

Opioide zur lokalen Ausschaltung schwerster Schmerzen bei Verletzung der Haut

**- In vitro Charakterisierung von nanostrukturierten
Trägersystemen -**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sarah Heilmann

aus Aschaffenburg

Berlin, im Dezember 2011

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting
Institut für Pharmazie, Pharmakologie und Toxikologie
Freie Universität Berlin
Königin-Luise-Straße 2+4
14195 Berlin

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Heinz Pertz
Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Biologie
Freie Universität Berlin
Königin-Luise-Straße 2+4
14195 Berlin

Disputation am: 24. Februar 2012

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting

in der Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie
des Instituts für Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

**Für
meine Familie
und
Christian**

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Monika Schäfer-Korting für die Vergabe des hochinteressanten Dissertationsthemas, die ausgezeichnete Betreuung sowie die stetige Unterstützung und Förderung im Verlauf der Arbeit. Ihre stete Gesprächsbereitschaft und wissenschaftliche Kompetenz haben wesentlich zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Für die Erstellung des Zweitgutachtens möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. Heinz Pertz bedanken.

Danken möchte ich auch Frau Professor Dr. Johanna Plendl, Institut für Veterinär Anatomie, und Herrn Professor Dr. Christoph Stein, Institut für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Charité Berlin, für die Bereitschaft mich als Mentoren innerhalb des DRS-Betreuungsteams zu unterstützen.

Frau Dr. Sarah Küchler und Herrn Prof. Dr. Günther Weindl danke ich für viele praktische Tipps und wissenschaftliche Anregungen.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Mehnert.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Frau Professor Dr. Schäfer-Korting danke ich für das gute Arbeitsklima, die angenehme Zusammenarbeit und den wissenschaftlichen Austausch untereinander. Besonderen Dank an:

- Frau Wiebke Klipper für die CYP-Aktivitätsbestimmung der Mikrosomen, vor allem aber für die vielen Gespräche und Diskussion, die außeruniversitären Unternehmungen und die Freundschaft, die im Laufe dieser Zeit entstanden ist. Grazie mille!
- Frau Franzisca Marie Bätz für die vielen Gespräche und Diskussionen im beruflichen und privaten Bereich.
- Frau Dominika Henkes für die Erkenntnis, dass Kaffee ein wichtiger Bestandteil des Lebens ist, und die vielen Stunden gemeinsamen Leidens an so manchem Montag.
- Frau Nhung Do-Sydow für die vielen schönen Mensa-Besuche und Kaffeepausen.
- Frau Maja Natek für den Sonnenschein, den sie in unser Labor gebracht hat und die gemeinsame Leidenschaft für „George“!

- Frau Gabriele Roggenbuck-Kosch und Frau Barbara Brüggener für Ihr offenes Ohr und die stete Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen.
- Frau Hannelore Gonska für die Hilfe beim Isolieren der Zellen.
- Herrn Mohammad Yahya Momin für die SLN-Stabilitätsbestimmung.

Herrn Christian Pabel möchte ich für die Liebe, die unendliche Geduld und den Rückhalt im privaten und beruflichen Bereich danken.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Eltern Ingrid und Albert Heilmann sowie meiner Schwester Eva Heilmann für die Unterstützung und den Rückhalt in allen Höhen und Tiefen dieser Arbeit bedanken.

Für das gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Frau Dominika Henkes und Herrn Christian Pabel.

Mein besonderer Dank gilt der Dr. Hilmer Stiftung zur Förderung der Forschung auf pharmazeutischem Gebiet, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Auch möchte ich der Dahlem Research School danken, für die Möglichkeit promotionsbegleitend an dem Postgraduiertenstudiengang „Biomedical Sciences“ teilzunehmen und für die finanzielle Unterstützung bei der Teilnahme am 40th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research, Helsinki 2010.

Originalarbeiten

Küchler, S. & Wolf, N.B., Heilmann, S., Weindl, G., Helfmann, J., Yahya, M.M., Stein, C., Schäfer-Korting, M., 3D-Wound healing model: Influence of morphine and solid lipid nanoparticles. Journal of Biotechnology, 2010. 148: p. 24-30

Poster

Wolf, N.B., Heilmann, S., Kleuser, G., Weindl, M., Radowski, R., Haag, R., Schäfer-Korting, M.: Influence of opioids on wound healing – an in vitro study. American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting, Los Angeles, CA 2009

S. Heilmann, S. Küchler, N.B. Wolf, M.M. Yahya, M. Schäfer-Korting: Morphine loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for local treatment of large-scale skin wounds. 40th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research, Helsinki 2010

S. Heilmann, S. Küchler, N.B. Wolf, M.M. Yahya, M. Schäfer-Korting: Morphine loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for local treatment of large-scale skin wounds. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Mikrozirkulation und Hämorheologie, Berlin 2010

S. Heilmann, S. Küchler, C. Stein, C. Müller-Goymann, M. Schäfer-Korting: Morphine loaded hydrogels for the local treatment of large-scale skin wounds. Doktorandentagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Heringsdorf 2011

Vorträge

S. Heilmann, S. Küchler, M. Schäfer-Korting: Morphine loaded hydrogels for the local treatment of large-scale skin wounds. Berlin Forum – Inflammation in context of pain and disease, Berlin 2011

Preise

Posterpreis für junge Forscher der Deutschen Gesellschaft für Klinische Mikrozirkulation und Hämorheologie, Berlin 2010

Originalarbeiten in Vorbereitung

Heilmann, S., Küchler, S., Stein, C., Müller-Goymann, C., Schäfer-Korting, M.: A thermosensitive hydrogel for the treatment of large-scale skin wounds

Klipper, W., Heilmann S., Henkler, F., Jäckh, C., Brinkmann, J., Liebsch, M., Landsiedel, R., Luch, A., Küchler, S., Korting, H.C., Weindl, G., Schäfer-Korting, M.: Biotransformation capacity of human skin – testosterone and morphine as example (Arbeitstitel)

Stipendien

Promotionsstipendium der Dr. Hilmer Stiftung zur Förderung der Forschung auf pharmazeutischem Gebiet

Reisestipendium der Dahlem Research School für das 40th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research, Helsinki 2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Die Haut	5
1.2	Aktuelle Methoden zur Behandlung schwerster Verletzungen der Haut.....	7
1.3	Charakterisierung von Morphin und seinen Rezeptoren	8
1.3.1	Morphin	8
1.3.2	Opioidrezeptoren.....	10
1.3.3	Opioidrezeptoren in der Haut	12
1.4	Opioide in der Schmerztherapie	13
1.5	Feste Lipidnanopartikel (Solid Lipid Nanoparticles – SLN)	18
1.6	Hydrogele.....	20
1.7	Einfluss von Morphin, SLN und Hydrogelen auf die Wundheilung	22
1.8	Zielsetzung.....	23
2	Material	26
2.1	Geräte.....	26
2.2	Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	28
2.3	Zellen/Zelllinien	31
2.4	Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur	32
2.5	Rekonstruierte humane Vollhautmodelle	34
2.6	Weitere Lösungen	35
2.6.1	Opioid-Stammlösungen.....	35
2.6.2	Lösungen für die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	35
2.6.3	Lösungen für Gelelektrophorese und RNA-Quantifikation	36
2.6.4	Lösungen für den β -Glucuronidase-Assay.....	37
2.6.5	Lösungen für Freisetzungs- und Hautresorptionsuntersuchungen.....	38
3	Methoden	40
3.1	Zellkultur	40
3.2	HPLC	42
3.3	β -Glucuronidase-Assay	47

3.4	Untersuchungen zur Genexpression	48
3.5	Metabolismus von Morphin in Hautzellen	52
3.6	SLN-Herstellung und Charakterisierung	54
3.7	Hydrogelherstellung und Charakterisierung.....	56
3.8	Freisetzungsuntersuchungen	58
3.9	(per-) kutane Resorption (Penetration und Permeation)	60
3.10	Statistik	62
4	Ergebnisse	64
4.1	Etablierung der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC).....	64
4.2	β -Glucuronidase-Assay	71
4.3	UGT2B7-Genexpression und Bestimmung der Enzymaktivität in der Haut.....	72
4.4	Feste Lipidnanopartikel (SLN) als Träger von Morphin.....	75
4.4.1	Partikelcharakterisierung.....	75
4.4.2	Freisetzung von Morphin aus SLN-Dispersionen und bei Inkorporierung in Hydroxyethylcellulose Gel DAB	76
4.5	Hydrogele.....	79
4.5.1	Entwicklung eines Morphin-beladenen Lutrol [®] F x Hydrogels.....	79
4.5.2	Einfluss der Konzentration des Gelbildners und des pH-Wertes des Lutrol [®] F 127 Gels auf die Freisetzung.....	80
4.5.3	Morphin-Freisetzung aus Lutrol [®] F 127 25% Gel im Vergleich zu Hydroxyethylcellulose Gel DAB über 48 Stunden	82
4.6	(Per-) kutane Resorption: Penetration und Permeation von Morphin aus Hydrogelen in rekonstruierte Humanhaut (RHS)	84
5	Diskussion.....	87
5.1	Etablierung der HPLC-Analytik	87
5.2	β -Glucuronidase-Assay	89
5.3	Metabolismus von Morphin in der Haut	90
5.4	Trägereffekte.....	92
5.4.1	Feste Lipidnanopartikel als Träger für Morphin.....	92
5.4.2	Hydrogele als Träger für Morphin	95
5.4.3	(Per-) kutane Resorption (Penetration und Permeation).....	99

5.5	Ausblick.....	101
6	Zusammenfassung.....	104
7	Summary.....	106
8	Literatur.....	109
9	Lebenslauf.....	119
10	Abkürzungsverzeichnis.....	120

Einleitung

1 Einleitung

1.1 Die Haut

Die Haut stellt mit einer Größe von fast 2 m² und einem Anteil von 10 % der Körpermasse das größte Organ des menschlichen Körpers dar [1]. Sie erfüllt nicht nur wichtige Schutz- und Sinnesfunktionen, sondern ist auch maßgeblich an der Wärmeregulation und dem Stoffwechsel beteiligt. Anatomisch lässt sie sich in drei Schichten einteilen (Abbildung 1): *Epidermis*, *Dermis* (= *Cutis*) und *Hypodermis* (= *Subcutis*). Ihre physiologischen Eigenschaften und der anatomische Aufbau sind allerdings stark von regionalen Unterschieden geprägt. So haben die Dicke der Epidermis bzw. der Hornschicht (= *Stratum corneum*), die Verteilung von Haarfollikeln und Drüsen, wie auch die Schichtdicke von Dermis und subkutanem Fettgewebe einen erheblichen Einfluss auf die (per)kutane Aufnahme und damit auch auf die dermale Therapie [2].

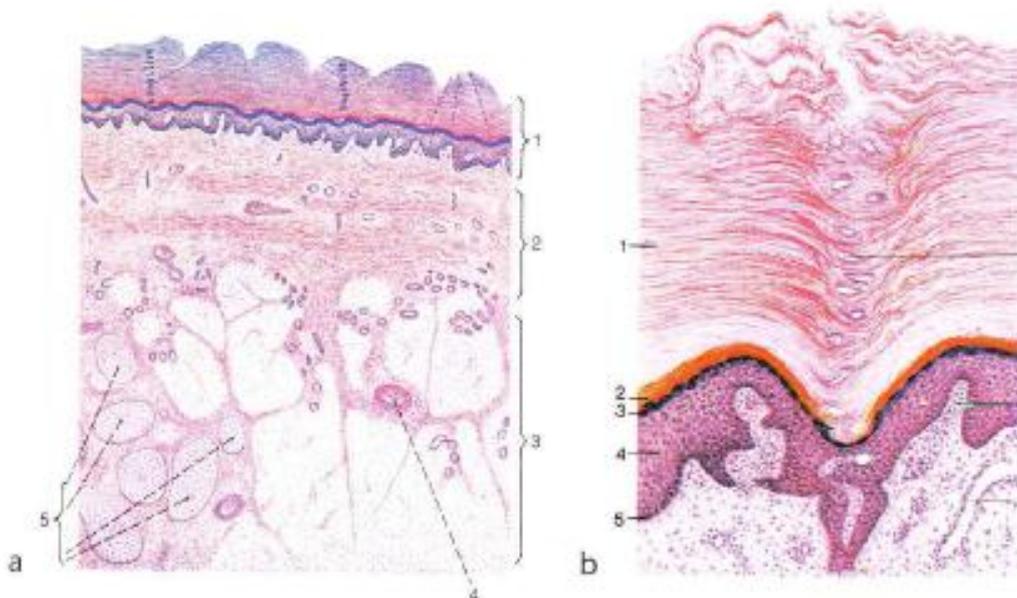


Abbildung 1. Schematischer Aufbau der Haut (a): 1 = Epidermis, 2 = Dermis, 3 = Subcutis, 4 = Blutgefäß, 5 = Lamellenkörperchen [3]. Schematischer Aufbau der Epidermis (b): 1 = *Stratum corneum*, 2 = *Stratum lucidum*, 3 = *Stratum granulosum*, 4 = *Stratum spinosum*, 5 = *Stratum basale* [4].

Epidermis. Mit einer Schichtdicke von 0,04 - 1,6 mm stellt die Epidermis ein mehrschichtiges Plattenepithel dar, das hauptsächlich aus Keratinozyten besteht. Darin eingebettet sind Melanozyten, Langerhans-Zellen sowie Merkel-Zellen. Wie in Abbildung 1

dargestellt, kann die Epidermis in vier mikroskopisch gut differenzierbare Schichten eingeteilt werden: *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum* und *Stratum corneum*. Das *S. basale* (Basalschicht) ist vor allem durch zylindrische Zellen gekennzeichnet [2]. Die Basalmembran, die über Hemidesmosomen mit den Keratinozyten verbunden ist, trennt das *S. basale* von der Dermis. Im *S. spinosum* (Stachelzellschicht) sind die Keratinozyten mehrschichtig angeordnet und untereinander durch Desmosomen verbunden. Ihre Form flacht langsam ab, der Zytoplasmaanteil steigt, und es können große Mengen an Keratintonofilamenten nachgewiesen werden [1]. An diese Schicht schließt das *S. granulosum* (Körnerzellschicht) an, welches besonders durch basophile Keratohyalin-haltige Granula gekennzeichnet ist. Hier findet keine weitere Keratin-Neusynthese statt. Mit einer Dicke von 10 - 20 µm stellt das *S. corneum* (Hornschicht) die äußerste der vier Epidermisschichten dar und ist wesentlich an der Schutz- und Barrierefunktion der Haut beteiligt. Die in der Basalschicht gebildeten Keratinozyten erfahren über einen Zeitraum von 20 - 30 Tagen eine im *S. spinosum* und *granulosum* fortschreitende Differenzierung. In der Hornschicht schließlich haben sie sich vollständig zu Korneozyten umgewandelt. Dies geht einher mit einem Verlust des Zellkerns, einer plattenförmigen Abflachung und einer deutlich sichtbaren Verhornung der Zellen [2]. Die Korneozyten sind in 15 - 25 Schichten backsteinartig angeordnet und in eine interzelluläre Lipidmatrix eingebettet. Die Lipidmatrix besteht hauptsächlich aus drei unterschiedlichen Lipidgruppen, den Ceramiden, Cholesterol und freien Fettsäuren (meist C₂₂ und C₂₄) [5]. Korneozytenstruktur und Zellanordnung im *S. corneum* bedingen die protektiven Eigenschaften, wie beispielsweise die Abwehr externer physiko-chemischer Einflüsse [2]. Die Barriere-Funktion wird durch die regelmäßige Abschilferung, die sogenannte Desquamation, der obersten Zellschicht unterstützt.

Dermis. Bei einer Dicke von 0,1 - 0,5 cm besteht die Dermis hauptsächlich aus Kollagenfasern (~ 70 %) und elastischem Bindegewebe. Funktionell kann sie in zwei Schichten eingeteilt werden. Das *Stratum papillare* (Papillarkörper), das durch die Basalmembran von der Basalschicht der Epidermis abgetrennt ist, dient u.a. der Ernährung der Epidermis [1]. Den größten Teil der Dermis aber nimmt das *Stratum reticulare* ein. Es besteht aus einem Netzwerk kollagener Faserbündel, in das grobe elastische Fasern, Zellen und Blutgefäße eingebettet sind. Bei den Zellen handelt es sich hierbei hauptsächlich um Fibroblasten, die Bestandteile des Bindegewebes wie beispielsweise Kollagenfasern produzieren. Des Weiteren sind Mastzellen und Melanozyten in der Dermis zu finden [2]. Weitere Funktionen neben der Versorgung der Epidermis mit Nährstoffen sind die Beteiligung an der Temperatur- und der Druck-Schmerz-Regulation.

Hypodermis. Durch Kollagen und elastische Fasern mit der Dermis verbunden schließt die Hypodermis direkt an diese an. Sie besteht hauptsächlich aus Fettläppchen, die von Bindegewebssepten umgeben sind. In diesen Septen verlaufen Nerven sowie Blut- und Lymphgefäße, die sich von hier bis ins *S. reticulare* der Dermis ziehen. Ebenfalls finden apokrine und ekkrine Schweißdrüsen sowie Haarbulbi hier ihren Ursprung. Aufgrund ihres Aufbaus fungiert die Hypodermis als Nahrungsdepot, Temperaturisolator und mechanisches Polster [2].

1.2 Aktuelle Methoden zur Behandlung schwerster Verletzungen der Haut

Die gängigste Methode zur Behandlung schwerster Verletzungen der Haut, wie beispielsweise nach Verbrennungen oder bei *Ulcus cruris*, ist das Debridement oder Ausschneiden der Wunde, gefolgt von Wundverschluss durch Hauttransplantation [6]. Dieses Verfahren wurde das erste Mal um 1600 in Gaspare Tagliacozzis „*De curtorum chirurgia per insitionem (Libri duo)*“ beschrieben [7]. Gemäß der Herkunft der Haut unterscheidet man Eigenhaut- von Fremdhauttransplantation. Bei Letzterer kann die Haut entweder von einem kürzlich verstorbenen Menschen oder einer anderen Spezies, wie beispielsweise dem Schwein, stammen. Nachteilig zu beurteilen ist hier allerdings, dass es nach einiger Zeit meist zu einer immunologischen Abstoßung des Transplantats kommt. Die Fremdhaut wird als eine Art „biologischer Verband“ verwendet, der den Wasser- und Proteinverlust der verletzten Haut einschränken und ein Heilen der Wunde unterhalb des Transplantats ermöglichen soll [7]. Eigenhauttransplantate werden meist aus dem Bereich des Gesäßes bzw. der Oberschenkel gewonnen. Generell kann die Haut als Vollhaut oder Spalthaut transplantiert werden. Das Vollhaut-Transplantat besteht aus Epidermis und Dermis und wird vor allem bei Wunden im Gesicht angewandt, da eine ästhetische Abheilung ohne entstellende Narbenbildung hier besonders erwünscht ist. Bei sehr schweren und großflächigen Verbrennungen werden Spalthaut-Transplantate verwendet, die aus Epidermis und kleinen Teilen der Dermis bestehen, die jedoch zu einer stärker sichtbaren Narbenbildung führen. Dabei können auch Netze der Spalthaut verwendet werden, um eine größere Fläche bedecken zu können [7]. Als Alternative zur Entnahme von Haut stehen auch aus Hautzellen gezüchtete Hautkonstrukte zur Transplantation (so genannte „skin substitutes“) zur Verfügung [8].

Eine große Herausforderung stellen nicht nur Schmerzen aufgrund der schweren, zu behandelnden Verletzung dar. Ein deutlich stärkerer Schmerz geht vielmehr von der Stelle der Transplantatentnahme aus [9, 10]. Vor allem bei schweren Verbrennungen treten zudem

unterschiedliche Schmerzarten parallel auf. Dazu gehören kontinuierliche Schmerzen und spontan auftretenden Durchbruchsschmerzen, die in ihrer Ausprägung und Intensität variieren können. Belastend für den Patienten ist aber auch die Versorgung und Behandlung der Wunden selbst. So wird der Verbandwechsel beispielsweise als besonders schmerzhaft beschrieben [11]. Aufgrund der Effektivität und der Vielfalt an Opioiden, die eine unterschiedliche Wirkstärke und -dauer aufweisen, sind sie die erste Wahl zur Schmerztherapie. Allerdings sind sie bei systemischer Gabe auch mit einigen sehr schweren Nebenwirkungen, wie beispielsweise Atemdepression, und einer ausgeprägten Toleranzentwicklung assoziiert. Je nach Bedarf und Zustand des Patienten werden sie oral in retardierter Form oder intravenös appliziert. Oft angewandt werden dabei Morphin, Oxycodon, Fentanyl, Remifentanyl, Alfentanyl und auch Methadon [9]. Die Komedikation mit Paracetamol, Clonidin oder verschiedenen Anxiolytika hat sich aufgrund synergistischer Effekte als positiv erwiesen, da dadurch die Opioid-Dosis reduziert werden kann [9]. Um Nebenwirkungen zu reduzieren und eine lokale Analgesie am Ort der Schmerzentstehung zu erreichen, bietet sich eine topische Opioidtherapie an [12]. Diese ist bislang aber noch nicht etabliert. Eine Alternative zur Schmerzreduktion bzw. -unterdrückung an der Entnahmestelle des Transplantats bietet die gezielte Blockade von Hauptnervensträngen durch den Fascia-iliaca-Block [13].

1.3 Charakterisierung von Morphin und seinen Rezeptoren

1.3.1 Morphin

Bei Morphin (siehe Abbildung 2) handelt es sich neben Codein, Thebain, Noscapin und Papaverin um eines der fünf Hauptalkaloide des Opiums, dem getrockneten Milchsaft aus *Papaver somniferum* (Schlafmohn).

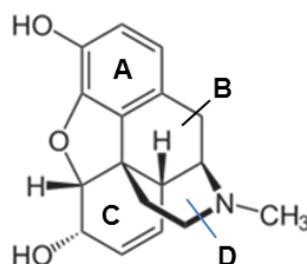


Abbildung 2. Strukturformel Morphin

Geschichtlicher Hintergrund. Schlafmohn wurde bereits 5000 v. Chr. von den Ägyptern und Sumerern aufgrund seiner medizinischen Wirkung eingesetzt. Eine Beschreibung der Gewinnung, Wirkung und therapeutischen Anwendung des Opiums erfolgte im 1. Jahrhundert n. Chr. durch Plinius und Dioskurides. Der deutsche Apotheker Friedrich Wilhelm Sertürner konnte 1804 erstmals einen alkaliähnlichen Stoff aus Opium isolieren, den er nach Morpheus, dem griechischen Gott der Träume und des Schlafes benannte [14]. Die strukturelle Aufklärung des Morphins erfolgte im Jahr 1924, wodurch der Weg für die Entwicklung von vollsynthetischen Opioiden der Pethidin- und Methadon-Klassen geebnet war.

Chemisch-strukturelle Charakterisierung. Bei Morphin handelt es sich um ein hydriertes Phenanthren-Derivat, das zusätzlich eine Isochinolin-Struktur mit 5 chiralen C-Atomen enthält. Aufgrund der phenolischen Hydroxylgruppe, die einen pK_S -Wert von 9,9 aufweist, und dem tertiären Amin mit einem pK_S von 8,1 handelt es sich bei Morphin um eine amphotere Verbindung, die sowohl in Säuren als auch Laugen leicht löslich ist. Die Morphinbase ist im Gegensatz zu Morphinhydrochlorid in Wasser nur schwer löslich. Morphin ist T-förmig aufgebaut: Ring C und D (siehe Abbildung 2) sind senkrecht zu der Ebene von Ring A und B angeordnet. Wichtig für die Affinität des Morphins zu den Opioidrezeptoren ist ein sterisch fixierter, aromatischer Substituent an einem quartären C-Atom, verbunden durch eine Kette von 2 C-Atomen mit einem basischen Stickstoff. Für die Wirksamkeit ist es essentiell, dass dieses C-Atom S-konfiguriert ist: Das andere Enantiomer weist keine zentrale Wirksamkeit auf.

Pharmakologische Charakterisierung. Morphin zählt zu den stark wirksamen Opioiden der WHO-Klassifikation der Stufe 3. Die Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt erfolgt sehr langsam. Aufgrund des sehr ausgeprägten First-Pass-Effektes beträgt die Bioverfügbarkeit von Morphin bei oraler Gabe nur 15-50 %. Die Halbwertszeit liegt zwischen 2 und 3 Stunden. Wie in Abbildung 3 dargestellt wird Morphin in der Leber durch UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT), hauptsächlich durch die Isoform 2B7, an den beiden Hydroxylgruppen in Position 3 und 6 glucuronidiert. Die dabei entstehenden Metabolite weisen ein unterschiedliches Wirkprofil auf: Der Hauptmetabolit Morphin-3-glucuronid (M-3-G) ist inaktiv, wohingegen Morphin-6-glucuronid (M-6-G) die gleichen analgetischen Effekte wie Morphin aufweist. Die Nebenwirkungen, die durch M-6-G hervorgerufen werden, sind weniger stark ausgeprägt als bei Morphin. An der Glucuronidierung sind zu einem kleinen Prozentsatz auch UGT1A1, 1A3, 1A6, 1A8, 1A9 und 1A10 beteiligt. Des Weiteren entsteht in geringen Mengen Normorphin durch Cytochrom P 450 Monooxygenasen (CYP) 3A4 und 2C8 [15].

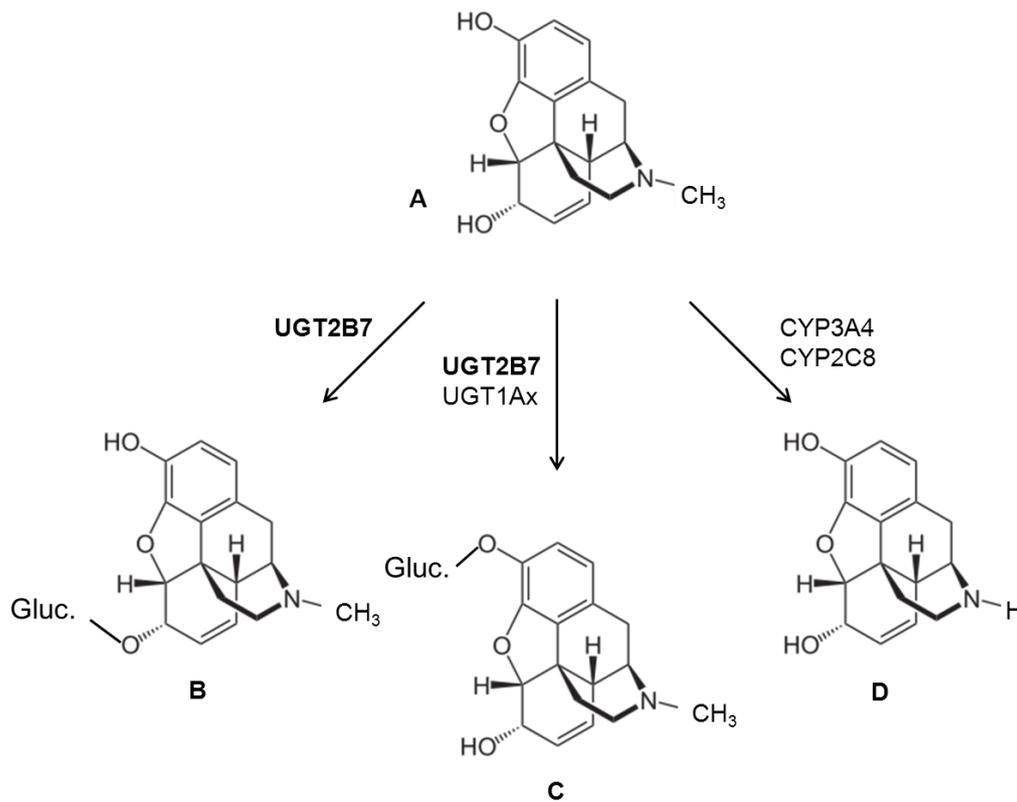


Abbildung 3. Schematische Darstellung des Metabolismus von Morphin und der zugehörigen Enzyme. A: Morphin, B: Morphin-6-glucuronid, C: Morphin-3-glucuronid; D: Normorphin. (modifiziert nach Maurer et al. [15])

1.3.2 Opioidrezeptoren

Opioidrezeptoren. Die Wirkung der Opiode wird durch Interaktion mit μ -, κ - und δ -Opioidrezeptoren (OR) hervorgerufen. Sie kommen in unterschiedlicher Dichte sowohl im Zentralnervensystem (prä- und post-synaptisch) als auch peripher im menschlichen Körper vor. Untereinander weisen die Opioidrezeptoren eine Homologie von > 60 % auf. Ferner ist ein vierter Rezeptor mit einer ähnlich hohen Homologie ORL-1 (opioid-like receptor) nachgewiesen worden. Da Opiode allerdings kaum Affinität zu ORL-1 zeigen, wird im Weiteren nicht näher auf ihn eingegangen. Die OR gehören zur Gruppe der G-Proteingekoppelten Rezeptoren. Ihre Aktivierung führt zu einer Hemmung der Adenylatcyclase und der Neurotransmitter-Freisetzung, einer Aktivierung hyperpolarisierender Kaliumkanäle und einer Inhibition spannungsabhängiger Calciumkanäle. Damit sinkt die Erregbarkeit von Neuronen. Charakteristisch für alle OR ist ein planares lipophiles Areal, an das die Aromaten der unterschiedlichen Opiode über van-der-Waals-Kräfte binden, ein anionisches Zentrum zur Bindung des protonierten Stickstoffs und eine Mulde zwischen den beiden Zentren, die

die sterisch fixierte C-C-Kette aufnimmt. Über Opioidrezeptoren vermittelte Wirkungen können durch Naloxon antagonisiert werden.

Endogene Liganden der Opioidrezeptoren. Verschiedene endogene Oligopeptide fungieren als körpereigene Agonisten an den Rezeptoren des schmerzhemmenden Systems. In Tabelle 1 sind die endogenen Liganden der OR und ihre Affinität zu den unterschiedlichen Rezeptoren dargestellt. Eine Gemeinsamkeit aller endogenen Opioid-Peptide ist die Aminosäuresequenz Tyr-Gly-Gly-Phe. Die 4-Hydroxyphenylgruppe des Tyrosins gleicht strukturell dem Ring A des Morphins (siehe Abbildung 2), und die Aminogruppe entspricht der tertiären Aminogruppe des Alkaloids.

Tabelle 1. Endogene Opioid-Peptide und deren Rezeptoraffinität (modifiziert nach Steinhilber et al. [16])

Endogenes Opioidpeptid	Rezeptorselektivität
Endomorphin-1	μ
Endomorphin-2	μ
β -Endorphin	$\mu = \delta$
Met-Enkephalin	$\delta > \mu$
Leu-Enkephalin	$\delta > \mu$
Metorphanid	$\mu \gg \delta > \kappa$
Dynorphin A	$\kappa \gg \mu$ und δ
Dynorphin B	$\kappa \gg \mu$ und δ
A-Neoendorphin	$\kappa \gg \mu$ und δ
Nociceptin	ORL-1

μ -Opioidrezeptor. Zu den μ -OR-vermittelten Wirkungen zählen vor allem Analgesie, Euphorie, Atmungshemmung, Hemmung der Magen-Darm-Motilität, Sedierung und Abhängigkeit. Im zentralen Nervensystem (ZNS) sind μ -Opioidrezeptoren hauptsächlich im Hirnstamm, im limbischen System und im Rückenmark anzutreffen. Aufgrund der hohen Rezeptordichte in direkter Nähe zu atem- und kreislaufregulatorischen Zentren kommt es neben der erwünschten Analgesie auch zu einer Beeinflussung dieser Vitalfunktionen durch Agonisten am μ -OR. Bei systemischer Opioid-Therapie ist daher immer sowohl mit der erwünschten Wirkung als auch mit einem Spektrum an Nebenwirkungen zu rechnen. Agonisten mit einer deutlichen Präferenz für den μ -OR sind beispielsweise Morphin, Oxymorphon und Fentanyl [17].

κ -Opioidrezeptor. Im Vergleich zu μ - ist die durch κ -Opioidrezeptoren vermittelte analgetische Wirkung schwächer ausgeprägt. Ein Auftreten von Atemdepression und Sedierung ist möglich. Besonders charakteristisch ist die durch κ -OR-vermittelte Dysphorie. κ -Opioidrezeptoren weisen eine hohe Dichte im Bereich des Kortex auf. Da die Rezeptordichte im limbischen System im Vergleich zu μ -OR sehr gering ist, weisen κ -OR-Agonisten ein geringeres Sucht- und Abhängigkeitspotential auf. Ein typischer Ligand für diesen Subtyp ist Ketocyclazocin [17].

δ -Opioidrezeptor. Die durch δ -Opioidrezeptoren hervorgerufene Analgesie ist am schwächsten ausgeprägt. Auch Euphorie, Dysphorie und Sedierung sind im Vergleich zu μ -OR weniger stark ausgeprägt, jedoch können Hemmungen des Atemzentrums und der Magen-Darm-Motilität auftreten. δ -OR sind vor allem im Gehirn anzutreffen, jedoch in einer geringeren Dichte als die beiden anderen OR. Met/Leu-Enkephalin sind typische Liganden für den δ -OR.

Pharmakologische Studien weisen zudem auf verschiedene Opioidrezeptor-Subtypen hin. So sind bereits je 2 von μ und δ sowie 3 Subtypen des κ -OR bekannt.

1.3.3 Opioidrezeptoren in der Haut

Eine wichtige Voraussetzung, um Opioide lokal therapeutisch anwenden zu können, ist das Vorhandensein von Opioidrezeptoren in der Haut. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten in den letzten Jahren die Existenz der OR sowohl in peripheren sensorischen Nerven [18] als auch in unterschiedlichen Zellen der Humanhaut, wie zum Beispiel normalen humanen Keratinozyten (NHK), normalen humanen dermalen Fibroblasten (NHDF) und epidermalen Melanozyten, nachweisen [19-21]. Bereits 1998 konnten Bigliardi et al. zeigen, dass der μ -OR sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in NHK, humaner Epidermis und dermalen Anhangsgebilden, wie beispielsweise Schweißdrüsen, exprimiert wird und aktiv ist [19]. Auch die Expression von δ - und κ -OR in der Haut und hier besonders in NHDF konnte von Salemi et al. gezeigt werden [20]. μ -OR werden vor allem in den basalen und suprabasalen, aber auch deutlich schwächer ausgeprägt in den subcornealen Schichten der Epidermis gebildet. NHK der subcornealen Schichten können ebenfalls β -Endorphin bilden. Bigliardi-Qi et al. zeigten, dass auch periphere Nervenendigungen in der humanen Epidermis und Dermis μ -OR exprimieren. NHK bilden Cluster in direkter Nähe zu diesen freien Nervenendigungen und beeinflussen mittels der β -Endorphin-Sekretion endogen das Schmerzempfinden beeinflussen [22]. Doch nicht nur μ -OR werden auf peripheren sensorischen Nerven

exprimiert. So beschreiben Stein et al 2001 in einer Übersichtsarbeit die Expression aller drei OR in peripheren Nervenendigungen und deren Hochregulation im Verlauf einer Entzündung [18]. Auch verschiedene Immunzellen bilden Opioidrezeptoren und stellen so eine wichtige Verbindung zwischen dem inflammatorischen Geschehen und der Schmerzentstehung bzw. -beeinflussung dar [21]. Aufgrund der Existenz von OR in der Haut erscheint eine lokale Therapie schwerster Hautwunden mit Opioiden möglich. Da hierfür wahrscheinlich geringe Dosen eingesetzt werden können und mit deutlich niedrigeren Blutspiegeln zu rechnen ist, sollten schwere Nebenwirkungen wie beispielsweise Atemdepression seltener auftreten. Das Problem der Toleranzentwicklung von Opioidrezeptoren gegenüber OR-Agonisten bleibt jedoch weiter bestehen [18].

