

**Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der
Medizinischen Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin**

DISSERTATION

**Biologisch degradierbare PLA-Partikel als Träger für die
transkutane Vakzinierung und die topische Dermatotherapie**

**Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin**

**von Dimitrios Papakostas
aus Athen**

Gutachter: 1.: Prof. Dr. med. U. Blume-Peytavi
2.: Prof. Dr. R. Wagner
3.: Prof. Dr. E. Rühl

Datum der Promotion: 18.09.2009

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Einführung in die Thematik	1
1.2	Anatomie und Immunologie des Haarfollikels	1
1.3	Penetration von topisch applizierten Substanzen	4
1.3.1	Interzelluläre Penetration durch die Lipidschichten des Stratum corneum	5
1.3.2	Follikuläre Penetration und Absorption	6
1.3.3	Strategien zur Optimierung der Wirkstoffpenetration in die Haarfollikel	7
1.4	Follikuläres Targeting durch Anwendung von Mikro- und Nanopartikeln als Wirkstoffträger	8
1.4.1	Follikuläre Zielstrukturen und -zellpopulationen	8
1.4.2	Penetrationseigenschaften der Nanopartikel	9
1.4.3	Kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen aus den Nanopartikeln	11
1.5	Partikel-basierte transkutane Vakzinierung	12
1.6	Biologisch abbaubare PLA-Partikel	14
1.7	Zielsetzung	16
2.	Material und Methoden	17
2.1	Materialien	17
2.1.1	Ethikantrag	17
2.1.2	Hautproben	17
2.1.3	PLA-Partikel	17
2.1.4	Antikörper und MACS-Separation Kit	20
2.1.5	Chemikalien	20
2.1.6	Geräte	22
2.1.7	Sonstige Materialien	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Präparation der Hautproben	24
2.2.2	Kryoschnitte	25
2.2.3	Isolierung der Epidermiszellen für die FACS-Analyse	26
2.3.4	MACS-Separation	27
2.3.5	<i>In vitro</i> Inkubation der Langerhanszellen mit den Partikelsuspensionen	27

2.3.6	FACS-Analyse _____	29
2.3.7	Nile Red und Coum6 Freisetzung Kinetik und Fluoreszenzspektrophotometrie ____	31
2.3.8	Statistische Auswertung _____	35
3.	Ergebnisse _____	36
3.1	Penetration von 228 nm und 365 nm PLA-Partikeln in menschliche Vellushaarfollikel _____	36
3.2	Aufnahme der PLA-Partikel von den Langerhanszellen der Epidermis _____	39
3.2.1	Aufnahme nach intrafollikulärer Penetration _____	39
3.2.2	<i>In vitro</i> Aufnahme der PLA-Partikel durch isolierte Langerhanszellen der Epidermis _____	44
3.3	Farbstofffreisetzung aus den PLA-Partikeln _____	48
3.3.1	Untersuchung der Freisetzung von Nile Red aus PLA-Partikeln nach Kontakt mit exzidierte menschlichen Haut _____	48
3.3.2	Visualisierung des Nile Red in der Epidermis, im Follikels und in der Talgdrüse mit der Hilfe des konfokalen Laserscanmikroskops. _____	52
3.3.3	Nile Red und Coumarin6 Freisetzung <i>in vitro</i> _____	53
3.3.4	Aufnahme des freigesetzten Nile Red durch die Epidermiszellen nach transfollikulärer Penetration der PLA-Partikel _____	58
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse _____	62
4.	Diskussion _____	63
4.1	Penetration von PLA-Partikeln in menschliche Vellushaarfollikel. _____	63
4.1.1	Faktoren, die die Penetrationstiefe der Partikel beeinflussen _____	65
4.2	Aufnahme der PLA-Partikel durch Antigen-präsentierende Zellen der Epidermis _____	69
4.2.1	Penetration durch die Hautbarriere des Infundibulums _____	69
4.2.2	Untersuchung der Partikelaufnahme durch die Langerhanszellen der Epidermis <i>in vitro</i> . _____	70
4.2.3	Anwendung der PLA-Partikel als Antigen-träger für die transkutane Vakzinierung _____	71
4.3	Farbstofffreisetzung aus PLA-Partikeln _____	74
4.3.1	PLA Partikel als Wirkstoffträger für die lokale Dermatotherapie _____	81

5.	Zusammenfassung	83
6.	Literaturverzeichnis	85
	Verzeichnis der Abbildungen und der Tabellen	i
	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	iii
	Lebenslauf	v
	Danksagung	vii
	Eidesstattliche Erklärung	viii

1. Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

In den letzten Jahren hat die Rolle der Haarfollikel als Reservoir für topisch applizierte Substanzen und als Shunt für die systemische Verabreichung von Wirkstoffen an Interesse gewonnen^[1]. Anatomische Besonderheiten wie erhöhte Permeabilität der Hautbarriere im untersten Teil des Haarinfundibulums und wichtige Zielregionen wie die perifollikulären Antigen-präsentierenden Zellen (APZ), die Stammzellen der Wulstregion, die Melanozyten des Haarbulbus und die Talgdrüse gaben den Anlass zur umfangreichen Untersuchung der Penetration und der Permeation von topisch applizierten Substanzen.

Der rasante Fortschritt der Nanotechnologie ermöglichte die Herstellung von verschiedenen nano- bis mikrometergroßen Partikeln als Träger für ein breites Spektrum von Wirkstoffen. Verbesserte Penetrations- und Depoteigenschaften sowie auch ihre Funktion als Impfstoffadjuvantien untermauern ihre Rolle als potentielle Kandidaten für das gezielte Heranbringen von Wirkstoffen an bestimmte Zellpopulationen. Für die klinische Anwendung sind jedoch auch toxikologische Fragestellungen wie systemische Verteilung, Ablagerung und Ausscheidung von essentieller Bedeutung. Polylactid (PLA) ist als biologisch abbaubarer, thermoplastischer, aliphatischer, hydrophobischer Polyester besonders geeignet für die Herstellung von Nanopartikeln zur medizinischen Anwendung.

Ziel dieses Forschungsvorhabens ist die Untersuchung der transfolikullären Penetration von biologisch abbaubaren PLA-Partikeln und möglichen Anwendungen als Träger für die selektive Dermatotherapie und die transkutane Vakzinierung.

1.2 Anatomie und Immunologie des Haarfollikels

• Funktionelle Anatomie

Die ganze menschliche Hautoberfläche, mit Ausnahme der Handteller und Fußsohlen, ist behaart. Man unterscheidet zwischen Terminalhaaren, d.h. Kopfhaaren, dicken pigmentierten Bart-, Nasen-, Ohren-, Achsel- und Schamhaaren, Wimpern und Augenbrauen und Vellushaaren, welche dünn, kurz und nicht pigmentiert sind und den restlichen Körper bedecken. Zwischenformen bezeichnet man als Intermediärhaar. Die follikuloseboglanduläre Einheit besteht aus dem Haarschaft, dem Haarfollikel, der das Haar produziert und aus der Talgdrüse.

In der Talgdrüse wird Sebum produziert, zusammengesetzt aus Triglyzeriden, freien Fettsäuren, Squalenen, Wachs und freien Sterolen. Die Talgdrüsenzellen desintegrieren im Rahmen ihres

Reifungsprozesses, dadurch wird das Sebum freigesetzt. Ihr Lebenszyklus beträgt etwa 14 Tage und stellt eine kontinuierliche Sebumproduktion sicher, die bei gesunden Individuen $1 \text{ mg}/10 \text{ cm}^2$ alle drei Stunden beträgt. Der Haarschaft ist aus drei Schichten aufgebaut. Im Inneren findet sich die Medulla (Haarmark) bestehend aus dichten Schichten von polyedrischen Zellen. Vellushaare besitzen kein Haarmark. Der Kortex (Rinde) besteht aus Keratinfibrillen in dicht gepackten spindelförmigen Zellen und aus der Cuticula, bestehend aus flachen übereinander greifenden, keratinisierten Zellen.

Der Haarfollikel besteht aus einem konstanten distalen (oberen) und einem ständig umbaubaren proximalen (unteren) Teil, wo die Produktion des Haarschaftes während der Anagenphase (2 - 6 Jahre) stattfindet. Während der Katagenphase (zwei Wochen) kommt es zu einer Apoptose-induzierten Regression des Haarfollikelepithels. In der anschließenden Telogenphase (3 - 5 Monate) ist die Keratinbildung eingestellt.

Schematisch lässt sich der Haarfollikel unterteilen in Infundibulum (vom Follikelostium bis zum Ausführungsgang der Talgdrüse), Isthmus (unter dem Ausführungsgang der Talgdrüse bis zur Wulstregion), Wulstregion (Reservoir der follikulären Stammzellen), suprabulbäre Region (zwischen Bulbus und Wulst) und Haarbulbus (Wurzel des Follikels und Ort der Haarproduktion) (Abb. 1).

Die Länge des menschlichen Terminalhaarfollikels (behaarte Kopfhaut) beträgt $3864 \pm 605 \mu\text{m}$, des Infundibulums $580 \pm 84 \mu\text{m}$ und der Durchmesser des Infundibulums $172 \pm 70 \mu\text{m}$ auf der Höhe der Hautoberfläche. Der Vellushaarfollikel (retroaurikuläre Region) ist viel kleiner und die entsprechenden Größen betragen $646 \pm 140 \mu\text{m}$, $225 \pm 34 \mu\text{m}$ und $86 \pm 37 \mu\text{m}$ ^[2]. Des Weiteren zeigen sich wesentliche Unterschiede in der Dichte der Vellushaare an den verschiedenen Körperregionen, welche von einem Maximum von 292 Follikeln pro cm^2 an der Stirn bis zu einem Minimum von 14 Follikeln pro cm^2 an der Wade reicht^[3].

Von außen nach innen zeigt sich eine Gliederung des Haarfollikels in die folgenden Schichten (Abb. 1): Zunächst besteht die bindegewebige Wurzelscheide (CTS) aus einer äußeren Langfaserschicht und einer inneren Ringfaserschicht. Dann folgen eine deutliche Basalmembran, die Glashaut und die äußere Wurzelscheide (ORS). Diese innere Wurzelscheide ist von außen nach innen aus der Henleschen Schicht, der Huxleyschen Schicht und der Scheidencuticula aufgebaut. Die innere Wurzelscheide endet auf der Höhe des Talgdrüsenausführungsganges, während die äußere Wurzelscheide an die Epidermis angrenzt. Das Haarfollikelepithel folgt einem anderen Differenzierungsmuster als die interfollikuläre Epidermis und differenziert trichilemmal ohne Ausbildung eines Stratum granulosum. Neben ihrer Rolle als Stammzellen-

Reservoir fungiert die äußere Wurzelscheide auch als Energie-Speicher (Glukogen) und Transitweg für Nährstoffe und Sauerstoff.

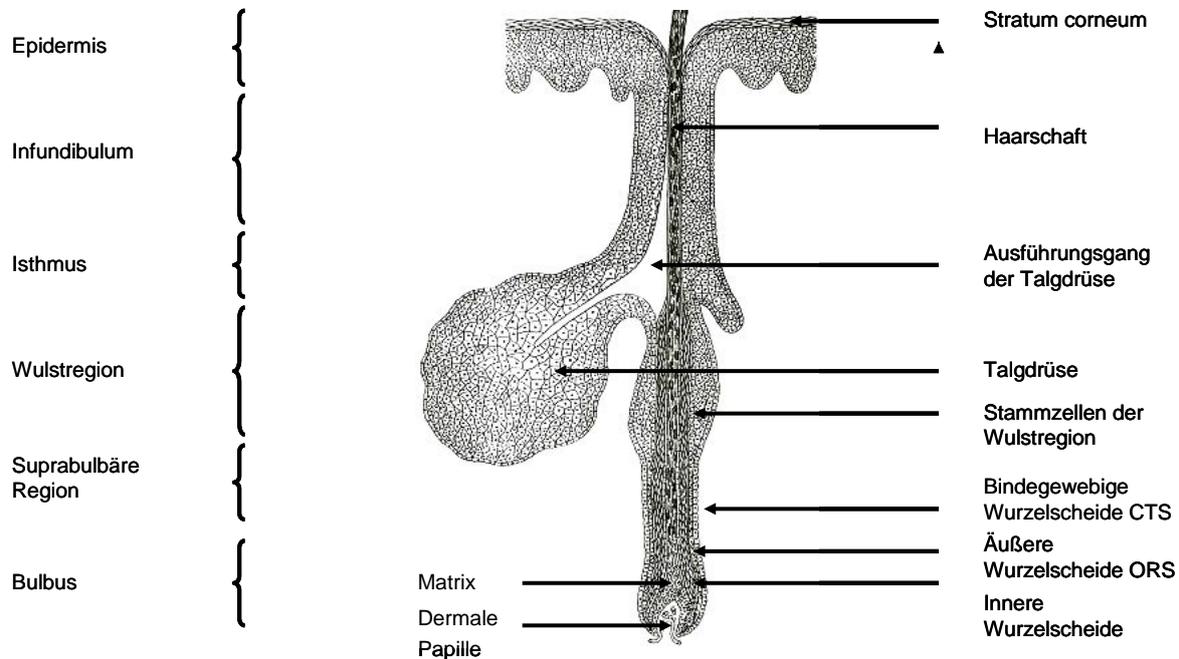


Abb. 1: Schematische Darstellung des Vellushaarfollikels

In der Wulstregion der äußeren Wurzelscheide befinden sich epitheliale Stammzellen, die als ein Reservoir für die zyklische Regenerierung des Follikels fungieren. In der Anagenphase wandern von hier die Nachfolgerzellen dieser epithelialen Stammzellen zum Haarbulbus, wo es durch Zellproliferation und Differenzierung zu Trichozyten des Haarschaftes und der inneren Wurzelscheide kommt^[4,5]. Zudem sind die epithelialen Stammzellen in der Lage nach inflammatorischer Stimulation, wie z.B. nach Verbrennungen, die Epidermis und die Talgdrüsen zu regenerieren^[6]. Ebenso in der Wulstregion befinden sich melanozytäre Stammzellen, die als Zellreservoir für die Melanozyten der Haarmatrix fungieren^[7]. Des Weiteren befinden sich in der bindegewebigen Wurzelscheide mesenchymale Stammzellen, die sich *in vitro* und *in vivo* zu Mastzellen^[8], Fibroblasten, Lipozyten, Chondrozyten, blutbildenden und neuronalen Vorläuferzellen differenzieren können^[9].

An der Basis des Follikels findet sich eine kolbige Auftreibung, der Haarbulbus, bestehend aus der dermalen Papille und der Haarmatrix. Die dermale Papille ist eine bindegewebige Ausstülpung der Dermis in den Haarfollikel mit Blutgefäßen, Nervenfasern und Fibroblasten. Es

findet eine zyklusabhängige Wanderung von Fibroblasten zwischen dermalen Papille und bindegewebiger Wurzelscheide statt. Das Volumen der dermalen Papille beeinflusst die Größe des Haarbulbus und dadurch den Durchmesser des Haarschaftes. In der Matrix befinden sich Melanozyten und die Matrixzellen aus denen sich die Trichozyten, die den Haarschaft und die innere Wurzelscheide bilden, differenzieren^[10].

- **Immunologie des Haarfollikels**

Obwohl der follikuläre Kanal eine der wichtigsten Eintrittspforten des Organismus für pathogene Mikroorganismen ist, kommt es bei immunkompetenten Erwachsenen nur selten zu Infektionen. Grund dafür ist das differenzierte Immunsystem des Haarfollikels mit verschiedenen Immunzellen, wie Langerhanszellen (LHZ), Makrophagen, Mastzellen und ganz selten auch B- und T-Lymphozyten und NK-Zellen. Die größte Dichte von Langerhanszellen zeigt sich in der basalen Schicht der Epidermis und in der äußeren Wurzelscheide (ORS) des oberen Infundibulums. Mit zunehmendem Abstand von der Follikelöffnung nimmt die Anzahl der LHZ ab, sodass sich unterhalb der Wulstregion nur unbedeutende Zahlen von Langerhanszellen befinden. Diese Tatsache ergibt das Immunprivileg des proximalen Haarfollikels, dessen Kollaps von größter Bedeutung für den Pathomechanismus der Autoimmunkrankheiten des Haarfollikels ist^[11].

1.3 Penetration von topisch applizierten Substanzen

Generell sind drei verschiedene Wege für die Penetration von topisch applizierten Substanzen durch die Hautbarriere denkbar, die interzelluläre Penetration zwischen den Korneozyten und durch die Lipide des Stratum corneum, die transzelluläre Penetration durch die Korneozyten und die transfollikuläre Penetration (Abb.2).

Die Diffusion durch die Lipidschichten des Stratum corneum wurde bis vor kurzem als der wichtigste, wenn nicht der einzige Weg, der transkutanen Penetration von topisch applizierten Substanzen betrachtet^[12].

Die transzelluläre Penetration gilt als unwahrscheinlich, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, weil verschiedene Forschergruppen verschiedene topische applizierte Substanzen in den Korneozyten nachgewiesen haben. Ein weithin anerkanntes *in vitro* Modell deutet jedoch auf eine besondere Rolle der Lipidschichten des Stratum corneum hin. In der Tat ist der Diffusionsweg vom Wasser im Stratum corneum 50 mal länger als die eigentliche Dicke dieser Hautschicht, so dass man vermuten könnte, dass die Korneozyten eine limitierende Rolle bei der

Penetration spielen. Das würde heißen, dass die Penetration einem gewundenen Weg durch die interzellulären Lipidschichten folgt^[13].

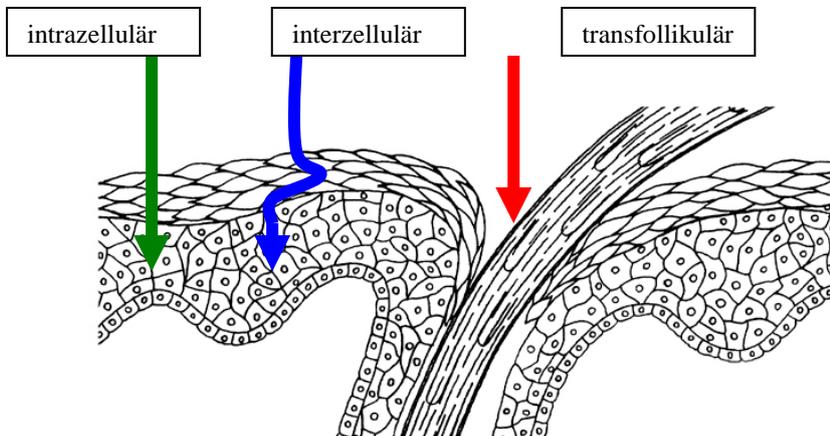


Abb. 2: Transkutane Penetration

Interzellulärer, transzellulärer und follikulärer Penetrationsweg

Der dritte denkbare Penetrationsweg, der in den vergangenen Jahren zunehmende Bedeutung erlangt hat, ist der transfollikuläre Weg. Da aber die Haarfollikel nur 0,1% der Hautoberfläche ausmachen, wurde ihre Rolle bislang unterschätzt^[14]. Eine Reihe von wissenschaftlichen Beobachtungen hat jedoch in den letzten Jahren eindeutig gezeigt, dass die Haarfollikel ein wichtiger und viel versprechender Penetrationsweg sind und das Infundibulum die Hautoberfläche signifikant vergrößert^[1].

1.3.1 Interzelluläre Penetration durch die Lipidschichten des Stratum corneum

Das Stratum corneum bildet eine potente Hautbarriere, die den Körper vor Mikroorganismen und toxischen Substanzen schützt und den Verlust von Flüssigkeit und Elektrolyten verhindert. Es ähnelt einer Wand aus Ziegel und Mörtel, die Ziegel entsprechen den Korneozyten und der Mörtel den hydrophoben extrazellulären Lipiden, die sich in lamellären Doppelschichten organisieren. Nicht nur diese doppelschichtige Organisation der Lipide, sondern auch ihre extreme Hydrophobizität, und das Auftreten von drei verschiedenen Sorten, Ceramide, Cholesterol und freie Fettsäure, in einer molaren Ratio (1:1:1) verstärken die Barrierefunktion des Stratum corneum. Das hat als Konsequenz, dass nur lipophile und kleinmolekulare Substanzen diese Hautbarriere penetrieren können.

Aus diesem Grund sind verschiedene Strategien entwickelt worden, um die Penetration von topisch applizierten Substanzen zu verbessern. Dies wäre nicht nur für die lokale Dermatotherapie, sondern auch für die systemische Verabreichung von Medikamenten und für die Entwicklung von neuen Vakzinierungstherapien von essentieller Bedeutung. Dementsprechend wurden neben bekannten Methoden wie der Hautokklusion und der Anwendung von Lösungsmitteln, neue Methoden wie Iontophorese, Elektroporation, Sonophorese, photomechanische Wellen, Tape Stripping, und schließlich die metabolische Veränderung des Lipidprofils entwickelt^[15].

Diese Untersuchungen zeigten, dass die Integrität des Stratum corneum essentiell für die Erfüllung seiner Rolle als Hautbarriere ist und dass Unterbrechungen dieser Barriere, wie z.B. der Haarfollikel, eine wichtige Rolle für die Penetration spielen^[16].

1.3.2 Follikuläre Penetration und Absorption

Experimente an Mäusen lieferten die ersten Hinweise auf die Funktion des Haarfollikels als ein wichtiger Shunt für die Penetration und systemische Aufnahme von topisch applizierten Substanzen. In der Tat ist die Haut von neugeborenen Ratten, die über keine Follikel verfügt, viel weniger permeabel als die Haut von 5 Tage alten Ratten, bei denen sich die ersten Haarfollikel schon gebildet haben^[17]. Hueber et al (1994) und Tenjarla et al (1999) zeigten, dass die Permeation von Kortikosteroiden in unbehaarter Haut viel geringer ist als in der behaarten^[18,19] und Michel et al (1999) konnten nachweisen, dass das künstliche Einsetzen von Haarfollikeln in rekonstruiertes Hautgewebe die Permeationsrate von Hydrocortison deutlich erhöhte^[20]. Otberg et al (2004) legten dar, dass das follikuläre Reservoir dem des Stratum corneum in verschiedenen Körperstellen vergleichbar ist^[3].

Die Penetration topisch applizierter Substanzen kann jedoch nicht durch alle Haarfollikel erfolgen. Lademann et al. postulierten das Konzept der „offenen und geschlossenen“ Haarfollikel als auch der „aktiven und inaktiven“^[21]. Sie könnten zeigen, dass Penetration nur durch offene, aktive Haarfollikel möglich ist. Zwei Voraussetzungen müssen erfüllt sein, um einen Follikel als aktiv zu beschreiben, nämlich die Sebumproduktion und/oder das Haarwachstum. Bei inaktiven, ruhenden Haarfollikeln kommt es zur Bildung eines Deckels aus Talgbestandteilen, abgestoßenen Korneozyten, keratinisiertem Material und Bakterien, der zu einem Follikelverschluss führt. Deswegen bleibt der Follikel für die Penetration „geschlossen“^[12,22]. Mit der Hilfe des Cyanoacrylate Skin Surface Stripping (CSSS) werden dieser Deckel sowie auch 30% des Stratum corneum entfernt (unpublizierte Daten von Vogt (2008)), so dass alle Follikel für die Penetration „offen“ zur Verfügung stehen können^[12].

1.3.3 Strategien zur Optimierung der Wirkstoffpenetration in die Haarfollikel

Es gibt in der Literatur ausreichend Hinweise dafür, dass die Penetration und die Lieferung von Wirkstoffen in den Haarfollikel mit Hilfe von verschiedenen Methoden optimiert werden kann. Dazu gehören die Methode der Iontophorese, die Anwendung von Penetrationsverbessern wie Ethanol und von partikulären Trägersystemen wie die Liposomen und die polymerischen Nano/Mikropartikel.

- Die Anwendung von Ethanol könnte zur Verbesserung der Penetration führen, indem das Sebum im Infundibulum gelöst und entfernt wird^[23]. Mit Hilfe der Iontophorese (Niedrige elektrische Ströme, produziert von einer externen Elektrode mit derselben Ladung wie der Wirkstoff) werden Kanäle im Follikel geöffnet^[24].
- Außer den oben genannten physikalischen Methoden hat die Verwendung von verschiedenen Trägersystemen eine große Bedeutung. In den letzten Jahren sind viele verschiedene Arten von Wirkstoffträgern, Antigenträgern und Vakzinadjuvantien entwickelt worden. Besonders Liposomen und Partikel unterschiedlicher Größen sind für das Einbringen von Substanzen in Haarfollikel und für die lokale Dermatotherapie angewendet worden.

Liposomen sind vesikuläre Strukturen bestehend aus einer Doppelschicht von Phospholipiden und einem hydrophilen Kern. Hydrophile und lipophile Substanzen können im Kern oder in der Membran entsprechend integriert werden. Wirkstoffbeladene Liposomen können tiefer als der Wirkstoff allein in den Haarfollikel penetrieren^[25]. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass mit dem Antiandrogen RU 58841 beladene Liposomen vor allem in den Talgdrüsen lokalisiert wurden^[26]. Diese Beobachtung war ein wichtiger Hinweis darauf, dass Liposomen potentiell auch für ein follikuläres Targeting angewendet werden können.

ISCOMS sind Matrixkonstrukte zusammengesetzt aus Saponin, Cholesterol, Phospholipiden und Antigen. Ihre Größe ist vergleichbar mit Viren. Sie haben die Liposomen mittlerweile wegen ihrer erhöhten Stabilität als Antigenträger für Vakzine ersetzt^[27].

Virosomen sind hybridische Komplexe von Liposomen und viralen Proteinen. Diese viralen Proteine wirken stabilisierend auf die Liposomen und weisen zusätzlich auch eine adjuvante Wirkung auf. Virosomen wie auch VLP's (Virus like particles) werden als Trägersysteme für Vakzine angewendet. VLP's sind hochorganisierte Sphären, die aus strukturellen Antigenen viraler Herkunft gentechnologisch hergestellt werden. Sie wurden bereits erfolgreich in der Herstellung von Vakzinen gegen HBV und HPV angewendet^[28].

SLN (Solid Lipid Nanoparticles) sind solide aus Lipiden Nanopartikel hergestellte und werden als Wirkstoffträger oder Antigenträger angewendet. Sie weisen mehrere Vorteile, unter anderen eine hohe Stabilität, leichter Herstellung und Schutz der eingekapselten Wirkstoffe auf^[29].

Solide Mikro- und Nanopartikel sind kolloidale, meist sphärische Strukturen; Polymer-Partikel sind neben Metall- (Gold) und Keramikpartikel (Silika) die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe. Beliebige Wirkstoffe können in ihrem Kern eingekapselt oder an der Hülle absorbiert werden. Diese Anwendung der Nanopartikel als Wirkstoffträger weist mehrere Vorteile auf: Vermeidung der Degradation des Wirkstoffes, erniedrigte systemische Toxizität, Targeting von bestimmten Zellpopulationen und kontrollierte Freisetzung des Wirkstoffes, Adjuvantwirkung für Vakzine, Transport von hydrophilen Substanzen in lipophiler Umgebung^[30]. Bezüglich der exakten Definition der Nanopartikel anhand ihrer Größe gibt es noch keine weltweit akzeptierte Definition. Die britische Institution für Standardisierung (British Standards Institution) definiert jedoch Nanopartikel als die Partikel deren Größe ≤ 100 nm beträgt^[31].

1.4 Follikuläres Targeting durch Anwendung von Mikro- und Nanopartikeln als Wirkstoffträger

Es ist sehr wichtig zwischen zwei verschiedenen therapeutischen Anwendungen der transfollikulären Penetration zu unterscheiden, die Rolle des Follikels als Reservoir und Shunt für die systemische Aufnahme von topisch applizierten Substanzen und das Targeting von follikulären Strukturen oder Zellpopulationen.

1.4.1 Follikuläre Zielstrukturen und -zellpopulationen

Das Infundibulum mit seinen Langerhanszellen, die Talgdrüse, die Wulstregion mit ihren Stammzellen und der Haarbulbus mit den Melanozyten, den Matrixzellen und der dermalen Papille stellen wichtige Strukturen innerhalb des Haarfollikels dar.

- Das Epithel des Infundibulums ist der Sitz einer bedeutenden Population von LHZ, die vergleichbar mit der der basalen Schicht der Epidermis ist^[11].
- Die Talgdrüse spielt eine wichtige Rolle in der Lipidsynthese, u.a. auch in der Pathogenese von weit verbreiteten Hautkrankheiten wie der Akne vulgaris. Ziel jeder Aknetherapie ist die Maximierung der Akkumulation der therapeutischen Substanzen in der Talgdrüse.
- In der Wulstregion befinden sich epitheliale, mesenchymale und melanozytäre Stammzellen, deren Manipulation nicht nur das Wachstum des Haarfollikels und die Pigmentierung des Haares, sondern auch die Regeneration der Epidermis beeinflussen (Par. 1.2).

Die Folgen für die Behandlung der Alopezie, der Hypertrichose, der Canities sowie auch für die Behandlung von verschiedenen Hautkrankheiten sind leicht zu erwägen. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass Stammzellen von der Wulstregion für die Neoangiogenese bei Hauttumoren verantwortlich sind^[32].

- Im Haarbulbus sitzen Matrixzellen und Melanozyten. Haarpigmentierung und Wachstum können durch ihre Manipulation für kosmetische Gründe manipuliert werden.

Diese verschiedenen Zielstrukturen und Zellpopulationen sitzen in unterschiedlicher Tiefe im Haarfollikel. Mit der Anwendung von Polymer-Partikeln unterschiedlicher Größe als Wirkstoffträger kann man die Penetrationstiefe beeinflussen und dadurch die erwünschten Zellpopulationen gezielt erreichen^[33]. Dieser Prozess wird als *passives Targeting* bezeichnet. In der Tat zeigte sich eine größenabhängige maximale Penetrationstiefe der untersuchten Polystyrenpartikel (PS-Partikel) in menschlichen Terminalhaarfollikeln, $0,75\mu\text{m} > 1,5\mu\text{m} > 3\mu\text{m} > 6\mu\text{m}$. Ebenso zeigten Vogt et al (2006), dass in menschlichen Vellushaarfollikeln 40 nm PS-Partikel tiefer als 750 nm oder 1500 nm penetrieren^[34].

Des Weiteren kann auch ein *aktives Targeting* verschiedener Zellpopulationen angestrebt werden. Die Partikeloberfläche wird durch das Hinzufügen von Liganden modifiziert. Die Liganden ermöglichen das Anbinden an spezifischen Zellrezeptoren, so dass eine bestimmte Zellpopulation bevorzugt von der entsprechenden Partikelart erreicht wird^[35].

1.4.2 Penetrationseigenschaften der Nanopartikel

Die Anwendung von Nanopartikeln als Träger kann die Penetrationstiefe und die Permeationsrate von topisch applizierten Substanzen in Haarfollikel beträchtlich vergrößern. Frühe Untersuchungen von Rolland et al (1993) zeigten, dass die Anwendung von $5\mu\text{m}$ Poly (lactid-co-glycolid)-Partikeln (PLGA-Partikel) als Träger die Permeation von Adapalen im Vergleich zu nicht partikulären Formulierungen verstärken^[36]. Das hat als Folge, dass viel kleinere Konzentrationen des Wirkstoffes für dasselbe therapeutische Ergebnis benötigt werden. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Shim et al (2004) mit der Anwendung von P(CL)-polyethylenglykol Nanopartikeln (40-130 nm) als Träger für Minoxidil^[37].

Lademann et al (2006) zeigten, dass farbstoffbeladene Nanopartikel (300 - 400 nm) tiefer in den Haarfollikel penetrieren als der Farbstoff allein^[38]. Dieses Ergebnis bestätigte die Beobachtungen von Mordon et al (2003) und Alvarez-Roman et al (2004a)^[39,40].

Um die verstärkte Penetration der partikulären Formulierungen zu interpretieren schlugen Lademann et al (2006) einen Pumpmechanismus vor, mit dessen Hilfe Nanopartikel vergleichbarer Größe zu der Dicke der Keratinonzyten der Cuticula des Haarschaftes (500 und

800 nm) tiefer getrieben werden^[38]. Für die verstärkte Penetration kleinerer (20 - 40 nm) oder größerer (1,5 - 5 µm) Partikel müssen jedoch andere Mechanismen zuständig sein.

Verschiedene Studien weisen daraufhin, dass elastische Nanopartikel, im Gegensatz zu rigiden, durch das intakte Stratum corneum in die lebendige Epidermis penetrieren können^[41,42]. Baroli et al (2007) berichten über die Penetration von metallischen 10 nm Nanopartikeln durch die Hautbarriere bis zum Stratum granulosum und in das folliculäre Epithel^[43]. Die Penetration von Nanopartikeln durch die intakte Barriere des Stratum corneum oder durch die Barriere des unteren Infundibulums, obwohl die letzte als relativ permeabel gilt, wird jedoch von vielen Autoren bezweifelt^[1]. In der Tat zeigten Lekki et al 2007, dass 17 nm Titaniumdioxid-Partikel sich nur im Haarfollikel (Schweinohrmodel und menschliche VHF) und nicht in dem folliculären Epithel nachweisen lassen^[44], ein Ergebnis das mit den Beobachtungen von Lademann et al (1999) zur Penetration von 17 nm Titaniumdioxid-Partikeln in menschliche VHF übereinstimmt^[45].

Vogt et al (2006) zeigten jedoch, dass nach der Durchführung eines CSSS, welches eine milde Barriestörung induziert und Haarfollikel für die Penetration künstlich öffnet, 40 nm PS-Partikel, im Gegensatz zu 750 und 1500 nm PS-Partikeln, tiefer in das Infundibulum penetrieren können und das Haarfollikelepithel durchdringen können. In der Tat ließen sich die 40 nm PS-Partikel fluoreszenzmikroskopisch nicht nur im folliculären Kanal sondern auch im folliculären Epithel nachweisen. Eine Penetration durch die interfollikuläre Epidermis wurde nicht beobachtet. Als weiterer Hinweis auf die Fähigkeit der 40 nm PS-Partikel in das folliculäre Epithel zu penetrieren konnten LHZ aus Hautproben isoliert werden, die Nanopartikel internalisiert hatten. Der Nachweis ihrer Aufnahme erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie^[34].

Aus unpublizierten Daten (2008) derselben Arbeitsgruppe ist bekannt, dass 200 nm PS-Partikel nach intrafollikulärer Penetration ebenso in das folliculäre Epithel penetrieren und von den LHZ aufgenommen werden, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß. Dieser Unterschied bei dem Ausmaß der Partikelaufnahme könnte sich durch die Größenunterschiede zwischen den Partikeln erklären. Die Tatsache, dass alle drei Forschergruppen keine transepidermale Penetration durch das Stratum corneum in die lebendige Schicht der Epidermis beobachteten, verstärkt die mögliche Bedeutung von CSSS oder anderen Maßnahmen zur Barriestörung und erleichterten folliculären Penetration für das Heranbringen von Nanopartikeln an Zielzellen, z.B. APZ im Rahmen von transkutaner Vakzinierung^[46].

1.4.3 Kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen aus den Nanopartikeln

Ein weiterer Vorteil der Nanopartikel ist ihre Anwendung als Depot für die kontrollierte Freisetzung des Wirkstoffes in einem entsprechenden Zeitraum. Eine solche verzögerte Freisetzung könnte die Effizienz aktueller Therapien erhöhen, da Schwankungen des Medikamentenspiegels, Über- oder Unterdosierung, sowie häufige Medikamentengaben vermieden und dadurch eine bessere Compliance der Patienten erzielt werden könnten. Außer ihrer Anwendung als Depot bei der systemischen Verabreichung von Medikamenten wird auch ihre Anwendung bei der lokalen Dermatotherapie untersucht.

Nach Applikation auf die Hautoberfläche penetrieren die Nanopartikel in die Haarfollikel, in deren Reservoir sie ca. 10-mal länger (um die 10 Tage) im Vergleich zu dem Reservoir des Stratum corneums aufbewahrt werden^[47]. Farbstoffbeladene (Methylenblau) poröse Nylon-Mikropartikel penetrieren in die Haarfollikel bis zu einer Tiefe von 400 μm . Dort wirken sie als Depot für die Freisetzung des Farbstoffes, der noch tiefer in die Haarfollikel (600 μm) und in die Talgdrüsen diffundieren kann^[40]. Das ist von größter Bedeutung für die Therapie von Talgdrüsenkrankheiten.

