

Aus dem  
CharitéCentrum für Innere Medizin und Dermatologie  
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. T. Zuberbier

## **Habilitationsschrift**

# **Follikuläre und transfollikuläre Penetration**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Dermatologie und Venerologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. Alexa Patzelt**  
**geboren in Offenbach am Main**

<b>Eingereicht:</b>	<b>Oktober 2016</b>
<b>Dekan:</b>	<b>Prof. Dr. med. Axel R. Pries</b>
<b>1. Gutachter/in:</b>	<b>Prof. Dr. med. Steffen Emmert</b>
<b>2. Gutachter/in:</b>	<b>Prof. Dr. med. Peter Elsner</b>

Inhaltsverzeichnis	2
--------------------	---

## **Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis .....	2
Abkürzungsverzeichnis .....	4
1. Einleitung .....	5
1.1 Die Hautbarriere .....	5
1.2 Penetrationswege in die Haut .....	8
1.3 Die Struktur und Funktion des Haarfollikels .....	10
1.3.1 Anatomie des Haarfollikels .....	11
1.3.2 Die Barriere innerhalb des Haarfollikels .....	11
1.3.3 Funktion des Haarfollikels .....	12
1.4 Besonderheiten des Haarfollikels – warum ist der Haarfollikel ein besonders interessanter Penetrationsweg? .....	13
1.4.1 Follikuläre und perifollikuläre Zielstrukturen .....	13
1.4.2 Selektive follikuläre Penetration von partikulären Substanzen .....	15
1.4.3 Follikuläre versus transfollikuläre Penetration .....	15
1.5 Methoden zur Untersuchung der follikulären Penetration .....	17
1.6 Zielstellung der Arbeit .....	19
2. Eigene Arbeiten .....	21
2.1 Entwicklungen von Methoden zur Bestimmung der follikulären und transfollikulären Penetration .....	21
2.1.1 Die Rolle des Haarfollikel bei der perkutanen Absorption von Koffein .....	22
2.1.2 Differentielles Stripping: Bestimmung der Menge an topisch applizierter Substanz, die in den Haarfollikel penetriert ist .....	29
2.2 Bewertung von ex vivo Hautmodellen für die Untersuchung der follikulären Penetration .....	36
2.2.1 Die Methode des differentiellen Strippings zeigt eine signifikante Reduktion des follikulären Reservoirs in vitro im Vergleich zu in vivo .....	37
2.2.2 Vergleich der Haarfollikelmorphologie von acht verschiedenen Säugetieren und Menschen .....	43
2.3 Warum sind partikuläre Substanzen besonders gut für die follikuläre Penetration geeignet? .....	52
2.3.1 Bestimmung der Dicke der Kutikula von Schweinehaaren und menschlichen Haaren und die Möglichkeit des Einflusses der Kutikuladicke auf den follikulären Penetrationsprozess von Nanopartikeln .....	53
2.3.2 Selektives follikuläre Targeting durch Modifikation der Partikelgröße .....	58
2.4 Untersuchungen zur getriggerten Freisetzung von Wirkstoffen aus Nanocarriern im Haarfollikel .....	63
2.4.1 Getriggerte Wirkstofffreisetzung aus Partikeln im Haarfollikel .....	64

2.4.2 Durch IRA-Strahlung getriggerte Freisetzung eines Modelwirkstoffes aus AuNP-dotierten BSA Nanocarriern im Haarfollikel.....	71
3. Diskussion .....	81
3.1 Entwicklung von Methoden zur Bestimmung der follikulären und transfollikulären Penetration .....	81
3.2 Bewertung von ex vivo Hautmodellen für die Untersuchung der follikulären Penetration .....	85
3.3 Warum sind partikuläre Substanzen besonders gut für die follikuläre Penetration geeignet?.....	87
3.4 Untersuchungen zur getriggerten Freisetzung von Wirkstoffen aus Nanocarriern im Haarfollikel .....	88
4. Zusammenfassung .....	92
5. Literaturangabe .....	95
Danksagung .....	102
Erklärung .....	103

**Abkürzungsverzeichnis**

UV	Ultraviolet
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
LogKow	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
o/w	Öl in Wasser
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
Cy5	Cyanin5
BSA	Bovines Serumalbumin
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
CaCO <sub>3</sub>	Calciumcarbonat
wIRA	Wassergefiltertes Infrarot A
AuNP	Goldnanopartikel

## 1. Einleitung

Möchte man einem lebenden Organismus Substanzen oder Wirkstoffe zuführen, gibt es hierfür im Prinzip drei mögliche Darreichungsformen. Entweder wird die Substanz oral verabreicht und gelangt über den Gastrointestinaltrakt in den Organismus oder man injiziert den Wirkstoff z.B. intravenös, subkutan bzw. intramuskulär oder er wird mit Hilfe von einfachen Vehikeln, Penetrationsverstärkern oder komplexen Drug Delivery Systemen auf die Haut aufgetragen. Bei der topischen Verabreichungsform muss dann noch unterschieden werden, ob die Substanz direkt in oder auf der Haut wirken oder transdermal in den Organismus aufgenommen werden soll.

Schon seit dem 18. Jahrhundert gibt es Bemühungen, Wirkstoffe über die Haut zu applizieren, wobei damals vor allem tierische und menschliche Körperflüssigkeiten wie Magensäure und Speichel als Penetrationsverstärker eingesetzt wurden <sup>1</sup>. Während diese Versuche vermutlich auf Basis empirischer Beobachtungen stattgefunden haben, gibt es seitdem kontinuierliche wissenschaftliche Bemühungen, die Penetrationsmechanismen von topisch applizierten Substanzen zu verstehen und zu verbessern.

### 1.1 Die Hautbarriere

Die größte Herausforderung stellt dabei die Hautbarriere dar, welche den Organismus von der Umwelt abgrenzt und schützt. Insgesamt hat die Haut viele verschiedene Barriereigenschaften: sie bietet eine physikalische Barriere, um den Organismus vor mechanischen Verletzungen zu schützen, eine Permeabilitätsbarriere, um einerseits den Wasser- und Elektrolytverlust zu verhindern und andererseits das Eindringen von Schadstoffen, Mikroorganismen und Allergenen abzuwehren, eine UV-Barriere, um UV-Licht-induzierte Schädigungen wie Sonnenbrand und Hauttumore zu inhibieren, eine oxidative Barriere, um oxidative Schäden an Zellmembranen und -lipiden zu hemmen, eine thermische Barriere für die Wärmeisolation sowie eine immunologische und eine mikrobielle Barriere <sup>2</sup>. Die verschiedenen Barrierefunktionen der Haut sind in Abbildung 1 zusammengefasst.

Für die Permeabilitätsbarriere ist hauptsächlich das Stratum corneum verantwortlich. Das Stratum corneum besteht aus mehreren Lagen Korneozyten, welche die Endprodukte der terminalen Differenzierung von epidermalen Keratinozyten sind <sup>3</sup>.

Die Kerneozyten wiederum sind von speziell zusammengesetzten und ausgerichteten Lipidschichten umgeben <sup>4</sup>. Diese extrazellulären Lipide bestehen aus Ceramiden, Cholesterol und freien Fettsäuren, stammen aus den Lamellarkörpern und sind von besonderer Bedeutung für die Wasser- und Elektrolytretention und wirken effektiv gegen das Eindringen von Mikroorganismen <sup>5</sup>. Klassischerweise wird die Struktur des Stratum corneum als Ziegelstein-Mörtel-Modell beschrieben, wobei in diesem 2D-Modell die Kerneozyten die Ziegelsteine darstellen und die Lipide den Mörtel, welche sich in einer speziellen geometrischen Anordnung befinden <sup>6</sup>. Neuere 3D-Modelle schreiben dem Stratum corneum eher eine kubische bzw. tetrakaidekahedrale Geometrie zu <sup>7</sup>.

Unterhalb des Stratum corneum beginnt die lebende Epidermis, die in drei Schichten unterteilt werden kann (Stratum granulosum, Stratum spinosum, Stratum basale) und ebenfalls Barriere-bildende Eigenschaften besitzt. Im Bereich des Stratum granulosum, aber auch teilweise im oberen Stratum spinosum und Stratum corneum, befindet sich die sogenannte Tight junctions-Barriere. Tight junctions sind komplexe Zell-Zell-Verbindungen durch Transmembranproteine und bieten eine bidirektionale Barriere <sup>8</sup>.

Die physikalische Barriere wird einerseits durch das Stratum corneum realisiert, andererseits aber auch durch die unterhalb der Epidermis lokalisierte Dermis mit ihren zwei Schichten. Das Stratum papillare ist mit der Epidermis eng verzahnt durch seine papilläre Struktur. Das Stratum reticulare besitzt ein dichtes Netzwerk an Kollagen und Elastin. Das Kollagenetzwerk ist effektiv bei starken Zug- und Scherkräften, das Elastin ermöglicht die Wiederherstellung nach Überdehnung <sup>2</sup>. Bei starker mechanischer Beanspruchung hat die Haut ferner die Möglichkeit der Kallusbildung wie an Hand- und Fußsohlen durch Ausbildung stark kohäsiver Desmosomen <sup>2</sup>. Auch das darunter liegende subkutane Fettgewebe ist Teil der physikalischen Barriere.

Die UV-Barriere wird neben dem Stratum corneum auch durch die in der Basalmembran vorkommenden Melanozyten erzeugt. Bei eindringender UV-Strahlung kommt es zur Melaninproduktion. Die Melanozyten bilden dendritische Ausläufer, um das Melanin in Form von Melanosomen an die umliegenden Keratinozyten zu transportieren. Das Melanin wird dann um die Zellkerne gelagert.

Ein zweiter Aspekt der UV-Barriere ist die Ausbildung einer sogenannten Lichtschwiele. Hier kommt es bei erhöhter UV-Exposition zu einer Verdickung der Epidermis und vor allem des Stratum corneum.

Auch im Rahmen des UV-Schutzes spielt die oxidative Barriere eine besondere Rolle. Die Haut besitzt ein komplexes System aus antioxidativen Substanzen und Enzymen, um die durch metabolische Prozesse oder externe Einflüsse (z.B. UV-Strahlung) auftretenden freien Radikale im Gleichgewicht zu halten. Die Antioxidantien regulieren u.a. oxidative Prozesse in Signaltransduktionskaskaden, beeinflussen die Genexpression und die Zellproliferation und Apoptose<sup>9</sup>. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Konzentrationen der Antioxidantien stets in der Epidermis höher sind als in der Dermis<sup>2</sup>. Für einige Substanzen konnte gezeigt werden, dass sie über die Sebum- bzw. Schweißsekretion an die Hautoberfläche gelangen<sup>10, 11</sup>.

Die immunologische Barriere beinhaltet Anteile des zellulären und humoralen Immunsystems, wie zum Beispiel die Langerhanszellen als antigenpräsentierende Zellen der Epidermis und verschiedene Zytokine<sup>2, 8</sup>. Auch verschiedene antimikrobielle Peptide wie die Defensine, Cathelicidine und Psoriasin werden in der Epidermis synthetisiert, um eindringende mikrobielle Spezies zu neutralisieren<sup>12-14</sup>. Zu guter Letzt stellt auch das Mikrobiom der Haut eine effektive Barriere dar. Durch die Besiedlung der Hautoberfläche mit residenten Keimen (wie z.B. Propionibakterien, Corynebakterien) wird die Kolonisierung durch potential pathogene Mikroorganismen kontrolliert<sup>8, 15</sup>.

Durch die dargestellte Komplexität der Hautbarriere wird deutlich, dass ein einfaches Überwinden der Hautbarriere durch topisch applizierte Substanzen nicht ohne Weiteres möglich ist. Dennoch handelt sich bei dem Organ Haut natürlich nicht um eine vollständig impermeable Barriere. Insgesamt wurden bislang drei potentielle Penetrationswege in die Haut beschrieben, auf die im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden soll.

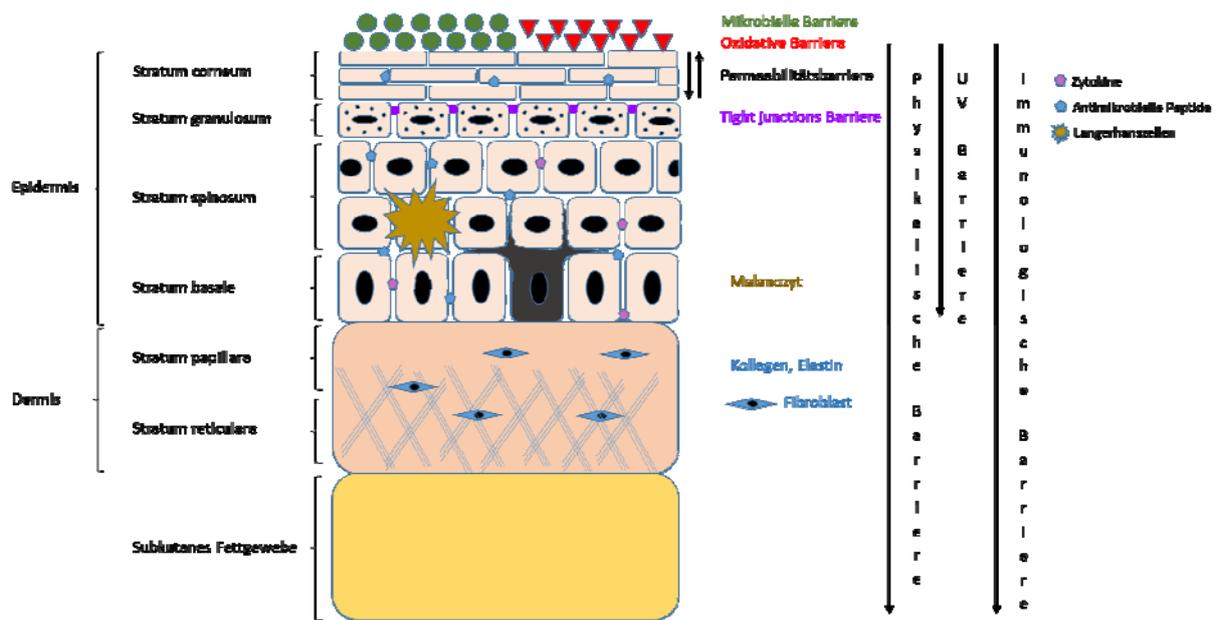


Abbildung 1: Darstellung der verschiedenen Barrierefunktionen der Haut

## 1.2 Penetrationswege in die Haut

Als potentielle Eintrittspforten zur Überwindung der Hautbarriere sind der (1) interzelluläre, der (2) follikuläre und der (3) transzelluläre Penetrationsweg beschrieben<sup>16</sup>, wie auch in Abbildung 2 dargestellt. Die entsprechende Relevanz der einzelnen Penetrationswege für die perkutane Absorption von Substanzen hängt dabei ganz entscheidend von deren physikochemischen Eigenschaften ab<sup>16</sup>. Für viele Substanzen ist dabei davon auszugehen, dass zwei oder sogar alle Penetrationswege parallel genutzt werden. Prinzipiell ist die Bioverfügbarkeit von topisch applizierten Substanzen oft sehr gering und meist nicht höher als 1-2% der applizierten Dosis<sup>17</sup>.

Untersuchungen von Albery und Hadgraft<sup>18</sup> haben Ende der 70er Jahre gezeigt, dass die interzelluläre Penetration eine besonders große Rolle spielt, aber dennoch sehr komplex ist. Die Substanzen müssen dabei entlang komplex angeordneter Lipidschichten diffundieren und dabei abwechselnd hydrophile und hydrophobe Regionen überwinden. Die Länge dieses gewundenen Penetrationsweges hängt dabei hauptsächlich von der Anzahl der Zellschichten und der Größe der applizierten Substanz ab. Neben der Kompliziertheit dieses Penetrationsweges spielt vermutlich auch die geringe aktive Diffusionsfläche eine Rolle bei der geringen Bioverfügbarkeit

von topisch applizierten Substanzen. Auch wenn eine größere Menge einer Formulierung auf die Hautoberfläche gegeben wird, bleibt die große Fläche des Korneozyts nicht zugänglich für die Substanz <sup>17</sup>, sondern nur der in Relation gesehen sehr kleine interzelluläre Spalt.

Auch die physikochemischen Eigenschaften der topisch applizierten Substanz spielen eine große Rolle bei der interzellulären Penetration. Vor einigen Jahren ist man noch davon ausgegangen ist, dass Substanzen mit einem Molekulargewicht von über 500 Dalton nicht in der Lage sind, in die Haut zu penetrieren <sup>19</sup>. Neuere Untersuchungen jedoch zeigen, dass diese lange Zeit akzeptierte 500 Dalton-Regel zumindest für eine Reihe von Hautsensibilisatoren nicht mehr gültig ist <sup>20</sup>. Ebenso konnte die Regel, dass sehr hydrophile Substanzen mit einem  $\text{LogKow} \leq 1$  keine Sensibilisierung aufgrund von mangelnder Penetration hervorrufen können, widerlegt werden. Eine systematische Untersuchung hat ergeben, dass es keinen signifikanten Unterschied gibt bezüglich der Inzidenz von Sensibilisatoren unterhalb und oberhalb eines  $\text{LogKow}$ -Werts von 1 <sup>21</sup>.

Während der interzelluläre Penetrationsweg für lipophile Substanzen relativ einheitlich erklärt wird, ist der genaue Penetrationsweg von hydrophilen Substanzen noch immer Gegenstand von Untersuchungen und Diskussionen.