1.4 Opiode in der Schmerztherapie

In der klinischen Praxis werden Opiode sowohl zur Behandlung akuter als auch chronischer Schmerzen unterschiedlicher Genese, mit Ausnahme von Neuropathien, eingesetzt. Aufgrund ihrer guten Wirksamkeit gibt es bisher keine andere Substanzklasse, die an ihrer Stelle verwendet werden könnte. Angewendet werden Opiode vor allem zur Behandlung intraoperativer, postoperativer und chronischer Schmerzen [17].

Intraoperative Anwendung. Ziel der modernen Narkose ist es, durch den Einsatz von Pharmaka mit selektivem Wirkprofil gezielt Analgesie, Bewusstlosigkeit und Muskelrelaxation zu erlangen. Besonders hervorzuheben ist hierbei, dass ausschließlich Pharmaka zum Einsatz kommen, die während des operativen Eingriffs Kreislaufstabilität und neurovegetative Stabilisierung gewährleisten. Der intraoperative Einsatz starkwirksamer, zentral angreifender Opiode, wie beispielsweise Dextromoramid und Phenoperidin, blockiert direkt durch den operativen Eingriff ausgelöste Schmerzen. Dies wirkt sich auch positiv auf die postoperative Phase aus: Schmerzen treten nach einer opioidhaltigen Narkose deutlich verzögert auf [17].

Postoperative Anwendung. Auch postoperative Schmerzen zählen zu den akuten Schmerzen. Auslöser sind neben der durch chirurgische Inzisionen bedingten Stimulation von Haut- und Muskelnozizeptoren eine viszerale und spastische Komponente aufgrund des starken Zuges z.B. an Muskeln des Peritoneums. Bei der Behandlung postoperativer Schmerzen werden konstante, ausreichend hohe Opioidkonzentrationen im Blut angestrebt,

um eine gleichmäßige Rezeptorbesetzung und damit eine kontinuierliche Blockade der schmerzvermittelten Afferenzen zu gewährleisten, um Durchbruchschmerzen zu vermeiden. Die Applikation der Opioide erfolgt daher meist oral in Form von Retardformulierungen, eine intravenöse Applikation ist aber auch möglich. Um den individuellen Analgetikabedarf des Patienten stärker zu berücksichtigen, kann auch die sogenannte Patienten-kontrollierte Analgesie angewendet werden, bei der sich der Patient „bei Bedarf“ per Knopfdruck selbst eine zuvor festgelegte Dosis mittels einer Infusionspumpe applizieren kann [17]. Die Auswahl des Opioids erfolgt weniger nach der Wirkstärke als nach der Wirkdauer, der Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Atemdepression und anderer möglicher Nebenwirkungen. Neben Morphin und Pethidin zählt Piritramid wegen seiner mittleren Wirkdauer von 6 Stunden und der geringen Inzidenz für das Auftreten von Atemdepression zu den am häufigsten eingesetzten Opioiden für die postoperative Therapie. Ferner wird auch der gemischtwirkende Agonist/Antagonist Buprenorphin eingesetzt, da er eine Wirkdauer von 8 - 10 Stunden aufweist und durch Antagonismus am μ -Opioidrezeptor das Auftreten von Atemdepressionen vermieden werden kann. Zur Behandlung postoperativer Schmerzen nach ambulant durchgeführten Operationen wird Dihydrocodein oral in retardierter Form eingesetzt [17].

Anwendung bei chronischen Schmerzen. Zur Langzeittherapie chronischer, sehr starker Schmerzen, wie sie beispielsweise bei Tumoren auftreten können, werden Opioide gemäß des Stufenplans der WHO eingesetzt. Die orale oder auch transdermale Therapie ist der intravenösen Applikation vorzuziehen, da die Selbstständigkeit des Patienten so weitgehend erhalten bleibt. Durch Verwendung von galenisch retardierten Präparaten kann eine kontinuierliche Wirkstofffreisetzung und damit ein konstanter Blutspiegel erreicht werden, was für die Langzeittherapie chronischer Schmerzen unabdingbar ist. So werden in der Praxis vor allem oral applizierbare Retardpräparate von Morphin, Oxycodon und Hydromorphon verwendet, die alle 8 - 12 Stunden eingenommen werden müssen. Transdermale therapeutische Systeme, wie sie beispielsweise in Form von fentanyl- bzw. buprenorphin-haltigen Pflastern zur Verfügung stehen, bieten eine noch längere Wirkstofffreisetzung bis zu 72 bzw. 96 Stunden. Bei der Langzeitanwendung von Opioiden ist mit dem Auftreten verschiedener Nebenwirkungen wie Atemdepression und Obstipation zu rechnen. Da 90 % der Patienten im Laufe der Therapie eine Obstipation entwickeln, ist die gleichzeitige Gabe eines Laxans angezeigt. Groß-angelegte Studien konnten zeigen, dass unter der chronischen Opioidtherapie die Inzidenz für eine Sucht- und Abhängigkeitsentwicklung nur sehr gering ist. Auch mit einer Toleranzentwicklung ist nur in sehr seltenen Fällen zu rechnen [17].

Weitere Applikationsarten. Zur Behandlung post-operativer Schmerzen können Opioide nicht nur intravenös, sondern auch intrathekal oder peridural appliziert werden. Dadurch kann die Schmerzweiterleitung an der ersten Schaltstelle der sensorischen Afferenzen unterdrückt werden. Es resultiert eine längere und stärkere Wirkung, die weitgehend regional begrenzt ist und sich durch eine geringe Inzidenz an Nebenwirkungen in Form von sensorischen, sympathischen oder motorischen Ausfallstörungen im Vergleich zur systemischen Applikation auszeichnet. Um den Firstpass-Effekt zu reduzieren und die Bioverfügbarkeit bei der Behandlung chronischer Schmerzen zu erhöhen, können Opioide auch rektal oder transdermal appliziert werden. Rektal werden Opioide vor allem bei Patienten mit Schluckbeschwerden eingesetzt [17].

Lokale Anwendung von Opioiden. Eine Vielzahl von Fallberichten und kleinen Studien hat sich bisher mit der Frage beschäftigt, ob eine ausreichende Analgesie mit dermal applizierten Opioiden erreicht werden kann [12]. Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Untersuchungen kurz zusammengefasst werden.

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse erster vielversprechender Fallberichte zusammengefasst, bei denen der topische Effekt von Opioiden zur Analgesie bei schweren Hautwunden unterschiedlichster Genese untersucht wurde. Bei fast allen Patienten konnten die Schmerzintensität durch lokale Opioid-Applikation reduziert werden, ohne dass es zu einem Auftreten starker Nebenwirkungen kam. Wurden die Schmerzen zusätzlich mit systemisch applizierten Opioiden behandelt, konnte in einzelnen Fällen auch die systemische Dosis reduziert werden [23-25]. Die topische Applikation erfolgte meist in Form von IntraSite-Gel, welches ein feuchtes Wundmilieu ermöglicht und das Debridement der Wunden erleichtert [12]. Das Fehlen von Kontrollgruppen und die sehr kleinen Patientenpopulationen der Fallberichte sind nachteilig zu beurteilen. Daher sollen im Folgenden (siehe Tabelle 3) die Ergebnisse der in den letzten Jahren diesbezüglich durchgeführten Studien dargestellt werden.

Tabelle 2. Fallberichte zur topischen Opioidtherapie von Verletzungen der Haut. Es wurde eine Fokussierung auf für die vorliegende Arbeit relevante Hautverletzungen vorgenommen. N = Patientenzahl.

Quelle	Jahr	N	Wunde	Verwendetes Opioid	Effekt
Back et al. [26]	1995	2	Dekubitus	Diamorphin	+
Twillman et al. [25]	1999	1	Transplantatentnahmestelle	Morphin	+
		3	Dekubitus (Sakrum)		+
		2	Hautulzerationen (Brust bzw. Fuß)		+
		1	Beinlesionen		+
Krajnik et al. [27]	1999	2	Hautulzerationen (Bein bzw. Nacken)	Morphin	+
		1	Läsion an der Leiste	Diamorphin	+
Flock et al. [28]	2000	1	Hautulzerationen (Bein)	Diamorphin	+
Ballas [23]	2002	2	Hautulzerationen (Bein)	Oxycodon/ Meperidin	+
Watterson et al [29]	2004	2	Epidermolysis bullosa	Morphin	+
Gallagher et al. [24]	2005	2	Dekubitus (Steiß bzw. Gesäß)	Methadon	+
		1	Gesäßwunde nach Hämatom		-
Porzio et al. [30]	2005		Hautulzerationen am:	Morphin	
		2	- Brustbein		+
		3	- Fuß bzw. Sakrum bzw. Vulva		+
Van Ingen et al. [31]	2008	1	Hautulzerationen (Bein)	Morphin	+
Barker [32]	2009	1	Pyoderma gangrinosum (Brust)	Morphin	+

Tabelle 3. Klinische Studien zur topischen Opioidtherapie unterschiedlichster Hautwunden. *Die Lokalisation der Hautulzerationen wurde von den Autoren nicht näher charakterisiert.

Quelle	Jahr	N	Wunde	Verwendetes Opioid	Effekt	Randomisiert-kontrolliert
Long et al. [33]	2001	4	Verbrennungen	Morphin	+	+
Flock [34]	2003	13	Druckulzerationen	Diamorphin	+	+
Zeppetella et al. [35]	2003	5	Hautulzerationen (Bein)	Morphin	+	+
Abbas [36]	2004	17	Druckulzerationen*	Diamorphin	+	-
Zeppetella et al. [37]	2005	16	Hautulzerationen*	Morphin	+	+
Skiveren et al. [38]	2006	28	Wunden nach photodyn. Therapie (Verbrennungen)	Morphin	-	+
Welling [39]	2007	59	Verbrennungen	Morphin	-	+
Huptas et al. [40]	2011	30	Ulcus cruris	Morphin	+	-

Von zwei Ausnahmen [36, 40] abgesehen wurden die Studien randomisiert kontrolliert und verblindet durchgeführt. Flock et al. [34] und Zeppetella et al. [35, 37] wählten zusätzlich ein cross-over-Design. Sie konnten zeigen, dass durch die Applikation von Morphin- bzw. Diamorphin-beladenem IntraSite-Gel lokal analgetische Effekte erreicht wurden, ohne dass es zum Auftreten systemischer Nebenwirkungen kam. Hingegen wirkte die Behandlung mit unbeladenem IntraSite-Vehikel nicht-analgetisch. Skiveren et al. [38] untersuchten ebenfalls die analgetischen Effekte von topisch appliziertem Morphin bei Patienten mit einer Hautwunde nach einer photodynamischen Therapie. Sie konnten keinen Unterschied zwischen der Verum- und der Placebogruppe feststellen. Zu einem ähnlichen Ergebnis führte die Studie von Welling [39] an Patienten mit oberflächlichen Verbrennungswunden. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Behandlung mit Morphin-beladenem und unbeladenem IntraSite-Gel sowie dem herkömmlich verwendeten Jelonet-Wundverband gezeigt werden. Eine Ursache für das Ausbleiben eines positiven Effektes durch Morphin kann darin liegen, dass in beiden Fällen akute Wunden ohne Anzeichen einer Inflammation untersucht wurden. Die Expression von Opioidrezeptoren in peripheren Nervenendigungen der Haut wird durch inflammatorische Vorgänge induziert, daher kann das Ausbleiben eines Effektes eventuell in einer zu geringen Anzahl an Rezeptoren begründet liegen [12].

Eventuell kann auch die größere Stichprobenanzahl zu Fehlschlüssen geführt haben, wenn Verletzungen unterschiedlichen Schweregrades betrachtet wurden.

In welchem Ausmaß Opioide bei topischer Applikation systemisch resorbiert werden, ist zurzeit nicht ausreichend untersucht. Erste Untersuchungen [41] weisen darauf hin, dass die Resorption wenn überhaupt nur in sehr geringem Ausmaß stattfindet und von der Größe der Wunde abhängig ist. Obwohl in vielen Studien und Fallberichten ein positiver analgetischer Effekt gezeigt werden konnte, fehlen bis heute randomisiert kontrollierte Studien an einem ausreichend großen Patientenkollektiv. Auch das Auftreten systemischer Nebenwirkungen und die systemische Resorption müssen noch näher untersucht werden.

1.5 Feste Lipidnanopartikel (Solid Lipid Nanoparticles – SLN)

Feste Lipidnanopartikel (Solid Lipid Nanoparticles – SLN) sind eine Weiterentwicklung von Nanoemulsionen. Im Gegensatz zu diesen liegt das Lipid bei SLN bei Raum- und Körpertemperatur nicht flüssig sondern fest vor. SLN bestehen im Allgemeinen aus 5 - 10 % festen Lipids, 0,5 - 5 % Tensid und Wasser und weisen eine mittlere Partikelgröße zwischen 50 und 1000 nm auf. Der Begriff Lipid ist hierbei weitgefasst, so beinhaltet er Triglyceride, Partialglyceride, Fettsäuren, Steroide und Wachse [42]. Die verwendete Tensidkonzentration richtet sich nach der Art und Menge des eingesetzten Lipids. Für die dermale Applikation kommen folgende Tenside zur Anwendung: Poloxamer 188, Polysorbat 80, Lecithin, Tyloxapol, TegoCare® 450, Miranol® Ultra C32 und Saccharose-Fettsäureester. Da die Lipidmatrix der SLN hauptsächlich aus physiologischen Lipiden mit GRAS-Status (generally recognized as safe) aufgebaut ist, ist die Gefahr der akuten bzw. chronischen Toxizität bei oraler Gabe gering [42]. Ein Auftreten von Hautreizungen bei topischer Applikation, kann aufgrund dessen aber nicht ausgeschlossen werden. Um die topische Applikation zu vereinfachen, können SLN in Gele oder auch Cremes eingebettet werden [43].

Die Herstellung für die dermale Anwendung erfolgt meist mittels Hochdruckhomogenisation. Dabei kann auf die Verwendung - toxikologisch oft nicht unkritischer - organischer Lösemittel verzichtet werden und eine Vergrößerung des Herstellungsmaßstabs ist leicht möglich. Hierbei kann zwischen zwei unterschiedlichen Verfahren unterschieden werden: Der Heiß- und der Kalthomogenisation. In beiden Verfahren wird das Lipid bei Temperaturen oberhalb der Schmelztemperatur geschmolzen und der Arzneistoff in der Lipidphase dispergiert bzw. gelöst. Bei der Heißhomogenisation wird die Lipidschmelze anschließend wie in Kapitel 3.6 beschrieben weiterverarbeitet. Im Gegensatz dazu wird bei der Kalthomogenisation die

Arzneistoff-Lipidschmelze in flüssigem Stickstoff oder auf Trockeneis sehr schnell abgekühlt, so dass sich das Lipid wieder verfestigt. Anschließend werden durch Mahlen in einer Pulvermühle Partikel im Mikrometerbereich (50 - 100 μm) erhalten. Nach Dispergierung in einer wässrigen Tensidlösung erfolgt die Hochdruckhomogenisation bei Raumtemperatur oder niedriger [42]. Die Kalthomogenisation ist bei thermolabilen Stoffen zu bevorzugen und auch die Beladungskapazität hydrophiler Arzneistoffe ist höher, da diese sich nicht in der wässrigen Phase anreichern können [44]. Nachteilig ist zu bewerten, dass diese Methode im Vergleich zur Heißhomogenisation zu deutlich größeren Partikeln mit einer breiteren Größenverteilung führt [42].

Nanopartikel unterscheiden sich in der mittleren Partikelgröße, der Breite der Größenverteilung, der Beladungskapazität und dem Ort der Arzneistoff-Lokalisation. Die Bestimmung der mittleren Partikelgröße und der Größenverteilung erfolgt mittels der Photonenkorrelationsspektroskopie. Die Beladungskapazität beschreibt den prozentualen Anteil an Arzneistoff in Relation zur verwendeten Lipidmenge [42]. Interaktionen zwischen Arzneistoff und Trägersystem beeinflussen dessen Lokalisation. So kann dieser homogen in der Lipidphase gelöst bzw. dispergiert vorliegen oder sich in der Schale oder im Kern des Lipidnanopartikels anreichern. Eine weitere Möglichkeit ist die Adhäsion einzelner Arzneistoff-Moleküle oder -Cluster an der Lipidoberfläche. Durch die Wahl des Lipids, des Tensids und auch durch die Herstellungsmethode selbst kann die Lokalisation beeinflusst werden [43]. Die Wechselwirkungen zwischen der Substanz und dem Carrier können unter anderem durch die Raman-Spektroskopie beschrieben werden. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, bei dem die SLN-Dispersion einem sich ändernden elektromagnetischen Feld ausgesetzt wird. In Folge dessen ändern sich die Dipoldichte und -mobilität der Partikel in Abhängigkeit der Arzneistoffanreicherung im bzw. am Partikel. So nimmt die Partikelgröße durch zunehmende Inkorporation des Arzneistoffs im Lipid zu, wodurch die Dipolmobilität sinkt. Lagert sich der Arzneistoff hingegen an der Partikeloberfläche an, nimmt die Dipolmobilität kontinuierlich zu bis eine vollständige Besetzung der Partikeloberfläche erreicht ist, denn die Energie für die Bewegung der Dipole an der Oberfläche wird reduziert [45].

Die kolloidalen Lipidnanopartikel liegen in der Dispersion oftmals als Mizellen, gemischte Mizellen oder Liposomen vor. Daher kann es während der Lagerung zur Gelierung der Dispersion, zu Partikelwachstum oder auch zu einer Expulsion des Arzneistoffs kommen [42]. Um dies zu verhindern, sollte die Dispersion unter Lichtausschluss und bei Temperaturen zwischen 4 und 8° C gelagert werden. SLN-Dispersion sind in der Regel über einen Zeitraum von 3 bis 6 Monaten [46, 47], in einzelnen Fällen auch über 12 - 36 Monaten stabil [42].

SLN vereinigen die Vorteile anderer kolloidaler Träger und vermeiden deren negative Aspekte [42]. So ist beispielsweise ein Beladen der Carrier sowohl mit lipophilen als auch hydrophilen Substanzen möglich, und chemisch instabile Arzneistoffe können durch Inkorporation in die Lipidmatrix stabilisiert und vor Oxidation oder Hydrolyse geschützt werden. Eine derartige Steigerung der Stabilität konnte beispielsweise für Retinol und für Koenzym Q10 gezeigt werden [44]. Durch gezieltes Anreichern des Arzneistoffs in der Epidermis können Nebenwirkungen, die beispielsweise bei der systemischen Absorption von Podophylotoxin oder Isotretinoin nach dermalen Applikation in Form einer Creme auftreten können, reduziert oder optimalerweise vermieden werden [46-48].

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Möglichkeit einer gezielten und zeitlich verzögerten Wirkstofffreisetzung. Die Freisetzung aus festen Lipidnanopartikeln kann auf zwei verschiedene Weisen erfolgen: Wird innerhalb der ersten Stunden die gesamte Wirkstoffmenge freigesetzt, so spricht man von „burst-release“ [49, 50]. Die Freisetzung des Arzneistoffs über mehrere Tage bis hin zu mehreren Wochen, wie es beispielsweise für Prednisolon gezeigt werden konnte, bezeichnet man hingegen als verzögerte Freisetzung oder „sustained release“ [49].

Der Verbandswechsel bei schweren Hautwunden wie beispielsweise Verbrennungen ist für die Patienten sehr schmerzhaft. Des Weiteren besteht die Gefahr, dass durch Anhaften an der Wundauflage auch das neugebildete Epithel zerstört wird. Eine Darreichungsform zur dermalen Anwendung, die eine langanhaltende Analgesie ermöglicht und somit auch die Intervalle zwischen den jeweiligen Verbandswechseln vergrößert, ist daher wünschenswert. Für verschiedene SLN-Zubereitungen konnte, wie bereits beschrieben, eine verzögerte Arzneistofffreisetzung gezeigt werden. Morphin-beladene feste Lipidnanopartikel könnten somit eine Möglichkeit zur dermalen Behandlung schwerster Hautwunden eröffnen, um eine langanhaltende lokalinduzierte Analgesie zu erreichen.

1.6 Hydrogele

Bei Gelen handelt es sich um einphasige streichfähige Zubereitungen zur kutanen Anwendung. Die Unterteilung der Gele erfolgt nach der Zusammensetzung der flüssigen Komponente: Liegt eine wässrige Wirkstofflösung vor, so handelt es sich um ein Hydrogel. Ist sie hingegen ölig, so spricht man von einem Oleogel. Da der Fokus dieser Arbeit auf Hydrogele gerichtet ist, sollen diese im Folgenden näher beschrieben werden. Es handelt sich hierbei um wässrige Arzneistoff-Lösungen, die durch Zusatz makromolekularer

hydrophiler Substanzen ein Gel ausbilden. Als Gelbildner können anorganische Verbindungen, wie beispielsweise Bentonit oder Siliciumdioxid, oder organische Verbindungen, wie Celluloseether, Carbomere oder Poloxamere, eingesetzt werden. In Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration des Gelbildners entstehen Lösungen mit pseudoplastischem Fließverhalten, auch Sole genannt, oder plastische Körper. Zwischen Solen und Gelen besteht ein fließender Übergang. Der Gelbildner bildet ein makromolekulares Gerüst aus, in dem die flüssige Komponente durch Adsorption und mechanischen Einschluss immobilisiert wird. In Abhängigkeit von dem jeweiligen Gelbildner entstehen Linear-, Laminar- oder Sphärokolloidgerüste. Im makromolekularen Gerüst wird auch der Wirkstoff eingeschlossen, eine verzögerte Wirkstofffreisetzung ist möglich. Je stärker der Gelbildner durch das Wasser hydratisiert wird, desto langsamer kann der Wirkstoff durch die verbleibende Flüssigkeit diffundieren. Daher ist bei einem engmaschig ausgerichteten und stark hydratisierten Gel mit einer besonders langsamen Wirkstofffreisetzung zu rechnen. Poloxamer-Gele eignen sich zum Beispiel zur verzögerten Freisetzung von Phenolsulfophthalein [51], Naltrexon [52] und Fentanyl [53]. Die Freisetzungverzögerung lag hierbei zwischen 8 [51] und 48 Stunden [52]. Xyloglycan-basierte Hydrogele verzögerten die Freisetzung von Ibuprofen und Ketoprofen über einen Zeitraum von 24 Stunden [54]. Da Hydrogele aufgrund des hohen Wassergehalts auch einen kühlenden Effekt aufweisen, werden sie vor allem bei schmerzhaften und stark juckenden Hauterkrankungen als angenehm empfunden. Allerdings besteht bei Hydrogelen die Gefahr des Austrocknens und ein hohes Risiko für mikrobiellen Befall; dem wirkt ein Zusatz von Feuchthaltemitteln wie Glycerol, Mannit und Sorbit und eine Konservierung entgegen.

Da der Fokus dieser Arbeit auf der Entwicklung eines Poloxamer-Hydrogels liegt, sollen diese Gelbildner im Folgenden kurz charakterisiert werden: Poloxamere (Handelsname: Lutrol[®]) sind sogenannte Blockcopolymere, die aus zwei verschiedenen Bausteinen aufgebaut sind (siehe Abbildung 4): einer Propylenoxidkette (b), die von je einer Ethylenoxidkette (a) umgeben ist. Man unterscheidet die verschiedenen Poloxamere nach dem durchschnittlichen Polymerisationsgrad der beiden Ketten (siehe Tabelle 4).

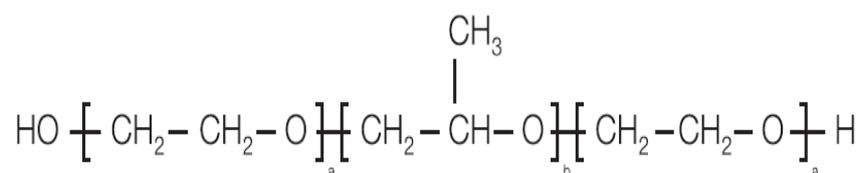


Abbildung 4. Allgemeine Strukturformel der Poloxamere [55]

Tabelle 4. Poloxamer-Zusammensetzung [55]

Poloxamer	Lutrol®	a	b
188	F 68	80	27
338	F 108	141	44
407	F 127	101	56

Sowohl Lutrol® F 108 als auch Lutrol® F 127 zählen zu den nichtionischen Tensiden und finden u.a. Verwendung als Verdickungsmittel und Lösungsvermittler. Zu ihren besonderen Charakteristika zählt jedoch die Fähigkeit in wässriger Lösung in einem Konzentrationsbereich von 16-30 % thermoreversible Gele zu bilden [56]. Auch Lutrol® F 68 gehört zu den nichtionischen Tensiden und wird in der pharmazeutischen Industrie als Benetzungsmittel, Lösungsvermittler und Emulgator eingesetzt. Aufgrund des hohen Anteils an Polyoxyethylen-Einheiten sind die verwendeten Gelbildner nahezu untoxisch [57] und können daher nicht nur topisch sondern auch bukkal, rektal, intraokular, intramuskulär und intravenös appliziert werden [56].

1.7 Einfluss von Morphin, SLN und Hydrogelen auf die Wundheilung

Morphin. Um die in Kapitel 1.2 beschriebene Möglichkeit einer lokalen Analgesie durch topische Opioide für die Behandlung schwerster Hautwunden nutzbar zu machen, muss ein möglicher Einfluss des Arzneistoffes bzw. des Trägersystems auf den Prozess der Wundheilung in Betracht gezogen werden. Der Einfluss von Morphin auf die Wundheilung wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In einem Wundheilungsmodell an Ratten (dorsale Exzisionswunde) beschleunigten topisch applizierte Opioide (Fentanyl, Hydromorphon und Morphin) in einer Hydrocreme-Formulierung die Wundheilung: Der makroskopische Wundverschluss 7 Tage nach Wundinduktion war deutlich stärker ausgeprägt und auch histologische Untersuchungen zeigten eine stärkere Reepithelialisierung, eine bessere dermale Organisation des Wundgewebes und ein dichteres Granulationsgewebe [58]. Andere Studien weisen jedoch auf eine Störung der Wundheilung nach topischer Applikation von Opioiden im Rattenmodell hin: So verlief der Wundverschluss in den ersten Tagen nach Wundinduktion (dorsale Exzisionswunde) deutlich langsamer nach topischer Applikation von Morphin in Intrasite® Gel als in der Kontrollgruppe [59]. Eine Ursache hierfür ist vermutlich

die Suppression der Freisetzung pro-inflammatorischer Neuropeptide, die vor allem in frühen Phasen der Wundheilung eine wichtige Rolle spielen [59]. Auf den endgültigen Wundverschluss scheint dies jedoch keinen Einfluß zu nehmen [60]. Die dermale Opioid-Behandlung führte ebenfalls zu einer geringeren Makrophageninfiltration im Wundbereich, einer niedrigeren Myofibroblastendichte und einer dünner ausgebildeten Epidermis [61]. Die Migration von Keratinozyten während der Reepithelialisierung ist ein weiterer wichtiger Schritt im Wundheilungsprozess. Wolf et al. zeigten 2009 im Migrations-Assay und dem Scratch Test, dass Morphin die Migration der Keratinozyten fördert [62] und in einem humanen 3D-Wundheilungsmodell den Wundverschluss einer Laser-induzierten Wunde beschleunigt [60].

Träger. Auch das Trägersystem selbst kann einen Einfluss auf den Prozess der Wundheilung haben. In dem oben beschriebenen Transwelltest und an der Laser-induzierten Wunde erwiesen sich feste Lipid-Nanopartikel als wirksam, sie stimulierten wie Morphin die Migration der Keratinozyten. Das Gleiche konnte für Morphin-beladene SLN gezeigt werden [60, 62]. Ein feuchtes Wundmilieu fördert die Wundheilung zusätzlich. Da Hydrogel-Wundverbände eine feuchte Wundumgebung fördern [63], stellt die Einbettung von SLN in ein Hydrogel ein besonders interessantes System für die Applikation von Opioiden zur lokalen Therapie von Wundschmerzen dar.

1.8 Zielsetzung

Vor dem Hintergrund der beschriebenen Wirkung von Morphin und dem Potential einer lokalen Opioid-Therapie bei schwersten Verletzungen der Haut, sollte eine Darreichungsform zur topischen Anwendung von Morphin entwickelt werden. Diese soll das Opioid kontinuierlich über einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden freisetzen, um eine dauerhafte Schmerzausschaltung bis zum nächsten Verbandswechsel zu gewährleisten. Das bisher verwendete IntraSite-Gel scheint diesen Anforderungen nicht gerecht zu werden, da dieses bereits nach 2 Stunden 50 % des Wirkstoffes freisetzt [12]. Die Darreichungsform darf auch die Wundheilung nicht beeinträchtigen bzw. sollte sie idealerweise fördern. Aufgrund der fehlenden Kenntnisse zur Biotransformation von Morphin in der Haut und dem Risiko einer damit verbundenen Inaktivierung bei nennenswertem Morphinmetabolismus galt es auch diesen zu untersuchen, um gegebenenfalls eine Dosisanpassungen vornehmen zu können.

Die Teilziele der vorliegenden Arbeit lassen sich daher wie folgt zusammenfassen:

- Etablierung einer Analytik zur Quantifizierung von Morphin und Detektion seiner Metabolite in biologischem Material
- Untersuchung des Metabolismus von Morphin in Hautzellen - Bestimmung der Genexpression von UGT2B7 und Untersuchung der Metabolisierung in einem Modellsystem
- Entwicklung einer Morphin-Formulierung mit verzögerter Wirkstofffreisetzung zur topischen Applikation unter Verwendung von festen Lipidnanopartikeln und/oder verschiedenen Hydrogelen
- Charakterisierung der (per-) kutanen Resorption von Morphin aus der Darreichungsform unter Verwendung von rekonstruierter Humanhaut

Material

2 Material

2.1 Geräte

Acculan 3 Ti	Aesculap, Tuttlingen
Agarosegeldetektionssystem BioDoc Analyse	Biometra, Göttingen
Brutschrank Heracell 240i	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Coulter LS 230	Coulter Cooperation, Miami, USA
Elektrophoresekammern	Biometra, Göttingen
Emulsiflex C5	Avestin, Mannheim
Filtrationseinheit Millipore®	Millipore-Waters, Eschborn
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200	Zeiss, Jena
Franz-Diffusionszelle, ø 15 mm	PermeGear, Bethlehem, Pa., USA
Hautstanzen 16 bis 25 (DIN 7200; ø 16 - 25 mm)	Bauhaus Berlin
Heraeus Instruments Function Line Typ B6	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
HPLC-Anlage Merck Hitachi	Merck Hitachi, Tokio, Japan
Autosampler L-7200	
Interface D-7000	
Pumpe L-7100	
UV-Detektor L-7400	
Fluoreszenz-Detektor L-7480	
HSM-Software D-7000	
LightCycler 480	Roche, Mannheim
Malvern Zetasizer ZS	Malvern Instruments, Malvern, UK

Neubauer Zählkammer	Zeiss, Jena
Nalgene® Cryo 1 °C Freezing Container	Nalge Nunc International Corporation, Rochester, NY, USA
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Nürnberg
Pipetten Eppendorf Reference®	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy®	Integra Bioscience, Fernwald
RO 10 power IKAMAG	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Savant SC 210 A Speed Vac Concentrator	Thermo Scientific, Langenselbold
Sg-Labostar 2-DI/-UV Reinstwasser-System	SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel
Sterilarbeitsbank LaminAir HB 2472	Heraeus, Hanau
Thermoblock: T-Gradient	Biometra, Göttingen
Thermo Haake DC10	Thermo Haake, Karlsruhe
Thermo Haake P5	Thermo Haake, Karlsruhe
TissueLyser II	Qiagen, Hilden
Ultraschallbad Sonorex® RK100	Bandelin, Berlin
Ultraschallbad USR 57	Merck Eurolab N.V., Belgien
Ultra-Turrax IKA® T25	IKA® Werke, Staufen
UV- Photometer GeneRay	Biometra, Göttingen
UVS 400 A Univ. Vac. System	Thermo Scientific, Langenselbold
Wasserbad DC3/W26	Haake, Karlsruhe
Vortex Genie 2™	Bender Hobein, Zürich, Schweiz
Zentrifuge Eppendorf 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge® 1.0R	Heraeus, Hanau

2.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Acetonitril, HPLC Gradient Grade	Fisher Scientific, Schwerte
Acetonitril, LiChrosolv®	VWR Merck, Darmstadt
Aesculap® Dermatorklingen	Aesculap, Tuttlingen
Albumin Fraktion V, proteasefrei	Carl Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
β-Glucuronidase, Type HP-2, from Helix pomatia (104130 units/ml β-Gluc., 835 units/ml Sulfatase)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
BD UltraPool™ HLM 150 (Mammalian Liver Microsomes)	BD Biosciences, Woburn, MA
Borsäure	VWR Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Citronensäure (wasserfrei)	Carl Roth, Karlsruhe
Codeinphosphat	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
Compritol® 888 ATO	Gattefossé, Weil a. Rh.
Cellulose Nitrate Membrane Filters (0,1 µm, ø 25 mm)	Whatman GmbH, Dassel
Desoxyribonuklease I (KIT)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriummethyldiamintetraacetat- Dihydrat (Na ₂ EDTA·2H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ ; wasserfrei)	Merck, Darmstadt
Dulbeccos Modified Eagles Medium	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Enosa Injektionskanülen (steril; 0,80x80 mm; Luer-Lock)	Rose, Trier

Ethylacetat, Chromasolv [®] Plus, for HPLC, 99.9%	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin
Filteraufsatz TPP rapid, 0,2 µm, PES	Biochrom, Berlin
Gelmarker: GeneRuler 50bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GelRed 10000x in water	Biotium, Hayward, CA, USA
Glycerol 85%	Caesar & Lorentz, Hilden
HPLC- Zubehör	Merck, Darmstadt
Säule: LiChroCART [®] 250-4 RP-8, 5 µm	
Vorsäule: LiChroCART [®] 4-4	
Autosamplergefäße: Vial 1,5 ml Klarglas	VWR, Darmstadt
Microinserts: 0,1 ml Klarglas	
Septen: 8 mm Silicon weiß/PTFE blau	
Schraubkappen: 8 mm mit Loch	
Humane Hautmikrosomen:	Biopredic International, Rennes, Frankreich
- Einzelspender (weiblich, 66 Jahre)	
- Pool (weiblich, 36 und 56 Jahre)	
Hydromorphonhydrochlorid	Fagron, Hamburg
Hydroxyethylcellulose 250 HX Pharm (= HEC 10000)	Fagron, Hamburg
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe
Keratinozytenbasalmedium	Lonza, Walkersville, MD, USA
Kryoröhrchen 2 ml	Biochrom, Berlin
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Lutrol [®] F 68 (Poloxamer 188)	BASF, Ludwigshafen
Lutrol [®] F 108 (Poloxamer 338)	BASF, Ludwigshafen
Lutrol [®] F 127 (Poloxamer 407)	BASF, Ludwigshafen
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl ₂ ·6 H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe

Membranfilter (Polyamid, 0,2 µm, ø 47 mm)	Schleicher & Schuell, MicroScience GmbH, Dassel
Membranfilter NC03 (Cellulosenitrat, 0,025 µm, ø 25 mm)	Whatman, Dassel
Methanol, HiPerSolv CHROMANORM	VWR, Darmstadt
Minimum Essentiell Medium Eagle	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Morphin	Gewinnung durch Morphinhydrochloridausfällung
Morphin-3-Glucuronid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Morphin-6-Glucuronid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Morphinhydrochlorid	Fagron, Hamburg
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumhydroxid-Plätzchen	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Nescofilm	Carl Roth, Karlsruhe
Nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom, Berlin
Nucleopore® Polycarbonate (Polycarbonat, 15 nm; ø 25 mm)	Whatman, Dassel
Omnifix®-F (0,01 ml/1 ml)	B. Braun, Melsungen
PCR-Stripes	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
pH-Papier (pH 8,0-10,0)	Macherey-Nagel, Düren
Plastik für die Zellkultur, TPP	Biochrom, Berlin
Primer	Tib Molbiol, Berlin
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
RNA-Isolierungs-Kit: NucleoSpin® RNA II	Macherey-Nagel, Düren
RPMI 1640 Medium	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Salzsäure, konzentriert	VWR Merck, Darmstadt

Substanzen für die quantitative PCR:	Roche, Mannheim
SYBR Green Master I	
H ₂ O, RNase-frei	
Multiwell-Platte	
Sealing Foil	
Supplements für das Keratinozytenwachstumsmedium	Lonza, Walkersville, MD, USA
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Trypsin	Biochrom, Berlin
UDP-glucuronic acid trisodium salt	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
UGT Reaction Mix Solution A (UDPGA Cofactor)	BD Biosciences, Woburn, MA, USA
UGT Reaction Mix Solution B (5x UGT Buffer Mix with Alamethicin)	BD Biosciences, Woburn, MA, USA
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf

2.3 Zellen/Zelllinien

primäre humane Keratinozyten (NHK)	isoliert aus juveniler Vorhaut; verwendete Passagen 1-3
primäre humane Fibroblasten (NHDF)	isoliert aus juveniler Vorhaut; verwendete Passagen 2-5
HaCaT Zellen (spontan immortalisierte Keratinozytenzelllinie)	DKFZ Heidelberg
HepG2 Zelllinie (human caucasian hepatocyte carcinoma)	European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK

2.4 Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur

Wachstumsmedium für Keratinozyten:

Rinderhypophysenextrakt

hEGF (human epidermal growth factor)

Insulin

Hydrocortison

Gentamicin

Amphotericin

in Keratinozytenbasalmedium (KBM;
genaue Konzentrationen sind nur dem
Hersteller (Lonza) bekannt)

Basalmedium für Fibroblasten:

2 mM L-Glutamin

100 I.U./ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

in Dulbecco's Modified Eagle Medium

Wachstumsmedium für Fibroblasten:

10% fetales Kälberserum

in Fibroblastenbasalmedium

Transportmedium:

100 I.U./ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

in Dulbecco's Modified Eagle Medium

Stoppmedium:

10 % fetales Kälberserum

100 I.U./ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

in Dulbecco's Modified Eagle Medium

<u>Basalmedium für HaCaT-Zellen:</u>	100 I.U./ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin in RPMI 1640 Medium
<u>Wachstumsmedium für HaCaT-Zellen:</u>	10 % fetales Kälberserum in HaCaT-Basalmedium
<u>Basalmedium für HepG2-Zellen:</u>	2 mM L-Glutamin 1% nicht essentielle Aminosäuren 100 I.U./ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin in Minimum Essential Medium Eagle
<u>Wachstumsmedium für HEPG2-Zellen:</u>	10% fetales Kälberserum in HepG2-Basalmedium
<u>Einfriermedium für alle 4 Zellarten:</u>	10 % DMSO 10 % fetales Kälberserum ad 100 % Dulbecco's Modified Eagle Medium
<u>Phosphatgepufferte Salzlsg. (PBS) pH 7,4:</u>	0,2 g/l KCl 8,0 g/l NaCl 0,2 g/l KH_2PO_4 1,44 g/l Na_2HPO_4 in Aqua bidest.