Die Mechanismen der Freisetzung von enkapsulierten Wirkstoffen aus Nanopartikeln ist bisher hauptsächlich *in vitro* in wässriger Lösung untersucht worden. Dementsprechend sind bisher zwei verschiedene Mechanismen beschrieben worden: die Diffusion und die Erosion/Degradierung des Polymers. Die Diffusion kann supramolekular durch Poren der Nanopartikel^[48] oder auf molekularer Ebene zwischen den Polymerketten stattfinden^[49]. Der hydrolytische Abbau der Polymerketten führt zur Degradierung der Nanopartikel und schließlich zur Gewichtsabnahme der Polymerketten. Der Degradierung des Polymers geht eine Phase mit Erhaltung der Masse voraus, die als Erosion bekannt ist. Die Erosion kann entweder in der Oberfläche oder im Inneren der Nanopartikel stattfinden^[50], führt zur Volumenzunahme und ist von dem Typ und der Struktur der Partikel abhängig. Es wurde die Hypothese formuliert, dass die Freisetzung des Wirkstoffes von den Nanopartikeln das Ergebnis der Wechselwirkung beider Mechanismen ist^[51].

Das größte Problem bei der Entwicklung von Nanopartikeln als Träger für die kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen ist das so genannte „burst release“, d.h. die Freisetzung von mehr als 60% des enkapsulierten Wirkstoffes wegen der Kinetik ersten Grades (first order kinetics: $r = k[A]$, r ist die Freisetzungsrate des Wirkstoffes, A ist die Konzentration in den Nanopartikeln und k eine Konstante). Diese initiale Freisetzung des Wirkstoffes lässt sich durch eine schnelle Diffusion durch die Poren der Partikel erklären^[52]. Für eine kontrollierte Freisetzung des Wirkstoffes ist jedoch eine null-Grad Kinetik erwünscht ($r = k$) bei der die Freisetzung konstant

ist. Verschiedene Methoden sind entwickelt worden, um dieses Ziel zu realisieren. Zu denen gehören die Entwicklung von hybriden Partikeln (z.B. Silika und PLGA)^[53], die Vernetzung der Polymerketten (crosslink)^[54], und die Herstellung von Kern-Mantel Nanopartikeln (core-shell, Beschichtung eines Polymerkernes mit einem anderen Polymer)^[55].

Vor kurzem berichteten Chen et al (2008) über einen möglichen Abbau der Polymer-Nanopartikel im Blut eines Tiermodells und über eine schnelle Freisetzung hydrophobischer Moleküle von pegylierten PLA-Partikeln. Zirkulierende α - und β -Globuline und dadurch die Diffusion der hydrophobischen Wirkstoffe zu den zahlreichen Lipidträgern des Blutes, gelten als wichtigster Faktor für den Abbau der Partikel^[56]. Dieser schnelle Abbau der Nanopartikel im Blut *in vivo* unterscheidet sich wesentlich von der langsameren hydrolytischen Degradierung der Polymerketten und ist vermutlich Folge einer schnellen Denaturierung der Partikel.

Die Untersuchung der Mechanismen der Wirkstofffreisetzung im menschlichen Haarfollikel ist bis jetzt nicht erfolgt, obwohl verschiedene Forschergruppen eine Farbstofffreisetzung von Poly(ϵ -caprolakton) (P(CL)) und Nylonpartikeln beobachtet haben^[39,57,40]. Dementsprechend wurde im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit die Freisetzung von enkapsulierten Farbstoffen aus biologisch abbaubaren PLA-Partikeln in Vellushaarfollikeln exzidiierter menschlicher Haut untersucht. Die Beobachtungen an menschlicher Haut wurden *in vitro* in verschiedenen lipophilen Umgebungsmedien nachvollzogen und mechanistisch untersucht.

1.5 Partikel-basierte transkutane Vakzinierung

• Vorteile der transkutanen Vakzinierung

Eine Reihe von Impfstoffen und Impfstoffträgern ist in den letzten Jahrzehnten für die Prävention von infektiösen Krankheiten entwickelt worden. Sie weisen gemeinsame Merkmale, wie die intramuskuläre Gabe, die Anwendung von lebendigen, abgeschwächten, toten oder fragmentierten Pathogenen und das Hervorrufen von potenten humoralen Immunantworten auf^[58]. Die Behandlung von chronischen infektiösen Krankheiten mit intrazellulär persistierendem Pathogen und von Tumoren verlangt jedoch eine starke zelluläre Immunantwort. Derartige Antworten können derzeit nur unter Verwendung von lebendigen, abgeschwächten Viren (z.B. Masern und Rubella Vakzine) induziert werden, was nicht ohne Risiken für die Patienten ist. Deswegen wird die Entwicklung neuer innovativer Vakzinierungsstrategien, darunter die transkutane Vakzinierung, im Zentrum des allgemeinen Interesses auf diesem Gebiet stehen.

Im Gegensatz zu den Muskeln besitzt das Haarinfundibulum eine große Anzahl von APZ, darunter LHZ, die im unteren Infundibulum wegen der erhöhten Permeabilität der Hautbarriere leicht erreichbar sind^[59]. Ein weiterer Vorteil ist die Eigenschaft der LHZ exogene partikuläre und Zell-assoziierte Antigene nach intrazellulären Bearbeitung assoziiert mit MHC-I Molekülen zu exprimieren und dadurch zytotoxische CD8+ T-Lymphozyten zu aktivieren. In der Tat konnten Vogt et al (2008) nachweisen, dass nach einem CSSS und nach transkutaner Vakzinierung mit einem Protein-basierten Influenzaimpfstoff eine zelluläre Immunantwort, insbesondere zytotoxische CD8+ T-Zellen induziert wurden. Nach der intramuskulären Vakzinierung der Kontrollgruppe zeigten sich im Gegenteil nur Antigen-spezifische CD4+ Zellen, nicht aber CD8+ T-Zellen. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass CSSS auch eine Reifung von LHZ induzieren kann. Zu den möglichen immunstimulierenden Effekten, möglicherweise als Folge der Barrierefunktionsstörung, zählen vor allem auch erhöhte Werte von IL-8 im Serum der Probanden^[46]. Takeuchi et al (2003) haben gezeigt, dass nach minimalen Traumata eine erhöhte Expression der IL-8 und E-Selectin Gene erfolgt^[60]. In anderen Worten könnte CSSS nicht nur die Penetration der applizierten Substanzen durch Eröffnung der Haarfollikel fördern, sondern auch eine zunächst lokale Aktivierung des Immunsystems hervorrufen.

- **Nanopartikel als Träger für die Entwicklung neuer Vakzinierungsstrategien**

Obwohl die Herstellung von Peptiden und rekombinanten Proteinen heutzutage eher einfach ist, bleibt die Immunogenität in jedem einzelnen Fall zu prüfen^[61]. Die Verwendung von Adjuvantien ist häufig erforderlich. Hierzu gehören Salze des Aluminiums und Kalziums, Emulsionen, Saponine, Polymertenside und Lipopolysaccharid-Abkömmlinge. Nanopartikel weisen auch eine Adjuvantwirkung auf und können die Immunantwort nicht nur verstärken sondern auch modulieren. Antigene können an Nanopartikeln adsorbiert oder eingekapselt werden. Durch den Depoteffekt kommt es zu einer verlängerten Freisetzung des Antigens. Des Weiteren fördern sie die Aufnahme des Antigens durch die APZ und seine Präsentation zu den T-Lymphozyten. Dabei spielt ihre partikuläre Natur eine wichtige Rolle, weil Partikel vom Immunsystem als fremd identifiziert werden^[62]. Nanopartikel sind auch in der Lage, die Art der Immunantwort zu beeinflussen. Die Rolle der Partikelgröße und der physikalischen und chemischen Eigenschaften sind hierbei bedeutend. Nanopartikel (200-600 nm) rufen eine stärkere zelluläre und Mikropartikel (2-8 µm) eine stärkere humorale Immunantwort hervor^[63]. Mottram et al (2007) berichten von IFN-γ Produktion nach Aufnahme von 40-49 nm Nanopartikeln und von erhöhter IL-4 und CD4+ Aktivierung nach Aufnahme von 123 nm Nanopartikeln^[64]. Die

Größe der Partikel könnte auch Ihre Aufnahme durch die APZ beeinflussen. Mikropartikel, im Gegensatz zu Nanopartikeln, werden von APZ nicht aufgenommen sondern binden sich auf die Oberfläche der APZ an und rufen durch Antigenfreisetzung eine starke humorale Immunantwort hervor^[63]. Die Arbeit von Foged et al 2005 deutete auf eine optimale Aufnahme von Partikeln \leq 500 nm hin^[65]. Die positive Ladung der Partikeloberfläche kann auch die Aufnahme beeinflussen, indem positiv geladene Nanopartikel auch >500 nm aufgenommen werden können. Des Weiteren können die sauren oder basischen Eigenschaften der Partikel die Richtung der Immunantwort durch die Erhöhung oder Erniedrigung des pH der Endosomen beeinflussen und dementsprechend die MHC-II oder MHC-I Präsentation begünstigen^[66,30]. Wichtig zu erwähnen ist, dass auch die Antigenmenge und -struktur die Art der Immunantwort beeinflussen, indem kleine Dosen und geordnete, sich wiederholende Strukturen eher eine humorale Immunantwort hervorrufen^[67,68]. Schließlich kann die Einfügung von PAMP's (pathogen associated molecular patterns) wie CpG (Zytosin- Guanin Dinukleotide bakterieller Herkunft) durch das Anbinden an TLR (Toll like Receptors) der APZ die Adjuvantwirkung der Nanopartikel bei der Aktivierung der APZ weiter verstärken^[69].

1.6 Biologisch abbaubare PLA-Partikel

Nicht degradierbare Latex-, Silika-, Gold- und Polystyrenpartikel sind bereits als effiziente Antigenträger benutzt worden. Da sie von dem Organismus nicht abgebaut werden können, besteht immer die Gefahr der Toxizität und der Akkumulation, was ihre therapeutischen Anwendungen beschränkt^[58]. Wegen dieser Hindernisse wurden neue, biologisch abbaubare Polymerpartikel entwickelt. Hierzu gehört PLA, ein aliphatischer Ester der Milchsäure, der im Körper hydrolytisch abgebaut wird. Die dadurch entstandenen Milchsäuremonomere werden durch den Zitratzyklus metabolisiert und vom Körper entfernt^[70].

Verschiedene Forschergruppen konnten starke humorale und zelluläre Immunantworten nach intramuskulärer Vakzinierung mit eingekapselter Plasmid DNA^[71] und subkutaner Vakzinierung mit adsorbiertem HIV-1 p24 Protein in PLA-Partikeln nachweisen^[72]. Ein Nachteil des Einkapselns des Antigens in den Nanopartikeln ist die mögliche Degradierung während dem Einbauprozesses^[73]. Das führte zur Entwicklung von anionischen PLA-Partikeln. Die negative Oberflächenladung erlaubt die Adsorption von HIV-1 p24 Kapsid-Protein^[72].

Aus diesem Grund und mit dem Ziel der Entwicklung von PLA-Partikeln als zukünftige Trägersysteme für die transkutane Vakzinierung war das Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit die Untersuchung der Penetrationseigenschaften von PLA-Partikeln verschiedener Größe in menschliche Vellushaarfollikel und ihre potentielle Aufnahme durch die LHZ. Da 200-300 nm

Partikel von verschiedenen Autoren als die optimale Partikelgröße für das Hervorrufen einer humoralen und zellulären Immunantwort zur Behandlung von chronischen infektiösen Krankheiten wie HIV-Infektion oder Hepatitis erwähnt wird^[58] und Partikel dieser Größe gleichzeitig viel stabiler sind und bessere Depoteigenschaften aufweisen als kleinere Nanopartikel (<200 nm), wurden zwei verschiedene Partikelgrößen ausgewählt, 228 nm als möglicher Kandidat für die Entwicklung eines innovativen Trägersystems für Antigene und 365 nm als Kontrolle. Zu diesem Punkt muss jedoch erwähnt werden, dass bei der transkutanen Vakzinierung, anders als bei der intramuskulären oder oralen Vakzinierung, das Problem der Hautbarriere besteht, welche zumindest im intakten Zustand eine Partikelpenetration verhindert. Nach Barrierestörung z.B. infolge von CSSS können jedoch PS-Partikel ≤ 200 nm in das folliculäre Epithel penetrieren und von den LHZ aufgenommen werden (Par. 1.4.2). Das verstärkt die Rolle der 228 nm PLA-Partikel als Kandidat für einen neuen Antigenträger für die transkutane Vakzinierung.

Weiteres Ziel dieser experimentellen Arbeit ist die Untersuchung der biologisch abbaubaren PLA-Partikel als Vehikel für eine partikelbasierte Lieferung von therapeutischen Substanzen in den menschlichen Haarfollikel und für das Targeting von bestimmten folliculären Strukturen wie die Talgdrüse.

1.7 Zielsetzung

Diese experimentelle Arbeit setzt folgende Ziele:

- 1 Die Untersuchung der Penetrationseigenschaften von biologisch abbaubaren PLA-Partikeln in menschlicher Haut mit Schwerpunkt auf Penetration in Vellushaarfollikel mittels Fluoreszenzmikroskopie. Untersucht werden zwei verschiedene Partikelgrößen, 228 nm und 365 nm beladen mit unterschiedlichen fluoreszierenden Farbstoffen (Nile Red und Coumarin 6), die auf exzidierte menschliche Haut aufgetragen und anschließend inkubiert werden.
- 2 Die Untersuchung der Aufnahme von 228 nm und 365 nm biologisch abbaubaren PLA-Partikeln durch Antigen-präsentierende Zellen der Haut an exzidiertes menschlicher Haut am Beispiel von magnetisch separierten Langerhanszellen mittels Durchflusszytometrie. Verifikation der Aufnahmefähigkeit von frisch isolierten Langerhanszellen in der Zellkultur nach Inkubation mit PLA-Partikeln vier verschiedener Größen (228 nm, 365 nm, 375 nm und 423 nm). Ziel ist die Untersuchung der potentiellen Anwendung der PLA-Partikel als Antigen-träger für die transkutane Vakzinierung.
- 3 Die Untersuchung der möglichen Freisetzung der eingekapselten Fluochrome aus den Partikeln mittels Fluoreszenzmikroskopie, konfokaler Laserscanmikroskopie und Fluoreszenzspektrophotometrie und deren Konsequenzen für die Anwendung der PLA-Partikel für ein partikelbasiertes Einbringen von therapeutischen Substanzen in den menschlichen Vellushaarfollikel.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Ethikantrag

Der Antrag „Experimentelle in vitro Untersuchungen zur Penetration und zur biologischen Wirkung von Mikro- und Nanopartikeln in menschlicher Haut“, Antragsnummer: EA1/1135/06, wurde am 23.08.2006 durch die Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin genehmigt.

2.1.2 Hautproben

Hautproben, die im Rahmen von geplanten operativen Eingriffen an der Haut, z.B. Hautstraffungen im Gesichtsbereich oder Brust- und Bauchreduktionsplastiken anfallen und normalerweise entsorgt werden, wurden innerhalb von 24 Stunden ins Labor gebracht und für die geplanten Experimente verwendet. Patienteninformation und –einwilligung erfolgten entsprechend der Vorgaben durch die Ethikkommission und in Anlehnung an die ethischen Regeln der „Declaration of Helsinki Principles“.

2.1.3 PLA-Partikel

PLA ist ein biologisch abbaubarer, thermoplastischer, aliphatischer, hydrophobischer Polyester der Milchsäure. Die Milchsäure wird aus erneuerbaren Ressourcen wie zum Beispiel Maisstärke oder Zuckerrohr gewonnen^[74]. Bei 160°C wird durch die katalytische Ringöffnungspolymerisation der Milchsäure das Polylactid (PLA) produziert (Abb.3). Die PLA-Partikel wurden von Dr. T. Delair (Unité Mixte CNRS-bioMérieux UMR2714, IFR128 BioSciences Lyon-Gerland, ENS-Lyon, 46, Allée d'Italie, F-69364 Lyon cedex 07, France) im Rahmen des europäischen Projektes MuNanoVac hergestellt und zur Verfügung gestellt^[75].

- **Herstellung der PLA-Partikel**

Nach der Synthese wird das Polymer in Azeton zusammen mit dem jeweiligen Fluorochrom (Nile Red oder Coumarin 6) gelöst und fällt in einer Wasser/Ethanol Lösung unter Bildung der Partikel aus. Die dadurch hergestellten Nanopartikel sind solide und besitzen keine zentrale Kavität^[76].

PLA ist ein lineares hydrophobes Polymer, besitzt jedoch eine hydrophile Karboxylendgruppe. Während der Partikelherstellung richten sich die lipophilen Ketten in das Partikelinnere und die hydrophilen Karboxylgruppen nach außen. Dadurch wird die Auflösung der Nanopartikel in

wässrigen Lösungen vermieden und damit die Anwendung im menschlichen Körper (Mukosa, Serum etc.) ermöglicht. In dem lipophilen Kern des Partikels können verschiedene lipophile Substanzen eingekapselt werden, und an der wasserlöslichen Außenseite können hydrophile Substanzen wie zum Beispiel Antigene oder andere Proteine gekoppelt bzw. absorbiert werden.

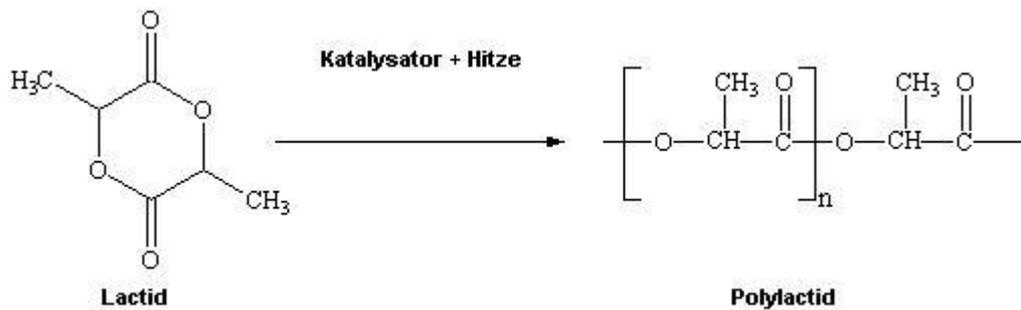


Abb. 3: PLA-Synthese

Poly lactide sind vor allem durch die ionische Polymerisation von Lactid, einem ringförmigen Zusammenschluss von zwei Milchsäuremolekülen, zugänglich. Bei Temperaturen zwischen 140 und 180°C findet unter Einwirkung katalytischer Zinnverbindungen (z.B. Zinnoxid) eine Ringöffnungspolymerisation statt. So werden Kunststoffe mit einer hohen Molekülmasse und Festigkeit erzeugt. Lactid selbst lässt sich durch Vergärung von Melasse oder durch Fermentation von Glukose mit Hilfe verschiedener Bakterien herstellen^[74]

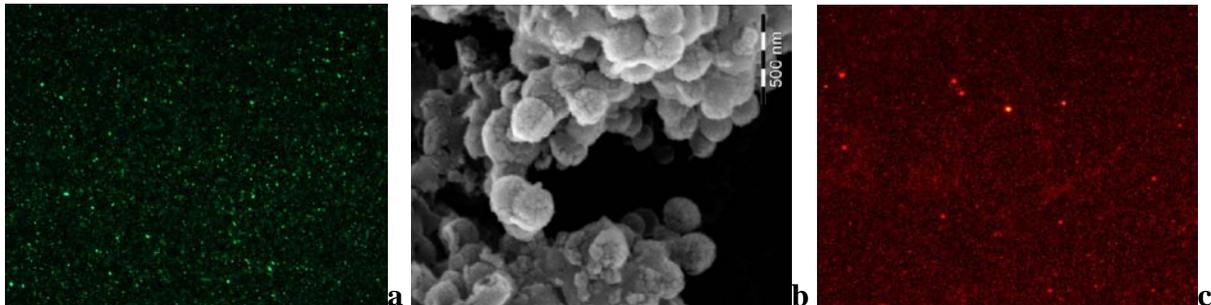


Abb. 4: PLA-Partikel

- a. 365 nm PLA-Partikel beladen mit Coumarin 6 (grün), Fluoreszenzmikroskop 20x Vergrößerung
- b. Elektronmikroskopisches Bild von PLA-Partikeln (T. Delair, Unité Mixte CNRS-bioMérieux, Lyon, France)
- c. 228 nm PLA-Partikeln beladen mit Nile Red (rot), Fluoreszenzmikroskop 20x Vergrößerung

- **Angewendete PLA-Partikel**

Für die Zwecke dieser experimentellen Arbeit wurden PLA-Partikel in vier verschiedenen Größen angewendet (Tab.1). Die Partikel waren mit den fluoreszierenden Farbstoffen Nile Red (rot) und Coumarin 6 (grün) beladen (Abb.4). Dadurch wurde ihre Anwendung für die Durchführung von fluoreszenzmikroskopischen und –spektrophotometrischen sowie durchflusszytometrischen Untersuchungen ermöglicht.

Tabelle 1: PLA-Partikel Daten

Partikelgröße	228 nm PLA	365 nm PLA	375 nm PLA	423 nm PLA
Konzentration	61 mg/ml	40 mg/ml	27,9 mg/ml	44,1 mg/ml
Partikel/ml	$7,87 \times 10^{12}$	$11,26 \times 10^{12}$	$8,09 \times 10^{11}$	$8,91 \times 10^{11}$
Lösungsmittel	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser
Zeta Potential	-62 mV	-64,4 mV	-71,8 mV	-72,5 mV
Polydispersity Index	0,032	0,075	0,048	0,032
Farbstoff	Nile Red (rot)	Coumarin 6 (grün)	Nile Red (rot)	Coumarin 6 (grün)
Farbstoffkonzentration.	0,2 %	0,02 %	0,2%	0,02
Emission	635 nm	505 nm	635 nm	505 nm
Exzitation	530 nm	458 nm	530 nm	458 nm
Antigen	kein	kein	kein	kein

- **Nile Red und Coumarin 6**

Nile Red und Coumarin 6 (Abb.5) sind lipophile fluoreszierende Farbstoffe, die im lipophilen Kern der PLA-Partikel eingekapselt wurden. Im Rahmen dieser experimentellen Arbeit wurden neben den eingekapselten Farbstoffen auch freie Farbstoffe, Nile Red (Sigma-Aldrich, Deutschland, CAS Nr. : 7385-67-3) und Coumarin 6 (Sigma-Aldrich, Deutschland, CAS Nr. : 38215-36-0) für die Erstellung von Kalibrierungskurven für die spektrophotometrische Auswertung der enkapsulierten Farbstoffen aus den PLA-Partikeln benutzt. Diese ermöglichten dabei die Umrechnung der gemessenen Fluoreszenzintensität in Farbstoffkonzentrationen. Nile Red weist ein Absorptionsmaximum bei 457 nm und Coumarin 6 bei 553 nm auf. Die Anwendung von Nile Red zur Lipidfärbung ist seit langem bewährt^[77].

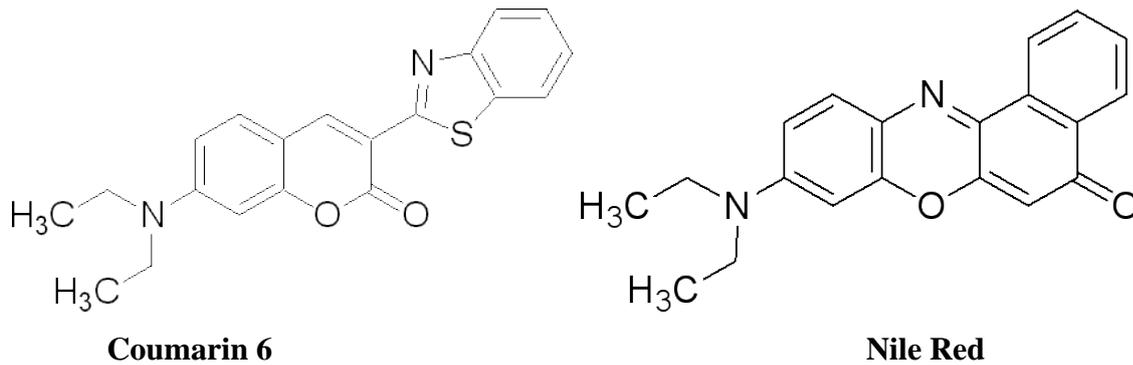


Abb.5 Chemische Struktur von Coumarin 6 und Nile Red

Coumarin 6 ($C_{20}H_{18}N_2O_2S$) weist ein molekulares Gewicht von 350.43 Da und Nile Red $C_{20}H_{18}N_2O_2$ von 318.37 Da auf. Beide sind lipophile fluoreszierende Farbstoffe.

2.1.4 Antikörper und MACS-Separation Kit

Für die Isolierung von LHZ der Epidermis erfolgte eine magnetische Zellseparation. Verwendet wurde ein MACS-Separation Kit von Miltenyi Biotec, USA (CD1c (BDCA-1) + Dendritic Cell Isolation kit human, Order No. 130-090-506). Für die weiteren fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen und für die Durchflusszytometrie wurden die Langerhanszellen mit anti-CD1a monoklonalen Antikörpern markiert (BD Pharmingen TM APC anti human CD1a, Kat. Nr. 559775 und FITC anti human CD1a, Kat. Nr. 555806, BD Biosciences Pharmingen, CA, USA)

2.1.5 Chemikalien

Die im Rahmen dieser experimentellen Arbeit verwendeten Materialien werden in Tabelle 2 aufgelistet. Des Weiteren wird hier die Herstellung der Trypsin-, Dispase-, PFA 2% Lösung und des MACS-Puffers beschrieben. Die aufgelisteten Chemikalien sind in Deutschland hergestellt.

MACS- Puffer: 500 ml PBS, pH=7,2, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}
0,5% BSA
10 mM EDTA

Dispase: 2,4 U/ml Dispase

Paraformaldehyde: 1g PFA+ 49 ml PBS

(Trypsin 2,5% 1:10 in PBS mit 1,5 mM CaCl₂), 50 ml

5ml Trypsin (2,5%) + 45 ml PBS+ 75 µl 1M CaCl₂

Trypsin 2,5%: 0,125g Trypsin + 4,87 ml PBS

CaCl₂ 1M: 1,665 g CaCl₂ + 13,3 ml PBS

Tab. 2: Chemikalienliste

Bezeichnung	Menge/ Konzentration	Hersteller	Katalognummer
Medium RPMI 1640	500 ml	PAA Laboratories	E15-039
Foetal Calf Serum (FCS)	500 ml	PAA Clone	A 15- 041
Dulbecco´s PBS Mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺	500 ml	PAA Laboratories	H15-001
Dulbecco´s PBS Ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	500 ml	PAA Laboratories	H15-002
Hexan	1000 ml, >95%	Merck	110-54-3
Isopropyl myristat	250 ml, >98%	Fluka	110-27-0
Dichloromethan	500 ml, >99,9%	Merck	1, 06048 0500
CaCl ₂	500 gr ,>99%	Merck	10035-04-08
Paraformaldehyde	500 gr	Sigma	30525-89-4
Dispase [®] II	5x 1 gr, 0,8 U/mg	Roche	04 942 078 001
Albumin bovine Fraction V (BSA)	100 gr	Serva	11939
EDTA	50 gr, >99%	Sigma	E5134

2.1.6 Geräte

Die im Rahmen dieser experimentellen Arbeit verwendeten Geräte werden in Tabelle 3 nach Hersteller und Modell aufgelistet. Herstellungsland ist Deutschland.

Tab. 3: Verwendete Geräte

Gerätart	Hersteller	Modell
Kryostat	MICROM	HM 560
Inverses Mikroskop	Olympus	IX 50
Fluoreszenzmikroskop	Olympus	BX 60
Konfokales Laserscanmikroskop	Olympus	FV 1000
Fluoreszenzspektrometer	Perkin Elmer	Luminescence Spectrometer LS 50B
Durchflusszytometer	Becton Dickinson	FACS Calibur
Zentrifuge	Heraeus	Biofuge fresco
Zentrifuge	Heraeus	Multifuge 3 S-R
Brutschrank	Heraeus	HERA cell
Sterile Arbeitsplatte	Heraeus	HERA safe
Schüttler	IKA [®] Labortechnik	Mini Rocker MR-I
Rührer	IKA [®] Labortechnik	RH basic
Vortex	IKA [®] Labortechnik	MSI Minishaker
Ultraschallbad	BANDELIN	Sonorex Super RK 102H
Magnetic Cell Separator	MILTENYI BIOTEC	MACS Multistand
Magnetische Säule	MILTENYI BIOTEC,	Large Cell Separation Columns

2.1.7 Sonstige Materialien

Sonstige Materialien, die für die Zwecke dieser experimentellen Arbeit verwendet wurden, werden in Tabelle 4 aufgelistet.

Tab 4: Sonstige Materialien

Beschreibung	Hersteller	Modell
Kleber	UHU, Deutschland	Sekunden Alleskleber
Klebeband	Tesa, Deutschland	Tesafilm®
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, WI, USA	Parafilm M
Kryo- Spray	Bio optica, Italien	Cryo Spray
Einbettmedium	Science Services, Deutschland	Tissue- Tek® O.C.T. Compound
Quartz Küvetten	Helma, Deutschland	Quartzglas suprasil 5x5x44,75 mm 111.057-QS
Cell Strainer	BD Biosciences USA	BD Falcon Cell Strainer 70 µm
Konisches Röhrchen	BD Biosciences USA	Falcon Blue Max 15 ml und 50 ml

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation der Hautproben

Die Hautproben wurden makro- und mikroskopisch zum Ausschluss von Mikroläsionen untersucht. Für die Kryoschnitte bzw. die FACS-Analyse wurden jeweils 1 cm² Hautproben von der Gesichtshaut und 16 cm² Hautproben von der Brust/Bauchhaut verschiedener Spender gewonnen. Von den 16 cm² Hautproben wurde pro Spender je eine Probe nicht weiter behandelt, sondern als Negativkontrolle für die FACS-Analyse benutzt. Für jede Experimentart wurden Hautproben von drei verschiedenen Spendern vorbereitet (Abb. 8).

Nach Entfernung des subkutanen Fettgewebes wurden die Hautproben mit einem Sicherheitsrand von 0,3 - 0,5 cm pro Seite geschnitten. Als Unterlage wurden Styropor Stücke mit Parafilm umkleidet, darauf wurde jeweils eine Probe fixiert. Nach der Durchführung eines CSSS wurde die jeweilige Partikelsuspension aufgetragen (20µl/ml). Das CSSS (Abb. 6) wurde nach dem Protokoll in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. A. Vogt durchgeführt^[34,46].

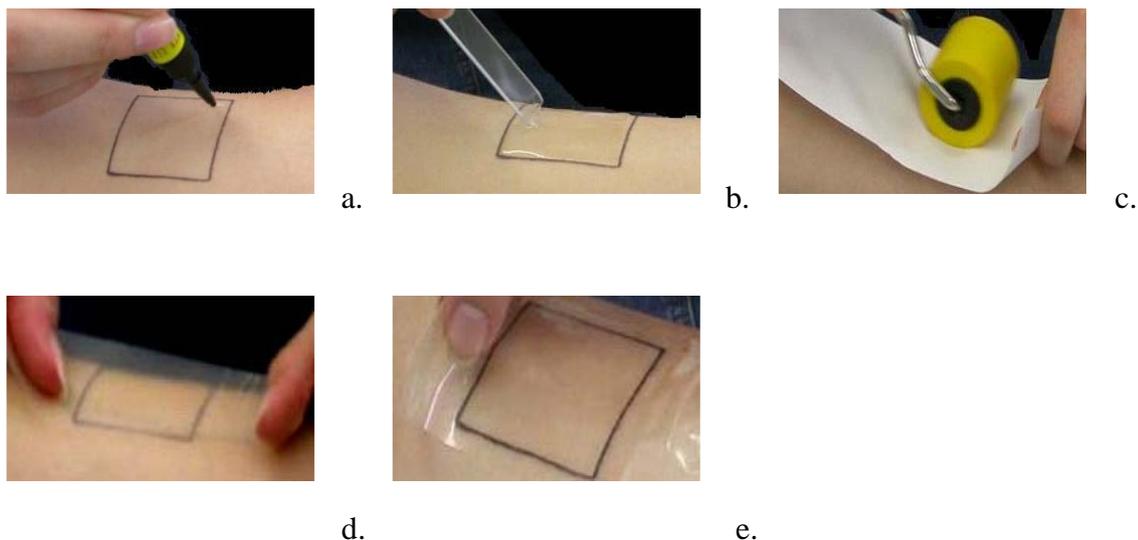


Abb. 6: Durchführung eines CSSS auf exzidierte menschliche Haut

Auf 1 cm² bzw. 16 cm² präparierter Haut wurden 1 bzw. 9 Tropfen UHU Sekundenkleber gegeben (a) und mit einem Mikroskopdeckglas gleichmäßig dünn verstrichen (b). Im Anschluss wurde der Tesafilm auf das Hautareal geklebt (c) und mit der Fingerspitze über eine Minute fest gedrückt bzw. mit der Gummirolle 10 mal gerollt (d). Nach 20 Minuten wurde der Tesafilm mit einer Pinzette gefasst und abgerissen (e).

Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer bei 37°C über vier (Kryoschnitte) bzw. 16 Stunden (FACS-Analyse). Für die Kinetik der Nile Red Freisetzung in den Haarfollikeln wurde die Partikellösung auf fünf 1 cm² Stücke aufgetragen und es erfolgte eine Inkubation bei 37°C über 2, 4, 8, 16, und 24 Stunden.

Nach der Inkubation wurde 5x ein Tape Stripping (Entfernung der obersten Schichten des Stratum corneum mit Tesa Film) durchgeführt, um überschüssige Partikel von der Hautoberfläche zu entfernen. Um Artefakte durch spätere Verschleppung zu vermeiden wurde anschließend der Sicherheitsrand entfernt und jede Probe von der Seite der Dermis zur Epidermis geschnitten, ebenfalls um ein unspezifisches Verschieben von Partikeln in die Haut während der Präparation zu vermeiden.

2.2.2 Kryoschnitte

Für die Herstellung der Kryoschnitte wurden die 1 cm² Hautproben, nach der Inkubation mit der jeweiligen Partikelsuspension (228 nm PLA_NR-NP 0,5%, 365 nm PLA_Coum6-NP 0,5%) in vier 0,5 x 0,5 x 0,2 cm Würfel geteilt. Im Anschluss wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C aufbewahrt. Jeweils eine der Proben wurde in Einbettmedium fixiert und am Kryostat geschnitten. Insgesamt wurden 150-200 Schnitte pro Stück und Hautprobe auf 10-15 Objektträgern gemacht. Geschnitten wurde mit einer Schichtdicke von 6 µm, die Temperatur des Messers lag zwischen -19 und -22°C und des Objektes zwischen -22 und -25°C. Die Objektträger wurden anschließend bei -20°C gelagert.

- **Fluoreszenzmikroskop**

Die Auswertung der Kryoschnitte erfolgte semiquantitativ am Fluoreszenzmikroskop. Die Tiefe der Penetration in die Haarfollikel wurde nach folgenden Kategorien bewertet: mittlere Epidermis, tiefe Epidermis und tiefes Infundibulum des Haarfollikels (Abb.7). Follikel, bei denen sich Partikel ausschließlich oberhalb der Epidermisebene zeigten, wurden als negativ bewertet. Insgesamt wurden pro Hautprobe ungefähr 150 Schnitte analysiert. Hautproben von der Gesichtshaut drei verschiedener Spender wurden ausgewertet. Für die grünen Coumarin 6 PLA-Partikel wurde der NIBA-Filter (Exc. 470 - 490 nm, Em. >550 nm) und für die roten Nile Red PLA-Partikel der WIY-Filter (Exc. 545 - 580 nm, Em. >610 nm) benutzt. Für die Kinetik der Nile red Freisetzung in den Haarfollikeln wurden 30 - 50 Schnitte pro Probe ausgewertet. Fotos und Overlay-Bilder wurden mit der Hilfe der AnalySIS[®] Software, Version 3.1 von Olympus, Deutschland gemacht.

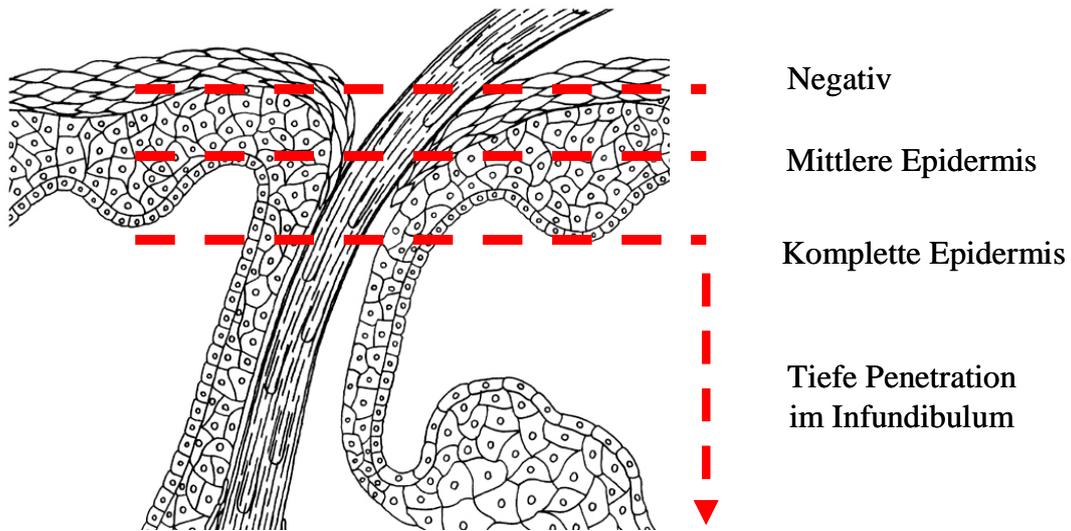


Abb. 7: Penetrationstiefe der PLA-Partikel in die menschlichen Vellushaarfollikel

Die Penetration der Nanopartikel wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht und nach den Kategorien „negativ“, mittlere Epidermis, komplette Epidermis und tiefes Infundibulum ausgewertet.