Einige Autoren nehmen an, dass es poröse polare Penetrationswege für hydrophile Substanzen gibt. Diese könnten strukturelle Unregelmäßigkeiten in den Lipidlamellen sein und damit interzellulär lokalisiert sein, also innerhalb der wässrigen Regionen, die von polaren Lipiden umgeben sind <sup>22</sup>. Andere Autoren wiederum gehen von einem transzellulären Transport für hydrophile Substanzen aus <sup>23, 24</sup>.

Während dagegen vor einigen Jahren der follikuläre Penetrationsweg noch als relativ unbedeutend eingestuft wurde, gewinnt dieser nun zunehmend an Bedeutung als spezifisches Ziel für die topische Wirkstoffapplikation, da der Follikel selbst eine komplexe, dynamische, dreidimensionale Struktur darstellt mit unterschiedlichen Zielzellen. In Abhängigkeit von der applizierten Substanz kann über den follikulären Penetrationsweg ein schneller Wirkstofftransport in das Blutsystem bzw. eine Langzeitspeicherung ermöglicht werden <sup>16</sup>. Im folgenden Abschnitt werden die Struktur und die Funktion der Haarfollikel und ihre Kompetenz als Penetrationsweg für topisch applizierte Substanzen weiterführend erläutert.

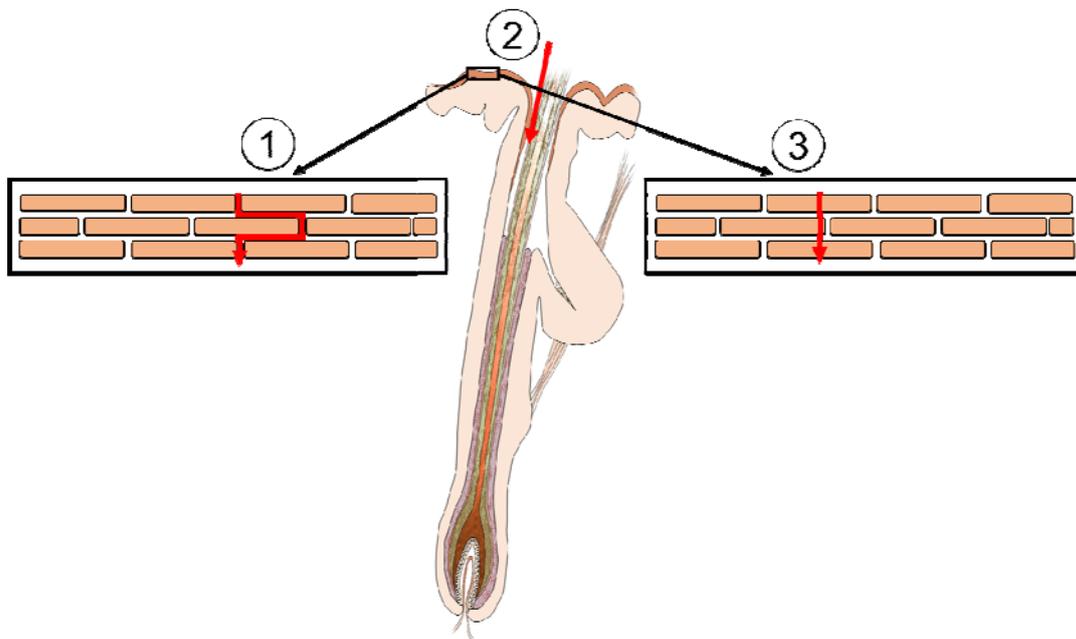


Abbildung 2: Darstellung der drei möglichen Penetrationswege in die Haut: 1. der interzelluläre Penetrationsweg, 2. der follikuläre Penetrationsweg, 3. der transzelluläre Penetrationsweg

### 1.3 Die Struktur und Funktion des Haarfollikels

Jeder Mensch besitzt ungefähr 5 Millionen Haarfollikel<sup>25</sup>. Histologisch können diese Haarfollikel in die größeren Terminalhaarfollikel und die kleineren Vellushaarfollikel unterteilt werden. Die Haardichte ist in den verschiedenen Körperregionen stark unterschiedlich. Während in einigen Körperregionen wie z.B. dem Unterarm die Haarfollikelöffnungen nur etwa 0,1% der Hautoberfläche ausmachen, hier also wahrscheinlich eher eine untergeordnete Rolle bei der Gesamtpenetration spielen, sind es im Bereich der Stirn, wo die Haarfollikel eine besonders hohe Dichte aufweisen, etwa 13,7%<sup>26</sup>. Otberg et al.<sup>26</sup> haben das follikuläre Reservoir mit dem des Stratum corneum verglichen und haben berechnet, dass beide Reservoirvolumina im Bereich der Stirn und der Wade vergleichbar sind.

Der Haarfollikel ist eine komplexe dreidimensionale Struktur, die einer zyklischen Aktivität unterliegt<sup>27, 28</sup>. Neben Phasen von starkem Wachstum (Anagenphase) und Apoptose-gesteuerter Regression (Katagenphase) gibt es absolute Ruhephasen (Telogenphase)<sup>25</sup>. Damit kann sich der Haarfollikel immer wieder neu regenerieren.

### *1.3.1 Anatomie des Haarfollikels*

Der anatomische Aufbau des Haares ist relativ komplex. Eine schematische Darstellung des Haarfollikels findet sich in Abbildung 3. Prinzipiell können mehrere Anteile unterschieden werden. Der obere Anteil des Haarfollikels ist das Infundibulum, welches sich wiederum in ein oberes und ein unteres Infundibulum aufgliedert. Im oberen Anteil besteht das Epithel aus einer keratinisierten Epidermis und ist mit einem intakten Stratum corneum ausgekleidet. Im unteren Infundibulum ändert sich das Differenzierungsmuster langsam von epidermal zu trichilemmal. Das Infundibulum reicht bis zum Abgang der Talgdrüse. Der Teil zwischen Talgdrüsenausführungsgang und Wulstregion wird Isthmus genannt. Im Bereich der Wulstregion sind die epithelialen Stammzellen lokalisiert. Hier inseriert auch der Musculus arrector pili. Im unteren Teil befindet sich der Haarbulbus, der die Haarpapille, auch Haarzwiebel genannt, umfasst. Die Haarpapille wirkt als Kommandozentrale und bestimmt Dicke, Länge und wahrscheinlich auch den gesamten Haarzyklus<sup>25, 29</sup>. Im Zentrum des Haarfollikels ist der Haarschaft lokalisiert, dieser besteht aus Medulla, Kortex und Kutikula. Der Haarschaft ist von innen nach außen zunächst von einer inneren Wurzelscheide bestehend aus der Huxley-Schicht und der Henle-Schicht und einer äußeren Wurzelscheide umgeben. Die äußere Wurzelscheide wird von einer hyalinen Membran eingefasst, die wiederum in eine bindegewebige Hülle eingebettet ist. Jeder Haarfollikel besteht aus epithelialen und mesenchymalen Anteilen<sup>25</sup>.

### *1.3.2 Die Barriere innerhalb des Haarfollikels*

Bei der interzellulären Penetration stellt das Stratum corneum die wichtigste Barriere dar. Diese kontinuierliche Barriere ist durch die Haarfollikelöffnungen unterbrochen, die im Prinzip Invaginationen der Epidermis darstellen<sup>16</sup>. Das heißt, dass im oberen Teil des Infundibulums des Haarfollikels eine ebenso effektive Barriere besteht wie auf der Hautoberfläche. Erst im unteren Abschnitt des Infundibulums wird die Barriere schwächer, da sich das Differenzierungsmuster hier langsam von epidermal zu trichilemmal ändert<sup>30</sup>. Neueste Untersuchungen zeigen darüber hinaus, dass auch der Haarfollikel Barriere-bildende Tight junctions besitzt, die in der äußersten Schicht der äußeren Wurzelscheide lokalisiert sind und vom unteren Infundibulum bis zur suprabulbären Region reichen. Darüber hinaus befinden sie sich in der Huxley-

Schicht der inneren Wurzelscheide in der Suprabulbärregion. Im Bereich des Bulbus ist keine Barriere erkennbar <sup>31</sup>.

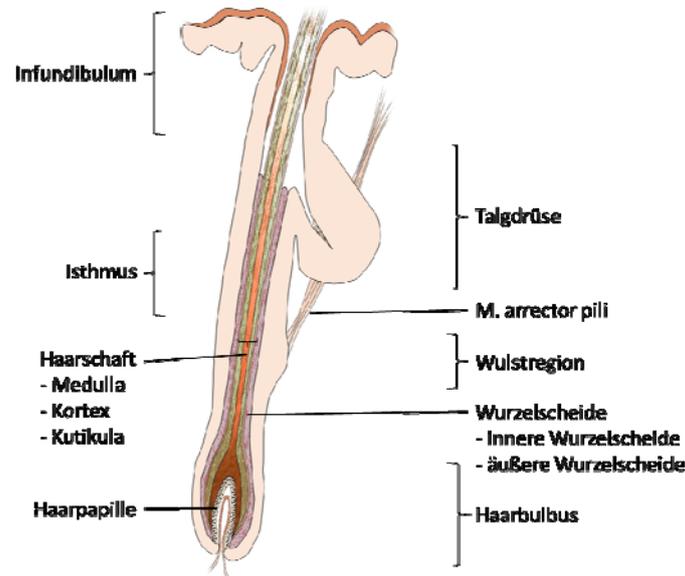


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Anatomie des Haarfollikels

### 1.3.3 Funktion des Haarfollikels

Auch wenn auf den ersten Blick nicht unbedingt erkenntlich, besitzt der Haarfollikel tatsächlich multiple Funktionen. Zum einen dient der Haarfollikel als sensorisches Organ. Durch eine durch das vegetative Nervensystem gesteuerte Kontraktion des Musculus arrector pili kommt es zu einer Aufrichtung des Haares (sog. Gänsehaut). Auslöser können Angst, Kälte oder emotionale Erregung sein <sup>32</sup>. Auch in der Tierwelt lässt sich dieser Effekt noch beobachten, durch Aufstellen des Fells wirken die jeweiligen Tiere größer und bedrohlicher. Beim Mensch hat sich die Körperbehaarung im Laufe der Evolution deutlich reduziert, der Reflex ist jedoch geblieben, hat allerdings keine wirkliche Funktion mehr <sup>32</sup>. Auch die Schutzfunktion des Haares ist nur noch an einigen Körperregionen von Relevanz, z.B. im Bereich der Augenbrauen und Wimpern, damit beispielsweise der Schweiß von der Stirn nicht in die Augen tropft oder Fremdkörper nicht so leicht in das Auge gelangen können oder im Bereich der Kopfbehaarung. Diese dient als guter Sonnenschutz <sup>33</sup>.

Vielmehr ist die Kopfbehaarung jedoch ein wichtiges Instrument für die psychosoziale Kommunikation. Personen mit reduzierter Kopfbehaarung (Alopezie) oder vermehrter Körperbehaarung (Hirsutismus) haben häufig einen sehr starken Leidensdruck, da sie scheinbar allgemein anerkannten Schönheitsnormen nicht entsprechen <sup>34</sup>. Eine weitere wichtige Funktion des Haarfollikels ist die Sebumsekretion <sup>35</sup>. Das Sebum wird in der Talgdrüse produziert und gelangt dann über den Ausführungsgang in den Haarfollikel und wird dann an die Hautoberfläche transportiert, wo sich das Sebum verteilt und einen weiteren wichtigen Aspekt der Hautbarriere darstellt. Abweichungen in der Sebumsekretion gehen häufig mit verschiedenen Krankheiten einher (z.B. Seborrhö bei Akne).

Eine nicht zu vernachlässigende Funktion des Haarfollikels ist aber auch seine Berechtigung als Penetrationsweg für topisch applizierte Substanzen und seine Möglichkeit, diese über einen längeren Zeitraum zu speichern <sup>36</sup>. Dies gilt natürlich nicht nur für Substanzen, die absichtlich auf oder in die Haut gebracht werden sollen (wie z.B. Kosmetika oder Wirkstoffe), sondern auch für Substanzen, die zufällig in die Haarfollikel gelangen wie z.B. Allergene <sup>37</sup> oder auch Kohlenstoffpartikel aus Abgasen.

#### ***1.4 Besonderheiten des Haarfollikels – warum ist der Haarfollikel ein besonders interessanter Penetrationsweg?***

Die follikuläre Penetration wird in vielen Studien als Zufallsbefund bewertet. Die Tatsache, dass ein Teil der topisch applizierten Substanz auch in den Haarfollikel eindringt, wird inzwischen seltener negiert, meist akzeptiert, aber sehr selten quantifiziert. Es gibt inzwischen jedoch auch immer mehr Ansätze, die bewusst durch den Einsatz von bestimmten Drug Delivery Systemen wie z.B. Nanopartikeln eine gezielte und selektive follikuläre Penetration forcieren <sup>38-40</sup>. Dies hat mehrere Gründe, die sich auch teilweise aus den anatomischen und funktionellen Besonderheiten des Haarfollikels ergeben.

##### ***1.4.1 Follikuläre und perifollikuläre Zielstrukturen***

Einerseits ist der Haarfollikel im oberen Anteil von einem dichten Netz an Kapillaren umgeben. Das bedeutet, wenn die topisch applizierte Substanzen in der Lage sind, die follikuläre Barriere zu überwinden, also transfollikulär zu penetrieren, werden sie relativ zügig, d.h. innerhalb von 5 Minuten auch in den Blutkreislauf aufgenommen <sup>41</sup>.

Neben dem dichten Kapillarnetz ist der obere Teil des Haarfollikels auch von einer großen Anzahl dendritischer Zellen umgeben. Dies spielt besonders dann eine Rolle, wenn Impfstoffe über die Haut bzw. transfollikulär in die Haut eingebracht werden sollen<sup>42-44</sup>. Darüber hinaus kann dies auch von pathophysiologischer Bedeutung sein bei der Entwicklung oder Verschlimmerung einer atopischen Dermatitis durch Typ 1 Allergene<sup>37</sup>. Auch die enge anatomische Verbindung zur Talgdrüse stellt eine therapeutische Option dar, die teilweise bereits in der Behandlung von Akne vulgaris und anderen Talgdrüsen-assoziierten Erkrankungen genutzt werden. Durch die Applikation der Wirkstoffe in partikulärer Form wird versucht, den Haarfollikel und damit die Talgdrüse gezielt anzusteuern<sup>45-47</sup>. Auch die epithelialen multipotenten Stammzellen, die sich in der Wulstregion des Haarfollikels befinden, sind von hohem therapeutischen Interesse<sup>48</sup>. Durch ihre hohe Proliferität bieten sie sich als Stammzellquelle für die regenerative Medizin an. Auch ein Transport von spezifischen Genen zu speziellen Zellen der Wulstregion ist ein vielversprechender Ansatz, um beispielsweise genetische Korrekturen bei angeborenen Haarerkrankungen oder genetischen Hauterkrankungen wie z.B. der Epidermolysis bullosa zu realisieren<sup>49</sup>. Auch der Transport von Haarwachstums-fördernden Substanzen wie Diphencypron und Minoxidil bis zur dermalen Papille wurde beschrieben<sup>50</sup>.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Haarfollikel einige interessante und auch individuelle Zielstrukturen aufweist, diese sind in Abbildung 4 noch einmal schematisch dargestellt. Wenn ein gezielter Transport von entsprechenden Wirkstoffen zu diesen Zielstrukturen realisiert werden könnte, würden sich die Behandlungsoptionen von einigen, teilweise auch schweren Haut- und Haarerkrankungen deutlich verbessern lassen. Zusätzlich würde sich die systemische Aufnahme der Wirkstoffe deutlich reduzieren lassen, was ebenfalls zu einer Minimierung von potentiellen Nebenwirkungen führen würde<sup>16</sup>.

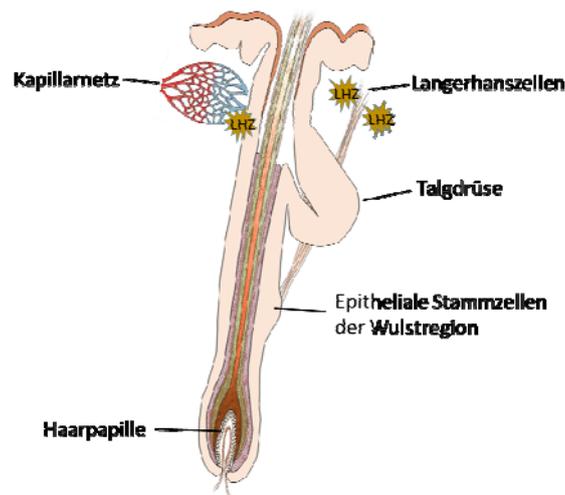


Abbildung 4: Schematische Darstellung der follikulären und perifollikulären Zielstrukturen

#### 1.4.2 Selektive follikuläre Penetration von partikulären Substanzen

Neben seinen speziellen Zielstrukturen weist der Haarfollikel jedoch noch eine weitere Besonderheit auf. In zahlreichen Studien konnte bereits belegt werden, dass partikuläre Substanzen besonders tief und effektiv in die Haarfollikel hinein penetrieren<sup>39, 51, 52</sup>, während eine interzelluläre Penetration von partikulären Substanzen in vivo und bei intakter Haut eher auszuschließen ist. Auf die Besonderheiten der follikulären Penetration von Nanopartikeln wird weiter unten bzw. im Kapitel 2 Eigene Arbeiten noch weiter eingegangen.