Trypsin-EDTA: 1,67 mg/ml Trypsin
0,67 mg/ml EDTA
in PBS

Lyse-Reagenz: 0,5% SDS
in Aqua bidest.

Alle Lösungen für die Zellkultur wurden bei 4 °C gelagert.

2.5 Rekonstruierte humane Vollhautmodelle

EpidermFT (EFT-400)

MatTek Corporation, Ashland,
MA, USA

Erhaltungsmedium für EFT-400

MatTek Corporation, Ashland,
MA, USA

2.6 Weitere Lösungen

2.6.1 Opioid-Stammlösungen

HPLC. Zur Weiterentwicklung der HPLC-Methode und für die Erstellung der Standardkurven für die quantitative HPLC-Messung wurden aus Hydromorphon-, Morphinhydrochlorid und Codeinphosphat Stammlösungen mit einer Konzentration von 10 mM in einer Mischung aus 0,05 M KH_2PO_4 -Puffer und Acetonitril (9:1) hergestellt. Von den Metaboliten Morphin-3-Glucuronid und Morphin-6-Glucuronid wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 mM hergestellt. Diese Stammlösungen wurden jeweils vor Versuchsbeginn schrittweise im selben Lösungsmittel weiterverdünnt, bis die geforderten Endkonzentrationen (siehe Kapitel 3.2) erreicht waren.

Zellkulturversuche. Für die Zellkulturversuche wurde aus Morphinhydrochlorid eine sterile Stammlösung mit einer Konzentration von 10^{-2} M in PBS mit einem Zusatz von 0,4% Albumin hergestellt. Durch schrittweises Verdünnen (1:10) mit dem jeweiligen Basalmedium wurden die Stimulationsmedien mit den Konzentrationen 10^{-5} M und 10^{-4} M für die Metabolisierungsversuche hergestellt.

Mikrosomen. Für die Metabolisierungsuntersuchungen mit Mikrosomen wurde Morphinhydrochlorid-Lösung 10^{-2} M und 10^{-3} M in gereinigtem Wasser hergestellt. Durch Verdünnung mit dem entsprechenden Reaktionspuffer wurden Endkonzentrationen von 10^{-4} M bzw. 10^{-5} M eingestellt.

Alle Lösungen wurden bei -20 °C gelagert.

2.6.2 Lösungen für die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Acetonitril: direkt vom Hersteller als Gradient Grade bezogen

Wasser: Für die HPLC-Messungen wurde stets bidestilliertes Wasser verwendet, welches direkt vor Gebrauch mittels eines $0,2$ μm Membranfilters aus Polyamid filtriert und anschließend entgast wurde.

Puffer (0,05 M KH_2PO_4): 6,80 g KH_2PO_4
in 1,0 l Aqua bidest.
Vor Gebrauch entgast und steril (0,2 μm) filtriert.

2.6.3 Lösungen für Gelelektrophorese und RNA-Quantifikation

DEPC-Wasser: 0,1% DEPC in Aqua bidest.
Inkubation über Nacht; danach Autoklavierung des Wasser um überschüssiges DEPC zu zerstören.

Tris 150 mM, pH 7,6: 1,817 g Tris-Base
in 90 ml DEPC-Wasser
pH mit konz. Salzsäure auf pH 7,6
ad 100,0 ml mit DEPC-Wasser

0,5 M Na_2EDTA : 186,12 g $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$
in Aqua bidest.
pH Einstellung auf 8,0 erfolgte mittels Natriumhydroxid
ad 1,0 l mit Aqua bidest.

10x TBE Puffer: 108 g Tris-Base
55 g Borsäure
40 ml 0,5 M Na_2EDTA
ad 1,0 l mit Aqua bidest.

Tris-HCl 10 mM pH 7,5: 0,3 g Tris-Base
in DEPC-Wasser
pH Einstellung auf pH 7,5 erfolgte mit konz. Salzsäure
ad 250,0 ml mit Aqua bidest.

GelRed-Färbelösung: 30 µl GelRed (10000x)-Lsg
in 200,0 ml Aqua bidest.

Probenpuffer (10x): 100 mg Bromphenolblau
100 mg Xylencyanol
33 ml Tris 150 mM pH 7,6
60 ml Glycerol 85%
7 ml DEPC-Wasser

Alle Lösungen wurden bei Raumtemperatur gelagert.

2.6.4 Lösungen für den β -Glucuronidase-Assay

0,2 M Na₂HPO₄- Puffer: 1,779 g Na₂HPO₄·2H₂O
in 50,0 ml Aqua bidest.

0,1 M Citronensäure-Lsg: 0,961 g Citronensäure (wasserfrei)
in 50,0 ml Aqua bidest.

Mcllvaine-Puffer pH 5,0 [64]: 20,6 ml 0,2 M Na₂HPO₄-Puffer
19,4 ml 0,1 M Citronensäure-Lösung
pH-Wert-Überprüfung erfolgte mittels eines pH-Meters

2.6.5 Lösungen für Freisetzungs- und Hautresorptionsuntersuchungen

PBS + 1,5% Albumin: 3,75 g Albumin
in 250,0 ml PBS
anschließend steril filtriert
Lagerung bei 4 - 8°C

0,02 M Na₂HPO₄-Puffer: 2,84 g Na₂HPO₄
in 100,0 ml Aqua bidest.

Methoden

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Normale humane Keratinozyten (NHK)

Primäre humane Keratinozyten wurden aus Humanhaut isoliert. Dafür wurde entweder juvenile Vorhaut, die bei Zirkumzisionen in kooperierenden chirurgischen Kliniken und Arztpraxen anfiel, oder Brust- und Abdominalhaut, die bei chirurgischen Eingriffen (HELIOS-Klinikum Emil von Behring; Klinik für Plastische und Ästhetische Chirurgie) gewonnen wurde, verwendet. Haut ohne erkennbare Krankheitszeichen („normale Haut“) wurde direkt nach dem Transport in Transportmedium mit PBS gewaschen, in eine Petrischale überführt und in ca. 0,20 cm² große Stücke geschnitten. Diese wurden für 20 h bei 4 °C in Dispase eingelegt, um die Epidermis von der Dermis zu lösen. Am nächsten Tag wurde die Epidermis vorsichtig mit einer Pinzette von der Dermis abgenommen, in ein Zentrifugenröhrchen mit Trypsin/EDTA überführt und für 2 Minuten bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert, um die Keratinozyten aus dem Zellverband zu lösen. Durch Zugabe von Stoppmedium wurde die Reaktion beendet. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde der Überstand abzentrifugiert (1000 Umdrehungen/min; 5 Min; 4 °C), das Zellpellet in Keratinozyten-Wachstumsmedium resuspendiert, in eine 75 cm³ Zellkulturflasche überführt und kultiviert (37 °C, 5 % CO₂). Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um nicht anhaftende Zellen und Blutzellen zu entfernen.

Der Mediumwechsel der Keratinozytenkultur erfolgte alle zwei, spätestens drei Tage. Sobald die Zellen eine Konfluenz von ca. 70 % erreicht hatten, wurden sie im Verhältnis 1:3 gesplittet. Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 2 Minuten mit Trypsin/EDTA inkubiert, um die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abzulösen. Nach Zugabe von Stoppmedium wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Nach Resuspendierung des Zellpellets in Wachstumsmedium erfolgte die Neuaussaat in 75 cm³ Zellkulturflaschen. Für die Zellkulturversuche und die Genexpressionsuntersuchungen wurden ausschließlich Keratinozyten der Passagen 1 bis 3 verwendet.

Normale humane Fibroblasten (NHDF)

Die Isolation primärer humaner Fibroblasten erfolgte ebenfalls aus den oben beschriebenen Häuten. Die Haut wurde direkt nach dem Transport mit PBS gewaschen und anschließend für 24 h in Trypsin/EDTA inkubiert, um die Fibroblasten aus dem Zellverband zu lösen. Nach Zugabe von Stopplösung wurde das Hautstück entfernt und die Zellsuspension zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Fibroblasten-Wachstumsmedium resuspendiert, in eine 75 cm³ Zellkulturflasche überführt und kultiviert (37 °C, 5 % CO₂).

Die Zellpflege und das Splitten erfolgten analog zu den NHK. Für die Zellkulturversuche und die Genexpressionsuntersuchungen wurden ausschließlich Zellen der Passagen 2 bis 5 verwendet.

HaCaT

Die Keratinozytenzelllinie HaCaT wurde in 75 cm³ Zellkulturflaschen in Wachstumsmedium kultiviert (5 % CO₂, 37° C). Alle zwei bis maximal drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Bei einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 gesplittet. Das Splitten erfolgte analog zu den NHK.

HepG2 Zellen

Die Leberzelllinie HepG2 wurde in 75 cm³ Zellkulturflaschen in HepG2-Wachstumsmedium bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Das Medium wurde alle zwei bis spätestens drei Tage gewechselt. Bei einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 gesplittet. Das Splitten erfolgte wie für NHK beschrieben.

Zum Einfrieren wurde der Inhalt je einer Zellkulturflasche nach Abtrypsinieren, Waschen und Zentrifugation in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Um ein schonendes Einfrieren zu ermöglichen, wurde das Röhrchen in eine Einfrierbox überführt und für 24 h bei – 80 °C gelagert, bevor es in flüssigen Stickstoff überführt wurde. Zur Reaktivierung der Zellen wurde das Röhrchen bei 37 °C (schnell) aufgetaut und der Inhalt in ein Zentrifugenröhrchen mit PBS überführt. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in Wachstumsmedium resuspendiert und zur Kultivierung in eine 75 cm³ Zellkulturflasche überführt.

3.2 HPLC

Interner Standard

Zur Gehaltsbestimmung von Morphin wurde in vorherigen Arbeiten Codeinphosphat als interner Standard eingesetzt [65]. In einem ersten Schritt wurde die Eignung von Codeinphosphat als interner Standard für die Extraktion von Morphin untersucht. Wässrige Lösungen von Morphinhydrochlorid bzw. Codeinphosphat (Endkonz.: 10^{-4} M) wurden mittels der nachfolgend beschriebenen Methode extrahiert und die prozentuale Extraktionsraten der beiden Substanzen bestimmt. Als eine Alternative zu Codeinphosphat wurde Hydromorphonhydrochlorid hinsichtlich der Eignung als interner Standard untersucht.

Bestimmung der Wiederfindungsrate von Morphin aus Epidermis, Dermis, Lutrol F 127 25 % Hydrogel und Hydroxyethylcellulose Gel DAB

Epidermis und Dermis (RHS). Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate von Morphin wurden Epidermis und Dermis des RHS EFT-400 homogenisiert (TissueLyser II; 1 Min; 25 Hz) und für 2 Stunden mit 5 µg (Epidermis) bzw. 3 µg (Dermis) Morphinhydrochloride in 200 µl bidestilliertem Wasser inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit internem Standard versetzt und über Nacht bei -20°C gelagert. Die Extraktion mit Ethylacetat und die HPLC-Quantifizierung von Morphin erfolgten wie unten dargestellt.

Hydrogele. Hydroxyethylcellulose Gel DAB und Lutrol F 127 25 % Hydrogel mit einem Morphinhydrochloridgehalt von 0,5 mg/ml wurden wie in Kapitel 3.7 beschrieben hergestellt und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde eine 1:100-Verdünnung mit bidestilliertem Wasser hergestellt. Diese wurde mit internem Standard versetzt, wie unten beschrieben mit Ethylacetat extrahiert und der Morphingehalt mittels HPLC quantifiziert.

Durch Vergleich der eingesetzten mit der wiedergefundenen Morphinmenge wurde die Wiederfindungsrate aus den verschiedenen Matrices bestimmt.

Methode

Entwicklung. Ausgehend von einer im Arbeitskreis entwickelten HPLC-Methode zur Trennung und Quantifizierung von Morphin, Morphin-3-glucuronid und Morphin-6-glucuronid mit Codein als internem Standard [65] wurde eine Methode zur Quantifizierung von Morphin und Hydromorphon entwickelt. Bei erstgenannter Methode [65] wurde ein Gradient aus Acetonitril (ACN) und 0,05 M KH_2PO_4 -Puffer zur Trennung verwendet. Die Detektion erfolgte UV-metrisch bei 210 nm. Da Acetonitril bei einer Messwellenlänge von 210 nm eine beträchtliche Eigenabsorption zeigt, kam es im Verlauf der Messung zu einem gradienten-abhängigen Anstieg der Basislinie, wodurch das resultierende Chromatogramm nicht mehr korrekt auswertbar war. Ferner konnte nach Etablierung des β -Glucuronidase-Assays auf die Detektion der beiden Metabolite im weiteren Verlauf der Arbeit verzichtet werden. Daher wurde eine isokratische Methode zur Trennung und Detektion von Morphin und Hydromorphon entwickelt.

Dazu wurden verschiedene isokratische Mischungen aus 0,05 M KH_2PO_4 -Puffer und Acetonitril untersucht, beginnend mit 5 % ACN und 95 % KH_2PO_4 -Puffer. Der ACN-Anteil wurde schrittweise erhöht, bis das optimale Mischungsverhältnis (8 % ACN und 92 % KH_2PO_4 -Puffer; HPLC-Konditionen siehe Tabelle 5) erreicht war. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur. Vor Beginn der jeweiligen Messung wurde die HPLC-Anlage mit dem Fließmittelgemisch mindestens 30 Minuten gespült, um eine stabile Basislinie zu erhalten. Zusätzlich wurde vor Beginn einer jeden Messserie und nach jeweils 4 Proben reines Fließmittel injiziert, um zu überprüfen und sicherzustellen, dass keine Probenreste auf der Säule verblieben. Im Anschluss an die letzte Probe wurde ein 10-minütiges Waschprogramm (30 % Acetonitril + 70 % H_2O ; Fließrate: 1,0 ml/min) durchgeführt, um die Säule zu reinigen. Dieses Programm wurde auch im Stand-by verwendet, um das Gerät in Dauerbetrieb halten zu können und ein Auskristallisieren von Pufferresten zu vermeiden.

Tabelle 5. HPLC-Konditionen

Injektionsvolumen	50 μl
Fließrate	1,0 ml/min
Detektion	UV (210 nm) Später Fluoreszenz + UV [(ex. 235 nm/em. 345 nm) + UV (210 nm)]
Säule	LiChroCART® 250-4 RP-8, 5 μm
Vorsäule	LiChroCART® 4-4
Laufzeit	30 min

Im weiteren Verlauf der Arbeit stellte sich heraus, dass die untere Detektionsgrenze für Morphin nicht ausreichte, um den Morphingehalt in Hautproben zu bestimmen. Daher wurde zusätzlich zum UV- ein Fluoreszenz-Detektor in Reihe geschaltet, so dass Morphin fluorimetrisch und parallel dazu Hydromorphon UV-metrisch erfassbar war. In Anlehnung an bereits publizierte Methoden [66, 67] wurden verschiedene Fluoreszenz-Wellenlängen zur Detektion von Morphin untersucht. Die besten Resultate lieferten die in Tabelle 5 dargestellten Extinktions- und Emissionswellenlängen.

Etablierung. Um die Linearität der Standardkurven, die Interday- und Intraday-Variabilität, die mittleren Retentionszeiten und die Auflösung (Basislinientrennung der beiden Peaks) der Methode zu untersuchen, wurden an drei unterschiedlichen Tagen jeweils Lösungen von Morphin und Hydromorphon in abnehmender Konzentration eingespritzt.

Mittels linearer Regression der Peakflächen und der jeweiligen Konzentrationen wurden die Geradengleichung und der Korrelationskoeffizient (R^2) berechnet. Eine ausreichende Linearität ist gegeben, wenn $R^2 > 0,99$.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden die Intraday- und Interday-Variabilität bestimmt. Die Interday-Variabilität gibt die Schwankungen der Peakflächen einer bestimmten Konzentration an unterschiedlichen Tagen an. Durch Berechnung der relativen Standardabweichungen der entsprechenden Flächen wurde ermittelt, in welchem Bereich die Methode valide und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Die Intraday-Variabilität beschreibt die Peakflächen-Schwankungen einer bestimmten Konzentration innerhalb eines Messtages. Die Berechnung erfolgte analog zur Berechnung der Interday-Variabilität. Die Methode wird als valide angesehen, wenn $SD_{rel} < 12\%$ (intern festgelegt) ist.

Die chromatographische Auflösung beschreibt den Grad der Trennung zweier Substanzen. Sie wurde nach folgender Gleichung berechnet.

$$1,18 * \frac{t_{m+s}(HM) - t_{m+s}(M)}{b_{0,5}(HM) + b_{0,5}(M)} = R_S$$

R_S	Auflösung
t_{m+s}	Retentionszeit [min]
$b_{0,5}$	Peakbreite bei halber Peakhöhe [min]

Eine Basislinientrennung liegt vor, wenn R_S Werte $\geq 1,4$ annimmt.

Extraktion

Um Morphin und Hydromorphon in biologischem Material bzw. in den unterschiedlichen Trägersystemen (SLN bzw. Hydrogele) mittels HPLC quantifizieren zu können, mussten beide Substanzen zuvor aus den jeweiligen Proben extrahiert werden, um Störpeaks bzw. Säulenverschmutzung zu vermeiden. Sofern das Untersuchungsmaterial (Epidermis, Dermis und Insertmembran) nicht als Lösung vorlag, wurde es zuvor mit bidestilliertem Wasser versetzt (siehe Tabelle 6). Die Extraktion des Überstands bei Hautresorptionsuntersuchungen erfolgte analog zur Gehaltsbestimmung in Hydrogelen (siehe Kapitel 3.7). Zur jeweiligen Probe wurde ein definiertes Volumen an 10^{-3} M Hydromorphon-Lösung zugesetzt (siehe Tabelle 6) und der pH-Wert mit 1 N NaOH auf 9,5 eingestellt. Bei diesem pH-Wert liegt der isoelektrische Punkt von Morphin und Hydromorphon, dementsprechend liegen sie ungeladen vor und können mit Ethylacetat extrahiert werden. Die geeignete Menge an Hydromorphon wurde für die verschiedenen Untersuchungslösungen zuvor experimentell bestimmt. Die Untersuchungslösung wird mit einem äquivalenten Volumen an Ethylacetat versetzt, zur quantitativen Extraktion 1 Minute bei höchster Stufe gevortext und schließlich 2 Minuten bei 11000 x G zentrifugiert. Die obere, organische Phase wurde abgenommen und in ein neues Probenröhrchen überführt. Die Ethylacetat-Extraktion wurde insgesamt 3x durchgeführt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mittels Vakuum-Zentrifugation evaporiert. Der Rückstand wurde zur weiteren Aufreinigung in 500 µl Methanol aufgenommen und 5 Minuten im Ultraschallbad gelöst. Ungelöste Rückstände wurden mittels Zentrifugation (2 min.; 14000 rpm) abgetrennt, der Überstand wurde zur erneuten Evaporation in ein frisches Tube überführt und der Rückstand bis zur Quantifizierung bei - 20° C gelagert.

Tabelle 6. Extraktionsbedingungen und Probenvorbereitung

Probe	gelöst in A. bidest. [μ l]	Zusatz von 10^{-3} M HM-Lsg. [μ l]	Probenvorbereitung: $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{ACN}$ (9:1) [μ l]
β -Glucuronidase-Inkubation			
Zellkulturmedien	—	20	200
Waschlösung	—	6	150
Lysat	—	2	110
Mikrosomeninkubation	—	5	200
Akzeptormedien aus Freisetzungsuntersuchungen	—	4,9	200
SLN-Gehaltsbestimmung/ SLN-Einschlusseffizienz	—	5	200
Hydrogel- Gehaltsbestimmung	—	5	200
Hautabsorption			
Pipettenspitzen	500/1000	4	150
Akzeptormedium	—	4,9	120
Überstand	—	4	200
Insertmembran	500	4	120
Epidermis	500	4	120
Dermis	500	4	120

Probenvorbereitung

Alle Extrakte wurden vor der HPLC-Quantifizierung in einem definierten Volumen aus 0,05 M KH_2PO_4 und Acetonitril (9:1) gelöst (siehe Tabelle 6). 100 μ l davon wurden zum Vermessen in ein HPLC-Mikroinsert überführt. Zusätzlich wurden in jedem Lauf 6 (UV-Detektion) bzw. 7 (Fluoreszenz-Detektion) Standardlösungen verschiedener Konzentrationen an Morphin und Hydromorphon analysiert, um eine Standardkurve zur Gehaltsbestimmung der jeweiligen Substanz zu erhalten. Dabei wurden die unterschiedlichen Konzentrationen mit der höchsten beginnend gleichmäßig über die Messproben verteilt vermessen, um eventuell auftretende Messstörungen während eines Laufs detektieren zu können.

Auswertung

Zur Auswertung wurde zunächst die Standardgerade durch Auftragen der jeweiligen Peakflächen der Standardlösungen gegen die entsprechende Konzentration ermittelt. Mittels linearer Regression wurde die zugehörige Gerade berechnet und die Linearität anhand des

Korrelationskoeffizienten (R^2) überprüft. Bei einem R^2 -Wert von $> 0,99$ wurde von einer guten Korrelation ausgegangen und die Geradenfunktion zur Berechnung des Gehalts an Morphin und Hydromorphon herangezogen. Aus den Peakflächen der beiden Substanzen wurden die Mengen berechnet. Hydromorphon wurde als interner Standard verwendet. Die ermittelte Hydromorphon-Menge wurde in Bezug zu der für die Extraktion eingesetzte Menge an internem Standard gesetzt, so dass die Extraktionseffizienz bestimmt werden konnte, mit deren Hilfe der tatsächliche Morphingehalt berechnet wurde. Die Ergebnisse der (per-) kutanen Resorption wurden zusätzlich um die Wiederfindungsrate von Morphin aus den Matrices korrigiert.

3.3 β -Glucuronidase-Assay

Entwicklung. Da die Metaboliten von Morphin – Morphin-3-glucuronid (M-3-G) und Morphin-6-glucuronid (M-6-G) – aufgrund ihrer stark ausgeprägten Hydrophilie nicht mit organischen Lösemitteln extrahiert werden können, mussten sie vor der Extraktion in Morphin rücküberführt werden. Dafür wurde eine Enzymmischung aus *Helix pomatia* verwendet, die sowohl β -Glucuronidase als auch Sulfatase enthält. Wie in Abbildung 5 dargestellt katalysiert die β -Glucuronidase die Spaltung der beiden Metaboliten M-3-G und M-6-G zu Morphin.

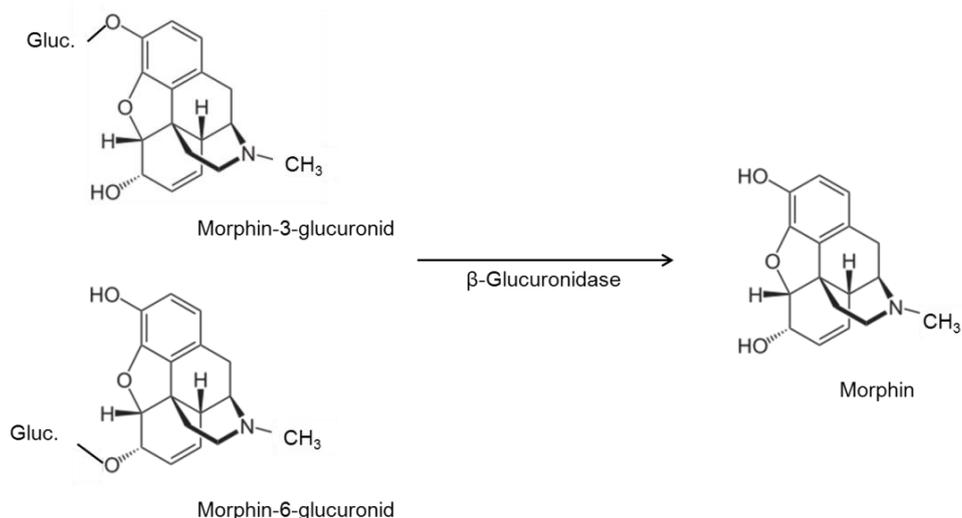


Abbildung 5. Spaltung der Metabolite durch β -Glucuronidase

Um optimale Versuchsbedingungen zu erlangen, wurde zu Beginn die Spaltungskapazität unterschiedlicher Mengen an β -Glucuronidase über 24 h untersucht. Dafür wurden 500 μ l

10^{-4} M M-3-G bzw. M-6-G (entsprechend einer Menge von 23,07 μg bzw. 24,87 μg) über 24 h mit je 1 ml 221, 400 bzw. 800 Einheiten/ml β -Glucuronidase inkubiert und das gebildete Morphin nach Extraktion mittels HPLC quantifiziert. Des Weiteren wurde der Einfluss der Inkubationsdauer auf die Spaltung der Metabolite untersucht. Dafür wurden wiederum 23,07 μg M-3-G bzw. 24,87 μg M-6-G mit 1 ml 400 Einheiten/ml β -Glucuronidase über 24 h, 48 h bzw. 72 h inkubiert und im Anschluss daran ebenfalls der Morphingehalt wie oben beschrieben bestimmt.

Durchführung. Zur Quantifizierung der Metabolite wurde die Untersuchungslösung halbiert. Ein Aliquot wurde 72 h bei 37 °C mit dem doppelten Volumen an 400 Einheiten/ml β -Glucuronidase in McIlvaine-Puffer (pH 5,0), das andere Aliquot mit dem doppelten Volumen an McIlvaine-Puffer (pH 5,0) inkubiert. Anschließend wurde der Morphin-Gehalt nach Extraktion mittels HPLC bestimmt. Der Gesamtgehalt an Metaboliten berechnete sich wie folgt:

$$[\text{Metaboliten}] = ([\text{Mor}]_+ - [\text{Mor}]_-) \times 2.$$

[Metaboliten]	Menge an Metaboliten [mol]
[Mor] ₊	Menge an Morphin nach β -Glucuronidaseinkuba- tion [mol]
[Mor] ₋	Menge an Morphin vor β - Glucuronidaseinkubation [mol]

3.4 Untersuchungen zur Genexpression

Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus NHK, NHDF, HaCaT Zellen und HepG2 Zellen als Positivkontrolle erfolgte mithilfe des RNA-Isolations-Kits NucleoSpin[®] RNA II (Macherey-Nagel, Düren) gemäß dem Herstellerprotokoll („Total RNA purification from cultured cells and tissue with NucleoSpin[®] RNA II“). Hierzu wurden 4×10^5 Zellen pro Vertiefung in eine 6-Loch-Platte in Wachstumsmedium ausgesät und 24 h im Brutschrank (5 % CO₂, 37 °C) inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten die Lyse der Zellen und die Homogenisierung des Probenmaterials mittels einer Mischung des im Kit bereitgestellten Guanidinthiocyanat-

haltigen Puffers (RA1-Puffer, inaktiviert RNAsen) und β -Mercaptoethanol. Die Aufreinigung des Lysats erfolgte durch Zentrifugation für 1 Minute bei 11,000 x g über Filtersäulen (NucleoSpin[®] Filter; im Kit enthalten). Das Eluat wurde mit einer äquivalenten Menge an Ethanol 70 % versetzt, um die Ausbildung optimaler Bindungseigenschaften an der Silikamembran zu gewährleisten. Die Beladung der Säule (NucleoSpin[®] RNA II Column; im Kit enthalten) mit der im Eluat enthaltenen RNA erfolgte mittels Zentrifugation für 30 s bei 11,000 x g. Nach DNase-Verdau und verschiedenen Waschschrritten wurde die aufgereinigte RNA schließlich mit 60 μ l RNase-freiem Wasser (im Kit enthalten) von der Membran eluiert.

Der Gehalt an RNA wurde photometrisch bestimmt. Dafür wurden die Proben 1:40 mit Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) verdünnt und die Absorption bei 260 nm gemessen. Die Gehaltsberechnung erfolgte nach folgender Gleichung:

$$[\text{Gesamt-RNA}] = A_{260 \text{ nm}} \times 40 \times F$$

[Gesamt-RNA]	Konzentration der RNA in $\mu\text{g/ml}$
$A_{260 \text{ nm}}$	Absorption bei 260 nm
F	Verdünnungsfaktor

Zusätzlich wurde die Qualität der isolierten Gesamt-RNA mithilfe von RNA-Agarose-Gelen überprüft. 3 μ l der RNA-Proben wurden mit 5 μ l DEPC-Wasser und 2 μ l Probenpuffer (10x) gemischt und auf ein Agarose-Gel (1 % Agarose in 1x TBE- Puffer) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V über 35 Minuten in einer mit 1x TBE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer. Die RNA-Gele wurden in einem GelRed-Färbegrad gefärbt und unter Belichtung mit UV-Licht (312 nm) fotografiert. Waren bei den Proben nur die beiden Banden für die 18- und 28s-RNA erkennbar, wurde vorausgesetzt, dass die isolierte RNA rein war. Die isolierte Gesamt-RNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

cDNA-Synthese

Um die aus den Zellen isolierte Gesamt-RNA quantitativ mittels rt-PCR bestimmen zu können, war es notwendig, die RNA mithilfe einer reversen Transkriptase in cDNA zu überführen. Um eventuell vorhandene Reste genomischer DNA zu zerstören, wurde direkt vor der cDNA-Synthese ein DNase-Verdau gemäß dem Herstellerprotokoll (DNase I Amplification Kit; Sigma-Aldrich) durchgeführt. Hierzu wurden 0,5 μg RNA in 8 μ l RNase-freiem Wasser mit 1 μ l 10x Reaktionspuffer und 1 μ l Desoxyribonuklease I versetzt und 15 Minuten bei RT inkubiert. Durch Zusatz von 1 μ l Stopp-Lösung und 10-minütiger Inkubation bei 70 °C wurde die Reaktion beendet.

Die anschließende cDNA-Synthese erfolgte unter Verwendung des RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kits (Fermentas, Leon-Rot). Die im Kit bereitgestellte RevertAid™ M-MuLV (Moloney murine leukemia virus) reverse Transkriptase zeichnet sich im Vergleich zur häufig verwendeten AMV (Avian Myeloblastosis Virus) reversen Transkriptase durch eine geringere RNase-H-Aktivität aus. Das Reaktionsgemisch des DNase-Verdaus wurde mit 4 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl RiboLock™ RNase Inhibitor (20 u/µl), 2 µl 10 mM dNTP Mix, 1 µl random hexamer Primer und 1 µl reverser Transkriptase (200 u/µl) versetzt und nach dem in Tabelle 7 angegebenen Temperaturschema inkubiert. Die so erhaltene cDNA wurde mit RNase-freiem Wasser 1:4 verdünnt bei –20 °C gelagert.

Tabelle 7. Temperaturschema für die cDNA-Synthese

	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Präinkubation	25	5
cDNA-Synthese	42	60
Beenden der Reaktion	70	5

Semiquantitative real-time PCR

Für die Quantifizierung der UGT2B7-Genexpression in NHK, NHDF und HaCaT Zellen kamen die Tabelle 8 genannten Primer zur Anwendung. YWHAZ, ein Tyrosin-3-monooxygenase/Tryptophan-5-monooxygenase-Aktivierungsprotein, wurde als Referenzgen verwendet. Die Effizienz der Primer wurde vor Einsatz zur Quantifizierung der Genexpression bestimmt (siehe Tabelle 8).

Der von Roche bereitgestellte Mastermix SYBR Green I Master diente der Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion. Dieser Mastermix enthält neben einer FastStart *Taq* Polymerase einen Reaktionspuffer, SYBR-Green-I-Farbstoff, ein Nukleotidgemisch sowie Magnesiumchlorid zur Stabilisierung der Nukleotide. Ungebunden vorliegender Farbstoff weist bei einer Wellenlänge von 530 nm eine sehr geringe Fluoreszenz auf, wohingegen die Interkalation in doppelsträngiger DNA (ds-DNA) zu einem starken Anstieg der Fluoreszenz führt. Der Anstieg der Fluoreszenz ist direkt proportional zu der Menge an neu gebildeter ds-DNA. Somit kann die rt-PCR nicht nur zur Vervielfältigung sondern auch zur Quantifizierung von ds-DNA durch Messung der Fluoreszenz genutzt werden.

Tabelle 8. Übersicht über die für die PCR verwendeten Primer.