- **Konfokales Laserscannmikroskop (CLSM)**

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Farbstofffreisetzung wurde durch Aufnahmen am konfokalen Laserscannmikroskop ergänzt. Ein Laserstrahl (produziert mit einem Helium-Neon Laser, grün, 543 nm) wird auf einen kleinen Objektbereich fokussiert. Das von diesem Bereich zurückreflektierte Streulicht wird mit einem Strahlenteiler geteilt, um nach Durchquerung einer kleinen als Raumfilter wirkenden Blende („Pinhole“), die in ihrem Durchmesser zu der Größe des beleuchteten Bereiches passt, von einem optischen Detektor (600 - 700 nm) nachgewiesen zu werden. Diese Technik ermöglicht daher eine sehr spezifische Messung mit hoher Auflösung. Es erfolgte die Aufnahme der Epidermis, der Dermis und der Talgdrüsen zur optimierten Darstellung der Nile Red Freisetzung aus den Nanopartikeln und der Färbung der verschiedenen Hautelemente.

2.2.3 Isolierung der Epidermiszellen für die FACS-Analyse

Jede Hautprobe (16 cm²) wurde nach der Inkubation mit der jeweiligen Partikelsuspension in 3 mm x 3 mm Hautstückchen geschnitten. Für die Untersuchung der Partikel Aufnahme durch die Langerhanszellen *in vitro* sowie für die Vorbereitung aller negativen Kontrollen für die FACS-Analyse wurden die unbehandelten 16 cm² Hautproben gleich geschnitten.

Die Hautstückchen wurden bei 37°C über 3 Stunden in 3 ml Dispase (2,4 U/ml) verdaut, und anschließend wurde die Epidermis von der Dermis getrennt. Die Epidermisplättchen wurden mit PBS gewaschen und in 10 ml Trypsin über 15 min bei 4°C verdaut. Nach dem Filtern durch den Cell Strainer wurde die gewonnene Zellsuspension für 10 min zentrifugiert (1000 rpm) und in 200 µl MACS-Puffer resuspendiert.

2.3.4 MACS-Separation

Die MACS-Separation dient der Isolierung einer bestimmten Zellpopulation aus einer Einzelzellsuspension. Dazu wird die erwünschte Zellenpopulation mit nanometergroßen Magnetpartikeln markiert. Beim Durchfluss einer Säule, die von einem starken Magnetfeld umgeben ist, wird die magnetisch markierte Zellpopulation zurückgehalten und kann nach Entfernung des Magnetfeldes gewonnen werden^[78].

- **Isolierung der Langerhanszellen aus der Epidermiszellensuspension**

Zu 200 µl einer Epidermiszellensuspension wurden jeweils 100 µl vom FcR Blocking Reagent, CD19-Beads und anti-BDCA-1-Biotin Antikörper (MACS-Separation Kit, Flasche 1-3) hinzugegeben, gut gemischt und für 12 min bei 4°C geschüttelt. Nach dem Waschen mit PBS, Zentrifugation (800 rpm, 7 min) und Resuspension in 400 µl MACS-Puffer wurden 100 µl anti-Biotin MicroBeads hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde erneut gut gemischt und bei 4°C 12 min auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Zugabe von 15 µl konjugierter Fluorochrome (anti-CD1a-FITC und -APC) wurde die Inkubation über 20 min weitergeführt. Schließlich wurde die Zellsuspension nach Waschen mit PBS erneut zentrifugiert (800 rpm, 7 min) und in 1000 µl MACS-Puffer resuspendiert.

Nach der Vorbereitung der magnetischen Säule durch dreifaches Waschen mit 1 ml MACS-Puffer wurde die Zellsuspension auf die Säule gebracht. Anschließend wurde sie erneut dreimal mit PBS gewaschen. Nach Entfernung des Magnetfeldes wurde durch Waschen mit 1 ml MACS-Puffer eluiert. Der gleiche Prozess mit einer zweiten Säule wurde die Langerhanszellpopulation nach Zentrifugation und Resuspension der Zelllösung wiederholt. Die isolierte Langerhanszellensuspension wurde noch einmal zentrifugiert, in 300 µl PFA 2% resuspendiert und bei 4°C im Kühlschrank gelagert (Abb 8).

2.3.5 *In vitro* Inkubation der Langerhanszellen mit den Partikelsuspensionen

Zur Untersuchung der Partikelaufnahme durch Langerhanszellen *in vitro* erfolgte nach der Isolierung der Langerhanszellen von exzidierte menschlicher Haut (n=3) die Inkubation der

Zellsuspension mit den jeweiligen Partikelsuspensionen über 2 Stunden in 1 ml Medium (RPMI 1640) bei 37°C. Verwendet wurden vier verschiedene Partikelgrößen (228 nm, 365 nm, 375 nm und 423 nm) und zwei verschiedene Konzentrationen der Partikelsuspension (10 µg/ml und 50 µg/ml). Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension mit 1 ml PBS gewaschen, zentrifugiert (2000 rpm, 7 min), mit 300 µl PFA 2% resuspendiert und im Kühlschrank bei -4°C gelagert.

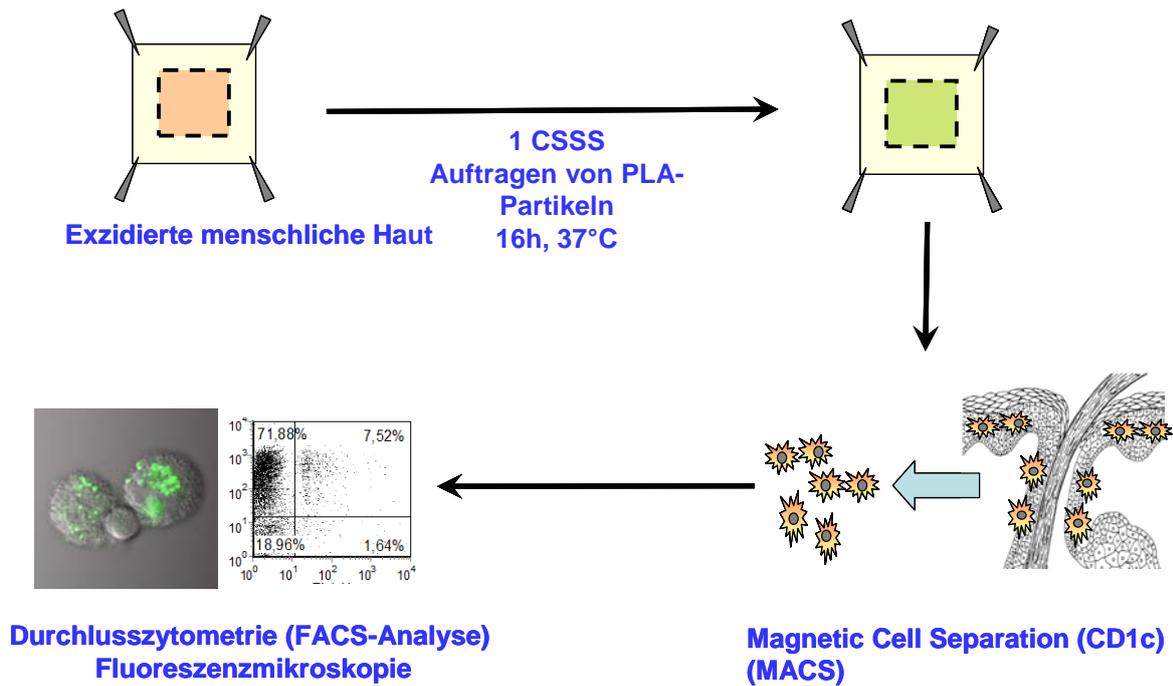


Abb. 8: Untersuchung der Partikelaufnahme der PLA-Partikel durch die Langerhanszellen

Nach der Durchführung eines CSSS wurde die jeweilige Partikelsuspension auf 16 cm² exzidierte menschliche Haut aufgetragen und über 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Isolierung der Langerhanszellen (MACS-Separation) und die Untersuchung der Partikelaufnahme mittels Durchflusszytometrie. Zur Bestätigung des Befundes erfolgte im Anschluss eine Kontrolle am Fluoreszenzmikroskop. Nach der Partikelaufnahme zeugte sich ein feingranuläres Fluoreszenzmuster.

CSSS: Cyanacralat Skin Surface Stripping; PLA: Poly lactic acid

2.3.6 FACS-Analyse

Ein Durchflusszytometer kann Fluoreszenzlicht messen und erlaubt dadurch, eine Vielzahl von Merkmalen auf den Zellen zu untersuchen. Dazu müssen diese Merkmale mit der Hilfe von fluoreszierenden Farbstoffen (Fluorochrome) markiert werden. Die Fluorochrome selbst können an monoklonale Antikörpern gekoppelt werden, um gezielt an bestimmte CD-Oberflächenproteine zu binden. Durch Einsatz verschiedenfarbiger Laser kann die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe und damit die Informationsdichte erhöht werden^[79].

Das verwendete Durchflusszytometer verfügt über einen luftgekühlten Argon Laser (488 nm) und einen Dioden Laser (635nm) und kann vier verschiedene Farben in vier verschiedenen Kanälen mit der Hilfe von vier Detektoren detektieren. Im Kanal FL1 wird Fluoreszenz einer Wellenlänge 530/30 nm (530 bis 560 nm) detektiert. Für die anderen drei Kanäle werden die folgenden Werten angegeben: FL2: 585/42 nm, FL3: 661/16 nm und FL4 ab 670 nm. Die Markierung der Langerhanszellen erfolgte durch fluoreszierende anti-CD1a-APC und anti-CD1-FITC Antikörper (Par. 2.1.4). Die Nanopartikel fluoreszierten dank der jeweiligen eingekapselten Fluorochrome (Nile Red und Coumarin6, Par 2.1.3).

Die Darstellung der Daten kann in Form eines zweidimensionalen Dot-Plot-Diagramms oder eines Histogramms erfolgen. Anhand der zwei Beispiele in Abbildung 9 wird das Funktionsprinzip in Kürze dargestellt. Das Gerät wird mit der Hilfe einer Negativenkontrolle (Zellsuspension gewonnen von unbehandelter Haut) eingestellt. Jeder Punkt im Dot-Plot-Diagramm entspricht einer gemessenen Zelle. Auf den zwei Achsen des Diagramms werden die Fluoreszenzintensitäten der zwei zu untersuchenden Merkmale dargestellt, an der vertikalen die Fluoreszenzintensität der markierten Langerhanszellen und auf der horizontalen die Fluoreszenzintensität der Nanopartikel. Bei fehlender Markierung befinden sich alle Zellen in unteren linken Quadrant (Abb.9a). Im Gegensatz dazu bewegen sich die markierten Langerhanszellen mit den internalisierten Nanopartikeln entlang der beiden Achsen, so dass sie sich als doppelt positive Zellen im obersten rechten Quadrant darstellen (Abb.9b).

Die zweite Darstellungsmethode, das Histogramm, wurde zur Untersuchung der Aufnahme von freigesetzten fluoreszierenden Farbstoffen (Nile Red und Coumarin 6) durch Epidermiszellen angewendet. In diesem Fall wird die Fluoreszenzintensität in Relation zur Zahl der fluoreszierenden Zellen als Kurve dargestellt. Die Überlappung von Kontroll- und Testkurven ermöglicht einen direkten Vergleich (Abb. 9c,d).

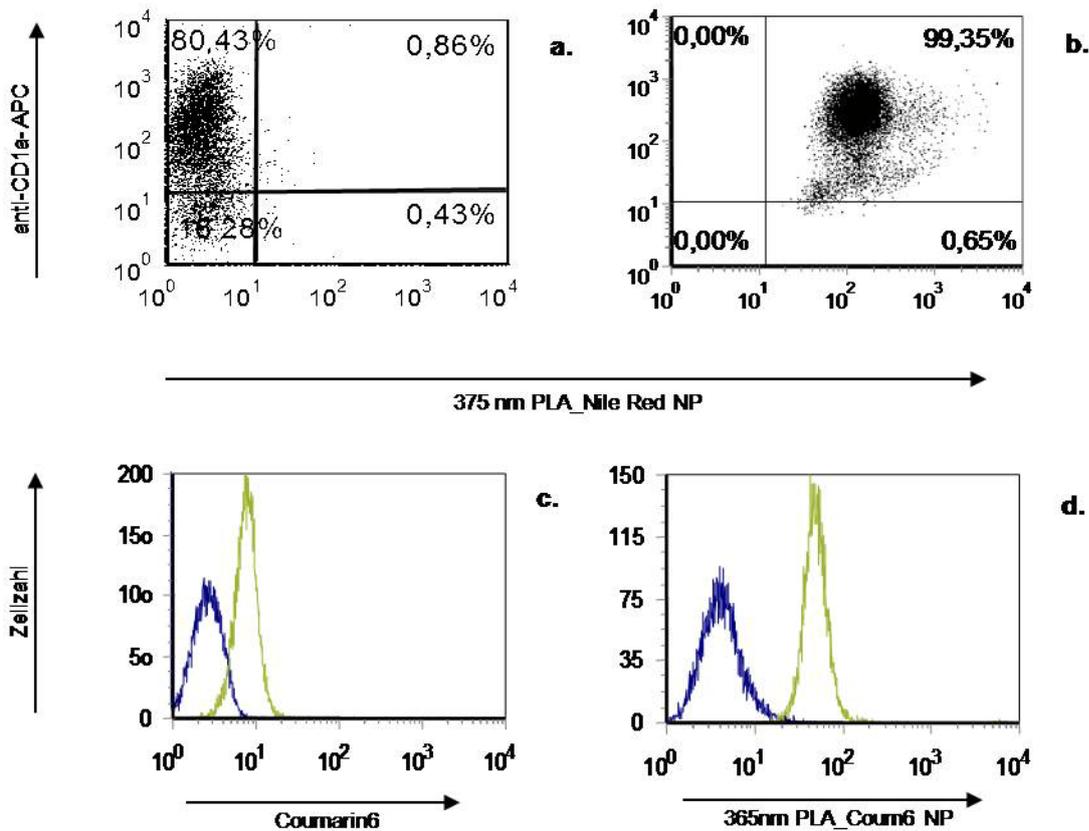


Abb. 9: FACS-Analyse, Beispiele vom Dot- Plot-Diagramm und Histogramm

Bei der negativen Kontrolle zeigt sich keine Bewegung der Zellwolke (a), anti-CD1a+ Zellen, die Nanopartikel aufgenommen haben stellen sich als doppelt positive Zellen im oberen rechten Quadrant dar (b). In den Histogrammen entspricht die blaue Kurve der negativen Kontrolle (unbehandelte Haut). Die Kurve der Fluoreszenzintensität bewegt sich viel weniger nach der Aufnahme des freien Coumarin6 (c) als nach Internalisierung der PLA_Coum6-NP (d)

PLA: Poly lactic acid; Coum6: Coumarin 6; NP: Nanopartikel

• Untersuchungsmaterial

Nach Behandlung der exzidierten menschlichen Haut mit der jeweiligen Partikelsuspension und Isolierung der LHZ wurde die Partikelaufnahme am Durchflusszytometer gemessen. Bei den *in vitro* Versuchen erfolgte die Inkubation mit der jeweiligen Partikelsuspension erst nach der Isolierung der LHZ von unbehandelter exzidierte menschlicher Haut. Zur Untersuchung der Aufnahme vom freien Farbstoff durch Keratinozyten wurden komplette Einzelzellsuspensionen der Epidermis ohne vorherige Zellseparation verwendet. Insgesamt wurden 20.000 Events pro Zelllösung (n=3 für jeden verschiedenen Experimenttyp) am Durchflusszytometer gemessen und mit der Hilfe der CellQuest Software (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) analysiert.

- **Verwendete Partikelsuspensionen**

Zur Untersuchung der Partikelaufnahme durch die LHZ der Epidermis wurden die Hautproben (16 cm²) mit der jeweiligen Zellsuspension (228 nm PLA_NR-NP bzw. 365 nm PLA_Coum6-NP, 20 µl/cm², Konz. 0,5%) bei 37°C über 16 Stunden inkubiert. Zur Untersuchung der Aufnahme des freigesetzten Farbstoffes durch die Epidermiszellen erfolgte ebenso die Inkubation der Hautproben (16 cm²) mit der jeweiligen Zellsuspension (228 nm PLA_NR-NP bzw. 423 nm PLA_Coum6-NP, 20 µl/cm², Konz. 0,5%) bei 37°C über 16 Stunden. Zur Untersuchung der Partikelaufnahme *in vitro* in der Zellkultur wurden die Zellsuspensionen der isolierten Langerhanszellen mit verschiedenen Partikelsuspensionen inkubiert (vier verschiedene Partikelgrößen: 228 nm, 365 nm, 375 nm und 423 nm, und zwei verschiedene Konzentrationen der Partikelsuspension: 10 µg/ml und 50 µg/ml).

2.3.7 Nile Red und Coum 6 Freisetzung Kinetik und Fluoreszenzspektrophotometrie

Um das Verhalten der Partikelsuspensionen (228 nm PLA_NR-NP und 423 nm PLA_Coum6-NP) in der lipophilen Umgebung des Haarfollikels zu simulieren wurde die Freisetzung des Farbstoffes in einem zweiphasigen System (hydrophil/lipophil) gemessen.

- **Freisetzungskinetik**

Für die Herstellung der zwei Partikelsuspensionen wurden 10 µl 228 nm PLA_NR-NP (Stammlösung: 61 µg/ml PLA, 0,2% NR) und 13,8 µl 423 nm PLA_Coum6-NP (Stammlösung: 44,1 µg/ml PLA, 0,02% Coum6) jeweils in 990 µl und 986,2 µl PBS gelöst (Endkonzentration 610 µg/ml). Anschließend wurden jeweils in 2 ml Eppendorf- Rörchen 1 ml der Partikellösung und 1 ml Hexan bzw. IPM hinzugefügt. Hexan, ein gesättigter linearer Kohlenhydrat wurde wegen seiner extremen Lipophilizität ausgewählt. Isopropylmyristat (IPM) wurde aufgrund seiner Ähnlichkeit zur lipophilen Natur des Stratum corneum und des Sebums gewählt^[39]. Insgesamt wurde das Experiment dreimal mit Hexan und dreimal mit IPM als Rezeptor Medium für jede der zwei Partikellösungen wiederholt.

Die zwei Phasen blieben getrennt. Im unteren Teil des Rörchens verblieb die dichtere hydrophile Lösung und im oberen die lipophile Lösung mit niedriger Dichte.

Die zweiphasigen Lösungen wurden mit 240 Drehungen pro Minute gerührt. Nach 0,1,2,3,5,16 und 24 Stunden wurden jeweils 10 µl von der Hexan- bzw. IPM-Lösung entnommen und in 1 ml reine Hexan bzw. IPM Endlösung überführt. Das entnommene Volumen wurde jedes Mal durch 10 µl frisches Hexan bzw. IPM ersetzt (Abb. 10).

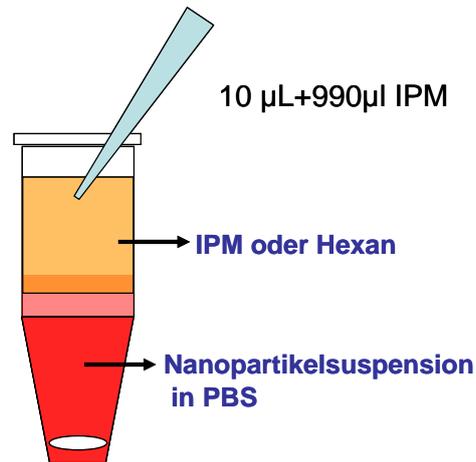


Abb. 10: In vitro Untersuchung der Farbstofffreisetzung von den PLA-Partikeln

Die Farbstofffreisetzung aus den PLA-Partikeln wurde in vitro mit Anwendung eines zweiphasigen Systems untersucht. Die Partikelsuspension in 1ml PBS (hydrophil) wurde in einem 2ml Röhrchen mit 1ml IPM oder Hexan (lipophil) inkubiert. Nach jeweils 0,2,4,8,16 und 24 Stunden wurden 10 µl von der IPM bzw. Hexan Lösung entnommen und in 990 µl IPM bzw. Hexan Lösung hinzugegeben. Im Anschluss erfolgte in den entsprechenden Lösungen mittels Fluoreszenzspektrophotometrie nach den freigesetzten Farbstoffen gesucht

IPM: Isopropylmyristat; PLA: Poly lactic acid

- **Zellextrakte**

Nach Inkubation der exzidierte menschliche Haut mit der jeweiligen Partikelsuspension (Par. 2.3.5) wurden die Epidermiszellen mittels MACS-Separation isoliert (Par. 2.3.4). 5×10^7 Zellen/ml ($n=3$) wurden zentrifugiert, und nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet mittels 1 ml Dichloromethan und Vortexen lysiert. Das entstandene Zellextrakt wurde am Fluoreszenzspektrophotometer untersucht.

- **Fluoreszenzspektrophotometrie**

Die Fluoreszenzintensität der freigesetzten Farbstoffe in den Rezeptormedia wurde fluoresszenzspektrophotometrisch gemessen und mit Hilfe einer Kalibrierungskurve in Konzentrationen umgerechnet. Benutzt wurden Quarzküvetten mit 5 mm Schichtdicke und fünf Fenstern, externe Dimensionen 5 x 4 x 44,7 mm.

Das Auflicht des Spektrophotometers exzitiert die Probe über die gesamte Schichtdicke der Küvette, und das emittierte Licht wird im 90° Winkel zum Exzitationsstrahl gemessen. Mit der Hilfe des Exzitations- und Emissionsmonochromators können für verschiedene Exzitations- oder Emissionswellenlängen die entsprechenden Emissions- und Exzitationsspektren und -maxima

bestimmt werden^[80] (Abb. 11). Die gesammelten Daten wurden mit Hilfe von UV Winlab Software, Version 2.85.04, Perkin Elmer USA, analysiert.

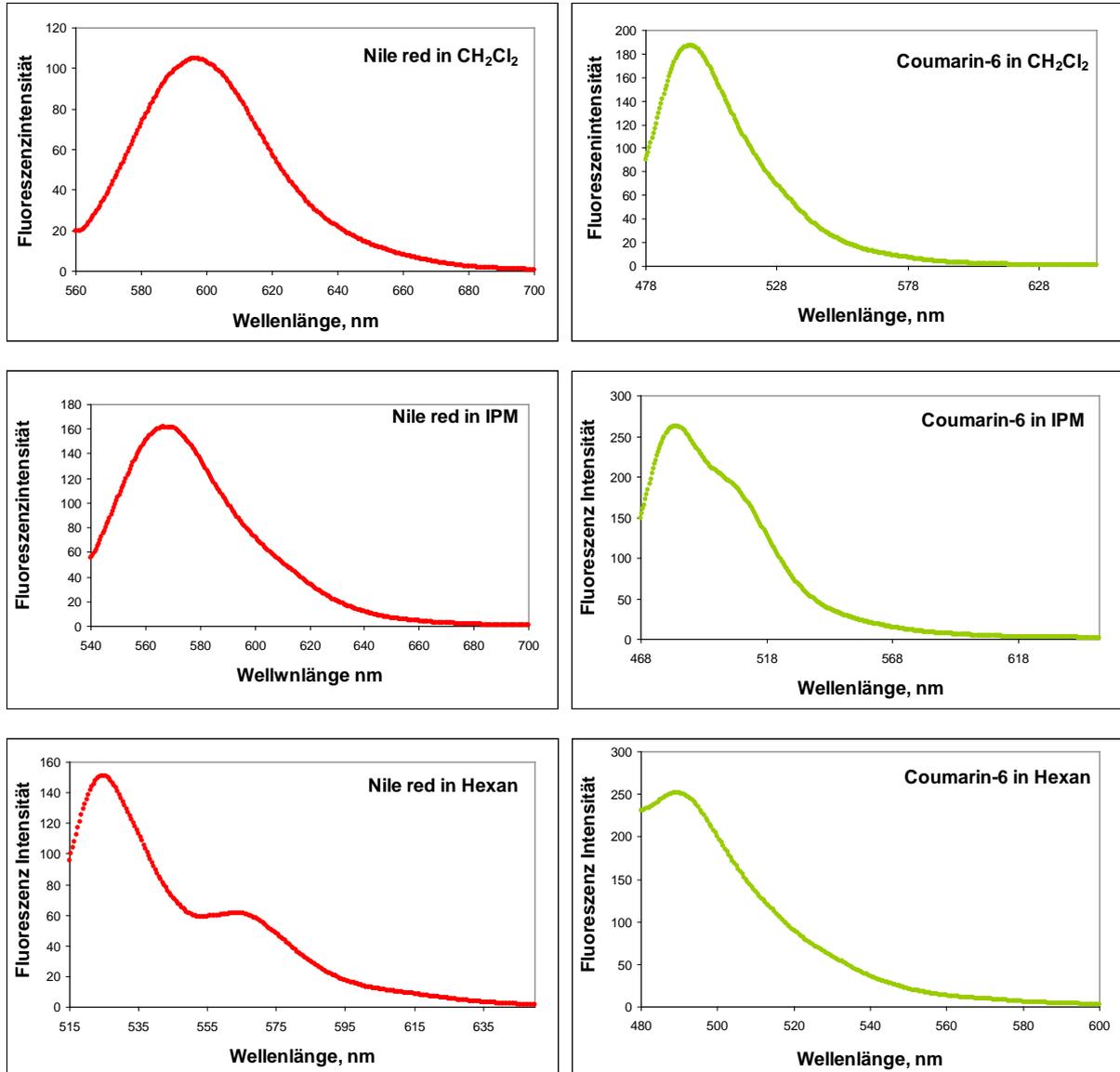


Abb. 11: Fluoreszenzemissionsspektren

Dargestellt sind die Fluoreszenzspektren von Nile Red und Coumarin 6 in Dichloromethan (CH₂Cl₂), IPM und Hexan
IPM: Isopropylmyristat

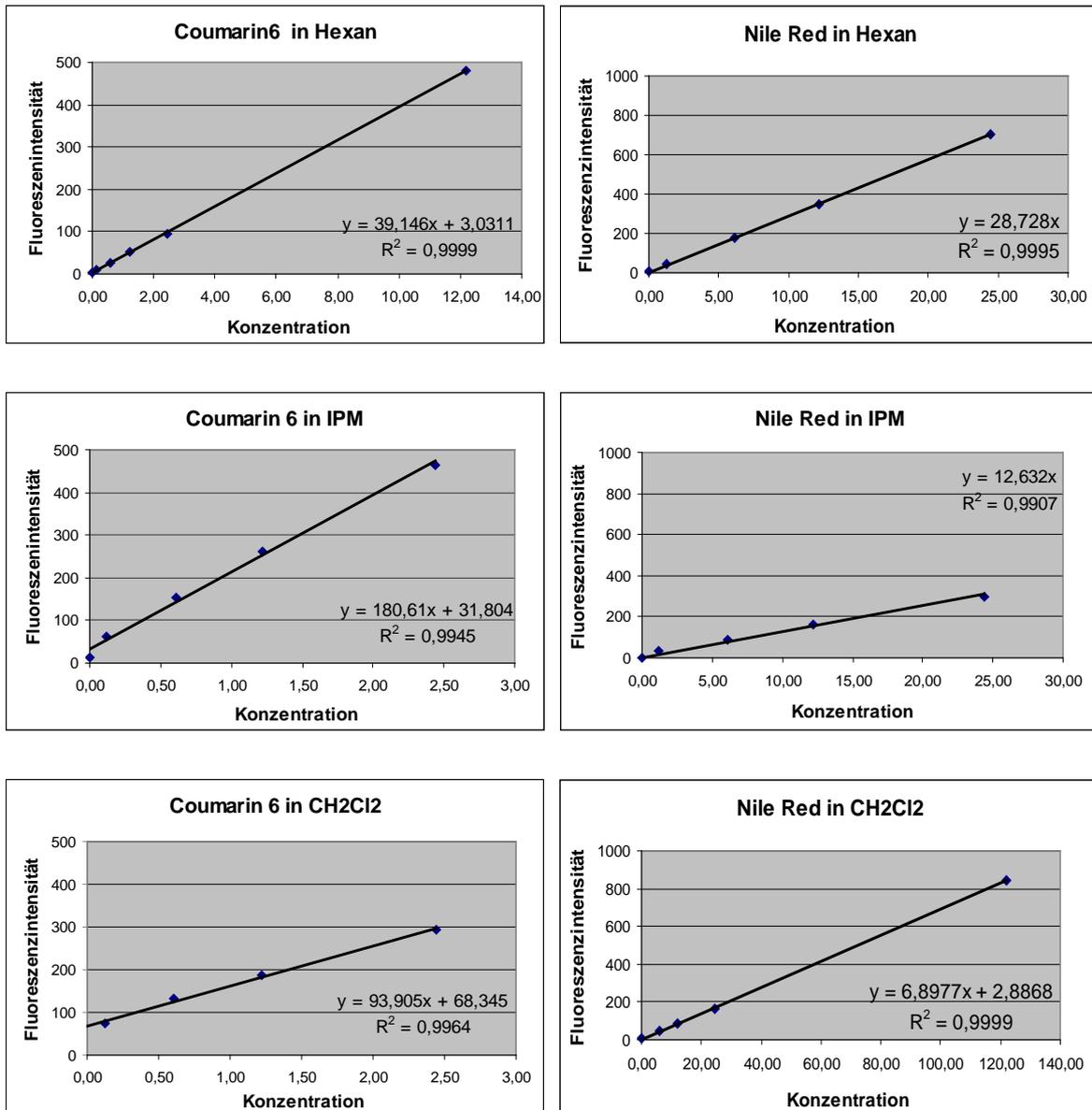


Abb. 12: Coumarin 6 und Nile Red Kalibrierungskurven für die freien Fluoreszenzfarbstoffen Nile Red und Coumarin6

Fluoreszenzintensität von verschiedenen Coumarin 6 und Nile Red Konzentrationen in IPM, Hexan und Dichlormethan. Mit der Hilfe der Kalibrierungskurven wurde ausgehend von der gemessenen Fluoreszenzintensität die Konzentration der freigesetzten Farbstoffe bestimmt.

IPM: Isopropylmyristat

**Tab. 5 : Exzitations- und Emissionsmaxima von Nile Red und Coumarin6
Dichloromethan, Hexan und IPM**

	In Dichloromethan	In Hexan	In IPM
NR Emmisionsmax.	595 nm	525 nm	567 nm
NR Exzitationsmax.	543 nm	484 nm	516 nm
Coum6 Emmisionsmax.	495 nm	490 nm	481 nm
Coum6 Exzitationsmax.	458 nm	448 nm	438 nm

Zur Bestimmung der Konzentration des freigesetzten Farbstoffes im Rezeptormedium wurden Kalibrierungskurven für die zwei verschiedenen Farbstoffe in jeweiligen verschiedenen Media erstellt. Zu diesem Zweck wurde die Fluoreszenzintensität von fünf verschiedenen Farbstoffkonzentrationen (0; 0,61; 6,1; 12,2; 24,4 µg/ml) für Nile Red und (0; 0,122; 0,61; 1,22; 2,44 µg/ml) für Coumarin6 in beiden Medien gemessen (Abb.12).

Mit Hilfe der Kalibrierungskurven wurde für jede Probe der Kinetik die gemessene Fluoreszenzintensität in Farbstoffkonzentration umgerechnet. Der Vergleich der Farbstoffkonzentration im Rezeptormedium mit der Anfangskonzentration des in den Nanopartikeln eingekapselten Farbstoffes (Nile Red oder Coumarin 6) in der PBS-Lösung (610 µg/ml) ermöglichte die Quantifizierung der Farbstofffreisetzung bei der Interaktion der hydrophilen (PBS und Nanopartikel in PBS) mit der lipophilen (Rezeptor Medium) Phase. Die Konzentration der freigesetzten Farbstoffe wurde auch in epidermalen Zellextrakten, welche zuvor mittels Dichloromethan lysiert wurden, gemessen (Par. 2.3.7). In diesem Fall wurden Kalibrierungskurven für Nile Red und Coumarin 6 in Dichloromethan (Abb. 12) verwendet.

2.3.8 Statistische Auswertung

Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit der Hilfe der Software Microsoft Excel 2003 berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Penetration von 228 nm und 365 nm PLA-Partikeln in menschliche Vellushaarfollikel

Zur Untersuchung der Penetrationseigenschaften und der maximalen Penetrationstiefe der PLA-Partikel erfolgte nach der Herstellung der Kryoschnitte eine semiquantitative Analyse am Fluoreszenzmikroskop. Es wurden native Fotos und Fotos mit verschiedenen Filtern (WIY- bzw. NIBA-Filter) von exakt demselben Areal angefertigt und digital übereinander gelegt (Overlay Bilder). Die Penetrationstiefe der Partikel entlang des Haarkanals wurde in die Kategorien Hautoberfläche, mittlere Epidermis, dermoepidermale Grenze und tiefes Infundibulum unterteilt. Pro Hautprobe (n=3 pro Partikelsuspension, 0,5% 228 nm bzw. 365 nm PLA-Partikel) wurden 50 bis 60 Haarfollikel ausgewertet (Tab. 6).

Tab. 6: Penetrationstiefe der PLA-Partikel, semiquantitative Analyse

	Follikel ausgewertet	Keine Penetration	Mittlere Epidermis	Epidermis komplett	Tiefer
365 nm_a	63	24	9	16	14
365 nm_b	36	23	6	7	0
365 nm_c	47	20	8	9	9
228 nm_a	67	28	16	11	14
228 nm_b	50	26	12	7	5
228 nm_c	51	29	6	7	9

Keiner der beiden untersuchten Partikeltypen wies eine Penetration in die interfollikuläre Haut auf. Im Gegensatz dazu zeigte sich in etwa der Hälfte der Follikel ($48,18 \pm 13,79\%$ bzw. $49,41 \pm 7,69\%$) eine feingranuläre bzw. grobgranuläre Färbung des Follikels, die auf eine intrafollikuläre Penetration von beiden Partikelgrößen (365 nm bzw. 228 nm PLA-Partikel) in manchen Fällen bis zum tieferen Infundibulum hinweist.

In $15,99 \pm 1,49\%$ bzw. $19,19 \pm 7,03\%$ der ausgewerteten Follikel zeigte sich eine oberflächliche Penetration der 365 nm bzw. 228 nm PLA-Partikel. In $21,33 \pm 3,53\%$ und $18,34 \pm 1,48\%$ penetrierten die 365 nm bzw. 228 nm PLA-Partikel in den kompletten epidermalen Anteil des Haarfollikelinfundibulums. In $13,79 \pm 12,04\%$ bzw. $13,35 \pm 5,59\%$ ließen sich 365 nm bzw. 228

nm PLA-Partikel im tieferen Infundibulum nachweisen (Abb. 13). Nanopartikel in der perifollikulären Epidermis, in den Zellschichten des Follikels oder in den Talgdrüsen waren jedoch nicht sichtbar.