#### 1.4.3 Follikuläre versus transfollikuläre Penetration

Die Penetration von topisch applizierten Substanzen ist ein sehr komplexer Prozess, der bislang nur sehr lückenhaft aufgeklärt ist. Prinzipiell muss man die follikuläre Penetration jedoch in zwei Schritte unterteilen (Abbildung 5). In einem ersten Schritt penetrieren die Substanzen in den Haarfollikel und erst in einem zweiten Schritt kommt es zu einer transfollikulären Penetration in das den Haarfollikel umgebende Gewebe<sup>16</sup>. Ob dieser zweite Schritt überhaupt stattfinden kann, hängt von den physikochemischen Eigenschaften der topisch applizierten Substanz, aber auch von den Barriereigenschaften des Haarfollikels ab. Prinzipiell lässt sich feststellen, dass

die Größe der topisch applizierten Substanz ähnlich wie bei der interzellulären Penetration eine entscheidende Rolle zu spielen scheint.

Erfolgt nur eine folliculäre, jedoch keine transfollikuläre Penetration einer Substanz, wird diese im Haarfollikel gespeichert. Das Reservoir des Stratum corneum für topisch applizierte Substanzen ist im Vergleich zu dem des Haarfollikels nicht sehr stabil. Da die größte Menge einer Substanz meist in den ersten Schichten des Stratum corneum liegt, kommt es durch Textilkontakt, Waschen oder einfach durch den täglichen Desquamationsprozess (Abschilferung einer Lage Korneozyten pro Tag) relativ schnell zu einer Entleerung des Reservoirs. Der Haarfollikel ist dagegen ein eher geschützter Bereich, wenn eine transfollikuläre Penetration ausgeschlossen ist. Nur langsamere Prozesse wie Sebumsekretion und Haarwachstum, also auswärtsgerichtete Aktionen können zu einer Entleerung des folliculären Reservoirs führen. Untersuchungen haben gezeigt, dass eine topisch aufgetragene Partikelformulierung auch noch 10 Tage nach der Applikation in den Haarfollikeln nachweisbar war <sup>36</sup>. Dies bietet in therapeutischer Hinsicht natürlich viele Optionen. So könnte man sich vorstellen, mit Wirkstoffen beladene Partikel zu applizieren, die dann im Haarfollikel gespeichert werden und ihren Wirkstoff nach und nach abgeben. Auf diese Weise wären unter Umständen bei einigen Fragestellungen ggf. nur einmalige Applikationen notwendig, was natürlich die Compliance von Patienten erhöhen würde.

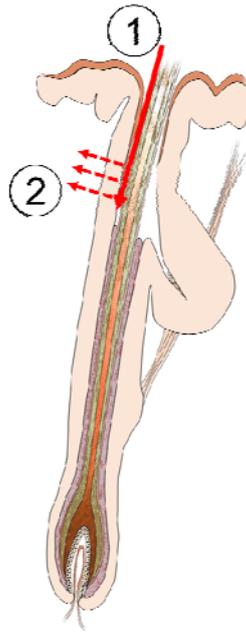


Abbildung 5: Die folliculäre Penetration muss in zwei Schritte unterteilt werden: 1. die folliculäre Penetration in den Haarfollikel und 2. die transfolliculäre Penetration in das perifolliculäre Gewebe. Ob eine transfolliculäre Penetration überhaupt stattfindet, ist stark von den physikochemischen Eigenschaften der topisch applizierten Substanz abhängig. Findet sie nicht statt, werden die Substanzen über einen längeren Zeitraum im Haarfollikel gespeichert.

### **1.5 Methoden zur Untersuchung der folliculären Penetration**

Während es für die Untersuchung der perkutanen Penetration weltweit anerkannte Standardmethoden gibt, welche auch in einer Übersichtsarbeit von Holmgaard et al. in 2014 <sup>53</sup> übersichtlich zusammengefasst worden sind, ist man davon, was die Untersuchung der folliculären Penetration angeht, noch sehr weit entfernt. Die selektive Untersuchung der folliculären Penetration stellt weiterhin eine große Herausforderung dar, da sie eine räumliche Auflösung benötigt. Prinzipiell bietet es sich an, die folliculäre Penetration indirekt zu bestimmen, indem man folliculfreie Haut mit normaler Haut vergleicht. Das größte Problem ist jedoch, ein quantitatives Modellsystem zu finden, das wirklich folliculfrei ist, sonst aber die gleichen strukturellen, biochemischen und Barriereigenschaften aufweist, wie normale Haut <sup>54</sup>. Ein relativ naheliegender Ansatz ist der Vergleich der Penetration durch Haut mit unterschiedlicher Follikeldichte oder der Vergleich von haarigen und haarlosen

Nagern<sup>55, 56</sup>. Das Problem hier ist jedoch, dass Haut mit unterschiedlicher Follikeldichte auch andere strukturelle Eigenschaften aufweisen kann (z.B. ist die Fußsohle follikelfrei, hat aber ein etwa 10fach dickeres Stratum corneum und damit auch andere Penetrationseigenschaften) bzw. haarlose Nagetiere nicht wirklich follikelfrei sind, sondern eher rudimentäre Haarfollikel besitzen<sup>57</sup>. Auch weitere Ansätze, wie der Vergleich von vernarbter<sup>58</sup> oder unreifer Haut mit noch nicht entwickelten Haarfollikeln<sup>59</sup> und normaler Haut ist eher kritisch zu bewerten, da die Barriereigenschaften der Haut sicherlich nicht vergleichbar sind. Des Weiteren wurde das Haut-Sandwichmodell von Barry et al.<sup>60</sup> vorgestellt. Durch das Übereinanderlegen einer zusätzlichen Stratum corneum-Membran auf die epidermale Membran werden die Follikelöffnungen blockiert. Aufgrund ihrer anteilig sehr kleinen Oberfläche im Vergleich zur Hautoberfläche ist es daher sehr unwahrscheinlich, dass sich zwei Öffnungen überlappen, so dass es zu einer effektiven Blockade der Follikelöffnungen kommt. Ein offensichtliches Problem dieser Methode ist, dass sich durch die Verdopplung des Stratum corneum auch die Barriereigenschaften verändern. In den letzten Jahren wurden auch verschiedene optische Methoden entwickelt, um die follikuläre Penetration von topisch applizierten Substanzen zu visualisieren und teilweise sogar zu quantifizieren<sup>57</sup>, wie z.B. die quantitative Autoradiographie<sup>61</sup>. Auch die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie hat einen hohen Stellenwert bei der Analyse der follikulären Penetration. Nach kryohistologischer Aufarbeitung von Follikelschnitten lässt sich beispielsweise exakt die follikuläre Penetrationstiefe von fluoreszenzmarkierten topisch applizierten Substanzen bestimmen<sup>62</sup>. Andere Systeme ermöglichen die online-Visualisierung und Quantifizierung von Farbstoffen während der Penetration in Kopfhaut<sup>63</sup>. Auch die konfokale Raman-Mikroskopie bietet die Möglichkeit, die follikuläre Penetration zu analysieren<sup>64</sup>.

### **1.6 Zielstellung der Arbeit**

Das komplexe Organ des Haarfollikels an sich, aber besonders auch der follikuläre Penetrationsprozess ist ein sehr spannendes Arbeitsgebiet. Bisher sind die Mechanismen der follikulären Penetration nur in Ansätzen geklärt. Dies liegt vor allem daran, dass die Untersuchung der follikulären Penetration eine besondere Herausforderung darstellt und es im Gegensatz zur Untersuchung der perkutanen Penetration kaum standardisierten Methoden gibt, um die follikuläre Penetration vollständig und ohne Einschränkung zu erfassen.

Als physiologische Unterbrechung der sehr potenten Hautbarriere besitzt der Haarfollikel jedoch einen besonderen Status, der nicht weiter vernachlässigt werden darf.

Konkrete Zielstellungen der vorliegenden Arbeit sind in den folgenden Punkten zusammengefasst:

1. Die Entwicklung von neuen Methoden ist notwendig, um die follikuläre Penetration spezifisch untersuchen zu können. Es wurde daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit angestrebt, Methoden zu entwickeln, die einerseits die transfollikuläre Penetration erfassen und andererseits aber auch die follikuläre Penetration und Speicherung berücksichtigen, falls eine transfollikuläre Penetration für einige Substanzen nicht realisierbar ist. Eine Anwendbarkeit der Methoden in vivo und in ex vivo Hautmodellen war dabei erstrebenswert, da nur ein direkter Vergleich von in vivo und ex vivo Daten die Prädiktivität von ex vivo Daten für weitere Experimente darstellen kann.
2. Da in vivo Untersuchungen aus ethischen Gründen oft nicht vertretbar sind, ist es unabdingbar, vernünftige ex vivo Hautmodelle zu identifizieren und zu implementieren, um die follikuläre Penetration vollständig zu erfassen. Dies sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit realisiert werden.
3. Der Mechanismus der follikulären Penetration ist kaum aufgeklärt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern follikel- oder Haarschaft-assoziierte Strukturen und physikochemische Eigenschaften der topisch applizierten Substanzen den follikulären Penetrationsprozess beeinflussen können.
4. In weiteren Arbeiten sollte der Effekt ausgenutzt werden, dass partikuläre Substanzen besonders gut und effektiv in den Haarfollikel hinein penetrieren können, eine transfollikuläre Penetration aber aufgrund ihrer Größe nicht

realisierbar ist. Es sollte der Ansatz verfolgt werden, partikuläre Substanzen mit Wirkstoffen zu beladen, die durch den folliculären Penetrationsprozess damit tief in den Haarfollikel eingebracht werden. Ziel war es verschiedene Triggermechanismen zu untersuchen, die dann eine Freisetzung des Wirkstoffes vom Transportpartikel bewirken können, so dass dieser dann unabhängig transfollikulär diffundieren kann. Dieser Ansatz eines intelligenten getriggerten Drug Release Systems sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersucht werden.

## 2. Eigene Arbeiten

Im folgenden Kapitel wurden 8 Arbeiten aus einer Anzahl von über 120 eigenen Publikationen ausgewählt. Die ausgewählten Veröffentlichungen haben den Forschungsschwerpunkt der follikulären Penetration. Jeweils zwei der Arbeiten befassen sich mit einer konkreten Zielstellung der Arbeit und sind in eigenen Unterkapiteln zusammengefasst. Zu den jeweiligen Unterkapiteln ist ein kurzer Abschnitt dargestellt, der den Inhalt der Arbeiten in einen wissenschaftlichen Gesamtkontext bringt und die aufeinander aufbauenden Arbeiten verbindet. Ferner findet sich jeweils eine kurze Zusammenfassung der jeweiligen Arbeiten.

### ***2.1 Entwicklungen von Methoden zur Bestimmung der follikulären und transfollikulären Penetration***

Die Untersuchung der follikulären und transfollikulären Penetration stellt eine große Herausforderung dar, da sie eine räumliche selektive Auflösung benötigt<sup>16</sup>. Anders als bei der Untersuchung der interzellulären Penetration, wo die Absorption über eine bestimmte Fläche gemessen werden kann, ist dies bei der Bestimmung der follikulären Penetration nicht möglich, da die Substanzen nicht gezielt in die Haarfollikel eingebracht werden können und dort quantifiziert werden können.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, gibt es verschiedene Ansätze, um die follikuläre Penetration zu untersuchen. Oft wird die follikuläre Penetration indirekt nachgewiesen, d.h. die Penetration von Substanzen durch follikelfreie Haut wird mit der Penetration von Substanzen durch Haut verglichen, die Follikel aufweist. Problematisch an dieser Stelle ist jedoch, dass follikelfreie Haut meist nicht die strukturellen, biochemischen und Barriereigenschaften hat wie normale Haut<sup>54</sup>. Beim Einsatz von unreifer oder vernarbter Haut<sup>65, 66</sup> kann nicht von vergleichbaren Penetrationseigenschaften wie bei reifer gesunder intakter Haut ausgegangen werden, was unbedingt bei der Interpretation der Ergebnisse mit einbezogen werden muss. Prinzipiell muss man bei der Untersuchung der follikulären Penetration zwischen der tatsächlichen Penetration, also der Aufnahme einer Substanz in den Haarfollikel und zwischen der transfollikulären Penetration unterscheiden. Bei der transfollikulären Penetration werden die topisch applizierten Substanzen über die Follikelwand in die lebende Epidermis oder Dermis aufgenommen. Da der Haarfollikel ebenfalls eine Barrierefunktion besitzt, hängt es stark von der Größe und

weiteren physikochemischen Eigenschaften der topisch applizierten Substanzen ab, ob überhaupt eine transfollikuläre Penetration stattfinden kann. Da die Barrierefunktion innerhalb des Haarfollikels in Abhängigkeit von der Tiefe unterschiedlich stark ausgeprägt ist, hängt es zusätzlich auch von der Penetrationstiefe der topisch applizierten Substanz ab, ob eine transfollikuläre Penetration erfolgen kann. Nachfolgend werden zwei Arbeiten vorgestellt, die die Untersuchung der transfollikulären und der follikulären Penetration in vivo am Menschen erlauben. In der ersten Arbeit wird die in einer früheren eigenen Arbeit<sup>67</sup> entwickelte Methode des selektiven Follikelverschlusses genutzt, um die Aufnahmekinetik von Koffein über den Haarfollikel zu untersuchen. In der zweiten Arbeit wurde die Methode des differentiellen Strippings entwickelt, die es erlaubt, die Menge an topisch applizierter Substanz zu quantifizieren, die selektiv in den menschlichen Haarfollikel hineinpenetriert ist.

### *2.1.1 Die Rolle des Haarfollikel bei der perkutanen Absorption von Koffein*

*Nina Otberg, Alexa Patzelt, Utkur Rasulev, Timo Hagemeister, Michael Linscheid, Ronald Sinkgraven, Wolfram Sterry, Jürgen Lademann. The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine. British Journal of Clinical Pharmacology 2008; 65(4): 488-492*

Zusammenfassung: Im Rahmen der Arbeit wurde die selektive Follikelverschlussmethode eingesetzt, um die transfollikuläre und interfollikuläre Aufnahme von topisch appliziertem Koffein zu untersuchen. Die Studie wurde an sechs männlichen Probanden durchgeführt, die zuvor eine strikte koffeinfreie Diät durchgeführt hatten. Im ersten Teil der Studie wurde vor der Applikation der Koffeidlösung im Bereich des Applikationsareals jede Haarfollikelöffnung mit einer speziellen Lack-Wachs-Mischung verschlossen. Im Anschluss wurde die Konzentration von Koffein im Blut zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Nach weiteren drei Tagen unter strikter koffeinfreier Diät erfolgte der zweite Teil der Studie. Diesmal blieben die Follikelöffnungen offen, es wurde lediglich ein kleiner Tropfen der Lack-Wachs-Mischung neben jede Follikelöffnung gesetzt, um vergleichbar große Absorptionsflächen in beiden Teilen der Studie zu haben. Die Bestimmung der Koffeinkonzentration im Blut erfolgte analog zu Studienteil 1. Waren die Haarfollikelöffnungen nicht verschlossen, konnten bereits nach 5 min 3,75 ng/ml Koffein im Blut nachgewiesen werden. Bei verschlossenen Haarfollikelöffnungen war

der Nachweis erst nach 20 min möglich (2,45 ng/ml). Die höchste Koffeinkonzentration mit 11,75 ng/ml wurde nach einer Stunde im Falle der offenen Haarfollikelöffnungen nachgewiesen. In der Arbeit wurde damit einerseits eine gute Methode gezeigt, um die transfollikuläre Penetration von kleineren Molekülen in vivo nachzuweisen. Darüber hinaus konnte die Arbeit eindrücklich die Relevanz des follikulären Penetrationsweges demonstrieren.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2125.2007.03065.x>









### 2.1.2 *Differentielles Stripping: Bestimmung der Menge an topisch applizierter Substanz, die in den Haarfollikel penetriert ist*

Alexa Teichmann, Ute Jacobi, Michael Ossadnik, Heike Richter, Stefan Koch, Wolfram Sterry, Jürgen Lademann. *Differential Stripping: Determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles. Journal of Investigative Dermatology* 2005; 125:264-269

Zusammenfassung: Die Methode des differentiellen Strippings kombiniert zwei bekannte Abrissmethoden, das Tape Stripping und die Cyanacrylat-Hautoberflächenbiopsie. Im Rahmen der Studie wurde das differentielle Stripping zunächst histologisch am Schweinehautmodell evaluiert. In der histologischen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass nach 100 Abrissen das Stratum corneum komplett entfernt werden konnte, während die anschließende Entnahme der Cyanacrylat-Hautoberflächenbiopsie zur Entfernung des Inhalts des Haarfollikelinfundibulums geführt hat. Erfolgte die Cyanacrylat-Hautoberflächenbiopsie nach der kompletten Entfernung des Stratum corneum, kam es jedoch zusätzlich zu Strukturveränderungen in der lebenden Epidermis. Um dies in den in vivo Untersuchungen zu verhindern, erfolgte in diesen Versuchsreihen nur die Entnahme der notwendigen Abrisse, d.h. der Abrisse auf denen noch Substanz nachweisbar war. Bei den in vivo Untersuchungen am Probanden wurden 2 verschiedenen Formulierungen (1. Versuchsreihe: o/w Emulsion mit 0,1% Patentblau für die visuelle Kontrolle des differentiellen Stripping; 2. Versuchsreihe: w/o Formulierung Eucerin cum Aqua mit 2% Natriumfluoreszein für die Quantifizierung der follikulären Penetration) topisch appliziert. Das differentielle Stripping erfolgte in der 1. Versuchsreihe nach 30 min und in der 2. Versuchsreihe nach 30 min, 24 h und 48 h. Mittels Tape stripping wurde zunächst der notwendige Anteil des Stratum corneum entfernt. Anschließend erfolgte die Entnahme einer Cyanacrylat-Hautoberflächenbiopsie vom gleichen Hautareal. Für die quantitative Analyse in Versuchsreihe 2 wurden sowohl die Abrisse als auch der Cyanacrylatabriss gelöst und mittels Fluoreszenzspektrometrie die Konzentration von Natriumfluoreszein bestimmt. Nach einer Penetrationszeit von 30 min konnten etwa 5% der wiedergefundenen Menge an Natriumfluoreszein im Haarfollikelinhalt nachgewiesen werden. Bei einer etwa 55%igen Wiederfindungsrate in Bezug auf die applizierte Menge wurde für die restliche Menge eine Absorption angenommen. Nach 24 und 48 Stunden war die gemessene Konzentration im Haarfollikel deutlich geringer.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23779.x>











## ***2.2 Bewertung von ex vivo Hautmodellen für die Untersuchung der folliculären Penetration***

In den letzten beiden Arbeiten wurden Methoden vorgestellt, die die Untersuchung der transfolliculären und folliculären Penetration in vivo am menschlichen Probanden erlauben. Dies war nur möglich, da nur gut bekannte Modellwirkstoffe wie Koffein oder Natriumfluoreszein eingesetzt wurden, die ohne zu erwartende Nebenwirkungen am Menschen genutzt werden können. Auch die Formulierungen, in denen die Modellwirkstoffe appliziert wurden, waren unbedenklich. Für die Methodenentwicklung waren dies geeignete Substanzen, wenn es sich jedoch um weiterführende Fragestellungen handelt, oder die Penetration von neuen Wirkstoffen oder Vehikeln untersucht werden soll, sind Untersuchungen in vivo an Probanden oder Tieren aus ethischen Gründen nicht ohne Weiteres vertretbar. Daher ist es dringend notwendig, geeignete ex vivo Hautmodelle zu identifizieren, die sowohl für die Methoden als auch die entsprechenden Fragestellungen geeignet sind.