Gen	5'/3' Primer	Sequenz	Effizienz	Quelle
UGT2B7a	5'	TGCTTTACTTTGACTTTTGGTTCCG	2,05	Sun et al. [68]
	3'	CCAGGAGTTTTCGAATAAGCCATAC		
UGT2B7b	5'	AGTTGGAGAATTTTCATCATGCAACAGA	1,85	Congiu et al. [69]
	3'	TCAGCCAGCAGCTCACCACAGGG		
YWHAZ	5'	AGACGGAAGGTGCTGAGAAA	1,90	LightCycler® Probe Design Software 2.0
	3'	GAAGCATTGGGGATCAAGAA		

Für die rt-PCR wurden pro Ansatz 8 µl des vorbereiteten Mastermixes (Mischung aus Mastermix und den genspezifischen Primern) mit 2 µl der cDNA-Probe oder 2 µl Wasser (Negativkontrolle) in eine für den Lightcycler 480 geeignete 96-Well-Platte pipettiert. Die Aktivierung der FastStart Taq Polymerase erfolgte während der Präinkubation durch Erhitzen auf 95 °C. Im Anschluss erfolgte die Genamplifikation über 45 Zyklen (Temperaturschema siehe Tabelle 9). Nach Abschluss der Genamplifikation wurde zusätzlich eine Schmelzkurve erstellt, um zu überprüfen, ob es während der PCR zur Ausbildung störender Primer-Dimere kam. Hierzu wurde die Abnahme des Fluoreszenzsignals durch kontinuierliches Erhitzen auf 95 °C gemessen. Bei dieser Temperatur trennen sich die Stränge der ds-DNA und der Fluoreszenzfarbstoff kann nicht mehr interkalieren, was mit einer Abnahme des Fluoreszenzsignals einhergeht. Für jedes PCR-Produkt entsteht somit ein spezifischer Schmelzpeak. Das Auftreten von Doppelpicks weist auf die Bildung von Primer-Dimeren oder anderen unspezifischen PCR-Produkten hin.

Tabelle 9. Temperaturschema für die PCR.

	Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl der Wiederholungen
Präinkubation	95	5 min	1
Genamplifikation:			45; später 30
Denaturierung	95	10 s	
Primer-Anlagerung	60	10 s	
DNA-Elongation	72	10 s	

Zusätzlich wurde zu einem späteren Zeitpunkt die Genamplifikation mit einer verringerten Zykluszahl (30 Wiederholungen statt 45) wiederholt, um eine semiquantitative Auswertung mittels Agarose-Gelelektrophorese zu ermöglichen.

Gelelektrophorese. Zur gelelektrophoretischen Auswertung der PCR-Versuche wurden cDNA-Gele mit 2 % Agarose eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden zusammen mit einem Größenmarker wie oben beschrieben auf das Gel aufgetragen und die cDNA bei 100 V über 35 Minuten in einer mit 1x TBE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer getrennt, in einem GelRed-Färbebad gefärbt und unter Belichtung mit UV-Licht (312 nm) fotografiert. Das so entstandene cDNA-Gel-Bild wurde visuell ausgewertet.

3.5 Metabolismus von Morphin in Hautzellen

Zellkultur

Zur Untersuchung des Metabolismus von Morphin in Keratinozyten und Fibroblasten wurden NHK, NHDF und HepG2-Zellen als Positivkontrolle in einer Dichte von 4×10^5 Zellen pro Vertiefung in Wachstumsmedium in eine 6-Lochplatte ausgesät und 24 h kultiviert (5 % CO₂, 37 °C). Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 ml Stimulationsmedium (siehe Kapitel 2.6.1) versetzt, welches entweder Morphinhydrochlorid gelöst in PBS/Albumin (Endkonz.: 10^{-5} M oder 10^{-4} M) oder nur PBS/Albumin (als Negativkontrolle) enthielt. Um eine Zersetzung des Morphins während der Inkubation auszuschließen wurde ferner Stimulationsmedium ohne Zellen inkubiert. Die Inkubation erfolgte über 6 h, 24 h und 48 h. Nach Versuchsende wurde das Stimulationsmedium abgenommen, die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit 500 µl einer 0,5%igen SDS-Lösung lysiert. Medien, Waschlösung und Lysat wurden bis zur Durchführung des β -Glucuronidase-Assays bei -80 °C gelagert. Anschließend erfolgte die Gehaltsbestimmung mittels HPLC.

Zellkultur + Kofaktoren

Um die Zellen mit den nötigen Kofaktoren zu versorgen, wurde das Stimulationsmedium mit Morphin (Endkonzentration: 10^{-4} M), MgCl₂ (8 mM) und UDP-Glucuronsäure (2 mM) versetzt. Die Durchführung dieser Versuche verlief analog zu den vorher beschriebenen Metabolisierungsuntersuchungen in der Zellkultur.

Mikrosomen-Assay

Die Untersuchung des Metabolismus von Morphin in der Haut erfolgte unter Verwendung von humanen Hautmikrosomen (Biopredic International, Rennes, Frankreich). Als Positivkontrolle wurde ein Lebermikrosomenpool (BD Microsciences, Woburn, MA) verwendet. Die Versuche wurden gemäß dem Herstellerprotokoll von BD Microsciences durchgeführt. Die entsprechenden Endkonzentrationen sind in Tabelle 10 dargestellt. Um sicherzustellen, dass die Haut- und Lebermikrosomen funktionsfähig waren, wurde deren CYP-Aktivität durch Inkubation mit Testosteron in Zusammenarbeit mit Frau Wiebke Klipper überprüft.

Durchführung. 16 µl Lösung A wurden mit 40 µl Lösung B, Morphinhydrochlorid und gereinigtem Wasser versetzt und 5 Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurden 10 µl Leber- bzw. 50 µl Hautmikrosomen (entsprechend einer mikrosomalen Proteinmenge von 200 µg) zugesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 10. Mikrosomen-Assay: Zusammensetzung der Lösungen mit den jeweiligen Endkonzentrationen der einzelnen Inhaltsstoffe.

	Bestandteil	Endkonzentration in 200 µl
Lösung A	UDPGA	2 mM
Lösung B	Tris-HCl	50 mM
	MgCl ₂	8 mM
	Alamethicin	25 µg/ml
Morphin-HCl		0,01 und 0,1 mM
Mikrosomen		1 µg/µl
Gereinigtes Wasser		ad 200 µl

Die Inkubation wurde durch Zugabe von 100 µl eiskalter 18,5 %iger Salzsäure beendet. Das starke Ansäuern führte zur Ausfällung des Proteins, welches anschließend mittels Zentrifugation (2 Minuten bei 11000 x g) abgetrennt werden konnte. 270 µl des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 N NaOH neutralisiert (pH 7) und bei -20 °C gelagert. Die Gehaltsbestimmung erfolgte mittels des β-Glucuronidase-Assays mit anschließender HPLC-Quantifizierung. Die Menge an neugebildeten Metaboliten wurde wie oben beschrieben berechnet. Zusätzlich zur Positivkontrolle wurden Mikrosomen ohne Morphin bzw. Morphin ohne Mikrosomen inkubiert, um die Stabilität des Opioids während der

Inkubationszeit zu überprüfen und das Auftreten von Störpeaks verursacht durch die Ausgangssubstanzen im Chromatogramm auszuschließen.

3.6 SLN-Herstellung und Charakterisierung

Die in Tabelle 11 beschriebene Rezeptur wurde zur Produktion von SLN mit folgendem Morphin-Gehalt verwendet: 0 mg/g, 0,125 mg/g, 0,25 mg/g, 0,375 mg/g und 0,5 mg/g.

Tabelle 11. Zusammensetzung der verwendeten SLN

Ausgangssubstanzen	Zusammensetzung
Compritol [®] 888 ATO (Lipid)	2,0 g
Poloxamer 188 [®] (Tensid)	0,5 g
Morphin-Base	x mg
MilliQ Wasser	ad 20,0 g

Herstellung

Morphin-Base. Für die SLN-Herstellung wurde Morphin-Base anstelle von Morphinhydrochlorid verwendet, da sich die ungeladene und damit lipophilere Substanz in der Lipid-Phase besser lösen kann. Die Base wurde aus Morphinhydrochlorid isoliert. Dafür wurde das Salz in einer Mischung aus Ethanol 50 % und einem Ammoniumchlorid-Puffer (pH 9,5) gelöst und anschließend drei Mal 5 Minuten mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und das Lösungsmittel mittels Vakuumzentrifugation verdampft. Die Base wurde unter Lichtausschluss bei -20 °C gelagert.

Solid Lipid Nanoparticles. Die Herstellung der SLN erfolgte nach der bereits publizierten und im Arbeitskreis etablierten Methode der Heißhomogenisation [70]. Morphin wurde in der geschmolzenen Lipidphase bei 80 °C gelöst. Die wässrige Phase, die das gelöste Tensid enthält, wurde auf dieselbe Temperatur erhitzt und anschließend mit der Lipidphase vereinigt. Mithilfe des Rotor-Stator-Systems Ultra-Turrax IKA[®] T25 wurde eine O/W-Präemulsion hergestellt (30 Sekunden, 8000 U/min), welche in dem Hochdruck-Homogenisator Emulsiflex C5 bei 500 bar für 2,5 Minuten homogenisiert wurde. Während

des Homogenisationsvorgangs entstand eine Nanoemulsion. Bei Abkühlen auf Raumtemperatur bildeten sich durch Auskristallisation des Lipids feste Lipidnanopartikel.

SLN-Hydrogel. Um die Freisetzungskinetik der SLN-Dispersion mit einem Gehalt von 0,5 mg/g stärker zu verzögern, wurden sie in Hydroxyethylcellulose Gel DAB eingebettet. Das Gel wurde wie unten (siehe Kapitel 3.7) beschrieben hergestellt. Anstelle von bidestilliertem Wasser wurde die zuvor hergestellte SLN-Dispersion verwendet.

Charakterisierung

Partikelgrößenmessung. Die Größe und die Größenverteilung der SLN wurden mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS), einem dynamischem Streulichtverfahren, bestimmt: Die Probe wird dabei mit einem Laser bestrahlt, Messparameter ist die Intensität der Lichtstreuung in Abhängigkeit von der Partikelgröße und der Molekularbewegung der Teilchen im Dispersionsmedium. Die unterschiedlichen Streulichtintensitäten stellen ein Maß für die Partikelgröße dar. Größenbestimmungen in einem Bereich von wenigen Nanometern bis zu 3 Mikrometern sind möglich [42]. Mithilfe des Malvern Zetasizer ZS wurden die mittlere Partikelgröße und der Polydispersitätsindex (Pdl) als ein Maß der Größenverteilung bestimmt. Hierzu wurden die Proben mit destilliertem Wasser verdünnt. Bei einem Streuwinkel von 90 °C wurde die Streulichtintensität bestimmt. Die Kenndaten für die Partikelgrößenverteilung ergaben sich aus der statistischen Auswertung der jeweiligen Messung durch die Zetasizer Software.

Um größere Partikel detektieren zu können wurde die Laserdiffraktometrie (LD) angewendet. Das Messprinzip der LD beruht auf der unterschiedlich starken, größenabhängigen Beugung von Laserlicht. Größere Partikel weisen im Gegensatz zu kleineren Partikeln eine relativ geringe Oberflächenkrümmung auf, die wiederum zu einem relativ kleinen Beugungswinkel des Laserlichts führt. Die Proben wurden ebenfalls mit destilliertem Wasser verdünnt und mithilfe des Coulter LS 230 analysiert.

Auch die Partikelgröße der in das Hydrogel eingebetten SLN wurde mithilfe der Photonenkorrelationsspektroskopie bestimmt. Hierfür wurde eine 1:100 Verdünnung des Gels mit destilliertem Wasser hergestellt und mittels eines 0,2 µm-Filters filtriert, um ungelöste Gelbestandteile abzutrennen. Im Anschluss daran wurde das Filtrat vermessen.

Gehaltsbestimmung. Die Bestimmung des Gesamt-Morphingehalts der SLN-Dispersionen erfolgte spätestens am Tag nach der Herstellung. 500 µl einer 1:100-Verdünnung der SLN-Dispersion in bidestilliertem Wasser wurden nach Extraktion (siehe 3.2) mittels HPLC (UV-

Detektion) analysiert. Die Morphinbestimmung des Hydrogels mit inkorporierten SLN erfolgte analog.

Einschlusseffizienz. Die Einschlusseffizienz charakterisiert die in den SLN eingeschlossene Menge an Morphin. 500 µl der 1:100-Verdünnung wurde mithilfe eines 0,1 µm Nylonfilters filtriert, um die Nanopartikel abzutrennen. Nach Extraktion des Filtrats wurde der Morphingehalt mittels HPLC (UV-Detektion) analysiert.

Stabilität. Die physikalische Stabilität der Morphin-beladenen SLN erfolgte durch Kooperationspartner (Yahya M. Momin). Die Partikelgröße wurde mittels Photonenkorrelationspektroskopie und Laserdiffraktometrie über einen Zeitraum von 30 Tagen erfasst.

3.7 Hydrogelherstellung und Charakterisierung

Zur Entwicklung und Charakterisierung eines Hydrogels mit verlangsamer Morphinfreisetzung wurden Poloxamer-haltige Gele (Zusammensetzung siehe Tabelle 13) untersucht. Als Referenzgel diente Hydroxyethylcellulose Gel DAB (Tabelle 12), da es in klinischen Studien der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christoph Stein (Institut für Anästhesiologie und Intensivmedizin; Charité Berlin) eingesetzt wird.

Tabelle 12. Zusammensetzung von Hydroxyethylcellulose Gel DAB (Morphingehalt: 0,5 mg/ml)

Hydroxyethylcellulose 10000	0,175 g
Glycerol 85%	0,70 g
Morphinhydrochlorid	0,0035 g
Aqua bidest.	ad 7,0 g

Tabelle 13. Lutrol® F x Hydrogele. Für die Gelentwicklung wurden die unter a) gelisteten Hydrogele verwendet, b) gibt die Hydrogele für die Untersuchung des Einflusses der Porengröße und c) die Hydrogele für die Prüfung des Einflusses des pH-Wertes an. Der Morphingehalt der Gele betrug stets 0,5 mg/ml. Sofern nicht anders angegeben wiesen die verwendeten Gele einen pH-Wert von 6,0 auf.

		Konzentration des Gelbildners [%]
a)	Lutrol® F 127	25
	Lutrol® F 68	46
	Lutrol® F 108	40
	Lutrol® F 68 + Lutrol® F 127	20 + 20
b)	Lutrol® F 127	20; 25; 27,5
c)	Lutrol® F 127 pH 7,4	25
	Lutrol® F 127 pH 6,0	25

Herstellung

Lutrol® F x Hydrogele. Die Herstellung der Lutrol® F x Hydrogele erfolgte mittels der sogenannten „kalten Methode“ [52]. Dazu wurde Morphinhydrochlorid in kaltem (4 - 5 °C) bidestilliertem Wasser (pH 6) gelöst und der Gelbildner anschließend unter Rühren hinzugefügt. Um eine komplette Auflösung des jeweiligen Lutrols® sicher zu stellen wurde der Ansatz 24 Stunden bei 4 – 5 °C gerührt.

Die Herstellung der Lutrol® F x Hydrogele mit unterschiedlichem pH-Wert erfolgte analog. Anstelle des bidestillierten Wassers wurde ein 0,02 M Na₂HPO₄-Puffer verwendet, dessen pH-Wert nach Lösen des Morphinhydrochlorids unter Verwendung eines pH-Meters auf 6,0 bzw. 7,4 eingestellt wurde.

Hydroxyethylcellulose Gel DAB. Morphinhydrochlorid wurde in 1 ml bidestilliertem Wasser (pH 6) gelöst. In eine Fantaschale wurde Hydroxyethylcellulose vorgelegt und mit Glycerol 85 % verrieben. Um Blasenbildung zu vermeiden, wurden die Morphin-Lösung und das restliche bidestillierte Wasser unter vorsichtigem Rühren eingearbeitet. Anschließend wurde der Ansatz 1 Stunde bei Raumtemperatur quellen gelassen.

Die Lagerung der verschiedenen Hydrogele erfolgte in Kruken bzw. mit Nescofilm verschlossenen Bechergläsern unter Lichtausschluss bei 4-5 °C.

Gehaltsbestimmung. Die Bestimmung des Morphingehalts der Hydrogele erfolgte spätestens 1 Woche nach der Herstellung. 500 µl einer 1:100-Verdünnung in bidestilliertem Wasser wurden extrahiert (siehe Kapitel 3.2) und der Morphingehalt mittels HPLC (UV-Detektion) bestimmt.

3.8 Freisetzungsuntersuchungen

Versuchsaufbau. Die Freisetzungsuntersuchungen wurden mit statischen Franzzellen ($\varnothing = 15\text{mm}$, $V = 12\text{ ml}$) durchgeführt. Die Akzeptorkammer (Diffusionsfläche $1,767\text{ cm}^2$) wurde mit Hilfe einer Cellulosenitrat- bzw. Polycarbonatmembran mit definierter Porengröße (siehe Tabelle 14) von der Donorkammer getrennt. Als Akzeptormedium wurde PBS mit einem Zusatz von 1,5 % Albumin verwendet, welches mittels eines Wasserbades auf $33,5\text{ °C}$ temperiert und konstant mit einem Magnetrührer bei 500 rpm durchmischt wurde.

Tabelle 14. Membranen für die Freisetzungsuntersuchungen

Material	Porengröße [nm]	Durchmesser [mm]	Verwendet für die Freisetzung aus
Cellulosenitrat	100	25	SLN
Cellulosenitrat	25	25	Hydrogele
Polycarbonat	15	25	Hydrogele

Versuchsdurchführung. Die Membranen wurden über Nacht in bidestilliertem Wasser äquilibriert, um eine gleichmäßige Benetzung der Poren zu gewährleisten. 30 Minuten vor Versuchsbeginn wurden sie in Akzeptormedium überführt und in diesem die Äquilibration fortgesetzt. Währenddessen wurden die Franzzellen mit Akzeptormedium befüllt und mithilfe des Wasserbades auf $33,5\text{ °C}$ temperiert. Die vorinkubierten Membranen wurden mit einer stumpfen Pinzette auf der Akzeptorkammer zentriert und mit Hilfe der Donorkammer und einer Klammer fixiert. Alle Membranen wurden nach einer 30-minütigen Äquilibration visuell auf Integrität überprüft. Bevor 500 µl der Untersuchungsmaterialien in die Donorkammer eingebracht wurden, wurde eine definierte Menge (500 µl) des Akzeptormediums als Nullprobe entnommen und frisches Medium bis zum Erreichen des Eichstriches ergänzt. Der Probenzug von 500 µl erfolgte zu definierten Zeitpunkten, die sich über die gesamte Versuchsdauer erstreckten.

SLN. Für die Freisetzung von Morphin aus festen Lipidnanopartikeln wurden SLN-Dispersionen mit einer Opioidkonzentration von 0,5 mg/ml eingesetzt. Die Versuche erfolgten im Vergleich zu einer wässrigen Morphin-Base-Lösung derselben Konzentration. Der Probenzug erfolgte zu folgenden Zeitpunkten: 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h und 48 h. Die Freisetzung aus SLN eingebettet in Hydroxyethylcellulose Gel DAB wurde analog bestimmt. Als Vergleich wurde hier ein mit Morphinhydrochlorid beladenes Hydroxyethylcellulose Gel DAB derselben Konzentration verwendet.

Hydrogele. Das Freisetzungsverhalten der verschiedenen Poloxamer-Hydrogele (siehe Tabelle 13) im Vergleich zu Hydroxyethylcellulose Gel DAB (HEC 10000 Gel) wurde über einen Zeitraum von 4 Stunden bestimmt. Der Probenzug erfolgte zu den Zeitpunkten: 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 3 h und 4 h; im Einzelfall bis 48 h.

Auswertung. Die Gehaltsbestimmung der Akzeptorproben erfolgte wie in Kapitel 3.2 dargestellt. Um die Freisetzungskinetik berechnen zu können, wurde der Higuchi-Plot angewendet [71]. Hierfür wurde die kumulativ freigesetzte Morphinmenge gegen die Wurzel aus der Zeit aufgetragen. Mittels linearer Regression wurde die Steigung der resultierenden Geraden (kinetische Konstante K) bestimmt. Je kleiner K, desto langsamer ist die Wirkstofffreisetzung. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der x-Achse gibt die Verzögerungszeit (lag-time) an.

$$Q_t = K * \sqrt{t}$$

Q_t	Kumulativ freigesetzte Morphinmenge [μg]
K	Kinetische Konstante [$\mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$]
t	Zeit [h]

3.9 (per-) kutane Resorption (Penetration und Permeation)

Grundlage für die Versuchsbedingungen der nachfolgend beschriebenen Franzzelluntersuchungen (Hautresorption) sind die OECD Testrichtlinie 428 sowie das zugehörige Guidance Document 28 [72, 73].

Versuchsaufbau. Die Hautresorptionsuntersuchungen erfolgten analog zu den in Kapitel 3.8 beschriebenen Freisetzunguntersuchungen mittels statischer Franzzellen. Anstelle der künstlichen Membranen wurde das Vollhautmodell EpidermFT (EFT-400) der Firma Mattek verwendet. Da die Oberfläche des Modells mit einer Größe von 1 cm^2 zu klein war, um direkt in die Franzzelle eingespannt zu werden, wurde mithilfe von Spezialeinsätzen [74] die Diffusionsfläche zwischen den beiden Kammern von $1,767 \text{ cm}^2$ auf $0,385 \text{ cm}^2$ reduziert. Durch die Einsätze wurde das Volumen der Akzeptorkammer von 12 ml auf 11,4 ml reduziert.

Versuchsdurchführung. Direkt nach Lieferung wurden die Vollhautmodelle in eine 6-Loch-Platte mit 2,5 ml Erhaltungsmedium pro Vertiefung überführt und über Nacht im Brutschrank (37° C , 5 % CO_2) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Häute zur Bestimmung der Penetration/Permeation unter Finite Dose-Bedingungen ($23,4 \mu\text{l Hydrogel/cm}^2$) von unten zusammen mit der Insertmembran aus den Kulturinserts herausgeschnitten, mit einer stumpfen Pinzette auf der Akzeptorkammer zentriert und die Donorkammer mit einer Klammer fixiert, so dass das Stratum corneum in Richtung Donorkammer zeigt. Nach einer 30-minütigen Äquilibrationsphase wurden die rekonstruierten Häute visuell auf Integrität überprüft. Vor der Applikation von $9 \mu\text{l}$ der zu untersuchenden Hydrogele (Morphinhydrochlorid-Konzentration im Gel: 2,22 mg/ml) in die Donorkammer wurde eine definierte Menge ($500 \mu\text{l}$) des Akzeptormediums (1,5 % Albumin in PBS) als Nullprobe entnommen und frisches Medium bis zum Erreichen des Eichstriches ergänzt. Während der Inkubation über 3 bzw. 6 Stunden erfolgte der Probenzug ($500 \mu\text{l}$) stündlich. Nach Versuchsende wurde das Stratum corneum und die Donorkammer mit drei PBS-getränkten Baumwolltüchern gewaschen (= Überstand). Epidermis, Dermis und Insertmembran wurden mittels spitzer Pinzetten voneinander getrennt. Die Pipettenspitzen, die zur Gelapplikation verwendet wurden, wurden direkt danach mit $500 \mu\text{l}$ bidestilliertem Wasser gespült. Alle Proben wurden bis zur Gehaltsbestimmung bei -20° C gelagert.

Die Bestimmung der Hautresorption unter Infinite Dose-Bedingungen ($262,3 \mu\text{l Hydrogel/cm}^2$, Morphinhydrochlorid-Konzentration im Gel: 0,5 mg/ml) über einen Zeitraum von 6 Stunden

wurde am nächsten Tag analog durchgeführt. Jedoch wurden die Pipettenspitzen hierbei mit 1 ml bidestilliertem Wasser gespült.

Auswertung. Um das Permeationsverhalten von Morphin aus den beiden Hydrogelen miteinander vergleichen zu können, wurden der scheinbare Permeabilitätskoeffizient (P_{app}) und die lag-Zeit bestimmt. Da der Transport topisch applizierter Substanzen vorwiegend durch passive Diffusion erfolgt, kann zu deren Berechnung das erste Fick'sche Gesetz angewandt werden [75]:

$$J = \frac{\Delta m}{\Delta t * A} = \frac{D * K * \Delta c}{dx}$$

J:	Steady-state Flux [$\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$]	K:	Verteilungskoeffizient
Δm :	permeierte Menge [mol]	A:	Fläche [cm^2]
Δt :	Zeitintervall [s]	Δc :	Konzentrationsdifferenz [$\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$]
D:	Diffusionskoeffizient [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]	dx:	Membrandicke [cm]

Unter Infinite-Dose-Bedingungen kann Δc durch die Konzentration in der Donorkammer (c_D) ersetzt werden, da die Konzentration in der Donorkammer die in der Akzeptorkammer (c_A) während der gesamten Versuchsdauer um ein Vielfaches übersteigt: $c_D \gg \gg c_A$ [75]. Unter diesen Bedingungen ist J abhängig von der eingesetzten Konzentration c_D , während der scheinbare Permeabilitätskoeffizient P_{app} eine unabhängige Variable zur Charakterisierung der Geschwindigkeit darstellt, mit der die Substanz unter Infinite-Dose-Bedingungen die Membran permeiert. Zur Berechnung wird die permeierte Menge an Morphin pro Fläche gegen die Zeit aufgetragen. Mittels linearer Regression wird die Steigung der resultierenden Geraden berechnet, die den Flux darstellt. Damit berechnet sich der P_{app} -Wert [cm/s] wie folgt [75]:

$$P_{app} = J / c_D$$

Aus der resultierenden Geradengleichung kann neben dem Flux auch die sogenannte lag-Zeit [h] berechnet werden. Sie ist definiert als der Zeitpunkt, an dem die Gerade die x-Achse schneidet, und beschreibt die Zeit, die infolge der Modellaufsättigung vergeht, bis die Substanz linear aus der Haut permeiert [75, 76].

3.10 Statistik

Sofern nicht anderweitig beschrieben werden alle Daten als Mittelwert \pm SD angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Software GraphPad Prism 5.0.

Etablierung des β -Glucuronidase-Assays und Freisetzungsuntersuchungen (Hydrogele). Die statistische Auswertung der Morphinneubildungsraten nach β -Glucuronidase-inkubation sowie die Auswertung der kinetischen Konstanten (Hydrogele) erfolgten mittels des Kruskal-Wallis-Tests. Konnte hierbei ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen den jeweiligen Gruppen nachgewiesen werden, erfolgte im Anschluss ein post-hoc-Test (Dunn's Multiple Comparison Test), um individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Inkubationsbedingungen (β -Glucuronidase-Assay) bzw. einzelnen Formulierungen zu ermitteln.

Freisetzung (SLN) und (per-)kutane Resorption. Die statistische Auswertung der kinetischen Konstanten, der P_{app} -Werte, der lag-Zeit und der Morphinmengen in den jeweiligen Probenmatrizes untereinander erfolgte mittels des Mann-Whitney-U-Tests. Ein statistisch signifikanter Unterschied lag bei $p \leq 0,05$ vor.

Ergebnisse

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Hydromorphon als interner Standard

Ein interner Standard wird bei der Gehaltsbestimmung von Probenlösungen eingesetzt, um Fehler/Störfaktoren während des Extraktionsverfahrens erfassen zu können. Um eine Substanz als internen Standard verwenden zu können, muss sie der zu untersuchenden Substanz strukturell und im Extraktionsverhalten ähnlich sein. Der interne Standard wird der Untersuchungslösung vor Extraktionsbeginn in definierter Menge zugesetzt. Nach der Extraktion kann mittels der Wiederfindungsrate des internen Standards die Extraktionseffizienz bestimmt werden und so die Menge an wiedergefundener Untersuchungssubstanz um diese korrigiert werden.

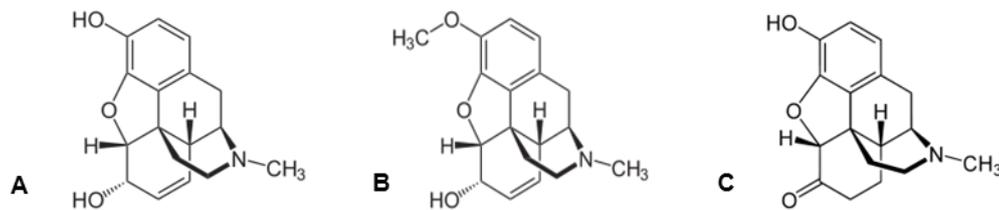


Abbildung 6. Strukturformeln von Morphin (A), Codein (B) und Hydromorphon (C)

Abbildung 6 zeigt die strukturelle Ähnlichkeit von Morphin und den möglichen internen Standards Codein und Hydromorphon. Codein unterscheidet sich von Morphin durch das Vorhandensein einer Methoxy-Gruppe anstelle der Hydroxylgruppe am Kohlenstoff 3. Bei Hydromorphon ist die Hydroxylgruppe am Kohlenstoff 6 zu einer Keto-Gruppe oxidiert. Die strukturelle Ähnlichkeit der beiden Substanzen mit Morphin lässt vermuten, dass beide als interner Standard geeignet sind, allerdings darf man hierbei das Extraktionsverhalten (Wiederfindungsraten) nicht unbeachtet lassen.

In Tabelle 15 sind die Extraktionsraten von Codein und Hydromorphon im Vergleich zu Morphin dargestellt. Codein ist allerdings deutlich besser extrahierbar als Morphin. Hydromorphon hingegen zeigte ein ähnliches Extraktionsverhalten. Für die weiteren Versuche wurde daher Hydromorphon als interner Standard eingesetzt.

Tabelle 15. Extraktionsrate von Opioiden aus wässriger Lösung bei pH 9,5 mit Ethylacetat.

	Morphin [% ± SD]	Codein [% ± SD]	Hydromorphon [% ± SD]
Extraktionsrate	67,73 [± 4,17]	92,35 [± 2,43]	—
Extraktionsrate	67,35 [± 8,35]	—	71,66 [± 16,3]

Wiederfindungsrate von Morphin aus Epidermis, Dermis, Lutrol F 127 25 % Hydrogel und Hydroxyethylcellulose Gel DAB

Wechselwirkungen zwischen der Probenmatrix und Morphin können dazu führen, dass das Opioid nicht quantitativ aus den jeweiligen Proben extrahiert werden kann und somit Wiederfindungsraten kleiner 100 % erhalten werden. Die Wiederfindungsrate (Tabelle 16) wurde aus den unterschiedlichen Probenmatrizes, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass Morphin nur aus der Epidermis zu 100 % extrahiert werden kann. In der Dermis und den beiden Hydrogelen wurden jedoch nur zwischen 84,6 und 88,4 % des eingesetzten Opioids wiedergefunden, so dass zur Bestimmung der tatsächlichen Menge an Morphin in diesen Proben der mittels HPLC-gemessene Gehalt um diesen Faktor korrigiert werden muss.

Tabelle 16. Wiederfindungsrate von Morphin aus Epidermis und Dermis der rekonstruierten Humanhaut sowie aus den beiden für (per-) kutane Absorption eingesetzten Hydrogelen [N ≥ 3].

	Wiederfindungsrate [%]
Epidermis	100,5
Dermis	88,4
Lutrol F 127 25 % Hydrogel	87,5
Hydroxyethylcellulose Gel DAB	84,6

Entwicklung einer Methode zur Detektion von Morphin und Hydromorphon

Basierend auf der Methode von N. Wolf [65] sollte eine HPLC-Methode zur Detektion und Quantifizierung von Morphin und Hydromorphon für die im Rahmen dieses Forschungsvorhabens geplanten Metabolismus-, Freisetzungs- und Hautresorptionsuntersuchungen entwickelt werden. Da die selektivere Detektion der beiden Metabolite Morphin-3-glucuronid und Morphin-6-glucuronid aufgrund der Durchführung des β -Glucuronidase-

Assays nicht mehr notwendig war, konnte die ursprüngliche Gradientenmethode in eine einfachere isokratische Methode umgewandelt werden. Dies reduzierte die Laufzeit von 50 auf 30 Minuten, so dass eine deutlich höhere Probenanzahl pro Tag analysiert werden konnte. Die Trennung der beiden Substanzen erfolgte auf einer C8 Reversed Phase Säule LiChroCART® 250-4 RP-8 (5 µm) mit den Fließmitteln 0,05 M KH₂PO₄-Puffer und Acetonitril (92 % + 8 %); eine ausreichend gute und reproduzierbare Trennung wurde erreicht (siehe Abbildung 7 B). Die untere Detektionsgrenze bei UV-metrischer Messung lag bei 1 µM. Ein linearer Zusammenhang bestand im Konzentrationsbereich zwischen 1 µM und 100 µM. Die mittleren Retentionszeiten sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17. Mittlere Retentionszeiten bei UV-metrischer bzw. Fluoreszenz (FL)-Detektion

Substanz	mittlere Retentionszeiten [min ± SD]
Morphin (FL)	6,48 [± 0,07]
Morphin (UV)	6,57 [± 0,07]
Hydromorphon (UV)	10,48 [± 0,26]

Da die untere Nachweisgrenze von Morphin mit 1 µM erwartungsgemäß zu hoch war, um in Hautproben reproduzierbar Morphin zu quantifizieren, wurde zusätzlich zur UV-metrischen Detektion ein Fluoreszenzdetektor eingesetzt, die Nachweisgrenze von 0,1 µM sollte nun die Analyse von Morphin in Hautproben erlauben. Hydromorphon selbst weist keine Fluoreszenzaktivität bei der verwendeten Extinktions- und Emissionswellenlänge (siehe Tabelle 5) auf, daher wurden die beiden Detektoren in Reihe geschaltet. Die Kopplung der beiden Detektionssysteme ermöglichte die fluorimetrische Gehaltsbestimmung von Morphin und parallel dazu die UV-metrische von Hydromorphon (siehe Abbildung 7).

