

**Topische Applikation von Opioiden –
Einfluss auf die Wundheilung
und Untersuchung möglicher Trägersysteme**

DISSERTATION

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

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

vorgelegt von
Nadine Wolf
aus Bamberg

Berlin, im Oktober 2009

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

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Christoph Stein
Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin
Freie Universität Berlin
Charité Campus Benjamin Franklin
Hindenburgdamm 30
12200 Berlin

Disputation am 10. Dezember 2009

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting

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

Danksagung

Frau Professor Dr. Monika Schäfer-Korting gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes für die Dissertation sowie für die stetige Unterstützung und Förderung im Verlauf der Arbeit. Ihre wissenschaftliche Kompetenz und stete Gesprächsbereitschaft haben wesentlich zum erfolgreichen Abschluss der Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Professor Dr. Christoph Stein möchte ich mich für die Begutachtung der Dissertationsschrift bedanken.

Zudem bedanke ich mich besonders herzlich auch bei Herrn Prof. Dr. Christoph Stein und Frau Dr. Ruth Zaslansky vom Institut für Anästhesie und Anästhesiologie der Charité Berlin für die angenehme Zusammenarbeit und immer neue Anregungen im Verlauf der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Klaus Kramer danke ich für die Idee der Wundinduktion mittels Laser und die Kontaktvermittlung zum Institut für Lasermedizin. Zudem danke ich ihm sowie Herrn Dr. Tobias Blaschke für die Durchführung der Messungen zur Parelektrischen Spektroskopie.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Jürgen Beuthan sowie Herrn Dr. Jürgen Helfmann vom Institut für Medizinische Physik und Lasermedizin für die Bereitstellung des CO₂-Lasers und Hilfsbereitschaft beim Umgang mit diesem.

Bei Herrn Momin Mohd. Yahya bedanke ich mich für die Herstellung und Charakterisierung der Morphin-beladenen SLN.

Herrn Dr. Günther Weindl danke ich für viele praktische Hinweise und Anregungen im Labor sowie unermüdlige Hilfe bei der Versuchsauswertung.

Der technischen Assistentin Frau Hannelore Gonska danke ich für die Hilfe bei der Kultivierung und Isolierung von humanen Hautzellen.

Allen übrigen Mitarbeitern der Arbeitskreise von Frau Prof. Dr. Schäfer-Korting und Herrn Prof. Dr. Kleuser am Institut für Pharmazie, FB Pharmakologie und Toxikologie danke ich vor allem für das freundschaftliche Arbeitsklima und die angenehme Zusammenarbeit. Dabei möchte ich mich ganz besonders bei Dr. Anja Schwanke, Dr. Vivian Kral und Dr. Sarah Kückler bedanken für viele außeruniversitäre Unternehmungen aus denen auch private Freundschaften entstanden sind.

Zum Schluss bedanke ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern und meinem Bruder für die Unterstützung und den Rückhalt, auch und vor allem in schwierigen Phasen der Arbeit.

Originalarbeiten

Wolf, N.B. & Küchler, S.; Radowski, M.R.; Blaschke, T.; Kramer, K.D.; Weindl, G.; Kleuser, B.; Haag, R.; Schäfer-Korting, M., Influences of opioids and nanoparticles on in vitro wound healing models. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2009 Sep;73(1):34-42. Epub 2009 Apr 1.

Küchler, S. & Wolf, N.B.; Heilmann, S.; Weindl, G.; Helfmann, J.; Yahya, M.M.; Stein, C.; Schäfer-Korting, M., 3D-Wound Healing Model - Influence of Morphine and Solid Lipid Nanoparticles. - submitted.

Poster

R. Zaslansky, N.B. Wolf, A. Kopf, Y. Ullman, O. Fishelzon, B. Kleuser, W. Mehnert, M. Schäfer-Korting, C. Stein: Topical morphine for analgesia and wound healing – preliminary results. International Narcotics Research Conference, Berlin 2007.

N.B. Wolf, S. Küchler, M. Radowski, R. Haag, B. Kleuser, M. Schäfer-Korting: Nanoparticulate Preparations of topical opioids for pain reduction – influence on wound healing and local tolerability. International Narcotics Research Conference, Charleston, SC 2008.

N.B. Wolf, G. Weindl, M. Radowski, R. Haag, B. Kleuser, M. Schäfer-Korting: Nanoparticle dispersions of opioids for local pain reduction – influence on wound healing. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Mainz 2009.

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

Vortrag

N.B. Wolf, B. Kleuser, R. Zaslansky, C. Stein, M. Schäfer-Korting: Topical Opioids for Analgesia and Wound Healing. International Congress on Burns, Eye and Skin Irritation and Decontamination, Köln 2007

Abkürzungsverzeichnis

ABU	arbitrary units
B	Buprenorphin
BPE	Rinderhypophysenextrakt
BSA	Rinderserumalbumin
CMS (Nanotransporter)	Dendritic core-multishell (Nanotransporter)
C _t	cycle threshold
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
F	Fentanyl
FCS	fetales Kälberserum
H	Hydromorphon
HaCaT	human adult keratinocytes, kept under low calcium and elevated temperature
hEGF	Humaner Epithelialer Wachstumsfaktor
I.U.	International Unit
iNOS	induzierbare NO-Synthase
KBM	Keratinocytenbasalmedium
KGM	Keratinocytenwachstumsmedium
LPS	Lipopolysaccharid
M	Morphin
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetraziliumbromid
n	nano-
NED	N-1-Naphtylethylendiamindihydrochlorid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Polydispersionssindex
PS	Parelektrische Spektroskopie
RNA	Ribonucleinsäure
RPMI	Roosevelt Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SLN	Solid Lipid Nanoparticle(s)
TBE	Tris-Borat-EDTA (-Puffer)
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
UV	ultraviolett

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Die Haut.....	3
1.2	Die Phasen der Wundheilung.....	6
1.3	Aktuelle Methoden zur Behandlung von Verletzungen der Haut.....	9
1.4	Die Wirkstoffklasse der Opioide.....	11
1.4.1	Opioidrezeptoren der Haut	15
1.4.2	Klinische Anwendung von Opioiden zur Schmerztherapie	15
1.5	Nanopartikuläre Trägersysteme zur topischen Applikation von Arzneistoffen.....	19
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	22
2	Material	24
2.1	Geräte.....	24
2.2	Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	25
2.3	Zellen und Zellkulturmedien sowie Lösungen zur Zellkultur	27
2.4	Weitere Lösungen	29
3	Methoden	32
3.1	Zellkultur	32
3.2	Migrationsassay in der Boyden Kammer	33
3.3	Scratch-Assay	34
3.4	Wundheilungsuntersuchungen an rekonstruierten Vollhautmodellen.....	35
3.5	NO-Messung (Griess-Assay).....	36
3.6	Untersuchungen zur Genexpression	37
3.7	Viabilitätsuntersuchung: MTT-Test.....	40
3.8	Partikelherstellung und Charakterisierung.....	41
3.9	Parelektische Spektroskopie (PS).....	41
3.10	HPLC-Entwicklung.....	42
4	Ergebnisse	44
4.1	Migrationsassays	44
4.1.1	Unterscheidung chemotaktischer – chemokinetischer Effekt	46
4.1.2	Migrationsassays im sauren Milieu.....	48
4.1.3	Einfluss von Morphin auf die NO-Produktion in HaCaT Zellen.....	49
4.1.4	Zellviabilitätsuntersuchungen: MTT-Assay	50
4.2	Wundheilungsuntersuchung mittels Scratch-Test	51
4.3	Wundheilungsuntersuchungen am Vollhautmodell.....	52
4.4	Träger für Opioide	54
4.4.1	Partikelcharakterisierung	55

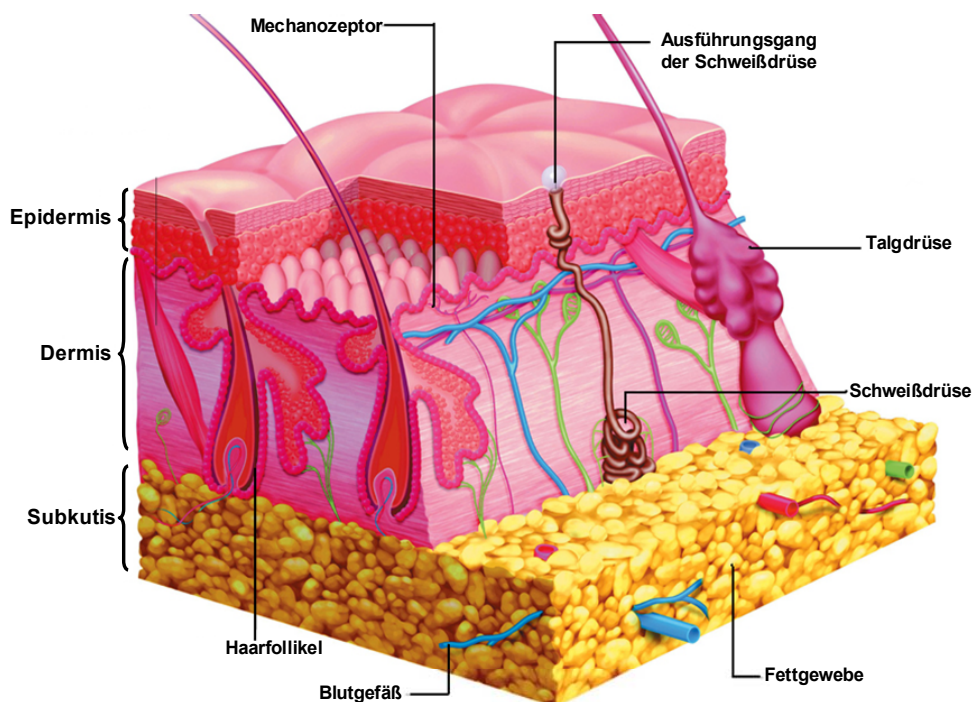
4.4.2	Interaktionen von Morphin mit unbeladenen Trägermolekülen.....	55
4.4.3	Einfluss unbeladener Trägerpartikel auf die Zellmigration.....	56
4.4.4	Einfluss Morphin-beladener SLN auf die 3D-Wundheilung	57
4.5	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC).....	58
4.5.1	Entwicklung einer Methode zur Detektion von Morphin und seiner Metabolite ..	58
4.5.2	Validierung der Methode für Morphin und Codein	59
5	Diskussion.....	62
5.1	Wundheilungsuntersuchungen	63
5.1.1	2D-Wundheilungsuntersuchungen	63
5.1.2	3D-Wundheilungsuntersuchungen	71
5.1.3	Einordnung der Wundheilungsergebnisse in den wissenschaftlichen Kontext...	73
5.2	Interaktion von Morphin mit verschiedenen Trägern	75
5.3	Toxizitätsuntersuchungen.....	76
5.4	Analytik	77
5.5	Ausblick	79
6	Zusammenfassung.....	80
7	Summary.....	83
8	Literatur	85
9	Lebenslauf.....	98

1 Einleitung

1.1 Die Haut

Die Haut mit einer Gesamtläche von fast 2 m² beim Erwachsenen erfüllt nicht nur wichtige Schutz- und Sinnesfunktionen, zudem laufen hier auch wichtige Teile des Stoffwechsels im menschlichen Körper ab. Anatomisch lassen sich die drei großen Hautschichten Epidermis, Dermis und Subkutis unterscheiden (Abb. 1), wobei die Dermis häufig auch als Korium (Lederhaut) bezeichnet wird, die Epidermis und die Dermis auch als Kutis zusammengefasst werden. Je nach Körperstelle können die verschiedenen Strata der Haut unterschiedlich stark ausgeprägt sein.

Zu den Schutzfunktionen der Haut zählen der Schutz vor UV-Strahlen, Wärmeverlust und Eindringen körperfremder Stoffe in den Körper.



aus: <http://www.br-online.de/wissenbildung/collegeradio/medien/biologie/haut/didaktik/>

Abb. 1. Aufbau der Haut.

Epidermis. Die Epidermis (Abb. 2) als dünnste der Hautschichten besitzt eine Dicke von 40 µm bis 1,5 mm und ist histologisch gesehen ein mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel. Die Unterschiede in ihrer Dicke sind abhängig von der mechanischen Belastung an der Körperoberfläche und damit vor allem durch den variierenden Verhornungsgrad bestimmt. Besonders stark ausgeprägt ist der Verhornungsgrad an den Fußsohlen sowie den Handtellern. Auf zellulärer Ebene findet man in der Epidermis vor allem Keratinozyten, deren Schicht man noch einmal in drei Teile gliedern kann: das Stratum basale zeichnet sich durch die hohe Teilungsrate der basalen Keratinozyten aus, welche über Hemidesmosomen in der darunter liegenden Basalmembran verankert sind. Die hier gebildeten Zellen wandern unter fortschreitender Differenzierung und Kernverlust mit der Zeit in Richtung Hautoberfläche (Stratum spinosum), flachen dabei ab und werden stärker eosinophil. Stratum basale und Stratum spinosum lassen sich auch unter dem Begriff Stratum germinativum zusammenfassen. Charakteristisch für das darüberliegende 2 - 3 Zellschichten umfassende Stratum granulosum sind die stark basophilen Keratohyalin granula in den Zellen. Diese Keratohyalin granula enthalten Lipide sowie Enzyme und sind für die Sekretion dieser Lipide in den Interzellularraum zuständig. So beinhalten die Keratinozyten die Vorläuferstrukturen der interzellulären epidermalen Lipide, welche für die charakteristische Lipidzusammensetzung der Hornschicht ausschlaggebend sind (Bouwstra et al., 2003). Allerdings müssen die Vorläuferlipide (Glycosphingolipide, freie Sterole und Phospholipide) nach Sekretion zunächst noch modifiziert werden. Durch Hydrolyse entstehen dabei schließlich Ceramide und freie Fettsäuren als wichtige Bestandteile der Hornschicht, welche den Abschluss der Epidermis nach außen bildet. In der äußeren Hornschicht sind sowohl Zellgrenzen als auch Zellkerne elektronenmikroskopisch nicht mehr nachweisbar (Hornstein, 1985). Die terminale 10 - 20 µm dicke Hornschicht besteht aus etwa 15 - 20 Zelllagen von Korneozyten (ausdifferenzierte Keratinozyten) und schützt durch ihren charakteristischen Lipidgehalt sowie die dichte Packung der Lipide zu bandförmigen Strukturen vor allem vor Wasserverlust und kosmischer Strahlung. Sie entsteht durch Ausdifferenzierung der Keratinozyten während ihrer Wanderung an die Hautoberfläche, welche von Körner- zu Hornzellen übergehen. Der Wassergehalt der Hornschicht liegt bei etwa 7 - 10%.

Neben den Keratinozyten befinden sich in der Epidermis Melanozyten, Langerhans- und Merkel-Zellen. Das von den Melanozyten produzierte und an die Keratinozyten abgegebene Melanin dient als Schutz vor UV-Strahlen. Ähnlich wie die Dicke der Epidermis ist auch der Grad der Pigmentierung der Haut je nach Körperregion unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Langerhans-Zellen bilden einen Teil des Immunsystems, Merkel-Zellen üben ihre Funktion bei der Berührungswahrnehmung aus.

Schließlich wird die Epidermis noch von Haaren durchzogen, deren Follikel sich in der darunterliegenden Dermis oder Subkutis befinden und die die wichtigsten Hautanhangsbilde darstellen. Beim Menschen bedecken sie ca. 0,1% der Hautoberfläche (Schäfer-Korting et al., 2007).

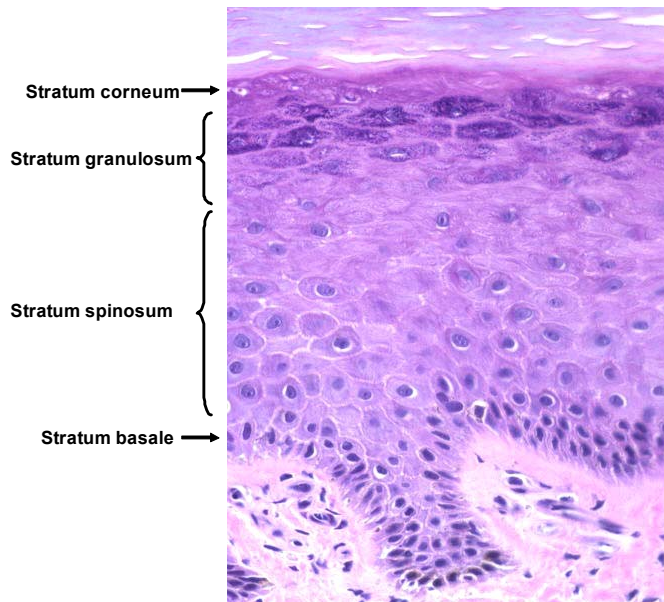


Abb. 2. Aufbau der Epidermis mit Stratum corneum, S. granulosum, S. spinosum und S. basale. Histologischer Schnitt mit HE-Färbung.

Dermis. Die vor allem Fibroblasten und Bindegewebsfasern enthaltende Dermis kann in zwei Schichten aufgeteilt werden: Die im Stratum papillare enthaltenen zahlreichen Blutgefäße sind für die Versorgung der Basalschicht der Epidermis verantwortlich. Außerdem ist dieser Teil der Dermis zellreich (u.a. Histiozyten, Mastzellen). Das größentechnisch weitaus prominentere Stratum reticulare beheimatet neben einem dichten Netzwerk kollagener Faserbündel die Fibroblasten, die für die Bildung kollagener und elastischer Fasern sowie der ebenfalls in der Dermis vorhandenen Grundsubstanz verantwortlich sind. Eine spezielle Form dieser Zellen, die Myofibroblasten findet man vor allem während der Gewebeheilung und in Bindegewebstumoren (Hornstein, 1985).

Subkutis. In diesem überwiegend aus Fettgewebsläppchen, die von Blut- und Lymphgefäßen durchzogen sind, aufgebautem Gewebe befinden sich die Haarbulbi, eine große Anzahl an Mechano- und Thermorezeptoren sowie Schweiß- und Talgdrüsen. Die Dicke der Subkutis ist variabel und abhängig von Körperregion und Ernährungszustand, weshalb sie auch als Nährstoffspeicher und Temperaturisolator fungiert (Hornstein, 1985).

1.2 Die Phasen der Wundheilung

Der Regenerationsprozess der Haut nach Verletzungen kann in drei Phasen unterteilt werden, welche teils überlappen: akute Entzündungsphase, Proliferationsphase (mit Reepithelialisierung) und Reifungsphase (Abb. 3).

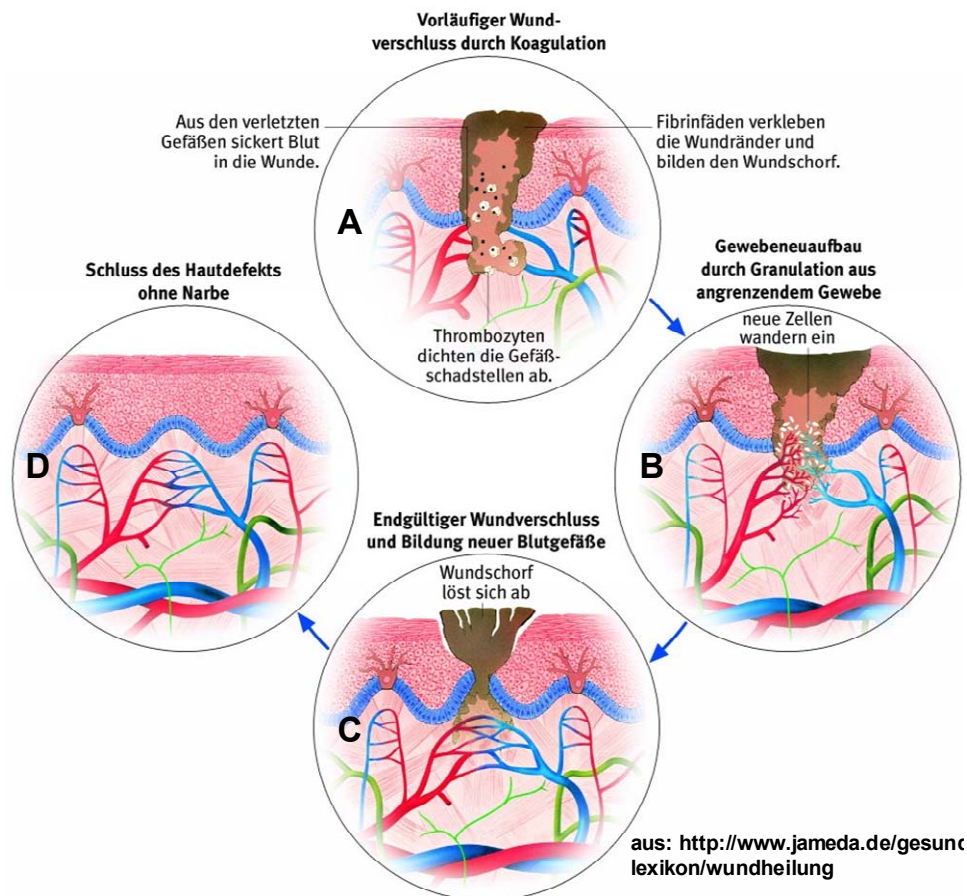


Abb. 3. Phasen der Wundheilung. Dargestellt sind Entzündungsphase (A), Proliferationsphase unter Gefäßneubildung (B, C) und Reifungsphase (D).

Entzündungsphase. Das erste zu beobachtende Ereignis nach einer Verletzung der Haut ist die Stillung der Blutung, makroskopisch bereits wenige Minuten nach der Verletzung als Erblassen des Gewebes (durch Vasokonstriktion), Bildung eines Blutpfropfes und somit Blutungsstopp erkennbar. Der Blutpfropf besteht vor allem aus Thrombozyten und Fibrin, welches nach Spaltung durch Thrombin aus Fibrinogen gebildet wird und nach Faktor XII-vermittelter Vernetzung an die Thrombozyten bindet (Donnelly et al., 1956; Mosesson et al., 2001). Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgt dabei ebenfalls durch Thrombin, woraufhin diese vermehrt Oberflächenrezeptoren exprimieren, den Inhalt von Granula freisetzen und aggregieren. Die dabei von den Thrombozyten freigesetzten Proteine (Zytokine und

Wachstumsfaktoren) beeinflussen die Funktion von Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen und anderen Zellarten.

Die eigentliche Entzündung wird durch die Kennzeichen Rötung, Erwärmung, Schwellung und Schmerz sichtbar und hervorgerufen durch Vasodilatation und erhöhte Gefäßpermeabilität. Dabei wird die Vasodilatation durch Mastzellmediatoren wie Histamin und Leukotriene ausgelöst (Hebda et al., 1993), Thrombin erhöht die Gefäßpermeabilität (Stiernberg et al., 1993). Zytokine und Wachstumsfaktoren wirken außerdem auf verschiedene weitere Zellen wie Monozyten und Makrophagen chemotaktisch, welche Abfallmaterialien und Bakterien durch Phagozytose aus der Wunde entfernen (Singer & Clark, 1999). Weitere Zytokine wie TGF- β oder FGF-2 stimulieren die Fibroblastendifferenzierung, die Kollagenbildung sowie die Angiogenese (Baum & Arpey, 2005). Schließlich kommt auch den T-Lymphozyten (CD4⁺/CD8⁺) und Eosinophilen während der Entzündungsphase eine vor allem regulierende Rolle zu (Efron et al., 1990), hauptsächlich durch Bildung und Sekretion von Wachstumsfaktoren.

Proliferationsphase. Während der nun folgenden Proliferationsphase der Wundheilung wird das zunächst noch provisorische und hauptsächlich Fibrin enthaltende Extrazellulärgewebe durch kollagenhaltiges Granulationsgewebe ersetzt. Typische Komponenten dieses Granulationsgewebes sind Fibroblasten, welche für die Kollagensynthese nötig sind, sowie neugebildete Blutgefäße und Makrophagen (Baum & Arpey, 2005). Fibroblasten sind wichtige mesenchymale Zellen, da sie durch ihre kontraktilen Eigenschaften die Wundränder zusammenziehen können. Fibroblasten wandern aus der nahen Umgebung der Wunde entlang von Fibronectin-Fasern in die Wunde ein und produzieren neben Kollagen auch eine Reihe von Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel NGF (nerve growth factor) oder FGF-7 (fibroblast growth factor 7), wodurch sie die Einwanderung weiterer Zellen und Nervenfasern und die Reorganisation des Wundgewebes regulieren (Baum & Arpey, 2005).

Die Neubildung von Blutgefäßen als „Keimlinge“ unbeschädigter naheliegender Kapillaren wird unter anderem durch erhöhten Laktatgehalt mit pH-Abfall und den niedrigen Sauerstoffgehalt im Gewebe selbst induziert (Remensnyder & Majno, 1968). Neben weiteren Wachstumsfaktoren und Zytokinen spielen auch hier FGF und TGF- β eine Rolle. Sie stimulieren die Wanderung von Endothelzellen entlang der provisorischen Extrazellulärmatrix, wie dies auch bei Fibroblasten der Fall ist. Neugebildete Kapillaren besitzen zunächst zwar noch einen porösen Wandaufbau, dies ändert sich jedoch durch den Einfluss von Angiopoietinen während ihrer Reifung zu dichten Blutgefäßen (Baum & Arpey, 2005).

Reepithelialisierung. Der wichtigste Prozess während der Proliferationsphase ist die Abstoßung des Wundschorfes und die Bildung einer neuen intakten Epidermis, was als

Reepithelialisierung zusammengefasst wird. Ausgehend von den Wundrändern wandern Keratinozyten über das Granulationsgewebe um schließlich in der Mitte der ursprünglichen Wunde aufeinander zu treffen. Diese wandernden Zellen zeichnen sich histologisch durch Hypertrophie, polarisierte Zellmorphologie, Reorganisation des intrazellulären Keratins und große intrazelluläre Vakuolen aus (Coulombe, 2003). In der Haut liegende Haarwurzeln dienen zudem als Stammzell-Reservoir für Keratinozyten, welche nach Verletzungen stimuliert durch verschiedene Wachstumsfaktoren von dort aus in Richtung der Wunde zu wandern beginnen (Taylor et al., 2000). Zu den Reepithelialisierungs-fördernden Wachstumsfaktoren gehören unter anderem TGF- β sowie FGF-2, -7 und -10 (Werner & Grose, 2003). Aufgrund der meist zerstörten Basalmembran müssen Keratinozyten auf einer aus Kollagen I und V, Fibronectin, Vitronectin und Tenascin bestehenden Matrix wandern, während sie durch die Expression verschiedener Enzyme, darunter auch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), Teile der extrazellulären Matrix degradieren und somit ihren eigenen Pfad schaffen können. Speziell MMP-1 ist an diesem Prozess beteiligt (Pilcher et al., 1997).

Reifungsphase. Makroskopisch sichtbare Ereignisse während dieser letzten Phase der Wundheilung sind die Wundkontraktion, das Abklingen von Rötung und Schwellung sowie die zunehmende Festigung des ehemals verletzten Gewebes (Baum & Arpey, 2005). Die Reifungsphase kann mehrere Wochen und Monate, bis hin zu mehreren Jahren dauern. Ausgelöst durch Myofibroblasten beginnt die Wundkontraktion bereits vier bis fünf Tage nach der Verletzung und dauert etwa zwei Wochen lang an. Die Differenzierung von Fibroblasten hin zu α -smooth muscle-Aktin-exprimierenden Myofibroblasten wird vor allem durch PDGF (platelet derived growth factor) und TGF- β stimuliert (Werner & Grose, 2003). Zudem erfolgt während der Reifungsphase ein Umbau der Kollagenmatrix, der letztendlich dazu führt, dass nach sechs Wochen ca. 80% der ursprünglichen Gewebefestigkeit erreicht werden (Baum & Arpey, 2005). Auch beim Umbau der Kollagenmatrix spielen Matrix-Metalloproteinasen, hier vor allem MMP-2 und -7, eine wichtige Rolle (Soo et al., 2000). Im Einzelnen wird dabei vor allem Kollagen III durch Kollagen I ersetzt, der Faserdurchmesser nimmt zu und die Anordnung der Fibrillen ist homogener organisiert, wodurch schließlich die Gewebefestigkeit erhöht wird. Zudem nimmt die Anzahl der Kapillaren sowie schließlich auch die der Fibroblasten während dieser letzten Wundheilungsphase wieder ab, woraufhin ein relativ zellarmes, haarloses Narbengewebe zurückbleibt.