In diesem Abschnitt werden zwei Arbeiten vorgestellt, die sich mit der Identifizierung von geeigneten ex vivo Hautmodellen beschäftigen. In der ersten Arbeit wird die Methode des differentiellen Strippings eingesetzt, um das folliculäre Reservoir in vivo und ex vivo am selben Probanden zu vergleichen. Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob exzidierte Haut prinzipiell genutzt werden kann, um die folliculäre Penetration zu bestimmen und ob die Resultate mit den in vivo Ergebnissen vergleichbar sind. Daher war es notwendig, dass die Untersuchungen am selben Probanden durchgeführt wurden. Dies war in diesem Fall ethisch vertretbar, da die Haut von Patienten stammte, die im Rahmen einer Fettreduktionsplastik entfernt werden sollte (in vivo) bzw. wurde (ex vivo).

Da die Verfügbarkeit von exzidierter Humanhaut aus verständlichen Gründen sehr limitiert ist, wird häufig die Haut von verschiedenen Tierarten für die Untersuchung der Penetration von topisch applizierten Substanzen eingesetzt. Über die Eignung und Vergleichbarkeit von verschiedenen Tierhäuten in Bezug auf die folliculäre Penetration ist bislang relativ wenig bekannt. Prinzipiell lässt sich jedoch vermuten, dass die folliculäre Penetration bei Tieren mit dichtem Fell, d.h. einer hohen Follikeldichte eher größer sein wird, als bei der menschlichen Haut oder bei Tieren mit geringerer Felldichte. Im Rahmen einer weiteren Arbeit wurde daher die Haarfollikelmorphologie von acht verschiedenen Säugetierarten untersucht und mit bereits vorhandenen Daten zur menschlichen Haarfollikelmorphologie verglichen.

*2.2.1 Die Methode des differentiellen Strippings zeigt eine signifikante Reduktion des folliculären Reservoirs in vitro im Vergleich zu in vivo*

*Alexa Patzelt, Heike Richter, Rolf Buettemeyer, Hans-Joachim Roewert Huber, Ulrike Blume-Peytavi, Wolfram Sterry, Jürgen Lademann. Differential stripping demonstrates a significant reduction of the hair follicle reservoir in vitro compared to in vivo. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2008; 70: 234-238*

Zusammenfassung: Im Rahmen der Studie wurde das folliculäre Reservoir in vivo und ex vivo untersucht, ebenso wie die Verteilung der elastischen Fasern in histologischen Schnitten. Die Studie wurde an sechs Probandinnen durchgeführt. Bei allen Probandinnen war die Durchführung einer Fettgewebsreduktionsplastik im Bereich des Abdomens bzw. der Oberschenkel geplant. Die in vivo Untersuchungen wurden einen Tag vor der geplanten Operation durchgeführt. Nach erfolgter Operation wurde das entsprechende Hautstück der kontralateralen Seite für die ex vivo Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Vor der Exzision wurde ein Areal der Größe 4 x 4 cm markiert. Da die Haut nach der Exzision kontrahiert, wurde die Haut mit Hilfe einer entsprechenden Schablone für die ex vivo Untersuchungen wieder auf ihre ursprüngliche Größe gedehnt und fixiert. In beiden Fällen wurde eine o/w Formulierung mit Nanopartikeln der Größe 100 nm und 0,12% des lipophilen Farbstoffs Curcumin appliziert. Nach einer 30minütigen Penetrationszeit wurde das differentielle Stripping durchgeführt (Entnahme von Tape strips bis zur Entfernung der topisch applizierten Substanz aus dem Stratum corneum, dann Entnahme einer Cyanacrylat-Hautoberflächenbiopsie). Die Konzentration an Curcumin auf den Abrissen und auf den Cyanacrylat-Hautoberflächenbiospien wurde mittels Fluoreszenzspektrometrie bestimmt. Der Vergleich des folliculären Reservoirs in vivo und ex vivo hat gezeigt, dass das folliculäre Reservoir ex vivo nur etwa 9,5% des folliculären Reservoirs in vivo ausmacht. Die histologischen Untersuchungen haben gezeigt, dass sich die elastischen Fasern zirkulär im Bereich der Haarfollikel zusammenziehen, wobei die Reservoiruntersuchungen darauf schließen lassen, dass es eine Dehnung der Haut auf ihre ursprünglichen Ausmaße diese Kontraktion nicht wieder auflösen kann. Damit ist der Einsatz von exzidiertem Humanhaut für die Untersuchung der folliculären Penetration kaum geeignet, was bei der Auswahl von Hautmodellen zur Untersuchung der Hautpenetration in der Zukunft unbedingt berücksichtigt werden sollte.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.02.024>









### 2.2.2 Vergleich der Haarfollikelmorphologie von acht verschiedenen Säugetieren und Menschen

*Susanne Mangelsdorf, Theognosia Vergou, Wolfram Sterry, Juergen Lademann, Alexa Patzelt. Comparative study of hair follicle morphology in eight mammalian species and humans. Skin Research and Technology 2014, 20:147-154*

Zusammenfassung: Im Rahmen der Studie wurde die Haarfollikelmorphologie von acht Säugetierarten (Hund, Katze, Ratte, Meerschweinchen, Maus, Hase, Affe, Schwein) untersucht und die Ergebnisse wurden mit den Daten aus einer vorherigen Studie verglichen, in der die menschliche Haarfollikelmorphologie untersucht wurde. Bei fast allen Säugetieren wurden die Hautareale dorsolateral und kaudal des Schulterblattes untersucht. Beim Schwein erfolgte die Untersuchung am Ohr und beim Affen erfolgte die Untersuchung an zwei verschiedenen Körperregionen, da hier nicht ausreichend Tiere verfügbar waren. Bei jedem Tier wurde die Follikeldichte mittels digitaler Fotografie, Cyanacrylat-Hautoberflächenbiopsie und TrichoScan untersucht und die Morphologie an 50 Haarfollikeln (bzw. beim Affen an 100 Haarfollikeln) mittels Cyanacrylat-Hautoberflächenbiopsie bestimmt. Mittels Cyanacrylatabriss erhält man einen negativen Abdruck des Haarfollikelinfundibulums sowie das komplette Haar, beides kann dann lichtmikroskopisch vermessen werden. Zur Bestimmung der Haarfollikelmorphologie wurden der Durchmesser der Follikelöffnung und des Haarschafts, sowie die Länge des Follikels und des Infundibulums gemessen. Darüber hinaus wurde aus den gemessenen Werten der prozentuale Anteil der Follikelöffnungen pro cm<sup>2</sup> Hautoberfläche, die Oberfläche des Infundibulums pro cm<sup>2</sup> und das follikuläre Volumen pro cm<sup>2</sup> kalkuliert. Im Ergebnis der Studie konnte gezeigt werden, dass die Größe und Verteilung der Haarfollikel in Abhängigkeit von der Spezies sehr unterschiedlich ist. Ein Vergleich der follikulären Reservoirkapazität von Stratum corneum und Haarfollikeln für jede Spezies hat gezeigt, dass diese ebenfalls stark variieren kann. Während beim Hund, der sehr große Haarfollikel aufweist, das follikuläre Reservoir fast doppelt so groß ist wie das des Stratum corneum, beträgt es beim Affen etwa nur ein Fünftel. Ein Vergleich der Werte mit perkutanen Absorptionsraten aus der Literatur hat gezeigt, dass Tiere mit höherer Follikeldichte auch höhere Absorptionsraten aufweisen. In Bezug auf Haarfollikelmorphologie und Hautstruktur war die Schweineohrhaut der menschlichen Haut am ähnlichsten und sollte daher am ehesten für die Untersuchung der follikulären Penetration genutzt werden.

<http://dx.doi.org/10.1111/srt.12098>















### ***2.3 Warum sind partikuläre Substanzen besonders gut für die folliculäre Penetration geeignet?***

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass partikuläre Substanzen besonders gut und wesentlich effektiver in den Haarfollikel hinein penetrieren als nicht-partikuläre Substanzen<sup>38, 39, 52, 68</sup>. Dieser Effekt scheint stark abhängig von der Größe der Partikel zu sein<sup>69</sup>. Um die folliculäre Penetrationstiefe zu bestimmen, eignet sich erneut am besten das Schweinehautohrmodell<sup>70</sup>. Nach topischer Applikation (inklusive Massage) einer Fluoreszenz-markierten Substanz und einer gewissen Penetrationszeit, können aus dem Applikationsareal Biopsien entnommen werden und in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Im Anschluss werden Kryoschnitte der Haarfollikel angefertigt und die folliculäre Penetrationstiefe der Substanz mittels Laser-Scan-Mikroskopie vermessen<sup>68</sup>.

In früheren Arbeiten<sup>68</sup> konnte gezeigt werden, dass Fluoreszenz-gelabelte Partikel mit einem Durchmesser von 320 nm signifikant tiefer in den Haarfollikel penetriert sind, als ein Fluoreszenz-gelabeltes Hydrogel. Die Untersuchungen sind ex vivo am Schweineohrmodell durchgeführt worden. Für die partikuläre Formulierung konnten Penetrationstiefen von über 1400 µm erreicht werden, während die Penetrationstiefe für die nicht-partikuläre Formulierung bei etwa 400 µm lag. Wurden die Substanzen allerdings nicht in die Haut einmassiert, sondern einfach nur topisch appliziert, konnten sowohl für die partikuläre als auch für die nicht-partikuläre Substanz nur folliculäre Penetrationstiefen von knapp 300 µm erreicht werden.

Es scheint daher, dass die Massage und die Größe einer Substanz einen starken Einfluss auf die folliculäre Penetrationstiefe hat, was am ehesten auf einen mechanischen Einfluss dieser Parameter auf den folliculären Penetrationsprozess schließen lässt. In den nachfolgend dargestellten zwei Arbeiten wird einerseits der mögliche Einfluss der Dicke der Kutikulazellen des Haarschafts auf die folliculäre Penetrationstiefe untersucht und andererseits die Abhängigkeit der folliculären Penetrationstiefe von der Partikelgröße näher betrachtet.

*2.3.1 Bestimmung der Dicke der Kutikula von Schweinehaaren und menschlichen Haaren und die Möglichkeit des Einflusses der Kutikuladicke auf den folliculären Penetrationsprozess von Nanopartikeln*

*Jürgen Lademann, Alexa Patzelt, Heike Richter, Christina Antoniou, Wolfram Sterry, Fanny Knorr. Determination of the cuticula thickness of human and porcine hairs and their potential influence on the penetration of nanoparticles into the hair follicles. Journal of Biomedical Optics 2009; 14(2): 021014, 1-4.*

Zusammenfassung: Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Oberflächenstruktur von menschlichen und Schweinehaaren mittels Elektronenmikroskopie (SEM) untersucht und die maximale Dicke der Kutikulaschicht des Haares bestimmt. Insgesamt wurden 50 Schweinehaare und je 50 menschliche Vellus- und Terminalhaare vermessen.

Die Kutikulazelldicke der menschlichen Vellus- und Terminalhaare war nahezu identisch und wies eine mittlere Dicke von etwa 530 nm auf. Die Kutikulazellen der Schweineborsten waren mit 320 nm etwas dünner. In der Arbeit wurde postuliert, dass die Kutikulazelldicke zusammen mit der Massageapplikation einen Einfluss auf die folliculäre Penetration von partikulären Substanzen haben könnte. Durch die Massage kommt es zu einer Bewegung des Haarschafts im Haarfollikel. Und ähnlich wie bei einer Zahnradschraube oder einer Ratsche scheint es durch die Bewegung des Haares zu einem Weitertransport der Partikel zu kommen. Während die Bewegung des Haares im Haarfollikel in vivo physiologischer Weise vorkommt, muss diese in ex vivo Experimenten mittels Massage simuliert werden.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit wurde angenommen, dass möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der folliculären Penetrationstiefe von verschiedenen Partikelgrößen und der Dicke der Kutikulazellen bestehen könnte, so dass in der nachfolgenden Arbeit (siehe 2.3.2) gezielt und systematisch verschiedenen Partikelgrößen und Partikelarten auf ihre folliculäre Penetrationstiefe untersucht wurden.

<http://dx.doi.org/10.1117/1.3078813>







### 2.3.2 Selektives folliculäre Targeting durch Modifikation der Partikelgröße

*Alexa Patzelt, Heike Richter, Fanny Knorr, Ulrich Schäfer, Claus-Michael Lehr, Lars Dähne, Wolfram Sterry, Jürgen Lademann. Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. Journal of Controlled Release 2011; 150: 45-48*

Zusammenfassung: Im Rahmen dieser Studie wurde die folliculäre Penetrationstiefe von zwei verschiedenen Fluoreszenz-gelabelten Partikelarten mit jeweils verschiedenen Partikelgrößen untersucht (Versuchsreihe 1: Natriumfluoreszeingelabelte PLGA-Partikel in einer Hydrogelsuspension; Partikelgrößen: 122 nm, 230 nm, 300 nm, 470 nm, 643 nm, 860 nm; Versuchsreihe 2: Cy5-gelabelte Silikapartikel in einer wässrigen Lösung; Partikelgrößen: 300 nm, 646 nm, 920 nm und 1000 nm).

Für beide Partikelarten wurde die tiefste folliculäre Penetration für die Partikel erreicht, die einen Durchmesser von etwa 650 nm hatten. Für die Partikel mit kleinerem bzw. größerem Durchmesser wurden signifikant geringere Penetrationstiefen erreicht, kein signifikanter Unterschied war nur zwischen den 300 und 470 nm Partikeln aus der Versuchsreihe 1 zu verzeichnen. Diese Abhängigkeit der Penetrationstiefe von der Partikelgröße scheint am ehesten ein mechanischer Effekt zugrunde zu liegen, so wie er bereits in der vorherigen Arbeit beschrieben worden ist (siehe 2.3.1). Der Ratschenmechanismus des Haarschafts im Haarfollikel scheint bei einer bestimmten Partikelgröße besonders effektiv zu sein. Ein möglicher Zusammenhang mit der Dicke der Kutikulazellen, die beim Schweineohr bei etwa 320 nm liegt, wurde vermutet. Darüber hinaus wurde die Lage der diversen anatomischen Strukturen des Vellus- und Terminalhaarfollikels mit den verschiedenen folliculären Penetrationstiefen korreliert. So konnte veranschaulicht werden, dass beispielsweise die Partikel mit den Durchmessern 470 nm und 643 nm sogar die Wulstregion des Terminalhaarfollikels erreichen könnten, wenn die Ergebnisse auf die in vivo Situation am Menschen übertragen werden können. Damit wäre es bei zukünftigen pharmazeutischen Entwicklungen beispielsweise möglich durch die selektive Auswahl der Partikelgröße bestimmte Zielstrukturen im Haarfollikel direkt anzuvisieren, was sicherlich bei einigen Erkrankungen von therapeutischem Interesse sein könnte.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.11.015>







#### **2.4 Untersuchungen zur getriggerten Freisetzung von Wirkstoffen aus Nanocarriern im Haarfollikel**

Aufgrund der rasend schnellen Entwicklung von immer mehr nanopartikulären Systemen in allen pharmazeutischen und industriellen Bereichen gibt es auch in der Dermatologie immer mehr Bestrebungen, Nanocarrier auch als Transporter für Wirkstoffe in die Haut einzusetzen. Gleichzeitig gibt es immer mehr Untersuchungen, die zeigen, dass Nanocarrier gar nicht in der Lage sind, die intakte Hautbarriere zu überwinden. Dennoch bieten Nanocarrier als Transporter im Gegensatz zu anderen Wirkstofftransportsystemen mehrere Vorteile: es können höhere Wirkstoffkonzentration zu Zielstrukturen transportiert werden, die Löslichkeit besonders von stark hydrophoben Wirkstoffen kann verbessert werden und ihre chemische und physikalische Stabilität kann durch die Verkapselung deutlich erhöht werden. Außerdem kann die Freisetzung der Wirkstoffe mehr oder weniger kontrolliert erfolgen<sup>71</sup>. Trotz dieser vielen Vorzüge, bleibt jedoch die Frage, ob es sinnvoll ist, diese Entwicklungen weiter voran zu treiben, da es auch nach vielen Jahren Forschung und Entwicklung von akademischer und industrieller Seite noch kein partikuläres Produkt auf dem Markt gibt, welches Wirkstoffe einfach durch die Hautbarriere transportieren kann<sup>39</sup>.