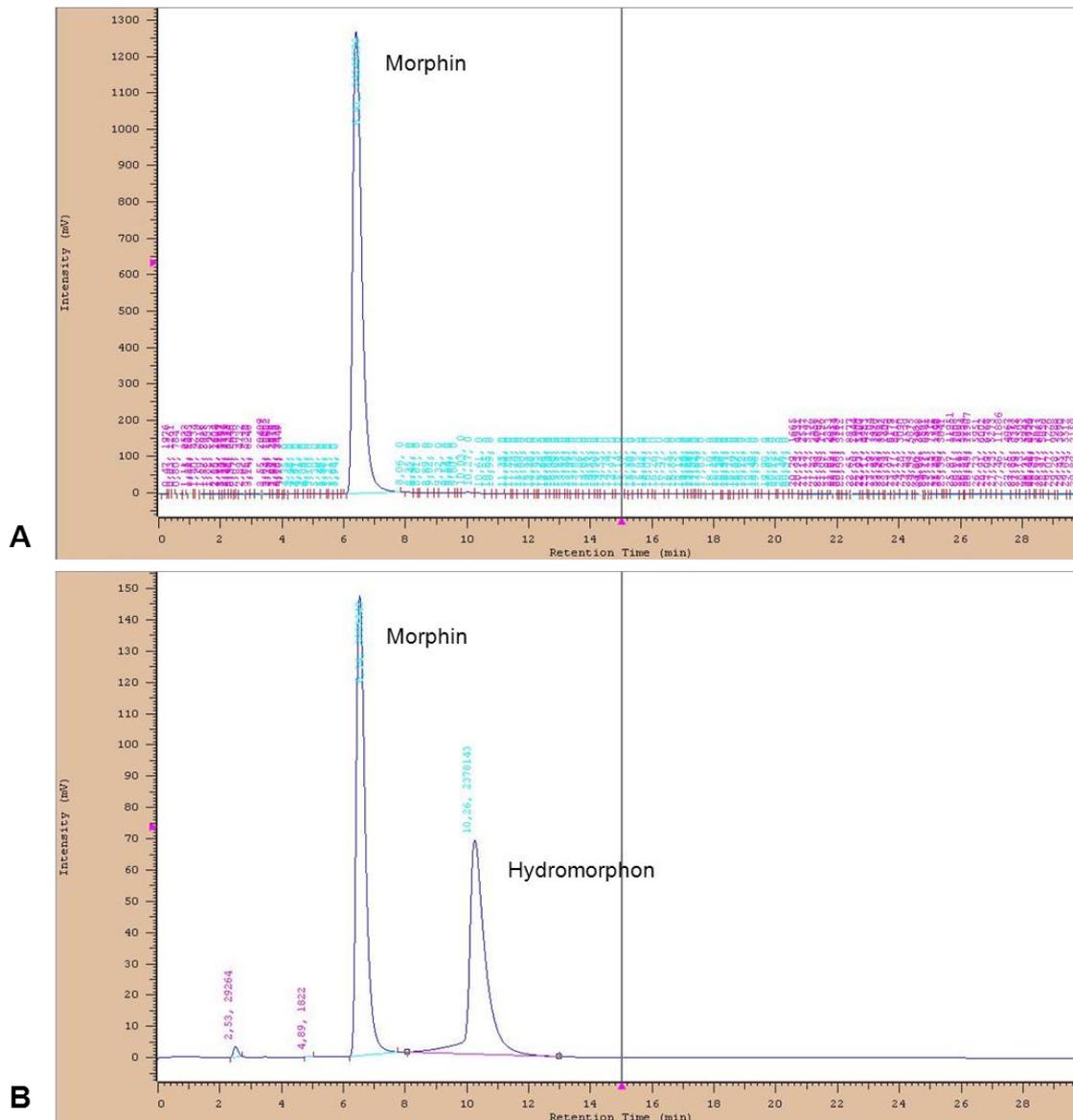


Abbildung 7. Repräsentative Trennung von Morphin und Hydromorphon (50 µM) unter Verwendung der beiden Detektoren. A: Chromatogramm des Fluoreszenz-Detektors; B: Chromatogramm des UV-Detektors

Etablierung der Methode für Morphin

An drei aufeinander folgenden Tagen wurden absteigende Konzentrationen von Morphin und Hydromorphon injiziert, um die Linearität, die Intraday- und Interday-Variabilität und die Auflösung zu bestimmen.

Linearität. Zur Überprüfung der Linearität wurden die Peakflächen gegen ihre entsprechende Konzentration in einem Diagramm aufgetragen. Mittels linearer Regression wurde der Korrelationskoeffizient (R^2) bestimmt. In Abbildung 8 ist die gute Korrelation der

Peakflächen von Morphin und Hydromorphon unter Verwendung der beiden Detektoren dargestellt, alle resultierenden Geraden wiesen den geforderten Korrelationskoeffizienten größer 0,99 auf.

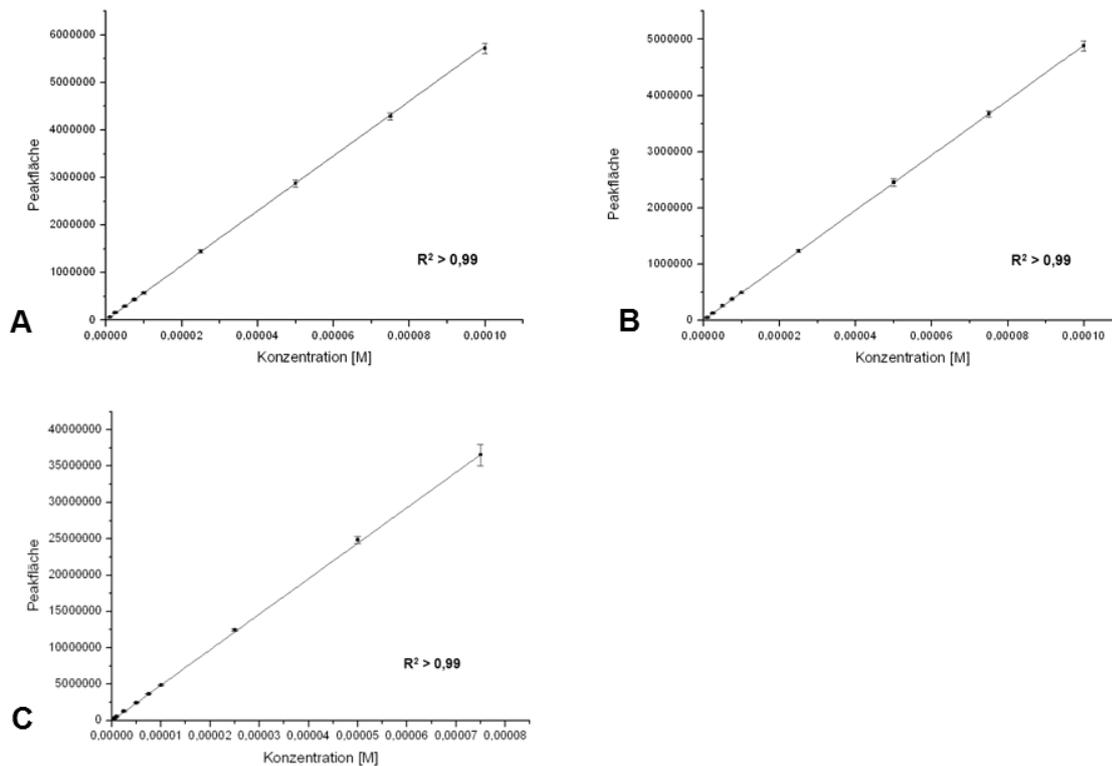


Abbildung 8. Kalibriergeraden von Morphin (A: UV-metrische Detektion; C: fluorimetrische Detektion) und Hydromorphon (B: UV-metrische Detektion).

Intraday-Variabilität. Die Intraday-Variabilität gibt die Schwankungen zwischen den Peakflächen einer bestimmten Konzentration innerhalb eines Messtages an. Durch Berechnung der relativen Standardabweichung (SD_{rel}) der entsprechenden Peakflächen wurde ermittelt, in welchem Bereich die Methode valide und reproduzierbare Ergebnisse liefert. In Tabelle 18 ist SD_{rel} der jeweiligen Konzentrationen an drei unterschiedlichen Messtagen dargestellt.

Interday-Variabilität. Die Interday-Variabilität beschreibt die Abweichungen der Peakflächen einer bestimmten Konzentration an unterschiedlichen Tagen. Sie wurde durch Berechnung der SD_{rel} der Mittelwerte der entsprechenden Flächen an unterschiedlichen Versuchstagen bestimmt und ist ebenfalls in Tabelle 18 dargestellt.

Die Intraday- und Interday-Variabilität zeigen, dass die Methode in dem untersuchten Konzentrationsbereich reproduzierbare Ergebnisse liefert ($SD_{rel} \leq 12\%$; Grenze wurde intern festgelegt). In niedrigeren Konzentrationsbereichen stieg die relative Standardabweichung auf deutlich höhere Werte an (hier nicht dargestellt). Daher konnte die Methode nur zur Gehaltsbestimmung im angegebenen Konzentrationsbereich angewandt werden.

Auflösung. Die Berechnung der Auflösung dient der Bestimmung der Basislinientrennung der Peaks in einem Chromatogramm. Da bei Peaküberlappung zu hohe bzw. zu niedrige Messergebnissen auftreten können, ist es wichtig die Auflösung (R_S) zu bestimmen. Eine Basislinientrennung liegt vor, sobald die Auflösung Werte $\geq 1,4$ annimmt. Die Berechnung von R_S erfolgte nach der in Kapitel 3.2 beschriebenen Gleichung und ergab einen Wert von 6,81, damit sind Morphin und Hydromorphon bei UV-metrischer Detektion basisliniengetreunt.

Tabelle 18. Intraday- und Interday-Variabilität von Morphin und Hydromorphon. Die Darstellung der SD_{rel} erfolgte in %.

Konz. [µM]	Morphin (FL)				Morphin (UV)			
	Intraday-Variabilität			Interday-Variabilität	Intraday-Variabilität			Interday-Variabilität
	Tag 1	Tag 2	Tag3		Tag 1	Tag 2	Tag 3	
100	0,24	0,01	0,51	6,49	0,88	0,46	0,29	1,92
75	0,58	0,24	0,52	4,03	0,41	0,26	0,49	1,81
50	0,34	0,31	0,14	2,06	0,09	0,28	0,07	2,59
25	0,39	0,66	0,61	1,32	0,10	0,47	0,47	2,09
10	0,37	0,27	0,78	1,90	0,28	0,29	0,32	2,77
7,5	0,27	0,31	0,67	0,91	0,50	0,23	0,51	2,93
5	0,55	0,56	0,90	2,17	1,21	1,61	0,29	3,41
2,5	4,64	5,92	11,76	3,51	3,19	3,47	7,19	5,95
1	9,48	10,19	5,76	2,25	10,18	10,31	0,32	7,09
0,75	1,28	2,05	3,23	1,77	-	-	-	-
0,5	2,35	1,35	5,01	1,81	-	-	-	-
0,25	3,30	5,66	1,09	1,18	-	-	-	-
0,1	4,00	8,67	8,25	3,62	-	-	-	-
Hydromorphon								
100	0,37	0,24	0,33	1,78				
75	0,62	0,46	0,23	1,59				
50	1,70	0,18	0,09	2,76				
25	0,45	0,32	0,40	2,10				
10	0,57	2,69	1,83	2,22				
7,5	7,00	6,32	2,77	3,11				
5	8,03	4,92	4,27	7,15				
2,5	5,86	0,44	10,49	6,11				
1	-	7,70	2,40	4,11				

4.2 β -Glucuronidase-Assay

Zur Etablierung des β -Glucuronidase-Assays wurden definierte Mengen an Morphin-3-glucuronid und Morphin-6-glucuronid zeit- bzw. konzentrationsabhängig mit β -Glucuronidase inkubiert. Bei der zeitabhängigen Inkubation wurden stets 400 units/ml Enzym eingesetzt. Wie in Abbildung 9 dargestellt, war die Spaltung von M-3-G zu Morphin unabhängig von der eingesetzten Enzymkonzentration (A) bzw. der Inkubationszeit (B). Im Gegensatz dazu konnte die Spaltung von M-6-G zu Morphin mit steigender Enzymkonzentration (C) bzw. längerer Inkubationsdauer (D) deutlich verbessert werden: Bei einer Konzentration von 800 units/ml bzw. bei einer Inkubation über 72 Stunden mit 400 units/ml konnten die höchsten Spaltungskapazitäten erzielt werden. Da durch die Verlängerung der Inkubationsdauer auf 72 Stunden die Spaltungskapazitäten der beiden Metabolite auf Werte $> 80\%$ erhöht werden konnten, wurden die Probenmatrizes für die quantitative Bestimmung der beiden Metabolite 72 Stunden mit 400 units/ml inkubiert.

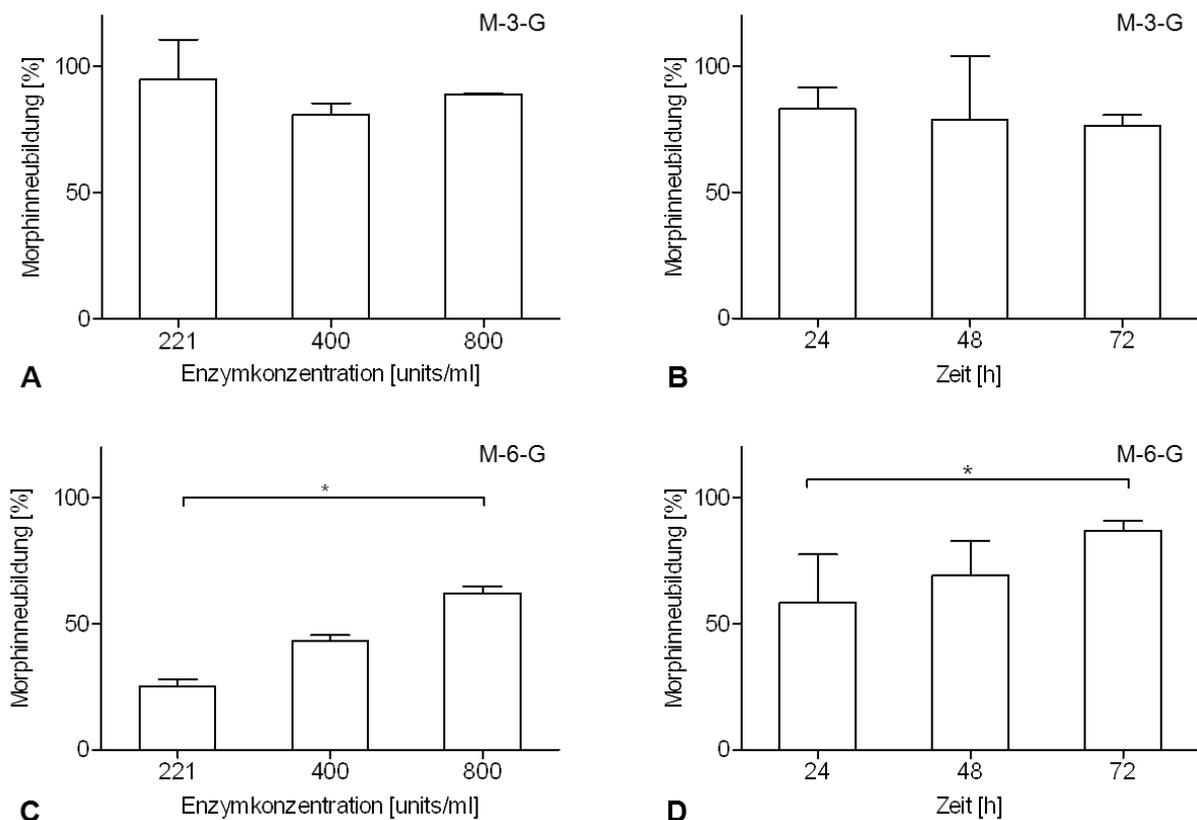


Abbildung 9. Spaltungskapazität der β -Glucuronidase in Abhängigkeit der Enzymkonzentration (A, C) und der Inkubationszeit (B, D). Um den Einfluss der Enzymkonzentration auf die Glucuronidspaltung zu bestimmen, wurden 500 μ l einer 10^{-4} M M-3-G bzw. M-6-G-Lösung mit je 1 ml der entsprechenden Enzymlösung 24 Stunden inkubiert [$N \geq 3$]. Der Einfluss der Inkubationsdauer wurde analog untersucht durch Inkubation der Glucuronidlösungen über 24, 48 und 72 Stunden [$N \geq 6$]. *Ein signifikanter Unterschied konnte nachgewiesen werden [$p \leq 0,05$].

4.3 UGT2B7-Genexpression und Bestimmung der Enzymaktivität in der Haut

UGT2B7-Genexpression

Zur Untersuchung der UGT2B7-Genexpression in NHK, NHDF und HaCaT Zellen kamen zwei unterschiedliche Primer zur Anwendung. Primer UGT2B7a detektiert im Gegensatz zu Primer UGT2B7b nicht nur die Hauptslicing-Variante der mRNA, sondern auch alle anderen Splicing-Varianten [68, 69]. Durch Verwendung beider Primer konnte somit ein breiteres Spektrum der möglichen mRNA untersucht und falsch negative Ergebnisse ausgeschlossen werden. Wie zu erwarten exprimiert die Positivkontrolle (HepG2 Zellen) UGT2B7. In NHK, NHDF (N = 4; 1 weiblicher und 3 männliche Spender) und HaCaT Zellen (N = 3) jedoch war die UGT2B7-mRNA nicht bzw. nur in Spuren exprimiert. Eine quantitative Auswertung mittels rt-PCR nach 45 Amplifikationszyklen konnte daher nicht vorgenommen werden. Ein geschlechtsspezifischer Unterschied konnte durch die Verwendung von Hautzellen weiblicher und männlicher Spender ausgeschlossen werden.

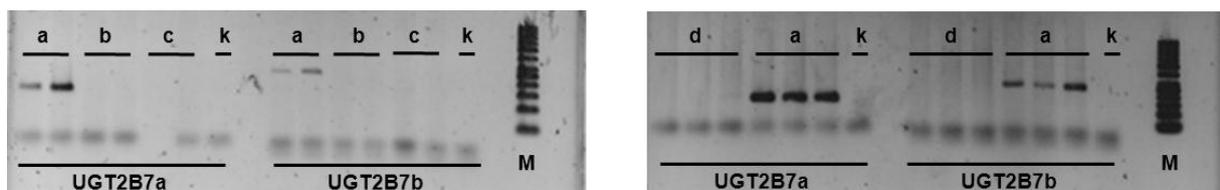


Abbildung 10. Beispiel für cDNA-Gele nach 30 Amplifikationszyklen. Dargestellt sind Proben je eines männlichen Spenders (b: NHK, c: NHDF) bzw. einer HaCaT-Probe (d) sowie der Positivkontrolle (a: HepG2), der Negativkontrolle (k) und einem cDNA-Größenmarker (M) in Abhängigkeit des verwendeten Primers.

Zusätzlich wurde eine semiquantitative Auswertung mittels cDNA-Agarosegelen nach 30 Amplifikationszyklen vorgenommen. In Abbildung 10 sind exemplarisch Proben eines männlichen Spenders (NHK, NHDF) und ein Versuch mit HaCaT-Zellen dargestellt. Eine Expression von UGT2B7 fand nur in HepG2 Zellen statt.

Bestimmung der UGT2B7-Aktivität

Um die Ergebnisse der Genexpressionsuntersuchungen auf Proteinebene zu bestätigen, erfolgten im nächsten Schritt Metabolisierungsversuche im Zellkulturmodell (siehe Kapitel 3.5). Als Positivkontrolle wurde wiederum die Leberzelllinie HepG2 eingesetzt, die UGT2B7 nachweislich exprimiert (siehe Kapitel 4.3).

Zellkulturversuche. Zunächst wurden in Basalmedium inkubierte Zellen einer definierten Menge an Morphin 6 - 48 Stunden exponiert. Weder in HepG2-Zellen noch in NHK und NHDF konnten Morphin-Metabolite nachgewiesen werden. Da auch die HepG2-Zellen unter diesen Bedingungen Morphin nicht biotransformierten, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob der Zusatz von Kofaktoren die Zellen zur Metabolisierung anregen kann. Dafür wurden die Zellen zusätzlich mit 8 mM $MgCl_2$ und 2 mM UDP-Glucuronsäure inkubiert. Jedoch erwiesen sich diese Inkubationsbedingungen erneut als unzureichend: Weder in NHK und NHDF noch HepG2 konnten Metabolite detektiert werden.

Mikrosomen. Auch Mikrosomen können zur Untersuchung des Arznei- und Fremdstoffmetabolismus eingesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden sie als Alternative zu den Zellkulturversuchen herangezogen. Die Versuche wurden mit zwei verschiedenen Chargen von Hautmikrosomen durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden Lebermikrosomen verwendet. Jeweils 200 μg mikrosomales Protein wurden über einen Zeitraum von zwei Stunden mit 0,01 mM bzw. 0,1 mM Morphinhydrochlorid inkubiert. Die Quantifizierung der Metabolite erfolgte mittels β -Glucuronidase-Assay und anschließender HPLC-UV-metrischer Messung. Die Ergebnisse der Mikrosomeninkubation sind in Abbildung 11 dargestellt.

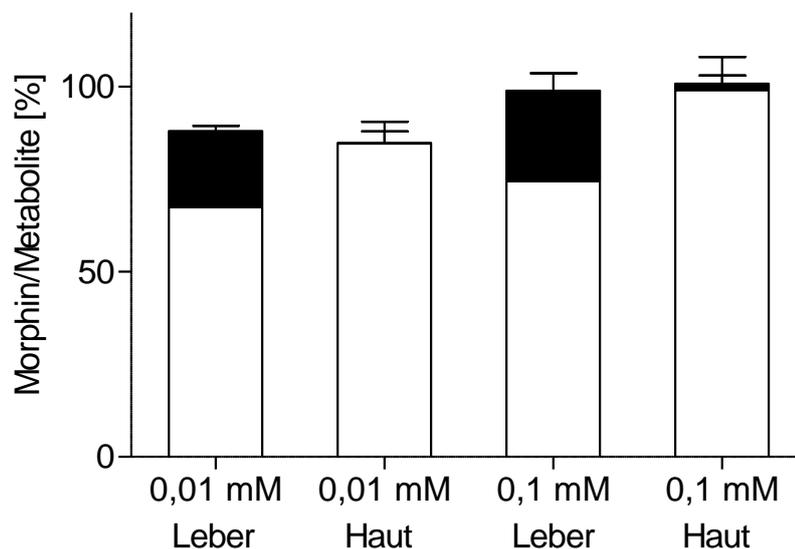


Abbildung 11. Vergleichende Darstellung (Mittelwert \pm SD; N = 2) der mikrosomalen Morphin-Biotransformation. Die Inkubation von 200 μg mikrosomalen Proteins aus Leber und Haut erfolgte über 2 Stunden mit 0,01 mM bzw. 0,1 mM Morphinhydrochlorid. Der prozentuale Anteil an gebildeten Metaboliten ist schwarz, der prozentuale Anteil an verbleibendem Morphin weiß dargestellt.

Lebermikrosomen glucuronidierten Morphin zu 20,6 % \pm 2,8 % (0,01 mM) bzw. 24,6 % \pm 9,4 % (0,1 mM). Die Inkubation mit Hautmikrosomen führte jedoch nur zu einer minimalen Konjugation von Morphin. So konnten nur 1,7 % \pm 4,5 % bzw. 0,2 % \pm 6,3 % an Metaboliten nachgewiesen werden. Die Funktionsfähigkeit der verwendeten Mikrosomen wurde vor Versuchsdurchführung durch Bestimmung der Aktivität verschiedener CYP-Enzyme, 17 β -Hydroxysteroidhydrogenase, 5 α -Reduktase und 3 α -Reduktase mittels Testosteroninkubation, HPLC-chromatographischer Trennung der Androgene und Quantifizierung mittels Radiodetektion (³H-Testosteron) in Zusammenarbeit mit Frau Wiebke Klipper nachgewiesen. Anders als Mikrosomen der Leber, die Testosteron CYP3A4/5-vermittelt zu nahezu 90 % in 6 β -Hydroxytestosteron umwandeln, zeigt bei Mikrosomen der Haut die 5 α -Reduktase die höchste Aktivität. Dihydrotestosteron wird von Mikrosomen der Haut weiblicher Spender zu 4,6 bzw. 9,7 % gebildet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19. Prozentuale Anteile von Testosteron und seinen Metaboliten gebildet nach 2-stündiger Inkubation von 3,17 ng Testosteron mit 200 μ g mikrosomalem Protein [N = 1]. - nicht detektierbar. *Die humanen Lebermikrosomen entstanden aus einem Pool von 150 weiblichen und männlichen Spendern.

	Mikrosomen			Enzym
	Leber (*)	Haut (66a ; weibl.)	Haut (36 a, 56 a; weibl.)	
Testosteron	0,9 %	85,2 %	88,5 %	
6β-Hydroxytestosteron	86,7 %	2,9 %	3,4 %	CYP3A4/5
Estradiol	9,1 %	2,1 %	1,7 %	CYP19A1
Androstendion	0,5 %	-	1,8 %	17 β -HSD
Dihydrotestosteron	0,3 %	9,7 %	4,6 %	5 α -Reduktase
Androstandion	1,3 %	-	-	17 β -HSD, 5 α -Reduktase
Androsteron	1,2 %	-	-	3 α -HSD

4.4 Feste Lipidnanopartikel (SLN) als Träger von Morphin

4.4.1 Partikelcharakterisierung

Die mittlere Partikelgröße und der Polydispersitätsindex (Pdl) wurden mithilfe der Photonenkorrelationspektroskopie bestimmt. In Tabelle 20 sind die Ergebnisse dieser Messung dargestellt: Die mit Morphin beladenen SLN wiesen eine mittlere Partikelgröße zwischen 180 und 192 nm auf, wohingegen die unbeladenen Partikel mit einer durchschnittlichen Größe von 240 nm etwas größer waren. Der Pdl aller SLN war kleiner 0,25, was auf eine relativ enge Größenverteilung innerhalb der einzelnen Chargen schließen lässt [77]. Die SLN, die in ein Gel eingearbeitet wurden, wiesen eine durchschnittliche Größe von 148,6 nm auf.

Tabelle 20. Partikelgröße und Polydispersitätsindex. Die Bestimmung der Partikelgröße erfolgte am Tag der Herstellung bzw. spätestens 2 Tage danach. Für die Größe und den Pdl der in ein Hydrogel inkorporierten SLN konnte keine Standardabweichung bestimmt werden, da nur 1 Charge untersucht wurde.

	Partikelgröße [nm ± SD]	Polydispersitätsindex (Pdl) [± SD]	N
Blank-SLN	240,0 [± 25,0]	0,240 [± 0,047]	3
SLN 0,125 mg/g	188,0 [± 4,4]	0,184 [± 0,062]	3
SLN 0,25 mg/g	192,0 [± 3,4]	0,223 [± 0,018]	4
SLN 0,375 mg/g	180,5 [± 13,4]	0,125 [± 0,105]	2
SLN 0,5 mg/g	185,0 [± 7,8]	0,229 [± 0,026]	10
SLN inkorporiert in das Hydrogel	148,6	0,172	1

Mittels LD-Messung wurden die SLN-Dispersionen auf Partikel im Mikrometerbereich untersucht. Es konnten keine Partikel größer 1000 nm detektiert werden. Die Partikel erwiesen sich über einen Zeitraum von 30 Tagen bei 8 °C als stabil. Während dieser Zeit konnte weder durch PCS- noch durch LD-Messung ein nennenswertes Partikelwachstum nachgewiesen werden.

In Tabelle 21 sind der gemessene Morphingehalt bezogen auf den theoretischen Gehalt und die Einschlusseffizienz der unterschiedlich konzentrierten Morphin-Nanopartikel dargestellt. Allenfalls ein sehr geringer Anteil an Morphin konnte in die Nanopartikel inkorporiert werden, ein Großteil des Morphins lag in der wässrigen Phase der Dispersion vor. Auffällig ist auch,

dass die Beladung der einzelnen Partikelchargen untereinander sehr stark schwankte. Die geringe Einschlusseffizienz der Nanopartikel zeigte sich auch in der Freisetzungskinetik (siehe Kapitel 4.4.2).

Tabelle 21. Gesamtmorphingehalt (angegeben in % der theoretischen Konzentration \pm SD) und Einschlusseffizienz (% \pm SD) [N \geq 3]. *SD konnte nicht berechnet werden, da nur eine Charge untersucht wurde.

	Gesamtmorphingehalt [% \pm SD]	Einschlusseffizienz [% \pm SD]
SLN 0,125 mg/g	93,3 \pm 21,5	-0,61 \pm 3,60
SLN 0,25 mg/g	96,9 \pm 21,5	12,21 \pm 18,32
SLN 0,375 mg/g	90,3 \pm 24,0	4,20*
SLN 0,5 mg/g	99,9 \pm 20,7	16,99 \pm 13,82

4.4.2 Freisetzung von Morphin aus SLN-Dispersionen und bei Inkorporierung in Hydroxyethylcellulose Gel DAB

Feste Lipidnanopartikel sind grundsätzlich geeignet als Träger für Arzneistoffe, deren Freisetzung verzögert stattfinden soll [49, 50]. Aufgrund der geringen Einschlusseffizienz sind SLN jedoch kein geeignetes Trägersystem für Morphin. Dennoch wurde der Vollständigkeit halber das Freisetzungsverhalten von Morphin aus SLN-Dispersionen mit einem Morphingehalt von 0,5 mg/g im Vergleich zu einer wässrigen Morphinlösung derselben Konzentration bestimmt. Abbildung 12 zeigt den zeitabhängigen Verlauf der Morphin-Freisetzung über einen Zeitraum von 48 h. Nach 4 h wurde Morphin vollständig aus der Lösung an das Akzeptormedium abgegeben (erkennbar am Erreichen der Plateauphase), auch war nach 6 h eine vollständige Freisetzung aus den SLN-Dispersionen erreicht. Somit konnte durch Beladen der SLN mit Morphin - wie erwartet - allenfalls eine minimale Freisetzungverzögerung von 2 h im Vergleich zur Lösung erreicht werden.

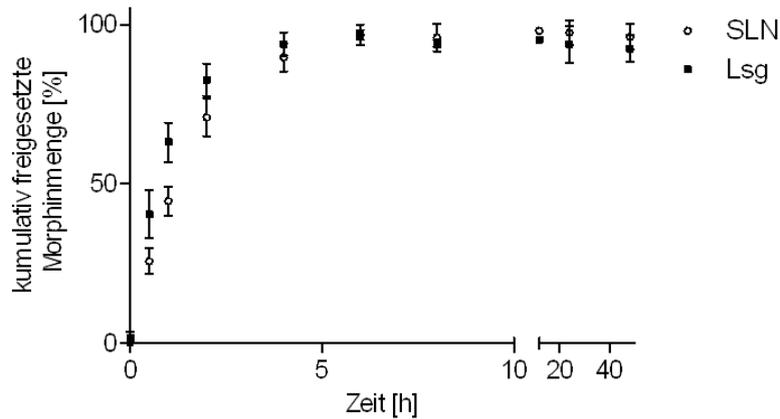


Abbildung 12. Zeitlicher Verlauf der Morphin-Permeation in die Akzeptorkammer aus einer SLN-Dispersion (schwarz dargestellt) bzw. Lösung (weiß dargestellt) über 48 h [N ≥ 3].

Der geringe Unterschied in der Permeation spiegelt sich auch in den kinetischen Konstanten (Abbildung 13) wieder: K_{SLN} ($90,42 \pm 11,38 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$) ist zwar signifikant kleiner als K_{Lsg} ($133,10 \pm 23,10 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$), aber zu gering für eine klinische Relevanz.

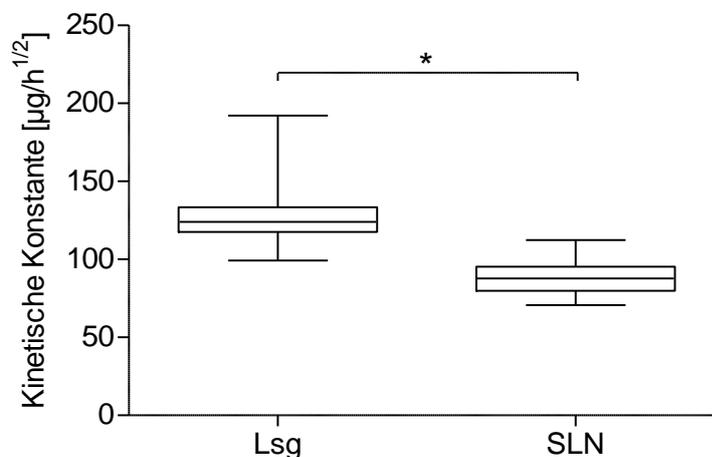


Abbildung 13. Graphische Darstellung von K_{SLN} und $K_{\text{Lösung}}$. * Ein signifikanter Unterschied konnte nachgewiesen werden [$p \leq 0,05$; $N \geq 3$].

Die Morphin-haltigen SLN-Dispersionen wurden zusätzlich in Hydroxyethylcellulose Gel DAB eingebettet. Über einen Zeitraum von 48 h wurde die Freisetzungskinetik der in das Hydrogel eingebetteten SLN im Vergleich zu einem Morphin-Hydrogel bestimmt. Abbildung 14 zeigt den Verlauf der Morphin-Freisetzung aus dem SLN-Morphin-Hydrogel im Vergleich zum Morphin-Hydrogel. Bezüglich ihres Freisetzungsverhaltens unterschieden sich die beiden

Gele kaum voneinander: Nach jeweils 12 Stunden wurde eine 100%ige Morphin-Freisetzung erreicht.

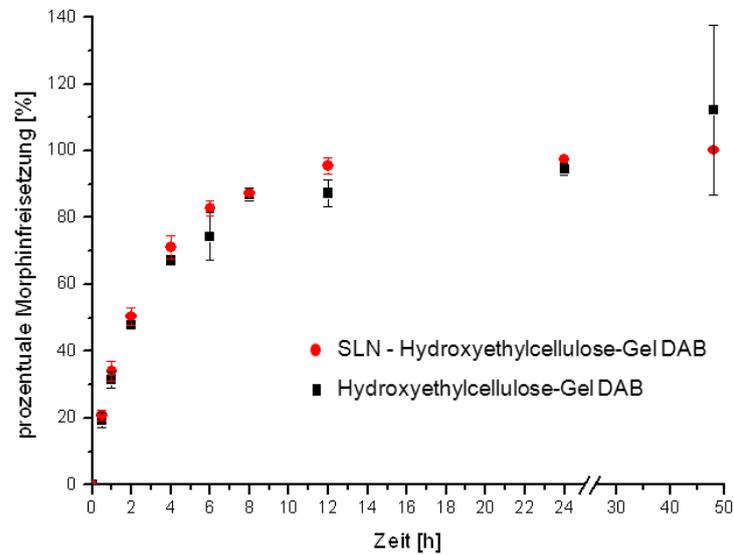


Abbildung 14. Zeitlicher Verlauf der Morphin-Freisetzung aus SLN-Dispersionen inkorporiert in ein Hydrogel und einem Morphin-Hydrogel.

Die kinetischen Konstanten zeigten eine etwas langsamere Morphin-Freisetzung aus dem Hydroxyethylcellulose Gel DAB ($K_{\text{Hydrogel}} = 29,99 \pm 2,50 \text{ mg/h}^{1/2}$) als aus dem Hydrogel mit inkorporierten SLN ($K_{\text{SLN-Hydrogel}} = 45,96 \pm 1,45 \text{ } \mu\text{g/h}^{1/2}$).

Aufgrund der unzureichenden Qualität der Morphin-haltigen SLN-Dispersionen und der vielversprechenden Freisetzungskinetik von Morphin aus dem reinen Hydrogel, wurden im nächsten Schritt unterschiedliche Hydrogele auf ihre Eignung als Träger zur verzögerten Wirkstofffreisetzung untersucht.

4.5 Hydrogele

In der Literatur sind Poloxamer-Hydrogele zur kutanen [53] aber auch subkutanen [52] Anwendung mit verzögerter Wirkstofffreisetzung beschrieben. Daher sollte nun ein Poloxamer-Hydrogel mit den gewünschten Freisetzungseigenschaften entwickelt und näher charakterisiert werden.

4.5.1 Entwicklung eines Morphin-beladenen Lutrol® F x Hydrogelen

In Anlehnung an vorherige Publikationen [52, 53, 55] wurden die in Kapitel 3.7 beschriebenen Hydrogele bezüglich ihres Freisetzungsverhaltens im Vergleich zu Hydroxyethylcellulose Gel DAB untersucht.