Wundheilung stellt also bei den hier beschriebenen tieferen Wunden eine Defektheilung dar. Der Urzustand vor der Verletzung, also eine Heilung ohne Narbenbildung ist nur bei sehr oberflächlichen Verletzungen möglich.

1.3 Aktuelle Methoden zur Behandlung von Verletzungen der Haut

Bereits im 15. Jahrhundert fand in einer Schrift des italienischen Chirurgen Gaspare Tagliacozzi das Verfahren der Hauttransplantation zur Wiederherstellung verwundeter Nasen erste Erwähnung (Review: Andreassi et al., 2005), womit dieser Arzt als Wegbereiter der plastischen Chirurgie in Europa bezeichnet werden kann. Auch heute noch ist die Methode der Eigenhauttransplantation zur Behandlung von schweren und schwersten Verletzungen der Haut verbreitet. Dabei unterscheidet man zwischen Vollhauttransplantaten, wobei die Epidermis und die komplette Dermis verwendet werden, wenn es sich um relativ kleine Hautareale handelt, und Spalthauttransplantaten, die aus Epidermis und nur einem Teil der Dermis bestehen (Andreassi et al., 2005). Solche Eigenspalthauttransplantate dienen zur Versorgung großer Areale nekrotischer Körperoberfläche, wie sie beispielsweise bei Verbrennungen oder schweren Ulzerationen häufig zu finden sind (Archer et al., 1998; Kogan & Govrin-Yehudain, 2003). Der Vorteil besteht darin, dass Spender und Empfängerpatient identisch sind, sodass Eigenhauttransplantate im Allgemeinen gut toleriert werden (Abb. 4). Typische Entnahmestellen für Spalthaut sind der Gesäßbereich, vorderer und seitlicher Oberschenkel bzw. die Oberfläche des Abdomens (Andreassi et al., 2005). Bei schweren und großflächigen Verbrennungen kann die Haut generell von nahezu jeder Körperstelle entnommen werden. Zur Vergrößerung der Fläche kann die Haut nach der Entnahme netzartig durchlöchert werden, um so eine größere Fläche bedecken zu können (Abb. 4).

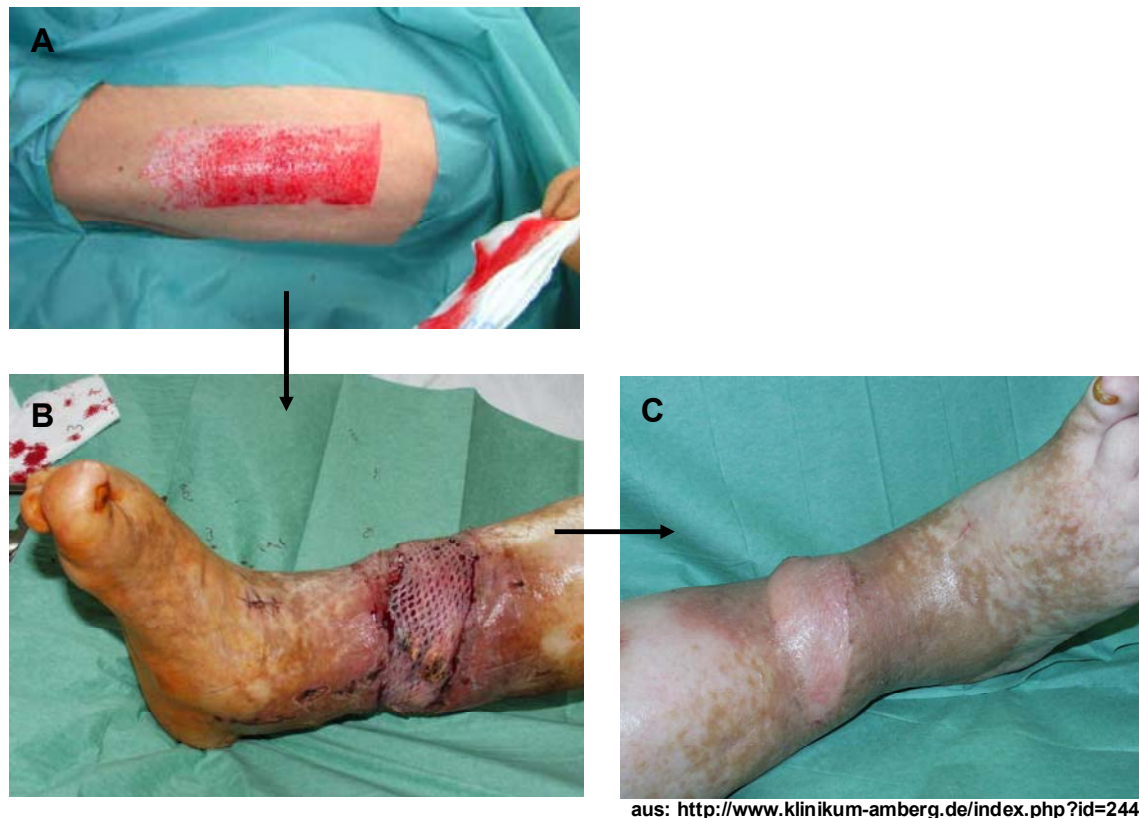


Abb. 4. Transplantation von Eigenhaut bei Ulkus cruris. Dargestellt sind Entnahmestelle der Spalthaut (A, untere Extremität) und Akzeptorstelle unmittelbar nach Transplantation der Spalthaut (B) sowie nach Ausheilung (C).

Problematisch bei Eigenhauttransplantationen sind vielfach ausgeprägte Schmerzen des Patienten an der Entnahmestelle der Haut. Oft klagen Patienten über ähnlich starke, teils sogar sehr viel stärkere Schmerzen als an der Stelle der eigentlichen Verbrennung bzw. Verletzung (Feldman et al., 1991; Zapata-Sirvent et al., 1985). Zur Behandlung dieser Schmerzen werden deshalb im klinischen Alltag neben neurochirurgischen Methoden wie dem Fascia-Iliaca-Block (Cuignet et al., 2004) meist stark wirksame Opioide angewandt (Choiniere et al., 1992; Cuignet et al., 2004; Pal et al., 1997), zumeist systemisch, teils auch schon lokal. Der Verbandwechsel von Hautwunden ist extrem schmerzhaft für den Patienten und sollte deshalb nur in möglichst großen zeitlichen Abständen durchgeführt werden (Cuignet et al., 2005; Cuignet et al., 2004). Zur Verminderung der Rate an Nebenwirkungen wurde in den letzten Jahren immer häufiger die lokale Anwendbarkeit von Opioiden untersucht, sowohl die Hautapplikation (Flock, 2003; Long et al., 2001; Twillman et al., 1999; Zeppetella et al., 2003) als auch eine andere Form der Opioid-Lokalapplikation, die Injektion von Opioiden ins Kniegelenk bei Gelenkarthrose-Patienten (Lehrberger et al., 1994; Likar et al., 1997).

1.4 Die Wirkstoffklasse der Opiode

Die ältesten Dokumente, die über eine Anwendung von Opioiden zur Schmerzbehandlung berichten, sind Schriftstücke aus dem alten Ägypten. Rezeptoren, an denen Morphin und verwandte Substanzen ihre Wirkung entfalten, wurden erstmals 1973 im Gehirn nachgewiesen (Pert & Snyder, 1973). Die endogenen Verwandten der Opiode - die Endorphine - wurden nur kurze Zeit später entdeckt (Hughes et al., 1975). Bis heute ist die Anwendung verschiedener Opiode zur Behandlung akuter sowie auch chronischer Schmerzen trotz zum Teil schwerer Nebenwirkungen weit verbreitet, da es bisher keine ähnlich wirksame Stoffklasse als Alternative gibt.

Definition. Obwohl die Begriffe Opioid und Opiat häufig als Synonyme verwendet werden, gilt es hier zunächst eine genaue Definition zur Abgrenzung anzuführen. Während der Begriff Opioid für alle - natürlichen und synthetischen - Substanzen steht, deren Wirkung sich über Interaktion mit einem der spezifischen Opioidrezeptoren erklärt, beschreibt die Bezeichnung Opiat ein natürlich vorkommendes Alkaloid von Papaverarten, vielfach ein direkter Abkömmling des Morphins (Trescot et al., 2008).

Struktur. Die Struktur des Morphins als „Muttersubstanz“ der Opiode enthält als Grundstruktur ein teilhydriertes Phenanthren mit jeweils einer Hydroxylgruppe an Position 3 und 6 (siehe Abb. 5), die beide sowohl zur Ester- als auch zur Etherbildung verwendet werden können. Der tertiäre Stickstoff scheint für die analgetische Wirkung von entscheidender Bedeutung zu sein, denn nach Umwandlung in eine quaternäre Verbindung aber auch bei Verlängerung des Methylsubstituenten nimmt die schmerzstillende Wirkung des Morphins stark ab (Trescot et al., 2008). Morphin-derivate mit voluminösen Substituenten am Stickstoff wirken vielfach als Antagonisten, wie zum Beispiel Naloxon.

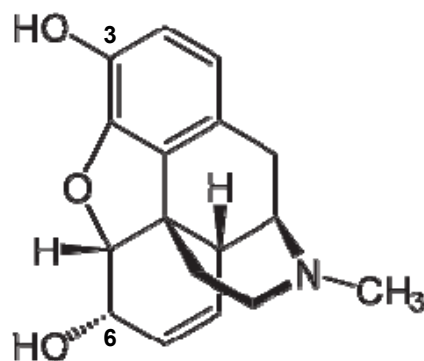


Abb. 5. Strukturformel Morphin.

Rezeptoren. Wirkorte der Opioide im Körper können sowohl zentrale als auch periphere Opioidrezeptoren sein. Diese sind aus sieben Transmembrandomänen, einem extrazellulär gelegenen N-Terminus, je drei extra- und intrazellulären Schleifen und einem intrazellulär gelegenen C-Terminus aufgebaut (Trescot et al., 2008). Bislang wurden vier Subtypen dieser G_i-Protein-gekoppelten Rezeptoren nachgewiesen und charakterisiert (Freye, 1999):

μ-Opioidrezeptoren. μ-Opioidrezeptoren findet man hauptsächlich im Hirnstamm und medialen Thalamus. Ihre Aktivierung führt zu supraspinaler Analgesie, Atemdepression, Euphorie, Sedierung, verminderter Darmmotilität und körperlicher Abhängigkeit. Die Lokalisation der Rezeptoren an atem- und kreislaufregulierenden Zentren erklärt die Beeinflussung dieser Vitalfunktionen - ausgeprägt zum Beispiel als Bradykardie - durch μ-Agonisten. μ-Opioidrezeptoren lassen sich weiterhin in zwei Subtypen - μ₁ und μ₂ - unterteilen, von denen die μ₁-Rezeptoren hauptsächlich für Analgesie, die μ₂-Rezeptoren hingegen für Nebenwirkungen wie Atemdepression, Obstipation und Abhängigkeitspotenzial verantwortlich sind. Typische Aktivatoren der μ-Opioidrezeptoren sind Morphin und Fentanyl.

κ-Opioidrezeptoren. Sie befinden sich vor allem in Bereichen des Zwischenhirns, dem Hirnstamm und dem Rückenmark, ihre Aktivierung hat demnach eine spinale Analgesie und Sedierung zur Folge. Das Abhängigkeitspotential ist geringer. Ketocyclazocin ist ein Beispiel für ein vornehmlich κ-Rezeptor-selektives Opioid.

δ-Opioidrezeptoren. δ-Opioidrezeptoren befinden sich hauptsächlich im Gehirn; ihre Effekte schließen eine (supra-)spinale Analgesie sowie Atemdepression und ein hohes Abhängigkeitspotential ein. Ein Agonist am δ-Opioidrezeptor ist Leu-Enkephalin.

σ-Opioidrezeptoren. Diese Gruppe von Rezeptoren gehört funktionell nicht zur Gruppe der Opioidrezeptoren im strengen Sinn, da zu ihren Agonisten auch Stoffe wie Phencyclidin oder Ketamin gehören und da σ-Opioidrezeptoren kaum durch Opioidrezeptorantagonisten wie Naloxon blockiert werden können.

Generell sind die - auch in der vorliegenden Arbeit untersuchten - analgetisch wirksamen Opioide meist Agonisten des μ-Opioidrezeptors, Buprenorphin als Partialagonist des μ-Rezeptors hingegen wirkt zusätzlich antagonistisch am κ-Rezeptor.

Metabolismus. Der Abbau von Opioiden findet größtenteils in der Leber statt und wird hier von Faktoren wie genetischer Enzymausstattung, Alter, Geschlecht sowie verschiedenen Grunderkrankungen beeinflusst (Trescot et al., 2008). Der Großteil aller Opioide wird dabei mithilfe von Enzymen der CYP-Familie metabolisiert, oftmals gefolgt von Phase II-

Reaktionen wie Glucuronidierung. Beispiele für die vorausgehenden CYP-vermittelten Phase I-Reaktionen sind die O-Demethylierung von Codein oder Tramadol durch CYP2D6, N-Demethylierung von Tilidin oder Dihydrocodein hauptsächlich durch CYP3A4 und 6-Ketoreduktion von Hydromorphon (Lötsch, 2005).

Wichtigstes Beispiel für ein Opioid, welches einer Glucuronidierung unterliegt, ist Morphin. Es kann an beiden freien Hydroxylgruppen konjugiert werden, woraus Morphin-3-Glucuronid bzw. Morphin-6-Glucuronid entstehen. Hierfür ist hauptsächlich die UDP-Glucuronosyltransferase 2B7 verantwortlich (Coffman et al., 1997). Das Besondere bei der Bildung dieser beiden Morphinmetaboliten ist die Tatsache, dass auch Morphin-6-Glucuronid eine agonistische Aktivität am μ -Opioidrezeptor besitzt und somit analgetisch wirkt. Deshalb wurde bereits untersucht, ob Morphin-6-Glucuronid anstelle von Morphin selbst eingesetzt werden kann, und zwar möglicherweise mit weniger Nebenwirkungen bei gleicher analgetischer Potenz (Abbott & Palmour, 1988; Frances et al., 1990; Paul et al., 1989). Die Ergebnisse dieser Studien deuten auf eine vielversprechende Rolle des Morphin-6-Glucuronides als potentes Analgetikum hin.

Für die Zelluntersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden zwar stets die entsprechenden Salze der Opioide verwendet (siehe 2.4), da jedoch davon ausgegangen werden kann, dass dies hinsichtlich der Wirkung am jeweiligen Opioidrezeptor keinen Einfluss hat, werden im Folgenden die untersuchten Opioide (Basen) mit den wichtigsten Kenngrößen (Tab. 1) kurz dargestellt:

Morphin. Die Ausgangssubstanz der Opioide (Abb. 5) wurde erstmals 1804 vom deutschen Apotheker Friedrich Wilhelm Adam Serturmer isoliert und ist der Prototyp der Agonisten am μ -Opioidrezeptor. Bei oraler Gabe ist Morphin durch seinen ausgeprägten First-Pass-Effekt nur etwa 25 - 40% bioverfügbar, seine Halbwertszeit liegt bei 4 - 5 Stunden. Hauptmetabolit ist Morphin-3-Glucuronid, daneben entsteht in relevanten Mengen der aktive Metabolit Morphin-6-Glucuronid. Neben einer analgetischen Wirkung kann die Gabe von Morphin eine Histaminausschüttung (mit resultierendem Bronchospasmus und Hypotension), Atemdepression, Obstipation sowie durch Stimulation der Chemozeptoren des Brechzentrums Nausea und Emesis nach sich ziehen (Trescot et al., 2008).

Tab. 1. Wichtige Kenngrößen der untersuchten Opioiden (H.C. Niesel, 2002).

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	log P-Wert	pKa-Wert
<i>Morphin</i>	285	0,78	7,9
<i>Hydromorphon</i>	285	1,06	8,2
<i>Fentanyl</i>	336	4,05	8,9
<i>Buprenorphin</i>	467	3,96	8,5

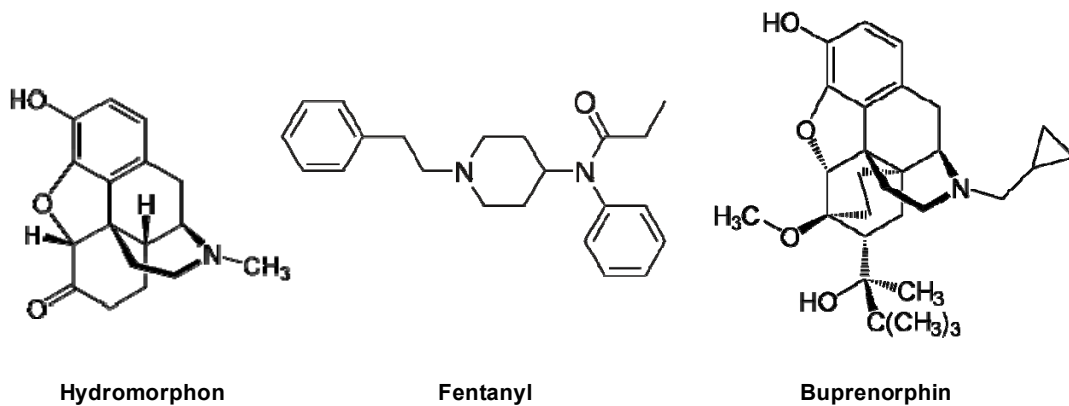


Abb. 6. Strukturformeln von Hydromorphon, Fentanyl und Buprenorphin.

Hydromorphon. Als halbsynthetischer Opioid-Agonist wirkt Hydromorphon (Abb. 6) wie Morphin vor allem am μ -Opioidrezeptor, hat dabei jedoch eine 7 - 11-mal höhere Potenz (Wirkstärke) als Morphin selbst und ist zudem, ähnlich wie Morphin, schlecht wasserlöslich (siehe auch Tab. 1). Auch hier werden nach oraler Applikation bis zu 62% bereits durch den First-Pass-Effekt in der Leber metabolisiert. Hauptmetabolit ist das analgetisch unwirksame Hydromorphon-3-Glucuronid, welches renal ausgeschieden wird.

Fentanyl. Fentanyl (Abb. 6), ein synthetischer Agonist am μ -Opioidrezeptor, besitzt eine etwa 80-fach höhere Potenz als Morphin und steht sowohl als parenterale, transdermale und transbukale Formulierung zur Verfügung. Die Substanz ist zudem stark lipophil (Trescot et al., 2008) und weist ein qualitativ etwas geringeres Nebenwirkungsprofil als Morphin und einen sehr viel schnelleren Wirkungseintritt auf, weshalb Fentanyl heute häufig in der Anästhesie Verwendung findet. Seine Metabolisierung erfolgt hauptsächlich in der Leber durch CYP3A4 zu den unwirksamen Abbauprodukten Hydroxy- und Norfentanyl (Feierman & Lasker, 1996).

Buprenorphin. Der partielle μ -Agonist Buprenorphin (Abb. 6) hat eine etwa 40-mal höhere Potenz als Morphin. Seine Besonderheit ist die zusätzlich antagonistische Wirkung an κ -Opioidrezeptoren, was seinen Sättigungseffekt bei Dosiserhöhung (ceiling-Effekt) beweist

sowie die Tatsache erklärt, dass die Effizienz und somit die maximale analgetische Wirkung der Substanz Morphin nicht erreicht wird. Buprenorphin kann gut als Sublingualtherapeutikum verwendet werden. Zudem kann die Substanz zur Substitutionstherapie bei Heroinabhängigen eingesetzt werden, da hier eine Überdosierung der Substanz zu einem Überwiegen der antagonistischen Wirkung führt und somit einem Missbrauch vorbeugend entgegengewirkt wird. Die Metabolisierung erfolgt biliär über CYP3A4 (Cone et al., 1984).

1.4.1 Opioidrezeptoren der Haut

Um eine Anwendbarkeit, das heißt eine lokale Wirkung von Opioiden nach Applikation auf der Haut zu erreichen, muss zunächst das Vorhandensein der entsprechenden Rezeptoren auf der Zellmembran von Hautzellen geklärt werden. Nachdem zunächst im Rattenmodell gezeigt wurde, dass sich Opioidrezeptoren sowohl auf Nerven- als auch auf Immunzellen in der Haut befinden, und dass diese bei Entzündung zudem vermehrt exprimiert werden (Hassan et al., 1993), gelang es bereits kurze Zeit später, den μ -Opioidrezeptor sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene auch in humanen Keratinozyten nachzuweisen (Bigliardi et al., 1998). Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte auch die Expression des μ -Rezeptors auf den peripheren Enden humaner Schmerzfasern sowie vor allem in den Keratinozyten, welche diese Schmerzfasern umgeben (Bigliardi-Qi et al., 2004). Da zudem die Bildung des endogenen Opioids β -Endorphin durch dieselben Nervenzellen nachgewiesen wurde (Bigliardi-Qi et al., 2004), kann von einer Kommunikation zwischen Nervensystem und Zellen der Haut über das Opioidsystem ausgegangen werden. Neben dem μ -Opioidrezeptor konnten desweiteren auch κ - und δ -Opioidrezeptoren in humanen Fibroblasten nachgewiesen werden (Salemi et al., 2005). Die Anzahl an Originalarbeiten, welche dem peripheren Opioidsystem eine wichtige Rolle bei der Schmerzunterdrückung bei Hautverletzungen zuschreiben (Review: Stein & Lang, 2009) zeigt, dass eine periphere Anwendung von Opioiden grundsätzlich möglich ist, was ihre Wirksamkeit anbelangt. Eine lokale Anwendung erscheint zudem sinnvoll, um die Anzahl der systemischen Nebenwirkungen dieser Substanzklasse zu minimieren.

1.4.2 Klinische Anwendung von Opioiden zur Schmerztherapie

Die Anwendung von Opioiden zur Behandlung von Schmerzen verschiedenster Genese findet in Kliniken große Akzeptanz, auch weil bisher keine Substanzgruppe gefunden werden konnte, mit welcher eine hinreichende Analgesie ähnlich gut wie mit Opioiden erzielt werden

kann. Dabei gibt es mittlerweile viele verschiedene Arten der Opioidanwendung, welche im Folgenden kurz erläutert werden (Freye, 1999).

Postoperativ. Zur Behandlung postoperativer Schmerzen, zum Beispiel nach chirurgischen Eingriffen im Bauchraum, werden Opioide vorwiegend oral in konstanter Dosierung anstelle einer Gabe „nach Bedarf“ angewandt, um sogenannte Schmerzspitzen zu vermeiden, deren Auftreten durch die Latenzzeit zwischen Anmeldung des Bedarfs von Schmerzmitteln durch den Patienten und dem Wirkungseintritt der danach verabreichten Analgetika begünstigt wird. Stattdessen sollte ein konstant hinreichend hoher Opioidblutspiegel eine kontinuierliche Blockade der Schmerzafferenzen gewährleisten, was mit einer größeren Patientenzufriedenheit assoziiert ist. Dieser „Basisspiegel“ kann gegebenenfalls mit einer sogenannten patientenkontrollierten Schmerztherapie (PCA) ergänzt werden, bei der der Patient durch Knopfdruck den Zeitpunkt der Applikation einer weiteren Dosis sowie die erforderliche Menge des Analgetikums selbst bestimmen kann. Dies geht jedoch mit einer hohen Eigenverantwortung für den Patienten einher und sollte nur bei speziellen Schmerzformen und nach sorgfältiger Anpassung von Opioidkonzentration, Bolusgröße und Basalinfusion erfolgen.

Wichtig bei der postoperativen Schmerzbehandlung ist die Wahl des am besten geeigneten Opioids. Die sehr stark und schnell wirksamen Arzneistoffe Fentanyl oder Sulfentanil besitzen den Nachteil der extrem kurzen Wirkdauer, während der Partialagonist Buprenorphin zwar eine längere Wirkdauer aufweist, jedoch muss hier mit einer langen Zeit bis zum Wirkungseintritt gerechnet werden. Im Einzelfall birgt dies die Gefahr von Überdosierungen durch wiederholte Gabe. Am besten geeignet sind retardierte Formulierungen von Dihydrocodein. Ferner können gemischt wirkende Agonisten/Antagonisten wie Buprenorphin angewandt werden, welche den Vorteil eines geringen Suchtpotentials besitzen und Morphin-induzierte Atemdepression umkehren können. Grundsätzlich ist es jedoch - auch bei der Langzeitopioidthherapie (s.u.) - zu vermeiden, einen reinen Agonisten mit einem gemischten Agonisten/Antagonisten ebenso wie verschiedene Opioide mit unterschiedlich langer Wirkdauer zu kombinieren.

Langzeittherapie. Opioide sind ebenfalls zur Langzeittherapie bei chronischen (z.B. tumorinduzierten) Schmerzen indiziert, wenn andere Analgetika wie NSAIDs oder Antidepressiva sich als nicht hinreichend wirksam erwiesen haben. Eine Applikation in fixen Abständen (abhängig vom verwendeten Opioid) ist einer bedarfsgesteuerten Dosierung vorzuziehen. Die Therapie sollte außerdem zur Verbesserung der Compliance nicht invasiv stattfinden. Als Beispiel sei hier die Anwendung von Morphin als Retardformulierung genannt, welche oral alle 24 Stunden erfolgen kann. Die Sublingual-Applikation von Buprenorphin hat den Vorteil, den ausgeprägten First-Pass-Effekt zu minimieren und somit

eine Dosisreduktion zu ermöglichen. Fentanyl findet heute häufigen Einsatz in Form von transdermalen therapeutischen Systemen (TTS), die eine langdauernde kontinuierliche Wirkstofffreisetzung ermöglichen. In zahlreichen Studien konnten Befürchtungen einer psychischen oder physischen Abhängigkeits-/Toleranzentwicklung klar widerlegt werden.

Um der Obstipation entgegenzuwirken, deren Auftreten gerade bei Langzeittherapie eine Verminderung der Lebensqualität des Patienten mit sich bringt, werden Opiode häufig gleich zu Beginn der Therapie mit Laxantien kombiniert. Die Gabe von Neuroleptika kann die vor allem in den ersten Behandlungstagen häufig auftretenden Nebenwirkungen Nausea und Emesis verhindern.

Intraoperativ. Intraoperativ sind Opiode (Fentanyl bzw. Sulfentanil) Teil der Narkosekonzeption. Außerdem ist das Auftreten von Schmerzen in der postoperativen Phase bei einer opioidhaltigen Anästhesie deutlich verzögert.