Vor wenigen Jahren wurde daher eine neue Strategie entwickelt, um die Vorzüge von Nanocarriern für den Wirkstofftransport in die Haut nutzen zu können. Das zugrunde liegende Prinzip ist, dass die Nanocarrier mit einem spezifischen Freisetzungsmechanismus ausgestattet werden müssen. Dies bedeutet, dass die Nanocarrier nur dafür genutzt werden, möglichst eine hohe Konzentration an Wirkstoff möglichst tief in den Haarfollikel hinein zu transportieren. Durch einen internen oder externen Stimulus kommt es dann zur Freisetzung des Wirkstoffs; dieser kann dann unabhängig transfollikulär ins lebende Gewebe diffundieren<sup>16</sup>. Wichtig dabei ist, dass die Freisetzung zum richtigen Zeitpunkt und am richtigen Ort stattfindet, was eine große pharmazeutische Herausforderung darstellt. In den nachfolgenden beiden Arbeiten sind zwei Möglichkeiten der getriggerten Wirkstofffreisetzung aus Nanocarriern beschrieben, deren Wirksamkeit am Schweinehautmodell überprüft wurde.

#### 2.4.1 Getriggerte Wirkstofffreisetzung aus Partikeln im Haarfollikel

Wing Cheung Mak, Alexa Patzelt, Heike Richter, Reinhardt Renneberg, Kwok Kei Lai, Eckart Rühl, Wolfram Sterry, Jürgen Lademann. *Triggering of drug release of particles in hair follicles. Journal of Controlled Release 2012; 160: 509-514*

Zusammenfassung: In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuartiges Konzept zur getriggerten Freisetzung eines Modellwirkstoffs aus bovinen Serumalbuminpartikeln (BSA) im Haarfollikel untersucht. Dabei handelte es sich um ein Zweikomponentensystem. Bei der einen Komponente handelte es sich um BSA-Partikel, die mit dem Modellwirkstoff FITC beladen waren und einen mittleren Durchmesser von etwa 532 nm hatten. Bei der zweiten Komponente handelte es sich um CaCO<sub>3</sub>-Partikel, die mit einer Protease beladen waren, welche mit Rhodamin gelabelt war. Die CaCO<sub>3</sub>-Partikel hatten einen mittleren Durchmesser von 516 nm. Ziel der Studie war die Protease-vermittelte Freisetzung des Modellwirkstoffs FITC aus den BSA-Partikeln. Die Untersuchungen wurden am Schweineohrhautmodell durchgeführt. Beide Substanzen wurden gleichzeitig auf die Haut gebracht. Durch das Aufbringen der Protease-haltigen Partikel auf die Haut kam es entlang des Konzentrationsgradienten zu einer langsamen Freisetzung der Protease. Durch den Kontakt der Protease mit den BSA-Partikeln kam es zu deren Abbau und damit zur Freisetzung des Modellwirkstoffs FITC. Als Kontrolle wurden die BSA-Partikel allein aufgetragen. In den Kontrolluntersuchungen konnte nur ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal in den Haarfollikeln gesehen werden. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Fluoreszenzsignale der FITC-Moleküle sich gegenseitig auslöschen, wenn es nicht freigesetzt, sondern dicht gepackt im Partikel lokalisiert ist. Im Falle der simultanen Applikation war ein starkes Fluoreszenzsignal im Haarfollikel detektierbar, was für eine gelungene Freisetzung des Modellwirkstoffs spricht. FITC konnte in einer Tiefe von bis zu etwa 900 µm im Haarfollikel nachgewiesen werden, ebenso wie die Rhodamin-markierte Protease. In einigen Schnitten konnte auch eine Aufnahme des Modellwirkstoffs FITC in die Talgdrüse nachgewiesen werden. Dies könnte von besonderem Interesse z.B. für die Therapie der Akne vulgaris sein.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.007>











#### 2.4.2 Durch IRA-Strahlung getriggerte Freisetzung eines Modellwirkstoffes aus AuNP-dotierten BSA Nanocarriern im Haarfollikel

Jürgen Lademann, Heike Richter, Fanny Knorr, Alexa Patzelt, Maxim Darwin, Eckart Rühl, K.Y. Cheung, Kwok Kei Lai, Reinhardt Renneberg, Wing Cheung Mak.

*Triggered release of model drug from AuNP-doped BSA nanocarriers in hair follicles using IRA radiation. Acta Biomaterialia 2016; 30: 388-396.*

Zusammenfassung: In der vorliegenden Arbeit wurde die durch wassergefilterte Infrarot A-Strahlung getriggerte Freisetzung von FITC aus Goldnanopartikel-dotierten BSA Nanocarriern im Haarfollikel untersucht. Die Untersuchungen wurden am Schweineohrhautmodell durchgeführt, der Durchmesser der Partikel lag bei etwa 545 nm. Nach der Applikation der Partikel auf die Schweineohrhaut entsprechend des Standardprotokolls und einer 30 minütigen Penetrationszeit wurde eines der behandelten Hautareale mit wIRA für 15 min bestrahlt ( $170 \text{ J/cm}^2$ ), das andere Hautareal blieb als Kontrolle unbestrahlt.

In den mit wIRA bestrahlten Hautarealen konnte eine folliculäre Penetrationstiefe von ca.  $717 \mu\text{m}$  erreicht werden, hier war ein starkes Fluoreszenzsignal durch das freigesetzte FITC detektierbar. In den Kontrollarealen war das Fluoreszenzsignal sehr schwach, was erneut für eine Selbstausschöpfung des Fluoreszenzsignals bei nicht vorhandener Freisetzung des Modellwirkstoffs spricht. Wie in der vorherigen Arbeit konnte der Modellwirkstoff FITC auch in der Talgdrüse nachgewiesen werden. Auch in dieser Arbeit konnte eine Freisetzung des Modellwirkstoffs nach erfolgter Penetration des Nanocarriers im Haarfollikel gezeigt werden. Durch die wIRA-Bestrahlung kommt es zu einer Wärmeentwicklung in den AuNP. Durch die entstandene Wärmeenergie kommt es zu einer partiellen Zerstörung bzw. Öffnung der AuNP-dotierten BSA-Partikel und Freisetzung des Modellwirkstoffs FITC.

Bei diesem Ansatz handelt es sich um einen effektiven getriggerten Freisetzungsmechanismus, der im Haarfollikel realisiert werden kann. Für die tägliche Anwendung scheint dieser Ansatz jedoch zu kompliziert, so dass in der Zukunft weitere Ansätze überprüft werden müssen und vielleicht sogar interne Triggermechanismen wie Änderungen des pH-Werts untersucht werden sollten.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.11.052>

















### 3. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten neue wesentliche Erkenntnisse in Bezug auf die folliculäre Penetration gewonnen werden. Neben der Entwicklung von neuen Methoden zur Bestimmung der folliculären und transfolliculären Penetration, die inzwischen auch international anerkannt sind und eingesetzt werden <sup>57</sup>, konnte mit dem Schweineohrmodell ein leicht zugängliches, ethisch vertretbares ex vivo Hautmodell etabliert werden, das es ermöglicht, die folliculäre Penetration zu untersuchen. Ferner konnten verschiedene Hypothesen, die den folliculären Penetrationsprozess erklären könnten, durch experimentelle Daten gestützt werden. Für die Zukunft scheint es sinnvoll, die folliculäre Penetration dahingehend zu nutzen, Nanocarrier mit Wirkstoffen zu beladen, die nach tiefer folliculärer Penetration Trigger-gesteuert ihren Wirkstoff innerhalb des Haarfollikels freisetzen, so dass dieser dann unabhängig zu den Zielzellen diffundieren kann. Hierzu konnten erste erfolgreiche Arbeiten veröffentlicht werden.

#### ***3.1 Entwicklung von Methoden zur Bestimmung der folliculären und transfolliculären Penetration***

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, stellt die selektive Untersuchung der folliculären Penetration eine große Herausforderung dar, da sie eine räumliche Auflösung benötigt. Beim Vergleich von follicelfreier Haut mit normaler Haut besteht das Problem darin, ein quantitatives Modellsystem zu finden, das wirklich follicelfrei ist, sonst aber die gleichen strukturellen, biochemischen und Barriereeigenschaften aufweist, wie normale Haut <sup>54</sup>.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten zwei Methoden etabliert werden, die diesen Anforderungen weitestgehend entsprechen. Daher haben diese Methoden bereits auch international Anerkennung erlangt und werden bereits auch vielfach für die Untersuchung der folliculären Penetration eingesetzt <sup>57</sup>. Die Entwicklung der Methode des selektiven Follikelverschlusses ist bereits in einer vorherigen eigenen Arbeit beschrieben <sup>67</sup>. Durch den Einsatz der Methode in der hier gezeigten Arbeit konnte der Einfluss des folliculären Penetrationsweges jedoch noch viel deutlicher gezeigt werden. Die Untersuchungen haben nachgewiesen, dass Koffein bereits 5 Minuten nach topischer Applikation im Blut nachweisbar wird, wenn die Haarfollikel

offen sind und am Penetrationsprozess beteiligt sind. Sind die Haarfollikelöffnungen jedoch selektiv verschlossen, dauert die systemische Aufnahme von Koffein etwa 20 min<sup>41</sup>. Mathematische Berechnungen der pharmakokinetischen Parameter haben gezeigt, dass ein Drittel der Absorption des Koffeins tatsächlich über den Haarfollikel stattgefunden hat, dieser Effekt jedoch hauptsächlich schnell direkt nach der topischen Applikation zu beobachten ist<sup>72</sup>. Ähnliche Ergebnisse konnten für weitere Substanzen und Formulierungen wie Minoxidilschaum<sup>73</sup> und eine Koffeinshampooformulierung<sup>74</sup> erzielt werden. Die Ergebnisse zeigen einerseits, dass die interzelluläre und die follikuläre Penetration stets simultane Prozesse sind, d.h. es werden beide Penetrationswege gleichzeitig bedient, die jedoch jeweils eine unterschiedliche Kinetik aufweisen. Es ist anzunehmen, dass diese unterschiedliche Kinetik stark von den physikochemischen Eigenschaften der topisch applizierten Substanz abhängt, da eine transfollikuläre Penetration die Voraussetzung für die systemische Aufnahme der Substanzen über den follikulären Penetrationsweg ist. Während die Untersuchungen mit Koffeinelösung eher der Grundlagenforschung zuzuordnen sind, ist es natürlich auch von Interesse, die transfollikuläre Aufnahme von neueren und ggf. noch nicht zugelassenen Wirkstoffen zu testen, was dann natürlich aus ethischen Gründen nicht mehr in vivo am Menschen durchgeführt werden kann. Daraufhin wurde versucht, die Follikelverschluss technik in Diffusionszelleexperimenten zu implementieren und die Versuche unter gleichen experimentellen Bedingungen wie in vivo<sup>41</sup> in vitro zu wiederholen<sup>75</sup>. Ein Vergleich der in vivo und in vitro Daten zeigte jedoch einige signifikante Unterschiede. Auch wenn im Falle der offenen Haarfollikel signifikant größere Mengen an Koffein im Rezeptormedium nachgewiesen werden konnten als im Falle der geschlossenen Follikel, gelang der Nachweis im Rezeptormedium erst nach zwei Stunden im Vergleich zu 5 min nach topischer Applikation in den in vivo Experimenten. Ein weiterer Unterschied war, dass es nach 24 h in den in vitro Experimenten zu einem weiteren Anstieg der Koffeinkonzentration im Rezeptormedium gekommen ist, während in den in vivo Versuchen nach 24 h bereits ein deutlicher Abfall der Koffeinkonzentration im Blut nachgewiesen werden konnte. Beide Unterschiede können prinzipiell dadurch erklärt werden, dass in den in vitro Experimenten kein Blutfluss vorhanden ist. In den in vivo Experimenten verursacht der Blutfluss einen Abtransport des Koffeins, in den in vitro Experimenten handelt es sich eher um kumulative Werte. Vergleichbar hingegen waren die relativen follikulären

Penetrationsraten in vivo und in vitro, diese lagen in beiden Fällen bei ca. 50,2 bzw. 58,6%.

Der Vergleich der Ergebnisse beider Studien zeigt, dass die Implementierung des selektiven Follikelverschlusses in der Diffusionszelle nur sehr bedingt geeignet ist, um die transfollikuläre Penetration von topisch applizierten Substanzen zu untersuchen. Dies liegt voraussichtlich vor allem an dem Hautmodell. Für Diffusionszelleexperimente muss exzidierte Haut eingesetzt werden. Hier ist jedoch bekannt, dass es bei exzidierter Haut zu einer Kontraktion der elastischen Fasern rund um den Haarfollikel kommt, was das follikuläre Reservoir um bis zu 90% reduzieren kann <sup>76</sup>. Häufig wird für Diffusionszelleexperimente darüber hinaus Spalthaut oder zumindest Haut genommen, von der das subkutane Fettgewebe entfernt worden ist. Da größere Haarfollikel jedoch häufig bis tief in das subkutane Fettgewebe hineinreichen, kommt es dabei zu einem Abschneiden des distalen Haarfollikelanteils, so dass es sich beim Haarfollikel theoretisch nur noch um einen Kanal handelt, der direkt in das Rezeptormedium mündet <sup>16, 77</sup>. Vermutlich wird dieser Effekt durch die oben beschriebene Kontraktion der elastischen Fasern um den Haarfollikel herum stark abgeschwächt, jedoch sollte dieser Effekt bei der Interpretation von in vitro Ergebnissen zur follikulären Penetration in der Diffusionszelle beachtet werden.

In einem neuen Ansatz wurde die follikuläre Verschlussstechnik im Zusammenhang mit der intradermalen Mikrodialyse implementiert. Die Mikrodialyse ist eine interessante Methode, um penetrierte Substanzen in der Dermis nachzuweisen <sup>78</sup>. Die Ergebnisse einer ersten noch nicht veröffentlichten Studie, in der die interzelluläre und transfollikuläre Penetration von mit Dexamethason beladenen Ethylcellulose-Nanocarriern untersucht wurde, zeigen eine deutlich bessere Korrelation der follikulären Penetrationskinetik mit den in vivo Daten als die Kombination der Methode mit der Diffusionszelle. Vorteil ist hier vor allem, dass das Schweineohrhautmodell eingesetzt werden kann, so dass der Haarfollikel weder durch eine Kontraktion von elastischen Fasern wie bei der exzidierten Haut noch durch ein distales Abschneiden des Haarfollikels beeinträchtigt wird.

Die ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode des differentiellen Strippings ist wiederum mehr dazu geeignet, zu quantifizieren, wie viel einer topisch applizierten Substanz tatsächlich in den Haarfollikel hineinpenetriert und wie viel im Stratum corneum lokalisiert ist. Sie eignet sich vor allem dazu, einen zeitlichen

Moment zu erfassen, eine möglich transfollikuläre Penetration bzw. perkutane Absorption einer Substanz wird bei dieser Methode jedoch nicht direkt berücksichtigt, es kann jedoch ggf. anhand der Gesamtwiederfindungsraten annähernd ein Rückschluss erfolgen. In der entsprechenden Arbeit <sup>79</sup> konnte ermittelt werden, dass sich nach 30 min etwa 5% der wiedergefunden Substanz im Haarfollikel befanden, nach 24 und 48 Stunden ließ sich die applizierte Substanz noch immer Haarfollikel nachweisen, allerdings in einer deutlich geringeren Konzentration. Da die Untersuchungen in vivo durchgeführt wurden und es sich bei dem applizierten Farbstoff (Natriumfluoreszein) um eine Substanz handelt, für die eine transfollikuläre Penetration zu erwarten ist, kann natürlich davon ausgegangen werden, dass ein gewisser Anteil dieser Substanz über den transfollikulären Weg penetriert ist und daher mit der Methode nicht mehr erfasst werden konnte.