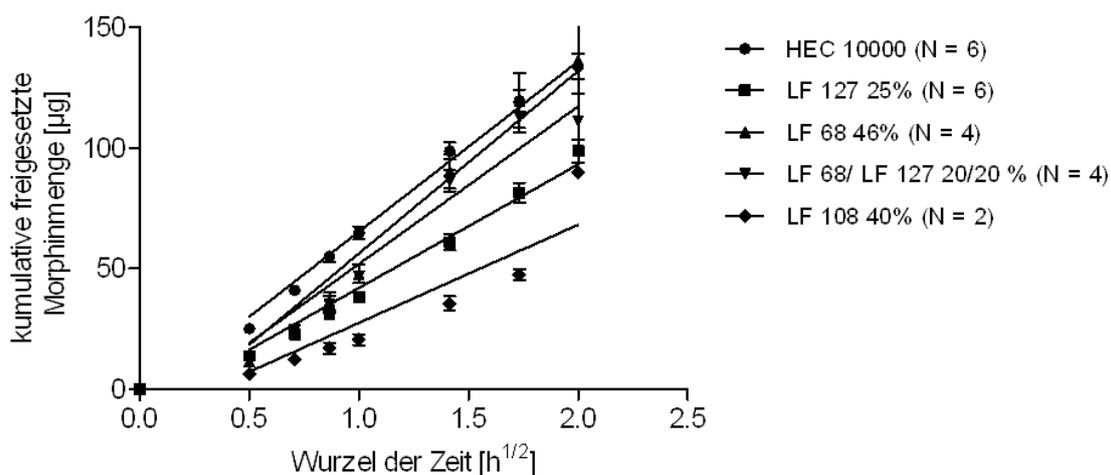


Abbildung 15. Kumulativ freigesetzte Morphinmenge [µg] gegen die Wurzel aus der Zeit [h^{1/2}] (Higuchi-Plot) aus den Lutrol® F x Hydrogelen im Vergleich zu Hydroxyethylcellulose Gel DAB.

Abbildung 15 zeigt die kumulative Morphinfreisetzung über einen Zeitraum von 4 Stunden. Tabelle 22 gibt die daraus resultierenden kinetischen Konstanten der unterschiedlichen Lutrol® F x Hydrogele wieder. Lutrol® F 127 25 % und Lutrol® F 108 40 % Hydrogel zeigten im Vergleich zu den anderen Gelen eine deutlich langsamere Wirkstofffreisetzung. Bei beiden Gelen handelt es sich um so genannte thermoreversible Gele, die bei Temperaturen zwischen 4 und 8 °C als Flüssigkeit vorliegen, bei Temperaturen über 20 °C findet eine Sol-Gel-Umwandlung statt.

Tabelle 22. Kinetische Konstanten der Morphin-Freisetzung aus Lutrol® F x - Hydrogelen im Vergleich zu Hydroxyethylcellulose Gel DAB.

Hydrogel	Kinetische Konstante [$\mu\text{g}/\text{h}^{1/2} \pm \text{SD}$]	N
Lutrol® F 68 46 %	87,75 [$\pm 16,89$]	4
Lutrol® F 68 / Lutrol® F 127 (20 % / 20 %)	81,93 [$\pm 9,80$]	4
Lutrol® F 127 25%	56,94 [$\pm 7,57$]	2
Lutrol® F 108 40%	33,45 [$\pm 1,20$]	6
Hydroxyethylcellulose-Gel DAB	73,58 [$\pm 7,36$]	6

4.5.2 Einfluss der Konzentration des Gelbildners und des pH-Wertes des Lutrol® F 127 Gels auf die Freisetzung

Um das Lutrol® F 127 Hydrogel weitergehend zu charakterisieren, sollte untersucht werden, ob die Konzentration an Poloxamer einen Einfluss auf die Morphin-Freisetzung hat. Dafür wurde das Freisetzungsverhalten von Lutrol® F 127 Hydrogelen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Gelbildner untersucht. Zu Beginn wurden die Versuche unter Verwendung von Cellulosenitratmembranen mit einer Porengröße von 25 nm durchgeführt. Da die Membranen zwischenzeitlich vom Markt genommen wurden, mussten die Versuche mit Polycarbonatmembranen mit einer Porengröße von 15 nm wiederholt werden. Dadurch konnte auch der Einfluss der Membranporengröße untersucht werden.

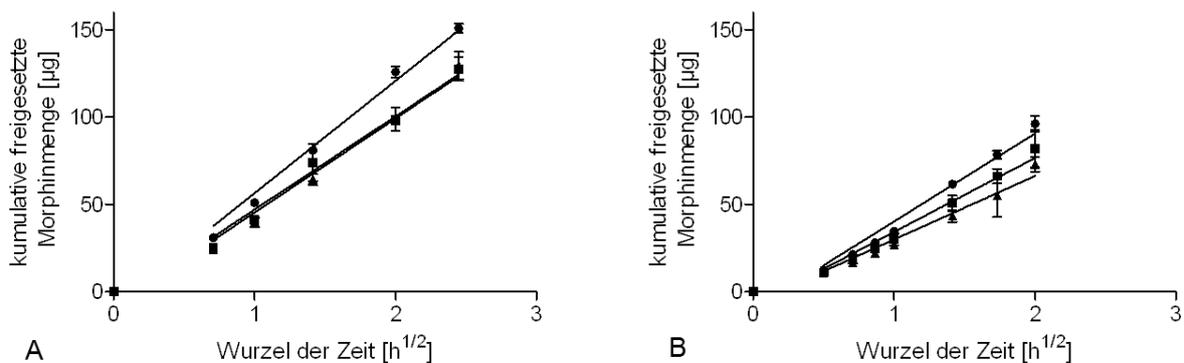


Abbildung 16. Kumulative Morphin-Freisetzung aus den unterschiedlich konzentrierten Gelen (Lutrol® F 127 20 %: ●; Lutrol® F 127 25 %: ■; Lutrol® F 127 27,5 %: ▲) gegen die Wurzel aus der Zeit (Higuchi-Plot). A: Cellulosenitratmembran (Porengröße 25 nm; N \geq 4); B: Polycarbonatmembran (Porengröße: 15 nm; N \geq 5).

Abbildung 16 zeigt die kumulative Morphinfreisetzung aus den Gelen mit unterschiedlicher Lutrol® F 127-Konzentration in Abhängigkeit von den verwendeten Membranen. In Tabelle 23 sind die entsprechenden kinetischen Konstanten zusammengefasst. Mit steigender Konzentration an Gelbildner sinkt die kinetische Konstante, die Morphinfreisetzung ist verlangsamt. Durch Vergleich der kinetischen Konstanten wird deutlich, dass auch die Membran, die die Donor- von der Akzeptorkammer trennt, einen Einfluss auf das Freisetzungsverhalten nimmt. Je kleiner die Poren der Membran, desto langsamer die Morphinfreisetzung.

Tabelle 23. Kinetische Konstanten der Morphin-Freisetzung aus Lutrol® F 127 Hydrogelen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Gelbildner. Die Versuche wurden jeweils mit Membranen mit einer Porengröße von 25 nm und 15 nm durchgeführt. * Ein signifikanter Unterschied zum Lutrol F 127 20 % konnte nachgewiesen werden [N ≥ 5; p ≤ 0,05].

	Kinetische Konstante [$\mu\text{g}/\text{h}^{1/2} \pm \text{SD}$]	
	Membranporengröße 25 nm	Membranporengröße 15 nm
Lutrol® F 127 20 %	73,73 [$\pm 4,80$]	56,73 [$\pm 7,00$]
Lutrol® F 127 25 %	57,40 [$\pm 5,20$]*	47,46 [$\pm 6,21$]
Lutrol® F 127 27,5 %	57,42 [$\pm 8,34$]*	41,88 [$\pm 2,88$]*

Der pH-Wert des Gels ist ein weiterer Parameter, der die Morphin-Freisetzung aus dem Lutrol® F 127 25 % Hydrogel beeinflussen kann [52]. Daher sollte nun der Einfluss des pH-Wertes auf die Morphin-Freisetzung untersucht werden. Hierzu wurden die kinetischen Konstanten von zwei Lutrol F 127 25 % Hydrogelen mit pH 6,0 bzw. 7,4 im Vergleich zu Hydroxyethylcellulose Gel DAB bestimmt. Abbildung 17 beschreibt die kumulative Morphin-Freisetzung aus den beiden Lutrol® F 127 25 % Hydrogelen mit unterschiedlichem pH-Wert über einen Zeitraum von 4 Stunden im Vergleich zu Hydroxyethylcellulose Gel DAB. Wie die kinetischen Konstanten ($K_{\text{Lutrol F 127 25 \% pH 6,0}}$, $K_{\text{Lutrol F 127 25 \% pH 7,4}}$, Tabelle 24) zeigen, unterscheiden sich die beiden Gele bezüglich ihres Freisetzungsverhaltens nicht signifikant voneinander. Jedoch zeigte sich ein signifikanter Unterschied zu Hydroxyethylcellulose Gel DAB. Das Verhältnis zwischen protoniertem und unprotoniertem Morphin ist abhängig vom pH-Wert. Die protonierte Form (MorH^+) weist eine größere Wasserlöslichkeit auf und kann daher leicht aus der Donorkammer in die Akzeptorkammer diffundieren. Obwohl der Anteil an MorH^+ bei pH 7,4 deutlich geringer als bei pH 6,0 ist (siehe Tabelle 24), wird aufgrund des Fließgleichgewichts zwischen den beiden Formen stetig Morphinbase neuprotoniert, da das Gleichgewicht aufgrund der Diffusion der protonierten Form in die Akzeptorkammer, in Richtung der Base verschoben wird. Dieser Prozess läuft sehr schnell ab; es konnte daher kein Unterschied in der Freisetzungskinetik von Morphin der beiden Gele gezeigt werden.

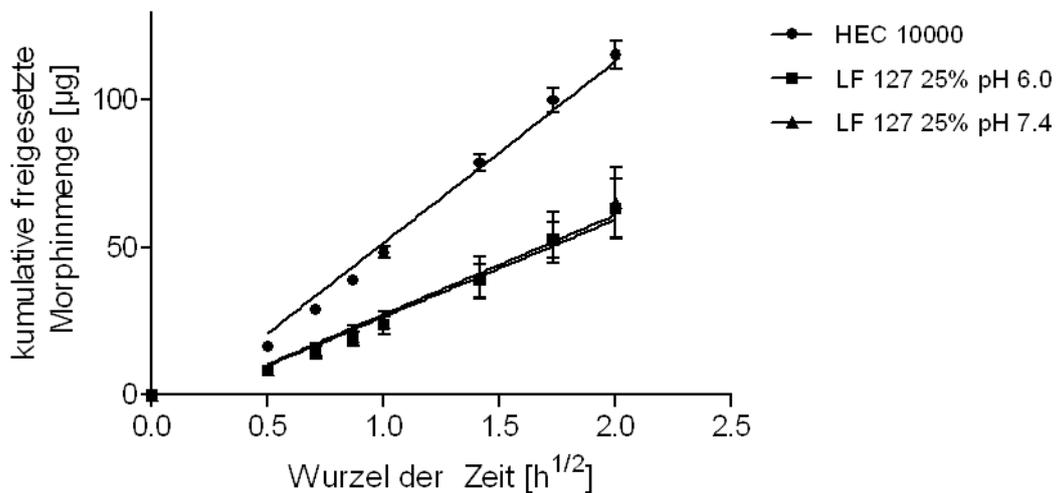


Abbildung 17. Kumulative Morphin-Freisetzung aus Lutrol® F 127 25 % Gelen mit unterschiedlichen pH-Werten gegen die Wurzel aus der Zeit im Vergleich zu Hydroxyethylcellulose Gel DAB [N ≥ 4].

Tabelle 24. Kinetische Konstanten der Morphin-Freisetzung aus Lutrol® F 127 25% Hydrogelen mit unterschiedlichen pH-Werten und das Verhältnis $MorH^+/Mor$ berechnet nach Henderson-Hasselbalch mit einem pK_a von 7,9. *Die beiden Lutrol® F 127 25% Gele unterscheiden sich signifikant von Hydroxyethylcellulose Gel DAB [N ≥ 4; $p \leq 0,05$].

	Kinetische Konstante [$\mu\text{g}/\text{h}^{1/2} \pm \text{SD}$]	Verhältnis $MorH^+/Mor$
Lutrol® F 127 25 % pH 6,0	37,71 [$\pm 6,94$]*	~ 79/1
Lutrol® F 127 25% pH 7,4	36,93 [$\pm 5,54$]*	~ 3/1
Hydroxyethylcellulose-Gel DAB	67,50 [$\pm 3,03$]	

4.5.3 Morphin-Freisetzung aus Lutrol® F 127 25% Gel im Vergleich zu Hydroxyethylcellulose Gel DAB über 48 Stunden

Ziel des Promotionsvorhabens war die Entwicklung einer Darreichungsform zur topischen Morphintherapie, die nicht nur lokal analgetisch wirksam ist, sondern auch über mehrere Stunden zeitverzögert Morphin freisetzt. Daher sollte abschließend das Freisetzungsverhalten des Lutrol® F 127 25% Hydrogels auch über einen Zeitraum von 48 Stunden mit dem von Hydroxyethylcellulose Gel DAB verglichen werden.

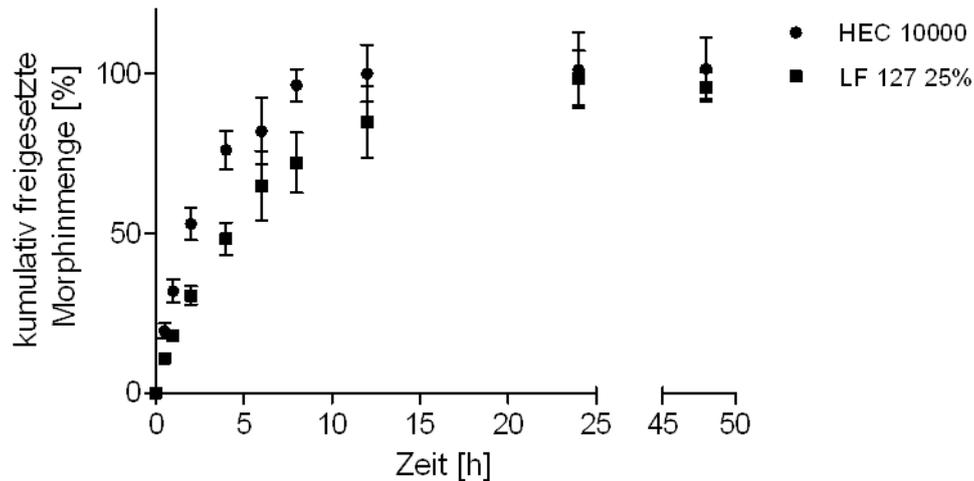


Abbildung 18. Kumulative Morphinfreisetzung aus dem Lutrol® F 127 25% im Vergleich zu Hydroxyethylcellulose Gel DAB über 48 Stunden [N = 6].

Tabelle 25. Kinetische Konstante der Morphinfreisetzung aus Lutrol® F 127 25% Hydrogel im Vergleich zu Hydroxyethylcellulose Gel DAB über 48 Stunden. * Ein signifikanter Unterschied zwischen den kinetische Konstanten der beiden Gele konnte nachgewiesen werden [N = 6; $p < 0,05$].

	Kinetische Konstante [$\mu\text{g}/\text{h}^{1/2} \pm \text{SD}$]
Lutrol F 127 25 %	46,43 [$\pm 4,82$]*
Hydroxyethylcellulose Gel DAB	70,78 [$\pm 6,73$]

In Tabelle 25 sind die kinetischen Konstanten der Morphinfreisetzung aus den beiden Hydrogelen dargestellt. Die Berechnung von K stützt sich auf die Messwerte der ersten 4 Stunden, um die Ergebnisse mit den vorherigen Versuchen vergleichen zu können. Wie in den vorausgegangenen Untersuchungen ist $K_{\text{Lutrol F 127 25\%}}$ signifikant kleiner als $K_{\text{Hydroxyethylcellulose Gel DAB}}$ und zeigt damit eine deutlich langsamere Morphin-Freisetzung aus dem Lutrol® F 127 25 % Gel als aus Hydroxyethylcellulose Gel DAB. Den zeitlichen Verlauf über einen Zeitraum von 48 Stunden stellt Abbildung 18 dar. Eine 100 %ige Morphin-Freisetzung aus Hydroxyethylcellulose Gel DAB wurde nach 12 Stunden erreicht, wohingegen der Übergang in die Plateauphase (entsprechend einer 100 %igen Morphinfreisetzung) bei Lutrol® F 127 25% Hydrogel erst nach 24 Stunden zu beobachten war.

4.6 (Per-) kutane Resorption: Penetration und Permeation von Morphin aus Hydrogelen in rekonstruierte Humanhaut (RHS)

Zur weiteren Charakterisierung der beiden Hydrogele sollte die (per-) kutane Resorption von Morphin unter Finite und Infinite Dose Bedingungen untersucht werden. Dazu wurde rekonstruierte Vollhaut (EFT-400, MatTek, USA) verwendet. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 3 bzw. 6 Stunden (siehe Kapitel 3.9). In Abbildung 19 sind die absoluten Mengen an Morphin, korrigiert um die Wiederfindungsrate, in den verschiedenen Matrices dargestellt. Tabelle 26 zeigt die zugrunde liegende Massenbilanz.

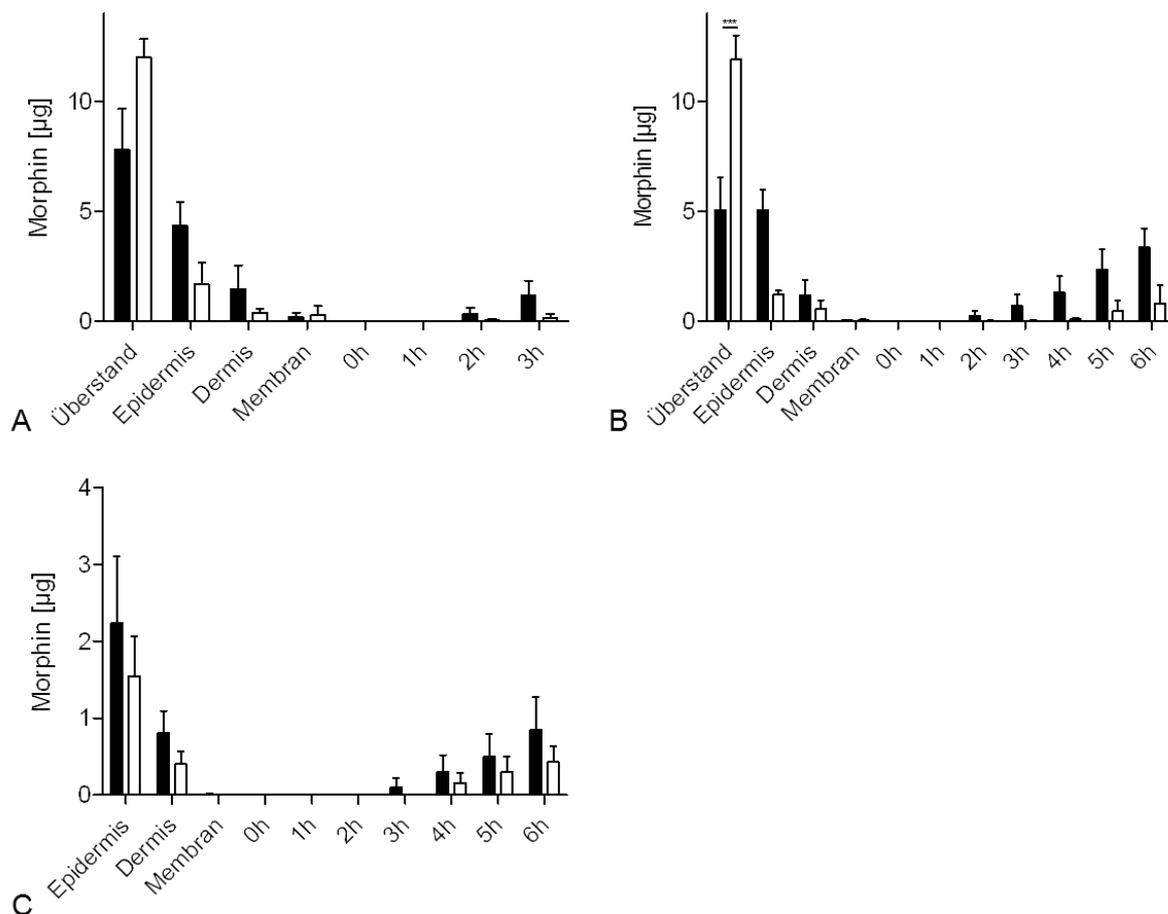


Abbildung 19. (Per-) kutane Resorption unter Finite Dose-Bedingungen (Applikation von 15,7 µg Morphin) über einen Zeitraum von 3 h (A) und 6 h (B) bzw. Infinite Dose Bedingungen (C; Applikation von 39,7 µg) über einen Zeitraum von 6 h . *** Ein signifikanter Unterschied lag vor ($p \leq 0,05$). Schwarze Säulen: Hydroxyethylcellulose Gel DAB; weiße Säulen: Lutrol® F 125 25 % Hydrogel.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl unter Finite (Abbildung 19 A + B) als auch Infinite Dose (Abbildung 19 C) Bedingungen eine größere Menge an Morphin aus dem Hydroxyethylcellulose Gel DAB in Epidermis und Dermis penetrieren konnte als aus dem

Lutrol® F 127 25 % Gel. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gelen konnte für die Überstände unter Finite Dose Bedingungen 6 h beobachtet werden. Die wiedergefundene Menge an Morphin (Massenbilanz; Tabelle 26) lag zwischen 81 und 97 %.

Die Permeation des Arzneistoffs durch die rekonstruierte Vollhaut erfolgte ebenfalls schneller und in größeren Mengen aus dem Hydroxyethylcellulose Gel DAB als aus dem Lutrol® F 127 25 % Gel: So konnten nach 6 h unter Finite Dose Bedingungen 22,5 % bzw. 5,7 % und unter Infinite Dose Bedingungen 2,5 % bzw. 1,2 % an Morphin im Akzeptor-medium detektiert werden. Dies bestätigen auch die P_{app} -Werte, welche in Tabelle 27 dargestellt sind. Das Lutrol® F 127 25 % Hydrogel weist einen kleineren P_{app} -Wert als das Hydroxyethylcellulose Gel DAB auf, was ebenfalls ein Kennzeichen für eine langsamer ablaufende Permeation ist. Die lag-Zeiten der beiden Gele unterscheiden sich dagegen kaum voneinander.

Tabelle 26. Massenbilanz [%] berechnet unter Finite Dose Bedingungen

	Massenbilanz [%]	
	Finite Dose 3 h	Finite Dose 6 h
Hydroxyethylcellulose Gel DAB	95,4	96,6
Lutrol® F 127 25 % Hydrogel	81,1	83,4

Tabelle 27. P_{app} -Wert und lag-Zeit der verwendeten Gele bestimmt über einen Zeitraum von 6 h unter Infinite Dose Bedingungen.

	P_{app} [*10 ⁻⁵ cm/s ± SD]	Lag-Zeit [h ± SD]
Hydroxyethylcellulose Gel DAB	161 ± 50	3,061 ± 0,29
Lutrol® F 127 25 % Hydrogel	87 ± 30	3,171 ± 0,51

Diskussion

5 Diskussion

Zur Behandlung schwerster Schmerzen bei Verletzung der Haut sollte eine Darreichungsform zur topischen Anwendung von Morphin entwickelt werden, die eine kontinuierliche Freisetzung von Morphin über mindestens 24 Stunden ermöglicht, um eine langanhaltende Schmerzausschaltung zu erlangen. Wichtig war hierbei, dass die Formulierung selbst die Wundheilung nicht beeinträchtigt. Als Trägersystem für Morphin wurden feste Lipidnanopartikel untersucht, da sie, wie beispielsweise für Prednisolon gezeigt, die Möglichkeit einer zeitlich verzögerten Wirkstofffreisetzung bieten [49, 50] und die Wundheilung durch Stimulation der Keratinozytenmigration fördern [60, 62]. Als weiteres Trägersystem kamen verschiedene Hydrogele zum Einsatz, da auch sie eine zeitlich verzögerte Wirkstofffreisetzung gewährleisten [52-54] und durch Ausbildung einer feuchten Wundumgebung die Wundheilung begünstigen können [63]. Des Weiteren sollten auch die perkutane Absorption und die Biotransformation von Morphin in der Haut näher charakterisiert werden.

5.1 Etablierung der HPLC-Analytik

In vorhergehenden Arbeiten wurde von N. Wolf im Arbeitskreis eine HPLC-Methode zur Trennung und Quantifizierung von Morphin, Morphin-3- und Morphin-6-glucuronid mit Codein als internem Standard entwickelt [65]. Als Fließmittel wurde ein Gradient aus Acetonitril und 0,05 M KH_2PO_4 -Puffer verwendet. Die Detektion erfolgte UV-metrisch bei 210 nm, dem Absorptionsmaximum von Morphin. Aufgrund der hohen Eigenabsorption von Acetonitril bei 210 nm und dem daraus resultierenden gradienten-abhängigen Anstieg der Basislinie sowie der Entwicklung und Etablierung des β -Glucuronidase-Assays sollte diese HPLC-Methode in eine isokratische Methode überführt und die Eignung von Hydromorphon als internem Standard für die Extraktion im Vergleich zu Morphin geprüft werden. Es konnte gezeigt werden, dass Codein aufgrund seines im Vergleich zu Morphin abweichenden Extraktionsverhaltens weniger gut als interner Standard geeignet ist als Hydromorphon. Daher wurde nun Hydromorphon als interner Standard verwendet und die HPLC-Methode auf die Trennung und Detektion von Morphin und Hydromorphon adaptiert. Beginnend mit einem Verhältnis von 5 % Acetonitril und 95 % 0,05 M KH_2PO_4 -Puffer wurde der ACN-Anteil sukzessive auf 8 % erhöht, womit eine ausreichende Trennung von Morphin und Hydromorphon (siehe Abbildung 7) erreicht ist. Morphin und Hydromorphon wurden

ebenfalls bei einer Wellenlänge von 210 nm UV-metrisch detektiert. Des Weiteren wurde in einem Vorversuch die Eignung von Methanol als organischer Fließmittelkomponente geprüft. Da die hierbei erhaltenen Chromatogramme qualitativ deutlich schlechter waren, wurde auf eine Umstellung von Acetonitril auf Methanol verzichtet. Durch die Entwicklung der isokratischen Methode konnte eine Laufzeitverkürzung von 50 auf 30 Minuten erreicht werden, wodurch nun eine deutlich höhere Probenanzahl pro Tag analysiert werden kann. Zur In-house-Validierung wurden die Linearität, die Interday- und Intraday-Variabilität und der Grad der Basislinientrennung bestimmt. Die untere Nachweisgrenze von Morphin und Hydromorphon lag bei UV-metrischer Detektion bei 1 μM (= 0,285 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Dies sollte zur Quantifizierung von Morphin bei Freisetzungsversuchen (500 μl einer Darreichungsform mit einer Morphin-Konzentration von 0,5 mg/ml) bzw. nach der Mikrosomeninkubation (2,85 bzw. 28,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ausreichen, um Morphin in den jeweiligen Proben reproduzierbar bestimmen zu können, was auch die folgenden Versuche bestätigen.

Jedoch ergaben Vorversuche zur Penetration und Permeation an exidierter Humanhaut, dass die untere Nachweisgrenze von 0,285 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nicht ausreichte, um die geringen Mengen an penetriertem Morphin in der Haut nachzuweisen. Daher wurde im nächsten Schritt eine sensitivere Detektionsmethode entwickelt. In der Literatur beschriebene HPLC-Methoden zur Detektion von Morphin und dessen Metaboliten basieren meist auf einer HPLC-Trennung gefolgt von fluorimetrischer [67] bzw. massenspektrometrischer Detektion [78, 79]. Durch Verwendung derartiger Detektoren kann die untere Nachweisgrenze auf Konzentrationen zwischen 0,1 und 5 ng/ml [66, 67, 79] erniedrigt werden. Daher wurde nun die HPLC-Anlage mit einem Fluoreszenzdetektor gekoppelt, der in Reihe zu dem UV-Detektor geschaltet wurde, so dass nun die Möglichkeit bestand, Morphin sowohl UV-metrisch als auch fluorimetrisch anhand seiner Eigenfluoreszenz zu quantifizieren. Verschiedene Extinktions- und Emissionswellenlängen wurden in Anlehnung an bereits publizierte Methoden untersucht [66, 67]. Die besten Resultate lieferte die Anregung bei 235 nm und die Erfassung des Fluoreszenzsignals bei 345 nm. Die untere Detektionsgrenze von Morphin konnte dadurch auf 0,1 μM (= 0,0285 $\mu\text{g}/\text{ml}$) erniedrigt werden, so dass die Gehaltsbestimmung von Morphin in Hautproben möglich wurde. Da der interne Standard Hydromorphon bei den verwendeten Wellenlängen keine Eigenfluoreszenz zeigt, wurde dessen Gehalt weiterhin mittels des UV-Detektors bestimmt, was durch die Reihenschaltung der beiden Detektoren möglich war.

5.2 β -Glucuronidase-Assay

Die beiden Hauptmetabolite von Morphin, Morphin-3- und Morphin-6-glucuronid, sind aufgrund ihrer Struktur zu hydrophil, um sie mit der in Kapitel 3.2 beschriebenen Methode zu extrahieren. Eine Extraktion und damit Aufreinigung des Probenmaterials ist aber unumgänglich, um Proben aus biologischem Material mittels HPLC quantifizieren zu können. Eine gängige Methode zur Quantifizierung von Morphin-Glucuroniden ist die Spaltung der Metabolite zu Morphin durch Inkubation mit β -Glucuronidase oder konzentrierter Salzsäure [80-82]. Säure-Inkubation bei Temperaturen zwischen 90 und 100 °C über 1 – 3 Stunden führt meist zu einer fast vollständigen Spaltung der beiden Glucuronide [80-83]. Die Effizienz der Enzym-Spaltung wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Zur Anwendung kommen β -Glucuronidasen unterschiedlichen Ursprungs: So wurden bisher Enzymextrakte aus *Patella vulgata* (Gemeine Napfschnecke), *Helix pomatia* (Weinbergschnecke) und *Escherichia coli* eingesetzt. Hackett et al. [80] und Romberg et al. [82] berichten von einer nahezu vollständigen Spaltung von M-3-G bei Verwendung von β -Glucuronidase aus *H. pomatia* und *E.coli*, wohingegen Wang et al. [81] nur mit dem Extrakt aus *P. vulgata*, nicht aber mit den beiden anderen, eine vollständige Spaltung erzielen konnte. Eine ausreichende Spaltung von M-6-G hingegen konnten Hackett et al. [80] nur durch Inkubation mit β -Glucuronidase aus *H. pomatia* erreichen. Die Behandlung mit konzentrierter Säure führt zwar zu einer besseren Spaltungseffizienz, allerdings sind die Proben im Gegensatz zur enzymatischen Behandlung deutlich unreiner und schwerer für die chromatographische Analyse aufzuarbeiten [80]. Da unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich ein Extrakt aus *H. pomatia* zur Spaltung und Quantifizierung von Östrogenglucuroniden eingesetzt hatte [83], sollte ein ähnlicher Assay für die Quantifizierung von M-3-G und M-6-G entwickelt werden. Hierfür wurde sowohl der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen des Enzyms als auch verschiedener Inkubationszeiten auf die Glucuronid-Spaltung untersucht. Die Inkubation mit 400 Einheiten/ml β -Glucuronidase über 72 Stunden bei 37 °C und pH 5,0 (Herstellerangabe) führte zu einer ausreichenden Spaltung (> 80 %) der beiden Metabolite. In oben beschriebenen Arbeiten [80-82] wurden die Versuche bei Temperaturen zwischen 45 und 60 °C durchgeführt, was eine Ursache für die deutlich schlechtere Effizienz der M-6-G-Spaltung sein kann.

Der β -Glucuronidase-Assay erlaubt es, die beiden Hauptmetabolite von Morphin mittels Extraktion und anschließender chromatographischer Auftrennung zu quantifizieren. Bei der Auswertung der Versuche ist es allerdings nicht möglich, zwischen M-3-G und M-6-G zu unterscheiden, da nur die Differenz an Morphin vor und nach Inkubation mit β -Glucuronidase bestimmt werden kann. Ziel der vorliegenden Arbeit war es lediglich zu prüfen, ob Morphin in

der Haut biotransformiert wird. Daher war eine Unterscheidung zwischen Morphin-3- und Morphin-6-glucuronid nicht erforderlich.

5.3 Metabolismus von Morphin in der Haut

Über den Metabolismus von Arznei- und Fremdstoffen in der Haut ist noch wenig bekannt. Für die Entwicklung einer topisch applizierbaren Morphin-Formulierung ist es jedoch unabdingbar, die Biotransformation von Morphin in der Haut zu untersuchen, um die optimale Dosis und ein passendes Behandlungsschema zu etablieren. Wie bereits in Kapitel 1.3.1 ausführlich beschrieben, wird Morphin in der Leber hauptsächlich durch die UDP-Glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) zu Morphin-3- und Morphin-6-glucuronid metabolisiert. Daher wurde zunächst die Genexpression von UGT2B7 auf mRNA-Ebene in NHK, NHDF und HaCaT-Zellen untersucht. Um die Ergebnisse auf Proteinebene zu bestätigen, erfolgten anschließend Morphin-Metabolisierungsuntersuchungen.

Genexpressionsuntersuchungen

Die UGT2B7-Genexpression wurde unter Verwendung zweier unterschiedlicher Primer untersucht, um nicht nur die Haupt-, sondern auch alternative Splicing-Varianten der mRNA zu detektieren [68, 69]. UGT2B7 mRNA wurde in NHK, NHDF und HaCaT-Zellen nicht bzw. nur in Spuren exprimiert. Die Testung an Hautzellen sowohl von männlichen als auch weiblichen Spendern ergaben keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Genexpression sowie keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Spendern. Auch in humaner Epidermis und dem Hautmodell EpiskinTM wird UGT2B7 mRNA nur schwach exprimiert [84]. Somit ist unter einer topischen Morphin-Therapie, wenn überhaupt, nur mit einer sehr langsamen Glucuronidierung von Morphin durch UGT2B7 zu rechnen. Die hier beschriebenen Versuche schließen allerdings eine mögliche Biotransformation durch UGT1A1, 1A3, 1A6, 1A8, 1A9 und 1A10 nicht aus. Van Luu-The et al. zeigen jedoch, dass auch diese Enzyme mit Ausnahme von UGT1A6 nur sehr schwach in humaner Epidermis und dem EpiskinTM Hautmodell exprimiert werden [84]. Auch die Bildung von Normorphin durch CYP3A4 und CYP2C8 ist eher unwahrscheinlich. So wird Morphin in der Leber nur in Spuren zu Normorphin metabolisiert [85].

Morphinmetabolismus in der Haut

Im nächsten Schritt sollte der Metabolismus von Morphin in einem Zellkulturmodell untersucht werden, um die Ergebnisse der Genexpressionsuntersuchungen zu bestätigen. Da UGT2B7 in NHK, NHDF und HaCaT-Zellen nicht bzw. nur in Spuren exprimiert wurde, sollte zunächst der Morphinmetabolismus in einem HepG2-Zellkulturmodell als Positivkontrolle untersucht werden, um anschließend die hierbei entwickelten Kulturbedingungen auf Keratinozyten und Fibroblasten zu übertragen. Jedoch konnte weder durch Inkubation der Zellen in Basalmedium, noch in Basalmedium mit Kofaktoren eine Biotransformation von Morphin in HepG2-Zellen gezeigt werden. Eine mögliche Ursache hierfür ist die Lokalisation des Enzyms UGT2B7. UDP-Glucuronosyltransferasen sind integrale Membranproteine, die in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert sind. Sie bestehen aus einem relativ großen transmembranären und einem kurzen, ins Cytosol gerichteten Segment. Das aktive Zentrum befindet sich intraluminal, d.h. im Lumen des ER [86]. Die für die Glucuronidierungsreaktion notwendigen Kofaktoren, wie beispielsweise UDP-Glucuronsäure (UDPGA), werden über einen Nukleotid-Zucker-Antiporter aus dem Cytosol ins Lumen des ER transportiert. Um eine Anreicherung der gebildeten Glucuronide zu vermeiden, werden sie rasch über einen ATP-unabhängigen organischen Anionentransporter ins Cytosol transportiert [86]. In Zellkulturversuchen musste Morphin neben der Zellmembran auch die ER-Membran passieren, um das aktive Zentrum des Enzyms UGT2B7 zu erreichen. Die fehlende Glucuronidierung könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Zellen unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht in der Lage waren, Morphin oder UDPGA ins Innere des ER zu transportieren, da auch im Zelllysate nur minimale Mengen an Morphin gefunden werden konnten. Des Weiteren sind neben den UDP-Glucuronosyltransferasen β -Glucuronidasen in der Membran des ER lokalisiert, deren aktives Zentrum ebenfalls intraluminal ausgerichtet ist, so dass es zu einer Spaltung der neugebildeten Glucuronide kommen kann. Auch wenn die Aktivität dieser β -Glucuronidase in vivo eher gering ausgeprägt ist, kann in der Koexistenz der beiden Enzyme eine weitere Ursache für das Ausbleiben nachweisbarer Metabolite liegen [86].