Applikationsarten. Zur Verminderung des ausgeprägten First-Pass-Effektes von Opioiden nach oraler Applikation gibt es neben der erwähnten Sublingualapplikation auch zahlreiche weitere Möglichkeiten, die primäre Leberpassage zu umgehen. Als Beispiel sei hier der Einsatz der Substanzen lokal im ZNS genannt, welcher sowohl *intrathekal* als auch *peridural* erfolgen kann. Ihr Vorteil liegt vor allem in ihrer geringeren Dosierung und der Anwendbarkeit bei sogenannten Risikopatienten - also zum Beispiel solchen mit schlechter kardiovaskulärer Funktion - vor Operationen bzw. bei postoperativem Schmerz. Bei ambulanter Opioidtherapie kann eine *rektale* Opioidapplikation die Arzneistoffverfügbarkeit unter teilweiser Umgehung des First-Pass-Effektes verbessern. Neben der Möglichkeit der *intraventrikulären* Verabreichung und der *Resorption* von zum Beispiel Fentanyl *über die Nasenschleimhaut* (besonders bei erbrechenden Patienten mit postoperativem Schmerz) gibt es auch die Möglichkeit der Aufnahme von Opioiden über die Haut. Solche *transdermalen* therapeutischen Systeme (TTS) ermöglichen eine kontinuierliche Freigabe auch von rasch eliminierten und daher eigentlich kurzwirksamen Opioiden und den Aufbau eines Hautdepots von welchem aus die Substanz dann langsam in die Zirkulation freigegeben wird.

Lokale Anwendung von Opioiden auf der Haut. Neben den eben beschriebenen meist systemischen Anwendungsmöglichkeiten von Opioiden gibt es jedoch auch heute schon erste vielversprechende Studien der lokalen Applikation (Tab. 2).

Tab. 2. Klinische Studien zur lokalen Opioid-Anwendung, n: Patientenzahl, M: Morphin, D:Diamorphin.

<i>Quelle</i>	<i>n</i>	<i>Substanz / Indikation</i>	<i>pos. Wirkung?</i>
Twillmann et al., 1999	9	M / Hautulzerationen	✓
Flock, 2003	13	D / Hautulzerationen	✓
Platzer et al., 2005	4	M / Haut- u- Schleimhautläsionen	✓
Likar et al., 2001	27	M / Zahnschmerz (mit Entzündung)	✓
	50	M / Zahnschmerz (Ø Entzündung)	-
	35	M / Zahnschmerz-Prävention (perineurale M-Applikation)	-
Watterson et al., 2004	2	M / Epidermolysis bullosa	✓
Zeppetella et al., 2003	5	M / Hautulzerationen	✓
Zeppetella & Ribeiro, 2005	16	M / Hautulzerationen	✓

Bereits 1999 wurden die Ergebnisse einer Fallstudie veröffentlicht, bei der neun Patienten ein Morphin-haltiges IntraSite Gel zur Bekämpfung ihrer Schmerzen durch Hautulzerationen erhielten. Bei sieben Patienten wurde eine signifikante Reduktion des Schmerzes registriert (Twillman et al., 1999). Ähnliche Ergebnisse wurden in einer Pilotstudie gesehen, Diamorphin-haltiges Gel reduzierte die „Schmerz-Scores“ bei Hautulzerationen, Atemdepression trat nicht auf (Flock, 2003). Weitere ebenfalls sehr klein angelegte Studien mit Patientengruppen von fünf bis 16 Personen, welche Morphin-haltiges Gel zur Behandlung von Schmerzen durch Hautulzerationen erhielten, weisen auf eine Analgesie durch lokal appliziertes Morphin im Vergleich zum Placebo hin (Platzer et al., 2005; Zeppetella et al., 2003; Zeppetella & Ribeiro, 2005). Die Tatsache, dass nach lokaler Applikation von Morphin weder der Stoff selbst noch seine Metabolite in nennenswertem Ausmaß im Plasma der Patienten nachgewiesen wurden (Ribeiro et al., 2004) deutet darauf hin, dass die analgetischen Effekte nicht auf eine systemische Aktivierung von Rezeptoren zurückzuführen sind. Auch bei zwei an Epidermolysis bullosa erkrankten Kindern konnte durch eine topische Morphinapplikation eine gute Analgesie mit verminderten Nebenwirkungen erzielt werden (Watterson et al., 2004). Allerdings fehlt bis heute die Publikation einer großen kontrollierten Studie, was auf Probleme der Reproduzierbarkeit bzw. unzureichende Stärke der Wirksamkeit hinweist.

1.5 Nanopartikuläre Trägersysteme zur topischen Applikation von Arzneistoffen

Da im Falle einer gesunden Epidermis mit intakter Hornschicht diese die wichtigste Barriere der dermalen Aufnahme von Stoffen darstellt, wurde in den letzten Jahren verstärkt nach Möglichkeiten gesucht, wie die Hautpenetration und -permeation effizienter gemacht werden könnte. Eine intakte Hornschicht verhindert die Penetration von hydrophilen und hochmolekularen Stoffen (mit einem Molekulargewicht $> 400 - 500 \text{ g/mol}$). Zur Verbesserung der Hautpenetration wurden deshalb nanopartikuläre Trägersysteme entwickelt, welche die Hautabsorption erhöhen und gleichzeitig ein gezieltes Eindringen von Stoffen in bestimmte Hautschichten ermöglichen könnten. Dazu gehören die bereits relativ gut untersuchten Solid Lipid Nanoparticles (SLN) sowie die neuartigen dendritic core-multishell (CMS) Nanotransporter.

Feste Lipidnanopartikel (Solid Lipid Nanoparticles). Solid Lipid Nanoparticles (SLN) bestehen aus nicht irritierenden, untoxischen Lipiden (Müller et al., 1996) wie Glycerolbehenat, Glycerolpalmitostearat oder Cetylpalmitat. Bei der Herstellung werden zur Partikelstabilisierung 0,5 - 5% eines Tensids wie Poloxamer 188, Polysorbat 80, Lecithin oder Tyloxapol zugesetzt (Schäfer-Korting et al., 2007). Die Produktion der Partikel bedarf der Hochdruck-Hitzehomogenisation oder der Kältehomogenisation (Mehnert & Mader, 2001). Zwar können bei Verwendung der Hitzehomogenisation letztendlich kleinere Partikel hergestellt werden, die Kältehomogenisation erweist sich jedoch für hitzeempfindliche Stoffe als besser geeignet. SLN mit einem Lipidgehalt von bis zu 10% sind eine flüssige Dispersion, welche zwecks besserer Handhabung zur Hautapplikation in eine Creme oder ein Gel eingearbeitet werden kann. Die Größen der mittels Hochdruck-Homogenisation hergestellten (unbeladenen) SLN bewegen sich in einem Rahmen von 150 - 200 nm, nach Beladung mit hydrophilen Stoffen können sie jedoch auf teilweise bis zu 400 nm ansteigen. Ihre Stabilität kann bis zu mindestens sechs Monaten gewährleistet werden (Jenning et al., 2000b; Wissing & Müller, 2001), teilweise wird sogar von einer Stabilität von zwei bis drei Jahren berichtet (Freitas & Müller, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die Penetration von Substanzen nach Hautapplikation von beladenen SLN deutlich verbessert wird, wie zum Beispiel bei Cyproteronacetat-beladenen SLN zur topischen Behandlung von Akne (Stecova et al., 2007) oder bei Glucocorticoid-beladenen Partikeln, welche zur Therapie von Hautekzemen angewandt werden können (Sivaramakrishnan et al., 2004). Gleichzeitig erhöht die SLN-Beladung die lokale Verträglichkeit der aufgeladenen Arzneistoffe, was etwa für Vitamin A nachgewiesen werden konnte (Shah et al., 2007). Zudem kann durch SLN ein gezieltes

Eindringen von Substanzen in die Epidermis - ein sogenanntes drug targeting - erzielt werden (Santos Maia et al., 2002; Sivaramakrishnan et al., 2004; Stecova et al., 2007). Durch die typische Plättchenform der Partikel (Braem et al., 2007) kann von einem guten Kontakt und guter Interaktion mit den Lipiden der Haut ausgegangen werden (Küchler et al., 2009b), was die Hautpenetration der aufgeladenen Substanzen fördert.

Hinsichtlich der Frage, wo genau sich die geladene Substanz befindet, gibt es jedoch relativ widersprüchliche Ansichten (Schäfer-Korting et al., 2007). Der Arzneistoff könnte sich einerseits homogen in der Lipidmatrix verteilen, andererseits auch im Kern oder aber eher in der Hülle angereichert vorliegen (Müller et al., 2002), wobei sowohl die chemischen Eigenschaften als auch die Konzentrationsverhältnisse der einzelnen verwendeten Grundstoffe wie Lipid und Detergens sowie der Ablauf der Herstellung von Bedeutung zu sein scheinen. Neue Studien weisen allerdings auf keinen Einschluss hin, sondern in Abhängigkeit von der Lipophilie des Arzneistoffes auf eine Anlagerung der Substanzen auf der Partikeloberfläche oder in der Surfactant-Schicht.

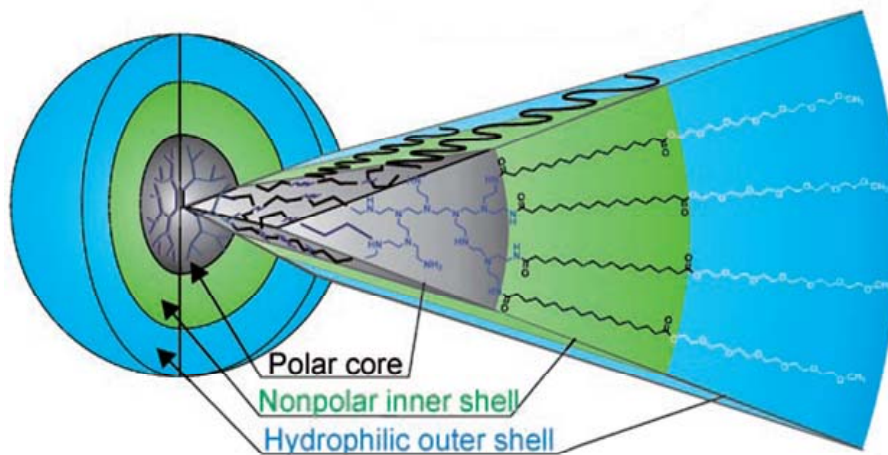
Die Lokalisation des Arzneistoffes in/auf den Partikeln kann unter anderem mithilfe der Polarisierten Lichtstreuung (PLS) untersucht werden. Bei dieser Technik werden die Partikel-enthaltenden Suspensionen in ein sich änderndes elektromagnetisches Feld gebracht und dabei frequenzabhängig sowohl ihre Dipoldichte als auch die Dipolmobilität gemessen. Die Beladung der Partikel mit einer Substanz ändert dabei sowohl deren Dipoldichte als auch ihre -mobilität, und zwar in unterschiedlicher Ausprägung, je nachdem welche Art von Interaktion zwischen Substanz und Partikeln besteht (Blaschke et al., 2007). So reduziert eine Aufnahme des Arzneistoffes in die Partikel ihre Dipolmobilität während ihre Größe zunimmt, während das Anheften des Stoffes auf der Partikeloberfläche die Dipolmobilität erhöht.

Ein weiterer Vorteil der Verwendung von SLN ist ihre protektive Eigenschaft, da sie die geladenen Substanzen vor Hydrolyse und Oxidation schützen können, was beispielsweise für mit Coenzym Q10 beladene SLN gezeigt wurde (Wissing et al., 2004).

Die Substanzfreisetzung aus SLN wurde bereits mit mehreren Modellsubstanzen ausgiebig untersucht. So konnte zum Beispiel für Vitamin A sowohl die Schnelligkeit als auch die Dauer der Freisetzung von SLN durch die Verwendung unterschiedlicher Detergenzien bei der Partikelherstellung gezielt beeinflusst werden (Jenning et al., 2000a), was zu einer gezielten Arzneistofffreisetzung über mehrere Tage ausgenutzt werden kann. Besonders im Hinblick auf die topische Behandlung von Hautwunden ist eine solche retardierte Freisetzung von großer Bedeutung, denn hier sollte der erste Verbandwechsel zur Schonung des Patienten möglichst erst nach sieben Tagen stattfinden. Hier muss allerdings die Tatsache berücksichtigt werden, dass bei verletzter bzw. abgetragener Hornschicht mit einer verstärkten Aufnahme der geladenen Stoffe und Partikel in das Zytoplasma von zum Beispiel

Keratinocyten gerechnet wird, weshalb auch die Toxizität der unbeladenen Partikel bereits untersucht wurde (Wolf et al., 2009).

Dendritic core-multishell (CMS) Nanotransporter. Neben den SLN wurde in den letzten Jahren eine weitere Klasse von Nanopartikeln entwickelt, welche aus hochverzweigten Polyglycerol-Polymerkernen bestehen, die von einer zweilagigen Hülle aus C₁₈-Alkylketten und Monomethoxy-Polyethylenglycol umgeben sind (Haag, 2004). Durch den unimolekularen Aufbau (siehe Abb. 7) dieser sogenannten CMS (dendritic core-multishell) Nanotransporter, welcher einen hydrophilen Kern und eine hydrophile Außenschale mit einer hydrophoben Zwischenschale kombiniert, wird die vorteilhafte Transporteigenschaft und Verträglichkeit von Stealth-Liposomen mit der verbesserten Stabilität von CMS Nanotransportern kombiniert. Die äußere polare Polyethylenglycol-Schale der CMS Nanotransporter gewährleistet eine gute Löslichkeit sowohl in Wasser als auch in organischen Lösungsmitteln. Bei der Beladung der Partikel können hydrophobe Substanzen in der Zwischenschicht aus aliphatischen Ketten eingelagert werden, während sich hydrophile Substanzen sowohl im Kern als auch in der äußeren Schale befinden können (Radowski et al., 2007).



aus: Radowski et al., 2007

Abb. 7. Aufbau der dendritic core-multishell (CMS) Nanotransporter (schematisch).

Die Größe der einzelnen Monomere beträgt 4 - 6 nm, wobei in Lösungen mit einer Partikelkonzentration über dem sogenannten CAC-Wert (critical aggregation concentration) eine Bildung supramolekularer stabiler Aggregate mit einem Durchmesser von 30 - 50 nm nachgewiesen wurde (Haag, 2004; Radowski et al., 2007). In diesen Aggregaten findet der Transport der geladenen Substanzen statt. Dabei können die geladenen Substanzen sowohl

lipo- als auch hydrophile Eigenschaften besitzen, was für die CMS ein breit gefächertes Einsatzgebiet ermöglicht. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme der Modellschubstanz Nilrot in die Haut bei Beladung von CMS Nanotransportern im Vergleich zu SLN weiter verbessert wird (Küchler et al., 2009b). Dabei scheint jedoch ihre geringere Größe anders als zunächst vermutet nicht der entscheidende Vorteil der CMS Nanotransporter zu sein (Küchler et al., 2009a). Es wurde weiterhin auch die Verträglichkeit der CMS Partikel gegenüber Hautzellen getestet, sowie ein mögliches Haut- und Augenirritationspotential ausgeschlossen (Wolf et al., 2009). Ähnlich wie bei SLN muss auch bei der Anwendung von CMS Nanotransportern mit einer stärkeren Aufnahme von Stoffen und Partikeln in Hautzellen gerechnet werden, sobald diese in direkten Kontakt mit den Partikeln kommen (Küchler et al., 2009b).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Behandlung von Patienten mit schweren Schmerzen basiert seit Jahren auf der Verwendung von Opioiden. Es konnte bisher keine Substanz mit anderem Wirkmechanismus gefunden werden, welche eine ähnlich gute Analgesie wie Opiode hervorzurufen vermag (Freye, 1999). Allerdings kann eine Opioidtherapie unerwünschte Arzneimittelwirkungen hervorrufen, welche von eher leichten Beschwerden wie Nausea und Obstipation bis hin zu teils lebensbedrohlicher Atemdepression reichen (Freye, 1999). Gerade bei Schmerzen, welche von Hautverletzungen wie starken Verbrennungen oder Entnahme von Spalthaut zur Transplantation stammen, sind bei oraler oder parenteraler Applikation Opiode meist in relativ hoher Dosierung nötig, um eine hinreichende Schmerzsuppression zu gewährleisten. Es konnte gezeigt werden, dass zumindest zu einem relevanten Anteil die Aktivierung von Opioidrezeptoren in der Peripherie, also in unmittelbarer Nähe zur Stelle der Schmerzauslösung ursächlich für die analgetische Wirkung der Opiode ist (Stein & Lang, 2009). Daher sollte durch eine gezielte topische Anwendung der Substanzen die notwendige Dosis beträchtlich reduziert und die Menge an systemisch verfügbarem Arzneistoff vermindert werden können, was zu einer deutlichen Reduktion aller systemischen Nebenwirkungen führen sollte. Bei Anwendung im Areal einer Hautverletzung muss aber gewährleistet werden, dass durch eine Opioid-Lokaltherapie der Prozess der Wundheilung nicht beeinträchtigt wird. Zudem wäre es sinnvoll, die Applikation der Opiode mithilfe eines geeigneten Trägersystems durchzuführen, welches es im optimalen Fall der langdauernden Wirkstofffreisetzung dem Pflegepersonal ermöglicht, den schmerzhaften Verbandwechsel beim Patienten erst mehrere Tage nach Erstapplikation durchzuführen, ohne dass eine systemische Opioidgabe erforderlich wird.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit lassen sich deshalb folgendermaßen zusammenfassen:

- 1) Untersuchung von zunächst vier verschiedenen Opioiden hinsichtlich ihres Einflusses auf die Wundheilung; Testung an zwei verschiedenen 2D-Wundheilungsmodellen;
- 2) Etablierung eines 3D-Wundheilungsmodells und Untersuchung des Opioideneinflusses auf die Heilung von rekonstruierter humaner Vollhaut;
- 3) Testung verschiedener Nanopartikel (SLN und CMS Nanotransporter) hinsichtlich eines möglichen Einflusses auf die Wundheilung;
- 4) Etablierung einer Detektions- und Quantifizierungsmethode zur zukünftigen Untersuchung des Grades der Metabolisierung von Morphin in 2D-Zellkulturen. Weiterhin kann diese Methode später zur Morphin-Quantifizierung für Penetrations- und Permeationsstudien des laufenden Projektes angewandt werden.

2 Material

2.1 Geräte

Agarosegeldetektionssystem BioDoc Analyse	Biometra, Göttingen
Autoklav	Guwina Hofmann, Berlin
Brutschränke HeraCell®	Heraeus, Hanau
CO ₂ -Laser: MCO 25 plus, Wellenlänge 10,6 µm	FLS Martin, Tuttlingen
Elektrophoresekammern	Biometra, Göttingen
ELISA-Reader Fluostar Optima	BMG Labtech, Offenburg
Filtrationseinheit Millipore®	Millipore-Waters, Eschborn
Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop:	Keyence, Neu Isenburg
Biozero BZ-8000	
Gefriermikrotom: 2800 Frigocut N	Reichert-Jung, Nussloch
HPLC-Anlage Merck Hitachi	Merck Hitachi, Tokio, Japan
Autosampler L-7200	
Interface D-7000	
Pumpe L-7100	
UV-Detektor L-7400	
HSM-Software D-7000	
KR-10 M Kamera	RICOH, Düsseldorf
Lightcycler 480	Roche, Mannheim
Neubauer-Zählkammer (0,0025 mm ² /0,1 mm)	Carl-Zeiss, Jena
Phasenkontrast-Mikroskop Axiovert 135	Carl-Zeiss, Jena
Phasenkontrast-Mikroskop Axiovert 40	Carl-Zeiss, Jena
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Nürnberg
Pipetten Eppendorf Reference®	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy®	Integra Bioscience, Fernwald
Schüttler IKA® MTS 2	IKA®-Werke, Staufen
Sterilarbeitsbank HearsaSafe®	Heraeus, Hanau
Thermoblock: TGradient	Biometra, Göttingen
Ultraschallbad Sonorex® RK 100	Bandelin, Berlin
UV-Photometer GeneRay	Biometra, Göttingen
Vakuum-Pumpe Universal Vacuum System	Savant, Bethesda, MD

Zentrifuge Eppendorf 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge® 1.0R	Heraeus, Hanau

2.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Acetonitril, LiChrosolv®	VWR Merck, Darmstadt
Agarose for routine use	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
	Rapidozym, Berlin
Borsäure	VWR Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Buprenorphinhydrochlorid	Fagron, Hamburg
Codein-Hydrochlorid	Fagron, Hamburg
Desoxyribonuklease I und gebrauchsfertiges Zubehör (Kit):	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
10x Reaction Buffer	
Stop Solution	
Diethylenpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Dimethylsulfoxid (DMSO)	VWR, Darmstadt
Dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Dinatriummethyldiamintetraacetat-Dihydrat (Na ₂ EDTA-2H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Einbettmedium: Gel Mount Aqueous Mounting Medium	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Eosin Y Lösung	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Ethanol	VWR Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Fentanylcitrat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Fibronectin aus humanem Plasma	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Gelmarker: GeneRuler 50 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Giensa Färbelösung	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
HPLC-Zubehör:	VWR Merck, Darmstadt
Säule: LiChroCART® 250-4 RP-8, 5 µm	
Vorsäule: LiChroCART® 4-4	

Autosamplergefäße: vial 1,5 ml Klarglas	
Microinserts: 0,1 ml Klarglas	
Septen: 8 mm Silicon weiß / PTFE blau	
Schraubkappen: 8 mm mit Loch	
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Keratinocytenbasalmedium (KBM) und Supplements für -wachstumsmedium (KGM)	Cambrex BioScience, Landen, Belgien
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Lösungen für Griess-Assay (Bullekit):	Promega, Madison, USA
Sulfanilamid	
N-1-Naphtylethylendiamindihydrochlorid (NED)	
Nitrit-Standard (0,1 M Natriumnitrit)	
Mayers Hämatoxylin Lösung	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Membranfilter (Polyamid, 0,2 µm, Ø 47 mm)	Schleicher&Schuell, MicroScience GmbH, Dassel
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Morphin-3-Glucuronid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Morphin-6-Glucuronid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Morphinhydrochlorid	Fagron, Hamburg
Naloxonhydrochlorid-Dihydrat	Fagron, Hamburg
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Objektträger: Polysine [®] Slides (25 x 75 x 1,0 mm)	Menzel, Braunschweig
Panserin 801 Keratinocytenmedium und Supplements	PanBiotech GmbH, Aidenbach
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Plastik für die Zellkultur, TPP	Biochrom, Berlin
Primer	TIB Molbiol, Berlin
Rekonstruierte humane Vollhautmodelle (EFT-400) und Medium	MatTek, Ashland, USA
RevertAid [™] First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
RNA-Isolierungs-Kit: NucleoSpin [®] RNA II	Macherey-Nagel, Düren
RPMI 1640 Medium	Sigma, Taufkirchen
Salzsäure, konzentriert	VWR Merck, Darmstadt
Serumalbumin vom Rind, fettsäurefrei (BSA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Substanzen für die quantitative PCR:	Roche, Mannheim
SYBR Green Master I	
H ₂ O, RNase-frei	
Multiwell-Plate	
Sealing Foil	
Tissue Freezing Medium	Leica, Nussloch
Transformierender Wachstumsfaktor β 1 (TGF- β 1)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Tris-base	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Trypsin	Biochrom, Berlin
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Zellkultureinsätze, 8 μ m Porengröße	Biochrom, Berlin

2.3 Zellen und Zellkulturmedien sowie Lösungen zur Zellkultur

Zellen: HaCaT Zellen (human adult keratinocytes, kept under low calcium and elevated temperature, spontan immortalisierte Keratinozytenzelllinie), zur Verfügung gestellt von Prof. Fusenig aus dem DKFZ Heidelberg

Primäre Humane Keratinozyten (NHK), isoliert aus Vorhaut, verwendete Passagen 2-3

Basalmedium für HaCaT-Zellen:

RPMI 1640 Medium mit
100 I.U./ml Penicillin
100 μ g/ml Streptomycin und
2 mM L-Glutamin

Wachstumsmedium für HaCaT-Zellen:

HaCaT-Basalmedium zusätzlich mit
10% FCS

Einfriermedium für HaCaT-Zellen:

10% DMSO in FCS

Anzuchtmedium für primäre humane Keratinozyten:

Panserin 801 Anzuchtmedium mit Supplements (Bulletkit):

5 ng/ml hEGF

5 µg/ml Insulin

0,5 µg/ml Hydrocortison

0,1 mM Ethanolamin

0,1 mM Phosphoethanolamin und

25 µg/ml BPE

Wachstumsmedium für primäre humane Keratinozyten:

Keratinozytenbasalmedium (KBM) mit Supplements (Bulletkit):

0,1 ng/ml hEGF

0,5 µg/ml Hydrocortison

5 µg/ml Insulin

30 µg/ml BPE

50 ng/ml Amphotericin B

50 µg/ml Gentamicinsulfat

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS):

0,2 g/l KCl

8,0 g/l NaCl

0,2 g/l KH_2PO_4

1,44 g/l Na_2HPO_4

in aqua bidest.

Trypsin-EDTA:

1,67 mg/ml Trypsin

0,67 mg/ml EDTA

in PBS

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

2.4 Weitere Lösungen

Opioide. Aus den Opioiden bzw. deren Salzen (Morphinhydrochlorid, Hydromorphonhydrochlorid, Fentanylcitrat, Buprenorphinhydrochlorid) sowie dem Opioidrezeptorantagonisten Naloxonhydrochlorid wurden für die Zellversuche jeweils Stammlösungen der Konzentration 1 mM durch Lösen der Festsubstanzen in PBS mit 0,4% BSA hergestellt. Diese wurden durch schrittweise 1:10-Verdünnungsstufen schließlich zu Lösungen der Konzentrationen 0,1 mM bis 10 nM weiterverdünnt, welche dann zur Stimulation in Zellversuchen verwendet wurden.

Zur Entwicklung der HPLC-Methode wurde Morphinhydrochlorid, seine beiden Metabolite und der interne Standard Codein zunächst in 0,05 M KH_2PO_4 -Laufpuffer (siehe Abschnitt 3.10) mit 10% Acetonitril, später in reinem Puffer in einer Konzentration von 10 mM gelöst. Diese Stammkonzentration wurde jeweils vor Versuchsbeginn schrittweise im selben Lösungsmittel weiterverdünnt, um die angegebenen Konzentrationen (siehe Abschnitt 3.10) zu erhalten.

Alle Opioidlösungen wurden bei -80°C gelagert.

Lösungen für Migrationsassays in der Boyden Kammer

Fibronektin-Lösung zum Beschichten der Membranfilter:

3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fibronektin

in aqua bidest.

Lagerung bei -20°C

Giensa-Färbelösung: Giensa stain 1:10 in Wasser (bei jedem Versuch frisch hergestellt)

Medium pH 6,5: HaCaT Kulturmedium mit konz. Salzsäure auf pH 6,5 eingestellt

Lösungen für RNA-Quantifikation und Gelelektrophorese

DEPC-Wasser: 0,1% DEPC in aqua bidest. für 24 h,
danach erfolgte Autoklavierung des Wassers
Lagerung bei RT

10 mM Tris-HCl pH 7,5:	0,30 Tris base in DEPC-Wasser pH eingestellt mit HCl konz. ad 250 ml mit aqua bidest. Lagerung bei RT
0,5 M Na ₂ EDTA:	186,12 g/l Dinatriumethylendiamintetraacetat-Dihydrat in aqua bidest. pH eingestellt mit Natrimhydroxid (pH 8,0) ad 1 l mit aqua bidest. Lagerung bei RT
10 x TBE Puffer:	108 g/l Tris base 55 g/l Borsäure 40 ml/l 0,5 M Na ₂ EDTA ad 1 l mit aqua bidest. Lagerung bei RT
Ethidiumbromid-Färbelösung:	10 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) in 200 ml Wasser bei RT ca. 3 - 4 Wochen verwendbar
Probenpuffer (10 x):	100 mg Bromphenolblau 100 mg Xylencyanol 33 ml Tris 150 mM pH 7,6 60 ml Glycerol (85%) 7 ml DEPC-Wasser Lagerung bei RT
150 mM Tris, pH 7,6:	1,817 g Tris Base 90 ml DEPC-Wasser pH eingestellt mit konz. Salzsäure ad 100 ml mit DEPC-Wasser Lagerung bei RT

Lösungen für Viabilitätsuntersuchungen

MTT-Stammlösung: 5 mg/ml Dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromid (MTT)
in PBS

Lösen der Festsubstanz erfolgte unter Lichtausschluss, nach anschließender steriler Filtration erfolgte die Lagerung in Aliquots lichtgeschützt bei -20°C.