Daher ist es besonders interessant, diese Methode bei Substanzen einzusetzen, für die keine transfollikuläre Penetration zu erwarten ist, wie für partikuläre Substanzen. In einer früheren Studie konnte mit Hilfe dieser Methode gezeigt werden, dass partikuläre Substanzen besonders lange im Haarfollikel gespeichert werden können <sup>36</sup>. Während die Konzentration der Partikel in den oberen Schichten des Stratum corneum 30 min nach topischer Applikation 8fach höher war als im Haarfollikel, ändert sich dieses Verhältnis über die Zeit. Nach 24 h fand sich bereits eine sehr starke Abnahme der Konzentration im Stratum corneum, während die Konzentration im Haarfollikel nur um etwa 20% abnahm. Nach vier Tagen waren die Partikel im Stratum corneum nicht mehr nachweisbar, während noch etwa 65% der initialen Konzentration im Haarfollikel nachweisbar war. Auch nach 10 Tagen fanden sich hier noch knapp 20%. Dies scheint plausibel, wenn man bedenkt, dass topisch applizierte Substanzen auf der Hautoberfläche oder in den obersten Schichten des Stratum corneum nicht besonders geschützt sind, sondern ständig äußeren Einflüssen wie Textil- oder Wasserkontakt ausgesetzt sind. Dagegen ist der follikuläre Bereich relativ protegiert. Auswärts gerichtete Prozesse wie Sebumsekretion oder Haarwachstum können natürlich eine gewisse Entleerung des Haarfollikels bewirken, dies sind aber eher langsamere Prozesse.

Im Rahmen der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Methode des differentiellen Strippings sehr gut in vivo am Menschen anwendbar ist, da sie auch nur minimal invasiv ist. Für weiterführende Untersuchungen ist es natürlich erneut von Interesse, ob die Methode auch in ex vivo Hautmodellen anwendbar ist. Während diese

Methode in anderen Arbeitsgruppen adaptiert auch im Schweinehautmodell eingesetzt wird <sup>80, 81</sup>, haben wir in eigenen Arbeiten eher die Erfahrung gemacht, dass die Haarfollikel im Schweineohr sehr fest verankert sind und sich mit einem Cyanacrylatabriss daher nur schwer vollständig über die Fläche entfernen lassen.

Daher wurde von Knorr et al. eine an das Schweineohrhautmodell angepasste Methode des differentiellen Stripping entwickelt <sup>82</sup>. Für diese Methode wurde ein Fluoreszenzfarbstoff in Hydroxyethylcellulose appliziert. Nach 30 min Penetrationszeit wurde analog zum differentiellen Stripping zunächst das Tape Stripping des Stratum corneum durchgeführt. Statt der Entnahme eines Cyanacrylatabrisses erfolgte dann jedoch die Entnahme einer Stanzbiopsie. Da die letzten Tape strips frei von Fluoreszenzfarbstoff waren, war davon auszugehen, dass sich die noch vorhandene Substanz nur noch in den Haarfollikeln befinden kann. Die Menge an Fluoreszenzfarbstoff in den Biopsien wurde daher dem Follikelinhalt zugeschrieben. Mittels Fluoreszenzspektrometrie wurde die Menge an Fluoreszenzfarbstoff in den gelösten Abrissen und in der gelösten Biopsie quantifiziert. Entsprechend den Ergebnissen der vorherigen in vivo Studie <sup>79</sup> wurden etwa 5% des Fluoreszenzfarbstoff in den Haarfollikeln detektiert.

### ***3.2 Bewertung von ex vivo Hautmodellen für die Untersuchung der folliculären Penetration***

Das differentielle Stripping bzw. auch die einfache Cyanacrylat-Hautoberflächenbiopsie sind sehr hilfreiche Methoden, wenn es um die Beurteilung von ex vivo Hautmodellen geht. Der Einsatz von Hautmodellen ist bei der Untersuchung der folliculären Penetration von topisch applizierten Substanzen unabdingbar. Denn gerade wenn es um die Untersuchung von neu entwickelten Wirkstoffen oder Trägersystemen geht, ist ein Einsatz am Menschen in vivo meist ethisch nicht vertretbar. Mit Hilfe des Differentiellen Strippings konnte eindeutig gezeigt werden, dass exzidierte Humanhaut nicht für die Untersuchung der folliculären Penetration geeignet ist <sup>76</sup>, da es bei der Exzision der Haut zu einer irreversiblen Kontraktion der elastischen Fasern um den Haarfollikel kommt, was das folliculäre Reservoir um bis zu 90% reduzieren kann. Auch das Problem der möglichen Verletzung des distalen Follikelanteils bei der Entfernung des subkutanen Fettgewebes wurde bereits weiter oben diskutiert <sup>16, 77</sup>.

Da exzidierte Humanhaut für die Untersuchung der follikulären Penetration ausgeschlossen werden musste, war es notwendig weitere Hautmodelle zu untersuchen. Auf den Einsatz von rekonstruktiven dreidimensionalen Hautmodellen<sup>83</sup> kann ebenfalls nicht zurückgegriffen werden, denn selbst wenn sie beispielsweise aus Keratinozyten entfernter Haarfollikel generiert werden, sind es dennoch Hautmodelle ohne Haarfollikel<sup>84</sup>. Damit ist es notwendig, auf Tierhautmodelle zurückzugreifen. In der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studie<sup>85</sup> wurde die Follikelmorphologie von 8 verschiedenen Säugetierarten mit der menschlichen Follikelmorphologie verglichen. Häufig wird in Penetrationsstudien auf Haut von Nagetieren (Mäuse, Ratten, Hasen) zurückgegriffen, diese weisen jedoch auch die höchste Hautpermeabilität auf<sup>86, 87</sup>. Dies begründet sich einerseits sicherlich durch die hohe Haardichte, andererseits aber auch durch eine unterschiedliche Barrierefunktion verursacht durch z.B. ein dünneres Stratum corneum. Daher sollte der Einsatz von Nagetierhaut, im Besonderen, wenn es um die Untersuchung der follikulären Penetration geht, eher kritisch betrachtet werden.

Die Untersuchung der Penetration an Affenhaut ist aus phylogenetischen Gründen naheliegend, da die Haut und auch die Verteilung der unterschiedlichen Follikeldichte der menschlichen Haut relativ nahe kommen. Penetrationsstudien zeigen meist ähnliche Ergebnisse. Der Einsatz von Affenhaut ist jedoch stark limitiert, da diese schlecht zugänglich und daher relativ teuer ist<sup>88</sup>.

In der eigenen Arbeit<sup>85</sup> zeigte das Schweineohrhautmodell in Bezug auf Haardichte und Reservoireigenschaften die größten Ähnlichkeiten zur menschlichen Haut.

Schweinehaut ist darüber hinaus leicht zugänglich, kostengünstig und weist sehr viele weitere Ähnlichkeiten zur menschlichen Haut auf, wie z.B. die spärliche Behaarung, eine relativ dicke Epidermis, eine Dermis mit einem ausgeprägten Papillarkörper und viel elastischem Gewebe<sup>89</sup>. Auch die Hautumsatzzeit ist beim Schwein und Mensch ähnlich. Die Anzahl, Größe und Verteilung der dermalen Blutgefäße ist vergleichbar, ebenso wie die Architektur der Kollagenfasern und Kollagenfibrillen. Auch in Bezug auf die Immunreaktivität zeigten sich gute Übereinstimmungen<sup>88, 90</sup>. Neben diesen vielen strukturellen und histologischen Gemeinsamkeiten weist das Schweineohrmodell den weiteren großen Vorteil auf, dass die Haut während der Experimente auf dem Ohrknorpel fixiert bleiben kann und es daher nicht zur einer Kontraktion der elastischen Fasern um die Haarfollikel kommt und diese daher vollständig für den follikulären Penetrationsprozess zur

Verfügung stehen. Aus den zuvor genannten Gründen und auf Basis der Ergebnisse der durchgeführten Studien wurde das Schweineohrhautmodell als Standardmodell für die nachfolgenden Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe fest etabliert.

### ***3.3 Warum sind partikuläre Substanzen besonders gut für die folliculäre Penetration geeignet?***

Inzwischen gibt eine Vielzahl von Arbeiten, die zeigen, dass partikuläre Substanzen besonders gut für die folliculäre Penetration geeignet sind, während eine interzelluläre Penetration bei einer intakten Hautbarriere kaum zu erwarten ist. Allerdings gibt es klare Hinweise, dass Nanopartikel in der Lage sind tiefe dermale Schichten zu erreichen, sobald die Integrität der Hautbarriere gestört und das Immunsystem aktiviert ist <sup>91</sup>. Vogt et al. haben beispielsweise zeigen können, dass die Vorbehandlung der Haut mit einer Cyanacrylat-Hautoberflächenbiospie die Partikelpenetration deutlich gesteigert hat und gleichzeitig die Langerhanszellen aktiviert hat <sup>43</sup>. Labouta et al. <sup>92</sup> haben kürzlich in einem Übersichtsartikel 40 aktuelle Studien zur Penetration von inorganischen Partikeln zusammengefasst. Auf den ersten Blick konnte in etwa der Hälfte dieser Studien eine Penetration der Partikel in die tieferen Hautschichten beobachtet werden. Bei genauerer Betrachtung der Methoden und Hautmodelle fällt jedoch auf, dass in fast allen dieser Fälle die Penetration entweder mechanisch oder chemisch stimuliert worden ist oder eben exzidierte Haut eingesetzt worden war. All diese Maßnahmen beinhalten eine deutliche Störung der Integrität der Hautbarriere, was auf jeden Fall bei der Bewertung dieser Ergebnisse kritisch in Betracht gezogen werden muss. Alle in vivo Experimente haben dagegen keine Aufnahme der Partikel in die lebende Epidermis gezeigt. Für die Anwendung auf der Haut werden unter anderem vor allem Polymer-Nanopartikel, Lipid-basierte Nanopartikel wie Liposome und Solid-Lipid Nanopartikeln, metallische Nanopartikel und Dendrimere eingesetzt <sup>71</sup>. Für die meisten Partikelarten wurde bereits eine gute Aufnahme in den Haarfollikel gezeigt <sup>62, 93-96</sup>. Für verschiedene Partikelarten konnte dabei eine eindeutige Abhängigkeit der folliculären Penetrationstiefe von der Partikelgröße festgestellt werden <sup>96</sup>, wobei die Partikelzusammensetzung dabei eher eine untergeordnete Rolle zu spielen schien, auch wenn verschiedene andere Parameter, wie eine negative Oberflächenladung oder lipophile Oberflächeneigenschaften die folliculäre Penetration natürlich auch noch weiter verbessern können <sup>80</sup>. Es lässt sich aber

dennoch vermuten, dass der follikuläre Penetrationsprozess vor allem ein mechanischer Prozess ist, der von verschiedenen Faktoren abhängig zu sein scheint. Neben dem möglichen Einfluss von strukturellen Eigenschaften des Haarschafts (die Dicke der Kutikulazellen korreliert in etwa mit der optimalen Partikelgröße), spielen aber auch sicher noch andere Faktoren eine Rolle, die bislang noch nicht systematisch untersucht worden sind. Bekannt ist jedoch, dass in ex vivo Experimenten die Applikation einer Massage unbedingt notwendig ist, um eine tiefe follikuläre Penetration zu erreichen<sup>68, 93</sup>. Hinweise über die notwendige Frequenz, Dauer und den durch die Massage ausgeübten Druck sind bislang nicht ausreichend untersucht. Zur Applikation mittels Massage sind bislang nur wenig Protokolle veröffentlicht<sup>40, 51, 97, 98</sup>, keine standardisierten Protokolle gibt es zum Einfluss von Frequenz, Dauer und Druck der Massage. Um den follikulären Penetrationsprozess von partikulären Substanzen weiter aufzuklären, gibt es derzeit eine Kooperation mit dem Institut Theoretische Biophysik und Physik weicher Materie der Freien Universität Berlin. In einem zwei-dimensionalen stochastischen Modell wurde bereits der Einfluss von Partikelgröße, Kutikulazellendicke, Massage und Bewegungsamplitude berechnet. Um die gerichtete follikuläre Penetration zu erklären, wurde ein Ratschenmechanismus angenommen. Bei einer radialen Haarbewegung, die durch die Massage erreicht werden kann, konnte ein gerichteter Partikeltransport gefunden werden, war die Haarbewegung axial, wurde ein auswärts gerichteter Transport beobachtet. Die Ergebnisse sind bereits in einer Publikation zusammengefasst und beim European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics zur Begutachtung eingereicht.

Eine weitere Zusammenarbeit zur Untersuchung des Einflusses von Massagefrequenz, Druck und Dauer sind in naher Zukunft geplant, um die Mechanismen der follikulären Penetration insbesondere von partikulären Substanzen weiter aufzuklären.

#### ***3.4 Untersuchungen zur getriggerten Freisetzung von Wirkstoffen aus Nanocarriern im Haarfollikel***

Wie bereits ausführlich in den vorherigen Kapiteln beschrieben, ist die follikuläre Penetration von topisch applizierten partikulären Substanzen bereits in vielen Studien beschrieben, eine transfollikuläre oder interzelluläre Penetration konnte jedoch bei intakter Hautbarriere bislang nicht gezeigt werden.

Bei einigen therapeutischen Fragestellungen ist es jedoch auch wünschenswert, einen Wirkstoff mittels eines Nanotransporters einfach tief in den Haarfollikel einzubringen bzw. einzelne bestimmte Strukturen im Haarfollikel zu erreichen. Einige Beispiele hierfür sind z.B. die erfolgreiche Verbesserung der Hautdesinfektion durch die Anwendung von Polyhexanidhaltigen Nanopartikeln. Es ist bekannt, dass etwa 25% der bakteriellen Hautflora im Haarfollikel lokalisiert ist <sup>99</sup>. Herkömmliche Desinfektionsmittel sind aufgrund ihrer nicht-partikulären Formulierung daher nicht in der Lage, besonders effektiv in den Haarfollikel einzudringen, so dass etwa 20-25% der Keime bei der Hautdesinfektion unberührt bleiben und den Ausgangspunkt für eine schnelle Wiederbesiedlung der Haut darstellen. Mit Hilfe der Polyhexanidhaltigen Nanopartikeln konnte eine effektivere und länger anhaltende Hautdesinfektion erreicht werden <sup>100</sup>. Auch für die Applikation von Haarwachstumsfördernden Substanzen scheint das direkte Einbringen der Wirkstoffe in den Haarfollikel von Vorteil zu sein <sup>101-104</sup>, ebenso wie für Erkrankungen wie Akne oder Rosacea <sup>105</sup>.

Eine weitere Option, um partikuläre Substanzen und ihre Wirkstoffe in die Haut zu bringen, kann natürlich auch die absichtliche Störung der Hautbarriere sein <sup>16</sup>. Methoden, um die Hautbarriere zu stören, können vielfältig sein. In Betracht kommen die Entnahme von Cyanacrylat-Hautoberflächenbiospien, chemische Penetrationsverstärker, Elektroporation, Ultraschall, der Einsatz von Mikronadeln, um hier nur einige zu nennen <sup>106, 107</sup>. Im Falle einer transkutanen Immunisierung kann man sich die durch die Verletzung der Hautbarriere entstehende Aktivierung des Immunsystems sogar zu Nutze machen <sup>43</sup>.

Soll das Ziel allerdings tatsächlich der transfollikuläre Wirkstofftransport in das lebende Gewebe sein, müssen für die Realisierung neue Ansätze gefunden werden. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Veröffentlichungen präsentiert, die sich mit dieser Herausforderung auseinandersetzen.

Ein eleganter Ansatz, um die zahlreichen Vorteile der diversen Nanotransporter für den Wirkstofftransport in die Haut zu nutzen ohne an der Hautbarriere zu scheitern, ist, dass die Nanocarrier tatsächlich nur den Transport der Wirkstoffe in den Haarfollikel übernehmen, zusätzlich aber mit einem Freisetzungsmechanismus ausgestattet werden, der über einen internen oder externen Trigger ausgelöst werden kann. Die im Haarfollikel freigesetzten Wirkstoffe können dann individuell transfollikulär diffundieren und unabhängig ihre Zielstrukturen erreichen. Wichtig

dabei ist, dass die Freisetzung zum richtigen Zeitpunkt und am richtigen Ort stattfindet, was eine große pharmazeutische Herausforderung darstellt. In den beiden vorliegenden Arbeiten sind zwei Optionen zur getriggerten Freisetzung beschrieben. In der ersten Arbeit <sup>97</sup> erfolgt die Freisetzung enzymatisch über eine simultan applizierte Protease, die zum Abbau der Nanocarrier führt. In der Arbeit konnte erfolgreich die Freisetzung des Modellwirkstoffes aus den Partikeln im Haarfollikel gezeigt werden. In der zweiten Arbeit erfolgte die Freisetzung des Modellwirkstoffes über wIRA-Strahlung aus AuNP-dotierten BSA-Partikeln. Auch hier konnte die getriggerte Freisetzung des Wirkstoffs aus den Partikeln demonstriert werden. Diese beiden Arbeiten stellen erste Ansätze dar, die getriggerte Wirkstofffreisetzung im Haarfollikel zu realisieren. Hier besteht aber sicherlich noch Optimierungsbedarf, da die simultane Applikation von zwei Komponenten bzw. die zusätzliche Notwendigkeit einer externen Wärmequelle wie die einer wIRA-Lampe für den täglichen Gebrauch natürlich etwas impraktikabel erscheint. Als weitere externe Stimulationsfaktoren bei der Wirkstofffreisetzung sind u.a. Radiofrequenz <sup>108</sup>, Ultraschall <sup>109</sup> und Licht <sup>110</sup> beschrieben.

Erstrebenswert wären jedoch eher interne Trigger, so dass die Freisetzung automatisch bei Kontakt der Partikel mit den Haarfollikeln erfolgt. Optimal wäre zusätzlich, wenn die Freisetzung sogar nur ortsselektiv auftreten würde, also nur im erkrankten Gewebe.