Im weiteren Verlauf des Projektes wurden daher Hautmikrosomen zur Untersuchung des Morphinmetabolismus in der Haut und Lebermikrosomen als entsprechende Positivkontrolle eingesetzt. Mikrosomen stellen ein weitverbreitetes Modell zur Untersuchung des Arznei- und Fremdstoffmetabolismus dar [87]. So wurden sie beispielsweise zur Untersuchung der Biotransformation von Morphin, Paracetamol und Testosteron angewandt [88, 89]. Mikrosomale Zubereitungen werden durch Differentialzentrifugation aus Homogenisaten der zu untersuchenden Gewebe erhalten und bestehen aus dem endoplasmatischen Retikulum und der sogenannten Golgi-Fraktion [87]. Da die ER-Membran ebenfalls eine Diffusionsbarriere für Substrate und Cofaktoren darstellt, wurde dem Versuchsansatz

zusätzlich zu den benötigten Kofaktoren Alamethicin hinzugefügt. Das antibiotische Peptid aus dem Pilz *Trichoderma viride* erleichtert durch Bildung definierter Poren in der ER-Membran die Diffusion [89]. Für die Inkubation der Mikrosomen mit Morphin (0,01 und 0,1 mM) wurde eine Dauer von 2 Stunden gewählt. Es wurden keine weiteren Zeitpunkte untersucht, da nicht die Enzymkinetik von UGT2B7 charakterisiert werden sollte, sondern die Fähigkeit der Haut, Morphin zu metabolisieren. Wie in Kapitel 4.3 dargestellt, konnte eine deutliche Biotransformation von Morphin durch Lebermikrosomen, aber nur eine minimal ausgeprägte durch Mikrosomen der Humanhaut gezeigt werden. Die Ergebnisse der Genexpressionsuntersuchungen konnten somit durch die mikrosomalen Metabolisierungsversuche bestätigt werden. Aufgrund des nur sehr gering ausgeprägten Metabolismus von Morphin in Hautmikrosomen erscheint eine Beteiligung von UGT1A1, 1A3, 1A6, 1A8, 1A9 und 1A10 unwahrscheinlich, da Mikrosomen nicht nur UGT2B7, sondern alle im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat vorkommenden Enzyme enthalten [87].

Aufgrund der Ergebnisse der Genexpressionsuntersuchungen sowie der mikrosomalen Metabolisierungsversuche ist die geringe Biotransformation in der Haut von untergeordneter Bedeutung für die Auswahl der zu applizierenden Dosis. Nach dermalen Applikation systemisch verfügbares Morphin wird in üblicher Weise in der Leber biotransformiert.

5.4 Trägereffekte

5.4.1 Feste Lipidnanopartikel als Träger für Morphin

Feste Lipidnanopartikel wurden aus verschiedenen Gründen als Trägersystem für die dermale Applikation von Morphin gewählt: Wie bereits beschrieben bieten sie die Möglichkeit einer gezielten und zeitlich verzögerten Wirkstofffreisetzung [49, 50], systemische Nebenwirkungen können durch ein gezieltes Anreichern des Arzneistoffs in der Epidermis reduziert werden [46-48]. Des Weiteren fördern auch unbeladene SLN die Wundheilung in 2D- und 3D-Wundheilungsmodellen durch Stimulation der Proliferation und Migration der Keratinozyten [60, 62]. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Darreichungsform zu entwickeln, die eine verzögerte Morphin-Freisetzung über einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden ermöglicht. Daher wurden SLN in bewährter Zusammensetzung mit Morphin beladen und näher charakterisiert.

Partikelcharakterisierung

Für die SLN-Herstellung wurde anstelle von Morphinhydrochlorid Morphin-Base eingesetzt, um die Löslichkeit des Wirkstoffs in der Lipidphase und damit die Einschlusseffizienz zu erhöhen. Die SLN wiesen Größen im Bereich von 180 bis 192 nm und einen Pdl kleiner als 0,25 auf und entsprechen damit anderen Compritol-basierten SLN, die mit lipophilen Substanzen wie beispielsweise Steroidhormonen [48, 90] oder dem Farbstoff Nilrot [70, 91] beladen wurden. Der Gesamt-Morphingehalt der SLN-Dispersionen lag je nach Charge zwischen 90 % und 100 %, wobei Standardabweichungen um die 22 % auftraten (siehe Tabelle 21). Morphin-Base ist eine thermolabile Verbindung. Während des Herstellungsprozesses der SLN wurde sie in der Lipidphase auf 80 °C erhitzt, so dass das Opioid aufgrund der hohen Temperaturen oxidationsbedingt degradiert sein kann. Andererseits kann auch ein geringer Anteil des Wassers während des Herstellungsprozesses verdunsten, so dass der Morphingehalt infolgedessen leicht ansteigt. Unter diesen Gegebenheiten ist ein Morphin-Gehalt von 90 - 100 % ein gut akzeptables Resultat.

Auch die mittlere Größe der in das Hydrogel inkorporierten Nanopartikel wurde gemessen, um zu zeigen, dass die Partikel während der Gelherstellung nicht degradieren und agglomerieren. Mit einer durchschnittlichen Größe von 148,6 nm sind die Partikel im Gel deutlich kleiner als in der Dispersion. Zur Größenbestimmung der inkorporierten Partikel diente eine wässrige Verdünnung des Hydrogels, die nach Filtration durch einen 0,2 µm-Filter mittels PCS vermessen wurde, wodurch neben ungelösten Gelbestandteilen vermutlich auch SLN mit einer Größe ≥ 200 nm abgetrennt wurden, so dass die durchschnittliche Partikelgröße in kleinere Bereiche verschoben und eine kleinere Partikelgröße nur vorgetäuscht wurde.

Die Bestimmung der Einschlusseffizienz zeigte allerdings, dass nur ein sehr geringer Anteil an Morphin in die SLN inkorporiert werden konnte und der bei weitem größte Anteil an Substanz in der wässrigen Phase gelöst vorlag. Zwischen den verschiedenen Chargen traten ebenfalls sehr stark schwankende Werte auf. Die Einschlusseffizienz eines Wirkstoffes wird von der Löslichkeit des Arzneistoffs in der Lipidphase, der Mischbarkeit im geschmolzenem Lipid, der chemischen und physikalischen Struktur des Lipids sowie der Lipid-Polymorphie beeinflusst [44]. Der geringe Einschluss von Morphin ist vermutlich auf die nur schwach ausgeprägte Lipophilie der Morphin-Base ($\log P = 0,78$ [65]) und eine daraus resultierende geringe Löslichkeit im Lipid zurückzuführen. Zur SLN-Herstellung wurde MilliQ Wasser eingesetzt, das einen leicht sauren pH-Wert aufweist, so dass die Löslichkeit von Morphin in der wässrigen Phase zusätzlich begünstigt wird. Während des Herstellungsprozesses kann das MilliQ Wasser CO_2 aus der Luft absorbieren, wodurch sich der pH-Wert zusätzlich erniedrigt. Die Schwankungen der Einschlusseffizienz zwischen den Chargen

können somit auch auf pH-Schwankungen des Wassers und damit unterschiedliche Löslichkeiten des Morphins in der wässrigen Phase zurückzuführen sein.

Aufgrund der geringen und variablen Einschlusseffizienz sind feste Lipidnanopartikel nicht als Trägersystem für Morphin geeignet. Dennoch wurde der Vollständigkeit halber das Freisetungsverhalten des Opioids aus den SLN-Dispersionen und aus SLN inkorporiert in ein Hydrogel untersucht.

Freisetzung von Morphin aus SLN-Dispersionen

SLN-Dispersionen mit einem Morphingehalt von 0,5 mg/g wurden zur Charakterisierung des Freisetungsverhaltens im Vergleich zu einer wässrigen Lösung derselben Konzentration eingesetzt. Der zeitliche Verlauf der Morphin-Freisetzung über 48 h zeigte, dass eine vollständige Opioid-Freisetzung aus den SLN-Dispersionen nach 6 h, aus der Lösung nach 4 h erfolgte. Die kinetischen Konstanten bestätigen den minimalen Unterschied in der Freisetzungskinetik. Im Vergleich zu anderen Arbeiten ist diese Verzögerung als gering zu beurteilen: So zeigten zur Mühlen et al. [49], dass Prednisolon aus SLN über einen Zeitraum von 5 Wochen konstant freigesetzt wird. Dabei war die prozentual freigesetzte Arzneistoff-Menge abhängig von der verwendeten Lipidkomponente: Aus Cholesterol-basierten SLN wurden etwa 84 %, aus Compritol-basierten hingegen nur 7 % an Prednisolon freigesetzt [49] und nach einem anfänglichen burst-release wurde Clobetasolpropionat aus SLN mit Monostearin als Lipidkomponente konstant über einen Zeitraum von 4 Tagen freigesetzt [50]. Die Ursache für die minimale Freisetungsverzögerung der Morphin-beladenen SLN-Dispersionen im Vergleich zu oben genannten Arbeiten liegt in der nur sehr geringen Einschlusseffizienz des Morphins begründet. Ein Großteil des Morphins liegt gelöst in der wässrigen Phase der Dispersion vor, so dass das Opioid, so wie es auch bei der Lösung der Fall ist, direkt durch die Membran in das Akzeptorkompartiment diffundieren kann. Nur der in den SLN inkorporierte Anteil kann zu einer verzögerten Freisetzung beitragen, da der Wirkstoff erst aus den SLN hinaus diffundieren muss, um schließlich in das Akzeptorkompartiment zu gelangen.

Bei Inkorporation der SLN-Dispersion in Hydroxyethylcellulose Gel DAB wurde Morphin nach 12 Stunden vollständig freigesetzt, allerdings zeigte der Vergleich der kinetischen Konstanten des SLN-Hydrogels im Vergleich zu dem reinen Morphin-Hydrogel, dass das Opioid langsamer aus letzterem freigesetzt wird. Die schnellere Freisetzung aus dem SLN-Hydrogel lässt sich dadurch erklären, dass es durch die Einbettung der festen Lipidnanopartikel zu einer Lockerung der Gelstruktur kommt und der Wirkstoff infolgedessen leichter durch das Gel diffundieren kann.

Die Freisetzungsuntersuchungen bestätigten die mangelnde Qualität der für diese Arbeit entwickelten SLN, die sich bereits in der Einschlusseffizienz zeigte. Feste Lipidnanopartikel dieser Zusammensetzung sind somit nicht als Trägersystem für Morphin geeignet, da eine zeitlich verzögerte Opioid-Freisetzung, wie sie für andere Arzneistoffe gezeigt wurde [49, 50], nicht möglich ist. Um die Vorteile nanopartikulärer Trägersysteme, wie beispielsweise Freisetzungsverzögerung und gezieltes Anreichern des Wirkstoffes in der Epidermis, dennoch für die topische Morphin-Therapie zu nutzen, könnten nanopartikuläre Lipidcarrier (NLC - nanostructured lipid carrier) als alternatives Trägersystem untersucht werden. Hierbei handelt es sich um eine Weiterentwicklung der SLN: Anstelle eines bei Raumtemperatur festen Lipids wird eine Mischung aus festen und flüssigen Lipiden eingesetzt. Dies führt zu einer ungeordneten bzw. amorphen Lipidstruktur innerhalb der Partikel, so dass Arzneistoffe in größerer Menge inkorporiert werden können [92-95]. Auch wenig lipophile Substanzen wie beispielsweise Etoposid ($\log P \sim 0,73$) zeigten eine Einschlusseffizienz von ca. 70% [94], so dass dieses Trägersystem auch für Morphin geeignet scheint.

Vielversprechend sind auch dendritische Kern-Multischalen-Nanotransporter (dendritic core-multishell (CMS) nanotransporters) [96], die ebenfalls zu einer gezielten Wirkstoffanreicherung in Epidermis und Dermis geeignet [97] sind. Sie bestehen normalerweise aus einem hydrophilen Kern aus Polyglycerol, einer hydrophoben Schale aus C18-Alkylketten und einer äußeren Schale aus Monomethoxy-Polyethylenglycol (mPEG), so dass sie sowohl mit lipophilen als auch mit hydrophilen Substanzen beladen werden können. Computer-Simulationen ergaben, dass Morphin in Partikel mit mPEG als äußerster Schale nicht inkorporiert werden kann. Ersetzt man allerdings mPEG durch Aspartat oder Glutamat, so ist eine Inkorporation von Morphin aufgrund ionischer Interaktionen möglich [98], so dass auch diese modifizierten CMS-Nanotransporter ein geeignetes Trägersystem für Morphin darstellen könnten.

Die Freisetzungsuntersuchungen mit dem reinen Morphin-Hydrogel zeigten, dass Hydrogele an sich ein geeigneteres Trägersystem für die dermale Morphin-Applikation darstellen als SLN. Daher sollten im weiteren Verlauf der Arbeit Hydrogele diesbezüglich näher untersucht werden.

5.4.2 Hydrogele als Träger für Morphin

Entwicklung eines Lutrol® F x Hydrogels

Hydrogele finden in der Praxis nicht nur Anwendung zur Behandlung von Erkrankungen der Haut, sondern werden auch für die dermale Applikation von Arzneistoffen eingesetzt, die

über die Haut aufgenommen bzw. systemisch resorbiert werden sollen. So sind in der Literatur beispielsweise verschiedene Hydrogele zur kutanen Applikation von Methotrexat [99], Ibuprofen, Ketoprofen [54] und Fentanyl [53] ferner zur subkutanen Applikation von Naltrexon [52] beschrieben. Einen festen Platz haben Hydrogele auch zur Behandlung von Hautwunden gefunden, wie sie beispielsweise bei schweren Verbrennungen oder Ulzerationen auftreten [25-32, 34-37, 100, 101]. Damit bieten sich Hydrogele als slow release Träger für Morphin an und wurden im nächsten Schritt untersucht. Die Wahl fiel dabei auf verschiedene Poloxamer-Gele, die unterschiedliche Arzneistoffe verzögert abgeben [52-54]: So konnte beispielsweise für ein Lutrol® F 68 Hydrogel gezeigt werden, dass nur 60% des inkorporierten Fentanyls nach 24 Stunden freigesetzt wurden [53]. Eine noch längere Freisetzungverzögerung konnte für Naltrexon durch Einsatz eines Lutrol® F 127 Hydrogels gezeigt werden, so dass nur 80 % des Arzneistoffes über einen Zeitraum von 48 Stunden freigesetzt wurden [52]. In Anlehnung an vorherige Publikationen [52-55] wurden daher folgende Poloxamere zur Herstellung der in Tabelle 13 beschriebenen Gele eingesetzt: Lutrol® F 68, Lutrol® F 108 sowie Lutrol® F 127.

Besonders interessant war Lutrol® F 127, da ein solches Hydrogel mit 3 % Propylenglycol in einem Modell am Schwein die Wundheilung signifikant beschleunigte [101]. Eine weitere Besonderheit der beiden Lutrol® F 108 und F 127 ist ferner die Thermoreversibilität [56]: Bei niedrigen Temperaturen (4 - 8 °C) liegen die Moleküle in wässriger Lösung vollständig hydratisiert in Lösung vor. Bei Temperaturerhöhung brechen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Solvent und den hydrophilen Anteilen, wodurch es zu einer Desolvatisierung der Lutrol®-Ketten und zur Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen zwischen den Polyoxypropylen-Einheiten kommt. Aufgrund dessen ordnen sich die Moleküle mit steigender Temperatur zuerst kubisch Mizellar und schließlich hexagonal an, da die Spannung innerhalb der Molekülketten steigt und diese daher stärker miteinander verwoben werden, ab Raumtemperatur bildet sich ein Gel. Aufgrund des thermosensitiven Verhaltens sind diese Gele besonders zur Applikation auf Brandwunden geeignet. Sie können in flüssiger Form mittels einer Spritze appliziert werden und verfestigen sich bei Kontakt mit der Wunde/Haut; die Gelschicht schützt die Wunde gegenüber negativen Einflüssen der Umgebung [100].

Die Freisetzung von Morphin aus Gelen wurde wie in Kapitel 3.8 beschrieben untersucht. Als Referenzgel diente wiederum Hydroxyethylcellulose Gel DAB. Anders als bei den Freisetzungsforschungen mit SLN-Dispersionen wurden Membranen aus Cellulosenitrat mit einer Porengröße von 25 nm bzw. Polycarbonat mit einer Porengröße von 15 nm verwendet, um einer Verflüssigung der stark hygroskopischen Poloxamer-basierten Gele vorzubeugen, die aufgrund einer starken Wasserabsorption aus der Akzeptorkammer bei Verwendung größerer Poren zustande kommt. Im Zuge der Verflüssigung würde die

Poloxamer-Konzentration stetig sinken, das Gel schließlich als Lösung vorliegen und die freisetzungsverzögernden Eigenschaften nicht mehr gegeben sein. Aufgrund dessen wurden Membranen mit einer kleineren Porengröße eingesetzt.

Morphin wurde aus dem Lutrol[®] F 127 25 % und dem Lutrol[®] F 108 40% Hydrogel deutlich langsamer freigesetzt als aus dem Hydroxyethylcellulose Gel DAB. Obwohl das LF 108 Gel die kleinste kinetische Konstante aufwies und damit die Morphinfreisetzung am stärksten verzögerte, wurde es nicht für die weiteren Versuche eingesetzt, da weder die flüssige Form bei 4 – 8 °C noch das Gel infolge starker Viskosität reproduzierbar auf die Membranen bzw. die Haut appliziert werden konnte. Im Hinblick auf die geplante topische Applikation bei schwersten Verletzungen der Haut ist ein solches Gel nur bedingt geeignet. Für die weiteren Versuche wurde daher das weniger viskose und ebenfalls deutlich die Morphin-Freisetzung retardierende LF 127 25 % Gel eingesetzt.

Einfluss der Konzentration des Gelbildners und des pH-Wertes des Gels auf die Freisetzung von Morphin

Verschiedene Parameter wie beispielsweise die Konzentration des Gelbildners [52, 102-104] oder der pH-Wert des Gels [52] können die Wirkstofffreisetzung beeinflussen. Zur weiteren Charakterisierung des Lutrol[®] F 127 25 % Gels sollte zunächst untersucht werden, ob die Konzentration des Gelbildners einen Einfluss auf die Morphin-Freisetzung hat. Dafür wurden drei Konzentrationen zwischen 20 % und 27,5 % gewählt. Niedrigere Konzentrationen wurden nicht einbezogen, da bei einer Lutrol[®] F 127-Konzentration unter 20 % keine Gelbildung stattfindet [102]. Die Erhöhung des Gelbildner-Anteils auf mehr als 27,5 % resultierte in einem festen, nicht mehr applizierbaren Gel. Morphin wird mit steigender Konzentration an Gelbildner langsamer freigesetzt. Je höher die Konzentration an Gelbildner, desto stärker können die Molekülketten miteinander verwoben werden und umso dichter gepackt liegenden die Poloxamer-Mizellen im Gel vor. Die zunehmende Verengung und Verwinkelung der Diffusionswege erschwert die Freisetzung [52, 56]. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Freisetzung von Naltrexon [52], Cefotiofur [102], rekombinantes Hirudin [104] und Lidocain [103] aus Lutrol[®] F 127 Hydrogelen erhalten. Auch bei diesen Arzneistoffen resultierte eine höhere Konzentration an Gelbildner in einer langsameren Wirkstofffreisetzung.

Aber nicht nur der Grad der Verengung der Diffusionswege nimmt einen Einfluss auf die Freisetzungsgeschwindigkeit, sondern auch die innere Struktur des Gels [54]. So konnten Takahashi et al. zeigen, dass Ibuprofen und Ketoprofen aus Xyloglycan-Gelen unterschiedlicher Konzentration schneller heraus diffundieren als aus einem Lutrol[®] F 127 25 % Hydrogel. Die stabförmigen, im Gel lateral-angeordnet vorliegenden

Xyloglycan-Ketten können Wasser nicht so stark immobilisieren wie die kubisch angeordneten Poloxamer-Mizellen, so dass der Wirkstoff aufgrund der einfacheren Diffusion schneller freigesetzt wird [54].

Initiale Versuche wurden mit Membranen aus Cellulosenitrat mit einer Porengröße von 25 nm durchgeführt. Da der Hersteller die Membranen zwischenzeitlich vom Markt genommen hatte, wurden die Untersuchungen mit Polycarbonatmembranen mit einer Porengröße von 15 nm wiederholt, um eine Vergleichbarkeit mit den nachfolgenden Versuchen zu schaffen. Daher wurde der Einfluss der Membranporengröße auf die Morphin-Freisetzung ermittelt. Auch die Porengröße der Membran beeinflusst die Wirkstoff-freisetzung. Das Resultat entsprach der Erwartung: Je kleiner die Porengröße der Membran, desto kleiner die resultierende kinetische Konstante und desto langsamer die Morphin-Freisetzung. Die oben beschriebene, starke Hygroskopizität des Lutrol® F 127 wirkt sich bei kleineren Membranporen weniger stark aus als bei großen Poren. Polycarbonat ist ebenso wie Cellulosenitrat für die Untersuchung hydrophiler Lösungen und Gele geeignet, der Materialeinfluss kann vernachlässigt werden.

Obwohl das Lutrol® F 127 27,5 % Gel die Morphin-Freisetzung stärker retardierte als das 25%ige Gel, wurde letzteres für die weiteren Versuche ausgewählt. Bei Einsatz des Gelbildners in 27,5%iger Konzentration bildete sich ein sehr festes Gel, das sich nicht reproduzierbar applizieren ließ.

Des Weiteren wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Freisetzungskinetik untersucht. Von Naltrexon ist bekannt, dass die Freisetzung aus einem Lutrol® F 127 Hydrogel bei einem pH-Wert von 5,5 und 8,5 schneller als bei pH 7,4 erfolgt [52]. Zur Einstellung des pH-Wertes von 6,0 und 7,4 wurde anstelle des bidestillierten Wassers Phosphatpuffer verwendet, um mögliche Einflüsse unterschiedlicher Ionenkonzentrationen auszuschließen. Die Wahl der beiden pH-Werte erfolgte nach unterschiedlichen Gesichtspunkten. Die Gele dieser Arbeit wurden normalerweise mit bidestilliertem Wasser hergestellt, das einen pH-Wert von 6,0 aufweist. Ein pH-Wert von 7,4 wurde ausgewählt, da hier die Naltrexon-Freisetzung am langsamsten verlief [52]. Gele in einem alkalischeren Bereich wurden nicht untersucht, da Morphin mit steigendem pH-Wert fast ausschließlich als Base vorliegt und damit die Freisetzung auch durch die Löslichkeit beeinflusst werden würde. Die kinetischen Konstanten zeigen keinen Einfluss der pH-Werte auf die Morphin-Freisetzung ($K_{LF\ 127\ 25\ \% \text{ pH } 6,0} = 37,71 \pm 6,94 \mu\text{g/h}^{1/2}$; $K_{LF\ 127\ 25\ \% \text{ pH } 7,4} = 36,93 \pm 5,54 \mu\text{g/h}^{1/2}$). Morphinhydrochlorid weist eine höhere Wasserlöslichkeit auf als Morphinbase und kann daher leichter aus der Donor- in die Akzeptorkammer diffundieren. Bei pH 7,4 liegt zwar deutlich weniger protoniertes Morphin vor, doch wird aufgrund des Fließgleichgewichtes zwischen den beiden Formen rasch MorH^+ nachgebildet, sobald es in die Akzeptorkammer diffundiert ist, so dass die Morphinfreisetzung sich bei pH 6,0 und 7,4 nicht unterscheidet.

Morphin-Freisetzung aus Lutrol® F 127 25 % Hydrogel im Vergleich zu Hydroxyethylcellulose Gel DAB

Abschließend wurde das Freisetzungsverhalten von Morphin aus den beiden Hydrogelen über einen Zeitraum von 48 Stunden untersucht. Die Inkorporation von Morphin in das Lutrol® F 127 25 % Hydrogel führte zu einer Verdoppelung der Freisetzungsdauer auf 24 Stunden im Vergleich zu Hydroxyethylcellulose Gel DAB. Somit sollte sich dieses Gel besser zur Behandlung schwerster Hautwunden eignen, da es eine länger andauernde, kontinuierliche Wirkstoffbereitstellung und eine länger anhaltende Schmerzausschaltung ermöglicht, wodurch die systemische Opioid-Dosis reduziert und für den Patienten belastende Nebenwirkungen vermieden werden könnten. Ob die Morphin-Freisetzung über 24 Stunden allerdings ausreicht, um den Verbandswechsel hinauszuzögern bzw. für den Patienten weniger schmerzhaft zu gestalten ist fraglich. Auch erscheint eine 24-stündige Freisetzung noch gering, verglichen mit einer 80%igen Naltrexon-Freisetzung nach 48 Stunden aus dem entsprechenden Poloxamer-Gel, das subkutan appliziert werden soll [52]. Aufgrund der Depot-Funktion der Hornschicht (*Stratum corneum*) können dermal applizierte Pharmaka in dieser gespeichert werden und so zu einer länger-anhaltenden Wirkung beitragen [43]. Bei topischer Applikation des Morphin-haltigen Poloxamer-Gels sollte daher in vivo eine die Freisetzung überdauernde Wirkung beobachtet werden können. Die Hornschicht ist bei schwersten Verletzungen der Haut meist zerstört, so dass man hier nicht mit einer zusätzlichen Depot-Wirkung rechnen kann.

5.4.3 (Per-) kutane Resorption (Penetration und Permeation)

Wie in Kapitel 5.4.2 beschrieben wird Morphin aus dem Lutrol® F 127 25 % Hydrogel deutlich langsamer freigesetzt als aus Hydroxyethylcellulose Gel DAB. Freisetzungsuntersuchungen, durchgeführt unter Verwendung von künstlichen Membranen, vermögen aber nur Effekte des Trägers zu charakterisieren. Mögliche Effekte der Hilfsstoffe auf die Penetration sowie die Penetrationseigenschaften des Wirkstoffes selbst bleiben unberücksichtigt [105]. Das Molekulargewicht und die Lipophilie (logP) haben den größten Einfluss auf die Penetration/Permeation der Haut [106, 107]. So weisen gut permeierende Substanzen ein Molekulargewicht kleiner 500 g/mol und einen logP zwischen 1 und 3 auf [107, 108]. Morphin erfüllt diese Voraussetzungen annähernd mit einem Molekulargewicht von 285,34 g/mol und einem logP von 0,78 [65]. Zur weiteren Charakterisierung der beiden Gele sollte die (per-) kutane Resorption von Morphin aus dem Lutrol® F 127 25 % Hydrogel im Vergleich zu Hydroxyethylcellulose Gel DAB untersucht werden. Gemäß der OECD-Prüfrichtlinie 428 „Hautresorption“ [72, 73] sind Humanhaut oder Haut tierischen Ursprungs für

Hautresorptionsuntersuchungen zu bevorzugen, allerdings kann auch rekonstruierte Epidermis oder rekonstruierte Vollhaut verwendet werden, da eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet ist [105, 109, 110]. Rekonstruierte Vollhaut ist im Vergleich zu Humanhaut deutlich dünner und weist aufgrund einer abweichenden Lipidkomposition weniger ausgeprägte Barriereigenschaften auf [111, 112]. Daher ist in vivo mit einer langsameren Penetration und Permeation des Morphins zu rechnen als bei Verwendung von RHS. Die (per-) kutane Resorption von Morphin wurde an rekonstruierter Vollhaut untersucht. Die Wahl fiel dabei auf das Vollhautmodell EFT-400 der MatTek Corporation, das bereits in anderen Studien für Hautresorptionsuntersuchungen [105, 113] und zur Etablierung eines Wundheilungsmodells [60, 65] eingesetzt wurde. Letzteres ist vor allem im Hinblick auf die Fortführung des Projektes wichtig, da auch die Resorption von Morphin an geschädigter Haut untersucht werden soll. Die Versuche wurden sowohl unter Finite als auch Infinite Dose Bedingungen durchgeführt. Bei Hautresorptionsuntersuchungen unter Finite Dose Bedingungen werden normalerweise $10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ der Untersuchungslösung appliziert [107]. Für die Hydrogel-Applikation konnte dies allerdings nicht übernommen werden: Um eine gleichmäßige Bedeckung der Hautoberfläche zu erlangen, mussten $23,4 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ der Formulierung aufgetragen werden.

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass mit der stärker verzögernden Freisetzung aus dem Lutrol[®] F 127 25 % Hydrogel auch die Penetration und Permeation von Morphin abnahmen (siehe Kapitel 4.5.3): Sowohl unter Finite als auch unter Infinite Dose Bedingungen penetrierte eine deutlich größere Menge an Morphin aus dem Hydroxyethylcellulose Gel DAB in Epidermis und Dermis als aus dem Lutrol[®] F 127 25 % Gel. Auch die P_{app} -Werte zeigen, dass Morphin nach Aufsättigung des Hautmodells (lag-Zeit) schneller aus dem Hydroxyethylcellulose Gel DAB permeiert. Daher ist in der Tat bei topischer Applikation des Gels in vivo mit einer sich langsamer entwickelnden und deutlich länger anhaltenden analgetischen Wirkung zu rechnen. Des Weiteren zeigt die Permeation des Vollhautmodells, dass Morphin bei topischer Applikation in geringen Mengen systemisch verfügbar sein sollte, so dass systemische Nebenwirkungen nicht ausgeschlossen werden können. Allerdings lag die im Akzeptormedium wiedergefundene Morphinmenge nach 6 Stunden unter 10 %, so dass angesichts der Biotransformation in der Leber mit einer geringeren Inzidenz an schwerwiegenden systemischen Nebenwirkungen zu rechnen ist.

Betrachtet man die Massenbilanz, die unter Finite Dose Bedingungen erhalten wurde, so zeigt sich ein Unterschied zwischen der wiedergefundenen Morphinmenge bei Verwendung des Hydroxyethylcellulose Gels mit ~ 96 % und des Lutrol[®]F 127 25 % Hydrogels mit ~ 82 %. Laut Definition sollte diese zwischen 90 und 110 % liegen, damit qualitativ hochwertige Daten erhalten werden. Die Diskrepanz zwischen den beiden Gelen weist auf einen systematischen Fehler bei der Probenaufarbeitung hin: Das Poloxamer Gel ist deutlich

adhesiver als das Hydroxyethylcellulose Gel DAB, so dass es fester an der Wand der Donorkammer anhaftet. Nach Versuchsende wurden das Stratum corneum und die Wände der Donorkammer mit PBS-getränkten Baumwolltüchern gewaschen, wobei immer die gleiche Anzahl an Tüchern verwendet wurde. Vermutlich wurde dabei das adhäsivere Gel nicht vollständig erfasst, was zu einem derartigen Unterschied in der Massenbilanz führen kann.

Abschließend lässt sich festhalten, dass das Poloxamer-Gel besser zur Behandlung schwerer Wunden der Haut geeignet ist, da es eine deutlich längere, kontinuierliche Morphin-Freisetzung gewährleistet als Hydroxyethylcellulose Gel DAB. Die (per-) kutane Resorption wurde im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung von intakter rekonstruierter Vollhaut untersucht, um den Einfluss des freisetzungverzögernden Effektes des Lutrol® F 127 25 % Hydrogels auf die Morphin Penetration und Permeation zu untersuchen und das Gel so weiter zu charakterisieren. Bei der Behandlung schwerster Hautwunden muss man jedoch berücksichtigen, dass die größte Penetrationsbarriere der Haut, das Stratum corneum, und auch die Epidermis durch Verletzung der Haut meist zerstört sind. Aufgrund der zerstörten Barriere kann es daher zu einer höheren Penetration und Permeation kommen.

5.5 Ausblick

Im weiteren Verlauf des Forschungsprojektes muss die (per-) kutane Resorption des Arzneistoffs aus dem Lutrol® F 127 25 % Hydrogel im Vergleich zum Referenzgel an geschädigter Haut bestimmt werden, um auch den Einfluss der beeinträchtigten Penetrationsbarriere zu untersuchen. Zur Verfügung stehen dafür entweder das bereits etablierte Wundmodell [60] oder aber reine Dermiskonstrukte (in eine Kollagenmatrix eingebettete Fibroblasten). Die Versuchsdurchführung kann analog zu oben beschriebenen Experimenten (siehe Kapitel 3.9) erfolgen.

Des Weiteren muss in Wundheilungsstudien untersucht werden, ob die beiden Gele (mit Morphin beladen und unbeladen) einen eigenen Einfluss auf das Wundheilungsverhalten zeigen. Hierfür kann ebenfalls das etablierte 3D-Wundheilungsmodell [60] eingesetzt werden.

Neben der (per-) kutanen Resorption soll zukünftig auch in Kooperation mit Prof. Dr. Christoph Stein (Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin; Charité Berlin) die systemische Aufnahme von Morphin aus den beiden Hydrogelen an Ratten untersucht

werden. Zur Bestimmung der systemisch resorbierten Morphinmenge soll hierbei das Verfahren der Mikrodialyse angewendet werden. Bei der Weiterführung des Projektes gilt es daher zu prüfen, ob die hier beschriebene HPLC-Methode mit einer unteren Nachweisgrenze von 0,0285 µg/ml auch für die Quantifizierung von Morphin in Mikrodialyseproben geeignet ist. Dafür muss auch die Extraktionsmethode auf Eignung überprüft und gegebenenfalls optimiert werden.

Erste klinische Studien zeigen einen positiven analgetischen Effekt von topisch applizierten Opioiden an kleinen Patientenkollektiven. Hierfür wurde bislang meist Intrasite-Gel als Trägersystem eingesetzt, das jedoch 50 % des Wirkstoffes bereits nach 2 Stunden freisetzt [12]. Im Hinblick auf eine dauerhafte Schmerzausschaltung, mit dem Ziel die Intervalle zwischen den Verbandswechseln zu vergrößern, ist das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Lutrol® F 127 25 % Hydrogel deutlich besser für die Behandlung schwerer Verletzungen der Haut geeignet, da eine kontinuierliche Wirkstofffreisetzung über 24 Stunden gewährleistet ist und die (per-) kutane Resorption verzögert abläuft. Bis heute fehlen randomisiert kontrollierte Studien an einem ausreichend großen Patientenkollektiv, die den positiven analgetischen Effekt von dermal applizierten Opioiden bestätigen. In diesen Studien sollte zukünftig das hier beschriebene Poloxamer Gel eingesetzt werden, um einen längeren analgetischen Effekt zu erlangen und so den für den Patienten sehr schmerzhaften Verbandswchsel hinauszuzögern. Auch eine regelmäßige Kontrolle des Blutspiegels wäre wünschenswert, um die systemisch resorbierte Menge an Morphin bestimmen zu können und so eine höhere Therapiesicherheit für den Patienten zu gewährleisten.