Lösungen für Vollhaut-Wundheilungsuntersuchungen

Morphin-Lösung: Morphin-Hydrochlorid wurde zur Herstellung einer Stammlösung abgewogen (4-5 mg) und im entsprechenden Volumen PBS (mit 0,4% BSA) gelöst. Anschließend wurde die Lösung steril filtriert und bei -80°C gelagert. Zur Herstellung der Versuchslösungen wurde die Stammlösung zu 10 µM bzw. 100 nM mit sterilem PBS verdünnt

Medium: Das Medium für die Vollhautmodelle wurde von der Firma MatTek mitgeliefert und unverändert verwendet.

Fixierlösung der Schnitte: 4% Formaldehyd in PBS

Lösungen für die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Wasser: Für die HPLC wurde stets aqua bidest. verwendet, welches zuvor - wie auch die restlichen HPLC-Lösungsmittel - mittels eines Polyamid (0,2 µm)-Membranfilters filtriert und im Ultraschallbad entgast wurde.

Puffer (0,05 M KH₂PO₄): 6,80 g KH₂PO₄
ad 1 l aqua bidest.
vor Gebrauch entgasen, Lagerung bei 4°C für max. 2 Wochen

Acetonitril: direkt als gradient grade vom Lieferant bezogen und entgast

3 Methoden

3.1 Zellkultur

HaCaT Zellen

Die Keratinozytenzelllinie HaCaT wurde in 75 cm³ Flaschen kultiviert (37°C, 5% CO₂), Mediumwechsel erfolgte alle zwei, spätestens alle drei Tage. Bei ca. 80% Konfluenz wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 bis max. 1:15 gesplittet. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, danach mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgelöst und nach Abstoppen der Reaktion mittels HaCaT-Wachstumsmedium und Überführen der Zellsuspensionen in Zentrifugenröhrchen zentrifugiert (250 x g, 5 min, 4°C). Nach Resuspension des Pellets erfolgte die Neuaussaat ebenfalls in 75 cm³ Flaschen, in die bereits zuvor frisches Wachstumsmedium gefüllt worden war.

Zum Einfrieren der Zellen wurde jeweils der Inhalt einer Zellkulturflasche (bei ca. 80% Konfluenz) nach Ablösen und Zentrifugation in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen zunächst für 24 h bei -80°C belassen bevor das Überführen in flüssigen Stickstoff erfolgte. Zur Reaktivierung wurden die Zellen schnell (im 37°C-Wasserbad) aufgetaut, zentrifugiert (250 x g, 5 min, 4°C) und das Zellpellet in frischem, gewärmtem Kulturmedium resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche eingesät.

Primäre humane Keratinozyten (NHK)

Die Isolation primärer humaner Keratinozyten erfolgte aus juveniler Vorhaut (Vogler et al., 2003), die bei Zirkumzisionen in kooperierenden chirurgischen Arztpraxen bzw. Kliniken anfiel. Die Vorhaut wurde zunächst für 24 h in Trypsin/EDTA eingelegt (4°C), um die Keratinozyten aus dem Gewebeverband zu lösen. Nach Abstoppen der Reaktion mit FCS-enthaltendem Medium und zweimaligem Waschen der Gewebe mit PBS wurden die vereinten Lösungen zentrifugiert (250 x g, 5 min, 4°C), die Pellets in Keratinozyten-Anzuchtmedium resuspendiert und in 25 cm³ Flaschen überführt und kultiviert (37°C, 5% CO₂). Zellen von mindestens drei unterschiedlichen Spendern wurden vereint, um interindividuelle Unterschiede auszugleichen. Nach dem ersten Splitvorgang primärer Keratinozyten wurde das Anzuchtmedium durch Keratinozyten-Wachstumsmedium ersetzt.

Der Splitvorgang war analog dem der HaCaT Zellen, allerdings wurde für die Keratinozyten ihr entsprechendes Medium dabei verwendet. Primäre humane Keratinozyten wurden bereits bei einer Konfluenz von 50 - 70% und in einem Verhältnis von nur 1:2 bis max. 1:3 gesplittet. Für die Versuche wurden Zellen der Passagen 2 oder 3 verwendet.

3.2 Migrationsassay in der Boyden Kammer

Grundlage des Tests. Der Aufbau des Migrationsassays (Bartolmäs et al., 2005; Sauer et al., 2004; Vogler et al., 2003) in der sogenannten „modifizierten Boyden Kammer“ („modified Boyden chamber“) ist in Abb. 8 dargestellt; der Test wird im Folgenden der Einfachheit halber nur als Migrationsassay bezeichnet. Grundlage dabei ist, dass während einer Migrationszeit von 5 h die Zellen aus dem oberen Kompartiment in den Filter einwandern und dort steckenbleiben. Wirken die zu untersuchenden Substanzen im unteren Kompartiment chemotaktisch, so erhöht sich die Anzahl der Zellen im Filter im Vergleich zur Negativkontrolle, bei der reines Medium verwendet wird. Zur Unterscheidung von Chemotaxis und Chemokinese dient der Versuchsaufbau, bei dem die Testsubstanz beiden Kompartimenten zugesetzt wird. Durch die Aufhebung des Gradienten wirken nur solche Substanzen migrationsfördernd, die Chemokinese - also ungerichtete Zellmigration - induzieren.

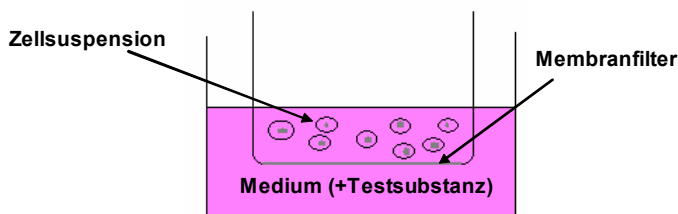


Abb. 8. Schematische Darstellung des Aufbaus des Migrationsassays („modified Boyden chamber“).

Beschichten der Membraninserts. Die Membraninserts wurden in die Vertiefungen von 24-Loch-Platten gesetzt und 50 μ l einer Fibronektinlösung (3 μ g/ml in aqua bidest.) auf jeden Filter pipettiert. Nach Inkubation für 1 h (37°C) wurden die Flüssigkeit wieder abgesaugt, die Filter auf der sterilen Werkbank einige Minuten zum Trocknen belassen und im Anschluss verschlossen bei 4°C für max. 6 Wochen bis zur Verwendung gelagert. Der gesamte Vorgang des Beschichtens erfolgte steril.

Vorbereitung. In die Vertiefungen einer 24-Loch-Platte wurden je 450 μ l Medium vorgelegt und dann je 50 μ l einer Lösung der Testsubstanzen (Opioide in versch. Konzentrationen bzw. TGF- β 1 10 ng/ml als Positivkontrolle) bzw. (im Falle der Negativkontrolle) des reinen Lösungsmittels (0,4% BSA in PBS) dazupipettiert (3-fach Bestimmungen). Anschließend

wurden die beschichteten Membranfilter unter Vermeidung von Luftblasen daraufgesetzt. Bei Versuchen mit dem Opioidrezeptorantagonisten Naloxon wurden die Zellen 30 min vor Zellaussaat zunächst mit Naloxon-enthaltendem (1 μ M) Medium vorinkubiert, um das Erreichen des Blockers an den Rezeptoren sicherzustellen.

Zellaussaat und Migration. Zellen wurden vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst, zentrifugiert und mithilfe der Neubauer-Zählkammer eine Zellsuspension mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro 500 μ l Medium (HaCaT) bzw. 8×10^5 Zellen pro 500 μ l Medium (NHK) hergestellt. Je 500 μ l dieser Zellsuspensionen wurden auf die Membranfilter gegeben und die Platten für 5 h im Brutschrank (37°C) belassen. Während dieser Zeit wanderten die Zellen in die Poren der Membraninserts. Nach 5 h wurde das Medium aus beiden Kompartimenten abgesaugt, die Zellen zunächst 2 min mit eiskaltem Ethanol (96%) fixiert und auf dem Filter zurückgebliebene Zellen vorsichtig mithilfe eines Wattestäbchens entfernt. Zuletzt erfolgte die Färbung mit Giemsa-Färbelösung (30 min, 37°C).

Für Versuche in saurem Milieu wurde der Versuch analog, jedoch mit angesäuertem Medium (pH 6,5) durchgeführt. Für die Untersuchungen des Einflusses unbelasteter Trägersysteme wurden diese (je 40 μ l) ebenfalls ins obere Kompartiment zur Zellsuspension gegeben und somit ihre chemokinetische Potenz untersucht.

Für Chemokinese-Versuche wurde die Zellsuspension so berechnet, dass sich die gleiche Anzahl von Zellen in einem Volumen von 450 μ l befand und die Testsubstanzen (50 μ l) dann zusätzlich auch ins obere Kompartiment zur Zellsuspension gegeben; so wurde der Substanzgradient aufgehoben.

Auswertung. Zur Auswertung wurden die Zellen in jeweils 10 zufällig ausgewählten Feldern pro Filter bei 150-facher Vergrößerung gezählt. Die Mittelwerte wurden jeweils in Relation zur Negativkontrolle betrachtet, welche definitionsgemäß einen Migrationsindex von 1 erhielt. Substanzen, die migrationsfördernd wirkten, erhöhten demzufolge den Migrationsindex auf Werte > 1.

3.3 Scratch-Assay

Grundlage des Tests. Eine weitere Möglichkeit der Untersuchung des Einflusses von Substanzen auf die Wundheilung ist der sogenannte Scratch-Test (Hintermann et al., 2001; Koivisto et al., 2006), bei welchem der Verschluss einer „Wunde“ in einer 2D-Keratinocytenkultur verfolgt und dokumentiert wird.

Durchführung. Für den Test wurden HaCaT Zellen in einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro Vertiefung in Wachstumsmedium in einer 6-Loch-Platte ausgesät und für 24 h inkubiert (37°C, 5% CO₂). Am folgenden Tag wurde mithilfe einer gelben (200 μ l-) Pipettenspitze eine

Wunde durch den Zellrasen gezogen („scratch“). Das Medium wurde abgesaugt, die Vertiefungen wurden vorsichtig mit PBS gewaschen um die abgelösten Zellen zu entfernen und neues Medium zugegeben, welches entweder die Testsubstanzen (Endkonz.: Morphin 100 nM bzw. TGF- β 1 1 ng/ml als Positivkontrolle) oder reines Medium als Negativkontrolle enthielt. Die Wunden wurden sofort sowie noch einmal nach 48 h-Inkubation (37°C, 5% CO₂) an exakt derselben Stelle fotografiert um das Voranschreiten des Wundverschlusses zu dokumentieren. Die Auswertung erfolgte visuell. Die Versuche wurden zweimal wiederholt.

3.4 Wundheilungsuntersuchungen an rekonstruierten Vollhautmodellen

Die Vollhautmodelle wurden nach Lieferung zunächst in frische 24-Loch-Platten überführt, mit mitgeliefertem frischem Medium versorgt und zur Regeneration für 20 - 24 h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Induzieren der Hautläsionen. Am nächsten Tag erfolgte die Läsion mittels CO₂-Laser. Dabei wurde der Laser mithilfe einer eigens dafür gebauten Metallhalterung in definiertem Abstand zum Hautmodell fixiert und so programmiert, dass jeweils in der Mitte der kreisrunden Hautmodelle (Durchmesser 12 mm) eine spiralförmige Figur von 5 mm Durchmesser abgefahren wurde. Die maximale Intensität von 25 W und eine mittlere Scangeschwindigkeit wurden am Gerät eingestellt. Die unterschiedlichen Abtragungstiefen wurden durch unterschiedlich häufige Wiederholungen des Laservorgangs erzielt. Im Anschluss daran wurden die Modelle in Einfriermedium eingebettet und bei -80°C tiefgefroren (mindestens 24 h), um anhand der Morphologie die Anzahl der Laserwiederholung zu bestimmen, die zu einer optimalen Wundtiefe führt.

Für die folgenden Untersuchungen zur Wundheilung am rekonstruierten Hautmodell erfolgte nach dem Lasern zunächst ein Mediumwechsel, gefolgt von einer Heilungsperiode von vier Tagen bei 37°C (Mediumwechsel nach zwei Tagen). Um den Einfluss von topisch appliziertem Morphin in Lösung bzw. beladenen und unbeladenen SLN auf die Wundheilung zu untersuchen, wurden auf einen Teil der Hautmodelle nach der Läsion 50 μ l einer Morphinlösung (Morphin in unterschiedlichen Konz., gelöst in PBS mit 0,4% BSA), unbeladener oder beladener SLN gegeben, auf den anderen Teil wurde das gleiche Volumen an reinem PBS (mit 0,4% BSA) gegeben. Dabei wurde darauf geachtet, dass sowohl die Wunde als auch der noch intakte Wundrand der Hautmodelle von Flüssigkeit benetzt waren. Diese Behandlung wurde nach dem Mediumwechsel nach zwei Tagen wiederholt. Nach 4 Tagen wurden die Hautmodelle eingebettet und tiefgefroren.

Schneiden und histologische Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung. Die tiefgefrorenen Hautstücke wurden zunächst mithilfe des Kryotoms in 14 µm dicke vertikale Scheiben geschnitten, wobei darauf geachtet wurde, möglichst durch die Mitte der Wunde zu schneiden. Sofort im Anschluss erfolgte die HE-Färbung. Dabei wurden die Schnitte für 10 min in einer Formaldehydlösung fixiert und nach einem Waschvorgang (aqua bidest., 30 s) für 5 min in Hämatoxylinlösung gefärbt. Nach Entfernen überschüssiger Färbelösung in Wasser (5 min) erfolgten die Gegenfärbung mit Eosin Y-Lösung über 30 s sowie eine mehrschrittige Dehydrierung in Alkohol (2 x 2 min 96%, dann 2 x 2 min 100%). Schließlich wurde der Alkohol noch mithilfe von Xylol (2 x 2 min) extrahiert und die Schnitte konnten nach Trocknung eingedeckelt werden. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop („Brightfield“-Einstellung).

3.5 NO-Messung (Griess-Assay)

Grundlage des Tests. Bei der Griess-Reaktion wird die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) indirekt anhand seines Abbauproduktes Nitrit quantifiziert. Ausgenutzt wird dabei die Bildung eines Azofarbstoffes in Anwesenheit von Nitrit (Griess-Reaktion), welcher durch Absorptionsmessung bei 540 nm detektiert wird (Lee et al., 1999).

Durchführung. Die Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^4 Zellen pro Vertiefung in einer 96-Loch-Platte in Wachstumsmedium ausgesät, für 24 h inkubiert (37°C, 5% CO₂) und dann mit 100 nM Morphin bzw. dem reinen Lösungsmittel (Neg.-Kontrolle) ohne Mediumwechsel für weitere 24 h (37°C, 5% CO₂) stimuliert (6-fach Bestimmungen). Um die Nitritmenge zu quantifizieren wurde das Medium im Anschluss abgenommen, zentrifugiert (13.000 x g, 4°C) und in eine neue 96-Loch-Platte überführt. Unter Lichtausschluss wurden zunächst 50 µl/Vertiefung der Sulfanilamidlösung (1% Sulfanilamid in 5%-iger Phosphorsäure) und nach 10-minütiger Inkubation (bei RT, Lichtausschluss) zusätzlich 50 µl/Well der NED-Lösung (0,1% N-1-Naphtylethylendiamin-dihydrochlorid in Wasser) zugegeben. Nach einer Reaktion über 10 min bei RT unter Lichtausschluss erfolgte die Absorptionsmessung bei 540 nm. Zur Auswertung wurden die Einzelwerte der 6-fach-Bestimmungen gemittelt um mithilfe des t-Tests (Signifikanzniveau $p \leq 0,05$) einen Unterschied zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen festzustellen.

3.6 Untersuchungen zur Genexpression

RNA-Isolierung aus Zellen

Für die RNA-Isolierung wurden die Zellen zunächst in 6-Loch-Platten in einer Dichte von 4×10^5 Zellen pro Vertiefung ausgesät und für 6 bzw. 24 h inkubiert (37°C , 5% CO_2). Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Morphin in den Konzentrationen 1 nM - 1 μM bzw. 0,4% BSA in PBS im Falle der Negativkontrolle stimuliert. Die RNA-Isolierung erfolgte am dritten Tag mithilfe des RNA-Isolierungs-Kits NucleoSpin[®] RNA II (Macherey-Nagel, Düren) nach mitgeliefertem Protokoll („Total RNA purification from cultured cells and tissue“). Hierfür wurden die Zellen zunächst mit dem im Kit enthaltenen Lysispuffer lysiert, das Homogenisieren erfolgte über Filtersäulen (im Kit). Nach Binden der RNA auf die mitgelieferten Säulen, DNase-Verdau und mehreren Waschschritten folgte schließlich die RNA-Elution von der Membran mit 60 μl RNase-freiem Wasser. Die Konzentration der erhaltenen RNA wurde im Anschluss photometrisch bestimmt. Dazu wurden die Proben 1:40 mit 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) verdünnt und die Absorption bei 260 nm gemessen. Eine Absorption von 1 entspricht einem RNA-Gehalt von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ der verdünnten Probe und der Gehalt in der Ursprungsprobe kann damit berechnet werden.

Die Qualität der RNA wurde im Anschluss mithilfe von RNA-Gelen überprüft. Dafür wurden 2 μl der RNA-Proben mit 4 μl Probenpuffer (1 x) gemischt und auf das RNA-Gel (1% Agarose in 1 x TBE) aufgetragen. In der Kammer befand sich während der Elektrophorese bei 100 V ebenfalls 1 x TBE-Puffer. Die Gele wurden mit einer Ethidiumbromidlösung gefärbt und unter Belichtung mit UV-Licht fotografiert. Waren im Gel für jede Probe 2 Banden zu sehen, welche der 18- und 28s-rRNA entsprechen, so wurde davon ausgegangen, dass die isolierte RNA rein war. Bei Spuren von Rest-DNA (erkennbar als kaum aus der Tasche gewanderte Bande zusätzlich zu den beiden RNA-Banden), wurde vor die cDNA-Synthese ein weiterer DNase-Verdau-Schritt eingefügt. Die isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

cDNA-Synthese

Um eine quantitative Bestimmung der in den Zellen synthetisierten RNA durchzuführen, musste im ersten Schritt aus der isolierten Gesamt-RNA mithilfe einer reversen Transkriptase die entsprechende cDNA hergestellt werden, die anschließend als Matrize für die DNA-Polymerase diente. Verwendet wurde hierfür die im Kit (RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas, St. Leon-Rot) bereitgestellte RevertAid[™] reverse Transkriptase, die zu der Gruppe der MMLV (Moloney murine leukemia virus)-reversen

Transkriptasen gehört. Die verwendeten Oligonukleotide waren Random Hexamer Oligonukleotide, die ebenfalls im Kit bereitgestellt wurden, pro Ansatz wurden 2 µg RNA verwendet. Für die Reaktion wurde am Thermo Cycler ein Programm erstellt, welches den vorhergehenden DNase-Verdau durch die DNase I (Sigma-Aldrich, Schnelldorf) mit einschloss, um eventuelle Rückstände von DNA in den Proben vollständig zu entfernen. Die so synthetisierte cDNA konnte nun nach Verdünnen mit RNase-freiem Wasser (1+4) für die semi-quantitative Polymerase-Kettenreaktion verwendet oder bei -80°C gelagert werden.

Semiquantitative real-time PCR

Die für die Polymerase-Kettenreaktion verwendeten Primer wurden entweder mithilfe der LightCycler® Probe Design Software 2.0 selbst designt, von der Primerdatenbank RTPriemer DB übernommen oder es wurde auf bereits veröffentlichte Primersequenzen zurückgegriffen (Tab. 3). Um eine Amplifikation genomischer DNA zu vermeiden sind alle verwendeten Primerpaare Exon-übergreifend. Als „house keeping“-Gen wurde YWHAZ (Tyrosin 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Aktivierungsprotein, Zeta-Polypeptid) verwendet.

Tab. 3. Übersicht über die für die Polymerase-Kettenreaktion verwendeten Primer.

Gen	Primersequenz	Referenz
YWHAZ	fw: 5'-AGACGGAAGGTGCTGAGAAA-3' rv: 5'-GAAGCATTGGGGATCAAGAA-3'	LightCycler® Probe Design Software 2.0
eNOS	fw: 5'-TGTGTGGGAGAGGATGC-3' rv: 5'-CGGATTGTAGCCTGGAAC-3'	LightCycler® Probe Design Software 2.0
iNOS	fw: 5'-GTCACCATCCTCTTTGCGA-3' rv: 5'-CAGGGCAGTCTCCATTG-3'	LightCycler® Probe Design Software 2.0
nNOS	fw: 5'-GAGGGATGACAACCGATAC-3' rv: 3'-GGCAAGAGGGTCCAGTTA-3'	LightCycler® Probe Design Software 2.0
MMP-1	fw: 5'-GGGAGATCATCGGGACAACCTC-3' rv: 5'-GGGCCTGGTTGAAAAGCAT-3'	Elliott et al., 2002
MMP-2	fw: 5'-GCGGCGGTCCACAGCTACTT-3' rv: 5'-CACGCTCTTCAGACTTTGGTTCT-3'	RTPriemerDB ID: 3494
MMP-9	fw: 5'-CCTGGAGACCTGAGAACCAATC-3' rv: 5'-CCACCCGAGTGTAACCATAGC-3'	RTPriemerDB ID: 3495

Grundlage des Tests. Der von Roche bereitgestellte Mastermix SYBR Green I Master enthält die FastStart Taq DNA Polymerase, einen Reaktionspuffer, das Nukleotidgemisch, den Farbstoff SYBR Green I sowie $MgCl_2$ um die Nukleotidtriphosphate zu stabilisieren. Der Farbstoff SYBR Green, welcher im ungebundenen Zustand nicht fluoresziert, lagert sich an doppelsträngige DNA-Moleküle während der Elongationsphase an (Zipper et al., 2004) und emittiert nach Anregung bei 530 nm ein Fluoreszenzsignal. Je mehr Moleküle an doppelsträngiger DNA am Ende der Elongationsphase vorhanden sind, desto stärker ist dieses Signal.

Durchführung. Für die quantitative Polymerase-Kettenreaktion wurden pro Ansatz je 2 μ l cDNA bzw. Wasser (im Falle der Negativkontrollen) mit je 8 μ l eines vorbereiteten Mastermixes (aus Mastermix SYBR Green I Master und den genspezifischen Primern) in eine für den LightCycler[®] 480 geeignete 96-Loch-Platte pipettiert. Nach einem initialen Schritt der Polymerasenaktivierung (Präinkubation) folgte am LightCycler[®] die Genamplifikation in 45 Zyklen (siehe Tab. 4). Am Schluss wurde durch stete Temperaturerhöhung auf 95°C eine Schmelzkurve erstellt, wobei kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen wurde. Bei hohen Temperaturen wird doppelsträngige DNA geschmolzen und somit das emittierte Fluoreszenzsignal immer kleiner, wodurch für jedes Amplikon ein charakteristischer Schmelzpeak erstellt wird. Doppelpeaks weisen entweder auf die Bildung von Primerdimeren oder auf die Bildung anderer (unspezifischer) Produkte in der entsprechenden Probe hin, weshalb das Erstellen der Schmelzkurve eine Möglichkeit zur Qualitätskontrolle der PCR ist.

Tab. 4. Temperaturschema für die quantitative real-time-PCR (ohne Schmelzkurve).

	<i>Temperatur (°C)</i>	<i>Zeit</i>	<i>Anzahl der Wiederholungen</i>
Präinkubation	95°C	5 min	1
Genamplifikation:			45
<i>Denaturierung</i>	95°C	10 s	
<i>Primer-Annealing</i>	60°C	10 s	
<i>DNA-Elongation</i>	72°C	10 s	

Auswertung. Bei der Auswertung bezeichnet der C_t -Wert die Anzahl der Zyklen, die notwendig ist um ein Fluoreszenzsignal zu erhalten, welches sich von der Hintergrundfluoreszenz signifikant unterscheidet. Dieser C_t -Wert dient als Grundlage für die Quantifizierung der ursprünglich eingesetzten cDNA-Menge. Bei der hier durchgeführten relativen Quantifizierung bezieht man die errechnete cDNA-Menge jeweils auf diejenige des eingesetzten house keeping-Gens, welches damit als Referenzgen dient.

Gelelektrophorese

Nach Abschluss der Reaktion wurden neben der quantitativen Auswertung die Reaktionsansätze zusätzlich zusammen mit einem Größenmarker auf ein Agarosegel (2%) aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert um eine zusätzliche (qualitative) Kontrolle der Ergebnisse zu erhalten.

3.7 Viabilitätsuntersuchung: MTT-Test

Grundlage des Tests. Dieser auch MTT-basierter Proliferationsassay genannte Test beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromids (MTT) in ein violettes, wasserunlösliches Formazan durch die mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Reduktase (Gysler et al., 1999; Gysler et al. 1997; Page et al., 1988; Abb. 9). Somit korreliert die Menge an blauem Farbstoff direkt mit der Anzahl lebender Zellen.

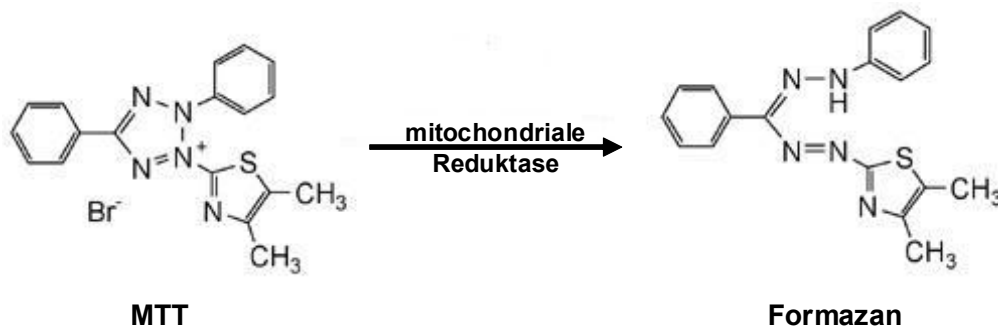


Abb. 9. Grundlage des MTT-Assays: Bildung des blauen Farbstoffes Formazan aus farblosem MTT.

Durchführung. Die Zellen wurden in einer Dichte von 4×10^4 Zellen pro Vertiefung in 24-Loch-Platten ausgesät und 24 h kultiviert (37°C , 5% CO_2). Nach einem Waschvorgang mit PBS erfolgte ein Mediumwechsel. Das Medium enthielt als Testsubstanz Morphin ($100 \mu\text{M}$ - $1 \mu\text{M}$), die Negativkontrolle enthielt stattdessen 0,4% BSA in PBS. Die Platten wurden für weitere 48 h inkubiert (37°C , 5% CO_2), anschließend wurde die vorbereitete und aliquotierte MTT-Lösung unter Lichtausschluss zupipettiert (MTT-Endkonz. in der Vertiefung: $0,4 \text{ mg/ml}$) und es folgte eine weitere Inkubation (37°C , 5% CO_2) für 4 h (Lichtausschluss). Schließlich wurde das Medium abgesaugt, die gebildeten Formazankristalle in $250 \mu\text{l/Well}$ DMSO gelöst (Schüttler, 300 rpm für ca. 5 min) und die Absorption bei 540 nm innerhalb von max. 30 min gemessen. Als Leerwert, der von allen Messwerten abgezogen wurde, diente dabei pures DMSO (6-fach-Bestimmung und Mittelwertbildung). Dann wurden die Werte der

6-fach-Bestimmungen gemittelt, die Viabilität der Negativkontrolle als 100% definiert und die der Morphin-stimulierten Zellen in Relation dazu berechnet. Bei einer Reduktion der Zellviabilität auf nicht weniger als 85% wurde davon ausgegangen, dass keine nennenswerte Schädigung der Zellen stattgefunden hat.