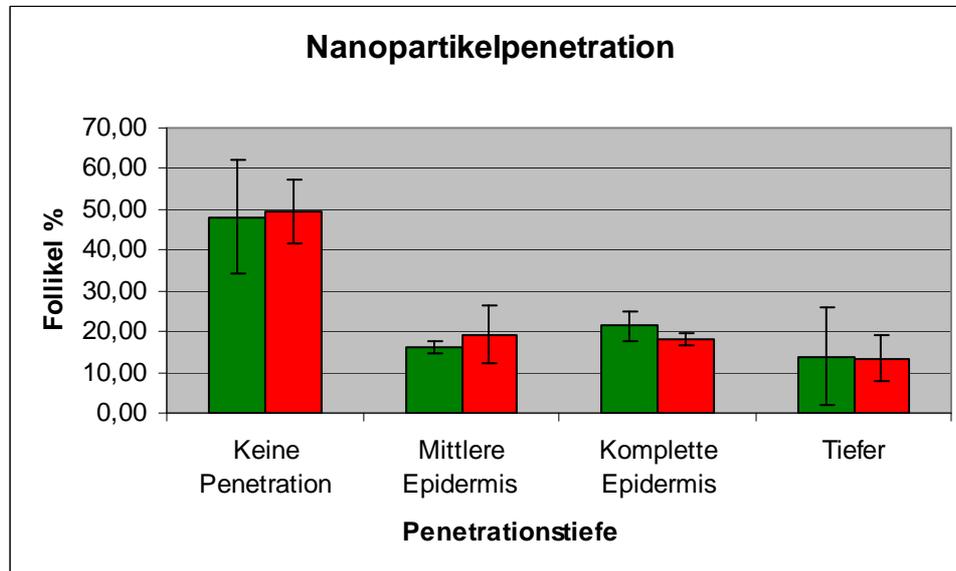


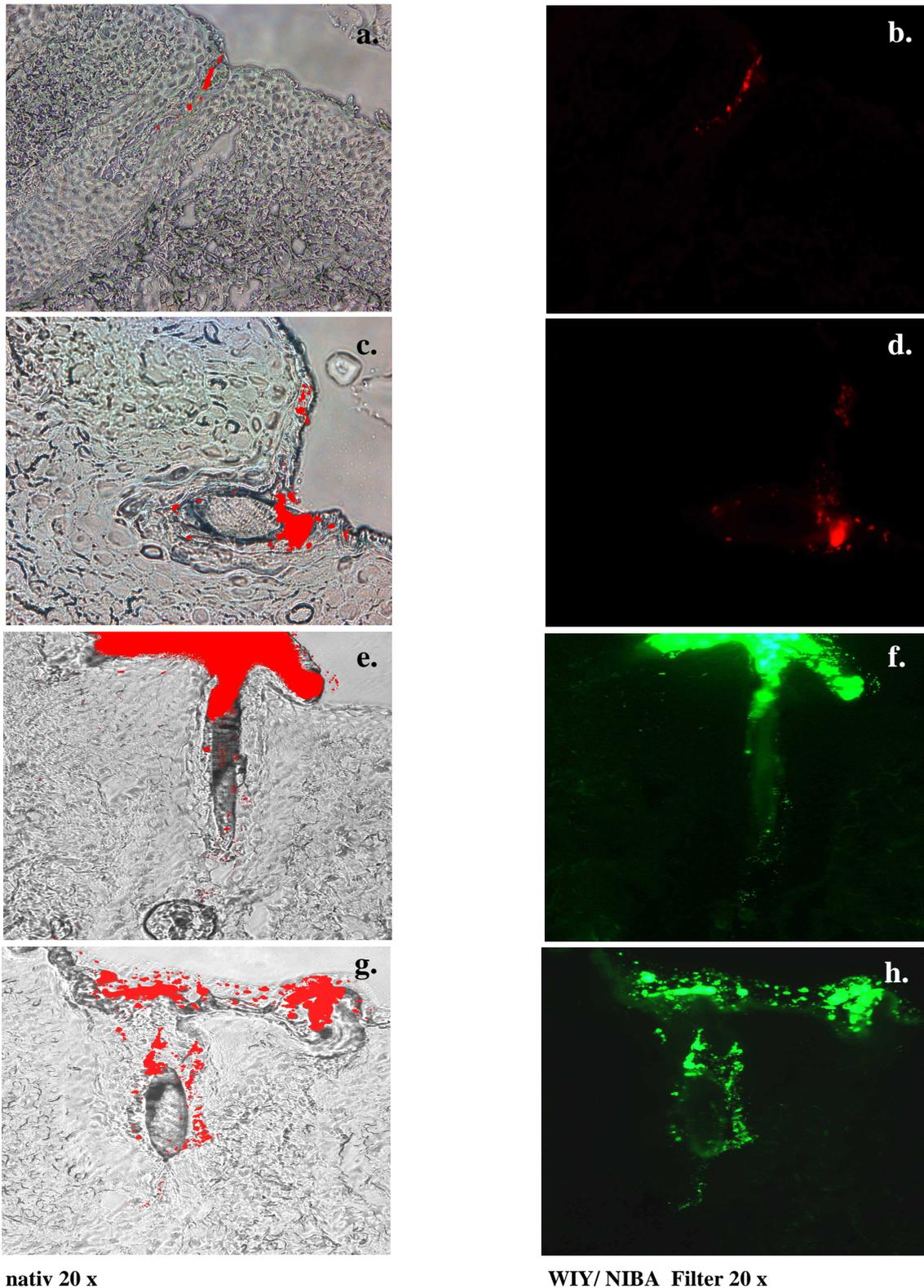
Abb. 13: Penetration der 228 nm und 365 nm PLA-Partikel in menschliche Vellushaarfollikel.

Es zeigte sich für beide Partikelgrößen in etwa der Hälfte der untersuchten Haarfollikel eine intrafollikuläre Penetration, welche in etwa 13% der Follikel bis zum tieferen Infundibulum reichte. (grün= 365 nm_Coum6 PLA-Partikel, rot= 228nm_NR PLA-Partikel)

NR: Nile Red; Coum6: Coumarin 6; PLA: Polylactic acid

In dem follikulären Kanal zeigten sich nicht nur einzelne Nanopartikel, die fluoreszenzmikroskopisch ein feingranuläres Fluoreszenzmuster aufwiesen, sondern auch große Partikelansammlungen mit einem unregelmäßigen, grobgranulären Fluoreszenzmuster. Diese intrafollikulären Partikelkonglomerate waren unterschiedlich groß und erreichten in einigen Fällen mehrere Mikrometer (Abb. 14). Sie ließen sich fluoreszenzmikroskopisch durch ihre Größe und unregelmäßige Struktur deutlich von einfachen Partikelaggregaten abgrenzen, welche sich z.T. in der Partikelstamm suspension (in PBS) bildeten und durch Schütteln oder Sonifizieren wieder auflösbar waren.

Außer der grobgranulären Färbung des Infundibulums der Haarfollikel war bei den mit 228 nm PLA_NR-NP inkubierten Hautproben auch eine deutliche diffuse rötliche Färbung (Fotos mit WIY-Filter) der Epidermis, der Haarfollikel und der Talgdrüsen auffällig (Abb. 22). Eine ähnliche, aber deutlich schwächer ausgeprägte Färbung der Epidermis fand sich bei Hautproben, die mit 365 nm PLA_Coum6-NP behandelt worden war.



nativ 20 x

WIY/ NIBA Filter 20 x

Abb. 14: Follikuläre Penetration der 365 nm PLA-Partikeln

Quer- und longitudinale Schnitte von verschiedenen Vellushaarfollikeln. Intrafollikulär zeigt sich ein grobgranuläres Fluoreszenzmuster. Das eingekapselte Fluorochrom (Coumarin 6 bzw Nile Red) fluoresziert im NIBA-Filter grün (f,h) bzw im WIY- Filter rot (b,d) Die Penetration der Nanopartikel, nicht nur im epidermalen Anteil des Haarfollikels sondern auch tiefer im Infundibulum lässt sich gut in den entsprechenden Overlay-Bildern darstellen (a,c,e,g). Das grobgranuläre Fluoreszenzmuster entspricht den Partikelaggregaten im Follikel.

In beiden Fällen wurden die enkapsulierten Farbstoffe von den Nanopartikeln oder den Konglomeraten teilweise freigesetzt; trotz der Freisetzung der Fluorochrome waren die Partikel und insbesondere die Konglomerate am Fluoreszenzmikroskop noch sichtbar.

Zusammenfassend penetrierten die PLA-Partikel beider untersuchten Größen in etwa der Hälfte der ausgewerteten Haarfollikel, wo sie maximal das tiefere Infundibulum erreichten. Im follikulären Kanal bildeten sich Partikelkonglomerate. Die diffuse Färbung der Epidermis, des Follikels und der Talgdrüse weist darauf hin, dass der enkapsulierte Farbstoff zumindest teilweise freigesetzt wurde; möglicherweise als Folge der Konglomeratbildung.

3.2 Aufnahme der PLA-Partikel von den Langerhanszellen der Epidermis

3.2.1 Aufnahme nach intrafollikulärer Penetration

Die Aufnahme der PLA-Partikel durch epidermale Langerhanszellen wurde an exzidiierter menschlicher Haut mittels Durchflusszytometrie untersucht. Es zeigte sich im Dot-Plot-Diagramm keine positive Wolke und im Histogramm keine wesentliche Verschiebung der Fluoreszenzintensitätskurve für beide untersuchten Partikelarten, 228 nm bzw. 365 nm PLA-Partikel (n=3 für jede untersuchte Partikelgröße), (Abb. 15 und 16). Das spricht gegen eine Internalisierung dieser Nanopartikel durch LHZ. Entsprechend zeigte sich fluorezenzmikroskopisch keine granuläre, auf Zellen lokalisierte Fluoreszenz.

Problematisch war die Darstellung der mit anti-CD1a-FITC Antikörpern markierten LHZ im Dot-Plot-Diagramm. FITC fluoresziert im Kanal FL1 und die 228 nm PLA_NR-NP im FL-2. Trotz der durchgeführten Kompensation zeigte sich eine deutliche Überstrahlung von FITC auf den FL-2 Kanal (Abb. 16, Pr.1). Aus diesem Grund wurden die nächsten Hautproben (Abb. 16, Pr. 2 und Pr. 3) mit anti-CD1a-APC markiert. APC fluoresziert im Kanal FL4 und strahlte nicht im FL2-Bereich hinein, sodass eine klare Identifikation von Oberflächenmarkern und Partikel-assoziiertes Fluoreszenz möglich war.

Anschließend wurden die PLA-Partikel sowie auch 200 nm Polystyren_FITC-Nanopartikel (PS_FITC-NP) auf geprickte exzidierte menschliche Haut aufgetragen und inkubiert. Ziel dieses Experimentes war es zu untersuchen, ob für die fehlende Aufnahme der PLA-Partikel die Hautbarriere oder sogar die Nanopartikel selbst ursächlich waren. Aus noch nicht publizierten Daten der Arbeitsgruppe von Dr. A. Vogt (2008) war bekannt, dass 200 nm PS-Partikel nach intrafollikulärer Penetration von den LHZ aufgenommen werden, sodass dieser Partikeltyp zur Durchführung einer Positivkontrolle verwendet wurde. PLA-Partikel und 200 nm PS_FITC-NP

wurden auf geprüfte exzidierte menschliche Haut aufgetragen und inkubiert, d.h. die Hornschicht wurde durch Lanzettenstiche künstlich unterbrochen.

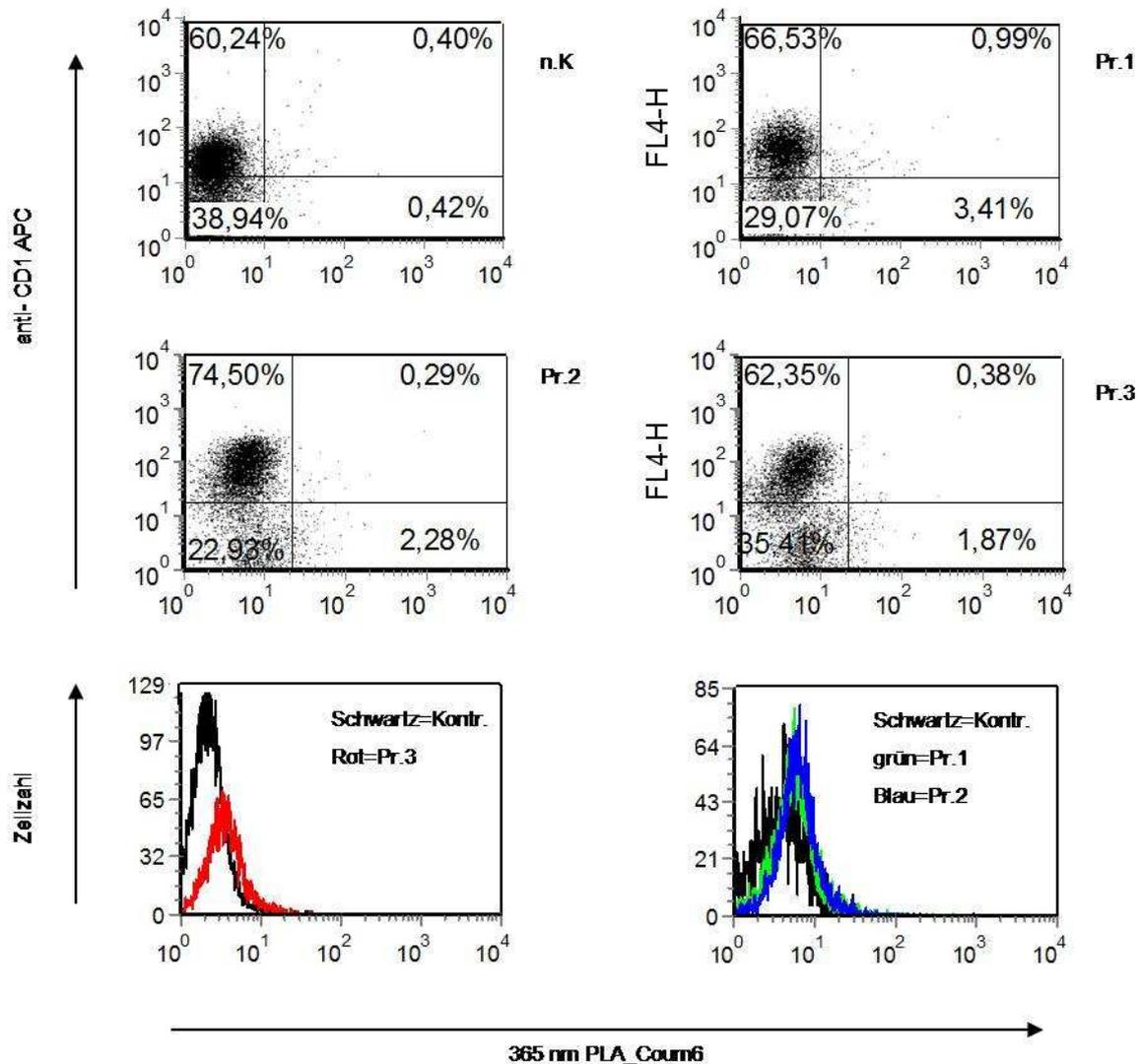


Abb. 15: Untersuchung der Aufnahme von 365 nm Coumarin 6 PLA-Partikeln durch die Langerhanszellen der Epidermis.

Es zeigte sich keine Aufnahme der 365 nm PLA_Coum6-NP durch die Langerhanszellen. (Im Dot-Plot Diagramm stellten sich keine doppelt positiv Zellen, anti-CD1-APC+ und PLA-Partikel+, dar, was gegen die Internalisierung der 365 nm PLA_Coum6-NP spricht.) Die Langerhanszellen wurden nach der Inkubation der exzidierten Haut mit der 365 nm PLA_Coum6 Partikelsuspension (nach einem CSSS, 0,5% 365 nm PLA_Coum6 NP, 16 Stunden, n=3) isoliert und markiert mit anti-CD1-APC (Pr.1-Pr.3). Als negative Kontrolle (n.K) fungierten Langerhanszellen isoliert aus unbehandelter menschlicher Haut und markiert mit anti-CD1a-APC.

Im Histogramm zeigte sich keine deutliche Verschiebung der Fluoreszenzintensitätskurven der drei untersuchten Proben (Pr.) im Vergleich zu den negativen Kontrollen, was gegen eine Aufnahme der 365 nm PLA_Coum6-NP durch die Langerhanszellen spricht.

PLA: Polylactic acid; Coum6: Coumarin6; Kontr.: Kontrolle; NP: Nanopartikel; Konz: Konzentration

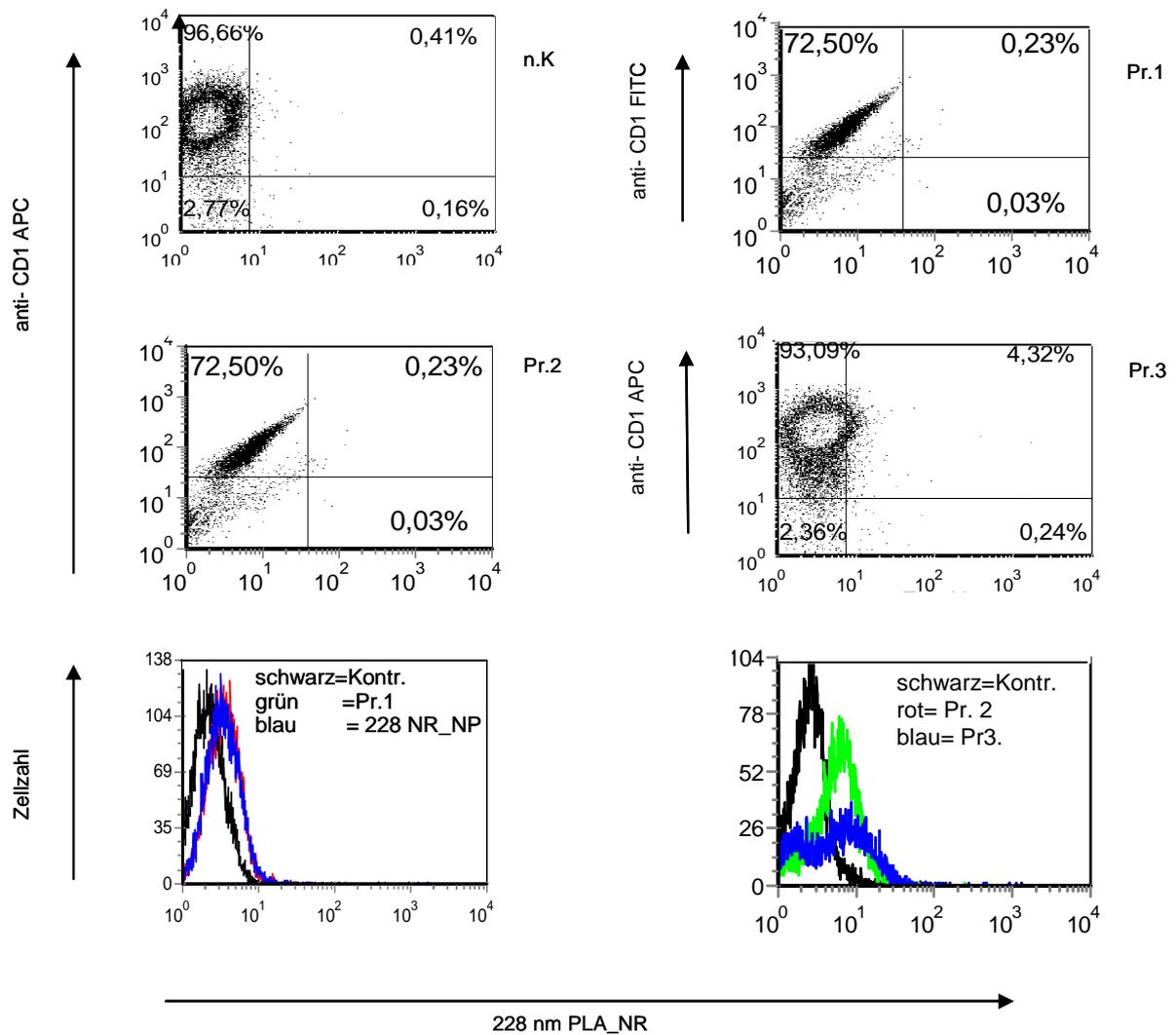


Abb. 16: Untersuchung der Aufnahme von 228 nm Nile Red PLA-Partikeln durch die Langerhanszellen der Epidermis

Es zeigte sich keine Aufnahme der 228 nm PLA_{NR}-NP durch die Langerhanszellen. (Im Dot-Plot-Diagramm zeigten sich keine doppelt positive Zellen, anti-CD1-APC⁺ und PLA-Partikel⁺, was gegen die Internalisierung der 228 nm PLA_{NR}-NP spricht). Die Langerhanszellen wurden nach der Inkubation der exzidierten Haut mit der 365 nm PLA_{Coum6} Partikelsuspension (nach einem CSSS, 0,5% 228 nm PLA_{NR}-NP, 16 Stunden, n=3) isoliert und markiert mit anti-CD1a-APC (Pr.2-Pr.3). Nach der Markierung mit anti-CD1a-FITC (Pr.1), zeigte sich eine deutliche Überstrahlung vom FITC (gemessen im Kanal FL1) in den FL2 -Bereich, die nicht adäquat kompensiert werden konnte, sodass bei den nächsten Proben die Markierung mit anti-CD1a-APC erfolgte.

Als Negativkontrolle (n.K) fungierten Langerhanszellen isoliert aus unbehandelter menschlicher Haut und markiert mit anti-CD1 -APC.

Im Histogramm zeigte sich keine deutliche Verschiebung der Fluoreszenzintensitätskurven der drei untersuchten Proben (Pr.) im Vergleich zu den negativen Kontrollen, was gegen eine Aufnahme der 365 nm PLA_{Coum6}-NP durch die Langerhanszellen spricht.

PLA: Polylactic acid; Coum6: Coumarin6; Kontr.: Kontrolle; NP: Nanopartikel; Konz: Konzentration

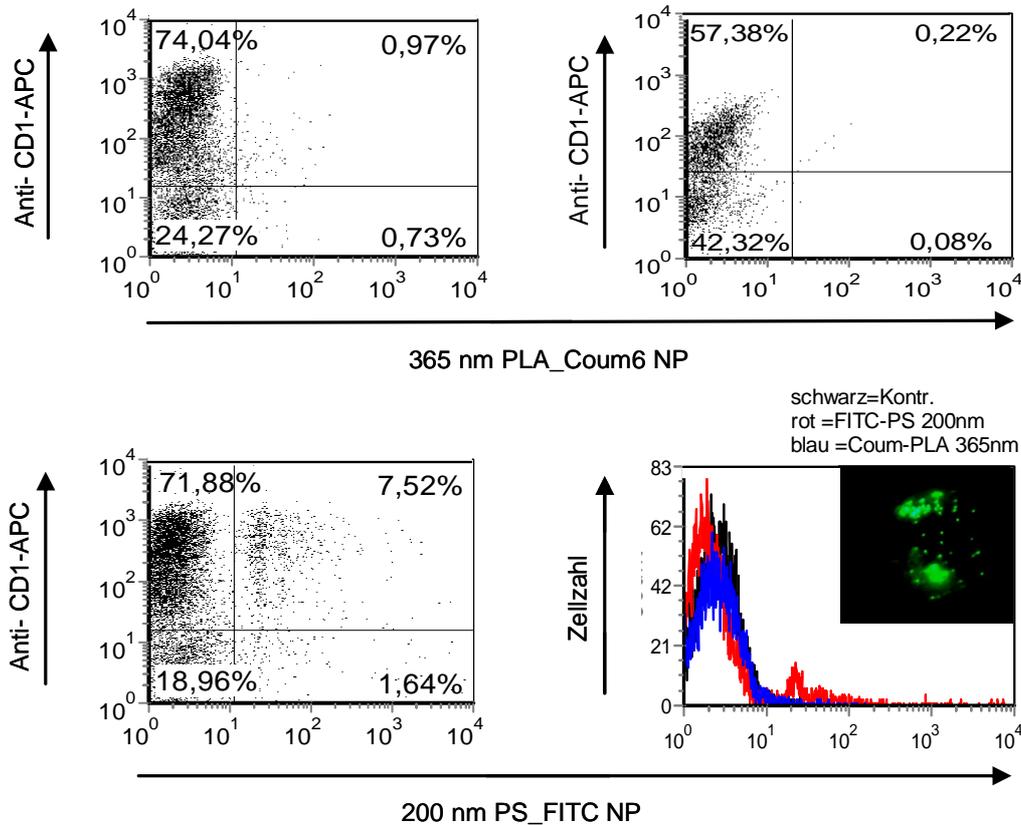


Abb. 17: Geprickte Hautproben

Nach der Störung der Hautbarriere durch Pricken zeigte sich keine Aufnahme der PLA-Partikel durch Langerhanszellen der Epidermis. Im Gegensatz dazu wurden bei 7,52% der Langerhanszellen die 200 nm PS_FITC-NP internalisiert. Eine Bestätigung dieses Befundes erfolgte durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Des Weiteren zeigte sich im Histogramm eine deutliche Verschiebung der Fluoreszenzintensitätskurve der 200 nm PS_FITC Probe (rot) im Vergleich zu der negativen Kontrolle und der 365 nm PLA_Coum6 -NP (blau). PS: Polystyren; NP: Nanopartikel; PLA: Polylactic acid; Kontr.: Kontrolle; Coum6: Coumarin6

Durch diese sicherere Unterbrechung der Hautbarrierefunktion und durch die Anwendung der standardisierten, stark fluoreszierenden PS-Partikel (vergleichbarer Größe zu den 228 nm PLA-Partikel) sollte geklärt werden, warum keine Aufnahme erfolgte. In der FACS-Analyse waren in der Tat PS-Partikel, nicht aber PLA-Partikel, in isolierten LHZ nachweisbar. Es zeigten sich 0,22% anti-CD1a⁺/228 nm PLA_NR-NP⁺ und 0,97% anti-CD1a⁺/365 nm PLA_Coum6-NP⁺ LHZ, im Gegensatz zu 7,52% anti-CD1a⁺/200 nm PS_FITC-NP⁺ LHZ (Abb. 17).

Ebenso zeigte sich in den Histogrammen nur für die 200 nm PS_FITC-NP eine Verschiebung der Fluoreszenzintensitätskurve. Diese Verschiebung bestätigt den im DOT-PLOT Diagramm

dargestellten Befund der PS-Partikel Aufnahme durch die LHZ (Abb. 17). Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung aller Proben zeigte sich nur für die PS-Partikel ein feingranuläres Fluoreszenzmuster auf den untersuchten LHZ.

Zusammenfassend zeigte sich nach Inkubation der Haut mit den zwei Partikelsuspensionen keine Aufnahme der PLA-Partikel, weder der größeren (365 nm) noch der kleinen (228 nm) PLA-Partikel, durch die epidermalen LHZ. Bei gestörter Hautbarrierefunktion (nach Pricken) wurden die 200 nm PS-Partikel, die als positive Kontrolle fungierten, von den LHZ aufgenommen (7,52% positive LHZ), nicht aber PLA-Partikel.

3.2.2 *In vitro* Aufnahme der PLA-Partikel durch isolierte Langerhanszellen der Epidermis

Um zu untersuchen, ob die PLA-Partikel prinzipiell von den Langerhanszellen aufgenommen werden können, wurden frisch isolierte Langerhanszellen (n=10) Hautproben *in vitro*, d.h. in der Zellkultur, mit den PLA-Partikeln inkubiert. Insgesamt wurden vier verschiedene Partikelgrößen, 228 nm, 365nm, 375 nm und 423 nm und zwei verschiedene Konzentrationen, 10 µg/ml und 50 µg/ml untersucht.

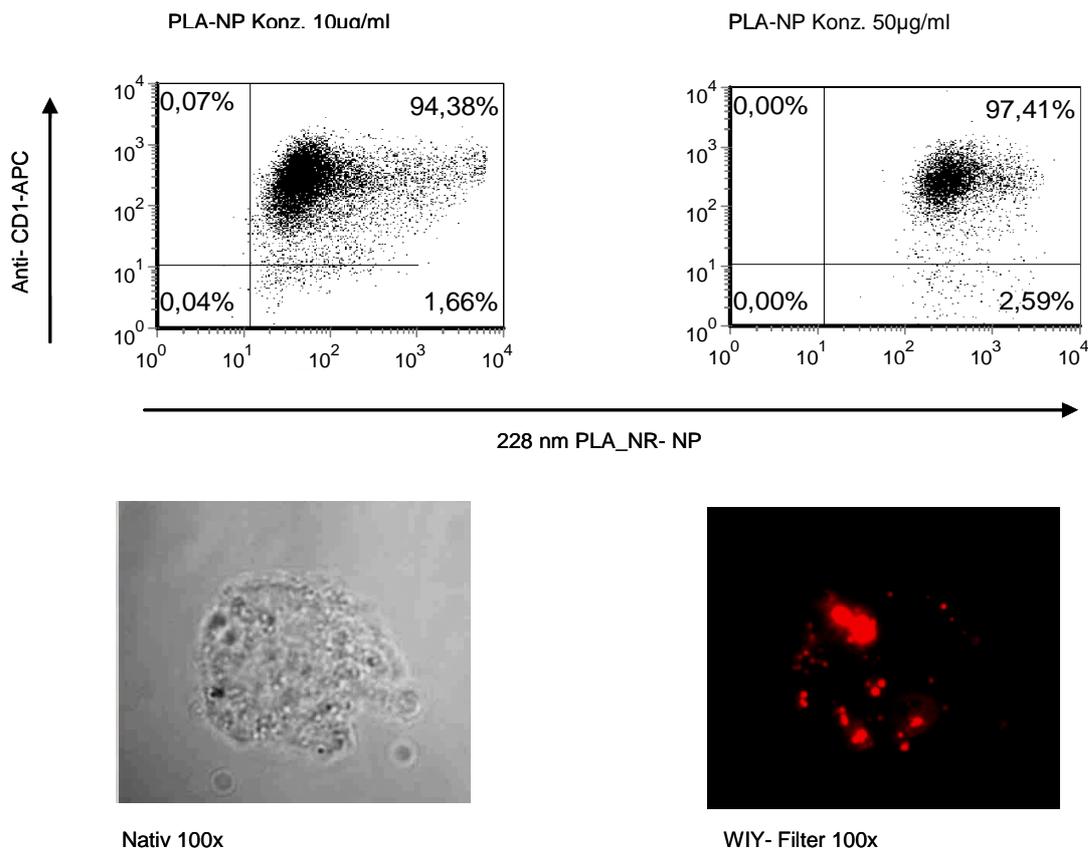


Abb. 18: *In vitro* Aufnahme der 228 nm PLA-Partikel durch Langerhanszellen

Nach der Inkubation von isolierten Langerhanszellen in der Zellkultur (2 Stunden, 37°C) mit 228 PLA_{NR}-NP zeigte sich eine Partikelaufnahme. Die Aufnahme der 228 PLA_{NR}-NP wurde von der Konzentration der Partikelsuspension nicht beeinflusst.

Der Befund wurde am Fluoreszenzmikroskop bestätigt, wo sich ein feingranuläres Muster auf den Zellen zeigte.

NP: Nanopartikel; PLA: Polylactic acid; NR: Nile Red; Konz: Konzentration

Die FACS-Untersuchungen bestätigten, dass LHZ *in vitro* durchaus PLA-Partikel aufnehmen können. Die Partikel waren in wässriger Lösung stabil. Nach Inkubation von 228 nm PLA_{NR}-NP in Gegenwart von isolierten LHZ zeigten sich Aufnahmen von 94,98% bei NP-Konzentration

von 10 $\mu\text{g/ml}$ und 95,95% bei NP-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$. Die Aufnahme dieser Partikel wurde durch die Variation der Partikelkonzentration nicht maßgeblich beeinflusst (Abb. 18).

Im Gegensatz dazu zeigte sich nach Inkubation von 10 $\mu\text{g/ml}$ 423 nm PLA_Coum6-Nanopartikelsuspensionen keine Partikelaufnahme ($n=2$, anti-CD1-APC+/423 nm PLA_Coum6-NP+ Langerhanszellen: 0,09% und 0,02%). Erst Langerhanszellsuspensionen, die mit der 50 $\mu\text{g/ml}$ Nanopartikelsuspension inkubiert wurden, nahmen diese Partikel auf (Abb. 21).

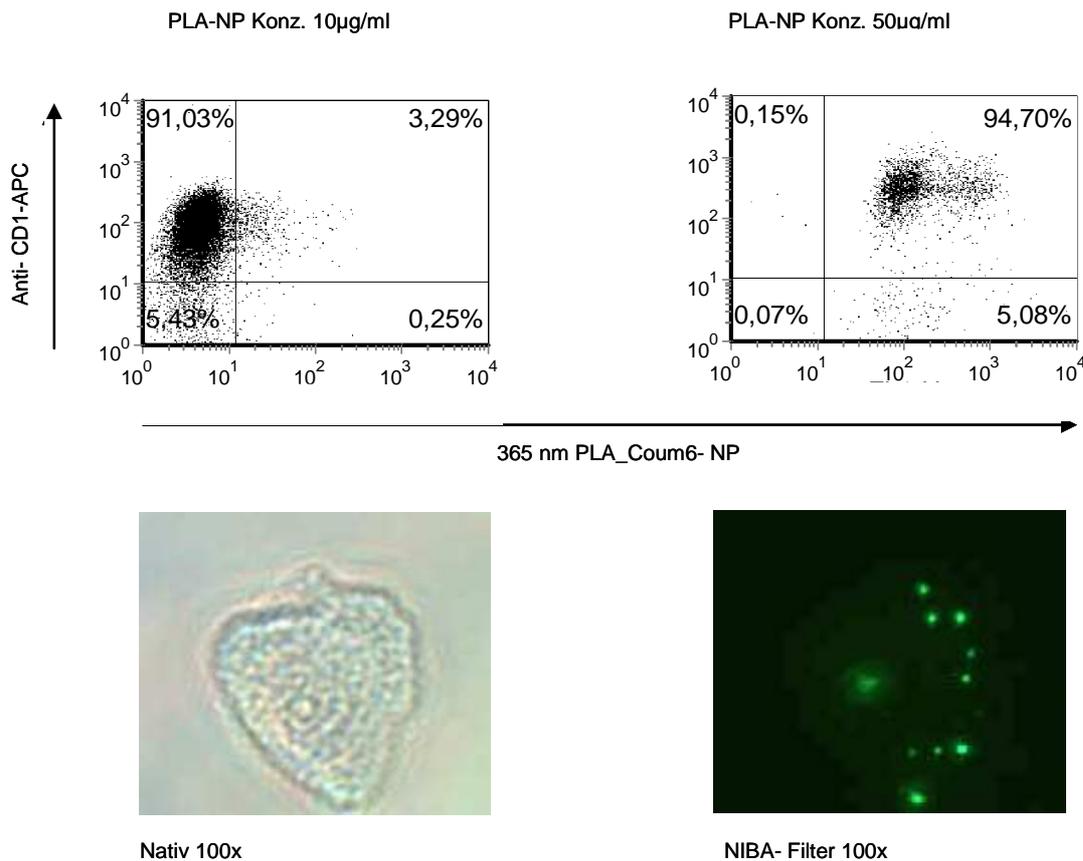


Abb. 19: *In vitro* Aufnahme der 365 nm PLA-Partikel durch Langerhanszellen.

Nach der Inkubation von isolierten Langerhanszellen in der Zellkultur (2 Stunden, 37°C) mit 365nm PLA_Coum6-NP zeigte sich eine Partikelaufnahme und der Befund wurde am Fluoreszenzmikroskop bestätigt, wo sich ein freigranuläres Muster auf den Zellen zeigte. Nach Inkubation mit der 50 $\mu\text{g/ml}$ Partikelsuspension stellte sich die Mehrheit (4,70%) der Langerhanszellen im Dot-Plot-Diagramm als positiv dar, im Gegensatz zu den Langerhanszellen (3,29%) die mit der 10 $\mu\text{g/ml}$ Partikelsuspension inkubiert wurden.

NP: Nanopartikel; PLA: Polylactic acid; Coum6: Coumarin6; Konz: Konzentration

Bei den 375 nm PLA_NR-NP bzw. 365 nm PLA_Coum6-NP zeigte sich eine beschränkte Partikelaufnahme nach der Inkubation mit der jeweiligen 10 $\mu\text{g/ml}$ Partikelsuspension (3,15%

und 3,05% bzw. 3,29%). Nach Anwendung der hohen Konzentration (50 $\mu\text{g/ml}$) zeigten jedoch fast alle LHZ eine Partikelaufnahme (99,35% bzw. 94,7%)(Abb.19 und 20).

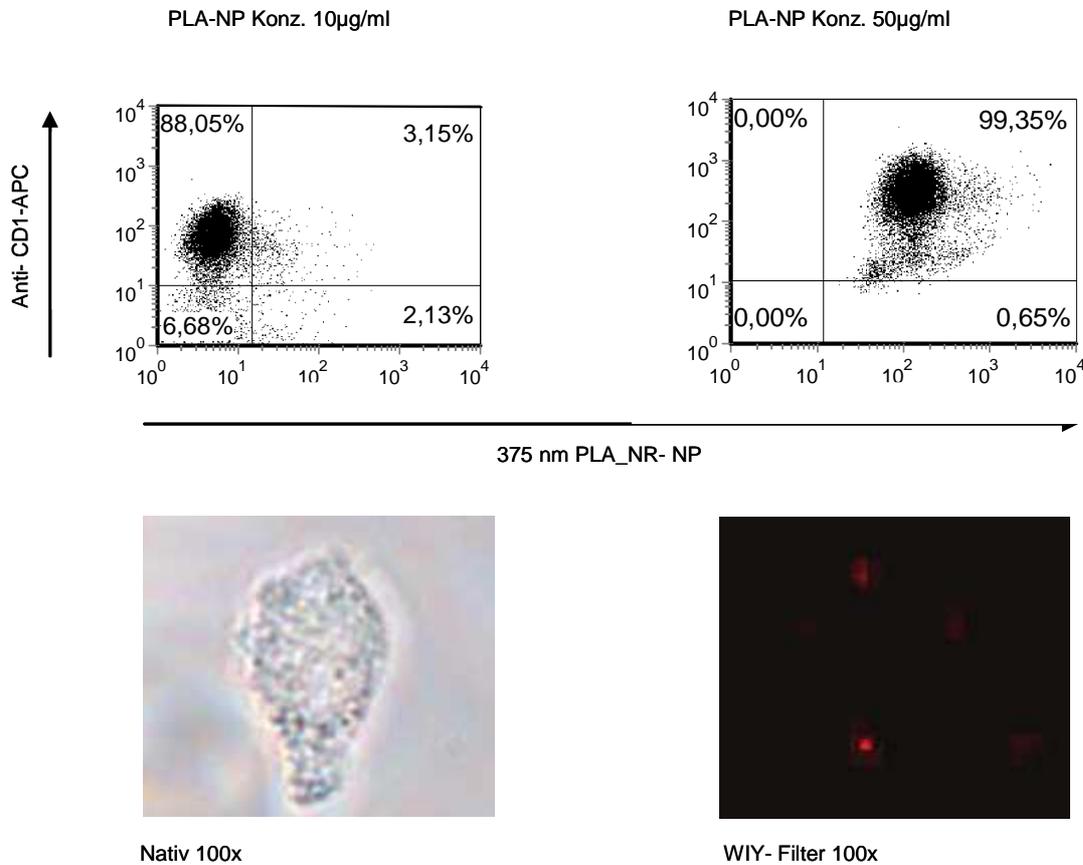


Abb. 20: Aufnahme der 375 nm PLA-Partikel durch Langerhanszellen *in vitro*.