Zusammenfassung / Summary

6 Zusammenfassung

Systemisch applizierte Opioide sind die Therapie der Wahl zur Behandlung schwerster Schmerzen verursacht durch Verletzung der Haut. Die damit assoziierten Nebenwirkungen sind für den Patienten belastend und im Falle einer Atemdepression auch lebensbedrohend. Eine lokale Behandlung dieser Wunden mit topisch appliziertem Morphin ist aufgrund der Existenz von Opioidrezeptoren in der Haut prinzipiell möglich. Dadurch können Nebenwirkungen reduziert, eventuell sogar ganz vermieden werden, da die zusätzlich erforderliche systemische Dosis durch die topische Applikation von Morphin reduziert werden kann. Der regelmäßig stattfindende Verbandswechsel ist für den Patienten besonders schmerzhaft und birgt die Gefahr, das neugebildete Epithel zu zerstören. Ziel dieser Arbeit war es, einen geeigneten Träger für Morphin zu entwickeln, um eine kontinuierliche Wirkstofffreisetzung über mindestens 24 Stunden zu gewährleisten. Des Weiteren sollten die Biotransformation von Morphin in der Haut und die (per-) kutane Resorption untersucht werden.

Zunächst wurde die im Arbeitskreis entwickelte HPLC-Methode [65] zur Trennung von Morphin und Hydromorphon (interner Standard) weiterentwickelt und optimiert, um Morphin in den verschiedenen Testmatrizes quantitativ bestimmen zu können. Durch Einführung eines Fluoreszenz-Detektors konnte das untere Quantifizierungslimit für Morphin von 1 auf 0,1 μM erniedrigt werden, wodurch die Quantifizierung des Wirkstoffes in rekonstruierter Haut möglich wurde. Linearität, Auflösung sowie Intra- und Interday-Variabilität zeigen, dass die Methode reproduzierbare und valide Ergebnisse liefert.

Im nächsten Schritt wurde die Biotransformation von Morphin in der Haut durch Untersuchung der Genexpression der UDP-Glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7), dem wichtigsten Enzym des Morphinstoffwechsels, in primären humanen Keratinozyten und Fibroblasten sowie der Keratinozytenzelllinie HaCaT bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass UGT2B7 in den drei Zelltypen nicht bzw. nur in Spuren exprimiert wurde. Zur Bestätigung der Ergebnisse erfolgte zusätzlich noch ein Metabolisierungstest mit Hautmikrosomen. Die beiden Metabolite Morphin-3- und Morphin-6-glucuronid wurden nur in Spuren gebildet, so dass in vivo nicht mit einem nennenswerten Metabolismus von Morphin in der Haut zu rechnen ist.

Die Entwicklung einer Darreichungsform zur topischen Anwendung von Morphin war zunächst fokussiert auf feste Lipidnanopartikel (SLN) als Trägersystem, das eine langanhaltende und kontinuierliche Wirkstofffreisetzung ermöglichen kann. Es zeigte sich aber, dass SLN aufgrund der sehr geringen Einschlusseffizienz sowie der schnellen

Freisetzung aus der Dispersion nicht als Trägersystem für die kontinuierliche Morphin-Freisetzung geeignet sind. Auch die Einbettung der SLN in Hydroxyethylcellulose Gel DAB verbesserte die Freisetzungskinetik nicht nennenswert. Vielmehr zeigte sich durch Vergleich mit Morphin-beladenem Hydroxyethylcellulose Gel DAB, dass das Hydrogel alleine eine deutlich längere Freisetzung gewährleistet, weshalb im nächsten Schritt die Eignung von Poloxamer-Gelen als Trägersystem für Morphin untersucht wurde. Lutrol® F 127 25 % Hydrogel wies dabei die langsamste Morphin-Freisetzung auf und wurde näher charakterisiert. Mit steigender Konzentration an Gelbildner, d.h. mit enger werdenden Diffusionswegen innerhalb des Gels, nahm die Freisetzungsgeschwindigkeit ab. Ein signifikanter Unterschied zwischen pH 6,0 und 7,4 des Gels auf die Morphin-Freisetzung wurde nicht beobachtet. Zuletzt wurde die Morphin-Freisetzung aus dem Lutrol® F 127 25 % Hydrogel im Vergleich zu Hydroxyethylcellulose Gel DAB über einen Zeitraum von 48 Stunden bestimmt. Das Poloxamer-Gel erhöhte die Freisetzungsdauer von 12 (Hydroxyethylcellulose Gel DAB) auf 24 Stunden und eignet sich damit als Träger für Morphin, um eine langanhaltende kontinuierliche Wirkstofffreisetzung zu ermöglichen.

Der freisetzungsverzögernde Effekt des Poloxamer-Gels resultierte auch in einer langsameren Hautresorption. Sowohl unter Finite als auch Infinite Dose Bedingungen war nach 3 bzw. 6 Stunden eine größere Menge an Morphin aus Hydroxyethylcellulose Gel DAB in Epidermis und Dermis (rekonstruierte Humanhaut) penetriert als aus dem Lutrol® F 127 25 % Hydrogel. Auch die Permeation von Morphin aus diesem Gel erfolgte schneller und es wurden deutlich höhere Mengen an Morphin im Akzeptormedium nachgewiesen.

Freisetzungsverhalten und (per-) kutane Resorption von Morphin lassen bei Applikation in Form des Lutrol® F 127 25 % Hydrogels aufgrund der kontinuierlichen Wirkstofffreisetzung über 24 Stunden eine erfolgreiche Behandlung schwerer Verletzungen der Haut erwarten, da dies bei dem bislang in klinischen Studien eingesetzten IntraSite Gel der Fall ist. Vor Einsatz in weiteren klinischen Studien müssen allerdings die (per-) kutane Resorption an geschädigter Haut und der Einfluss der Gele auf die Wundheilung untersucht werden.

7 Summary

Pain caused by severe skin wounds asks for the treatment with systemically applied opioids which is associated with severe and encumbering adverse effects like respiratory depression. Due to the presence of opioid receptors in the skin the topical treatment with morphine is possible. Thus, the additionally required systemic dose and first of all the adverse effects may be reduced. Besides, standardized wound management including regular changes of the wound dressing is really painful for the patient and bears the risk of destroying the newly generated epithelia. The main objective of this work was the development of a suitable carrier system for morphine which provides a long-lasting, sustained drug release. In addition, biotransformation of morphine and percutaneous absorption were also investigated.

Initially an HPLC-method was developed further and optimized for the quantification of morphine and hydromorphone (internal standard) in different matrices based on a method previously developed within the work group [65]. The lower limit of quantification could be decreased from 1 to 0.1 μM using a fluorescence detector in combination with an UV-detector and the quantification of morphine in reconstructed human skin became possible. Linearity, resolution as well as intraday and interday variety show that the results obtained with this method are reproducible and valid.

In order to investigate the biotransformation of morphine in the skin, gene-expression of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7), the major metabolizing enzyme of morphine, was determined in normal human keratinocytes and fibroblasts as well as the keratinocyte cell line HaCaT. It was shown that UGT2B7 is not or only expressed in traces in the different cell types. In order to confirm these findings a biotransformation experiment with human skin microsomes was performed. Two hours of microsomal incubation resulted in a negligible formation of metabolites. Thus a considerable biotransformation of morphine in the skin can be excluded.

Solid lipid nanoparticles (SLN) which can provide sustained release were initially considered as a possible carrier system for morphine. It could be shown that SLN are not appropriate as a carrier system for morphine due to the low entrapment efficiency and the fast morphine release from the SLN-dispersion. The embedding of the particles in hydroxyethylcellulose gel DAB did not improve release kinetics in an adequate way. In fact, the hydrogel itself showed an even slower morphine release compared to the SLN-loaded gel. Thus, in the next steps poloxamer gels were investigated as a carrier system for morphine. Since the Lutrol[®] F 127 25 % hydrogel showed the slowest morphine release it was further characterized. It could be shown that release rates decreased with increasing concentration

of the gel forming agent due to decreasing diffusion pass ways within the gel. No significant difference in morphine release could be observed using gels with pH 7.4 and 6.0. Finally, morphine release from Lutrol[®] F 127 25 % hydrogel over a period of 48 hours was determined in comparison to hydroxyethylcellulose gel DAB. Release studies revealed that the Lutrol[®] F 127 25 % hydrogel is an appropriate carrier system for morphine: it provided a constant morphine release up to 24 hours, whereas 100 % of morphine were released after 12 hours from the reference gel.

The sustained release behavior of the poloxamer gel resulted also in a slower percutaneous absorption. In comparison to the poloxamer gel a higher amount of morphine penetrated in epidermis and dermis (reconstructed human skin) from the reference gel over a period of 3 or 6 hours, respectively, both under finite and infinite dose conditions. Hydroxyethylcellulose gel DAB provided also a higher morphine permeation.

Release behavior and percutaneous absorption of morphine from Lutrol[®] F 127 25 % hydrogel give reason to expect a successful treatment of severe skin wounds due to the long-lasting morphine release over 24 hours and the positive analgesic effect of IntraSite gel shown in clinical studies. Before the poloxamer gel can be used in clinical studies, percutaneous absorption of morphine in wounded skin and the influence of both gels on the wound healing process must be investigated.

Literatur

8 Literatur

1. Walters, K.A., *The Structure and Function of the Skin*, in *Dermatological and Transdermal Formulations* (2002), Marcel Dekker, Inc.: New York.
2. Hornstein, O.P. and E. Nürnberg, *Die Haut als Aufnahme- und Wirkungsort der externen Therapie*, in *Externe Therapie von Hautkrankheiten* (1985), Georg Thieme Verlag: Stuttgart.
3. Sobotta, *Atlas & Lehrbuch Histologie und mikroskopische Anatomie*. 4. Auflage (1929), © Lehmann, München.
4. Patzelt, *Histologie*. 3. Auflage (1948), © Urban & Schwarzenberg, München.
5. Bouwstra, J.A. and P.L. Honeywell-Nguyen, *Skin structure and mode of action of vesicles*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002. 54: p. S41-S55.
6. Horner, C.W., J. Atkins, L. Simpson, B. Philp, O. Shelley, and P. Dziejulski, *Estimating the usage of allograft in the treatment of major burns*. *Burns*, 2011. 37: p. 590-3.
7. Andreassi, A., R. Bilenchi, M. Biagioli, and C. D'Aniello, *Classification and pathophysiology of skin grafts*. *Clin Dermatol*, 2005. 23: p. 332-7.
8. Kasten, K.R., A.T. Makley, and R.J. Kagan, *Update on the critical care management of severe burns*. *J Intensive Care Med*, 2011. 26: p. 223-36.
9. Richardson, P. and L. Mustard, *The management of pain in the burns unit*. *Burns*, 2009. 35: p. 921-36.
10. Summer, G.J., K.A. Puntillo, C. Miaskowski, P.G. Green, and J.D. Levine, *Burn injury pain: the continuing challenge*. *J Pain*, 2007. 8: p. 533-48.
11. Wiechman Askay, S., D.R. Patterson, S.R. Sharar, S. Mason, and B. Faber, *Pain management in patients with burn injuries*. *Int Rev Psychiatry*, 2009. 21: p. 522-30.
12. Farley, P., *Should topical opioid analgesics be regarded as effective and safe when applied to chronic cutaneous lesions?* *J Pharm Pharmacol*, 2011. 63: p. 747-56.
13. Cuignet, O., J. Mbuyamba, and J. Pirson, *The long-term analgesic efficacy of a single-shot fascia iliaca compartment block in burn patients undergoing skin-grafting procedures*. *J Burn Care Rehabil*, 2005. 26: p. 409-15.
14. Jurna, I., *Sertürner und Morphin – eine historische Vignette*. *Der Schmerz*, 2003. 17: p. 280-283.

15. Maurer, H.H., C. Sauer, and D.S. Theobald, *Toxicokinetics of drugs of abuse: current knowledge of the isoenzymes involved in the human metabolism of tetrahydrocannabinol, cocaine, heroin, morphine, and codeine*. *Ther Drug Monit*, 2006. 28: p. 447-53.
16. Steinhilber, D., M. Schubert-Zsilavec, and H.J. Roth, *Medizinische Chemie - Targets und Arzneistoffe* (2005), Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart.
17. Freye, E., *Opiode in der Medizin* (2010), Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
18. Stein, C., H. Machelska, W. Binder, and M. Schafer, *Peripheral opioid analgesia*. *Curr Opin Pharmacol*, 2001. 1: p. 62-5.
19. Bigliardi, P.L., M. Bigliardi-Qi, S. Buechner, and T. Rufli, *Expression of mu-opiate receptor in human epidermis and keratinocytes*. *J Invest Dermatol*, 1998. 111: p. 297-301.
20. Salemi, S., A. Aeschlimann, N. Reisch, A. Jungel, R.E. Gay, F.L. Heppner, B.A. Michel, S. Gay, and H. Sprott, *Detection of kappa and delta opioid receptors in skin--outside the nervous system*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 338: p. 1012-7.
21. Bigliardi, P.L., D.J. Tobin, C. Gaveriaux-Ruff, and M. Bigliardi-Qi, *Opioids and the skin--where do we stand?* *Exp Dermatol*, 2009. 18: p. 424-30.
22. Bigliardi-Qi, M., L.T. Sumanovski, S. Buchner, T. Rufli, and P.L. Bigliardi, *Mu-opiate receptor and beta-endorphin expression in nerve endings and keratinocytes in human skin*. *Dermatology*, 2004. 209: p. 183-9.
23. Ballas, S.K., *Treatment of painful sickle cell leg ulcers with topical opioids*. *Blood*, 2002. 99: p. 1096.
24. Gallagher, R.E., D.R. Arndt, and K.L. Hunt, *Analgesic effects of topical methadone: a report of four cases*. *Clin J Pain*, 2005. 21: p. 190-2.
25. Twillman, R.K., T.D. Long, T.A. Cathers, and D.W. Mueller, *Treatment of painful skin ulcers with topical opioids*. *J Pain Symptom Manage*, 1999. 17: p. 288-92.
26. Back, I.N. and I. Finlay, *Analgesic effect of topical opioids on painful skin ulcers*. *J Pain Symptom Manage*, 1995. 10: p. 493.
27. Krajnik, M., Z. Zylicz, I. Finlay, J. Luczak, and A.A. van Sorge, *Potential uses of topical opioids in palliative care--report of 6 cases*. *Pain*, 1999. 80: p. 121-5.
28. Flock, P., L. Gibbs, and N. Sykes, *Diamorphine-metronidazole gel effective for treatment of painful infected leg ulcers*. *J Pain Symptom Manage*, 2000. 20: p. 396-7.
29. Watterson, G., R. Howard, and A. Goldman, *Peripheral opioids in inflammatory pain*. *Arch Dis Child*, 2004. 89: p. 679-81.

30. Porzio, G., F. Aielli, L. Verna, K. Cannita, P. Marchetti, and C. Ficorella, *Topical morphine in the treatment of painful ulcers*. J Pain Symptom Manage, 2005. 30: p. 304-5.
31. van Ingen, I.L., M.M. Jansen, and P. Barrera, *Topical opioids for painful ulcers in systemic sclerosis*. Ann Rheum Dis, 2008. 67: p. 427.
32. Barker, S., *Analgesic effect of locally applied morphine to pyoderma gangrenosum*. Clin Exp Dermatol, 2009. 34: p. 91-2.
33. Long, T.D., T.A. Cathers, R. Twillman, T. O'Donnell, N. Garrigues, and T. Jones, *Morphine-Infused silver sulfadiazine (MISS) cream for burn analgesia: a pilot study*. J Burn Care Rehabil, 2001. 22: p. 118-23.
34. Flock, P., *Pilot study to determine the effectiveness of diamorphine gel to control pressure ulcer pain*. J Pain Symptom Manage, 2003. 25: p. 547-54.
35. Zeppetella, G., J. Paul, and M.D. Ribeiro, *Analgesic efficacy of morphine applied topically to painful ulcers*. J Pain Symptom Manage, 2003. 25: p. 555-8.
36. Abbas, S.Q., *Diamorphine-Intrasite dressings for painful pressure ulcers*. J Pain Symptom Manage, 2004. 28: p. 532-4.
37. Zeppetella, G. and M.D. Ribeiro, *Morphine in intrasite gel applied topically to painful ulcers*. J Pain Symptom Manage, 2005. 29: p. 118-9.
38. Skiveren, J., M. Haedersdal, P.A. Philipsen, S.R. Wiegell, and H.C. Wulf, *Morphine gel 0.3% does not relieve pain during topical photodynamic therapy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study*. Acta Derm Venereol, 2006. 86: p. 409-11.
39. Welling, A., *A randomised controlled trial to test the analgesic efficacy of topical morphine on minor superficial and partial thickness burns in accident and emergency departments*. Emerg Med J, 2007. 24: p. 408-12.
40. Huptas, L., N. Rompoti, S. Herbig, A. Korber, J. Klode, D. Schadendorf, and J. Dissemond, *[A new topically applied morphine gel for the pain treatment in patients with chronic leg ulcers: first results of a clinical investigation]*. Hautarzt, 2011. 62: p. 280-6.
41. Ribeiro, M.D., S.P. Joel, and G. Zeppetella, *The bioavailability of morphine applied topically to cutaneous ulcers*. J Pain Symptom Manage, 2004. 27: p. 434-9.
42. Mehnert, W. and K. Mäder, *Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. 47: p. 165-196.

43. Schäfer-Korting, M., W. Mehnert, and H.C. Korting, *Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007. 59: p. 427-43.
44. Müller, R.H., K. Mader, and S. Gohla, *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000. 50: p. 161-77.
45. Blaschke, T., L. Kankate, and K.D. Kramer, *Structure and dynamics of drug-carrier systems as studied by piezoelectric spectroscopy*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007. 59: p. 403-10.
46. Chen, H., X. Chang, D. Du, W. Liu, J. Liu, T. Weng, Y. Yang, H. Xu, and X. Yang, *Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting*. *J Control Release*, 2006. 110: p. 296-306.
47. Liu, J., W. Hu, H. Chen, Q. Ni, H. Xu, and X. Yang, *Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery*. *Int J Pharm*, 2007. 328: p. 191-5.
48. Santos Maia, C., W. Mehnert, M. Schaller, H.C. Korting, A. Gysler, A. Haberland, and M. Schäfer-Korting, *Drug targeting by solid lipid nanoparticles for dermal use*. *J Drug Target*, 2002. 10: p. 489-95.
49. zur Mühlen, A., C. Schwarz, and W. Mehnert, *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery--drug release and release mechanism*. *Eur J Pharm Biopharm*, 1998. 45: p. 149-55.
50. Hu, F.Q., H. Yuan, H.H. Zhang, and M. Fang, *Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization*. *Int J Pharm*, 2002. 239: p. 121-8.
51. Guzmán, M., F.F. García, J. Molpeceres, and M.R. Aberturas, *Polyoxyethylene-polyoxypropylene block copolymer gels as sustained release vehicles for subcutaneous drug administration*. *Int J Pharm*, 1992. 80: p. 119-127.
52. Derakhshandeh, K., M. Fashi, and S. Seifoleslami, *Thermosensitive Pluronic hydrogel: prolonged injectable formulation for drug abuse*. *Drug Des Devel Ther*, 2010. 4: p. 255-262.
53. Liaw, J. and Y.-C. Lin, *Evaluation of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) gels as a release vehicle for percutaneous fentanyl*. *Journal of Controlled Release*, 2000. 68: p. 273-282.

54. Takahashi, A., S. Suzuki, N. Kawasaki, W. Kubo, S. Miyazaki, R. Loebenberg, J. Bachynsky, and D. Attwood, *Percutaneous absorption of non-steroidal anti-inflammatory drugs from in situ gelling xyloglucan formulations in rats*. *Int J Pharm*, 2002. 246: p. 179-86.
55. BASF, *Lutrol® L and Lutrol® F Grades*. Pharma Ingredients and Services - Technical Information, 2010. 1-8.
56. Escobar-Chavez, J.J., M. Lopez-Cervantes, A. Naik, Y.N. Kalia, D. Quintanar-Guerrero, and A. Ganem-Quintanar, *Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations*. *J Pharm Pharm Sci*, 2006. 9: p. 339-58.
57. Schmolka, I.R., *Artificial skin. I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns*. *J Biomed Mater Res*, 1972. 6: p. 571-82.
58. Poonawala, T., B.K. Levay-Young, R.P. Hebbel, and K. Gupta, *Opioids heal ischemic wounds in the rat*. *Wound Repair Regen*, 2005. 13: p. 165-74.
59. Rook, J.M. and K.E. McCaaron, *Delay of cutaneous wound closure by morphine via local blockade of peripheral tachykinin release*. *Biochem Pharmacol*, 2007. 74: p. 752-7.
60. Kuchler, S., N.B. Wolf, S. Heilmann, G. Weindl, J. Helfmann, M.M. Yahya, C. Stein, and M. Schäfer-Korting, *3D-Wound healing model: Influence of morphine and solid lipid nanoparticles*. *Journal of Biotechnology*, 2010. 148: p. 24-30.
61. Rook, J.M., W. Hasan, and K.E. McCaaron, *Temporal effects of topical morphine application on cutaneous wound healing*. *Anesthesiology*, 2008. 109: p. 130-6.
62. Wolf, N.B., S. Kuchler, M.R. Radowski, T. Blaschke, K.D. Kramer, G. Weindl, B. Kleuser, R. Haag, and M. Schäfer-Korting, *Influences of opioids and nanoparticles on in vitro wound healing models*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009. 73: p. 34-42.
63. Boateng, J.S., K.H. Matthews, H.N. Stevens, and G.M. Eccleston, *Wound healing dressings and drug delivery systems: a review*. *J Pharm Sci*, 2008. 97: p. 2892-923.
64. McIlvaine, T.C., *A buffer solution for colorimetric comparison*. *J Biol Chem*, 1921. 49: p. 183-186.
65. Wolf, N., *Topische Applikation von Opioiden - Einfluß auf die Wundheilung und Untersuchung möglicher Trägersysteme*, Institut für Pharmazie - Pharmakologie und Toxikologie (2009), FU Berlin, Berlin

66. Meng, Q.C., M. Soleded Cepeda, T. Kramer, H. Zou, D.J. Matoka, and J. Farrar, *High-performance liquid chromatographic determination of morphine and its 3- and 6-glucuronide metabolites by two-step solid-phase extraction*. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2000. 742: p. 115-123.
67. Hupka, Y., J. Beike, J. Roegerer, B. Brinkmann, G. Blaschke, and H. Kohler, *HPLC with laser-induced native fluorescence detection for morphine and morphine glucuronides from blood after immunoaffinity extraction*. *Int J Legal Med*, 2005. 119: p. 121-8.
68. Sun, C. and A. Di Rienzo, *UGT2B7 is not expressed in normal breast*. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2009. 117: p. 225-226.
69. Congiu, M., M.L. Mashford, J.L. Slavin, and P.V. Desmond, *UDP glucuronosyltransferase mRNA levels in human liver disease*. *Drug Metab Dispos*, 2002. 30: p. 129-134.
70. Lombardi Borgia, S., M. Regehly, R. Sivaramakrishnan, W. Mehnert, H.C. Korting, K. Danker, B. Röder, K.D. Kramer, and M. Schäfer-Korting, *Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement--correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and paretic spectroscopy*. *Journal of Controlled Release*, 2005. 110: p. 151-163.
71. Lombardi Borgia, S., P. Schlupp, W. Mehnert, and M. Schäfer-Korting, *In vitro skin absorption and drug release - A comparison of six commercial prednicarbate preparations for topical use*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008. 68: p. 380-389.
72. OECD, *Guidance Document No 28 for the conduct of skin absorption studies*. Adopted at 35th Joint Meeting August 2003, 2003.
73. OECD, *Test Guideline 428: Skin absorption: in vitro Method*. Adopted on 13th April 2004, 2004.
74. Netzlaff, F., M. Kaca, U. Bock, E. Haltner-Ukomadu, P. Meiers, C.M. Lehr, and U.F. Schaefer, *Permeability of the reconstructed human epidermis model Episkin in comparison to various human skin preparations*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2007. 66: p. 127-34.
75. Niedorf, F., E. Schmidt, and M. Kietzmann, *The automated, accurate and reproducible determination of steady-state permeation parameters from percutaneous permeation data*. *Altern Lab Anim*, 2008. 36: p. 201-13.
76. Vuia, A.G., *Rekonstruierte humane Epidermis für die Bestimmung der perkutanen Absorption in vitro - eine Validierungsstudie -*, Institut für Pharmazie - Pharmakologie und Toxikologie (2007), FU Berlin, Berlin

77. Müller, R.H. and R. Schuhmann, *Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis* (1996), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
78. Toyo'oka, T., M. Yano, M. Kato, and Y. Nakahara, *Simultaneous determination of morphine and its glucuronides in rat hair and rat plasma by reversed-phase liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry*. *Analyst*, 2001. 126: p. 1339-45.
79. Ahsman, M.J., B.C. van der Nagel, and R.A. Mathot, *Quantification of midazolam, morphine and metabolites in plasma using 96-well solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Biomed Chromatogr*, 2010. 24: p. 969-76.
80. Hackett, L.P., L.J. Dusci, K.F. Ilett, and G.M. Chiswell, *Optimizing the hydrolysis of codeine and morphine glucuronides in urine*. *Ther Drug Monit*, 2002. 24: p. 652-7.
81. Wang, P., J.A. Stone, K.H. Chen, S.F. Gross, C.A. Haller, and A.H. Wu, *Incomplete recovery of prescription opioids in urine using enzymatic hydrolysis of glucuronide metabolites*. *J Anal Toxicol*, 2006. 30: p. 570-5.
82. Romberg, R.W. and L. Lee, *Comparison of the hydrolysis rates of morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide with acid and beta-glucuronidase*. *J Anal Toxicol*, 1995. 19: p. 157-62.
83. Mahmoud, A., A. Haberland, M. Durrfeld, D. Heydeck, S. Wagner, and M. Schäfer-Korting, *Cutaneous estradiol permeation, penetration and metabolism in pig and man*. *Skin Pharmacol Physiol*, 2005. 18: p. 27-35.
84. Luu-The, V., C. Ferraris, D. Duche, P. Belanger, J. Leclaire, and F. Labrie, *Steroid metabolism and profile of steroidogenic gene expression in Episkin: high similarity with human epidermis*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007. 107: p. 30-6.
85. Sawe, J., J.O. Svensson, and A. Rane, *Morphine metabolism in cancer patients on increasing oral doses--no evidence for autoinduction or dose-dependence*. *Br J Clin Pharmacol*, 1983. 16: p. 85-93.
86. Bock, K.W. and C. Kohle, *Topological aspects of oligomeric UDP-glucuronosyltransferases in endoplasmic reticulum membranes: advances and open questions*. *Biochem Pharmacol*, 2009. 77: p. 1458-65.
87. Dudda, A. and G. Kürzel, *Metabolism Studies in vitro and in vivo*, in *Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays*, H. Vogel, Editor (2006), Springer-Verlag.

88. Hara, Y., M. Nakajima, K. Miyamoto, and T. Yokoi, *Morphine glucuronosyltransferase activity in human liver microsomes is inhibited by a variety of drugs that are co-administered with morphine*. Drug Metab Pharmacokinet, 2007. 22: p. 103-12.
89. Fisher, M.B., K. Campanale, B.L. Ackermann, M. VandenBranden, and S.A. Wrighton, *In vitro glucuronidation using human liver microsomes and the pore-forming peptide alamethicin*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 2000. 28: p. 560-6.
90. Stecova, J., W. Mehnert, T. Blaschke, B. Kleuser, R. Sivaramakrishnan, C.C. Zouboulis, H. Seltmann, H.C. Korting, K.D. Kramer, and M. Schäfer-Korting, *Cyproterone acetate loading to lipid nanoparticles for topical acne treatment: particle characterisation and skin uptake*. Pharm Res, 2007. 24: p. 991-1000.
91. Kückler, S., M.R. Radowski, T. Blaschke, M. Dathe, J. Plendl, R. Haag, M. Schäfer-Korting, and K.D. Kramer, *Nanoparticles for skin penetration enhancement--a comparison of a dendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles*. Eur J Pharm Biopharm, 2009. 71: p. 243-50.
92. Müller, R.H., R.D. Petersen, A. Hommos, and J. Pardeike, *Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2007. 59: p. 522-30.
93. Müller, R.H., M. Radtke, and S.A. Wissing, *Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs*. Int J Pharm, 2002. 242: p. 121-8.
94. Zhang, T., J. Chen, Y. Zhang, Q. Shen, and W. Pan, *Characterization and evaluation of nanostructured lipid carrier as a vehicle for oral delivery of etoposide*. Eur J Pharm Sci, 2011. 43: p. 174-9.
95. Souto, E.B., S.A. Wissing, C.M. Barbosa, and R.H. Muller, *Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery*. Int J Pharm, 2004. 278: p. 71-7.
96. Radowski, M.R., A. Shukla, H. von Berlepsch, C. Bottcher, G. Pickaert, H. Rehage, and R. Haag, *Supramolecular aggregates of dendritic multishell architectures as universal nanocarriers*. Angew Chem Int Ed Engl, 2007. 46: p. 1265-9.
97. Kückler, S., M. Abdel-Mottaleb, A. Lamprecht, M.R. Radowski, R. Haag, and M. Schäfer-Korting, *Influence of nanocarrier type and size on skin delivery of hydrophilic agents*. Int J Pharm, 2009. 377: p. 169-72.
98. Weber, M., *Persönliche Mitteilung*, 2011: Zuse-Institut-Berlin, Berlin.

99. Singka, G.S., N.A. Samah, M.H. Zulfakar, A. Yurdasiper, and C.M. Heard, *Enhanced topical delivery and anti-inflammatory activity of methotrexate from an activated nanogel*. Eur J Pharm Biopharm, 2010. 76: p. 275-81.
100. Nalbandian, R.M., R.L. Henry, and H.S. Wilks, *Artificial skin. II. Pluronic F-127 Silver nitrate or silver lactate gel in the treatment of thermal burns*. J Biomed Mater Res, 1972. 6: p. 583-90.
101. Nalbandian, R.M., R.L. Henry, K.W. Balko, D.V. Adams, and N.R. Neuman, *Pluronic F-127 gel preparation as an artificial skin in the treatment of third-degree burns in pigs*. J Biomed Mater Res, 1987. 21: p. 1135-48.
102. Zhang, L., D.L. Parsons, C. Navarre, and U.B. Kompella, *Development and in-vitro evaluation of sustained release poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur*. J Control Release, 2002. 85: p. 73-81.
103. Ricci, E.J., L.O. Lunardi, D.M. Nanclares, and J.M. Marchetti, *Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels*. Int J Pharm, 2005. 288: p. 235-44.
104. Liu, Y., W.L. Lu, J.C. Wang, X. Zhang, H. Zhang, X.Q. Wang, T.Y. Zhou, and Q. Zhang, *Controlled delivery of recombinant hirudin based on thermo-sensitive Pluronic F127 hydrogel for subcutaneous administration: In vitro and in vivo characterization*. J Control Release, 2007. 117: p. 387-95.
105. Schäfer-Korting, M., A. Mahmoud, S. Lombardi Borgia, B. Brüggener, B. Kleuser, S. Schreiber, and W. Mehnert, *Reconstructed epidermis and full-thickness skin for absorption testing: influence of the vehicles used on steroid permeation*. Altern Lab Anim, 2008. 36: p. 441-52.
106. Magnusson, B.M., Y.G. Anissimov, S.E. Cross, and M.S. Roberts, *Molecular size as the main determinant of solute maximum flux across the skin*. J Invest Dermatol, 2004. 122: p. 993-9.
107. Schäfer-Korting, M., U. Bock, W. Diembeck, H.J. Dusing, A. Gamer, E. Haltner-Ukomadu, C. Hoffmann, M. Kaca, H. Kamp, S. Kersen, M. Kietzmann, H.C. Korting, H.U. Krachter, C.M. Lehr, M. Liebsch, A. Mehling, C. Müller-Goymann, F. Netzlaff, F. Niedorf, M.K. Rubbelke, U. Schafer, E. Schmidt, S. Schreiber, H. Spielmann, A. Vuia, and M. Weimer, *The use of reconstructed human epidermis for skin absorption testing: Results of the validation study*. Altern Lab Anim, 2008. 36: p. 161-87.
108. Hadgraft, J. and M.E. Lane, *Skin permeation: the years of enlightenment*. Int J Pharm, 2005. 305: p. 2-12.

109. Schäfer-Korting, M., U. Bock, A. Gamer, A. Haberland, E. Haltner-Ukomadu, M. Kaca, H. Kamp, M. Kietzmann, H.C. Korting, H.U. Krachter, C.M. Lehr, M. Liebsch, A. Mehling, F. Netzlaff, F. Niedorf, M.K. Rubbelke, U. Schäfer, E. Schmidt, S. Schreiber, K.R. Schroder, H. Spielmann, and A. Vuia, *Reconstructed human epidermis for skin absorption testing: results of the German prevalidation study*. *Altern Lab Anim*, 2006. 34: p. 283-94.
110. Ackermann, K., S.L. Borgia, H.C. Korting, K.R. Mewes, and M. Schäfer-Korting, *The Phenion full-thickness skin model for percutaneous absorption testing*. *Skin Pharmacol Physiol*, 2010. 23: p. 105-12.
111. Van Gele, M., B. Geusens, L. Brochez, R. Speeckaert, and J. Lambert, *Three-dimensional skin models as tools for transdermal drug delivery: challenges and limitations*. *Expert Opin Drug Deliv*, 2011. 8: p. 705-20.
112. Netzlaff, F., C.M. Lehr, P.W. Wertz, and U.F. Schaefer, *The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005. 60: p. 167-78.
113. Sheasgreen, J., M. Klausner, H. Kandarova, and D. Ingalls, *The MatTek story - how the three Rs principles led to 3-D tissue success!* *Altern Lab Anim*, 2009. 37: p. 611-22.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

10 Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
cDNA	copy-DNA
CMS	dendritische Kern-Multischalen-Nanotransporter (dendritic core-multishell nanotransporter)
CYP	Cytochrom P450 Monooxygenase
DAB	Deutsches Arzneibuch
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds-DNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
HaCaT	Spontan immortalisierte Keratinozytenzelllinie
HEC	Hydroxyethylcellulose
hEGF	humaner epithelialer Wachstumsfaktor
HepG2	Leberzelllinie (human caucasian hepytocyte carcinoma)
HSD	Hydroxysteroiddehydrogenase
I.U.	international Unit
K	kinetische Konstante
KBM	Keratinozytenbasalmedium
KGM	Keratinozytenwachstumsmedium
LD	Laserdiffraktometrie
LF	Lutrol [®] F
M-3-G	Morphin-3-glucuronid
M-6-G	Morphin-6-glucuronid

Mor	Morphin
MorH ⁺	protoniertes Morphin
mPEG	Monomethoxy-Polyethylenglycol
mRNA	messenger-RNA
NHDF	normale humane dermale Fibroblasten
NHK	normale humane Keratinozyten
NLC	nanopartikuläre Lipid-Carrier (nanostructured lipid carrier)
OR	Opioidrezeptor
ORL-1	opiod-like receptor 1
P _{app}	scheinbarer Permeabilitätskoeffizient
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PdI	Polydispersitätsindex
R ²	Korrelationskoeffizient
RHS	rekonstruierte Humanhaut
RNA	Ribonukleinsäure
R _s	Auflösung
rt-PCR	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)
SLN	feste Lipidnanopartikel (Solid Lipid Nanoparticles)
UDPGA	Uridindiphosphat-Glucuronsäure
UGT2B7	UDP-Glucuronosyltransferase 2B7
UV	ultraviolett
YWHAZ	Tyrosin-3-monooxygenase-/ Tryptophan-5-monooxygenase-Aktivierungsprotein
ZNS	zentrales Nervensystem

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, Sarah Heilmann, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den _____

Sarah Heilmann