3.8 Partikelherstellung und Charakterisierung

Die Herstellung und Charakterisierung der verwendeten unbeladenen Nanopartikel erfolgte durch Kooperationspartner nach bereits veröffentlichten Methoden.

SLN. SLN (solid lipid nanoparticles) bestanden aus 10% Glycerolbehenat und 2,5% Tensid (Poloxamer 188). Das Verfahren ihrer Herstellung ist im Detail bereits veröffentlicht (Lombardi Borgia et al., 2005b) und bestand zusammengefasst aus dem Schmelzen des Lipids, gefolgt von der Zugabe einer wässrigen Poloxamer 188-Lösung und der Bildung einer Präemulsion. Diese Präemulsion wurde schließlich homogenisiert und die entstandenen SLN bei 8°C gelagert und innerhalb eines Monats für die Versuche verwendet. Für die Morphin-beladenen SLN wurde Morphin Base (2,5 bzw. 5 mg/20 ml) zu Beginn der Partikelherstellung dem verwendeten Lipid beim Schmelzen zugefügt.

CMS Nanotransporter. Die verwendeten CMS (dendritic core-multishell) Nanotransporter mit der empirischen Formel $PG_{10000}(-NH_2)_{0,7}(C_{18}mPEG_6)_{1,0}$ wurden ebenfalls nach bereits beschriebener Methode (Radowski et al., 2007) durch Kooperationspartner synthetisiert, verwendete Dispersionen hatten eine Konzentration von 0,5% Polymer.

Die Partikelcharakterisierung erfolgte durch Kooperationspartner mittels der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS). Dabei wurden die mittlere Partikelgröße (Z-Wert) und der Polydispersionsindex (PI) als Maß für die Verteilung des beladenen Stoffes ermittelt. Die Stabilität der beladenen Partikel wurde über einen Zeitraum von 30 Tagen verfolgt.

3.9 Parelektrische Spektroskopie (PS)

Die Untersuchungen zur Parelektrischen Spektroskopie erfolgten durch Kooperationspartner nach veröffentlichten Methoden (Blaschke et al., 2007). Mithilfe dieses Verfahrens lassen sich unabhängig von Zellversuchen Vorhersagen zur Interaktion eines Arzneistoffes mit Transportpartikeln (also SLN bzw. CMS Nanotransporter) treffen, welche die Penetration von Stoffen in gesunde und verletzte Haut entscheidend beeinflussen können (Lombardi Borgia et al., 2005b; Stecova et al., 2007). Die Parelektrische Spektroskopie, deren Grundlage die

Messung von Dipolmomenten in einem elektrischen Feld ist, ermöglicht Vorhersagen zur Lokalisation eines Stoffes auf dem verwendeten Träger. Die beiden entscheidenden Parameter bei der Messung sind die Dichte ($\Delta\epsilon$) sowie die Mobilität (f_0) der Dipole.

Für die Messungen wurden sowohl Morphin als auch die untersuchten beiden Trägersysteme (SLN und CMS Nanotransporter) im selben Lösungsmittel wie beim Migrationsassay (PBS mit 0,4% BSA) gelöst bzw. verdünnt.

3.10 HPLC-Entwicklung

Grundlage für die Etablierung einer optimierten Detektionsmethode zur Quantifizierung von Morphin und seinen beiden Metaboliten Morphin-3- und Morphin-6-Glucuronid, sowie des gewählten internen Standards Codein war eine bereits veröffentlichte Methode (Chari et al., 1991), welche isokratisch erfolgte. Das Laufmittel bestand dabei aus einem Gemisch von 0,05 M Kaliumphosphatpuffer (siehe 2.4) mit 10% Acetonitril. Die UV-Messung erfolgte bei 280 nm, ebenfalls in Anlehnung an die Ergebnisse von Chari et al.. Die Versuche wurden stets bei Raumtemperatur durchgeführt, am Gerät wurden die in Tab. 5 dargestellten Bedingungen gewählt. Die HPLC-Anlage wurde vor jedem Lauf für mindestens 30 min mit einem Puffer/10% Acetonitril-Gemisch gespült bis eine ebene Basislinie erreicht wurde. Zudem wurde zu Beginn eines jeden Laufes sowie immer nach 3 - 4 Probeneinspritzungen stets einmal reiner Puffer eingespritzt, um mögliche Reste der Proben von der Säule zu entfernen.

Tab. 5 HPLC-Konditionen.

Injektionsvolumen:	50 μ l
Fließrate:	1,0 ml/min
UV-Absorption:	280 nm, später 210 nm
Säule:	LiChroCART® 250-4 RP-8, 5 μ m
Vorsäule	LiChroCART® 4-4

Im Verlauf der Methodenentwicklung wurde der Acetonitrilgehalt auf 5% reduziert bevor schließlich bei der endgültigen Methode Puffer und Acetonitril als getrennte Laufmittel (A und B) verwendet wurden und ein Gradient eingeführt wurde. Nach einigen Zwischenschritten wurde schließlich folgende Gradientenmethode validiert:

Tab. 6. Gradientenmethode zur Detektion von Morphin, Morphin-3-Glucuronid, Morphin-6-Glucuronid und Codein.

<i>Zeit (min)</i>	<i>Laufmittel A: Puffer (%)</i>	<i>Laufmittel B: Acetonitril (%)</i>
0	95	5
15	95	5
30	80	20
37	80	20
42	95	5
50	95	5

Probenvorbereitung. Für die HPLC-Analytik wurden Stammlösungen der Testsubstanzen einer Konzentration von 10 mM in Laufmittel A hergestellt. Die Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert und serielle Verdünnungen (ebenfalls mit Laufmittel A, bis zur Konz. von 100 nM) zur Methoden-Validierung bei jedem Versuch frisch hergestellt. Anschließend wurde jede Probe mit dem internen Standard Codein versetzt. Dabei wurden je 5 µl einer 1 mM Codeinlösung zu einem Volumen von 500 µl zupipettiert, es entstand so die Codein-Endkonz. 0,01 mM. Es wurden jeweils drei Vials mit gleichen Proben bestückt (Dreifachbestimmung innerhalb eines Laufes) und der gesamte Lauf immer mindestens zweimal wiederholt, wobei zudem noch eine neue Einwaage der Substanzen zwischengeschaltet war. Die UV-Detektion der Substanzen erfolgte bei einer Wellenlänge von 210 nm.

Nach Abschluss eines Laufes wurde ein Waschprogramm (Wasser mit steigendem Anteil von Acetonitril, Fließrate 0,5 ml/min) durchgeführt und die Säule zwischen den Läufen in Acetonitril/Wasser (1:4) gelagert.

Auswertung. Zur Auswertung wurde zunächst für jede Messung der Quotient aus Morphin- und Codein-Peakfläche gebildet und die Mittelwerte von gleich bestückten Vials eines Laufes errechnet. Die gemittelten Quotienten für die einzelnen Morphinkonzentrationen wurden für jeden Lauf separat gegen die Morphinkonzentration aufgetragen und die Linearität der entstehenden Funktion mithilfe des Korrelationskoeffizienten (R^2) überprüft. Bei einem R^2 -Wert von $> 0,99$ wurde von einer guten Linearität ausgegangen und die gemittelten Werte auf einer gemeinsamen Korrelationsgerade dargestellt. Konnte bei mindestens 3 unabhängigen Versuchen ein Korrelationskoeffizient von $> 0,99$ erreicht werden, wurde die Methode als validiert betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Migrationsassays

Hinsichtlich der Eignung verschiedener Opioid-enthaltender Formulierungen für die Ausschaltung schwerer und schwerster Schmerzen bei Hautläsionen sollte zunächst deren Einfluss auf die Wundheilung geklärt werden. Da - wie bereits erläutert - die Migration von Keratinozyten eine wichtige Voraussetzung für eine Reepithelialisierung der Dermis bei verletzter Epidermis ist (siehe 1.2), stellt der sogenannte Migrationsassay eine Möglichkeit dar, den Einfluss bestimmter Substanzen auf die Wundheilung zu bestimmen. Es wurde hierfür die spontan immortalisierte Keratinozytenzelllinie HaCaT verwendet. Gründe hierfür sind ein extrem hoher Bedarf an Zellen, der mit primären humanen Keratinozyten nicht gedeckt werden konnte; ferner wurde bereits gezeigt, dass die Eigenschaften dieser Zelllinie denen primärer Keratinozyten entsprechen (Schürer et al., 1993), dazu gehört auch das Migrationsverhalten der HaCaT Zelllinie (Bartolmäs et al., 2005). Als Positivkontrolle bei jedem Versuch diente der transformierende Wachstumsfaktor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), welcher, wie beschrieben (Zambruno et al., 1995), die Expression von Fibronektinrezeptoren auf der Zellmembran von Keratinozyten fördert und so die Wanderung der Zellen in Richtung Fibronektin-beschichteter Filter stimuliert.

Zunächst wurden die verschiedenen Opioide (Morphin, Hydromorphon, Fentanyl, Buprenorphin) hinsichtlich ihres Einflusses auf die HaCaT Migration geprüft, je 4 verschiedene Konzentrationen (1 μM , 100 nM, 10 nM, 1 nM) wurden parallel getestet. Da sich die Sensitivität des Tests jedoch für eine derartige Dosis-Wirkungs-Kurve als zu gering erwies, wurden in der Auswertung nur die Effekte der Konzentrationen 100 nM und 1 nM betrachtet (siehe Abb. 10). Alle getesteten Opioide förderten die Migration signifikant und zudem konzentrationsabhängig. Die Effektivität bei einer Opioidkonzentration von 100 nM entsprach der der Positivkontrolle TGF- $\beta 1$, bei allen Opioiden stieg der Migrationsindex auf etwa 2 (unstimulierte Zellen: Migrationsindex 1). Wie erwartet war der Effekt bei der geringeren Opioidkonzentration entsprechend niedriger, jedoch signifikant höher als bei der Negativkontrolle (siehe Abb. 10). Um eine spezifische Aktivierung von Opioidrezeptoren nachzuweisen, wurden in einer zweiten Versuchsreihe Zellen mit dem spezifischen Opioidrezeptorantagonisten Naloxon (1 μM) vorinkubiert und auch während der

Opioidexposition mit Naloxon behandelt. Wie in Abb. 10 zu sehen, führte dies zu einer kompletten Aufhebung der Migrationsförderung (Migrationsindex bei allen Opioiden bei etwa 1). Die TGF- β 1-vermittelte Induktion der Migration hemmte Naloxon hingegen nicht (siehe Abb. 11, Migrationsindex ohne Naloxon $1,96 \pm 0,43$; mit Naloxon $1,95 \pm 0,69$).

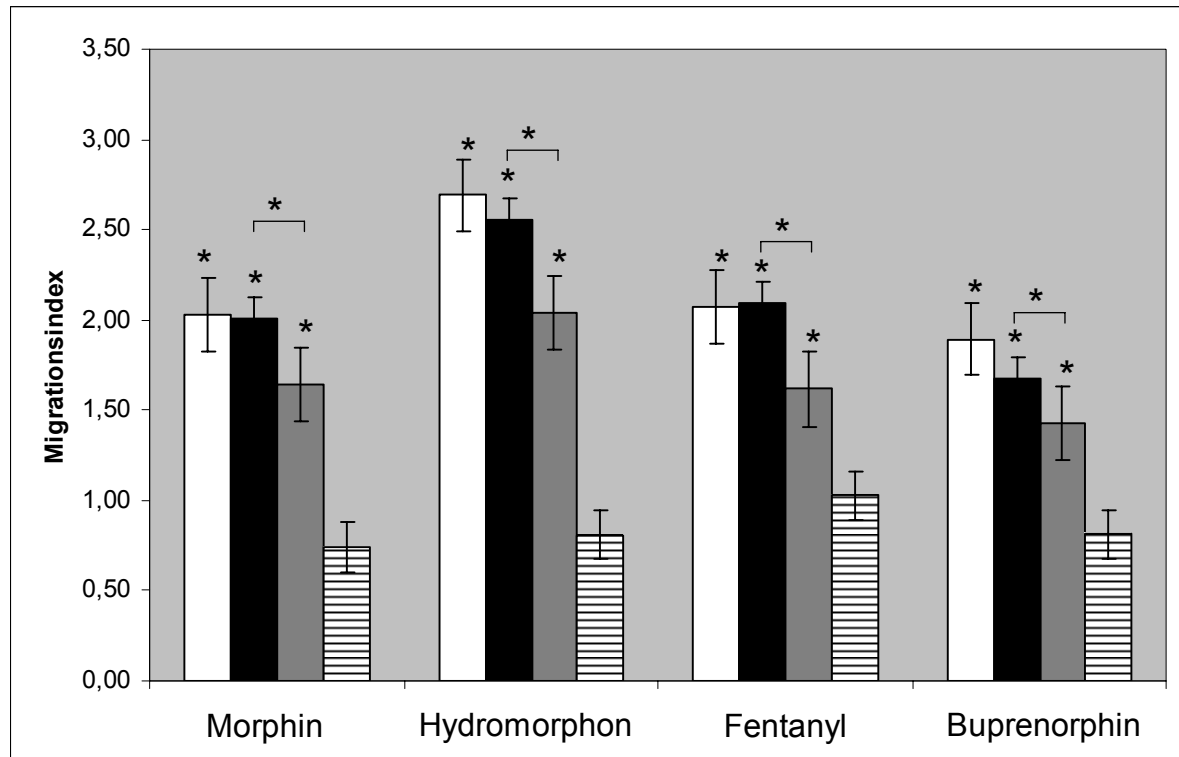


Abb. 10. Einfluss von Opioiden auf die HaCaT Migration (5 h Migrationsdauer). Neben der Positivkontrolle TGF- β 1 (1 ng/ml, weiße Säulen), welche die Migration etwa um den Faktor 2 erhöht, wurden zwei Konzentrationen der Opioiden getestet (100 nM, schwarze Säulen; 1 nM, graue Säulen). Alle Opioiden förderten die Zellmigration konzentrationsabhängig und führten in hoher Konzentration ähnlich wie die Positivkontrolle TGF- β 1 zu einer Verdopplung der migrierten Zellen im Filter. Die spezifische Aktivierung von Opioidrezeptoren wurde durch deren Blockade mittels Naloxon (1 μ M, gestreifte Säulen) nachgewiesen, da Naloxon den Migrationsindex auf den Basiswert reduzierte. Versuchsdaten stammen aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. * $p \leq 0,05$, bezogen auf die Kontrolle (basale Migration) bzw. Vergleich der beiden Opioidkonzentrationen.

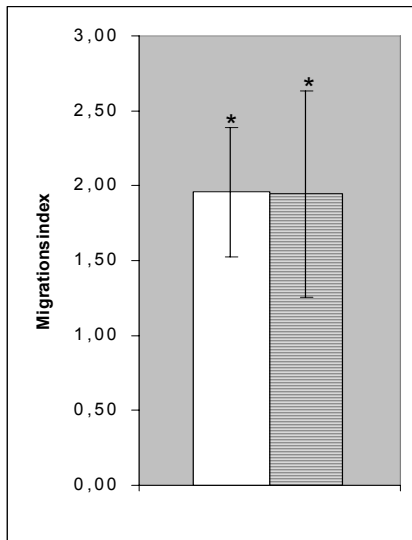


Abb. 11. Die migrationsfördernde Wirkung (5 h Migrationsdauer) der Positivkontrolle TGF-β1 (1 ng/ml, weiße Säule) konnte durch eine Kostimulation zusammen mit dem spezifischen Opioidrezeptorantagonisten Naloxon (1 μM, graue Säule) nicht gehemmt werden. Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen; * $p \leq 0,05$, bezogen auf Kontrolle (basale Migration).

Die verschiedenen Opioide unterschieden sich dabei kaum in ihrer Wirkstärke, die Migrationsförderung war bei Morphin, Hydromorphon und Fentanyl ähnlich stark, allein Buprenorphin wies eine leicht (nicht signifikant) geringere Förderung der HaCaT Migration auf (Abb. 10).

Die Kostimulation der Zellen mit TGF-β1 und Morphin führte zu keiner weiteren Steigerung der Zellmigration (Migrationsindex bei alleiniger TGF-β1-Zugabe $2,11 \pm 0,51$ vs. $2,25 \pm 0,62$ bei TGF-β1/Morphin-Kostimulation; Daten hier nicht dargestellt). Daher sollte mit TGF-β1 (1 ng/ml) bzw. den Opioiden in einer Konzentration von 100 nM das Testsystem maximal stimuliert sein.

Um für den weiteren Verlauf der Arbeit die Vergleichbarkeit der mit HaCaT Zellen erzeugten Ergebnisse mit der Wirkung auf normale humane Keratinozyten (NHK) zu gewährleisten, wurde zunächst sichergestellt, dass die beiden Zellarten auch tatsächlich in gleicher Weise auf Opioide reagieren. Es konnte gezeigt werden, dass NHK auf eine Stimulation mit Morphin nahezu identisch - also mit einer konzentrationsabhängig gesteigerten und durch Naloxon blockierbaren Zellmigration - reagieren (Ergebnisse hier nicht dargestellt). Für die folgenden Migrationsversuche wurde daher weiterhin auf die leichter zu handhabende HaCaT Zelllinie zurückgegriffen.

4.1.1 Unterscheidung chemotaktischer – chemokinetischer Effekt

Man unterscheidet bei migrationsfördernden Substanzen zwischen denen, die einen chemotaktischen Effekt besitzen, also die Zellen gradientenabhängig zum Applikationsort „anlocken“ und denen, die chemokinetisch wirken, die also die ungerichtete Zellmigration

fördern. Die Unterscheidung dieser beiden Mechanismen ist mithilfe eines speziellen Aufbaus des Migrationsassays möglich. Für diese Tests wurde die Substanz bei einem Teil der Vertiefungen - wie gehabt - nur der unteren Kammer zugegeben, somit also ein Gradient aufgebaut. Parallel dazu wurde in einem anderen Teil der Vertiefungen der Gradient dadurch aufgehoben, dass obere und untere Kammer die Substanz in derselben Konzentration enthielten. Wie in Abb. 12 zu sehen, war im Versuchsaufbau ohne Opioidgradienten die Stimulation der Zellwanderung durch Morphin, Hydromorphon und Fentanyl aufgehoben (Migrationsindex nach Aufhebung der Gradienten: etwa 1). Bei Buprenorphin allerdings, dem Stoff mit partialagonistischer Wirkkomponente, konnte auch ohne Gradient eine leichte - jedoch signifikante - Stimulation der Zellmigration beobachtet werden (Migrationsindex ohne Gradient $1,61 \pm 0,21$; nach Gradientenaufhebung $1,26 \pm 0,20$).

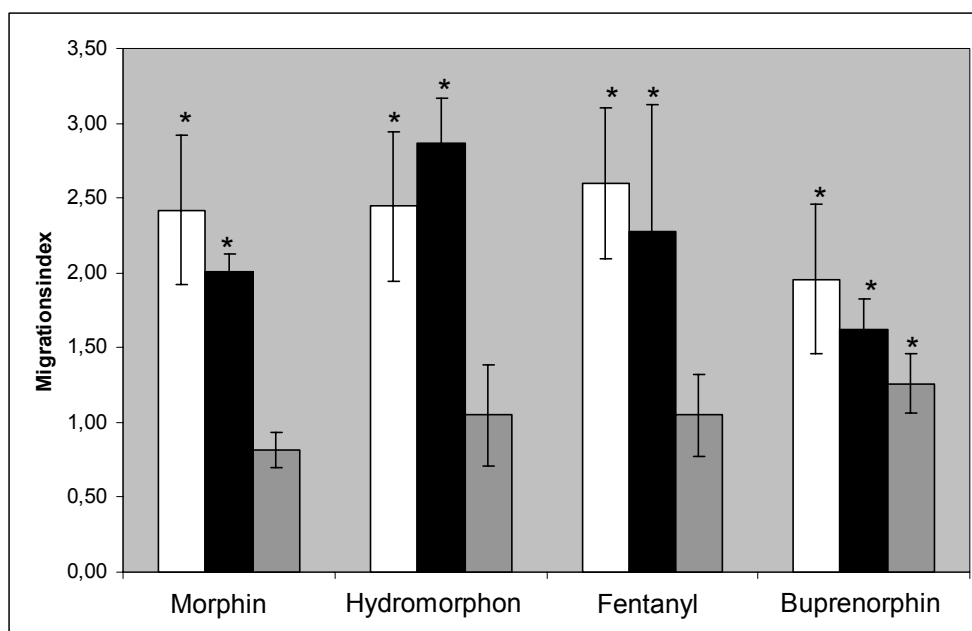


Abb. 12. Unterscheidung zwischen chemotaktischer und chemokinetischer Wirkung der Opiode. Neben der Positivkontrolle TGF-β1 (1 ng/ml, weiße Säulen) wurden die Opiode (100 nM) jeweils einmal mit Gradient (schwarze Säulen) und einmal ohne Gradient (graue Säulen) eingesetzt. Nach Aufhebung der Gradienten wirkten Morphin, Hydromorphon und Fentanyl nicht mehr migrationsfördernd, der Partialagonist Buprenorphin hingegen förderte die Zellwanderung auch ohne Gradient leicht. Ergebnisse stammen aus jeweils mindestens 3 unabhängigen Versuchen; * $p \leq 0,05$ gegen unbehandelte Kontrolle.

Auch mit dem als Positivkontrolle verwendeten transformierenden Wachstumsfaktor β1 wurden die eben beschriebenen Versuche noch einmal gesondert durchgeführt. Es zeigte sich hier, dass TGF-β1 sowohl mit als auch ohne Gradient die Wanderung der HaCaT Zellen zu stimulieren vermag (siehe Abb. 13; Migrationsindex mit Gradient $1,96 \pm 0,41$; ohne Gradient $2,07 \pm 0,46$).

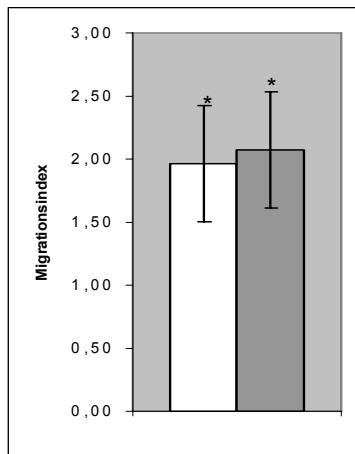


Abb. 13. Unterscheidung zwischen chemotaktischer und chemokinetischer Wirkung von TGF-β1 (1 ng/ml). Die Substanz wurde bei einem Teil der Wells nur in der unteren Kammer appliziert (Gradient, weiße Säule), beim zweiten Teil der Wells auch in der oberen (kein Gradient, graue Säule). Bei beiden Bedingungen wurde eine gleich intensive Migrationsförderung beobachtet. Ergebnisse stammen aus 3 unabhängigen Experimenten; * $p \leq 0,05$ bezogen auf unbehandelte Kontrolle.

Die Versuche, die den Unterschied zwischen chemotaktischem und chemokinetischem Morphineffekt klären sollten, wurden außerdem ein zweites Mal durchgeführt, wobei dann eine Migrationszeit von 24 h anstelle der üblichen Migrationszeit von 5 h eingesetzt wurde. Nach dieser längeren Migrationsdauer war der Morphineffekt sowohl mit als auch ohne Gradient sichtbar (Abb. 14) und in beiden Fällen gleich stark ausgeprägt.

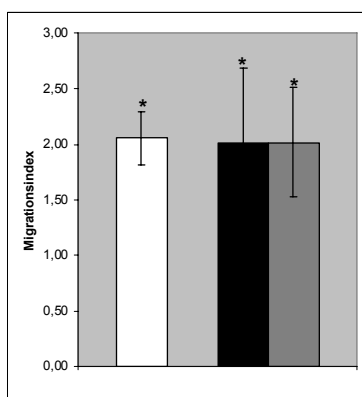


Abb. 14. Effekt von Morphin auf die HaCaT Zellmigration bei einer Migrationsdauer von 24 h. Positivkontrolle TGF-β1 (1 ng/ml, weiße Säule); Morphin (100 nM) mit Gradient (schwarze Säule) und ohne Gradient (graue Säule). Der migrationsfördernde Effekt von Morphin war bei 24-stündiger Migration mit und ohne Gradient etwa gleich stark ausgeprägt.

4.1.2 Migrationsassays im sauren Milieu

Aufgrund der Tatsache, dass im Falle einer Entzündungsreaktion immer mit einem leichten Abfall des pH-Wertes im Gewebe gerechnet werden muss, war es wichtig zu prüfen, ob Opiode die Wanderung der Keratinozyten auch in saurer Umgebung forcieren können. Deshalb wurden die Versuche unter Verwendung eines zuvor leicht angesäuerten (pH 6,5) Mediums wiederholt. Auch hier konnte bei einer Expositionszeit von 5 h im sauren Milieu mit allen Testsubstanzen eine signifikante Steigerung der Zellmigration erzielt werden, die jedoch bei Morphin, Hydromorphon und vor allem bei Fentanyl weniger stark ausgeprägt war als bei den Versuchen mit physiologischem pH (siehe Abb. 15). Wie in Abb. 15 zu sehen, wurde bei der Verwendung von Fentanyl im sauren Milieu ein deutlicher Wirkungsverlust im Vergleich zum physiologischen Zustand beobachtet (Migrationsindex $2,56 \pm 0,47$ bei pH 7,4

vs. $1,40 \pm 0,06$ bei pH 6,5). Buprenorphin hingegen zeigte keine Minderung seiner Wirkstärke nach pH-Senkung (Migrationsindex $1,68 \pm 0,29$ bei pH 7,4 vs. $1,69 \pm 0,22$ bei pH 6,5).

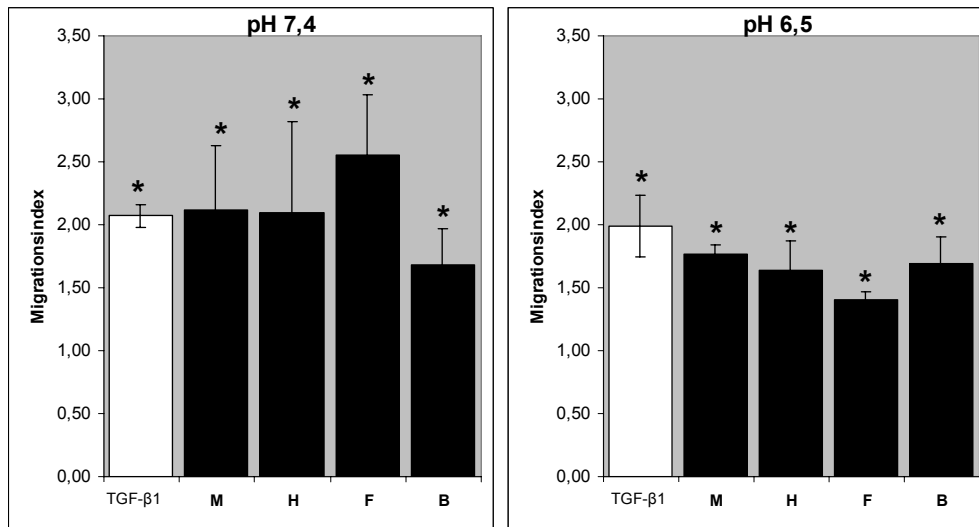


Abb. 15. Vergleich der migrationsfördernden Wirkung der Opiode (100 nM, schwarze Säulen) unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4; links) mit der in saurer Umgebung (pH 6,5; rechts). Positivkontrolle TGF-β1 (1 ng/ml; weiße Säulen); M, Morphin; H, Hydromorphon; F, Fentanyl; B, Buprenorphin; Ergebnisse stammen aus 4 unabhängigen Experimenten; * $p \leq 0,05$ bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.