Die Identifizierung und Umsetzung solcher optimierten getriggerten Freisetzungsmechanismen im Haarfollikel stellt eine große Herausforderung für die Partikelhersteller dar. Aktuell erfolgt beispielsweise die Erprobung von pH-sensitiven Nanocarriern <sup>111, 112</sup>, da Untersuchungen gezeigt haben, dass ein pH-Gradient innerhalb des Haarfollikels besteht (bislang noch nicht publizierte Daten) mit einem sauren pH an Hautoberfläche der nach distal Richtung neutral ansteigt. Optimal wäre es daher, die Partikel so einzustellen, dass bei saurem pH keine Freisetzung des Wirkstoffes erfolgt, sondern erst ab einem pH-Wert von >6, so dass der Wirkstoff nicht bereits an der Hautoberfläche freigesetzt wird. Diese Untersuchungen sind aktuell noch in Bearbeitung. Von besonderem Interesse sollte es dabei auch sein, die Zielindikation im Auge zu behalten, da einige Erkrankungen womöglich mit einem veränderten pH-Wert einhergehen, so dass hier eine Anpassung des Systems notwendig sein könnte.

Ein weiterer möglicher interner Triggermechanismus ist die Temperatur. Aktuell gibt es Entwicklungen auf dem Gebiet von thermoresponsiven Nanogelen<sup>113</sup>, die ihren Wirkstoff oberhalb einer Temperatur von 32°C, was in etwa der Hautoberflächentemperatur entspricht, abgeben. Auch hier ist die möglicherweise erhöhte Hauttemperatur in entzündlichem Gewebe zu bedenken.

Als weitere mögliche interne Triggermechanismen werden aktuell die Zusammensetzung des Sebums als auch Redoxpotentiale diskutiert. So ist es vorstellbar, dass die Nanocarrier so konzipiert werden, dass es durch den Kontakt der Partikel mit dem Sebum, das in hoher Konzentration im Haarfollikel vorkommt, zu einer Freisetzung von Wirkstoffen kommen kann. Erste Experimente hierzu laufen gerade mit künstlich hergestelltem Sebum. Auch die Änderung des antioxidativen Potentials in erkranktem Gewebe könnte zukünftig genutzt werden, um in erkranktem Gewebe, welches in den meisten Fällen höhere Konzentrationen an freien Radikalen aufweist, gezielt eine Wirkstofffreisetzung zu generieren. Hier sind jedoch auch spezifische Hautmodelle notwendig, die es noch zu identifizieren gilt.

Insgesamt handelt es sich bei der getriggerten Freisetzung von Wirkstoffen aus Nanotransportern um ein höchst spannendes Thema, welches bislang noch in den Kinderschuhen steckt und sicher noch viel Potential und Herausforderungen für weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet birgt, welchen ich mich in den nächsten Jahren gerne widmen würde.

#### 4. Zusammenfassung

Die Haut ist das größte und eines der lebenswichtigen Organe des Menschen. Ohne die Schutz- und Barrierefunktionen der Haut könnte ein Organismus nicht überleben. Die Barriereigenschaften der Haut sind vielfältig. Sie bieten Schutz unter anderem vor physikalischen, chemischen, mikrobiellen und UV-induzierten Schädigungen. Dennoch stellt die Haut keine absolute unflexible Sperrschicht dar. Prinzipiell ist es möglich, dass topisch applizierte Substanzen die Hautbarriere überwinden und systemisch aufgenommen werden. Die Optimierung des topischen Applikationsweges stellt eine große Herausforderung dar und ist Ziel zahlreicher wissenschaftlicher und industrieller Bemühungen. Prinzipiell sind drei Penetrationswege in und durch die Haut bekannt. Der interzelluläre Penetrationsweg läuft entlang der Lipidschichten, welche die Korneozyten umgeben und scheint eine besonders große Rolle zu spielen. Der follikuläre Penetrationsweg gewinnt jedoch auch immer mehr an Bedeutung. Hier muss jedoch prinzipiell unterschieden werden zwischen der follikulären Penetration in den Haarfollikel hinein und der transfollikulären Penetration, d.h. einer Diffusion der topisch applizierten Substanz durch die Follikelwand in das den Haarfollikel umgebende Gewebe. Der transzelluläre Penetrationsweg scheint bislang von untergeordneter Bedeutung zu sein.

Die vorliegende Arbeit widmet sich speziell der Untersuchung des Haarfollikels und des follikulären und transfollikulären Penetrationsprozesses, welcher bislang nur in Ansätzen geklärt ist. Zielstellung der Arbeit war neben der Entwicklung von in vivo und ex vivo Methoden zur Untersuchung des follikulären und transfollikulären Penetrationsprozesses, die Identifizierung von geeigneten ex vivo Hautmodellen, da aus ethischen Gründen eine Untersuchung unter in vivo Bedingungen nicht in allen Fällen zu rechtfertigen ist. Auch die genaue Aufklärung des Mechanismus der follikulären Penetration stand im Fokus der Arbeit. Ferner war es Ziel der Untersuchungen, neue Ansätze zum follikulären Wirkstofftransport zu entwickeln.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten zwei Methoden zur Untersuchung der follikulären und transfollikulären Penetration etabliert werden, die inzwischen auch international eingesetzt werden. Mit Hilfe der Methode des selektiven

Follikelverschlusses ist es möglich, den Anteil des Haarfollikels am Gesamtpenetrationsprozess zu bestimmen. Hier konnte für eine Koffeinlösung gezeigt werden, dass der Haarfollikel eine besonders schnelle systemische Aufnahme ermöglicht. Die ebenfalls entwickelte Methode des differentiellen Stripping dagegen erlaubt die Quantifizierung der Menge an topisch applizierter Substanz im Stratum corneum und im Haarfollikel.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit war die Identifizierung von geeigneten ex vivo Hautmodellen. Hier konnte einerseits gezeigt werden, dass humane Haut im ex vivo Experiment zur Untersuchung der follikulären Penetration nicht geeignet ist, da es durch die Exzision zu einer Kontraktion der elastischen Fasern kommt, welche das follikuläre Reservoir irreversibel um etwa 90% reduzieren. Der Vergleich der Haarfollikelmorphologie von acht verschiedenen Säugetierspezies dagegen hat ergeben, dass das Schweineohr besonders gut geeignet ist für die Untersuchung der follikulären Penetration. Neben der histologischen und morphologischen Ähnlichkeit von menschlicher Haut und Schweinehaut sowie einer vergleichbaren Haardichte ist es von besonderer Bedeutung, dass die Haut während der Experimente auf dem Ohrknorpel fixiert bleiben kann und es daher nicht zu einer Kontraktion der Haarfollikel kommen kann. Das Schweineohrhautmodell konnte nachfolgend fest für die Untersuchung der follikulären Penetration etabliert werden.

Da der Mechanismus des follikulären Penetrationsprozesses noch weitgehend ungeklärt ist, war dessen weitere Aufklärung ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit. Es konnten im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen zwei entscheidende Einflussgrößen für den follikulären Penetrationsprozess ermittelt werden. Zum einen scheint die Struktur des Haares und dabei besonders die Dicke der Kutikulazellen einen besonderen Einfluss auf den Transport von Substanzen in den Haarfollikel zu haben. Die dachziegelartig übereinander gelagerten Kutikulazellen scheinen bei Bewegung des Haares ähnlich eines Ratscheneffektes den gerichteten Transport zu unterstützen. Für partikuläre Substanzen mit einer Größe von ca. 600 nm konnten die höchsten follikulären Penetrationstiefen erreicht werden, vorausgesetzt, dass die Bewegung im ex vivo Hautmodell mittels Massage stimuliert wurde. Kleinere und größere partikuläre Substanzen zeigten signifikant geringere follikuläre Penetrationstiefen.

Auf Grundlage der Ergebnisse, dass partikuläre Substanzen besonders tief und effektiv in den Haarfollikel hinein penetrieren können, aufgrund ihrer Größe jedoch

nicht transfollikulär in das den Haarfollikel umgebende Gewebe translozieren können, wurden neue Ansätze entwickelt, um die positiven Eigenschaften von partikulären Nanocarrier-Systemen trotzdem nutzen zu können. Die grundsätzliche Idee besteht darin, die Nanocarrier ausschließlich für den Transport von Wirkstoffen in den Haarfollikel zu nutzen, wo es ausgelöst durch ein Triggersignal zu einer Freisetzung der Wirkstoffe kommt, die dann unabhängig transfollikulär diffundieren können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei Freisetzungsmechanismen untersucht. Der erste Ansatz beschreibt eine Protease-getriggerte Freisetzung eines Modellwirkstoffes (FITC) aus bovinen Serumalbuminpartikeln, der zweite Ansatz eine durch wassergefilterte Infrarot A-Strahlung getriggerte Freisetzung des gleichen Modellwirkstoffes aus Goldnanopartikel-dotierten bovinen Serumalbuminpartikeln. In beiden Ansätzen konnte eine Freisetzung des Wirkstoffes im Haarfollikel nachgewiesen werden, in einigen Fällen sogar eine Aufnahme des Wirkstoffs in die Talgdrüse beobachtet werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten einige wichtige Aspekte der follikulären und transfollikulären Penetration näher herausgearbeitet werden und Methoden zur Untersuchung der follikulären Penetration international etabliert werden. Auch konnten erste Versuche zur getriggerten Freisetzung von Wirkstoffen aus Nanocarriern im Haarfollikel erfolgreich umgesetzt werden. Hier besteht jedoch noch weiterhin Optimierungsbedarf ebenso wie in der weiteren Untersuchung des follikulären und transfollikulären Penetrationsprozesses, auch wenn schon einige wichtige Aspekte im Rahmen der Arbeit aufgeklärt werden konnten. Diesen und weiteren Herausforderungen dieses spannenden Forschungsgebiets möchte ich mich in den nächsten Jahren gerne weiter wissenschaftlich widmen.

**5. Literaturangabe**

1. Helmstadter A 2011. Endermatic, epidermatic, enepidermatic-the early history of penetration enhancers. *Int J Pharm* 416: 12-5.
2. Menon GK, Kligman AM 2009. Barrier functions of human skin: a holistic view. *Skin Pharmacol Physiol* 22: 178-89.
3. Matsui T, Amagai M 2015. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *Int Immunol* 27: 269-80.
4. Bouwstra JA, Ponc M 2006. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim Biophys Acta* 1758: 2080-95.
5. Pappas A 2009. Epidermal surface lipids. *Dermatoendocrinol* 1: 72-6.
6. Elias PM 1983. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol* 80: 44s-9s.
7. Naegel A, Heisig M, Wittum G 2013. Detailed modeling of skin penetration--an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 65: 191-207.
8. Brandner JM 2016. Importance of Tight Junctions in Relation to Skin Barrier Function. *Curr Probl Dermatol* 49: 27-37.
9. Packer L, Valacchi G 2002. Antioxidants and the response of skin to oxidative stress: vitamin E as a key indicator. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 15: 282-90.
10. Lademann J, Vergou T, Darvin ME, Patzelt A, Meinke MC, Voit C, et al. 2016. Influence of Topical, Systemic and Combined Application of Antioxidants on the Barrier Properties of the Human Skin. *Skin Pharmacol Physiol* 29: 41-6.
11. Shindo Y, Witt E, Han D, Epstein W, Packer L 1994. Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *J Invest Dermatol* 102: 122-4.
12. Braff MH, Bardan A, Nizet V, Gallo RL 2005. Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *J Invest Dermatol* 125: 9-13.
13. Gallo RL, Murakami M, Ohtake T, Zaiou M 2002. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J Allergy Clin Immunol* 110: 823-31.
14. Ganz T 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 710-20.
15. Zeeuwen PL, Boekhorst J, van den Bogaard EH, de Koning HD, van de Kerkhof PM, Saulnier DM, et al. 2012. Microbiome dynamics of human epidermis following skin barrier disruption. *Genome Biol* 13: R101.
16. Patzelt A, Lademann J 2013. Drug delivery to hair follicles. *Expert Opin Drug Deliv* 10: 787-97.
17. Hadgraft J, Lane ME 2016. Advanced topical formulations (ATF). *Int J Pharm.*
18. Albery WJ, Hadgraft J 1979. Percutaneous absorption: in vivo experiments. *J Pharm Pharmacol* 31: 140-7.
19. Bos JD, Meinardi MM 2000. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol* 9: 165-9.
20. Fitzpatrick JM, Roberts DW, Patlewicz G 2016. What determines skin sensitization potency: Myths, maybes and realities. The 500 molecular weight cut-off: An updated analysis. *J Appl Toxicol.*
21. Fitzpatrick JM, Roberts DW, Patlewicz G 2016. Is skin penetration a determining factor in skin sensitization potential and potency? Refuting the notion of a LogKow threshold for skin sensitization. *J Appl Toxicol.*

22. Sznitowska M, Janicki S, Williams AC 1998. Intracellular or intercellular localization of the polar pathway of penetration across stratum corneum. *J Pharm Sci* 87: 1109-14.
23. Barbero AM, Frasc HF 2006. Transcellular route of diffusion through stratum corneum: results from finite element models. *J Pharm Sci* 95: 2186-94.
24. Kasting GB, Barai ND, Wang TF, Nitsche JM 2003. Mobility of water in human stratum corneum. *J Pharm Sci* 92: 2326-40.
25. Krause K, Foitzik K 2006. Biology of the hair follicle: the basics. *Semin Cutan Med Surg* 25: 2-10.
26. Otberg N, Richter H, Schaefer H, Blume-Peytavi U, Sterry W, Lademann J 2004. Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. *J Invest Dermatol* 122: 14-9.
27. Rogers GE 2004. Hair follicle differentiation and regulation. *Int J Dev Biol* 48: 163-70.
28. Schneider MR, Paus R 2014. Deciphering the functions of the hair follicle infundibulum in skin physiology and disease. *Cell Tissue Res* 358: 697-704.
29. Paus R, Foitzik K 2004. In search of the "hair cycle clock": a guided tour. *Differentiation* 72: 489-511.
30. Blume-Peytavi U, Vogt A 2011. Human hair follicle: reservoir function and selective targeting. *Br J Dermatol* 165 Suppl 2: 13-7.
31. Mathes C, Brandner JM, Laue M, Raesch SS, Hansen S, Failla AV, et al. 2016. Tight junctions form a barrier in porcine hair follicles. *Eur J Cell Biol* 95: 89-99.
32. Benedek M, Kaernbach C 2011. Physiological correlates and emotional specificity of human piloerection. *Biological psychology* 86: 320-9.
33. Parisi AV, Smith D, Schouten P, Turnbull DJ 2009. Solar ultraviolet protection provided by human head hair. *Photochemistry and photobiology* 85: 250-4.
34. Katoulis AC, Christodoulou C, Liakou AI, Kouris A, Korkoliakou P, Kaloudi E, et al. 2015. Quality of life and psychosocial impact of scarring and non-scarring alopecia in women. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 13: 137-42.
35. Matsui MS, Pelle E, Dong K, Pernodet N 2016. Biological Rhythms in the Skin. *International journal of molecular sciences* 17.
36. Lademann J, Richter H, Schaefer UF, Blume-Peytavi U, Teichmann A, Otberg N, et al. 2006. Hair follicles - a long-term reservoir for drug delivery. *Skin Pharmacol Physiol* 19: 232-6.
37. Meinke MC, Patzelt A, Richter H, Schanzer S, Sterry W, Filbry A, et al. 2011. Prevention of follicular penetration: barrier-enhancing formulations against the penetration of pollen allergens into hair follicles. *Skin Pharmacol Physiol* 24: 144-50.
38. Pan-In P, Wongsomboon A, Kokpol C, Chaichanawongsaroj N, Wanichwecharungruang S 2015. Depositing alpha-mangostin nanoparticles to sebaceous gland area for acne treatment. *J Pharmacol Sci* 129: 226-32.
39. Lademann J, Richter H, Meinke MC, Lange-Asschenfeldt B, Antoniou C, Mak WC, et al. 2013. Drug Delivery with Topically Applied Nanoparticles: Science Fiction or Reality? *Skin Pharmacol Phys* 26: 227-33.
40. Lademann J, Richter H, Knorr F, Patzelt A, Darvin ME, Ruhl E, et al. 2016. Triggered release of model drug from AuNP-doped BSA nanocarriers in hair follicles using IRA radiation. *Acta Biomater* 30: 388-96.