Nach der Inkubation von isolierten Langerhanszellen in der Zellkultur (2 Stunden, 37°C) mit 375 nm PLA_NR-NP zeigte sich eine Partikelaufnahme und der Befund wurde am Fluoreszenzmikroskop bestätigt, wo sich ein feingranuläres Muster auf den Zellen zeigte. Nach Inkubation mit der 50 $\mu\text{g/ml}$ Partikelsuspension stellte sich die Mehrheit (99,35%) der Langerhanszellen im Dot-Plot-Diagramm als positiv dar, im Gegensatz zu den Langerhanszellen (3,15%) die mit der 10 $\mu\text{g/ml}$ Partikelsuspension inkubiert wurden.

NP: Nanopartikel; PLA: Polylactic acid; NR: Nile Red; Konz: Konzentration

Die Schlussfolgerung dieser *in vitro* Versuche ist, dass die PLA-Partikel aller untersuchten Größen (228nm, 365 nm, 375 nm und 423 nm) von den LHZ aufgenommen werden können. Diese Aufnahme ist jedoch größenabhängig und konzentrationsabhängig, d.h. kleinere Partikel werden bereits bei niedrigeren Konzentrationen effizient aufgenommen, während zur Aufnahme von größeren Partikeln höhere Konzentrationen erforderlich sind.

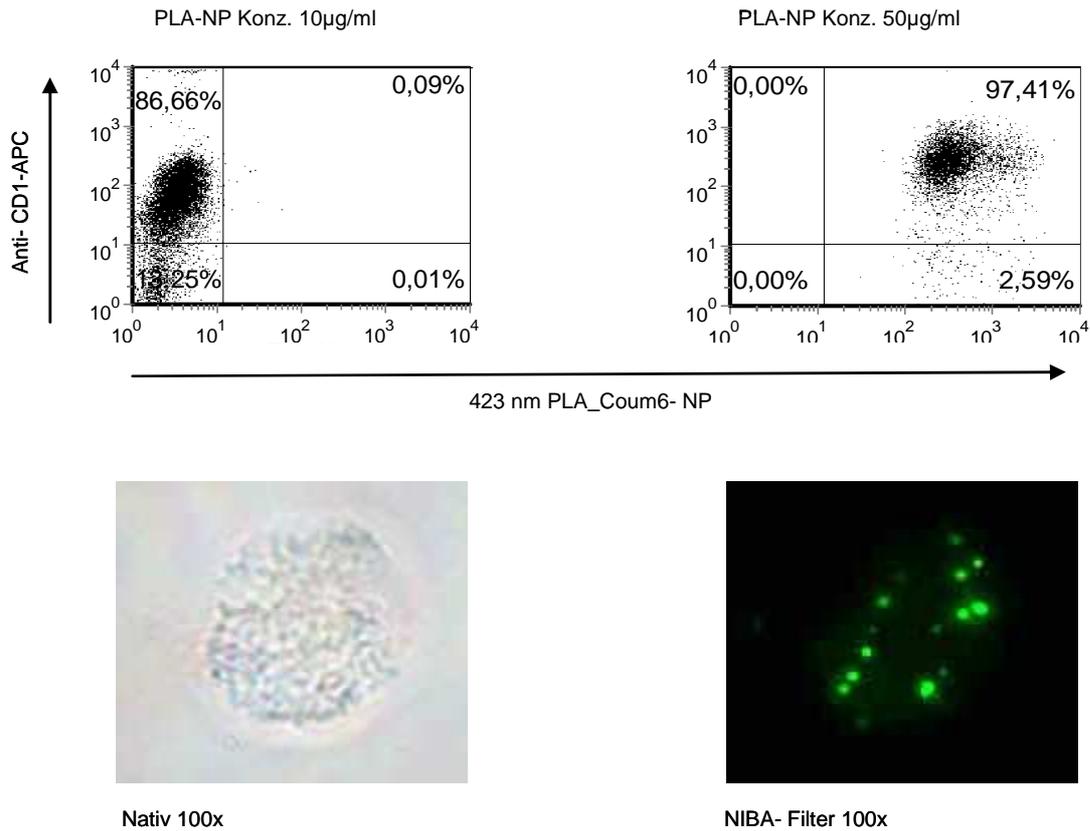


Abb. 21: *In vitro* Aufnahme der 423 nm PLA-Partikel durch Langerhanszellen

Nach Inkubation von isolierten Langerhanszellen in der Zellkultur (2 Stunden, 37°C) mit der 10 µg/ml 423 nm PLA_Coum6-NP zeigte sich keine Partikelaufnahme durch die Langerhanszellen, im Gegensatz zu den Langerhanszellen die mit der 50µg/ml Zellsuspension inkubiert wurden (97,41% Zellen zeigten eine Partikelaufnahme im Dot- Plot Diagramm). Die Bestätigung des Ergebnisses erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

NP: Nanopartikel; PLA: Polylactic acid; Coum6: Coumarin6; Konz: Konzentration

3.3 Farbstofffreisetzung aus den PLA-Partikeln

Die potentielle Anwendung der PLA-Partikel als Wirkstoffträger für die lokale Dermatotherapie erforderte die Untersuchung der Wirkstofffreisetzung *in vitro*. Als Modellwirkstoffe wurden zwei fluoreszierende lipophile Farbstoffe, Nile Red und Coumarin 6, angewendet. Ihre Fluoreszenz ermöglichte die Anwendung verschiedener Methoden wie die Fluoreszenzmikroskopie, die konfokale Laserscanmikroskopie, die Durchflusszytometrie und die Fluoreszenzspektrophotometrie.

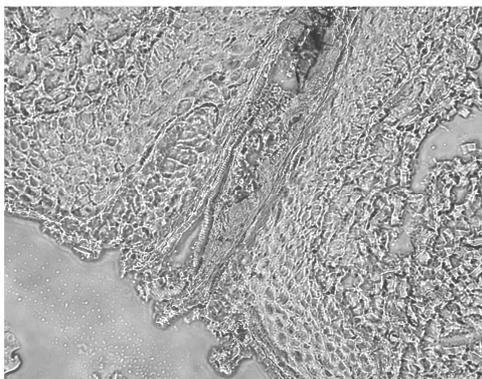
3.3.1 Untersuchung der Freisetzung von Nile Red aus PLA-Partikeln nach Kontakt mit exzidiierter menschlichen Haut

Mit Hilfe dieser Nile Red Kinetik wurde die Freisetzung des enkapsulierten Farbstoffs im Vellushaarfollikel untersucht. Nach Behandlung der exzidierten menschlichen Haut mit der 228 nm PLA_NR Partikelsuspension zeigte sich eine zeitabhängige Verfärbung nicht nur des Follikels, sondern auch der interfollikulären Epidermis und tieferer Strukturen wie die Talgdrüse. Die unbehandelte Haut weist im WIY-Filter nur eine schwache rote Eigenfluoreszenz auf, die vor allem im Stratum corneum und im Talg im Haarfollikel lokalisiert ist. Talgdrüse und Dermis sind nicht erkennbar (Abb. 22a).

Nach 2 Stunden Inkubation mit der 228 nm PLA_NR-Partikelsuspension bei 37°C sah man im Follikelostium und im oberen Infundibulum des Follikels einzelne Partikel und insbesondere Partikelkonglomerate (siehe auch Par. 3.1). Nur die Epidermis war im WIY-Filter leicht rot verfärbt. Der Talg im Haarfollikel wies die eigene schwache Eigenfluoreszenz auf und die Talgdrüse und die Dermis fluoreszierten nicht, genauso wie bei unbehandelter Haut (Abb. 22b).

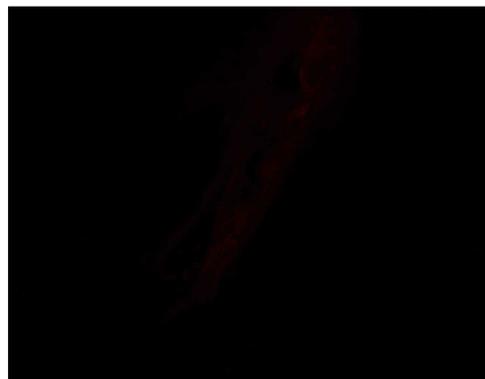
A. 0 Stunden Inkubation

Nativ 20x



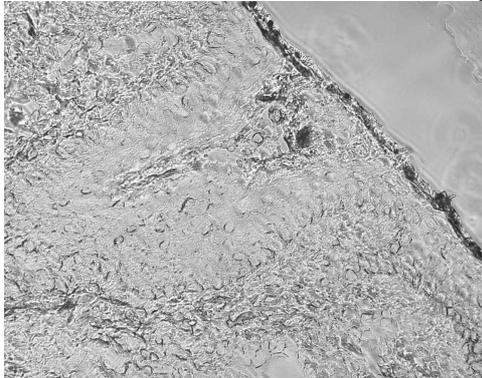
Epidermis

WIY- Filter 20x



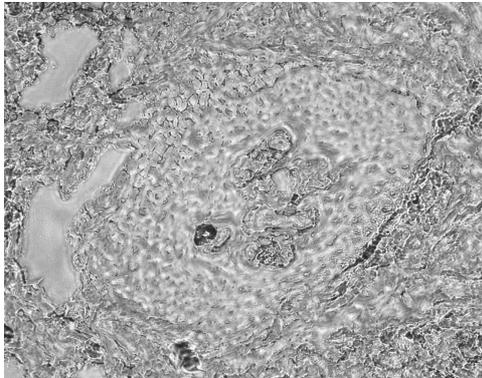
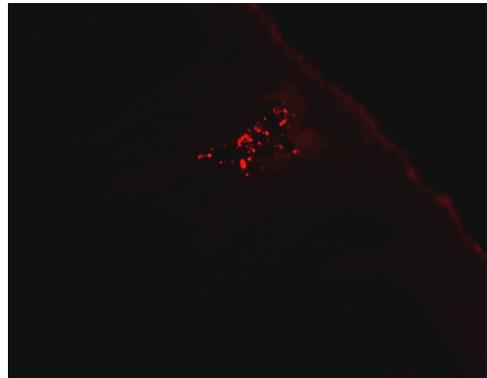
B. 2 Stunden Inkubation

Nativ 20x

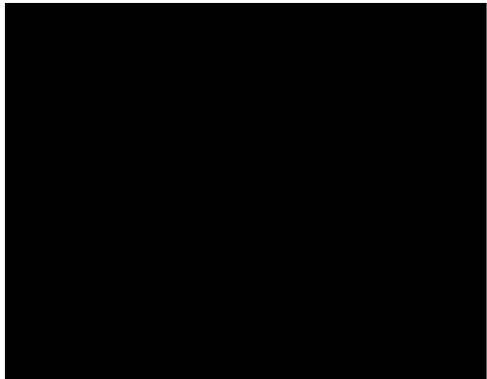


Epidermis und Follikel

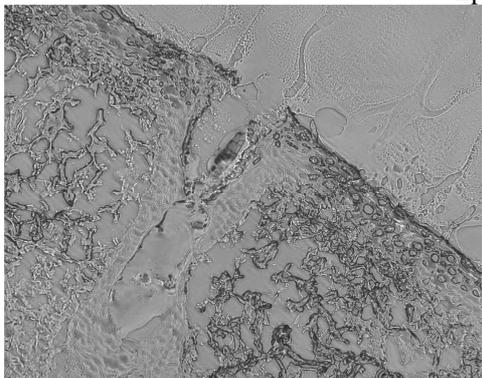
WIY- Filter 20x



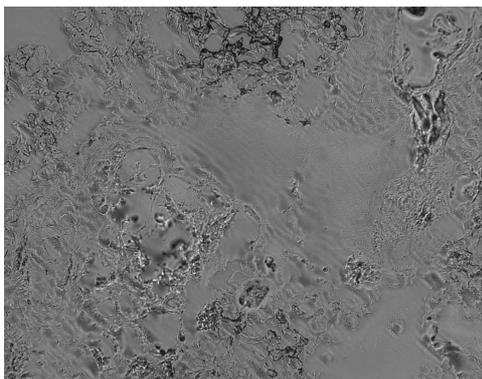
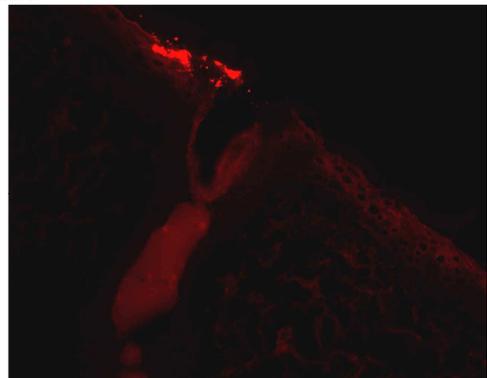
Talgdrüse



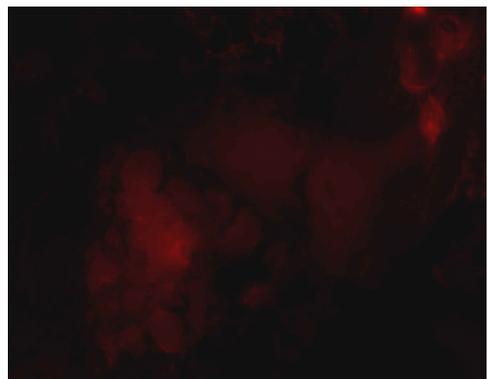
C. 4 Stunden Inkubation



Epidermis und Follikel

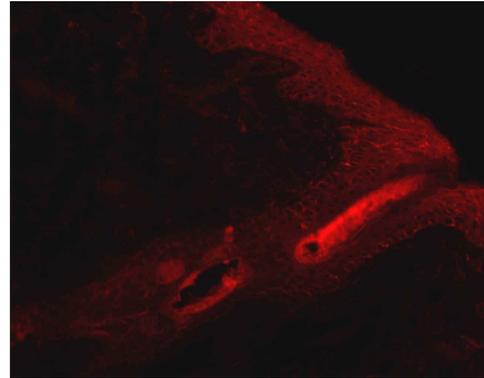
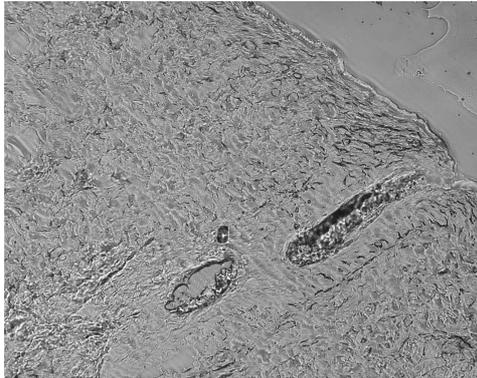


Talgdrüse

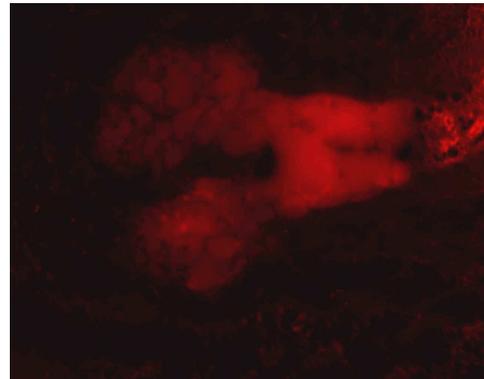
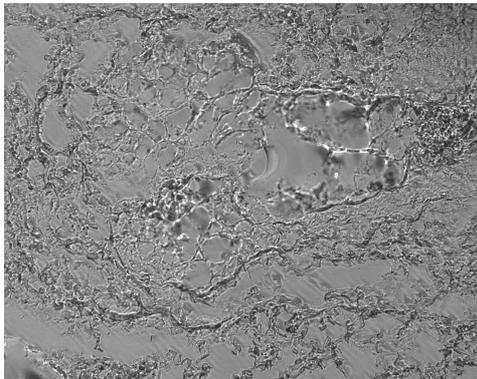


D. 8 Stunden Inkubation

Epidermis und Follikel

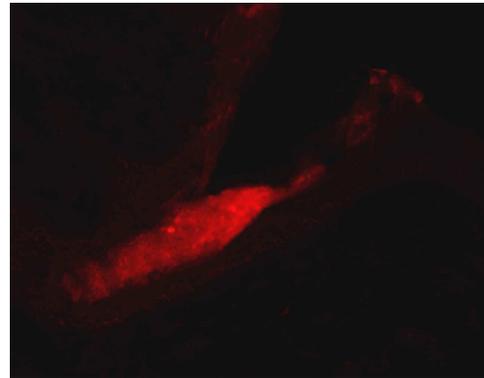
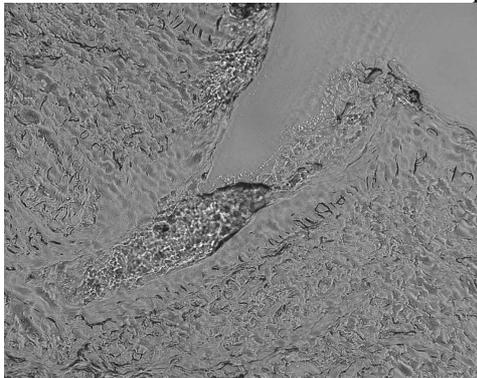


Talgdrüse

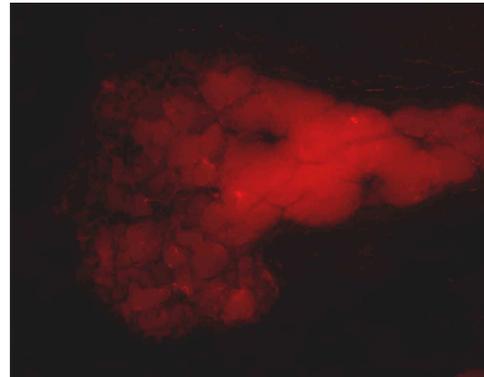
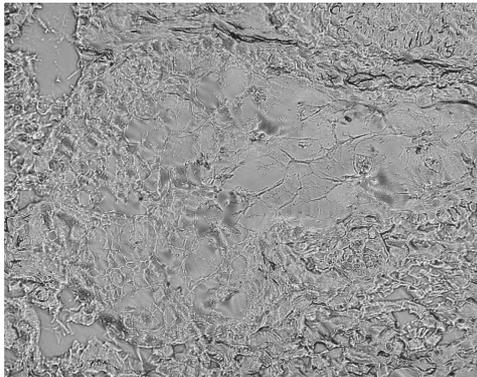


E. 16 Stunden Inkubation

Epidermis und Follikel



Talgdrüse



F. 24 Stunden Inkubation

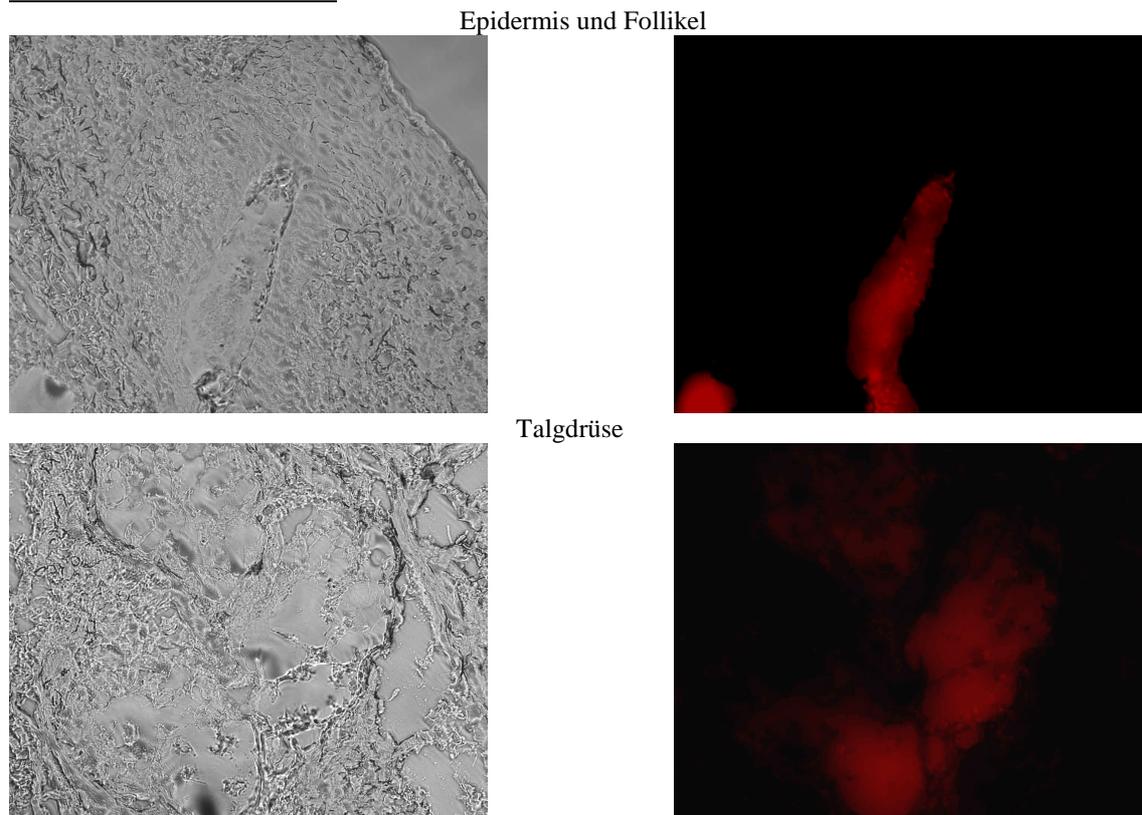


Abb. 22: Diffuse Verfärbung der Epidermis, des Follikels und der Talgdrüse nach Behandlung der Haut *ex vivo* mit 228 nm PLA_Nile Red-Partikeln

(Fluoreszenzmikroskopie, 20-fache Vergrößerung, Nativ und WIY Filter) Zeitabhängige diffuse Verfärbung der Epidermis, des Follikels und der Talgdrüse, im Verlauf der Zeit werden tiefere Strukturen wie die Talgdrüsen stärker verfärbt und die Verfärbung der Epidermis nimmt nach einem Maximum nach 8 Stunden wieder ab. Die Aggregation und die Penetrationstiefe der Partikel sind ebenso zeitabhängig. Nach 16 Stunden Inkubation sind die Partikelaggregate kaum noch erkennbar.

PLA: Polylactic acid

Nach 4 Stunden sah man Partikelkonglomerate im Infundibulum bis zum Ausführungsgang der Talgdrüse. Epidermis und Talgdrüse zeigten eine diffuse rote Verfärbung (Abb. 22c), welche nach 8 Stunden weiter zunahm (Abb. 22d). Nach 16 Stunden erreichte die rötliche Verfärbung der Talgdrüse und des Talges im Haarfollikel ein Maximum, während die rötliche Verfärbung der Epidermis abnahm. Partikelaggregate waren kaum noch erkennbar (Abb. 22e).

Schließlich waren nach 24 Stunden nur Talgdrüse und Talg rot verfärbt, wobei die Intensität jener Verfärbung erniedrigt war. Die Epidermis war nicht mehr verfärbt, was als ein Absinken der Fluoreszenz zu beobachten war. Partikelkonglomerate waren nicht mehr erkennbar (Abb. 22f). Diese Kinetik bestätigte eine zeitabhängige Freisetzung des Fluorochroms Nile Red und

demzufolge eine Verfärbung nicht nur des Follikels sondern auch der Epidermis und der Talgdrüsen. Zuerst verfärbten sich die Epidermis und die oberflächlichen Anteile des Follikels, später auch die tieferen. Bemerkenswert war die Persistenz des Signals in den Talgdrüsen über 24 Stunden.

3.3.2 Visualisierung des Nile Red in der Epidermis, im Follikel und in der Talgdrüse mit der Hilfe des konfokalen Laserscannmikroskops.

Die Untersuchung einzelner Schnitte der zuvor gezeigten Kinetik bestätigte die rötliche Verfärbung der Epidermis, des folliculären Epithels (Abb. 23 b,c), des Talges und der Talgdrüse nach der Inkubation exzidiierter menschlicher Haut mit 228 nm PLA_NR-Partikelsuspensionen. Das Zytoplasma der Epidermiszellen und der Zellen des folliculären Epithels, sowie auch die Talgdrüse und der Talg im Haarfollikelgang wiesen eine diffuse rötliche Verfärbung auf.

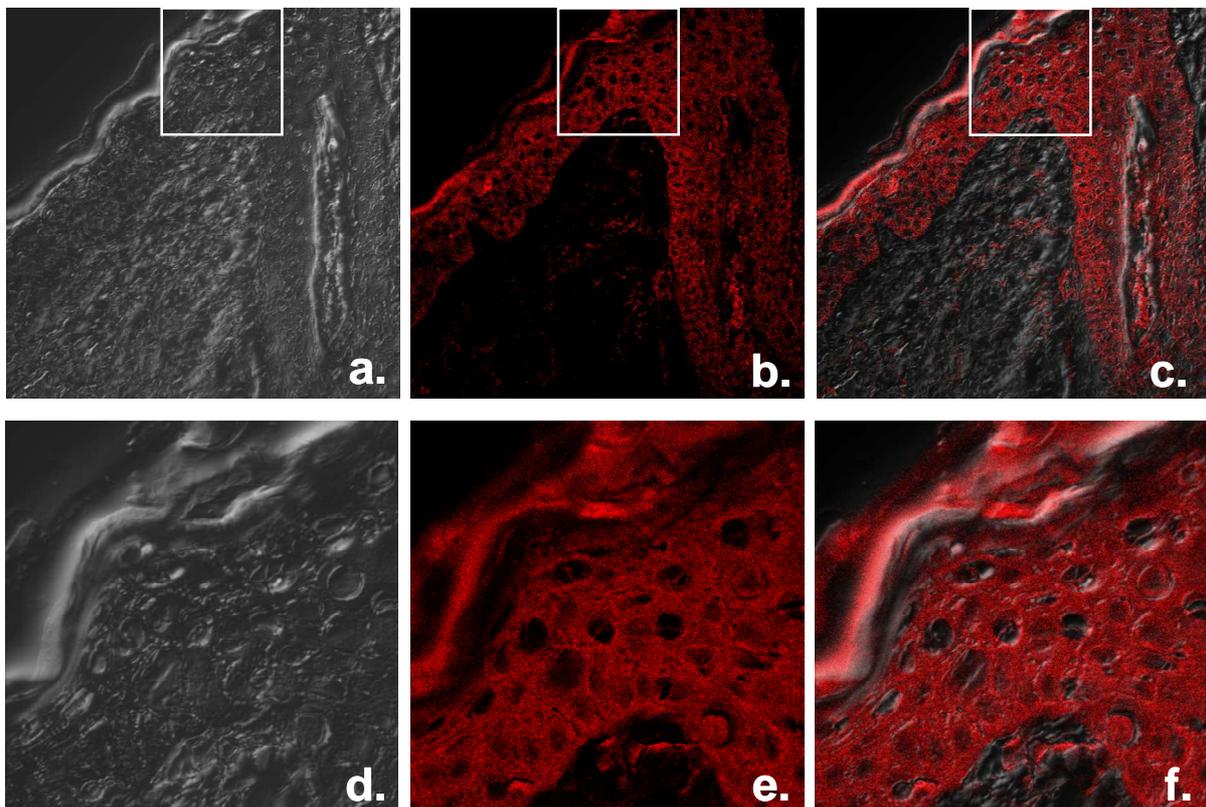


Abb. 23: Nile Red Freisetzung aus 228 nm PLA-Partikeln ex vivo

(Konfokales Laserscannmikroskop, native Bilder (a+d), overlay Bilder (c+f))

Nach 4 Stunden Inkubation mit 228 nm PLA_NR-NP (0,5%) zeigte sich eine Verfärbung der Epidermis, des Follikels und der Talgdrüse durch das freigesetzte NR. NR: Nile Red; PLA: Polylactic acid; NP: Nanopartikel

Die Zellkerne imponierten als dunkle, ovale Areale zentral oder dezentral der in den Zellen (Abb. 23 e,f). Die Dermis in direkter Nachbarschaft zur Epidermis und den folliculären Anteilen

zeigte ebenfalls eine rote Fluoreszenz, die jedoch viel schwächer ausgeprägt war. Das spricht für eine Diffusion des freigesetzten Farbstoffes durch die Hautbarriere des Follikels.

3.3.3 Nile Red und Coumarin 6 Freisetzung *in vitro*

Die kontrollierte Wirkstofffreisetzung aus den Trägerpartikeln ist ein wichtiges Ziel bei der Entwicklung neuer Systeme für die lokale Dermatotherapie. Durch das Aufrechterhalten von hohen Wirkstoffkonzentrationen über längere Zeiträume würde der therapeutische Effekt maximiert und die Toxizität reduziert (Par. 1.4.3). Destabilisierung von PLA-Partikeln und Farbstofffreisetzung nach Hautkontakt ist eine mögliche Erklärung für die beobachtete diffuse Fluoreszenz, umso mehr als die verwendeten Partikel in wässriger Lösung stabil erschienen. Aus diesem Grund wurde die Freisetzung der zwei Farbstoffe in zwei verschiedenen Lösungsmitteln, Hexan und Isopropylmyristat (IPM), *in vitro* untersucht. Hexan ist ein stark lipophiles organisches Lösungsmittel und IPM weist Ähnlichkeiten zu der lipophilen Natur des Sebums und des Stratum corneum auf (Par. 2.3.7).

In der Tat zeigte sich *in vitro* eine zeitabhängige Freisetzung des Nile Red und des Coumarin 6 aus den PLA-Partikeln (228 nm PLA_NR-NP und 423 nm PLA_Coum6-NP). Wie man an den Abbildungen 25 und 27 sehen kann, folgte die Farbstofffreisetzung in den ersten 4-8 Stunden einem linearen Muster, anschließend wurde die Freisetzung verlangsamt und erreichte nach 16 Stunden ein Plateau. Konkret wurde nach 24h Inkubation der zwei verschiedenen zweiphasigen Lösungen (PBS/Hexan 1:1 und PBS/IPM 1:1) in Hexan $9,95 \pm 2,27\%$ (n=3) und in IPM $6,89 \pm 2,18\%$ (n=3) des in den PLA-Partikeln ursprünglich eingekapselten Nile Red gemessen. Die gemessenen Konzentrationen betragen $121,40 \pm 27,75$ ng/ml (n=3) für Nile Red in Hexan und $84,05 \pm 26,55$ ng/ml (n=3) in IPM. Die ursprüngliche Konzentration der PLA_NR Partikelsuspension in PBS betrug 610 mg/ml und entsprach einer Nile Red Konzentration von 1200 ng/ml (die Konzentration des eingekapselten Nile Red war 0,2%) (Abb.22-25).

Ähnlich wie bei der Untersuchung der Nile Red Freisetzung wurde nach 24h Inkubation der zwei verschiedenen zweiphasigen Lösungen (PBS/Hexan 1:1 und PBS/IPM 1:1) in Hexan $37,98 \pm 10,07\%$ (n=3) und in IPM $9,42 \pm 3,44\%$ (n=3) des in den PLA-Partikeln ursprünglich eingekapselten Coumarin 6 gemessen. Die gemessenen Konzentrationen betragen $46,34 \pm 12,28$ ng/ml (n=3) für Coumarin 6 in Hexan und $11,49 \pm 4,20$ ng/ml (n=3) in IPM. Die ursprüngliche Konzentration der PLA_Coum6-Partikelsuspension in PBS betrug 610 mg/ml und entsprach einer Coumarin 6 Konzentration von 120 ng/ml) (Abb. 24-27). Es ist wichtig darauf hinzuweisen, dass die Konzentration des eingekapselten Coumarin 6 in den einzelnen Partikeln 10-fach geringer war als die des Nile Red. Das lässt sich durch die stärkere Fluoreszenz des

Coumarin 6 erklären, weshalb vom Partikelhersteller kleinere Konzentrationen des Coumarin 6 benutzt wurden.

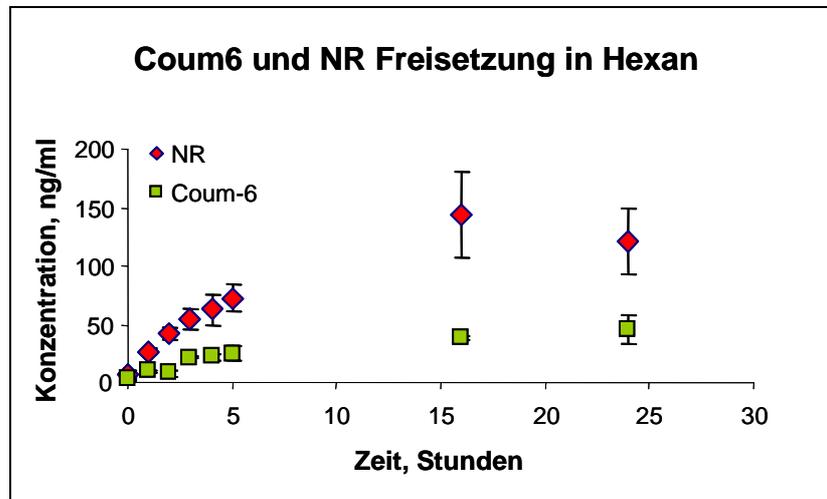


Abb. 24: NR und Coum6 Freisetzung in PBS: Hexan (1:1) Lösung. Konzentration des freigesetzten NR in Hexan

Nach 16 h zeigte sich die maximale kumulative Konzentration von freigesetztem Nile Red ($144,45 \pm 36,86$ ng/ml, $n=3$) und nach 24h von Coum6 ($46,34$ ng/ml $\pm 12,28$ ng/ml, $n=3$) in Hexan. Coum6: Coumarin6; NR: Nile Red,

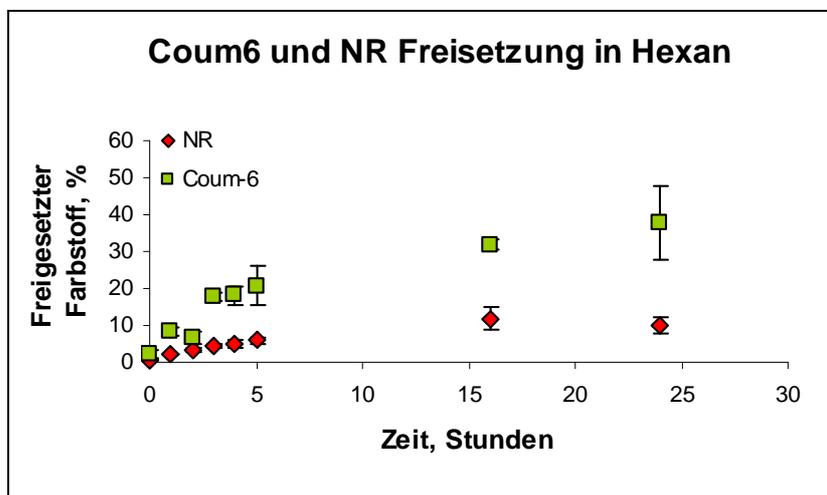


Abb. 25: NR und Coum6 Freisetzung in PBS:Hexan (1:1) Lösung. Prozentsatz der freigesetzten NR und Coum6 in Hexan

Nach 16h ist insgesamt $11,84 \pm 3,02$ % ($n=3$) des NR der Nanopartikel in PBS Lösung freigesetzt worden und in die lipophile Hexan Lösung diffundiert. Das gleiche galt nach 24h für $37,38 \pm 10,07$ % ($n=3$) des Coum6. Coum6: Coumarin6; NR: Nile Red.