Da sich bei den bisher gezeigten Ergebnissen die verschiedenen Opiode hinsichtlich ihres Einflusses auf die *in vitro* Zellmigration kaum unterschieden, wurde für die folgenden Versuche Morphin stellvertretend für die Klasse der Opiode verwendet.

4.1.3 Einfluss von Morphin auf die NO-Produktion in HaCaT Zellen

Der Prozess der Wundheilung wurde bereits mit einer funktionsfähigen NO-Synthase in Verbindung gebracht (Lee et al., 1999; Yamasaki et al., 1998), weshalb auch hier geklärt werden sollte, ob eine verbesserte Zellmigration unter Opioiden Folge einer erhöhten NO-Produktion der Keratinozyten sein könnte. Der sogenannte Griess-Assay stellt eine Möglichkeit dar, die Produktion und Sekretion von Stickstoffmonoxid von Zellen zu untersuchen. Nach 24-stündiger Morphinexposition (100 nM) wurde in der Tat im Kulturmedium der Zellen mehr Stickstoffmonoxid detektiert als bei unstimulierten Zellen (Abb. 16).

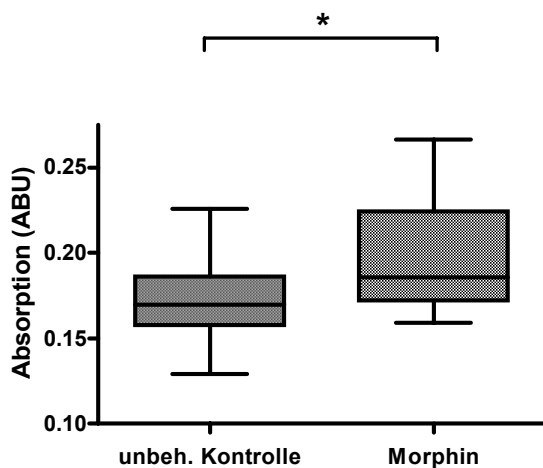


Abb. 16. Griess-Assay. Stimulation mit Morphin (100 nM, für 24 h) erhöhte den Gehalt an NO im Kulturmedium der HaCaT Zellen signifikant; Darstellung als Box Plot, * $p \leq 0,05$; $n = 3$.

Semiquantitative real-time PCR

Mithilfe der quantitativen real-time-Polymerasekettenreaktion wurde im Folgenden untersucht, ob der erhöhte Gehalt an Stickstoffmonoxid im Zellmedium auf eine gesteigerte Expressionsrate einer NO-Synthase (induzierbare: iNOS; endotheliale: eNOS; neuronale: nNOS) zurückzuführen ist.

Außerdem sollte geklärt werden, ob durch Morphinstimulation HaCaT Zellen auch Mitglieder der Enzymfamilie der Matrix-Metalloproteinasen (MMP-1, MMP-2, MMP-9) verstärkt exprimieren. Eine veränderte Genexpression wurde nach Stimulation mit Morphin 100 nM bis 10 μ M für keines der untersuchten Gene nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

4.1.4 Zellviabilitätsuntersuchungen: MTT-Assay

Mithilfe des MTT-Assays lassen sich Voraussagen über die zellschädigende Wirkung von Substanzen treffen (zur Durchführung siehe 3.7). Es sollte hier geklärt werden, ob nach topischer Applikation von Opioiden mit einer Beeinträchtigung der Keratinozyten-Viabilität gerechnet werden muss. Die Versuche wurden zunächst mit der Zelllinie HaCaT durchgeführt sowie unter Verwendung normaler humaner Keratinozyten verifiziert. Wie in Tab. 7 zu sehen, wurden weder HaCaT Zellen noch die primären Keratinozyten durch Morphinexposition für 48 h in ihrer Viabilität nennenswert gehemmt. Die minimale Viabilitätsrate lag bei 90,55%, weshalb Morphin als nicht zellschädigende Substanz eingestuft werden kann.

Tab. 7. Zellviabilität von HaCaT Zellen und NHK nach Morphinstimulation für 48 h. Ergebnisse aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten. Die Zellviabilität wurde auch bei höchster Morphinkonzentration nicht beeinträchtigt.

<i>Morphin-Konz.</i>	<i>Viabilität HaCaT [%]</i>	<i>Viabilität NHK [%]</i>
<i>Kontrolle</i>	100	100
<i>100 μM</i>	94,52 \pm 3,76	90,55 \pm 7,34
<i>10 μM</i>	97,40 \pm 3,75	93,30 \pm 13,77
<i>1 μM</i>	102,36 \pm 4,24	104,51 \pm 34,49

4.2 Wundheilungsuntersuchung mittels Scratch-Test

Eine weitere Möglichkeit der Untersuchung des Einflusses verschiedener Substanzen auf die Wundheilung bietet der sogenannte Scratch-Test. Nach Induktion einer „Wunde“ in einem Zellmonolayer wird dabei beobachtet, wie gut die Zellen in der Lage sind, diese Wunde zu verschließen (zur Versuchsdurchführung siehe 3.3). Wurde dem Medium TGF- β 1 oder Morphin zugegeben, so konnten die HaCaT Zellen die Wunde binnen 48 Stunden Inkubationszeit deutlich besser verschließen als dies ohne migrationsfördernde Zusätze („unbehandelte Kontrolle“) der Fall war (Abb. 17).

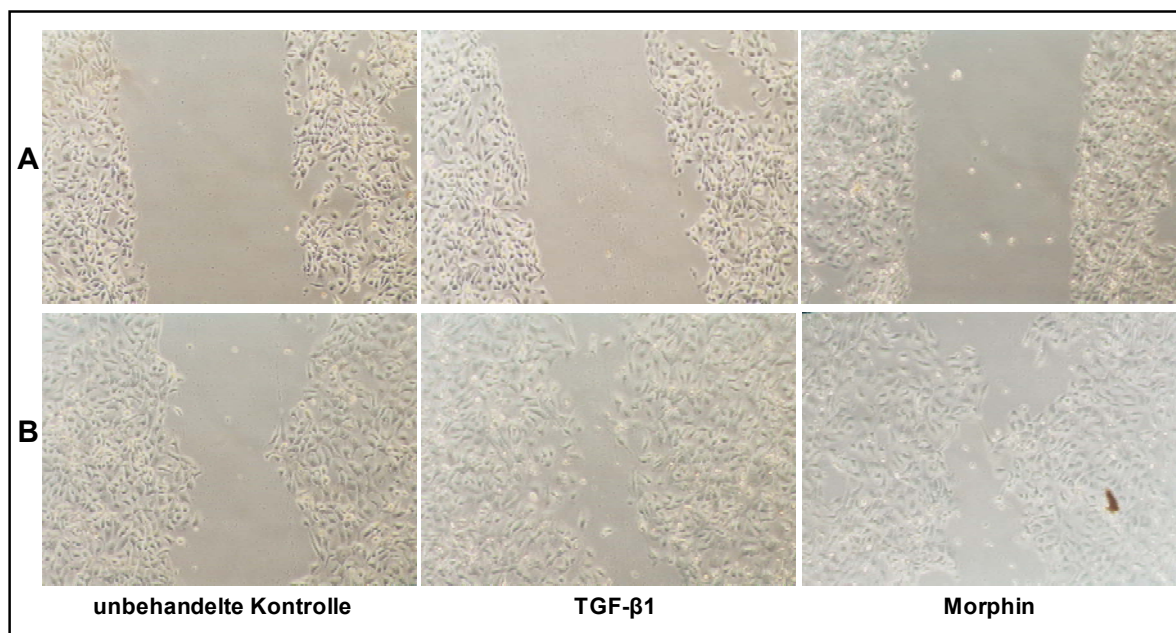


Abb. 17. Scratch-Test. Nach Induktion der Wunde im Monolayer wurde dem Medium entweder keine Substanz (unbehandelte Kontrolle), TGF- β 1 (1 ng/ml) oder Morphin (100 nM) zugegeben. Die Zellen wurden unmittelbar nach dem Scratch (A) und nach einer Heilungszeit von 48 h (B) an identischen Stellen des Monolayers fotografiert. TGF- β 1 und Morphin verbesserte die Wundheilung. Das Experiment wurde zweimal wiederholt wobei ähnliche Ergebnisse erhalten wurden.

4.3 Wundheilungsuntersuchungen am Vollhautmodell

Besser als Keratinozytenmonolayer reflektiert die Situation normaler Haut ein Vollhautmodell, das aus einer Dermis aufgebaut ist, der eine Epidermis mit mehreren Schichten von Keratinozyten aufliegt, deren obere Schichten zu Korneozyten ausdifferenziert sind (Abb. 18 E).

Etablierung der Lasermethode zur Wundinduktion. Zunächst sollte eine Methode etabliert werden, die es erlaubt, am Vollhautmodell eine standardisierte Wunde zu induzieren, die reproduzierbar in ihrer Tiefe und Größe ist, und noch eine ausreichende Menge an gesundem Gewebe übrig lässt, sodass eine von gesunden Zellen ausgehende Heilung möglich ist. Dazu wurde mit einem CO₂-Laser in einer speziellen Haltevorrichtung Programm-gesteuert eine spiralförmige Figur definierten Durchmessers abgefahren. Dies erlaubte ein kreisrundes Abtragen von Gewebe. Die Tiefe der induzierten Wunde wurde durch die Anzahl der Laservorgänge über ein und derselben Stelle variiert (siehe 3.4) und im Anschluss durch histologische Untersuchung bestimmt.

Bei einer viermaligen Wiederholung des Laservorgangs wurde zwar die Hornhaut und oberflächliche Epidermis leicht geschädigt (Abb. 18, A und B), die induzierte Wunde erreichte jedoch noch nicht die gewünschte Tiefe. Bei siebenmaliger Wiederholung (Abb. 18, C und D) konnte hingegen die Epidermis im Bestrahlungsareal nahezu vollständig abgetragen werden, während am Rand der Wunde ausreichend gesundes Gewebe verblieb. Am Wundgrund waren noch Reste von Keratinozyten vorhanden, von welchen aus die Heilung der Wunde ausgehen konnte. Das unbehandelte Vollhautmodell zeigt Abb. 18 E. Aufgrund der eben beschriebenen Ergebnisse wurde für die nun folgenden Wundheilungsversuche die siebenmalige Wiederholung des Laserns als am besten geeignet zur Wundinduktion ausgewählt.

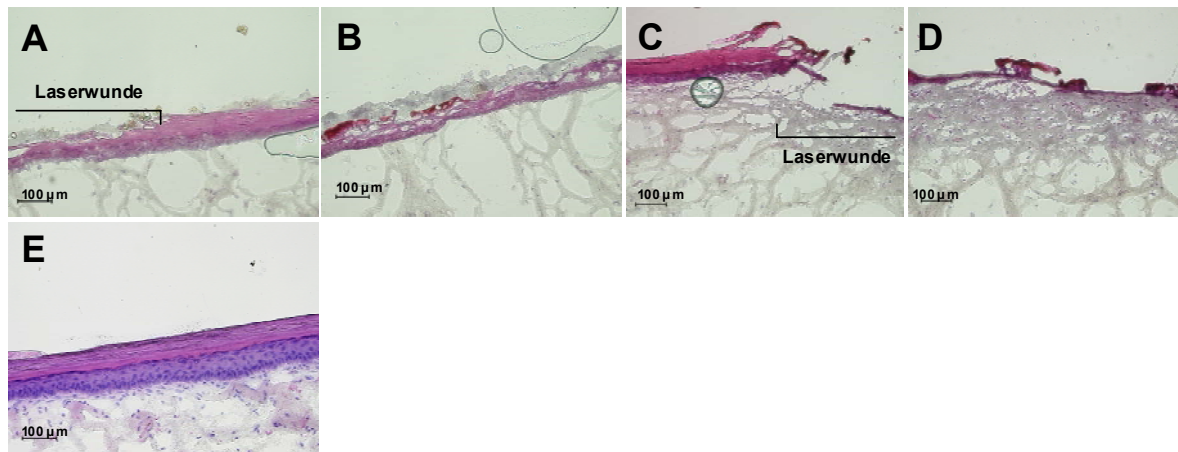


Abb. 18. Histologie der Vollhautmodelle MatTek EFT-400 nach dem Lasern. Mit 4-maligem Lasern (A: Wundrand, B: Wundgrund) konnte die Hornschicht nur partiell, mit 7-maligem Lasern (C: Wundrand, D: Wundgrund) fast vollständig abgetragen werden. Lediglich Reste von Keratinozyten sind im Zentrum der Wunde zu sehen. E: Histologie des unbehandelten Hautmodells EFT-400.

Verfolgung der Wundheilung am Vollhautmodell. Das EFT-400 Hautmodell und das Protokoll der Laser-induzierten, standardisierten Wunde wurden im Folgenden zur Untersuchung des Einflusses von Morphin auf die Wundheilung von Vollhautmodellen eingesetzt. Getestet wurde zunächst der Einfluss der auch bei den 2D-Experimenten verwendeten Morphinlösung. Die histologische Auswertung der Gewebeschnitte nach vier Tagen zeigte, dass beide verwendeten Morphinkonzentrationen die Reepithelialisierung des Wundgrundes förderten (Abb. 19). Ein deutlich dichter und besser ausgeprägter Saum neugebildeter Keratinozyten auf dem Wundgrund war nach Benetzung der Wunde mit reiner Morphinlösung (10 µM und 100 nM) während der Heilungsperiode erkennbar im Vergleich zur mit reinem PBS (mit 0,4% BSA) behandelten Negativkontrolle. Die Versuche wurden dreimal an drei unterschiedlichen Chargen der Vollhautmodelle durchgeführt (in der Abb.: Versuch A, B, C), wobei stets ähnliche Ergebnisse erhalten wurden.

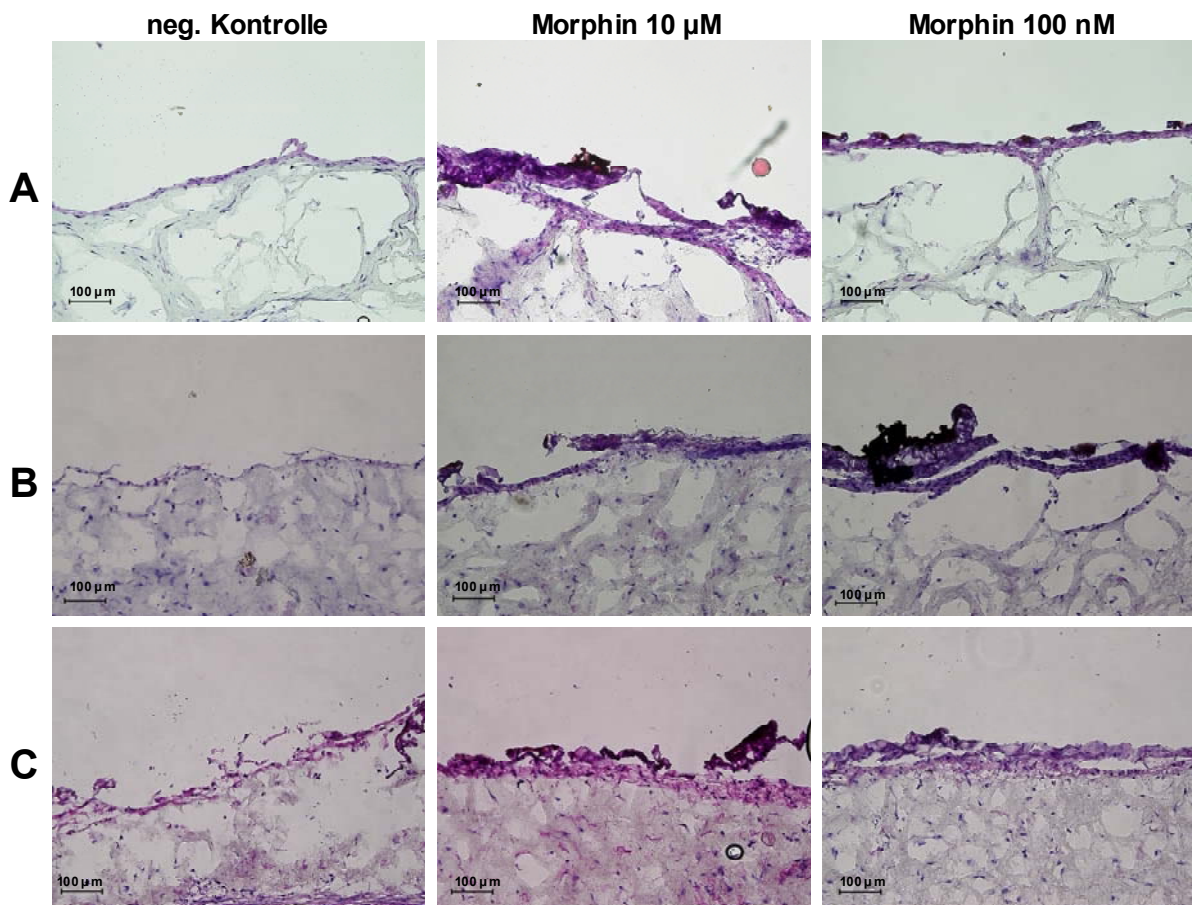


Abb. 19. Histologie der gelaserten Haut nach vier Tagen Heilung. Ergebnisse von drei unabhängigen Chargen bzw. Experimenten (A, B, C). Häute wurden entweder mit reiner PBS (0,4% BSA)-Lösung benetzt (neg. Kontrolle) oder mit in PBS (0,4% BSA) gelöstem Morphin (10 µM und 100 nM). Die mit Morphin behandelten Wunden zeigten nach vier Tagen eine deutlich besser ausgeprägte Keratinozyten-Neubildung auf dem Wundgrund.

4.4 Träger für Opioide

Letztendliches Ziel des Projektes soll es sein, eine langsam und kontinuierlich freisetzende Formulierung zu finden, die eine topische Applikation von Opioiden auf der Haut zulässt. In den bisher beschriebenen Versuchen wurde untersucht, ob mit einer Störung der Wundheilung durch Opioide zu rechnen ist. Diese konnte ausgeschlossen werden. Darüber hinaus darf auch keine Interferenz der in Frage kommenden Partikel mit dem Heilungsprozess erfolgen. Deswegen wurden im Folgenden zwei Trägersysteme - solid lipid nanoparticles (SLN) und dendritic core-multishell (CMS) Nanotransporter - in unbeladenem Zustand auf ihren Einfluss auf die Zellmigration hin untersucht.

4.4.1 Partikelcharakterisierung

Die charakteristischen Eigenschaften der verwendeten unbeladenen und Morphin-beladenen Nanopartikel sind in Tab. 8 dargestellt. Die Partikel erwiesen sich über den gemessenen Zeitraum von 30 Tagen als stabil.

Tab. 8. Eigenschaften von SLN und CMS Nanotransportern.

<i>Morphinkonzentration</i>	<i>Größe</i>	<i>Polydispersionsindex (PI)</i>
SLN:		
<i>Kontrolle (unbeladen)</i>	150 - 170 nm	≤ 0,250
<i>2,5 mg</i>	180 - 200 nm	≤ 0,250
<i>5 mg</i>	180 - 200 nm	≤ 0,250
CMS (unbeladen)	20 - 30 nm	≤ 0,250

4.4.2 Interaktionen von Morphin mit unbeladenen Trägermolekülen

Mittels Polarographischer Spektroskopie wurden Interaktionen der unbeladenen Träger mit der Substanz Morphin untersucht. Im Vergleich zur reinen Morphinhydrochloridlösung (Morphin gelöst in 0,4% BSA in PBS, Spalte 4 in Tab 9) zeigte sich bei den Proben, bei denen die Morphinhydrochloridlösung mit den Dispersionen der unbeladenen Transporter gemischt wurden (Spalten 5 und 6) ein deutlicher Unterschied hinsichtlich Dipoldichte und -mobilität. Vergleicht man zu Beginn die Werte für Dipoldichte und -mobilität der Träger (Spalten 2 und 3) mit denen des reinen Lösungsmittels (0,4% BSA in PBS, Spalte 1), so sind zunächst ein Anstieg der Dipoldichte sowie eine Abnahme der Dipolmobilität zu verzeichnen. Dies ist ein auch anschaulich zu erwartender Zusammenhang. Sehr gut in Übereinstimmung sind auch die gemessenen Zusammenhänge zwischen den mittleren Teilchendurchmessern und den zugehörigen Beweglichkeiten mit den Vorhersagen; die Einstein-Debye-Relation zwischen Teilchenradius r und Beweglichkeit f_0 fordert eine überproportionale Zunahme von f_0 mit dem Kehrwert $1/r$. Ein Widerspruch zwischen beinahe gleichen Dipoldichten der Träger SLN bzw. CMS Nanotransporter trotz unterschiedlicher Teilchenradien (siehe Tab. 8) bzw. -beweglichkeiten (Tab. 9) ist nicht gegeben, da über die einzelnen Dipolmomente der Träger nichts bekannt ist. Diese Aussage gilt auch für die Morphinhydrochloridmoleküle, bei denen eine sehr hohe Dipoldichte von $9,00 \times 10^5$ gemessen wurde. Interessanter ist die Betrachtung des umgekehrten Effektes, wie durch Vergleich der Spalten 4 - 6 augenfällig: Die hohe Dipoldichte der Morphinhydrochloridlösung (Spalte 4) wurde durch die Mischung mit den unbeladenen Partikeln (Spalten 5 und 6) vermindert. Dies deutet auf eine Interaktion

des Morphinhydrochlorids mit beiden Trägersystemen hin, was einerseits ein Anheften auf deren Oberfläche sein könnte, andererseits aber auch eine Inkorporation des Morphins in die Partikelmatrix. Aus der Zunahme des mittleren Teilchendurchmessers der SLN (siehe Tab. 8) von durchschnittlich 160 nm auf durchschnittlich 190 nm nach Beladung mit steigender Konzentration von Morphin muss geschlossen werden, dass die Sättigung in der Beladung bereits unterhalb der Konzentration von 2,5 mg Morphin stattfindet.

Tab. 9. Ergebnisse der Messungen der Parelektrischen Spektroskopie. Lösungsmittel PBS/0,4% BSA; $\Delta\epsilon$, Dipoldichte; f_0 , Dipolmobilität; Standardabweichung: $\pm 0,005$ für Messungen der Dipolmobilität bzw. $\pm 0,05$ für Dipoldichtemessungen in allen Formulierungen.

	<i>PBS/0,4% BSA</i>	<i>SLN- Dispersion</i>	<i>CMS- Dispersion</i>	<i>Morphin- Lösung</i>	<i>Mischung: Morphin- lösg. + SLN-Disp.</i>	<i>Mischung: Morphin- lösg. + CMS-Disp.</i>
$10^5 \Delta\epsilon$	1,60	1,85	2,12	9,00	3,60	3,35
f_0 / MHz	0,160	0,127	0,114	0,030	0,086	0,072

4.4.3 Einfluss unbeladener Trägerpartikel auf die Zellmigration

Der Einfluss der unbeladenen Partikel auf die Wundheilung wurde zunächst im 2D-Migrationsassay untersucht. Abb. 20 zeigt, dass unbeladene SLN die Wanderung der HaCaT Zellen ebenso stark fördern (Migrationsindex $2,16 \pm 0,39$) wie TGF- β 1. Die CMS Nanotransporter hingegen wiesen diese Fähigkeit zwar nicht auf, jedoch führten sie zumindest auch nicht zu einer Hemmung der Zellmigration (Migrationsindex $0,99 \pm 0,29$).

Wurden die Nanopartikel zusammen mit TGF- β 1 appliziert, nahm im Falle der SLN die Migration im Vergleich zur alleinigen TGF- β 1-Verwendung weiter zu (Migrationsindex $2,61 \pm 0,37$ bei Doppel- vs. $1,77 \pm 0,30$ bei TGF- β 1-Einzelapplikation). Dies war bei Koinkubation mit CMS Nanotransportern nicht der Fall, vielmehr wurde der TGF- β 1-Effekt durch die Nanotransporter gemindert (Migrationsindex $1,59 \pm 0,17$ bei Koinkubation vs. $2,27 \pm 0,19$ bei alleiniger TGF- β 1-Exposition). Betrachtet man den Effekt, den eine Koinkubation von Nanopartikeln zusammen mit Morphin erzielte, so entsprach bei SLN und Morphin die Migrationsförderung derjenigen von Morphin (100 nM) allein (Migrationsindex $2,10 \pm 0,37$), wohingegen CMS Nanotransporter den migrationsfördernden Morphineffekt reduzierten (Migrationsindex $1,53 \pm 0,04$). Im Hinblick auf die Ergebnisse, die die Parelektrische Spektroskopie lieferte ist dies auch durchaus schlüssig zu erklären, da mittels PS gezeigt werden konnte, dass eine Interaktion von Morphin mit beiden Partikelsystemen stattfindet. So ist bei einer Koinkubation von Partikeln und Morphin weniger freies Morphin in

Lösung verfügbar. Die trotzdem gleichbleibend starke Migrationsförderung bei SLN- und Morphin-Koinkubation ist auf den positiven Effekt der unbeladenen SLN selbst zurückzuführen. Koinkubation von CMS Nanotransportern und Morphin hingegen reduzierte den Morphineffekt wegen Aufnahme des Morphins in die Matrix der CMS Nanotransporter, die in unbeladenem Zustand keine eigene Migrationsförderung hervorrufen konnten.

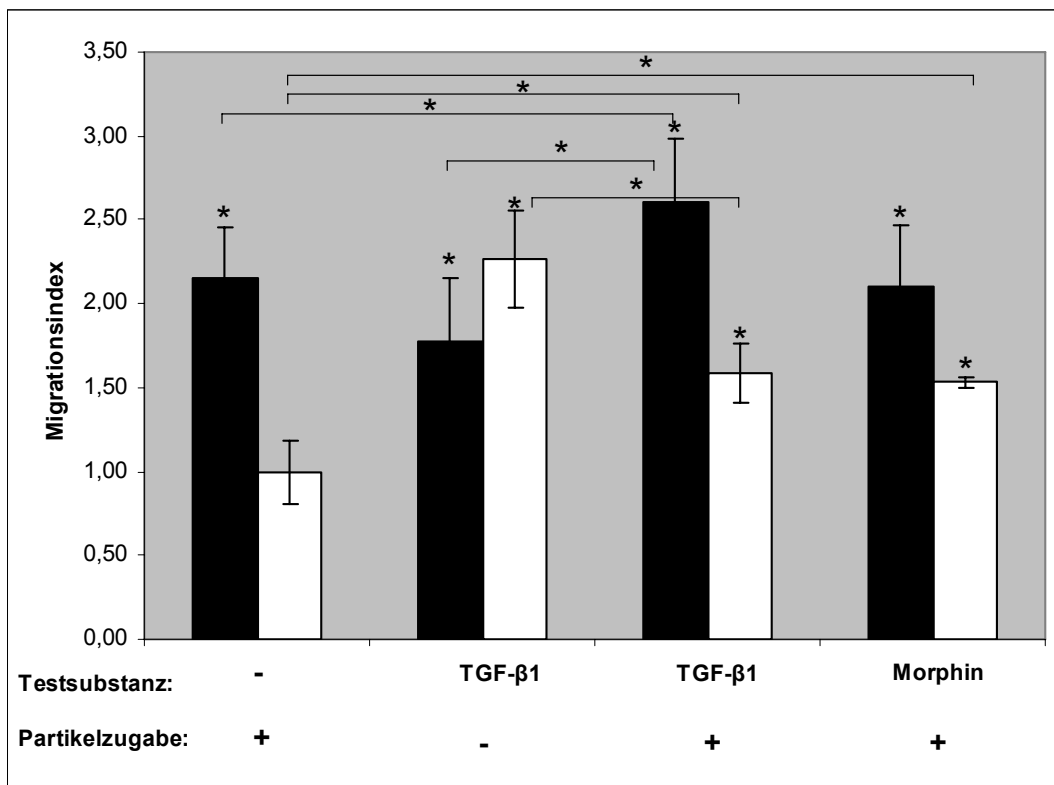


Abb. 20. Einfluss unbeladener Trägersysteme (jeweils 40 μ l; SLN, Verdünnung: 1:12,5, schwarze Säulen; CMS, Verdünnung: 1:12,5, weiße Säulen) auf die HaCaT Migration. Partikelsuspensionen wurden direkt zur Zellsuspension gegeben, Testsubstanzen (TGF- β 1, 1 ng/ml bzw. Morphin 100 nM) in die untere Kammer. SLN förderten die Zellmigration, CMS Nanotransporter zeigten diesen Effekt nicht. Doppelapplikation von TGF- β 1 zusammen mit Partikeln konnte den TGF- β 1-Effekt im Falle von SLN noch weiter steigern, CMS Nanotransporter hemmten die TGF- β 1-induzierte Zellwanderung. Die durch Morphin hervorgerufene Migration wurde bei zusätzlicher SLN-Zugabe nicht beeinflusst, CMS Nanotransporter hingegen verminderten den Index. Ergebnisse von 4 unabhängigen Experimenten. * $p \leq 0,05$ gegenüber Basalwert bzw. Gruppenvergleich wie angegeben.