41. Otberg N, Patzelt A, Rasulev U, Hagemeister T, Linscheid M, Sinkgraven R, et al. 2008. The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine. *Br J Clin Pharmacol* 65: 488-92.
42. Mittal A, Schulze K, Ebensen T, Weissmann S, Hansen S, Guzman CA, et al. 2015. Inverse micellar sugar glass (IMSG) nanoparticles for transfollicular vaccination. *J Control Release* 206: 140-52.
43. Vogt A, Hadam S, Deckert I, Schmidt J, Stroux A, Afraz Z, et al. 2015. Hair follicle targeting, penetration enhancement and Langerhans cell activation make cyanoacrylate skin surface stripping a promising delivery technique for transcutaneous immunization with large molecules and particle-based vaccines. *Exp Dermatol* 24: 73-5.
44. Baleeiro RB, Wiesmuller KH, Reiter Y, Baude B, Dahne L, Patzelt A, et al. 2013. Topical vaccination with functionalized particles targeting dendritic cells. *J Invest Dermatol* 133: 1933-41.
45. Rahman SA, Abdelmalak NS, Badawi A, Elbayoumy T, Sabry N, El Ramly A 2016. Tretinoin-loaded liposomal formulations: from lab to comparative clinical study in acne patients. *Drug Deliv* 23: 1184-93.
46. Lapteva M, Moller M, Gurny R, Kalia YN 2015. Self-assembled polymeric nanocarriers for the targeted delivery of retinoic acid to the hair follicle. *Nanoscale* 7: 18651-62.
47. Ridolfi DM, Marcato PD, Justo GZ, Cordi L, Machado D, Duran N 2012. Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin. *Colloids Surf B Biointerfaces* 93: 36-40.
48. Ohyama M 2007. Hair follicle bulge: a fascinating reservoir of epithelial stem cells. *J Dermatol Sci* 46: 81-9.
49. Ohyama M, Vogel JC 2003. Gene delivery to the hair follicle. *J Investig Dermatol Symp Proc* 8: 204-6.
50. Aljuffali IA, Sung CT, Shen FM, Huang CT, Fang JY 2014. Squarticles as a lipid nanocarrier for delivering diphencyprone and minoxidil to hair follicles and human dermal papilla cells. *AAPS J* 16: 140-50.
51. Knorr F, Patzelt A, Darvin ME, Lehr CM, Schafer U, Gruber AD, et al. 2016. Penetration of topically applied nanocarriers into the hair follicles of dog and rat dorsal skin and porcine ear skin. *Vet Dermatol* 27: 256-e60.
52. Fang CL, Aljuffali IA, Li YC, Fang JY 2014. Delivery and targeting of nanoparticles into hair follicles. *Ther Deliv* 5: 991-1006.
53. Holmgaard R, Benfeldt E, Nielsen JB 2014. Percutaneous Penetration - Methodological Considerations. *Basic Clin Pharmacol* 115: 101-9.
54. Meidan VM, Bonner MC, Michniak BB 2005. Transfollicular drug delivery--is it a reality? *Int J Pharm* 306: 1-14.
55. Hisoire G, Bucks D 1997. An unexpected finding in percutaneous absorption observed between haired and hairless guinea pig skin. *J Pharm Sci* 86: 398-400.
56. Honzak L, Sentjurc M, Swartz HM 2000. In vivo EPR of topical delivery of a hydrophilic substance encapsulated in multilamellar liposomes applied to the skin of hairless and normal mice. *J Control Release* 66: 221-8.
57. Meidan VM 2010. Methods for quantifying intrafollicular drug delivery: a critical appraisal. *Expert Opin Drug Deliv* 7: 1095-108.
58. Behl CR, Wittkowsky A, Barrett M, Pierson CL, Flynn GL 1981. Technique for preparing appendage-free skin (scar) on hairless mouse. *J Pharm Sci* 70: 835-7.

59. Illel B, Schaefer H, Wepierre J, Doucet O 1991. Follicles play an important role in percutaneous absorption. *J Pharm Sci* 80: 424-7.
60. Barry BW 2002. Drug delivery routes in skin: a novel approach. *Adv Drug Deliv Rev* 54 Suppl 1: S31-40.
61. Fabin B, Touitou E 1991. Localization of Lipophilic Molecules Penetrating Rat Skin In vivo by Quantitative Autoradiography. *International Journal of Pharmaceutics* 74: 59-65.
62. Patzelt A, Richter H, Knorr F, Schafer U, Lehr CM, Dahne L, et al. 2011. Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. *J Control Release* 150: 45-8.
63. Grams YY, Whitehead L, Lamers G, Sturmman N, Bouwstra JA 2005. On-line diffusion profile of a lipophilic model dye in different depths of a hair follicle in human scalp skin. *J Invest Dermatol* 125: 775-82.
64. Franzen L, Mathes C, Hansen S, Windbergs M 2013. Advanced chemical imaging and comparison of human and porcine hair follicles for drug delivery by confocal Raman microscopy. *J Biomed Opt* 18: 061210.
65. Hueber F, Besnard M, Schaefer H, Wepierre J 1994. Percutaneous absorption of estradiol and progesterone in normal and appendage-free skin of the hairless rat: lack of importance of nutritional blood flow. *Skin Pharmacol* 7: 245-56.
66. Tenjarla SN, Kasina R, Puranajoti P, Omar MS, Harris WT 1999. Synthesis and evaluation of N-acetylprolinatate esters - novel skin penetration enhancers. *Int J Pharm* 192: 147-58.
67. Teichmann A, Otberg N, Jacobi U, Sterry W, Lademann J 2006. Follicular penetration: development of a method to block the follicles selectively against the penetration of topically applied substances. *Skin Pharmacol Physiol* 19: 216-23.
68. Lademann J, Richter H, Teichmann A, Otberg N, Blume-Peytavi U, Luengo J, et al. 2007. Nanoparticles--an efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *Eur J Pharm Biopharm* 66: 159-64.
69. Toll R, Jacobi U, Richter H, Lademann J, Schaefer H, Blume-Peytavi U 2004. Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. *J Invest Dermatol* 123: 168-76.
70. Lademann J, Richter H, Meinke M, Sterry W, Patzelt A 2010. Which skin model is the most appropriate for the investigation of topically applied substances into the hair follicles? *Skin Pharmacol Physiol* 23: 47-52.
71. Goyal R, Macri LK, Kaplan HM, Kohn J 2015. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. *J Control Release*.
72. Liu X, Grice JE, Lademann J, Otberg N, Trauer S, Patzelt A, et al. 2011. Hair follicles contribute significantly to penetration through human skin only at times soon after application as a solvent deposited solid in man. *Br J Clin Pharmacol* 72: 768-74.
73. Blume-Peytavi U, Massoudy L, Patzelt A, Lademann J, Dietz E, Rasulev U, et al. 2010. Follicular and percutaneous penetration pathways of topically applied minoxidil foam. *Eur J Pharm Biopharm* 76: 450-3.
74. Otberg N, Teichmann A, Rasuljev U, Sinkgraven R, Sterry W, Lademann J 2007. Follicular penetration of topically applied caffeine via a shampoo formulation. *Skin Pharmacol Physiol* 20: 195-8.
75. Trauer S, Lademann J, Knorr F, Richter H, Liebsch M, Rozycki C, et al. 2010. Development of an in vitro modified skin absorption test for the investigation of

- the follicular penetration pathway of caffeine. *Skin Pharmacol Physiol* 23: 320-7.
76. Patzelt A, Richter H, Buetttemeyer R, Huber HJ, Blume-Peytavi U, Sterry W, et al. 2008. Differential stripping demonstrates a significant reduction of the hair follicle reservoir in vitro compared to in vivo. *Eur J Pharm Biopharm* 70: 234-8.
  77. Senzui M, Tamura T, Miura K, Ikarashi Y, Watanabe Y, Fujii M 2010. Study on penetration of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles into intact and damaged skin in vitro. *J Toxicol Sci* 35: 107-13.
  78. Doge N, Honzke S, Schumacher F, Balzus B, Colombo M, Hadam S, et al. 2016. Ethyl cellulose nanocarriers and nanocrystals differentially deliver dexamethasone into intact, tape-stripped or sodium lauryl sulfate-exposed ex vivo human skin - assessment by intradermal microdialysis and extraction from the different skin layers. *J Control Release*.
  79. Teichmann A, Jacobi U, Ossadnik M, Richter H, Koch S, Sterry W, et al. 2005. Differential stripping: determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles. *J Invest Dermatol* 125: 264-9.
  80. Raber AS, Mittal A, Schaefer J, Bakowsky U, Reichrath J, Vogt T, et al. 2014. Quantification of nanoparticle uptake into hair follicles in pig ear and human forearm. *J Control Release* 179: 25-32.
  81. Mittal A, Raber AS, Schaefer UF, Weissmann S, Ebensen T, Schulze K, et al. 2013. Non-invasive delivery of nanoparticles to hair follicles: a perspective for transcutaneous immunization. *Vaccine* 31: 3442-51.
  82. Knorr F, Patzelt A, Richter H, Schanzer S, Sterry W, Lademann J 2013. Approach towards developing a novel procedure to selectively quantify topically applied substances in the hair follicles of the model tissue porcine ear skin. *Exp Dermatol* 22: 417-8.
  83. Kuchler S, Henkes D, Eckl KM, Ackermann K, Plendl J, Korting HC, et al. 2011. Hallmarks of atopic skin mimicked in vitro by means of a skin disease model based on FLG knock-down. *Altern Lab Anim* 39: 471-80.
  84. Nakano M, Kamada N, Suehiro K, Oikawa A, Shibata C, Sasahara Y, et al. 2016. Establishment of a new three-dimensional human epidermal model reconstructed from plucked hair follicle-derived keratinocytes. *Exp Dermatol*.
  85. Mangelsdorf S, Vergou T, Sterry W, Lademann J, Patzelt A 2014. Comparative study of hair follicle morphology in eight mammalian species and humans. *Skin Res Technol* 20: 147-54.
  86. Bronaugh RL, Stewart RF, Congdon ER 1982. Methods for in vitro percutaneous absorption studies. II. Animal models for human skin. *Toxicol Appl Pharmacol* 62: 481-8.
  87. Scott RC, Corrigan MA, Smith F, Mason H 1991. The influence of skin structure on permeability: an intersite and interspecies comparison with hydrophilic penetrants. *J Invest Dermatol* 96: 921-5.
  88. Jung EC, Maibach HI 2015. Animal models for percutaneous absorption. *J Appl Toxicol* 35: 1-10.
  89. Simon GA, Maibach HI 2000. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations--an overview. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 13: 229-34.
  90. Debeer S, Le Ludec JB, Kaiserlian D, Laurent P, Nicolas JF, Dubois B, et al. 2013. Comparative histology and immunohistochemistry of porcine versus human skin. *Eur J Dermatol* 23: 456-66.
  91. Rancan F, Gao Q, Graf C, Troppens S, Hadam S, Hackbarth S, et al. 2012. Skin penetration and cellular uptake of amorphous silica nanoparticles with

- variable size, surface functionalization, and colloidal stability. *ACS Nano* 6: 6829-42.
92. Labouta HI, Schneider M 2013. Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: current status and critical review. *Nanomedicine* 9: 39-54.
  93. Trauer S, Richter H, Kuntsche J, Buttemeyer R, Liebsch M, Linscheid M, et al. 2014. Influence of massage and occlusion on the ex vivo skin penetration of rigid liposomes and invasomes. *Eur J Pharm Biopharm* 86: 301-6.
  94. Lauterbach A, Muller-Goymann CC 2015. Applications and limitations of lipid nanoparticles in dermal and transdermal drug delivery via the follicular route. *Eur J Pharm Biopharm* 97: 152-63.
  95. Darvin ME, Konig K, Kellner-Hoefler M, Breunig HG, Werncke W, Meinke MC, et al. 2012. Safety assessment by multiphoton fluorescence/second harmonic generation/hyper-Rayleigh scattering tomography of ZnO nanoparticles used in cosmetic products. *Skin Pharmacol Physiol* 25: 219-26.
  96. Zhang LSW, Monteiro-Riviere NA 2013. Use of confocal microscopy for nanoparticle drug delivery through skin. *Journal of Biomedical Optics* 18.
  97. Mak WC, Patzelt A, Richter H, Renneberg R, Lai KK, Ruhl E, et al. 2012. Triggering of drug release of particles in hair follicles. *J Control Release* 160: 509-14.
  98. Mathes C, Melero A, Conrad P, Vogt T, Rigo L, Selzer D, et al. 2016. Nanocarriers for optimizing the balance between interfollicular permeation and follicular uptake of topically applied clobetasol to minimize adverse effects. *J Control Release* 223: 207-14.
  99. Lange-Asschenfeldt B, Marenbach D, Lang C, Patzelt A, Ulrich M, Maltusch A, et al. 2011. Distribution of bacteria in the epidermal layers and hair follicles of the human skin. *Skin Pharmacol Physiol* 24: 305-11.
  100. Ulmer M, Patzelt A, Vergou T, Richter H, Muller G, Kramer A, et al. 2013. In vivo investigation of the efficiency of a nanoparticle-emulsion containing polihexanide on the human skin. *Eur J Pharm Biopharm* 84: 325-9.
  101. Kumar R, Singh B, Bakshi G, Katare OP 2007. Development of liposomal systems of finasteride for topical applications: design, characterization, and in vitro evaluation. *Pharm Dev Technol* 12: 591-601.
  102. Papakostas D, Rancan F, Sterry W, Blume-Peytavi U, Vogt A 2011. Nanoparticles in dermatology. *Arch Dermatol Res* 303: 533-50.
  103. Shim J, Seok Kang H, Park WS, Han SH, Kim J, Chang IS 2004. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. *J Control Release* 97: 477-84.
  104. Tsujimoto H, Hara K, Tsukada Y, Huang CC, Kawashima Y, Arakaki M, et al. 2007. Evaluation of the permeability of hair growing ingredient encapsulated PLGA nanospheres to hair follicles and their hair growing effects. *Bioorg Med Chem Lett* 17: 4771-7.
  105. Taglietti M, Hawkins CN, Rao J 2008. Novel topical drug delivery systems and their potential use in acne vulgaris. *Skin Therapy Lett* 13: 6-8.
  106. Lawson LB, Freytag LC, Clements JD 2007. Use of nanocarriers for transdermal vaccine delivery. *Clin Pharmacol Ther* 82: 641-3.
  107. Vogt A, Mahe B, Costagliola D, Bonduelle O, Hadam S, Schaefer G, et al. 2008. Transcutaneous anti-influenza vaccination promotes both CD4 and CD8 T cell immune responses in humans. *J Immunol* 180: 1482-9.
  108. Brazel CS 2009. Magnetothermally-responsive nanomaterials: combining magnetic nanostructures and thermally-sensitive polymers for triggered drug release. *Pharm Res* 26: 644-56.

109. Huang SL 2008. Liposomes in ultrasonic drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 60: 1167-76.
110. Pissuwan D, Niidome T, Cortie MB 2011. The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems. *J Control Release* 149: 65-71.
111. Yang Y, Achazi K, Jia Y, Wei Q, Haag R, Li J 2016. Complex Assembly of Polymer Conjugated Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular pH-Responsive Drug Delivery. *Langmuir*.
112. Sahle FF, Balzus B, Gerecke C, Kleuser B, Bodmeier R 2016. Formulation and in vitro evaluation of polymeric enteric nanoparticles as dermal carriers with pH-dependent targeting potential. *Eur J Pharm Sci* 92: 98-109.
113. Rancan F, Asadian-Birjand M, Dogan S, Graf C, Cuellar L, Lommatzsch S, et al. 2016. Effects of thermoresponsivity and softness on skin penetration and cellular uptake of polyglycerol-based nanogels. *J Control Release* 228: 159-69.

**Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr.-Ing. Jürgen Lademann. Bereits als mein Doktorvater und in den letzten 12 Jahren als mein Chef und Mentor hat er jede meiner wissenschaftlichen Ideen und Arbeiten jederzeit und in allen Belangen großzügig unterstützt. Ich danke sehr für die vielen Stunden, die wir mit angeregten Diskussionen verbracht haben. Seine Ratschläge und Anregungen habe ich immer sehr gerne angenommen. Herrn Prof. Dr. med. Wolfram Sterry und Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Torsten Zuberbier danke ich für die Möglichkeit, meine wissenschaftlichen Arbeiten an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchführen und aktiv im Bereich der Lehre tätig sein zu dürfen. Ein großer Dank gilt auch den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Experimentelle und Angewandte Physiologie der Haut, die mich stets bei meinen Arbeiten unterstützt haben. Frau Heike Richter danke ich für die Herstellung von zahlreichen Kryoschnitten für die Analyse der follikulären Penetration, die vielen Auswertungen und die tolle Unterstützung bei der Herstellung der grafischen Darstellungen für die verschiedensten Veröffentlichungen. Frau Sabine Schanzer danke ich für ihre Unterstützung bei allen chemisch-technischen Fragestellungen und bei zahlreichen Experimenten. Frau Prof. Martina Meinke, Frau Dr. Gisela Thiede, Herrn Dr. Dr. Maxim Darwin, Frau Dr. Fanny Knorr und Frau Dr. Sora Jung danke ich für die zahlreichen kritischen wissenschaftlichen Diskussionen und ihre moralische Unterstützung. Bei Frau Sabine Grenz möchte ich mich für ihren Einsatz bei den sprachlichen Korrekturen von zahlreichen Veröffentlichungen und anderen wissenschaftlichen Beiträgen bedanken und bei Frau Christiane Domke für ihr Organisationstalent, alle Termine, Abgabedeadlines etc. unter Kontrolle zu behalten und die Übernahme von vielen organisatorischen Aufgaben. Mein Dank gilt ferner allen Doktoranden und Kooperationspartnern, die bei der Durchführung der Experimente eine starke Unterstützung waren. Ohne finanzielle Unterstützung wären viele der Arbeiten nicht möglich gewesen. Daher möchte ich an dieser Stelle folgenden Institutionen für ihre finanzielle Unterstützung danken: der Stiftung für Hautphysiologie des Deutschen Wissenschaftsrats, der Deutschen Fördergemeinschaft für die Förderung des Sonderforschungsbereichs SFB 1112, Teilprojekt C05, dem Deutschen Akademischen Austauschdienst.

Zuletzt möchte ich noch von Herzen meiner Familie danken. Ohne ihre großartige Unterstützung und Toleranz hätte ich diese Arbeit nicht fertig stellen können

**Erklärung**

## § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

27.10.2016

.....

Datum

.....

Unterschrift