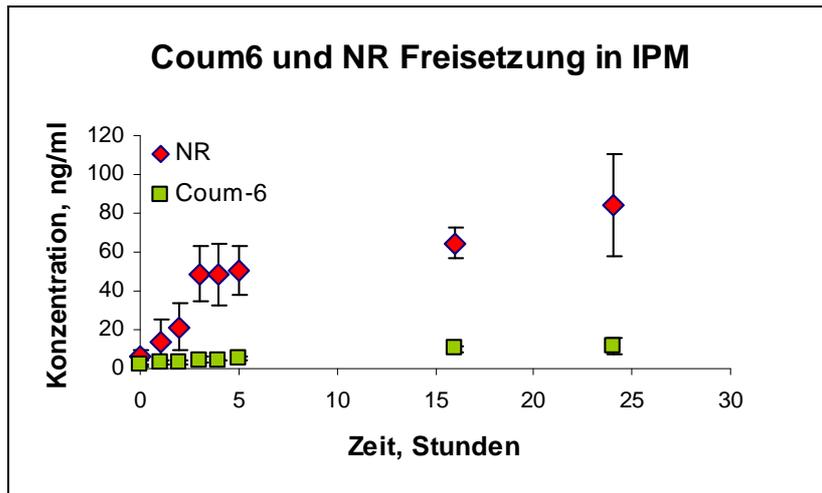


Abb. 26: NR und Coum6 Freisetzung in PBS:IPM 1:1 Lösung. Konzentration von freigesetztem NR und Coum6 in IPM.

Nach 24h zeigte sich die maximale kumulative Konzentration vom freigesetzten NR ($84,05 \pm 26,55$ ng/ml, $n=3$) und von Coum6 ($11,49 \pm 4,20$ ng/ml, $n=3$) in IPM. Coum6: Coumarin6; NR: Nile Red; IPM: Isopropylmyristate

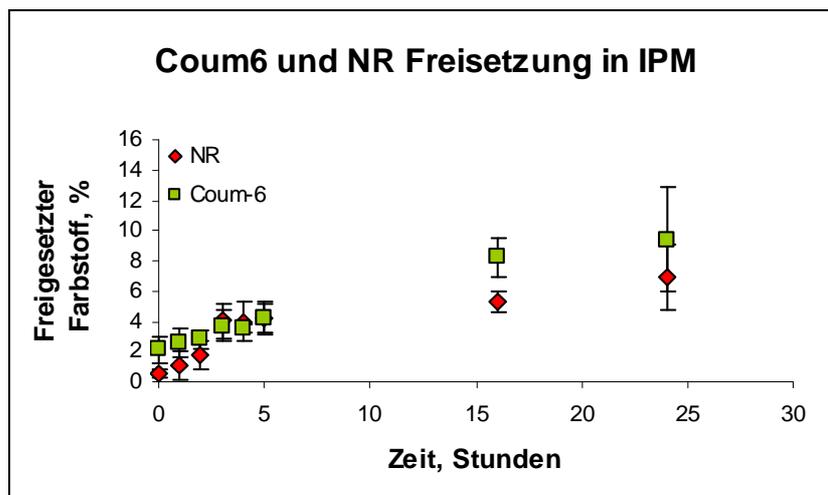


Abb. 27: NR und Coum6 Freisetzung in PBS:IPM 1:1 Lösung. Prozentsatz von freigesetztem NR und Coum6 in IPM.

Nach 24h ist insgesamt $6,89 \pm 2,18$ % ($n=3$) des NR der Nanopartikel in PBS Lösung freigesetzt und in die lipophile Hexan Lösung diffundiert worden. Das gleiche galt für $9,42 \pm 3,44$ % ($n=3$) des Coum6. Coum6: Coumarin6, NR: Nile Red; IPM: Isopropylmyristate

- **Aggregation der Nanopartikel in der Grenzzone zwischen PBS und IPM**

Nach 24 Stunden Inkubation der zweiphasigen 228 nm PLA_NR-NP in PBS/IPM (1:1) Lösung zeigte sich die Bildung einer rötlichen Grenzschicht zwischen den zwei Lösungsmitteln. Teile dieser Schicht wurde mit einer 10 µl Pipette entnommen und am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Es zeigte sich eine hohe Konzentration von aggregierten Partikeln, und in der Nähe der Grenzzone konnte man in PBS und in IPM einzelne Aggregate sehen (Abb. 28d). Diese Konglomerate waren mikrometergroß und zeigten im Vergleich zu den rundlichen 228 nm PLA_NR-NP in PBS und den entsprechenden Aggregaten der Partikellösung eine unregelmäßige Form (Par. 3,1; Abb. 28f).

Die PBS Suspension wies ein feingranuläres Fluoreszenzmuster auf (Abb. 28b), welches den einzelnen Nanopartikeln in PBS entsprach. In IPM selbst, waren weder Partikel, noch Aggregate sichtbar, und ein roter Schleier von dem freigesetzten Nile Red war nicht zu erkennen. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bei der Untersuchung der Stabilität von 423 nm PLA_Coum6-NP in PBS/IPM (1:1) Lösung.

Als Kontrolle wurden anschließend 200 nm PS_FITC-NP untersucht. Im Gegensatz zu den PLA-Partikeln sind die PS-Partikel nicht biologisch degradierbar und weisen andere strukturelle Merkmale auf, z.B. eine äußere Schicht bestehend aus dem Eiweiß NeutrAvidin. Anders als bei der Untersuchung der PLA-Partikel bildeten sich nach 24h Inkubation von PS-Partikeln in der zweiphasigen Lösung PBS/IPM (1:1) keine Partikelkonglomerate (Abb. 29).

Die *in vitro* Kinetik der Freisetzung von Nile Red und Coumarin 6 Freisetzung in zweiphasigen Lösungen bestätigte die Freisetzung der enkapsulierten Farbstoffen aus den Nanopartikeln im lipophilen Milieu. In der Grenzzone zwischen der lipophilen (IPM) und der hydrophilen (PBS) Phase zeigten sich Partikelkonglomerate, die am Fluoreszenzmikroskop Ähnlichkeiten zu den Konglomeraten in Haarfollikeln aufwiesen. Im organischen Lösungsmittel Hexan war die Farbstofffreisetzung deutlich höher als in IPM.

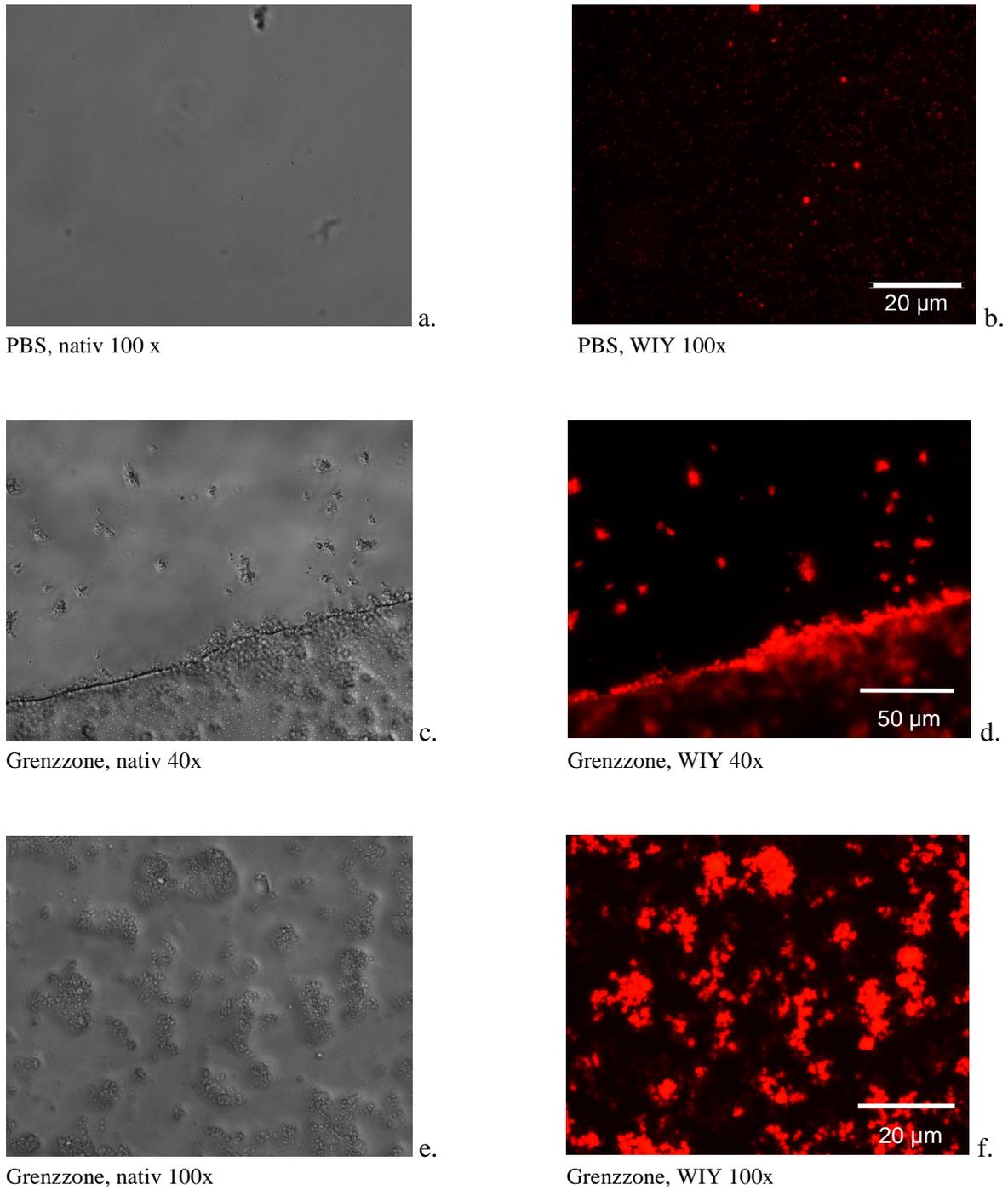
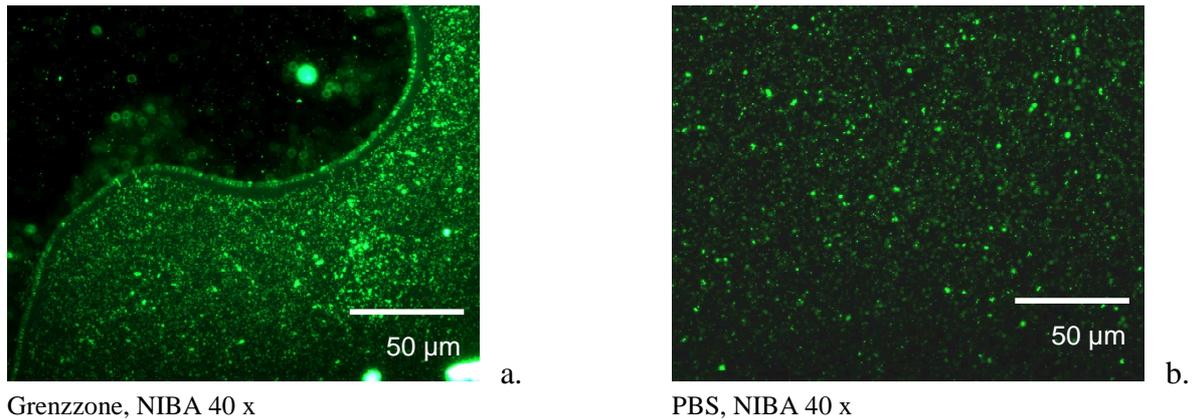


Abb. 28: Aggregation der PLA-Partikel nach 24h Inkubation in PBS:IPM (1:1) Lösung

Nach 24 h Inkubation waren die einzelnen Nanopartikel in PBS und einzelne kleine Aggregate sichtbar (a,b). In der Grenzzone zwischen IPM und PBS sah man nur große Partikelaggregate (c-f) und in der IPM-Lösung waren weder einzelne Partikel noch Aggregate sichtbar. IPM: Isopropyl myristate; PLA: Polylactic acid



Grenzzone, NIBA 40 x

PBS, NIBA 40 x

Abb. 29: PS-Partikel, PBS:IPM (1:1) Lösung

Nach 24h Inkubation sah man in PBS ein homogenes granuläres Verteilungsmuster der einzelnen PS-Partikel ohne Bildung von Konglomeraten. In der PBS/IPM Grenzzone auffällig war die erhöhte Partikelkonzentration, ohne Konglomeratbildung. Auf dem rechten Bild sieht man in PBS die einzelnen Partikel und kleine Aggregate in 40x Vergrößerung. PS: Polystyren; IPM: Isopropyl myristate.

3.3.4 Aufnahme des freigesetzten Nile Red durch die Epidermiszellen nach transfollikulärer Penetration der PLA-Partikel

Die Untersuchung der Epidermiszellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie wies auf eine Aufnahme der intrafollikulär und auf der Hautoberfläche freigesetzten Farbstoffe nach Diffusion der Farbstoffe durch das Stratum corneum, durch die Epidermiszellen und die Zellen des follikulären Epithels hin.

Exzidierte menschliche Haut wurde jeweils mit einer der beiden Partikelsuspensionen (228 nm PLA_NR-NP und 423 nm PLA_Coum6-NP) inkubiert. Nach Isolierung der Epidermiszellen wurde die Aufnahme der freigesetzten Farbstoffe untersucht. Als positive Kontrolle fungierten Epidermiszellen, die *in vitro* mit den gleichen Nanopartikeln inkubiert wurden und als negative Kontrolle unbehandelte Epidermiszellen. Bei der positiven Kontrolle zeigte sich eine deutliche Verschiebung der mittleren Fluoreszenzintensitätskurve im Histogramm der FACS-Analyse mit mittleren Fluoreszenzintensitäten von 48.14 ± 13.37 für Coumarin 6 bzw. $32,60 \pm 10,91$ für Nile Red und bei der negativen Kontrolle 4.11 ± 1.10 für Coumarin 6 bzw. $2,40 \pm 0,98$ für Nile Red. Die Fluoreszenzmikroskopie bestätigte ein intrazelluläres granuläres Fluoreszenzmuster, welches für eine intrazelluläre Lokalisation von Nanopartikeln spricht (Abb. 30: a-d). In anderen Worten erklärt sich die Verschiebung der Fluoreszenzkurve des Histogramms in diesen Zellen, die in der Zellkultur mit Partikelsuspensionen behandelt worden waren, durch die Fluoreszenz der von den Zellen aufgenommenen Partikel.

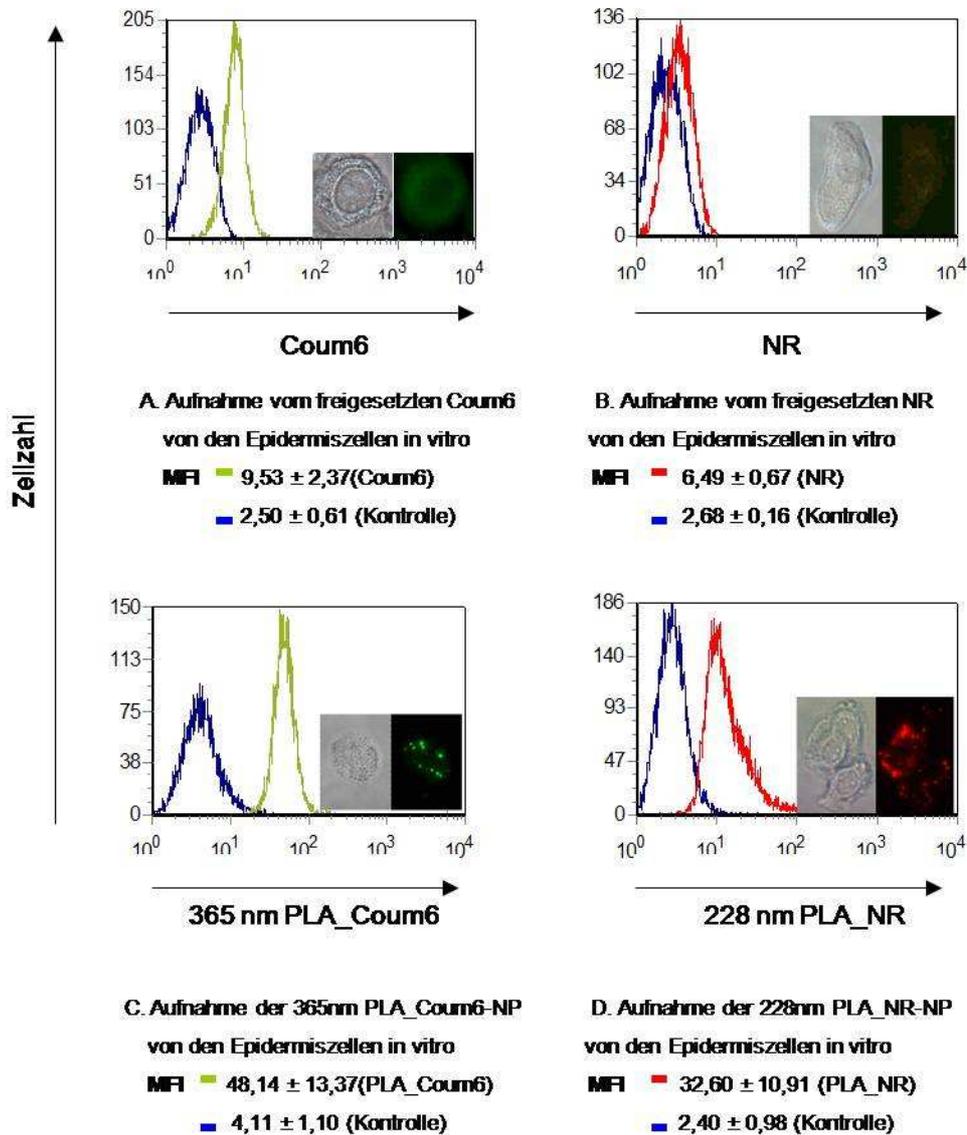


Abb. 30: Aufnahme der von den Nanopartikeln freigesetzten Farbstoffe Coumarin 6 und Nile Red durch die Epidermiszellen

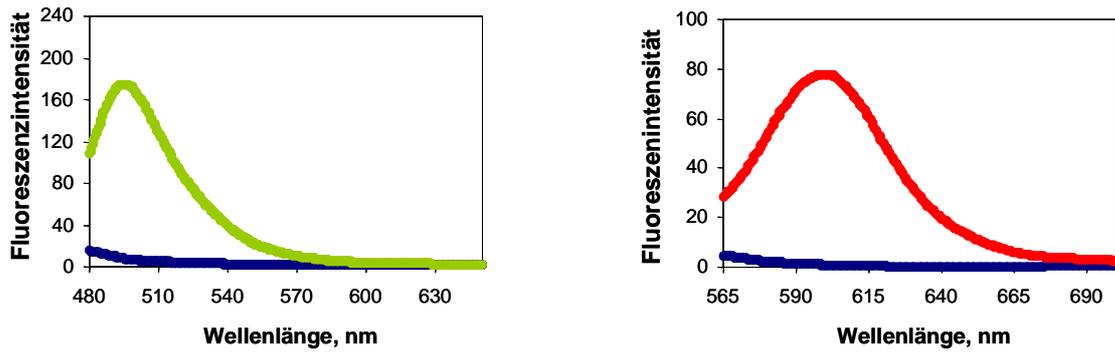
Nach Inkubation exzidiierter menschlicher Haut mit 228 nm PLA_NR-NP und 423 nm PLA_Coum_6-NP (A,B) wurden die Epidermiszellen isoliert und mit Epidermiszellen verglichen, die zuerst von menschlicher Haut isoliert und anschließend in vitro mit den 228 nm PLA_NR-NP und 423 nm PLA_Coum_6-NP (C,D) inkubiert wurden. Die Fluoreszenzaufnahme bzw. Partikelaufnahme wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht und fluoreszenzmikroskopisch bestätigt. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) sind die Mittelwerte von drei verschiedenen Experimenten. Bei den fluoreszenzmikroskopischen Bildern sieht man ein feingranuläres Fluoreszenzmuster der Nanopartikel (C,D) und eine diffuse Fluoreszenz, welche dem freien Farbstoff entspricht (A,B) PLA: Polylactic acid; NP: Nanopartikel; Coum6: Coumarin6; NR: Nile Red

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der Zellpopulation, deren Isolierung nach der Behandlung exzidiierter menschlicher Haut mit der Partikelsuspension erfolgte, nur eine dezente Verschiebung der mittleren Fluoreszenzkurve. Die mittlere Fluoreszenzintensität von Coumarin 6 bzw. von Nile Red betrug $9,53 \pm 2,37$ bzw. $6,49 \pm 0,67$ und die Fluoreszenzintensität der negativen Kontrolle (unbehandelte Hautproben) $2,50 \pm 0,61$ bzw. $2,68 \pm 0,16$). In der Fluoreszenzmikroskopie fanden sich keine Zell-assoziierten Partikel, sondern nur eine diskrete diffuse Fluoreszenz. Diese dezente Verschiebung der mittleren Fluoreszenzintensitätskurve entspricht am ehesten einer Aufnahme von Coumarin 6 und Nile Red, welche während der Inkubation der Partikellösung auf der menschlichen Haut aus den Partikeln freigesetzt und von den Epidermiszellen aufgenommen wurde. Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurden aus diesen Zellpopulationen Zellextrakte gewonnen. Anschließend wurde deren Fluoreszenzintensität mittels Fluoreszenzspektrophotometrie gemessen.

- **Bestätigung der Aufnahme von freigesetzten Farbstoffen durch Epidermiszellen in Zellextrakten**

Die Aufnahme der freigesetzten Farbstoffe durch die Epidermiszellen wurde in Zellextrakten bestätigt. Nach der Inkubation exzidiierter menschlicher Haut mit den PLA-Nanopartikelsuspensionen (228 nm PLA_NR-NP und 423 nm PLA_Coum6-NP) wurden die Epidermiszellen isoliert und durch Zugabe von Dichloromethan lysiert. In den gewonnenen Zellextrakten wurde die Fluoreszenzintensität der zwei Farbstoffe spektroskopisch gemessen und mit der Hilfe von Kalibrierungskurven in Konzentrationen umgerechnet. In der Tat zeigte sich für Nile Red eine mittlere Konzentration von $2,29 \pm 1,72$ ng/ml und für das Coumarin 6 eine mittlere Konzentration von $1,96 \pm 1,07$ ng/ml). Als Kontrolle dienten Zellextrakte aus unbehandelten Proben (Abb. 31).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Aufnahme der freigesetzten Farbstoffe durch die Epidermiszellen, nach Auftragen der Partikelsuspension auf exzidierte menschliche Haut bestätigt wurde. Des Weiteren wurde diese Aufnahme durch Lysierung und Präparation von Zellextrakten quantifiziert.



A. Coum-6 Konzentration

1.96 ± 1.07 ng/ml

● Kontrolle

● Coumarin6

B. Nile Red Konzentration

2.29 ± 1.72 ng/ml

● Nile Red

Abb. 31: Messung des Coumarin6 und Nile Red in Extrakten der Epidermiszellen

Zur Bestätigung der Aufnahme der freigesetzten Farbstoffe *ex vivo* (siehe Abb. 30) wurde nach Behandlung der isolierten Zellsuspensionen (nach der Inkubation der exzidierten menschlichen Haut mit den 228 nm PLA_NR_NP and 365 nm PLA_Coum_6-NP) die Fluoreszenzintensität für beide verschiedenen Farbstoffe (Coum6 und Nile Red) in den Zellextrakten bestimmt. Die Konzentrationen sind die Mittelwerte von drei verschiedenen Experimenten (\pm SD). NR: Nile Red; Coum6: Coumarin6; SD: Standardabweichung; PLA: Polylactic acid.

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

In exzidierte menschlicher Haut zeigte sich eine Aggregation der untersuchten 365 nm und 228 nm PLA-Partikel in den Haarfollikelöffnungen.

- Die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop zeigte für $48,18 \pm 13,79\%$ bzw. $49,41 \pm 7,69\%$ der untersuchten Follikel eine Penetration der 365 nm bzw. 228 nm PLA-Partikel entlang des follikulären Kanals. In einer beträchtlichen Anzahl der Follikel ($13,79 \pm 12,04\%$ bzw. $13,35 \pm 5,59\%$) zeigte sich sogar eine Penetration der 365 nm bzw. 228 nm PLA-Partikel bis zum tiefen Infundibulum. Auffällig war die Bildung von großen Partikelaggregaten im follikulären Kanal und auf dem Stratum corneum. Darüber hinaus fand sich eine diffuse Verfärbung der Epidermis, des Follikels und der Talgdrüse, die auf eine Farbstofffreisetzung aus den PLA-Partikeln hinweist. Auffällig war die Retention von Nile Red, besonders in der Talgdrüse, bis zu über 24 Stunden.
- In *vitro* Untersuchungen in einem zweiphasigen System (lipophil/hydrophil, PBS/Hexan und PBS/IPM) bestätigten die Destabilisierung der Partikel, die Aggregatbildung und die Farbstofffreisetzung im lipophilen Milieu. In wässrigen Lösungen (PBS) waren die PLA-Partikel stabil und konnten durch Zellsuspensionen in Kultur, insbesondere Langerhanszellen, internalisiert werden. Diese Aufnahme war größen- und konzentrationsabhängig.
- Nach Behandlung exzidierte menschlicher Haut dagegen, konnte keine Aufnahme von intakten PLA-Partikeln, sondern eine Aufnahme der freigesetzten Farbstoffe in Epidermiszellen und Langerhanszellen nachgewiesen werden.

4. Diskussion

4.1 Penetration von PLA-Partikeln in menschliche Vellushaarfollikel.

Die Penetrationseigenschaften von biologisch abbaubaren PLA-Partikeln in Vellushaarfollikel exzidierte menschlicher Haut wurden im Rahmen dieser experimentellen Arbeit zum ersten Mal untersucht. Nach Inkubation der jeweiligen Partikelsuspension auf exzidierte Gesichtshaut (retroaurikuläre Region) zeigte sich bei ungefähr der Hälfte der untersuchten Follikel eine Penetration der biologisch abbaubaren Partikel, sowohl der kleinen 228 nm als auch der größeren 365 nm Nanopartikel in die Follikel (Par. 3.1). Es gibt verschiedene Interpretationen, warum sich in ungefähr der Hälfte der untersuchten Follikel keine Penetration zeigte. Eine Hypothese ist die Präsenz von *inaktiven Follikeln* durch die keine Penetration erfolgen kann. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, stellten Lademann et al (2001) fest, dass die Penetration nur durch Follikel, die eine Sebumproduktion und/oder ein aktives Haarwachstum aufweisen, erfolgen kann^[21]. Die Forschungsergebnisse von Hoffmann et al. (2005) untermauerten diese Hypothese, indem sie zeigten, dass die Penetration von Liposomen, beladen mit fluoreszierenden Farbstoffen, vom Haarzyklus abhängig ist^[81].

Des Weiteren muss man auch die *Effektivität des CSSS* bedenken. Es kann sein, dass bei manchen Follikeln nach einem CSSS nur ein Teil des Deckels aus Talgbestandteilen, abgestoßenen Korneozyten, keratinisiertem Material und Bakterien entfernt wurde, so dass das verbliebene Material die Penetration der Partikel weiter beschränkte.

Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass die Nanopartikel in Form einer wässrigen Lösung auf die Haut aufgetragen wurden. Da die Hautoberfläche, nach dem Fixieren auf den Styroporstücken, nicht absolut flach ist, kann es zu einer *irregulären Verteilung der Lösung* auf der Hautoberfläche kommen, so dass vermutlich an gewissen Arealen nur eine beschränkte Anzahl von Partikeln, oder gar keine, zur Verfügung standen. Diese Hypothese erklärt auch die unregelmäßige Verfärbung der Epidermis und der Haarfollikel durch die freigesetzten Farbstoffe. An den Stellen wo sich die Partikellösung nur partiell oder gar nicht verteilte, zeigte sich keine Penetration in die Haarfollikel und dementsprechend auch keine Farbstofffreisetzung und Verfärbung.

In 35- 37% der untersuchten Haarfollikel zeigte sich eine Penetration beider Partikelgrößen in den epidermalen Anteil des Vellushaarfollikels. An dieser Stelle bildet das Stratum corneum noch eine potente Hautbarriere, die das Eindringen der Partikel in das folliculäre Epithel oder in

die perifollikuläre Dermis verhindert. Das follikuläre Reservoir ist vergleichbar zu dem des Stratum corneum an verschiedenen Körperstellen^[3]. Das hätte als Konsequenz, dass die Nanopartikel in diesem Reservoir als Depot für die kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen fungieren könnten. In der Tat ist im Rahmen dieser experimentellen Arbeit nachgewiesen worden, dass die eingekapselten Farbstoffe von den Nanopartikeln freigesetzt werden können. Diese Freisetzung ist zeitabhängig und hat als Ergebnis die Verfärbung der ganzen Epidermis, des Haarfollikels, einschließlich dem Haarfollikelepithel und der Talgdrüsen. Diese Untersuchung der Penetrationseigenschaften der Partikel und der Farbstofffreisetzung aus den Partikeln in menschliche Vellushaarfollikel ist für die potentielle Anwendung der PLA-Partikel als Wirkstoffträger für die Dermatotherapie von Talgdrüsen- und Haarkrankheiten erforderlich. Für die Behandlung von Krankheiten der behaarten Kopfhaut müssten jedoch die Penetrationseigenschaften der Partikel in die menschlichen Terminhaarfollikel untersucht werden, was die Zielsetzung dieser Arbeit überschreitet. Eine weitere Anwendung der PLA-Partikeln als Wirkstoffträger für die interfollikuläre Freisetzung und systemische Aufnahme von Medikamenten (z.B. Insulin) überschreitet ebenso die Zielsetzung dieser Arbeit. Das Thema der Anwendung des follikulären Reservoirs für die kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen wird ausführlich im Kapitel 4.3 besprochen.

In 13 % der untersuchten Vellushaarfollikel zeigte sich eine Penetration der 228 nm und 365 nm PLA-Partikel bis zum tieferen Infundibulum. Das entspricht in Vellushaarfollikeln der retroaurikulären Region einer Tiefe von $225 \pm 34 \mu\text{m}$ ^[2]. An dieser Stelle besteht das Stratum corneum im Gegensatz zu dem oberen Teil des Infundibulums, dem Akroinfundibulum, nur aus wenigen, kaum differenzierten Korneozyten. Demzufolge muss es als permeabel betrachtet werden^[10,82]. Im follikulären Epithel des Infundibulums sitzt auch eine beträchtliche Population von LHZ^[11], die als Zielpopulation für die Entwicklung neuer Vakzinierungstherapien benutzt werden kann. Theoretisch könnten die Nanopartikel, die das untere Infundibulum erreicht haben, die an dieser Stelle permeable Hautbarriere des Stratum corneum penetrieren und durch die LHZ aufgenommen werden.

Im Rahmen dieser experimentellen Arbeit wurde die mögliche Anwendung von biologisch abbaubaren PLA-Partikeln als potentielle Antigenträger für die Entwicklung einer innovativen transkutanen Vakzinierungsstrategie untersucht. Die Untersuchung ihrer Penetrationseigenschaften in die menschlichen VHF, und nicht in die THF, ist gerade deswegen erforderlich, weil die Applikation eines Vakzins in Form eines Pflasters aus praktischen Gründen nur an Hautarealen mit Vellushaaren (z.B. retroaurikuläre Region oder Oberarm) sinnvoll ist.

Grund dafür ist das größere Applikationsareal, das in diesem Fall zur Verfügung steht. Außerdem könnte die transkutane Vakzinierung leichter von den Patienten akzeptiert werden, solange der Aufwand nicht groß wird (z.B. keine Rasur der behaarten Kopfhaut, die aus ästhetischen Gründen problematisch wäre). Dieser Punkt wird jedoch im nächsten Kapitel vertieft (Par. 4.2).

4.1.1 Faktoren, die die Penetrationstiefe der Partikel beeinflussen

Verschiedene Faktoren können die maximale Penetrationstiefe von topisch applizierten Nanopartikelsuspensionen entlang des Haarfollikelkanals beeinflussen.

- **Partikelgröße und Aggregatbildung**

Die Partikelsuspension weist *in vitro* am Fluoreszenzmikroskop ein feingranuläres Fluoreszenzmuster auf, welches den einzelnen fluoreszierenden Nanopartikeln entspricht. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Untersuchung der Partikelpenetration in VHF exzidiertes menschlicher Haut am Fluoreszenzmikroskop die Bildung großer Partikelaggregate in den Follikelöffnungen und im Akroinfundibulum. Einzelne Partikel waren vor allem im tieferen Infundibulum sichtbar.

Die Bildung der Aggregate wurde *in vitro* untersucht (Par. 3.3.3) und wird ausführlich im Kapitel 4.3 diskutiert. Die PLA-Partikel denaturieren im lipophilen Milieu des Haarfollikels und bilden große Partikelkonglomerate, bei denen man die einzelnen Partikel fluoreszenzmikroskopisch nicht mehr erkennen kann. Diese Konglomerate konnten durch übliche Ultraschallbehandlung oder Durchmischung nicht gelöst werden, und ihre Bildung ist vermutlich irreversibel. Die Konglomerate sind mehrere Mikrometer groß und haben eine unregelmäßige Form, sodass sie sich am Fluoreszenzmikroskop deutlich von den vereinzelt Nanopartikeln abgrenzen lassen. Zum ersten Mal wird im Rahmen dieser experimentellen Arbeit über die Bildung von Polymer-Partikelkonglomeraten im lipophilen Milieu des Follikels berichtet. Man könnte vermuten, dass die 228 nm und 365 nm PLA-Partikel bis zum tieferen Infundibulum penetrieren können, während die mikrometergroßen Partikelaggregate sich in dem Akroinfundibulum akkumulieren. Das würde bedeuten, dass die Partikelgröße, und wegen der Aggregatbildung auch die Hydrophilität/Lipophilizität und die Stabilität der Nanopartikel die Penetrationstiefe beeinflussen könnten.

In der Tat haben verschiedene Forschergruppen bereits nachgewiesen, dass die follikuläre Penetration der Nanopartikel größenabhängig ist. Frühe Beobachtungen von Schaefer et al (1990) und Rolland et al (1993) in menschlichen VHF zeigten eine selektive Penetration für 3-5

μm PS- und PLGA-Partikel größer als $10 \mu\text{m}$ penetrierten nicht und Partikel $<3 \mu\text{m}$ wurden wahllos auf der Hautoberfläche und im Follikel nachgewiesen^[36,83]. Zu diesem Punkt muss jedoch gesagt werden, dass die beiden Forschergruppen sich auf das Verteilungsmuster der Partikellösung auf der Hautoberfläche und im Haarfollikel konzentrierten. Ihr Ziel war die Bestimmung der Größe der Partikel, die selektiv sich in den Haarfollikeln nach dem Auftragen auf die Haut nachweisen lassen. Im Gegensatz setzten die nächsten Forschergruppen als Ziel, den Einfluss der Partikelgröße in der follikulären Penetration und in der maximalen Penetrationstiefe einzuschätzen. Toll et al (2004) zeigten, dass nach einem CSSS $0,75 \mu\text{m} > 1,5 \mu\text{m} > 3 \mu\text{m} > 6 \mu\text{m}$ PS-Partikel in menschliche THF penetrierten und dass die Durchführung des CSSS nicht nur die Penetrationstiefe sondern auch die Penetrationsrate erhöht^[33]. Vogt et al (2006) zeigten, dass 40 nm PS-Partikel, nach einem CSSS, bis unter dem Ausführungsgang der Talgdrüse im VHF penetrieren, im Gegensatz zu den größeren 750 und 1500 nm PS-Partikel, die sich nur im Infundibulum nachweisen ließen^[34]. In Tiermodellen zeigten Alvarez- Roman et al (2004b) eine verstärkte Penetration für 20 nm im Vergleich zu 200 nm PS-Partikel (Schweinemodell)^[57] und Shim et al (2004) für 40 nm im Vergleich zu 130 nm P(CL)-polyethylenglykol Partikel (Mausmodell)^[37].

- **Typ des Follikels**

Lademann et al (2006) zeigten mit Anwendung des Schweinemodells, dass 320 nm PLGA-Partikel bis zu einer Tiefe von $1400 \mu\text{m}$ penetrieren können, d.h. tiefer als das Infundibulum^[38]. Die in der präsentierten experimentellen Arbeit angewendeten PLA-Partikel waren vergleichbarer Größe (228 nm und 365 nm) und ähnlicher chemischer Struktur. PLA und PLGA sind beide biologisch abbaubare lineare, aliphatische, hydrophobische Polyester. Die im Vorangegangenen beschriebenen Untersuchungen erfolgten jedoch an menschlichen Vellushaarfollikeln und nicht an Follikeln vom Schweineohr. Letztere weisen Ähnlichkeiten zu den menschlichen THF auf. Der Follikelkanal der Schweinefollikel ist breiter als der Follikelkanal der menschlichen VHF und erlaubt dementsprechend die tiefere Penetration von Partikeln vergleichbarer Größe. Ähnlich waren auch die Ergebnisse von Toll et al (2004) mit PS-Partikeln, die bei einer Größe von $750 - 1500 \text{ nm}$ tief bis in die Wulstregion der menschlichen THF ($1191 \pm 23 \mu\text{m}$ im Vergleich zu $362 \pm 88 \mu\text{m}$ im VHF) penetrierten^[2].