4.4.4 Einfluss Morphin-beladener SLN auf die 3D-Wundheilung

Die mit der Morphinlösung durchgeführten Versuche zur Beeinflussung der Wundheilung im 3D-Modell wurden auch mit unbeladenen sowie mit Morphin-beladenen SLN durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass unbeladene SLN - ähnlich wie im 2D-Modell - die Reepithelialisierung des Wundgrundes beschleunigten (Abb. 21). Die neugebildete

Keratinozytenschicht war deutlich besser ausgeprägt als bei der unbehandelten Kontrolle (Kontrolle siehe Abb. 19). Gleiches gilt für die Applikation Morphin-beladener SLN auf die Laser-induzierten Wunden der Vollhautmodelle. Auch hier wurde eine verbesserte Wundheilung, sichtbar an der höheren Anzahl vitaler Keratinozyten, mithilfe der SLN-Applikation herbeigeführt. Ein Konzentrationseffekt konnte jedoch nicht festgestellt werden.

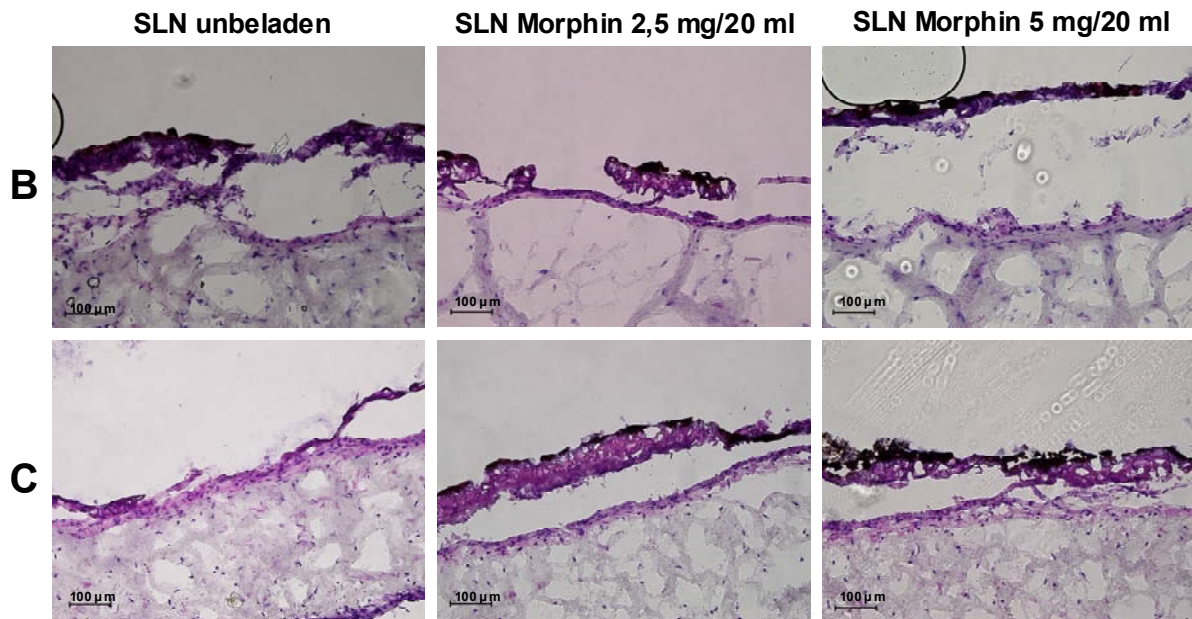


Abb. 21. Histologie der gelaserten Haut nach vier Tagen Heilung. Ergebnisse von 2 unabhängigen Chargen bzw. Experimenten (B, C). Häute wurden entweder mit reiner PBS(0,4% BSA)-Lösung benetzt (unbehandelte Kontrollen: siehe Abb. 19), oder mit Dispersionen Morphin-beladener oder unbeladener SLN. Die Konzentrationen 2,5 bzw. 5 mg/20 ml entsprechen dabei Konzentrationen von 370 bzw. 740 µM einer reinen Morphinlösung. Die mit SLN-Dispersionen behandelten Wunden zeigten nach vier Tagen eine deutlich besser ausgeprägte Keratinozytenneubildung auf dem Wundgrund.

4.5 Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

4.5.1 Entwicklung einer Methode zur Detektion von Morphin und seiner Metabolite

Im weiteren Verlauf des Forschungsvorhabens sollen die Penetration und Permeation von Morphin in gesunder und verletzter Haut untersucht werden. Des Weiteren soll geklärt werden, ob und in welchem Umfang Morphin von Keratinozyten und Fibroblasten metabolisiert wird. Für diesen Zweck sollte eine HPLC-Methode etabliert werden, welche die Detektion und Quantifizierung von Morphin sowie seiner beiden Hauptmetabolite Morphin-3- und Morphin-6-Glucuronid erlaubt. Eine veröffentlichte isokratische Methode (Chari et al., 1991) wurde schrittweise weiterentwickelt, bis schließlich mit einer Gradientenmethode eine

ausreichend gute und reproduzierbare Trennung der Stoffe Morphin, Morphin-3-Glucuronid, Morphin-6-Glucuronid und dem internen Standard Codein gewährleistet war (siehe Abb. 22, entsprechende Retentionszeiten siehe Tab. 10). Die Trennung erfolgte auf der C8 Reversed Phase Säule LiChroCART® 250-4 RP-8 (5 µm) und mit den Laufmitteln 0,05 M Kaliumphosphatpuffer (A) und Acetonitril (B, zum Gradientenablauf siehe 3.10).

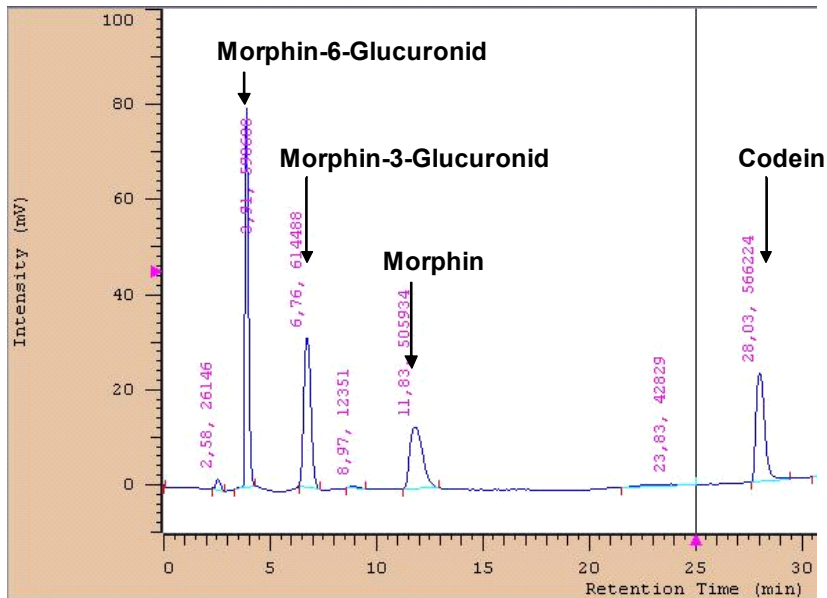


Abb. 22. Repräsentative Trennung von Morphin, den beiden Metaboliten und Codein (alle 10 µM). Detektion bei 210 nm.

Tab. 10. Mittlere Retentionszeiten von Morphin, Morphin-3-Glucuronid, Morphin-6-Glucuronid und Codein (interner Standard). Die Daten stammen aus 3 unabhängigen Versuchen.

Substanz	mittlere Retentionszeit [min]
Morphin	11,57 ± 1,37
Morphin-3-Glucuronid	6,96 ± 0,75
Morphin-6-Glucuronid	3,74 ± 0,17
Codein	27,64 ± 0,79

4.5.2 Validierung der Methode für Morphin und Codein

Die Methode wurde zunächst für Morphin und den internen Standard Codein getrennt validiert (Daten nicht gezeigt), dann wurden die Substanzen gemeinsam eingespritzt und es erfolgte die Prävalidierung der Methode. Morphinlösungen aufsteigender Konzentrationen wurden mit der konstanten Menge des internen Standards Codein (10 µM) versehen. Die minimale detektierbare Morphinkonzentration betrug 0,5 µM (siehe Abb. 23).

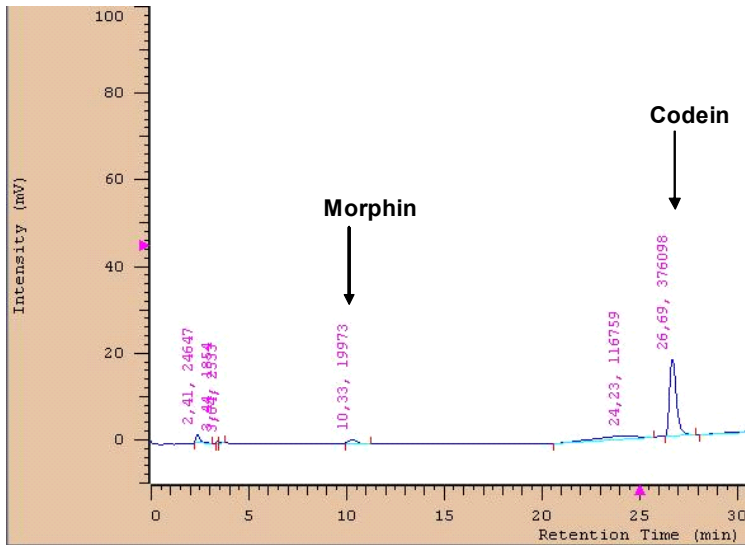


Abb. 23. Repräsentatives Chromatogramm für die Validierung der Methode zur Detektion von Morphin (hier 0.5 µM) zusammen mit dem internen Standard Codein (10 µM).

Bei der Auswertung wurde die Linearität der Quotienten aus den Peakflächen der Morphin- und der Codeinpeaks untersucht. Ein exemplarisches Chromatogramm ist in Abb. 24 dargestellt. Die mittleren Retentionszeiten der beiden Stoffe bei der Methodvalidierung sind in Tab. 11 dargestellt. Zur Prävalidierung wurde die Konzentrationsreihe an 4 Tagen unabhängig voneinander eingespritzt, nach dem zweiten Durchlauf erfolgte eine Neueinwaage der Substanzen. Alle dabei resultierenden Einzelgeraden wiesen einen Korrelationskoeffizienten > 0,999, demnach eine sehr gute Linearität auf (Zusammenfassung der Daten: Abb. 25), weshalb die Methode als Grundlage für eine ausführliche Validierung verwendet werden kann.

Tab. 11. Mittlere Retentionszeiten von Morphin und Codein bei Versuchen zur Methodvalidierung. Daten aus 4 unabhängigen Versuchen mit Neueinwaage der Substanzen nach Versuch 2.

Substanz	mittlere Retentionszeit [min]
Morphin	10,17 ± 1,71
Codein	26,28 ± 1,83

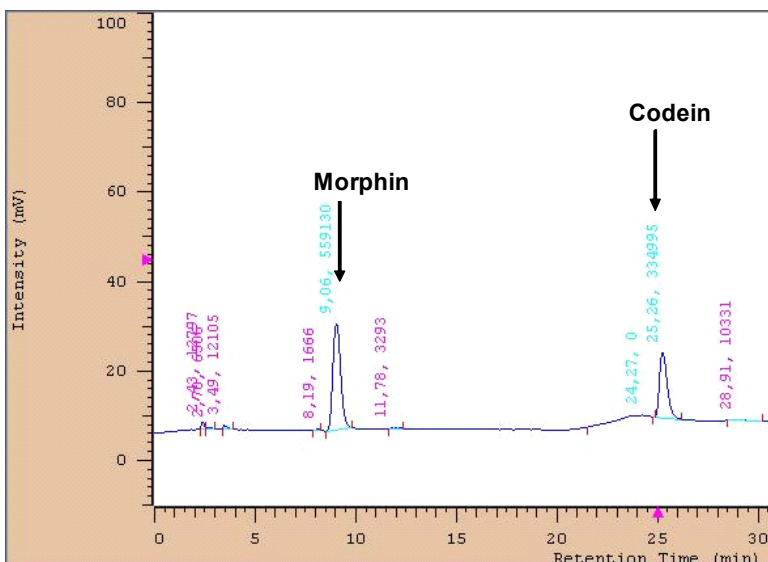


Abb. 24. Repräsentatives Chromatogramm zur Detektion von Morphin und dem internen Standard Codein (hier beide 10 µM).

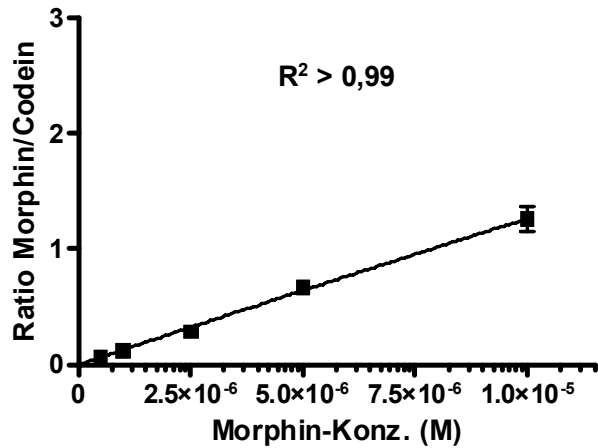


Abb. 25. Lineare Korrelation der Peakflächen von Morphin ($10 \mu\text{M}$ bis 500 nM) mit Codein als interner Standard ($10 \mu\text{M}$). Für die Erstellung der Korrelationsgeraden wurde die Konzentrationsreihe an 4 unterschiedlichen Tagen unabhängig voneinander eingespritzt.

Im weiteren Verlauf des Projektes sollen Prävalidierung respektive Validierung der Methode auch für die beiden Metaboliten Morphin-3- und Morphin-6-Glucuronid durchgeführt werden. Dies ist nicht mehr Gegenstand meines Promotionsvorhabens. Es soll dafür zunächst geklärt werden, ob Morphin überhaupt durch Hautzellen glucuronidiert wird.

5 Diskussion

Die Behandlung starker Schmerzen, welche durch Hautverletzungen wie schwere Verbrennungen und Wunden, zum Beispiel nach Entnahme von Eigenhauttransplantaten hervorgerufen werden, stellt für Ärzte immernoch eine Herausforderung dar. Es herrscht beispielsweise Uneinigkeit darüber, wie eine für den Patienten optimale Wundversorgung aussieht. Obgleich mehrere klinische Studien eine Überlegenheit des feuchten Wundverbands anstelle eines konventionellen, sowohl hinsichtlich der subjektiv wahrgenommenen Schmerzen der Patienten als auch der Infektionsrate und der Wundheilung zeigten (Wiechula, 2003), gehen die Autoren in einem aktuellen Review (Voineskos et al., 2009) nach Analyse von 75 Originalarbeiten von einem Gleichgewicht der Vor- und Nachteile der beiden Arten des Wundverbands aus.

In der effektiven Schmerzbehandlung bieten sich den Ärzten neben dem konventionellen Einsatz von Analgetika mittlerweile auch chirurgische Behandlungsmöglichkeiten. So kann eine Analgesie beispielsweise durch Blockade des Fascia Iliaca-Kompartments des Nervus Femoralis durchgeführt werden (Cuignet et al., 2004). Dennoch ist wegen des vorübergehenden Schmerzzustands eine Arzneimitteltherapie mit stark wirksamen Opioiden meist das Mittel der Wahl (Pal et al., 1997). Wegen der hohen Rate an teils schweren Nebenwirkungen bei systemischer Opioidgabe erlangte eine lokale Anwendung in dieser Indikation in den letzten Jahren immer stärkeres Interesse. Erste Erfolge wurden durch Verwendung von Opioid-haltigen Gels bzw. durch iontophoretische Applikation von Opioiden am Wirkort in mehreren klein angelegten Studien erzielt (Back & Finlay, 1995; Flock, 2003; Mattia & Coluzzi, 2007; Platzer et al., 2005; Twillman et al., 1999; Watterson et al., 2004; Zeppetella et al., 2003; Zeppetella & Ribeiro, 2005). Die Aufnahme rate des Stoffes sowie möglicherweise ein Einfluss auf den Heilungsprozess bei einer lokalen Anwendung ist jedoch weitgehend unbekannt. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Opioiden auf die Wundheilung durch Opioide untersucht werden. Nur wenn dieser Vorgang nicht wesentlich gestört wird, kann eine lokale Opioidgabe zur Schmerzbekämpfung im Gesamtmanagement sinnvoll sein. Im besten Fall könnte sogar eine Heilungsförderung eintreten. Da zudem im weiteren Verlauf des Projektes die Aufnahme und Metabolisierung von Opioiden in der Haut geklärt werden müssen, war es ein zweites Ziel der Arbeit, eine Detektions- und Quantifizierungsmethode für Morphin und seine beiden Hauptmetabolite Morphin-3- und Morphin-6-Glucuronid zu etablieren.

5.1 Wundheilungsuntersuchungen

Es sollen im Folgenden die erhaltenen Ergebnisse zur Wundheilung zunächst getrennt nach 2D- (Abschnitt 5.1.1) und 3D-Wundheilungsmodellen (Abschnitt 5.1.2) diskutiert werden und im Anschluss mit bereits veröffentlichten Daten zu Wundheilungsbeeinflussung durch Opiode verglichen werden (Abschnitt 5.1.3).

5.1.1 2D-Wundheilungsuntersuchungen

Wie bereits dargelegt ist die Wanderung von Keratinozyten während der Reepithelialisierungsphase der Wundheilung ein entscheidendes und geschwindigkeitsbestimmendes Ereignis (Baum & Arpey, 2005). Deshalb gibt die Migration von Keratinozyten in einer 2D-Zellkultur einen ersten Hinweis auf eine positive oder negative Beeinflussung der Wundheilung. Die Untersuchung des Einflusses verschiedener Opiode auf die Migration von HaCaT Zellen erfolgte zunächst mithilfe des sogenannten Migrationsassays. Die schnell wachsende Zelllinie HaCaT, welche aus humanen, spontan immortalisierten Keratinozyten hervorging, konnte anstelle der primären humanen Keratinozyten verwendet werden, da sie bezüglich ihrer Physiologie mit den NHKs vergleichbar ist (Schürer et al., 1993). Auch hinsichtlich der Migration besteht eine bereits mehrfach bestätigte Übereinstimmung zwischen den beiden Zellarten (Bartolmäs et al., 2005; Vogler et al., 2003), die durch Vorexperimente im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt wurde. Das Migrationsverhalten der immortalisierten Zelllinie unterschied sich nicht von dem der Primärzellen, weshalb für diese Arbeit meist auf die schnell proliferierende Zelllinie zurückgegriffen wurde. Als Positivkontrolle diente TGF- β 1, da dieser Wachstumsfaktor bei Keratinozyten die Expression von Fibronectinrezeptoren stimuliert (Zambruno et al., 1995) und so die Zellwanderung in Richtung der Fibronectin-beschichteten Membran im Migrationsassay fördert. Bei den Experimenten wurde durch TGF- β 1 in der Konzentration von 1 ng/ml stets etwa eine Verdopplung der Zellen in der Membran, also eine Erhöhung des Migrationsindex von 1 (unstimuliert) auf 2 erreicht (siehe Abb. 10 - 15).

Einfluss von Opioiden auf die Zellmigration

Zu Beginn der Untersuchungen sollte zunächst geklärt werden, ob relevante Unterschiede zwischen Opioiden bestehen. Deswegen wurden die Substanzen Morphin, Hydromorphon, Buprenorphin und Fentanyl für die Tests eingesetzt. Erste Versuche zeigten, dass alle vier

Opioide die HaCaT Zellmigration konzentrationsabhängig stimulierten. Allerdings erwies sich die Sensitivität des Migrationsassays als zu gering, um auf diese Weise eine klar definierte Dosis-Wirkungs-Kurve zu erhalten, weshalb für die Darstellung der Ergebnisse die beiden Konzentrationen 100 nM und 1 nM gegenübergestellt wurden (Abb. 10). Die Blockierbarkeit der Migrationsinduktion mit dem spezifischen Opioidrezeptorantagonisten Naloxon (Abb. 10) belegt zudem die spezifische Aktivierung der Opioidrezeptoren der Zellen für die Migrationsförderung. Erwartungsgemäß konnte Naloxon die migrationsfördernde Wirkung der Positivkontrolle TGF- β 1 nicht aufheben (Abb. 11), was als weiterer Beweis für die Spezifität der Opioid-Rezeptor-Interaktion betrachtet werden kann. Die Anwesenheit von Opioidrezeptoren in der Haut als nötige Voraussetzung für eine lokale Wirksamkeit wurde bereits erläutert (siehe 1.4.1); als weiteres Argument für eine Lokalapplikation gilt deren verstärkte Expression in der Zellmembran peripherer Neurone bei Entzündungsreaktionen, wie sie bei akuten Hautverletzungen auftreten (Hassan et al., 1993).

Die Ergebnisse zeigten, dass die gewählten Opioide in ihrer Wirkstärke kaum voneinander abweichen, lediglich die Wirksamkeit von Buprenorphin war etwas schwächer ausgeprägt als die der anderen Opioide (Abb. 10). Dies könnte in dessen Eigenschaft als partiell antagonistisch am κ -Rezeptor wirkendes Opioid begründet liegen. Da somit keine der untersuchten Substanzen einen deutlichen Vorteil gegenüber den anderen besitzt, wurde in den weiteren Versuchen Morphin stellvertretend für die Klasse der Opioide verwendet.

Als weitere Möglichkeit, die Beeinflussung der Wundheilung auf zweidimensionaler Ebene zu testen, stand der sogenannte Scratch-Assay zur Verfügung (Hintermann et al., 2001; Koivisto et al., 2006). Hier wird ein Zellmonolayer mittels einer Pipettenspitze verletzt und über 48 h beobachtet, wie gut die HaCaT Zellen diese Wunde durch Wanderung von den Wundrändern aus verschließen können. Dabei konnten die Ergebnisse des Migrationsassays bestätigt werden: Auch hier führte die Zugabe von Morphin zu einer deutlich besseren Wundheilung als ohne Zusätze (Abb. 17), was an der sichtbaren Verschmälerung der ursprünglichen Wunde in Morphin-enthaltenden Wells im Vergleich zur Negativkontrolle zu erkennen war. Die Untersuchung von Substanzeinflüssen auf die Zellmigration mittels Migrationsassay in der Boyden Kammer und eine zusätzliche Verifizierung der Ergebnisse im Scratch-Assay ist bisher noch für keine andere Substanz beschrieben.

Chemotaxis - Chemokinese

Mit dem abgewandelten Aufbau des Migrationsassays ohne Substanzgradient wurde untersucht, ob es sich bei der beobachteten Induktion der Migration um eine Wanderung der Zellen in Richtung einer chemotaktisch wirkenden Substanz handelt (Chemotaxis), oder aber um eine Förderung ungerichteter Zellwanderung (Chemokinese). Diese Abwandlung des Migrationsassays in der Boyden Kammer wurde in ähnlicher Form auch bereits verwendet, um zwischen chemotaktischem und chemokinetischem Effekt von Plasmin auf die Migration von HaCaT Zellen zu unterscheiden (Szabo et al., 2004). Es stellte sich heraus, dass Morphin, Hydromorphon und Fentanyl rein chemotaktisch auf HaCaT Zellen wirken (Abb. 12). Auch hier nahm der Partialagonist Buprenorphin eine Sonderstellung ein, da er als einzige getestete Substanz auch eine zumindest teilweise chemokinetische Wirkung aufwies (Abb. 12). Die Positivkontrolle TGF- β 1 zeigte in ihrer Wirkung keinen Unterschied zwischen chemotaktischem und chemokinetischem Versuchsansatz (Abb. 13), sie wirkt demnach auf beide Arten.

Zusammengefasst ließ sich nun sagen, dass im Scratch Assay die Wirksamkeit von Morphin bestätigt wurde und der Migrationsassay in der Boyden Kammer gezeigt hat, dass die Substanz offenbar rein chemotaktisch wirkt. Dies schien zunächst ein Widerspruch, denn beim Versuchsaufbau des Scratch-Assays war eine chemotaktische Wirkung von Morphin nicht möglich, da sich die Substanz im Medium befand und somit kein Gradient aufgebaut werden konnte. Der Unterschied der beiden Versuche bestand allerdings in der Versuchsdauer: Migrationsassays in der Boyden Kammer wurden über fünf Stunden durchgeführt, bei Scratch-Assays erfolgte die Beobachtung des Wundverschlusses über 48 Stunden. Zur Klärung dieser Diskrepanz wurden im Anschluss auch Migrationsassays mit einer 24-stündigen Migrationsdauer angesetzt. Unter diesen Bedingungen wirkte Morphin sowohl chemotaktisch als auch chemokinetisch auf die HaCaT Migration (Abb. 14). Somit kann die Diskrepanz der Ergebnisse mit Unterschieden in dem jeweiligen Standardtest teilweise erklärt werden.

Saurer pH

Die Migrationsuntersuchungen mit angesäuertem Medium wurden durchgeführt, weil bei Hautverletzungen immer mit einer lokalen Entzündungsreaktion gerechnet werden muss, bei der der physiologische pH von 7,4 im Gewebe durch Anreicherung saurer Stoffwechselprodukte und Freisetzung der Inhalte von Lysosomen aus Entzündungszellen leicht erniedrigt wird. Die Wirksamkeit aller getesteten Opioide war im sauren Milieu (pH 6,5)

zwar leicht gemindert (Abb. 15), jedoch förderten alle Substanzen die HaCaT Zellmigration. Die dabei beobachtete stärkste Abnahme der Wirkung von Fentanyl war zu erwarten, da Fentanyl den höchsten pKa-Wert unter den getesteten Opioiden besitzt (Tab. 1).