- **Ladung der Partikel**

Nicht nur die Größe, sondern auch die physikochemischen Eigenschaften der Partikel können ihre maximale Penetrationstiefe beeinflussen. Vor Kurzem zeigten Jung et al. (2006), dass

kationische Liposomen tiefer als anionische penetrieren können^[25]. Wenn die Ladung die Penetrationstiefe von Liposomen beeinflussen kann, dann könnte es möglicherweise auch bei anderen Partikelarten, wie die PLA-Partikel der Fall sein. Das hätte als Konsequenz, dass die negative Ladung der in dieser experimentellen Arbeit angewendeten Nanopartikeln eine limitierende Rolle bei der Partikelpenetration spielen könnte. Dies muss jedoch im Rahmen eines zukünftigen Forschungsvorhabens überprüft werden. Es ist auch darauf hinzuweisen, dass es einen wichtigen Grund gab, warum für die Zwecke der aktuellen Arbeit negativ geladene (anionische) PLA-Partikel angewendet worden sind. Die negative Oberflächenladung begünstigt die Adsorption von HIV-1 p24 Kapsid-Protein^[72]. Da es beim Einkapseln des Antigens zur Degradierung kommen kann^[73], ist die Adsorption des Antigens an die Oberfläche eine sicherere Methode zur Entwicklung neuer Impfstoffträger. Das war das Ziel des Forschungsvorhabens, für das die verwendeten PLA-Partikel hergestellt worden sind.

- **Partikelart**

Wenn die Penetration der untersuchten 228 nm PLA-Partikel mit der Penetration von PS-Partikeln vergleichbarer Größe (Penetration von 200 nm PS-Partikeln in die menschliche VHF, nicht publizierte Daten von Vogt et al, 2008) verglichen wird, zeigen sich ähnliche Ergebnisse bezüglich der maximalen Penetrationstiefe (unteres Infundibulum), aber eine erhöhte Penetrationsrate für PS-Partikel. Eine mögliche Erklärung ist, dass auch in dem Fall der PS-Partikel eine Aggregatbildung die Penetration der Partikel durch Größenzunahme bis zu einem gewissen Punkt limitierte. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass der Mechanismus dieser Aggregatbildung nicht identisch mit dem der PLA-Partikel ist und dass die Aggregatbildung in diesem Fall reversibel ist. Dieses Thema wird im Kapitel 4.3 vertieft, wo der Mechanismus der Konglomerat- und Aggregatbildung diskutiert wird. Auf jeden Fall würde jedoch eine reversible Aggregatbildung der PS-Partikel erklären, warum sie eine größere Penetrationsrate (weniger Follikel ohne Partikelpenetration) als die PLA-Partikel aufwiesen.

Zum Schluss müssen auch potentielle Schwächen der angewendeten Methoden, die die Einschätzung der Penetrationstiefe beeinträchtigt haben können, diskutiert werden.

Nach der Fertigstellung der Kryoschnitte stellte sich eine gewisse Anzahl der Haarfollikel in *Querschnitten* und schrägen Schnitten statt Längsschnitten dar. Es kann sein, dass in diesen Fällen Nanopartikel auch tiefer als in dem Querschnitt sichtbaren Areal der Haarfollikel penetrierten.

Die durch die freigesetzten Farbstoffe bedingte *Verfärbung der Epidermis, des Follikels und der Talgdrüsen* beeinträchtigte bis zu einem gewissen Punkt die Einschätzung der folliculären Partikelpenetration, da unter dem homogenen Schleier des freigesetzten Farbstoffes in dem Follikelkanal manchmal die fluoreszierenden Partikel schwer erkennbar waren. Des Weiteren ist es möglich, dass durch die partielle Freisetzung des Farbstoffes manche Partikel nicht mehr stark genug fluoreszierten, um am Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu sein.

Schließlich muss noch erwähnt werden, dass bei den Versuchen an exzidierte menschlicher Haut die natürliche Hautspannung fehlt, welche *in vivo* zu einem „Aufspannen“ der Infundibulumöffnung und zu einem verbreiterten folliculären Kanal führt^[84].

4.2 Aufnahme der PLA-Partikel durch Antigen-präsentierende Zellen der Epidermis

Eine Aufnahme von biologisch abbaubaren PLA-Partikeln beider untersuchten Größen (228 nm und 365 nm) durch Langerhanszellen konnte nach topischer Applikation der Partikel auf exzidierte menschliche Haut nicht nachgewiesen werden. Diese Langerhanszellpopulation sitzt nicht nur in der Epidermis sondern auch im follikulären Epithel des Infundibulums, wo ihre Anzahl mit zunehmendem Abstand von der Epidermisoberfläche abnimmt, so dass sich unterhalb des Ausführungsganges der Talgdrüse praktisch kaum LHZ befinden^[11]. Im unteren Infundibulum gilt die Hautbarriere des Stratum corneum als besonders permeabel. In der Tat findet mit zunehmendem Abstand von der Hautoberfläche eine trichilemmale anstelle einer epidermalen Differenzierung statt, so dass im unteren Infundibulum die Hornschicht aus 2-3 statt 15 Korneozytenschichten besteht^[10]. Die untersuchten PLA-Partikel penetrierten bis zum unteren Infundibulum, aber sie scheiterten möglicherweise beim Durchdringen der Hautbarriere, so dass keine Aufnahme durch die LHZ erfolgte (Par. 3.2.1). Um diese Hypothese zu untermauern, wurden isolierte LHZ *in vitro* mit der Partikelsuspension inkubiert. In der Tat zeigte sich durchflusszytometrisch eine größen- und konzentrationsabhängige Aufnahme aller untersuchten Partikel (228 nm, 365 nm, 375 nm und 423 nm) *in vitro* (Par. 3.2.2). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bestätigten diesen Befund im Form eines granulären Fluoreszenzmusters auf den Zellen (Abb. 18-21).

4.2.1 Penetration durch die Hautbarriere des Infundibulums

Die im Rahmen dieser experimentellen Arbeit untersuchten 228 nm PLA-Partikel (sowie auch die 365 nm PLA-Partikel) penetrierten trotz der Barrierestörung nach einem CSSS nicht durch die Barriere des unteren Infundibulums in das follikuläre Epithel und wurden im Gegensatz zu den 40 nm und 200 nm PS-Partikeln nicht von den LHZ des follikulären Epithels exzidiertes, menschlicher Haut aufgenommen, (Vogt et al., 2006 und unpublizierte Daten (2008)). Ein möglicher Grund könnte die Konglomeratbildung sein (Par. 4.1 und 4.3). Die Konglomerate sind mikrometergroß, weisen ein grobgranuläres Fluoreszenzmuster auf. Sie können wegen der Größenzunahme nicht die Hautbarriere durchdringen und entsprechend auch nicht von den LHZ des follikulären Epithels aufgenommen werden.

In dem Fall der von Vogt et al. verwendeten PS-Partikel zeigte sich im follikulären Kanal eine starke Überstrahlung der Partikel und nicht ein feingranuläres Fluoreszenzmuster. Vermutlich wird das durch die hohe lokale Konzentration von Nanopartikeln verursacht. Diese erhöhte Konzentration könnte auch zur Bildung von Partikelaggregaten führen. Die Polystyrenaggregate im lipophilen Milieu des follikulären Kanals müssen jedoch reversibel sein. In der Tat zeigte sich

für die PS-Partikel *in vitro*, im Gegensatz zu den PLA-Partikeln, keine irreversible Konglomeratbildung (Par. 3.3.3; Par. 4.3). Man könnte vermuten, dass die einzelnen Partikel sich von den Aggregaten erneut trennen können, um durch die Hautbarriere zu penetrieren und von den LHZ aufgenommen zu werden. Nach der Denaturierung der PLA-Partikel und der Bildung der Konglomerate lassen sie sich schlecht voneinander lösen, so dass die großen Konglomerate nicht in das folliculäre Epithel penetrieren können.

Ein zweiter Unterschied zwischen den untersuchten PLA-Partikeln und den PS-Partikeln ist die Beschichtung der letzteren mit dem Protein NeutrAvidin™. Möglicherweise könnte die Präsenz des Eiweißes die Anerkennung und Aufnahme der Partikel durch die LHZ des Follikels begünstigen. Das müsste jedoch im Rahmen eines zukünftigen Forschungsvorhabens mit der Anwendung von eiweiß- oder antigenbeladenen PLA-Partikeln geprüft werden.

Schließlich muss erwähnt werden, dass obwohl die meisten Autoren die Penetration der Nanopartikel durch die intakte Hautbarriere des Infundibulums bezweifeln^[1], Baroli et al. (2007) kürzlich über die Penetration von metallischen Partikeln (Eisen) durch die Schichten des Stratum corneum bis in die lebendige Epidermis und in das folliculäre Epithel berichteten^[43]. Dieses Ergebnis widerspricht früheren Untersuchungen mit TiO₂ Nanopartikeln vergleichbarer Größe (17 nm), die keine ähnliche Penetration sondern nur eine folliculäre Akkumulation aufwiesen^[45,44]. Weitere Experimente mit dieser Fragestellung sind nötig, um die mögliche Penetration von Nanopartikeln dieser Dimensionen (<20nm) durch die intakte Hautbarriere zu untersuchen. Das wäre für toxikologische Untersuchungen und zur Klärung von Sicherheitsfragen bezüglich der Anwendung von ultrakleinen Nanopartikeln in Sonnencremes und anderen lokalen Dermatotherapeutika von größter Bedeutung. Des Weiteren muss geprüft werden, ob diese Partikelgröße (10 nm) für die Herstellung von biologisch abbaubaren PLA-Partikeln für die transkutane Vakzinierung geeignet ist. Auf jeden Fall sind PLA-Partikel von rund 200 nm stabiler, lassen sich leichter herstellen und weisen bessere Depoteigenschaften auf. Schließlich sind antigenbeladene Partikel dieser Größe in der Lage eine starke humorale und zelluläre Immunantwort hervorzurufen, im Gegensatz zu den ultrakleinen Nanopartikeln (<20 nm), die schwach immunogen sind^[58,64].

4.2.2 Untersuchung der Partikelaufnahme durch die Langerhanszellen der Epidermis *in vitro*.

Die Untersuchung der Partikelaufnahme durch LHZ nach *in vitro* Inkubation mit PLA-Partikeln vier verschiedener Größen (228 nm, 365 nm, 375 nm und 423 nm) zeigte eine größen- und konzentrationsabhängige Aufnahme. In der Tat wiesen nach der FACS-Analyse fast alle

untersuchten LHZ eine Aufnahme der 228 nm Partikel auf, unabhängig von der Konzentration der Partikelsuspension. Im Gegenteil zeigte sich nur nach der Inkubation mit der 50 µg/ml Partikelsuspension (und nicht mit der 10 µg/ml Partikelsuspension) eine Aufnahme der 423 nm Partikel. Nach der Inkubation mit den 365 und 375 nm Partikeln zeigte sich eine konzentrationsabhängige Aufnahme.

Man könnte darauf schließen, dass die kleineren Partikel besser aufgenommen werden können und dass durch Erhöhen der Konzentration der angewendeten Suspension die beschränkte Aufnahme bei zunehmender Partikelgröße ausgeglichen werden kann.

Ähnliche Ergebnisse erhielten Foged et al (2004) bei der Untersuchung der Aufnahme von PS-Partikeln durch dendritische Zellen (DZ)^[65]. Es zeigte sich ebenso eine größenabhängige Aufnahme und sie schlussfolgerten, dass Partikelgrößen kleiner als 500 nm für eine schnelle und effiziente Aufnahme optimal seien. Interessanterweise ist die Oberflächenladung nicht nur für die Penetration in menschliche Haut, sondern auch für die zelluläre Aufnahme entscheidend. Die positive Ladung fördert die Aufnahme größerer Partikel (1µm) und kann wie die Anwendung von höheren Partikelkonzentrationen teilweise die limitierende Rolle der zunehmenden Partikelgröße ausgleichen.

Kanchan und Panda (2007) zeigten *in vitro* eine Aufnahme von antigenbeladenen PLA-Partikeln ≤600 nm durch Makrophagen. Mikrometergroße Partikel wurden nicht aufgenommen, sondern banden an die Oberfläche der Makrophagen. *In vivo* rief die Aufnahme der Nanopartikel eine starke zelluläre Immunantwort hervor und war mit einer hohen Produktion von IFN-γ assoziiert. Im Gegensatz dazu riefen die Mikropartikel eine humorale Immunantwort mit assoziierter IL-4 Produktion hervor^[63]. Das würde heißen, dass durch die Anwendung von PLA-Partikeln unterschiedlicher Größe die Richtung der Immunantwort beeinflusst werden kann^[64].

4.2.3 Anwendung der PLA-Partikel als Antigenträger für die transkutane Vakzinierung

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Partikelaufnahme *in vitro* von der Größe der Partikel, ihrer Ladung und der Konzentration der angewendeten Partikelsuspension abhängig ist. Des Weiteren kann die Größe der antigenbeladenen Nanopartikel auch die Richtung der Immunantwort beeinflussen. Partikel unter 500 nm begünstigen eine zelluläre Immunantwort, die sehr wichtig für eine effiziente Impfung gegen Tumoren und chronische infektiöse Krankheiten mit intrazellulär persistierenden Pathogenen ist^[63]. Für die Penetration der Nanopartikel durch die Hautbarriere des Infundibulums *in vivo* und mit dem fernen Ziel der Entwicklung einer neuen transkutanen Vakzinierungsstrategie ist die Rolle der Partikelgröße daher essentiell. Grund dafür ist, dass eine Größe von 200 nm möglicherweise als die oberste

Grenze für eine effiziente Penetration durch die folliculäre Hautbarriere und für die Aufnahme durch die LHZ des folliculären Epithels nach der Eröffnung der geschlossenen Follikel und der weiteren Abschwächung der folliculären Barriere mit einem CSSS gelten könnte (unpublizierte Daten von Vogt (2008)). Aus all diesen Gründen wären PLA-Partikel der Größe ≤ 200 nm ideale Kandidaten für die Entwicklung eines neuen Antigen-trägers für die transkutane Vakzinierung. Im Fall der untersuchten 228 nm und 365 nm PLA-Partikel kam es jedoch im lipophilen Milieu des folliculären Kanals, möglicherweise durch Denaturierung der Partikel bzw. Änderung ihrer Konformation, zur Bildung von mikrometergroßen Partikelkonglomeraten. Vermutlich verhinderte diese Größenzunahme die Penetration durch die Hautbarriere und die Aufnahme durch die LHZ. Diese Partikeleigenschaften, die offenbar spezifisch für PLA-, nicht aber für PS-Partikel sind, sind daher ein wichtiger limitierender Faktor für die Anwendbarkeit der PLA-Partikel in transkutaner Applikation. Wie Kanchan und Panda (2007) gezeigt haben können mikrometergroße PLA-Partikel durch Bindung an die Zellmembran von Makrophagen und durch kontrollierte Freisetzung des Antigens (Depoteffekt) eine starke humorale Immunantwort (TH2) hervorrufen^[63]. Die Internalisierung der Partikel und die MHC-I assoziierte Antigenpräsentation gilt als essentielle Voraussetzung für das Hervorrufen einer starken zellulären Immunantwort^[62]. Im Fall der transkutanen Vakzinierung können jedoch wegen der Hautbarriere die mikrometergroßen Partikel bzw. Konglomerate (in dem Fall der untersuchten PLA-Partikel) weder von den LHZ aufgenommen werden, noch bis zu deren unmittelbarer Nähe diffundieren. Die Antigenfreisetzung kann dadurch nicht in der unmittelbaren Nähe der gezielten Zellpopulation erfolgen. Das freigesetzte Antigen kann enzymatisch degradiert werden^[85], wird möglicherweise nicht sinnvoll von den APZ erkannt, oder kann im folliculären Kanal festsitzen. Zu bedenken ist jedoch die wichtige Rolle des Haarfollikelkanals als Wirkstoffreservoir. Deswegen müsste geprüft werden, ob die mögliche Freisetzung des Antigens von den PLA-Konglomeraten im Haarfollikel zu einer Aktivierung der LHZ führen kann. Demzufolge könnte (z. B. die p24 Freisetzung aus PLA-Partikeln) eine Fragestellung eines zukünftigen Forschungsvorhabens sein.

Die moderne Nanotechnologie bietet durch die Modifizierung der Partikeloberfläche bzw. Struktur verschiedene Möglichkeiten zur gezielten Modifizierung der Nanopartikel an. Zum Beispiel könnte versucht werden, durch Beschichtung mit Eiweiß oder durch Zugabe von Detergenzien die Konglomeratbildung zu verhindern. Durch das Hinzufügen einer schützenden Hülle, zum Beispiel durch Pegylierung des Polymers und Vernetzung der oberflächigen hydrophilen PEG-Gruppen^[86] oder durch Beschichtung der Polymer-Partikel mit einem zweiten Polymer könnte die Stabilität der Partikel im lipophilen Milieu bewahrt werden. Kritisch ist

jedoch das Einhalten des Größenlimits, um eine Aufnahme durch die LHZ zu ermöglichen und die Anwendbarkeit dieser modifizierten PLA-Partikel als Antigen-träger für die transkutane Vakzinierung weiter zu evaluieren. Eine weitere Möglichkeit ist das aktive Targeting von Zellpopulationen^[85]. Dazu können die Karboxylendgruppen benutzt werden. Andere Methoden, wie die Beschichtung des Polymers mit Avidin oder Chitosan, kommen ebenso in Betracht. Schließlich könnten die Polymer-Nanopartikel mit einem zweiten Polymer beschichtet werden, die mehrere funktionelle Gruppen besitzen (z.B. Polyaminen). An diesen funktionellen Gruppen können verschiedenen Liganden, wie z.B. monoklonale Antikörper mit dem Ziel eines aktiven Targetings konjugiert werden^[35], die eine Aufnahme durch spezifische Zellpopulationen wie die LHZ oder auch die dermalen APZ gezielt steuern können.

4.3 Farbstofffreisetzung aus PLA-Partikeln

Mit dem Ziel der Untersuchung der möglichen Anwendung der PLA-Partikel als Wirkstoffträger für die lokale Dermatotherapie wurden mit Hilfe von enkapsulierten fluoreszierenden Farbstoffen die Freisetzungseigenschaften der Nanopartikel untersucht. Zur Anwendung kamen die Methoden der Fluoreszenzmikroskopie, der konfokalen Laserscannmikroskopie, der Fluoreszenzspektrophotometrie und der Durchflusszytometrie.

In der Tat wurden die enkapsulierten Farbstoffe nach Applikation der Partikelsuspensionen auf exzidierte menschliche Haut freigesetzt und verfärbten nicht nur den Haarfollikel, sondern auch die Epidermis und die Talgdrüsen (Par. 3.3.3). Die Kinetik der Nile Red Freisetzung in exzidierte Haut zeigte eine zeitabhängige Verfärbung, und nach 24 Stunden lokalisierte sich der Farbstoff ausschließlich in den Talgdrüsen und im unteren Anteil des Follikels.

Diese rötliche Verfärbung wies ein diffuses Fluoreszenzmuster auf, welches dem freien Farbstoff entspricht. Im Gegensatz dazu ließen sich intakte fluoreszierende Nanopartikel durch ein feingranuläres Fluoreszenzmuster von dieser diffusen Färbung klar abgrenzen. Dieser Befund ließ sich am konfokalen Laserscannmikroskop bestätigen, wo sich eine diffuse Verfärbung des Zytoplasmas, der Epidermiszellen und der Zellen des follikulären Epithels und kein intrazelluläres, feingranuläres, Fluoreszenzmuster zeigten. Die Verfärbung der Zellen lässt sich daher durch Aufnahme der freigesetzten Farbstoffe erklären. Diese Aufnahme wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht (Par. 3.3.4). In der Tat zeigte sich im Histogramm der Durchflusszytometrie eine Verschiebung der Fluoreszenzintensitätskurve, was für eine Aufnahme der freigesetzten Farbstoffe durch die Epidermiszellen spricht. Als positive Kontrolle fungierten Epidermiszellen, die *in vitro* die Partikel internalisiert hatten. In diesem Fall war die Verschiebung viel stärker, so dass sich die Aufnahme der freigesetzten Farbstoffe von der Aufnahme der fluoreszierenden Partikel durchflusszytometrisch abgrenzen ließ. Die Bestätigung erfolgte mit der Hilfe von Zellextrakten, deren Fluoreszenzspektrum identisch zu dem der freien Farbstoffe in Dichlormethan war. Des Weiteren wurde die Aufnahme der freigesetzten Farbstoffe quantifiziert. Dadurch wurde nachgewiesen, dass sich der freigesetzte Farbstoff nicht nur im interzellulären Raum befand, sondern auch von den Epidermiszellen aufgenommen wurde. Diese Aufnahme ist von großer Bedeutung für die Anwendung der PLA-Partikel als Träger für das Einbringen von therapeutischen Substanzen in den Haarfollikel und in die Talgdrüse.

- **Hypothese der Farbstofffreisetzung im lipophilen Milieu**

Die beobachtete zeitabhängige Verfärbung muss als Folge einer entsprechenden zeitabhängigen Freisetzung der Farbstoffe interpretiert werden. In der Tat zeigte sich nach zwei Stunden nur eine leichte Verfärbung der Epidermis, obwohl die Nanopartikel bis zum tieferen Infundibulum penetriert waren. In den nächsten Stunden nahm die Verfärbung zu, obwohl die Partikel eigentlich nicht tiefer als bis zum Infundibulum penetrieren konnten. Schließlich waren nach 24 Stunden nur die Talgdrüse und der untere Anteil des Follikels verfärbt. Die Epidermis stellte sich erneut ungefärbt dar.

Demzufolge kann die folgende Hypothese formuliert werden: Nach Applikation der Partikelsuspension auf exzidierte menschliche Haut dringt ein Teil der Nanopartikel in den Haarfollikel ein. Der Haarfollikel fungiert als Shunt, weil die Hautbarriere des Stratum corneum die Penetration der Nanopartikel in die lebendige Epidermis verhindert. In dem lipophilen Milieu des follikulären Kanals und des Stratum corneum der Epidermisoberfläche werden die lipophilen Farbstoffe freigesetzt, und anschließend verfärben die freien lipophilen Farbstoffe die lipophilen Anteile der Epidermis, des Follikels und der Talgdrüse. Nile Red wurde bereits in der Vergangenheit für die selektive Färbung von intrazellulären Lipiden benutzt. In deren Anwesenheit wird die Fluoreszenzintensität von Nile Red verstärkt induziert^[77]. Im Laufe der Zeit wird möglicherweise der von den Epidermiszellen aufgenommene Farbstoff abgebaut oder durch weitere Diffusion verdünnt, so dass er nach 24 Stunden nur die Talgdrüse verfärbt. Lampe et al (2008) zeigten, dass das Zytochrom P450 3A4 dabei eine wichtige Rolle spielt^[87]. Eine zweite Erklärung wäre, dass die lipophilen Farbstoffe nach der zellulären Aufnahme weiter diffundierten und sich in der Talgdrüse, bzw. auch in dem subkutanen Fettgewebe wegen ihrer Lipophilizität akkumulierten. Auf jeden Fall ist leicht vorstellbar, dass die progrediente Entfärbung der Epidermis das Ergebnis beider vorgeschlagenen Mechanismen sein könnte, d.h. enzymatischer Abbau und weitere Diffusion und Akkumulation in lipophilen Strukturen wie der Talgdrüse. In der Talgdrüse wird der lipophile Farbstoff durch das stark lipophile Milieu über diese längere Zeiträume zurückgehalten. Diese Beobachtung eröffnet bedeutende Perspektiven für das Einbringen von aktiven Wirkstoffen in die Talgdrüsen und für die Therapie von Talgdrüsen-assoziierte Erkrankungen wie der Acne vulgaris.

Das follikuläre Infundibulum fungierte als Reservoir für die Nanopartikel. Aus dieser Stelle diffundierte der freigesetzte Farbstoff und verfärbte die Epidermis und die tieferen Strukturen. Eine lokale Freisetzung des Farbstoffes von PLA-Partikeln, die bis in die Talgdrüse penetrierten, ist eher unwahrscheinlich da die PLA-Partikel (228 nm und 365 nm) bei der mikroskopischen Auswertung der follikulären Penetration in keinem einzigen untersuchten Follikel die Partikel

tiefer als im Infundibulum nachweisbar waren. Münster et al (2005) beobachteten nach topischer Applikation von Nile Red beladenen SLN (153 - 489 nm) ein starkes Fluoreszenzsignal nicht nur im Follikel sondern auch in der Talgdrüse^[88]. Mittels TEM wurde die Präsenz von intakten SLN im follikulären Kanal nachgewiesen, es ist jedoch unklar, ob sich das Fluoreszenzsignal in der Talgdrüse durch den freien Farbstoff oder die farbstoffbeladenen SLN erklären ließ. Ähnliche Ergebnisse erhielten Bernard et al (1997) mit der Anwendung von Liposomen, welche mit dem Antiandrogen RU 58841 beladen waren. Es zeigte sich eine spezifische Akkumulation des freien Wirkstoffes in der Talgdrüse nach der Dissoziation von den Liposomen im Follikel^[26]. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass im lipophilen Milieu stabile Nanopartikel gewisser Größe bis in die Talgdrüse penetrieren können. Auf jeden Fall ist für die lokale Dermatotherapie von Talgdrüsen- assoziierten Krankheiten die Freisetzung des enkapsulierten Wirkstoffes und die spezifische Diffusion in die Talgdrüse das Ziel bei der Entwicklung neuer Systeme und nicht unbedingt die Penetration des Trägers bis in die Talgdrüse. Die kontrollierte Wirkstofffreisetzung in dem follikulären Reservoir des Infundibulums kann den Depoteffekt der Partikel maximieren.

- **Vorgeschlagener Freisetzungsmechanismus**

Der *in vitro* Versuch mit Hilfe des zweiphasigen (hydrophil/lipophil, PBS:IPM 1:1) Modells (Par. 2.3.4) bestätigte die zeitabhängige Freisetzung der enkapsulierten Farbstoffe im lipophilen Milieu. In den ersten 4 - 8 Stunden zeigte sich eine eher lineare Kinetik, später wurde die Freisetzung verlangsamt und erreichte nach 16 Stunden ein Plateau. In der Grenzzone zwischen IPM und PBS erkannte man große Partikelkonglomerate, etliche μm anstatt nm groß. Diese Konglomerate ließen sich von den Partikelaggregaten, die sich bei höherer Konzentration in der Stammlösung bilden können, deutlich abgrenzen. Die Aggregate waren reversible Partikelansammlungen die sich durch Schütteln oder Behandlung im Ultraschallbad auflösen ließen. Die Konglomerate des *in vitro* Versuches waren mikrometergroß, unregelmäßig in ihrer Form und wiesen mikroskopisch große Ähnlichkeiten zu den Konglomeraten im follikulären Kanal auf, so dass ein ähnlicher Mechanismus für ihre Entstehung vorgeschlagen werden kann. Das führte zu der Formulierung der Hypothese, dass in dem lipophilen Milieu des Follikels eine partielle Auflösung der PLA-Polymere und eine Änderung der drei dimensional Struktur der PLA-Partikel stattfinden kann, welche zur Bildung großer Konglomerate und zur partiellen Freisetzung des eingekapselten Fluoreszenzfarbstoffes führen kann (Abb. 32). PLA ist ein lineares hydrophobes Polymer, das wegen der Karboxylendgruppe negativ geladen ist. Während der Partikelherstellung (die in Azeton gelösten Polymere fallen in Wasser/Ethanol aus und bilden

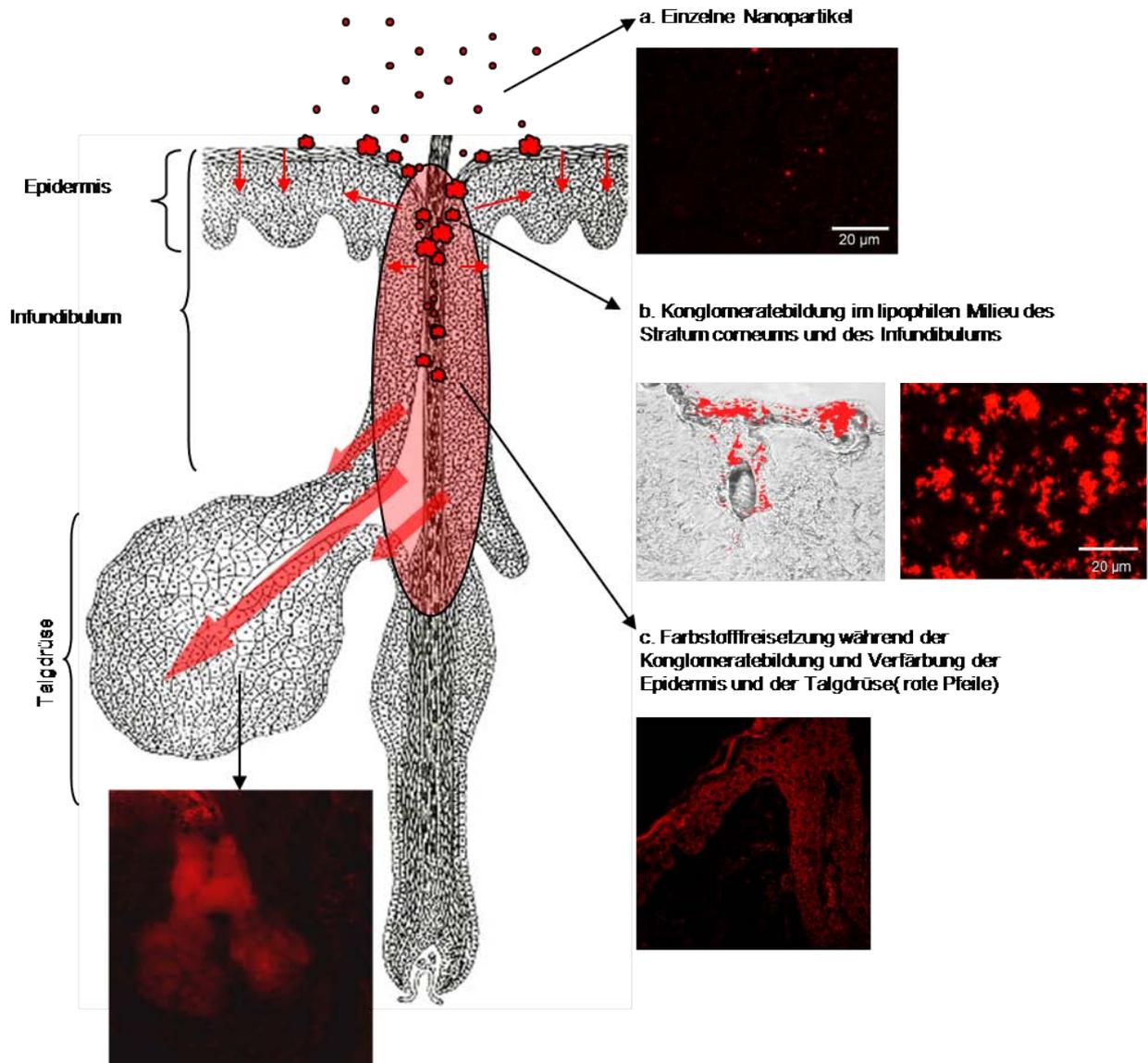


Abb. 32: Schematische Darstellung des Mechanismus der Farbstofffreisetzung und der Verfärbung der Epidermis und der Talgdrüse *in vivo*

Im lipophilen Milieu des Stratum corneum und des Infundibulums bilden sich mikrometergroße Partikelkonglomerate. Der Prozess ist irreversibel und durch Denaturierung der Polymer-Partikel kommt es zur Freisetzung der enkapsulierten Farbstoffe. Durch weitere Diffusion der freigesetzten lipophilen Farbstoffe erfolgt die Verfärbung nicht nur der Epidermis, sondern auch des folliculären Epithels und der Talgdrüse

die Nanopartikel) richten sich die hydrophilen Karboxylgruppen nach außen, und die hydrophoben Anteile des Polymers bilden den Kern der Nanopartikel. In einem hydrophilen Milieu, wie der PBS-Lösung, tragen diese äußerlichen Karboxylgruppen zur Erhaltung der Partikelstruktur bei, anders als in dem lipophilen Milieu der IPM-Lösung und des Follikelkanals, wo die lipophilen Anteile der Partikel sich erneut nach außen ausrichten können. In diesem Kontext könnte man erklären, wie es bedingt durch die Neigung der hydrophilen Gruppen Abstand von der lipophilen Umgebung zu halten, zur Bildung von Konglomeraten kommt, bei denen sich die hydrophilen Anteile im Inneren neu anordnen.

Die oberflächliche Hydrophilie der PLA-Partikel allein kann die Bildung der Aggregate nicht erklären. Eine wichtige Voraussetzung ist die Instabilität der Partikel. Die PS-Partikel, die von verschiedenen Forschergruppen (Schaefer et al 1990, Alvarez- Roman et al 2004, Toll et al 2004, Vogt et al 2006) zur Untersuchung der follikulären Penetration angewendet worden sind, weisen ebenso eine negative Ladung auf, ohne dass sie zur Konglomeratbildung neigen^[39,83,33,34]. Dass lässt sich möglicherweise durch die strukturellen Unterschiede zwischen den verschiedenen Partikelarten erklären. Die von Vogt et al angewendeten Polystyrenpartikel (Molecular Probes, NeutrAvidin labeled Microspheres, Yellow- green (505/515), F8774) sind durch Karboxylierung modifiziert. Ihr Kern besteht aus PS-Polymeren und ist mit einem Polymer beschichtet. An deren Karboxylgruppen wird Neutravidin kovalent gebunden. Exakte Details der Partikelherstellung werden geschützt und nicht bekannt gegeben, man könnte aber von der bekannten Information schließen, dass diese PS-Partikel über eine stabile externe hydrophile Hülle verfügen, die die Änderung der dreidimensionalen Struktur im lipophilen Milieu des Talgs verhindert. Im Gegensatz dazu verfügen die PLA-Partikel nicht über eine ähnliche stabilisierende Hülle, sondern nur über sporadische Karboxylgruppen.

Chen et al (2007) beobachteten in Untersuchungen an pegylierten PLA-Partikeln ebenso eine Instabilität und einen Verlust der Integrität nach systemischer Injektion^[56]. Sie zeigten, dass α - und β -Globuline dabei eine wichtige Rolle spielten. Möglicherweise lässt sich der Verlust der Integrität der Partikel durch die Interaktion des lipophilen Kernes der Partikel mit lipophilen Komponenten der α - und β -Globuline erklären. Wichtig ist zu erwähnen, dass die pegylierten PLA-Partikel (ohne Vernetzung der PEG-Gruppen) genauso wie die 228 nm und 365 nm PLA-Partikel nicht über eine stabilisierende Hülle wie die PS-Partikel verfügen.

Zusammenfassend könnte vermutet werden, dass die schnelle lineare Farbstofffreisetzung in den ersten 4-8 Stunden sich sowohl durch die Konglomeratbildung als auch durch die Diffusion des eingekapselten Farbstoffes durch die Matrix der Partikel/Partikelkonglomerate erklären lässt. Nach 8 Stunden wurde der ganze Prozess verlangsamt bis zum Erreichen eines Plateaus nach 16

bis 24 Stunden. Man könnte vermuten, dass in dieser zweiten Phase der Farbstofffreisetzung aufgrund der beginnenden Sättigung des Empfängermediums eine verlangsamte Diffusion des Farbstoffes stattfindet. Der Diffusionsprozess (Par. 1.4.3) ist von der Konzentration des enkapsulierten Farbstoffes und von der Sättigung der Partikel und des Rezeptormediums abhängig und nimmt daher im Laufe der Zeit ab. Nach einer gewissen Zeit kommt es zu einer Sättigung des Rezeptormediums durch den Farbstoff, bevor der gesamte Farbstoff freigesetzt wird. Diese Sättigung erklärt das Plateau in dem *in vitro* Versuch. Es ist möglich, dass sich die Partikel *in vivo* fast komplett entleeren können, bis es zu einer Sättigung kommt. Der andere wichtige Mechanismus der Wirkstofffreisetzung aus den Nanopartikeln, die Erosion/Degradierung des Polymers durch Hydrolyse, trifft im lipophilen Milieu des Follikels wahrscheinlich nicht zu^[50].

In Hexan wurde eine höhere Konzentration von den freigesetzten Farbstoffen gemessen. Das lässt sich möglicherweise nicht durch erhöhte Freisetzung sondern durch Zerstörung der Partikel durch die Interaktion mit Hexan und durch Auflösen der Polymere in der Hexanlösung wegen der erhöhten Solubilität der PLA-Polymere in Hexan erklären. Hinweis darauf ist die Tatsache, dass sich in der Hexan/PBS Grenzzone makroskopisch keine Konglomeratbildung zeigte. Aus diesen Gründen konnte die zweiphasige Hexan/PBS Lösung nicht sinnvoll zur Simulation der Farbstofffreisetzung im Follikel angewendet werden.

Die Farbstofffreisetzung aus Partikeln unterschiedlicher physikochemischer Eigenschaften nach folliculärer Penetration in Haut ist bereits von anderen Forschergruppen untersucht worden. Mordon et al (2003) untersuchten die Freisetzung von Metylenblau (MB) aus porösen Nylon Mikropartikeln (5µm). Die Freisetzung wurde jedoch nach Behandlung mit Ethanol induziert. Außerdem wurde für ihr Forschungsvorhaben ein Mausmodell verwendet. Nach intrafollikulärer Penetration der Partikel zeigte sich vergleichbar zu den PLA-Partikeln eine zeitabhängige Freisetzung vom MB, welches die Epidermis, den Follikel und die Talgdrüse verfärbte. Insgesamt erreichte MB eine größere Tiefe als die Mikropartikel. Der Zeitablauf der Verfärbung sowie auch die verfärbten Strukturen und Zellpopulationen (Bilder am Fluoreszenzmikroskop) war sehr ähnlich zu der im Rahmen der aktuellen experimentellen Arbeit beschriebenen Kinetik der Nile Red Freisetzung in menschlichen VHF^[40].

Alvarez-Roman et al (2004a) zeigten mit der Hilfe des konfokalen Laserscannmikroskops eine stärkere und tiefere Verfärbung der Haut (Schweineohr) nach Behandlung mit enkapsuliertem Nile Red (in 250 nm P(CL) Partikel) als mit Nile Red in Propylenglykol. Daraus wurde geschlossen, dass eine mikro/nanopartikeläre Formulierung die Wirkstofflieferung positiv

beeinflussen kann. Der exakte Mechanismus wurde nicht eruiert, es bestand aber der Verdacht auf eine Freisetzung von Nile Red. Mit der Hilfe eines zweiphasigen PBS/IPM Modells wurde gezeigt, dass eine solche Freisetzung *in vitro* möglich ist^[39]. In ihrer nächsten experimentellen Arbeit (Alvarez-Roman et al (2004b) konnten sie in der Tat nachweisen, dass sich die verstärkte Verfärbung der Haut tatsächlich durch die Farbstofffreisetzung von den Partikeln erklären ließ^[57].

Rolland et al hatten bereits 1993 mit Hilfe des Mausmodells gezeigt, dass in PLGA-Partikeln enkapsuliertes Adapalen einen besseren therapeutischen Index als Adapalen in anderen Formulierungen hat. Adapalen wird wegen seiner komedolytischen Wirkung für die Therapie der Akne benutzt. Derselben Arbeitsgruppe ist es gelungen, die Freisetzung von Adapalen aus den Partikeln in künstlichem Talg nachzuweisen, als Mechanismus wurde jedoch nur die Diffusion vermutet^[36]. PLGA ist fast identisch zu PLA. Deswegen ist zu vermuten, dass die Partikel im lipophilen Milieu des Follikels ebenso Konglomerate bilden. Die Arbeit der oben genannten Forschergruppen hat bereits gezeigt, dass durch Anwendung von mikropartikulären Formulierungen eine verbesserte Wirkstofflieferung im Follikel erzielt werden kann. Mordon et al. (2003) und Rolland et al. (1993) zeigten sogar, dass dadurch eine selektive Therapie von Talgdrüsenkrankheiten möglich ist^[40,36]. Es muss jedoch betont werden, dass nach der Untersuchung der Penetrations- und Freisetzungseigenschaften der PLA-Partikel im Rahmen der aktuellen experimentellen Arbeit zum ersten Mal diese verbesserte Lieferung von Wirkstoffen mit der Hilfe von partikulären Systemen in menschlichen Haarfollikeln und nicht in Tiermodellen gezeigt wurde. Außerdem wurde für den Mechanismus der Freisetzung die Kombination von Denaturierung der hydrophoben PLA-Partikel und Diffusion durch die Poren und/oder die Matrix der Partikel vorgeschlagen. Des Weiteren konnte mit der Hilfe der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden, dass die Verfärbung durch den freigesetzten Farbstoff bedingt ist und dass Nile Red durch die Zellen diffundiert (intrazellulärer Penetrationsweg).

4.3.1 PLA-Partikel als Wirkstoffträger für die lokale Dermatotherapie

Die Freisetzung des Farbstoffes aus den Nanopartikeln und den Konglomeraten in den ersten acht Stunden folgte einer näherungsweise linearen Kinetik. Das würde heißen, dass durch die Applikation der Partikellösung auf die Haut z.B. zweimal täglich, ständig eine konstante Wirkstoffmenge im Follikel zur Verfügung stünde. Dadurch könnte ein konstanter Wirkstoffspiegel erreicht werden, mit denkbaren Folgen für die Effizienz und die Verträglichkeit des entsprechenden Medikamentes.

Die Freisetzung findet im folliculären Infundibulum nach der Konglomeratbildung statt. Nach 24 Stunden sah man den lipophilen Farbstoff nur im unteren Teil des Follikels und der Talgdrüse. Das ist signifikant für die Behandlung von Talgdrüsenkrankheiten wie Akne oder Rosazea. Durch die Beladung von PLA-Partikeln mit lipophilen Substanzen könnte deren therapeutischer Effekt maximiert werden. Das Infundibulum fungiert als Reservoir für die Nanopartikel. An dieser Stelle findet die prolongierte Freisetzung durch Bildung von Konglomeraten, die Konformationsänderung der Partikel mit Freisetzung des Wirkstoffes und anschließend die Diffusion des lipophilen Wirkstoffes an die Zielstrukturen heran statt.

Im Rahmen dieser experimentellen Arbeit wurde nachgewiesen, dass nach der Wirkstofflieferung auch die Wirkstoffaufnahme durch die Epidermiszellen, die Sebozyten und die Zellen des folliculären Epithels erfolgen kann. Das ist von größter Bedeutung für die kontrollierte Wirkstofflieferung zur Behandlung von Haar- und Talgdrüsenkrankheiten. Wichtige Vorteile der PLA-Partikel für derartige Anwendungen sind daher die follicelspezifische Penetration in die menschlichen VHF, der Depoteffekt der Partikel und die prolongierte Wirkstofffreisetzung mit maximalen Konzentrationen in der direkten Umgebung der Zielstrukturen. Weitere Vorteile der PLA-Partikel sind ihre biologische Abbaubarkeit und ihre große Stabilität bei der Lagerung (bis zu einem Jahr), was natürlich für ein potenziell kommerzielles Produkt von größter Bedeutung ist. Schließlich muss noch einmal die Möglichkeit der Herstellung von PLA-Polymeren aus kostengünstigen, erneuerbaren Ressourcen wie zum Beispiel Maisstärke oder Zuckerrohr betont werden.

Selbstverständlich sind auch Liposomen und SLN wichtige Kandidaten für die Entwicklung von Trägersystemen für die lokale Dermatotherapie. Vor allem Liposomen sind umfangreich in den letzten 20 Jahren untersucht worden und sind fast die einzige Gruppe von allen Nanopartikel/Mikropartikelarten, die bereits kommerziell verwendet wird^[89,90]. Zu deren großen Vorteilen zählen die gute Verträglichkeit, der günstige Herstellungspreis und die Möglichkeit mit verschiedenen hydrophilen sowie auch hydrophoben Molekülen beladen zu werden^[91]. Wegen ihrer Instabilität und dem beschränkten Depoteffekt sind mit der Hilfe der

Nanotechnologie moderne solide Träger aus Lipiden (SLN) entwickelt worden^[92,93]. Ziel war es, die Vorteile der verschiedenen Partikelarten zu kombinieren und gleichzeitig ihre Schwächen zu vermeiden. Trotzdem weisen sie noch gewisse Nachteile auf, wie zum Beispiel der beschränkte Depoteffekt und die physikalische Instabilität während der Lagerung. Grund dafür ist ihre strukturelle Komplexität^[94]. Aus allen diesen Gründen ist die Suche nach idealen Wirkstoffträgern für verschiedene Anwendungen der lokalen Dermatotherapie immer noch aktuell. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit erscheinen PLA-Partikel als viel versprechende Wirkstoffträger für die Behandlung von Haar-/Talgdrüsenkrankheiten. Durch Modifizierung der Struktur und dadurch der Porösität der PLA-Partikel kann man die Wirkstofffreisetzung beeinflussen^[48]. Eine Idee wäre die Vernetzung (Cross linkage) der Partikeloberfläche durch eine UV-induzierte Polymerisation eines tri(ethylenglykol) dimethacrylat Monomers^[54]. Die Beschichtung der Partikel mit einem zweiten Polymer und dadurch der Verschluss der oberflächigen Poren wäre eine andere Strategie^[55]. Auf jeden Fall bietet die moderne Nanotechnologie eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Modifizierung der Partikeleigenschaften für eine beliebige Anpassung an den Bedürfnissen der jeweiligen erwünschten therapeutischen Strategie. Weitergehende Forschungsvorhaben, die diese Optionen systematisch und spezifisch für die verschiedenen möglichen Anwendungen untersuchen, sind daher erforderlich.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser experimentellen Arbeit war die Untersuchung der möglichen Anwendung von biologisch abbaubaren PLA-Partikeln als Träger für die transkutane Vakzinierung und für die lokale Dermatotherapie. Zu diesem Zweck wurden die Penetrations- und Freisetzungseigenschaften von Nanopartikeln in menschlicher Haut und ihre potentielle Aufnahme durch die Langerhanszellen der Epidermis untersucht.

Es zeigte sich, dass nach dem Auftragen der Partikellösung auf die exzidierte menschliche Haut innerhalb der ersten 2-4 Stunden eine Aggregation im Haarfollikel erfolgte. In ungefähr der Hälfte der untersuchten Haarfollikel ließen sich fluoreszenzmikroskopisch PLA-Partikel nachweisen, und bei einer beträchtlichen Anzahl von Follikeln (13%) zeigte sich eine Penetration bis zum tiefen Infundibulum. Durch die Interaktion der Partikel mit der lipophilen Umgebung erfolgte eine Konglomeratbildung der Partikel und Freisetzung des enkapsulierten Farbstoffes, möglicherweise bedingt durch eine Denaturierung. Am Fluoreszenzmikroskop zeigte sich eine diffuse Verfärbung der Epidermis, des follikulären Epithels und der Talgdrüse. Diese Farbstofffreisetzung wurde *in vitro* mit Hilfe der Fluoreszenzspektrophotometrie und eines zweiphasigen Systems (PBS/Hexan und PBS/IPM) untersucht. Die Freisetzung folgte in den ersten 8 Stunden einer linearen Kinetik und erreichte nach 16-24 Stunden ein Plateau. Dies lässt sich möglicherweise durch die Änderung der dreidimensionalen Struktur der Partikel während der Konglomeratbildung und die Diffusion durch Poren oder die Matrix der Partikel erklären. Von den teils mikrometergroßen Konglomeraten ließen sich die Partikel nicht neu formen oder trennen, was auf einen irreversiblen Prozess hinweist. Der freigesetzte Farbstoff wurde von den verschiedenen Zellpopulationen der Epidermis, des follikulären Epithels und der Talgdrüse aufgenommen (durchflusszytometrischer Nachweis) und persistierte im unteren Follikel und in der Talgdrüse für mindestens 24 Stunden. Die untersuchten PLA-Partikel sind deswegen ein potentieller Kandidat für die Entwicklung eines neuen Trägers für die kontrollierte Wirkstofflieferung in den Haarfollikel und in Talgdrüsen. Eine mögliche Anwendung in der Therapie von Talgdrüsen- und Haarkrankheiten ist gut vorstellbar. Durch Applikation der Partikel z. B. zweimal täglich könnte ein konstanter Wirkstoffspiegel im Follikel und in den Talgdrüsen mit positiven Folgen für die Verträglichkeit und den therapeutischen Effekt des Präparates erreicht werden.

Das zweite Ziel dieser experimentellen Arbeit war, aufbauend auf vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe, die Untersuchung der Anwendbarkeit der PLA-Partikel als

Antigen-träger für die Entwicklung von innovativen transkutanen Vakzinierungsstrategien. Für die Prävention von chronischen infektiösen Erkrankungen durch intrazellulär persistierende Pathogene und für die Behandlung von Tumoren ist die Induktion einer potenten zellulären Immunantwort von größter Bedeutung. Dazu kann die Internalisierung der Nanopartikel durch die Antigen-präsentierenden Zellen der Haut, möglicherweise über MHC-I Kreuzpräsentation des Antigens, beitragen. Aus diesem Grund wurde die Aufnahme der PLA-Partikel durch die Langerhanszellen nach topischer Applikation untersucht. Zur Förderung der follikulären Penetration erfolgte eine Vorbehandlung mit CSSS, welches die Haarfollikel für die Penetration öffnet und die Penetration partikulärer Formulierungen verbessert. Die im Rahmen dieser experimentellen Arbeit untersuchten 228 nm und 365 nm PLA-Partikel, wurden nach topischer Applikation nicht durch die Langerhanszellen der Epidermis aufgenommen. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der FACS-Analyse nach *in vitro* Inkubation in der Zellkultur eine größen- und konzentrationsabhängige Aufnahme der Partikel durch epidermale Langerhanszellen. Die Bildung von Konglomeraten nach topischer Applikation der Partikelsuspension erklärt möglicherweise warum die Partikel *ex vivo* nicht internalisiert wurden. Die verwendeten Partikelgrößen lagen allerdings bereits für die einzelnen Partikel in einem Bereich, in dem eine Penetration durch das follikuläre Epithel, wenn überhaupt nur limitiert stattfindet. Die Ergebnisse bestätigen daher frühere Beobachtungen, die die große Bedeutung der Partikelgröße für die Penetrationseigenschaften und die zelluläre Aufnahme unterstrichen.

Aufgrund der Biodegradierbarkeit bleiben speziell PLA-Partikel weiterhin viel versprechende Träger für transkutane Therapiesysteme. Die im Rahmen dieser experimentellen Arbeit gewonnenen Ergebnisse weisen allerdings daraufhin, dass eine systematische Verbesserung der Partikeleigenschaften, d.h. Reduktion der Größe und Schutz vor Destabilisierung im lipophilen Milieu wichtige Voraussetzungen sind.

6. Literaturverzeichnis

1. Lademann J, Knorr F, Richter H et al. Hair follicles--an efficient storage and penetration pathway for topically applied substances. Summary of recent results obtained at the Center of Experimental and Applied Cutaneous Physiology, Charite -Universitätsmedizin Berlin, Germany. *Skin Pharmacol Physiol* 2008; 21:150-155.
2. Vogt A, Hadam S, Heiderhoff M et al. Morphometry of human terminal and vellus hair follicles. *Exp Dermatol* 2007; 16:946-950.
3. Otberg N, Richter H, Schaefer H et al. Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. *J Invest Dermatol* 2004; 122:14-19.
4. Cotsarelis G. Epithelial stem cells: a folliculocentric view. *J Invest Dermatol* 2006; 126:1459-1468.
5. Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, and Lavker RM. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 2000; 102:451-461.
6. Ito M, Liu Y, Yang Z et al. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med* 2005; 11:1351-1354.
7. Nishimura EK, Jordan SA, Oshima H et al. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* 2002; 416:854-860.
8. Kumamoto T, Shalhevet D, Matsue H et al. Hair follicles serve as local reservoirs of skin mast cell precursors. *Blood* 2003; 102:1654-1660.
9. Tiede S, Kloepper JE, Bodo E et al. Hair follicle stem cells: walking the maze. *Eur J Cell Biol* 2007; 86:355-376.
10. Paus R and Piker S. Functional Anatomy. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, eds. *Dermatology*. 1st ed. Edinburgh, Scotland: Elsevier 2003:1010-1014.
11. Christoph T, Muller-Rover S, Audring H et al. The human hair follicle immune system: cellular composition and immune privilege. *Br J Dermatol* 2000;142:862-873.

-
12. Lademann J, Otberg N, Richter H et al. Follicular penetration. An important pathway for topically applied substances. *Hautarzt* 2003;54:321-323.
 13. Schaeffer H and Rademeier TE. In: Schaeffer H and Rademeier TE, eds. *Skin Barrier*. 1996; 1st Basel, Switzerland:Karger,1996:79-81.
 14. Schaeffer H and Rademeier TE. In: Schaeffer H and Rademeier TE, eds. *Skin Barrier*. 1996; 1st Basel, Switzerland: Karger, 1996:54-59.
 15. Tsai JC, Menon CM, Holleran W.M., and Feingold KR. Skin barrier and percutaneous Drug Delivery. 2003; 1st:1969-1074.
 16. Schaefer H and Lademann J. The role of follicular penetration. A differential view. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001; 14 Suppl 1:23-27.
 17. Behl CR, Flynn GL, Linn EE, and Smith WM. Percutaneous absorption of corticosteroids: age, site, and skin-sectioning influences on rates of permeation of hairless mouse skin by hydrocortisone. *J Pharm Sci* 1984; 73:1287-1290.
 18. Hueber F, Schaefer H, and Wepierre J. Role of transepidermal and transfollicular routes in percutaneous absorption of steroids: in vitro studies on human skin. *Skin Pharmacol* 1994; 7:237-244.
 19. Tenjarla SN, Kasina R, Puranajoti P, Omar MS, and Harris WT. Synthesis and evaluation of N-acetylprolinate esters - novel skin penetration enhancers. *Int J Pharm* 1999; 192:147-158.
 20. Michel M, L'Heureux N, Pouliot R et al. Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1999;35:318-326.
 21. Lademann J, Otberg N, Richter H et al. Investigation of follicular penetration of topically applied substances. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001;14 Suppl 1:17-22.
 22. Mills OH, Jr. and Kligman AM. The follicular biopsy. *Dermatologica* 1983;167:57-63.
 23. Illel B. Formulation for transfollicular drug administration: some recent advances. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1997; 14:207-219.

-
24. Uitto OD and White HS. Electroosmotic pore transport in human skin. *Pharm Res* 2003;20:646-652.
 25. Jung S, Otberg N, Thiede G et al. Innovative liposomes as a transfollicular drug delivery system: penetration into porcine hair follicles. *J Invest Dermatol* 2006;126:1728-1732.
 26. Bernard E, Dubois JL, and Wepierre J. Importance of sebaceous glands in cutaneous penetration of an antiandrogen: target effect of liposomes. *J Pharm Sci* 1997;86:573-578.
 27. Sjolander S, Drane D, Davis R et al. Intranasal immunisation with influenza-ISCAM induces strong mucosal as well as systemic antibody and cytotoxic T-lymphocyte responses. *Vaccine* 2001;19:4072-4080.
 28. Ludwig C and Wagner R. Virus-like particles-universal molecular toolboxes 2. *Curr Opin Biotechnol* 2007;18:537-545.
 29. Saupe A, Wissing SA, Lenk A, Schmidt C, and Muller RH. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) - structural investigations on two different carrier systems. *Biomed Mater Eng* 2005;15:393-402.
 30. Yih TC and Al-Fandi M. Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems. *J Cell Biochem* 2006;97:1184-1190.
 31. PAS 71: Definition of Nanoparticles , BSI 2008 (Accesed July 23, 2008 at <http://www.bsi-global.com/en/Standards-and-Publications/Industry-Sectors/Nanotechnologies/PAS-71/>)
 32. Amoh Y, Li L, Yang M et al. Hair follicle-derived blood vessels vascularize tumors in skin and are inhibited by Doxorubicin. *Cancer Res* 2005;65:2337-2343.
 33. Toll R, Jacobi U, Richter H et al. Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. *J Invest Dermatol* 2004;123:168-176.
 34. Vogt A, Combadiere B, Hadam S et al. 40 nm, but not 750 or 1,500 nm, nanoparticles enter epidermal CD1a+ cells after transcutaneous application on human skin. *J Invest Dermatol* 2006;126:1316-1322.

-
35. Mohamed F and van der Walle CF. PLGA microcapsules with novel dimpled surfaces for pulmonary delivery of DNA. *Int J Pharm* 2006;311:97-107.
 36. Rolland A, Wagner N, Chatelus A, Shroot B, and Schaefer H. Site-specific drug delivery to pilosebaceous structures using polymeric microspheres. *Pharm Res* 1993;10:1738-1744.
 37. Shim J, Seok KH, Park WS et al. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. *J Control Release* 2004;97:477-484.
 38. Lademann J, Richter H, Teichmann A et al. Nanoparticles--an efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *Eur J Pharm Biopharm* 2007;66:159-164.
 39. Alvarez-Roman R, Naik A, Kalia YN, Guy RH, and Fessi H. Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. *Pharm Res* 2004;21:1818-1825.
 40. Mordon S, Sumian C, and Devoisselle JM. Site-specific methylene blue delivery to pilosebaceous structures using highly porous nylon microspheres: an experimental evaluation. *Lasers Surg Med* 2003;33:119-125.
 41. Honeywell-Nguyen PL, Gooris GS, and Bouwstra JA. Quantitative assessment of the transport of elastic and rigid vesicle components and a model drug from these vesicle formulations into human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 2004;123:902-910.
 42. van den Bergh JP, Gelens MA, Klaassen HA et al. Efficacy and tolerance of three different calcium acetate formulations in hemodialysis patients. *Neth J Med* 1999;55:222-228.
 43. Baroli B, Ennas MG, Loffredo F et al. Penetration of metallic nanoparticles in human full-thickness skin. *J Invest Dermatol* 2007;127:1701-1712.
 44. Lekki J, Stachura Z, Dabrós W et al. On the follicular pathway of percutaneous uptake of nanoparticles: Ion microscopy and autoradiography studies. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research* 2007;260:174-177.
 45. Lademann J, Weigmann H, Rickmeyer C et al. Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice 1. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 1999;12:247-256.

-
46. Vogt A, Mahe B, Costagliola D et al. Transcutaneous anti-influenza vaccination promotes both CD4 and CD8 T cell immune responses in humans. *J Immunol* 2008;180:1482-1489.
 47. Lademann J, Otberg N, Jacobi U, Hoffman RM, and Blume-Peytavi U. Follicular penetration and targeting. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2005;10:301-303.
 48. Ehtezazi T and Washington C. Controlled release of macromolecules from PLA microspheres: using porous structure topology. *J Control Release* 2000;68:361-372.
 49. Brannon-Peppas L. Polymers in Controlled Drug Delivery. *Medical Plastics and Biomaterials* 1997;4:34-44.
 50. Batycky RP, Hanes J, Langer R, and Edwards DA. A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres. *J Pharm Sci* 1997;86:1464-1477.
 51. Lemaire V, Belair J, and Hildgen P. Structural modeling of drug release from biodegradable porous matrices based on a combined diffusion/erosion process. *Int J Pharm* 2003;258:95-107.
 52. Ehtezazi T, Washington C, and Melia CD. First order release rate from porous PLA microspheres with limited exit holes on the exterior surface. *J Control Release* 2000;66:27-38.
 53. Xue JM and Shi M. PLGA/mesoporous silica hybrid structure for controlled drug release. *J Control Release* 2004;98:209-217.
 54. Thote AJ, Chappell JT, Jr., Gupta RB, and Kumar R. Reduction in the initial-burst release by surface crosslinking of PLGA microparticles containing hydrophilic or hydrophobic drugs. *Drug Dev Ind Pharm* 2005;31:43-57.
 55. Pekarek KJ, Jacob JS, and Mathiowitz E. Double-walled polymer microspheres for controlled drug release. *Nature* 1994;367:258-260.
 56. Chen H, Kim S, He W et al. Fast release of lipophilic agents from circulating PEG-PDLLA micelles revealed by in vivo forster resonance energy transfer imaging. *Langmuir* 2008;24:5213-5217.

-
57. Alvarez-Roman R, Naik A, Kalia YN, Guy RH, and Fessi H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J Control Release* 2004;99:53-62.
 58. Combadiere B and Mahe B. Particle-based vaccines for transcutaneous vaccination. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2008;31:293-315.
 59. Vogt A, Mandt N, Lademann J, Schaefer H, and Blume-Peytavi U. Follicular targeting--a promising tool in selective dermatotherapy. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2005;10:252-255.
 60. Takeuchi F, Sterilein RD, and Hall RP, III. Increased E-selectin, IL-8 and IL-10 gene expression in human skin after minimal trauma. *Exp Dermatol* 2003;12:777-783.
 61. Aichele P, Brduscha-Riem K, Zinkernagel RM, Hengartner H, and Pircher H. T cell priming versus T cell tolerance induced by synthetic peptides. *J Exp Med* 1995;182:261-266.
 62. Storni T, Kundig TM, Senti G, and Johansen P. Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:333-355.
 63. Kanchan V and Panda AK. Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response. *Biomaterials* 2007;28:5344-5357.
 64. Mottram PL, Leong D, Crimeen-Irwin B et al. Type 1 and 2 immunity following vaccination is influenced by nanoparticle size: formulation of a model vaccine for respiratory syncytial virus. *Mol Pharm* 2007;4:73-84.
 65. Foged C, Brodin B, Frokjaer S, and Sundblad A. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *Int J Pharm* 2005;298:315-322.
 66. Strong P, Clark H, and Reid K. Intranasal application of chitin microparticles down-regulates symptoms of allergic hypersensitivity to *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Aspergillus fumigatus* in murine models of allergy. *Clin Exp Allergy* 2002;32:1794-1800.
 67. Rogers PR and Croft M. Peptide dose, affinity, and time of differentiation can contribute to the Th1/Th2 cytokine balance. *J Immunol* 1999;163:1205-1213.

-
68. Ruedl C, Bachmann MF, and Kopf M. The antigen dose determines T helper subset development by regulation of CD40 ligand. *Eur J Immunol* 2000;30:2056-2064.
69. Storni T, Ruedl C, Renner WA, and Bachmann MF. Innate immunity together with duration of antigen persistence regulate effector T cell induction. *J Immunol* 2003;171:795-801.
70. Panyam J and Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:329-347.
71. Hedley ML, Strominger JL, and Urban RG. Plasmid DNA encoding targeted naturally processed peptides generates protective cytotoxic T lymphocyte responses in immunized animals. *Hum Gene Ther* 1998;9:325-332.
72. Ataman-Onal Y, Munier S, Ganee A et al. Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models. *J Control Release* 2006;112:175-185.
73. Tamber H, Johansen P, Merkle HP, and Gander B. Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:357-376.
74. Tay A and Yang ST. Production of L(+)-lactic acid from glucose and starch by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* in a rotating fibrous bed bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 2002;80:1-12.
75. Mucosal Nano Vaccine Candidate for HIV. *MuNanoVac* 2008. (Accessed July 23, 2008 at <http://www.munanovac.eu/>)
76. Lamalle-Bernard D, Munier S, Compagnon C et al. Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120 proteins to surfactant-free anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity. *J Control Release* 2006;115:57-67.
77. Greenspan P, Mayer EP, and Fowler SD. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* 1985;100:965-973.
78. Simon JC, Dittmar HC, de RR et al. Rapid purification of human Langerhans cells using paramagnetic microbeads. *Exp Dermatol* 1995;4:155-161.

-
79. Radcliff G and Jaroszeski MJ. Basics of flow cytometry. *Methods Mol Biol* 1998;91:1-24.
 80. Chai BH, Zheng JM, Zhao Q, and Pollack GH. Spectroscopic studies of solutes in aqueous solution. *J Phys Chem A* 2008;112:2242-2247.
 81. Hoffman RM. Gene and stem cell therapy of the hair follicle 27. *Methods Mol Biol* 2005;289:437-448.
 82. Vogt A and Blume-Peytavi U. [Biology of the human hair follicle. New knowledge and the clinical significance]. *Hautarzt* 2003;54:692-698.
 83. Schaefer H, Watts F, Brod J, and Illel B. Prediction of Percutaneous Penetration : Methods, Measurements and Modelling. 1990;405-441.
 84. Patzelt A, Richter H, Buettmeyer R et al. Differential stripping demonstrates a significant reduction of the hair follicle reservoir in vitro compared to in vivo 2. *Eur J Pharm Biopharm* 2008;
 85. Reddy ST, Swartz MA, and Hubbell JA. Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines. *Trends Immunol* 2006;27:573-579.
 86. O'Reilly RK, Hawker CJ, and Wooley KL. Cross-linked block copolymer micelles: functional nanostructures of great potential and versatility. *Chem Soc Rev* 2006;35:1068-1083.
 87. Lampe JN, Fernandez C, Nath A, and Atkins WM. Nile Red is a fluorescent allosteric substrate of cytochrome P450 3A4. *Biochemistry* 2008;47:509-516.
 88. Munster U, Nakamura C, Haberland A et al. RU 58841-myristate--prodrug development for topical treatment of acne and androgenetic alopecia. *Pharmazie* 2005; 60:8-12.
 89. Choi MJ and Maibach HI. Liposomes and niosomes as topical drug delivery systems. *Skin Pharmacol Physiol* 2005;18:209-219.
 90. Date AA, Naik B, and Nagarsenker MS. Novel drug delivery systems: potential in improving topical delivery of antiacne agents. *Skin Pharmacol Physiol* 2006;19:2-16.

-
91. Guterres S, Alves MP, and Pohlmann AR. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules for Cutaneous Applications. *Drug Target Insights* 2007;2:147-157.
 92. Muller RH, Mader K, and Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm* 2000;50:161-177.
 93. Schafer-Korting M, Mehnert W, and Korting HC. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:427-443.
 94. Mehnert W and Mader K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;47:165-196.

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1:	Schematische Darstellung des Vellushaarfollikels_____	3
Abb. 2:	Transkutane Penetration_____	5
Abb. 3:	PLA-Synthese_____	18
Abb. 4:	PLA-Partikel_____	18
Abb. 5:	Chemische Struktur von Coumarin 6 und Nile Red_____	20
Abb. 6:	Durchführung eines CSSS auf exzidierte menschliche Haut_____	24
Abb. 7:	Penetrationstiefe der PLA-Partikel in die menschlichen Vellushaarfollikel_____	26
Abb. 8:	Untersuchung der Partikelaufnahme der PLA-Partikel durch die Langerhanszellen_____	28
Abb. 9:	FACS- Analyse, Beispiele vom Dot- Plot-Diagramm und Histogramm_____	30
Abb. 10:	In vitro Untersuchung der Farbstofffreisetzung von den PLA-Partikeln_____	32
Abb. 11:	Fluoreszenzemissionsspektren_____	33
Abb. 12:	Coumarin 6 und Nile Red Kalibrierungskurven für die freien Fluoreszenzfarbstoffen Nile Red und Coumarin6_____	34
Abb. 13:	Penetration der 228 nm und 365 nm PLA-Partikel in menschliche Vellushaarfollikel_____	37
Abb. 14:	Follikuläre Penetration der 365 nm PLA-Partikeln_____	38
Abb. 15:	Untersuchung der Aufnahme von 365 nm Coumarin 6 PLA-Partikeln durch die Langerhanszellen der Epidermis_____	40
Abb. 16:	Untersuchung der Aufnahme von 228 nm Nile Red PLA-Partikeln durch die Langerhanszellen der Epidermis_____	41
Abb. 17:	Geprickte Hautproben_____	42
Abb. 18:	In vitro Aufnahme der 228 nm PLA-Partikel durch Langerhanszellen_____	44
Abb. 19:	In vitro Aufnahme der 365 nm PLA-Partikel durch Langerhanszellen_____	45
Abb. 20:	Aufnahme der 375 nm PLA-Partikel durch Langerhanszellen in vitro_____	46
Abb. 21:	In vitro Aufnahme der 423 nm PLA-Partikel durch Langerhanszellen_____	47
Abb. 22:	Diffuse Verfärbung der Epidermis, des Follikels und der Talgdrüse nach Behandlung der Haut ex vivo mit 228 nm PLA_Nile Red-Partikeln_____	48-51
Abb. 23:	Nile Red Freisetzung aus 228 nm PLA-Partikeln ex vivo_____	52

Abb. 24:	NR und Coum6 Freisetzung in PBS: Hexan (1:1) Lösung. Konzentration des freigesetzten NR in Hexan_____	54
Abb. 25:	NR und Coum6 Freisetzung in PBS:Hexan (1:1) Lösung. Prozentsatz der freigesetzten NR und Coum6 in Hexan_____	54
Abb. 26:	NR und Coum6 Freisetzung in PBS:IPM 1:1 Lösung. Konzentration von freigesetztem NR und Coum6 in IPM_____	55
Abb. 27:	NR und Coum6 Freisetzung in PBS:IPM 1:1 Lösung. Prozentsatz von freigesetztem NR und Coum6 in IPM_____	55
Abb. 28:	Aggregation der PLA-Partikel nach 24h Inkubation in PBS:IPM (1:1) Lösung_____	57
Abb. 29:	PS-Partikel, PBS:IPM 1:1 Lösung_____	58
Abb. 30:	Aufnahme der von den Nanopartikeln freigesetzten Farbstoffe Coumarin 6 und Nile Red durch die Epidermiszellen_____	59
Abb. 31:	Messung des Coumarin6 und Nile Red in Extrakten der Epidermiszellen____	61
Abb. 32:	Schematische Darstellung des Mechanismus der Farbstofffreisetzung und der Verfärbung der Epidermis und der Talgdrüse <i>in vivo</i> _____	77
Tab. 1:	PLA-Partikel Daten_____	19
Tab. 2:	Chemikalienliste_____	21
Tab. 3:	Verwendete Geräte_____	22
Tab. 4:	Sonstige Materialien_____	23
Tab. 5:	Exzitations- und Emissionsmaxima von Nile Red und Coumarin 6 Dichloromethan, Hexan und IPM_____	35
Tab. 6:	Penetrationstiefe der PLA-Partikel, semiquantitative Analyse _____	36

Verzeichnis der Abkürzungen

APZ	Antigen-präsentierende Zellen
CD	Cluster of Differentiation
CLSM	Konfokales Laserscanmikroskop
Coum 6	Coumarin 6
CpG	Cytosine- Guanine Dinukleotide
CSSS	Cyanoacrylate Skin Surface Stripping
CTS	Bindegewebige Wurzelscheide
DZ	Dendritische Zellen
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
Em.	Emmision
Exc.	Exzitation
FM	Fluoreszenzmikroskop
HBV	Hepatitis B Virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPV	Human Papiloma Virus
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPM	Isopropylmyristate
IRS	Innere Wurzelscheide
ISCOMS	Immunstimulating Complexes
Kontr.	Kontrolle
Konz.	Konzentration
LHZ	Langerhanszellen
MACS	Magnetic-activated Cell Sorting
MB	Methylenblau
MHC	Major Histocompatibility Complex
n.K.	Negativkontrolle
NK	Natural Killer
NP	Nanopartikel
NR	Nile Red

ORS	Äußere Wurzelscheide
PAMP's	Pathogen Associated Molecular Patterns
Par.	Paragraph
P(CL)	Poly (ϵ -caprolactone)
PFA	Paraformaldehyde
PLA	Poly(lactic Acid)
PLGA	Poly (lactide-co-glycolide)
Polydisp. Index	Polydispersity Index
Pr.	Probe
PS	Polystyren
S.c.	Stratum corneum
SD	Standardabweichung
SLN	Solide Lipide Nanopartikel
TEM	Transmission Electron Microscopy
THF	Terminalhaarfollikel
TLR	Toll like Receptors
UV	Ultra Violet
VHF	Vellushaarfollikel
VLP's	Virus like particles

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

Danksagung

Bei dieser Arbeit haben mich viele Menschen unterstützt und ohne deren Hilfe hätte sich diese Arbeit nie realisieren lassen.

Zuerst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. U. Blume-Peytavi für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, die ständige Unterstützung und Beratung bedanken. Das sehr gute Arbeitsklima in ihrer Abteilung wirkte auf mich sehr produktiv und motivierend.

Herrn Prof. Dr. med. W. Sterry danke ich für die Möglichkeit an der dermatologischen Klinik der Charite-Universitätsmedizin Berlin zu arbeiten und zu promovieren.

Dank der intensiven Betreuung und der exzellenten fachlichen Beratung von Frau Dr. med. A. Vogt wurde diese Arbeit reibungslos und zügig fertig gestellt. Durch ihr breites Wissen im Gebiet der Nanopartikel und der transkutanen Vakzinierung habe ich eine Menge lernen können.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. F. Rancan. Mich mit ihren exzellenten naturwissenschaftlichen Kenntnissen auseinanderzusetzen war eine große Herausforderung. Die spannende tägliche Zusammenarbeit mit ihr, die fertilen Konfrontationen und die langen Diskussionen trugen entscheidend zu der erfolgreichen Realisierung dieser Arbeit bei.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Frau S. Hadam für die geduldige fachliche Unterstützung in den experimentellen Räumlichkeiten.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die immer an mich geglaubt und großzügig unterstützt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Dimitrios Papakostas, dass die vorliegende Dissertationsarbeit von mir selbst ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt. Die benutzten Hilfsmittel, sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, den 10.05.2009