Aufgrund dieser Ergebnisse muss bei lokaler Applikation von Opioiden auch im entzündeten Gewebe nicht bzw. nur in geringem Umfang mit einer Wirkungsabschwächung des positiven Effektes auf die Wundheilung gerechnet werden. Zwar ist der Opioidinfluss auf die Wundheilung im entzündeten, also sauren Milieu bisher noch nicht beschrieben, allerdings konnte gezeigt werden, dass die analgetische Wirkung von Opioiden auch bei lokaler Anwendung im Entzündungsgebiet erhalten bleibt (Likar et al., 2001; Platzer et al., 2005; Watterson et al., 2004). Es konnte sogar nachgewiesen werden, dass im Falle einer Entzündung bei der topischen Applikation von Opioiden weniger mit einer Toleranzentwicklung gerechnet werden muss als im nicht-entzündeten Gewebe (Zöllner et al., 2008), und dass durch die Entzündung die Anzahl von μ -Opioidrezeptoren im Gewebe erhöht wird (Zöllner et al., 2003).

Einfluss der unbeladenen Trägersysteme auf die Zellmigration

Langfristige Perspektive ist die Entwicklung eines Systems, welches es erlaubt mit einer einmaligen Applikation eine Versorgung der Wunde mit Opioidmengen zu gewährleisten, die initial hoch genug sind, um rasch eine ausreichend gute Analgesie beim Patienten hervorzurufen. Gleichzeitig sollen effektive Opioidkonzentrationen für die Analgesie über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten bleiben. Besonders der Verbandwechsel ist nämlich bei Hautverletzungen durch z.B. Transplantatentnahmen oder Verbrennungen für den Patienten sehr schmerzhaft (Zapata-Sirvent et al., 1985) und sollte deshalb frühestens nach einigen Tagen erstmals erfolgen. Für solche Arzneistofffreisetzungen über einen längeren Zeitraum stehen Arzneistoffträgersysteme wie SLN oder CMS Nanotransporter zur Verfügung (siehe 1.5), deren lokale Verträglichkeit bereits nachgewiesen wurde (Wolf et al., 2009). Eine kontinuierliche und langdauernde Abgabe der geladenen Stoffe aus diesen Trägern ist grundsätzlich nachgewiesenermaßen möglich. So konnte beispielsweise eine Freisetzung von Prednisolon über einen Zeitraum von bis zu 5 Wochen durch Beladung der Substanz auf SLN erreicht werden (zur Mühlen et al., 1998). Auch die Vitamin A-Abgabe aus beladenen SLN wurde bereits untersucht. Hier erfolgte nach einer anfänglich relativ starken Freisetzung eine verlängerte Abgabe über mindestens 24 h (Jenning et al., 2000a). Ähnliches konnte mit einer Beladung von Clobetasol Propionat auf SLN beobachtet werden (Hu et al., 2002). Auch hier erfolgte eine zunächst starke, dann eine kontrollierte und kontinuierliche Freisetzung über bis zu 4 Tagen.

Vor einer Beladung mit Opioiden musste jedoch zunächst ausgeschlossen werden, dass diese Träger selbst bzw. bestimmte Bestandteile davon den Wundheilungsprozess stören. Die Migrationsuntersuchungen wurden deswegen auch unter Zugabe unbeladener SLN bzw. CMS Nanotransporter durchgeführt. Diese Nanopartikel hemmten die Zellmigration nicht (Abb. 20), daher ist bei adäquater Opioidfreisetzung aus den Partikeln nicht mit einer Aufhebung des stimulierenden Morphineffekts durch einen Eigeneffekt der Träger zu rechnen. Bei unbeladenen SLN zeigte sich sogar der gegenteilige Effekt, Compritol-(=Glycerolbehenat-)basierte SLN förderten die Migration in ähnlichem Umfang wie TGF- β 1 (Abb. 20). Ein möglicher Grund dafür liegt in Lipasen der HaCaT Zellen, die Behensäure aus SLN freisetzen könnten (Olbrich & Müller, 1999), welche an das Tumorsuppressorgen p53 binden (Iijima et al., 2006). p53 verhindert die Migration gesunder Zellen. Zellen von p53-knock-out-Tieren zeigen verstärkte Ausbreitung und Bildung von Filopodien als Vorstufe der Zellmigration (Cooper et al., 2007; Roger et al., 2006). Zwar weisen HaCaT Zellen kein funktionelles Tumorsuppressorgen p53 auf, dafür besitzen sie jedoch den großteils homologen Tumorsuppressor p63 (Harms et al., 2004; Vigano et al., 2006), dessen Ausschaltung die Migration der HaCaT Zellen durch Hochregulation verschiedener motilitätsfördernder Gene induziert (Barbieri et al., 2006; Ichikawa et al., 2008). Offensichtlich führte nach SLN-Zugabe die Bindung von Behensäure an p63 zu einem p63-knock-out ähnlichen Effekt und HaCaT Zellmigration.

Zusammenfassend können beide untersuchten Trägersysteme aufgrund der beschriebenen Effekte zur topischen Morphinapplikation verwendet werden, da beide den Wundheilungsprozess im 2D-Migrationsmodell nicht stören. SLN könnten sogar eine positive Eigenwirkung besitzen und wären daher den CMS Nanotransportern vorzuziehen.

Einfluss von Morphin auf die NO-Produktion und Expression von NO-Synthasen

Die Ergebnisse der Wundheilungsassays zeigten, dass Opiode die Migration von Keratinozyten positiv beeinflussen können. Deswegen wurde als nächstes untersucht, ob dies möglicherweise über eine verstärkte Produktion von Stickstoffmonoxid in den Zellen induziert wurde. Stickstoffmonoxid wird in Zellen durch NO-Synthasen gebildet, von denen bisher drei Subtypen beschrieben sind: die induzierbare (iNOS), die endotheliale (eNOS) und die neuronale NO-Synthase (nNOS) (Alderton et al., 2001). Alle drei Subtypen konnten in verschiedenen Zelltypen der Haut nachgewiesen werden. Auch Keratinozyten sind grundsätzlich in der Lage, sowohl iNOS (Stallmeyer et al., 1999) als auch eNOS (Stallmeyer

et al., 2002) und nNOS (Baudouin & Tachon, 1996) zu exprimieren. Funktionell aktive NO-Synthasen sind wichtig für die Heilung von Hautverletzungen. Sie sind zum Beispiel von Bedeutung für die Bildung des Granulationsgewebes (Howdieshell et al., 2003), können durch die Modifikation der Cytokinproduktion die Angiogenese und Zellproliferation stimulieren (Schwentker et al., 2002) und schließlich auch die Migration von Epithelzellen induzieren (Noiri et al., 1996). Mithilfe von knock-out-Mäusen wurde gezeigt, dass sowohl Fehlen der iNOS als auch der eNOS die Wundheilung der Tiere deutlich verschlechtert (Lee et al., 1999; Yamasaki et al., 1998). Auch klinische Studien zur Wundheilung zeigten deutliche Verbesserung bei Patienten, denen das unmittelbare Substrat der NO-Synthasen, L-Arginin verabreicht wurde (Kirk et al., 1993). Die Annahme, dass der Opioideneffekt auf die HaCaT Migration über die Aktivierung einer NO-Synthase zurückzuführen ist, wurde unter anderem durch den positiven Effekt von Sphingosin-1-Phosphat (S1P) auf die Wundheilung gestützt (Herzinger et al., 2007; Vogler et al., 2003). Sowohl S1P als auch sein Struktur analogon FTY720-Phosphat stimulieren nämlich die endotheliale Form der NO-Synthase (Igarashi & Michel, 2008). Außerdem ist eine Stimulierung der murinen dermalen iNOS und eNOS durch exogene Opioide beschrieben (Poonawala et al., 2005), Endomorphin induzierte die NO-Produktion in humanen Entzündungszellen *in vitro* (Saric et al., 2007) und Met-Enkephalin die in Makrophagen von Ratten (Vujic et al., 2004). In einigen wenigen Originalarbeiten hingegen wurde eine Hemmung der NO-Bildung nach Zugabe von Opioiden beschrieben. Der spezifische κ -Opioidrezeptoragonist Ethylketocyclazocin hemmte zum Beispiel die NO-Freisetzung bei einer humanen Mammakarzinomzelllinie (T47D), während δ - und μ -Rezeptoragonisten keinen Einfluss hatten. Als Mechanismus dabei wurde eine Modifikation und damit Aktivitätsbeeinflussung der NO-Synthasen beschrieben (Kampa et al., 2001). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse zum Einfluss von Morphin auf die NO-Freisetzung humaner Keratinozyten decken sich mit dem Großteil der veröffentlichten Daten, da ein leichter Anstieg des gebildeten Stickstoffmonoxids erfolgte, wenn die Zellen zuvor für 24 h mit Morphin inkubiert worden waren (Abb. 16). Dabei könnte die vermehrte Detektion von NO zum einen ein Ergebnis einer erhöhten Expression oder Aktivität der NO-Synthasen in den Zellen sein.

Da der Griess-Assay nur Nitrit, also das Endprodukt der NO-Oxidation quantifiziert, könnte die Menge an tatsächlich gebildetem Stickstoffmonoxid sogar unterschätzt worden sein. Stickstoffmonoxid kann nämlich weiter zu Nitrat umgewandelt werden, das mittels Griess-Assay nicht detektierbar ist. Ein weiterer Nachteil des Griess-Assays ist seine relativ geringe Sensitivität. In einer anderen Arbeit zur Opioidstimulation von Makrophagen wurde mittels Griess-Assay kein Unterschied in der Menge an gebildetem NO festgestellt. Anwendung der Amperometrie zeigte dagegen eine vermehrte NO-Bildung in Opioid-stimulierten Zellen

(Saric et al., 2007). Dies kann auch erklären warum auch der in der vorliegenden Arbeit mittels Griess-Assay gemessene Unterschied relativ gering ausfiel.

Ob die vermehrte Bildung von NO nach Morphinstimulation durch eine verstärkte Expression eines (oder mehrerer) NO-Synthase-Subtypen ausgelöst wurde, sollten die im Anschluss durchgeführten Versuche zur Genexpression klären.

Es wurde die Expression der drei Subtypen der NO-Synthase (iNOS, eNOS und nNOS) mittels der quantitativen real-time Polymerase-Kettenreaktion mit und ohne Morphinstimulation untersucht. Als wahrscheinlichstes Enzym für die durch Morphin ausgelöste leicht erhöhte NO-Produktion galt hierbei die induzierbare NO-Synthase, denn während die von den beiden konstitutiv exprimierten NO-Synthasen gebildete NO-Menge im nanomolaren Bereich liegt, kann die induzierbare Form des Enzyms Mengen bilden, die bis in den mikromolaren Bereich reichen (Stefano et al., 2000). Anders als auf die NO-Bildung wurde der Opioidinfluss auf die Expression der NO-bildenden Enzyme in Hautzellen bislang nicht geprüft. An Ratten wurde eine erhöhte Expression der (induzierbaren) NO-Synthase im Rückenmark nach intraperitonealer Morphinapplikation immunhistochemisch gezeigt (Machelska et al., 1997). Heroin reduzierte bei Ratten die LPS-induzierte iNOS-Expression in Lunge, Milz und Leber (Lysle & How, 2000). Ob dieser Effekt auf die Beeinflussung der NOS-Expression humaner Hautzellen übertragbar ist erscheint fraglich. Dies gilt nicht nur wegen unterschiedlicher Testorganismen (Ratte vs. Mensch) und Organe (Lunge, Milz, Leber vs. Haut), sondern auch, weil Heroin eine andere Subklasse der μ -Opioidrezeptoren als Morphin aktiviert. (Rossi et al., 1996). Daten hinsichtlich der NOS-Expression und ihrer Beeinflussung durch Opiode in humanen Hautzellen existieren bisher in der Literatur noch nicht.

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion kein Einfluss auf die Menge der gebildeten mRNA der untersuchten NO-Synthasen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies war auch bei Variation der Stimulationszeit und unter Einsatz verschiedener Morphinkonzentrationen für die Stimulation der Zellen der Fall. Ein Grund dafür könnte zum Beispiel sein, dass zwar Morphin die Enzymexpression fördert, diese jedoch zu gering ist, um mit der real-time Polymerase-Kettenreaktion erfasst zu werden. Zudem wird auch in der Literatur beschrieben, dass eine erhöhte NO-Produktion in Zellen nicht zwangsläufig mit einer verstärkten iNOS-Expression korrelieren muss: Stimulation einer murinen Makrophagen-Zelllinie mit Endomorphin führte zum Beispiel im Gegenteil zu einer Downregulation der iNOS auf mRNA-Ebene, obwohl eine vermehrte NO-Produktion detektiert worden war (Saric et al., 2007). Änderung der Proteinaktivität kann daher auch auf posttranslationale Regulationen der NO-Synthase zurückzuführen sein. Dazu gehören Modifikation der Proteinstabilität, Dimerisierung, Phosphorylierung, Bindung von

Kofaktoren oder Verfügbarkeit der Substrate Sauerstoff und L-Arginin (Aktan, 2004; Pan et al., 1996).

Matrix-Metalloproteinasen

Eine weitere Klasse von Enzymen, die bei der Wundheilung eine wichtige Rolle spielen, sind die sogenannten Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). Diese mehr als 20 Mitglieder umfassende Gruppe von Enzymen sowie ihre Inhibitoren (TIMPs: tissue inhibitors of metalloproteinases) beeinflussen die Entzündungsphase, die Reepithelialisierung und die Narbenbildung (Chakraborti et al., 2003). Im Rahmen der Entzündung sind sie zum Beispiel für die Spaltung und damit die Aktivierung oder den Abbau verschiedener Zytokine und Chemokine verantwortlich und sie können die Extravasation von Entzündungszellen wie Leukozyten aus dem Blut in das verletzte Gewebe fördern (Gill & Parks, 2008). Die Reepithelialisierung unterstützen MMPs durch Spaltung von Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Kontakten, das heißt durch Aufbau eines neuen Epithels (Gill & Parks, 2008). Zudem fördern sie den Auf- und Umbau des Narbengewebes ebenfalls durch Neusynthese und Umgestaltung von Proteinen der extrazellulären Matrix wie Kollagenen oder indirekt über die Beeinflussung der Genexpression und Proteinbildung von Zellen (Gill & Parks, 2008). Die meisten Untersuchungen hinsichtlich der Beteiligung bei der Wundheilung gibt es für die MMP-1, welche auch Kollagenase 1 genannt wird (Birkedal-Hansen et al., 1993). Dieses Enzym wird in den murinen Keratinozyten verstärkt exprimiert, welche Teil der sogenannten migrierenden Front beim Verschluss einer Schnittwunde *in vivo* sind (Madlener et al., 1998). MMP-1 verbessert die Migration humaner Keratinozyten über eine Kollagenmatrix deutlich (Pilcher et al., 1997; Pilcher et al., 1999). Auch Untersuchungen zur Enzymexpression humaner Hautproben nach Verbrennungen zeigten erhöhte MMP-1-Bildung während der Heilung der Wunden (Stricklin & Nanney, 1994). Auch die zur MMP-Untergruppe der Gelatinasen gehörende MMP-2 (Gelatinase A) stimulierte *in vitro* die Wanderung humaner Keratinozyten (Makela et al., 1999) sowie von Brustepithelzellen (Giannelli et al., 1997). Bei Keratinozyten ist die migrationsfördernde Wirkung von TGF- β nach Hemmung der MMP-2-Expression durch Tetrazykline aufgehoben. Bei transgenen MMP-2-überexprimierenden Mäusen zeigte sich ein Tumor- und Metastasen-fördernder Effekt (D'Armiento et al., 1995), was ebenfalls unter anderem auf die migrationsfördernde Wirkung zurückgeführt wurde. Wegen dieses migrationsfördernden Effektes und der daraus resultierenden tumorigenen Potenz gelten MMPs mittlerweile auch als mögliche Angriffspunkte neuer Zytostatika (Stetler-Stevenson & Yu, 2001; Yu et al., 1997).

Kein Effekt auf das Migrationsverhalten der Keratinozyten konnte zunächst für die MMP-9 gezeigt werden (Makela et al., 1999). Für diese auch Gelatinase B genannte Proteinase sind die bisher veröffentlichten Daten jedoch widersprüchlich: bei kornealen Wunden von Kaninchen wurde eine erhöhte Expression von MMP-9 in den Epithelzellen beobachtet, die sich hinter der migrierenden Front befanden, woraus man folgerte, dass diese Protease hauptsächlich für den Umbau des neugebildeten Gewebes verantwortlich sein muss (Mulholland et al., 2005). Der Analyse von Wundbiopsien und Wundflüssigkeiten von Patienten zufolge korreliert die anhaltend starke Expression von MMP-9 mit einer schlechteren Heilung von Hautulzerationen. Bei gut heilenden Ulzera wurde hingegen kurz nach Beginn des Heilungsprozesses eine erniedrigte MMP-9-Expression nachgewiesen (Ladwig et al., 2002; Trengove et al., 1999). Die dargestellten Korrelationen beweisen allerdings nicht die Hemmung der Wundheilung durch starke MMP-9-Expression. Trotz der noch uneinheitlichen Befunde geht man mittlerweile zumindest von einer Regulation des Wundheilungsprozesses durch das Expressionsmuster verschiedener Matrix-Metalloproteinasen aus. Ob und inwieweit die MMP-Expression durch Opiode beeinflusst werden kann, wurde bislang lediglich an einer stark MMP-2-sezernierenden Fibrosarkom-Zelllinie (WEHI-164) untersucht. Morphin reduzierte die Sekretion von MMP-2 durch diese Zellen (Sharifabrizi et al., 2006).

Ob die Morphin-induzierte Migrationszunahme humaner Keratinozyten ebenfalls über eine Manipulation der Expressionsmuster von Metalloproteinasen erzielt wurde, sollte mittels quantitativer real-time PCR für die Metalloproteinasen MMP-1, -2 und -9 geklärt werden. Weder nennenswerte Steigerung noch Senkung der Expression aller untersuchten MMPs wurde gesehen (Daten nicht gezeigt). Somit kann man davon ausgehen, dass zu den intrazellulär ablaufenden Mechanismen nach Opioidrezeptorstimulation die Beeinflussung der MMP-Genexpression offensichtlich nicht gehört. Jedoch sind in der Literatur zahlreiche weitere Proteine wie beispielsweise verschiedene Wachstumsfaktoren (NGF, HGF, IGF, VEGF) und Zytokine wie zum Beispiel Interleukin 10 beschrieben, die die Keratinozytenmigration regulieren (Werner & Grose, 2003), und deren Auf- oder Abbau möglicherweise durch Morphinstimulation verändert werden könnte. Welche dies genau sind, könnten im weiteren Verlauf des Gesamtprojektes durchzuführende Studien klären.

5.1.2 3D-Wundheilungsuntersuchungen

Die Untersuchungen am 2D-Modell geben einen ersten Hinweis auf Effekte verschiedener Substanzen auf die Heilung von Hautverletzungen, dennoch bildet die Migration bei einer reinen 2D-Keratinozytenkultur die Gesamtheit der Vorgänge des Wundheilungsprozesses nicht vollständig ab. Deswegen war es ein weiteres Ziel der Arbeit, ein standardisiertes

Vollhaut-Wundheilungsmodell zu etablieren. Vollhautmodelle wurden zur Untersuchung der Wundheilung bereits mehrfach verwendet, der Herstellungsprozess wurde bereits 2002 gezeigt (Falanga et al., 2002). An kommerziell erhältlichen Hautmodellen wurde mittels einer sogenannten „Mesh“-Methode ein gitterartiger Defekt gesetzt, der nach etwa 4 Tagen vollständig ausheilte. In großer Zahl erfolgten Untersuchungen an selbst hergestellten Vollhautmodellen, sogenannten hausinternen Modellen (El Ghalbzouri et al., 2004; Laplante et al., 2001; Vaughan et al., 2004). Allerdings variieren bei hausinternen Hautmodellen die Dicke der Epidermis und die Qualität der Modelle deutlich. Auch exzidierte und *ex vivo* weiterkultivierte Humanhaut birgt für Wundheilungsversuche (Nath et al., 2007) den Nachteil großer interindividueller Schwankungen bezüglich Dicke und Beschaffenheit der Haut. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten daher die Untersuchungen mit einem kommerziell verfügbaren Modell durchgeführt werden, bei dem die Gleichartigkeit von Charge zu Charge gewährleistet wird.

Verletzungen können

- mittels Biopsiestanze (Laplante et al., 2001),
- mit einem Stickstoff-gekühlten Metallquader (El Ghalbzouri et al., 2004) oder
- einem einfachen Skalpell (El Ghalbzouri et al., 2004)

erzeugt werden. Diese Vorgehensweisen schließen jedoch eine absolut reproduzierbare Wunde aus, da Tiefe respektive Menge an abgetragenem Gewebe variieren können. Besser reproduzierbar erscheint eine Verletzung mittels Laser, die ebenfalls für Tests an Hautmodellen (Vaughan et al., 2004) aber auch für die *in vivo*-Verletzung von Versuchstieren (Delgado et al., 2005) beschrieben wurde. Es wurde der CO₂-Laser gewählt, welcher den Abtrag einer Hautschicht definierter Dicke nach vorheriger Etablierung der am besten geeigneten Zahl an Laserwiederholungen (Abb. 18) ermöglichte. Die histologische Auswertung der Keratinozyten-Einwanderung zeigte die partielle Reepithelialisierung der Wunde nach einer 4-tägigen Heilungsperiode und einen deutlichen Unterschied zwischen unbehandelten Wunden und mit Morphin bzw. mit unbeladenen und beladenen SLN behandelten Wunden (Abb. 19 und 21). Der Keratinozytensaum war dichter und dicker ausgeprägt bei den Wunden, die nach Laserbestrahlung mit Morphinlösung oder SLN benetzt worden waren. Die im 2D-Wundheilungsmodell erhaltenen Ergebnisse konnten somit mit dem neu etablierten 3D-Wundheilungsmodell verifiziert werden. Zusätzlich wurde ein positiver Effekt der Morphin-beladenen SLN auf die Wundheilung gezeigt (Abb. 21). Die histologische Auswertung ergab jedoch keine Unterschiede zwischen den beiden Morphinkonzentrationen. Das könnte auf einen bereits bei der geringeren Konzentration erreichten Maximizeffekt oder aber auf eine unzureichende Sensibilität des Testsystems zurückzuführen sein. Diese Frage müssen weitere Test und eine Weiterentwicklung des Assays zukünftig klären.

Zusammenfassend ist mit dem neu etablierten Modell die Reproduzierbarkeit der erzeugten Wunde durch Laser und industriell gefertigte Hautmodelle gewährleistet. Mittels histologischer Auswertung konnten die im 2D-Modell erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden. Eine Weiterentwicklung des Modells könnte zukünftig noch die Klassifizierung der verschiedenen Stadien der Keratinozytenwanderung während der Reepithelialisierung im Vollhautmodell ermöglichen.

5.1.3 Einordnung der Wundheilungsergebnisse in den wissenschaftlichen Kontext

Ein Einfluss von Opioiden auf die Wundheilung ist von mehreren Gruppen unter Verwendung verschiedener Versuchsansätze sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beschrieben worden. Die in der vorliegenden Arbeit bei 2D-Wundheilungsuntersuchungen erhaltenen Ergebnisse entsprechen denen von Bigliardi et al., die eine verstärkte Migration von Keratinozyten nach Stimulation mit dem endogenen Opioid β -Endorphin, jedoch unter Verwendung eines Versuchsansatzes mit mikroskopischer Beobachtung der Zellmorphologie und -wanderung in Echtzeit nachweisen konnten (Bigliardi et al., 2002). Die schwache Aktivität des κ -Agonisten Dynorphin ließ die Arbeitsgruppe darauf schließen, dass die Aktivierung der μ -Opioidrezeptoren dabei eine stärkere Bedeutung für die Wanderung hat. Auch dieses Ergebnis ist mit den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten grundsätzlich vereinbar, denn sowohl Morphin als auch die zu Beginn der Arbeit parallel verwendeten anderen Opioide zeichnen sich durch eine starke Interaktion mit dem μ -Opioidrezeptor und nur sehr schwach ausgeprägte Stimulation des κ -Subtyps aus. Dieselbe Arbeitsgruppe postulierte in einer späteren Veröffentlichung auch eine Rolle des δ -Rezeptors, was sie durch *in vivo*-Experimente mit Mäusen, deren δ -Opioidrezeptor ausgeschaltet wurde, anhand der Heilung von Verbrennungswunden belegen konnte. Die Wundheilung wurde zeitabhängig mittels Immunhistochemie verschiedener Wundheilungsmarker verfolgt (Bigliardi-Qi et al., 2006). Auch an Ratten zeigte sich eine Beschleunigung der Wundheilung durch die lokale Applikation verschiedener Opioide (Fentanyl, Hydromorphon, Morphin) in Creme-Formulierungen (Poonawala et al., 2005). Der makroskopische Wundverschluss erfolgte am schnellsten unter Fentanyl, Naloxon hob den Effekt auf. Diese Beobachtungen wurden durch histologische Experimente untermauert. Ein interessanter Aspekt dieser Arbeit ist der direkte Vergleich der systemischen mit der topischen Opioidapplikation im Hinblick auf die Beeinflussung der Wundheilung: Bei intravenöser Applikation war der positive Effekt auf die Reepithelialisierung nicht feststellbar, somit musste also eine Aktivierung von lokalen Opioidrezeptoren zugrunde liegen. Damit kann die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Interaktion von Opioiden mit Rezeptoren der Keratinozyten die von Poonawala et al.

veröffentlichten Ergebnisse bestätigen. Die standardisierte Laser-induzierte Wunde könnte in Zukunft entsprechende Tiermodelle ersetzen. Das Ergebnis dieses Promotionsvorhabens erfüllt daher auch den wichtigsten Aspekt des von Russel und Burch 1959 entwickelten 3R-Konzeptes „replace“.

Daneben wurden jedoch auch Studien veröffentlicht, welche auf eine Störung der Wundheilung durch topische Opioide hinweisen. So verzögerte die Applikation von Morphin, eingebettet in IntraSite® Gel die Wundheilung im Rattenexperiment (Rook et al., 2009; Rook & McC Carson, 2007). Dies war offenbar auf eine gehemmte Freisetzung von Neuropeptiden wie Substanz P und Neurokinin A aus peripheren Nervenenden zurückzuführen, welche wichtige Mediatoren besonders in der Entzündungsphase des Wundheilungsprozesses sind, und auch nach exogener Applikation die Wundheilung fördern können (Delgado et al., 2005). Die verminderte Freisetzung weiterer Zytokine als Folge einer Morphinapplikation ist ebenfalls beschrieben (Clark et al., 2007; Khalil et al., 1999). Da in der vorliegenden Arbeit jedoch sowohl im 2D- als auch im 3D-Versuch der Einfluss von Opioiden auf die Keratinozytenmigration und somit auf einen Vorgang einer späteren Wundheilungsphase dargestellt wurde, sind die Ergebnisse nicht unbedingt als konträr zu denen von Rook et al. zu betrachten. Auch in deren Untersuchungen wurde nämlich der letztendliche Wundverschluss trotz der anfänglichen Verzögerung der Entzündungsphase durch Morphin nicht nennenswert gehemmt, die Gesamt-Heilungsdauer stieg durch Morphin nicht. In einer weiteren Publikation der Arbeitsgruppe (Rook et al., 2008) verlangsamte eine Morphinapplikation auf Hautverletzungen bei gleichem Versuchsaufbau die Wundheilung initial, in der zweiten Phase jedoch wurde ein beschleunigter Verschluss der Wunde beobachtet. Bei Morphinapplikation nach Tag 4 konnte kein Einfluss mehr beobachtet werden, die Verzögerung der Inflammationsphase wurde auf eine durch Morphin gehemmte Makrophageninvasion in die Wunde zurückgeführt (DiPietro, 1995).

Für eine zukünftige topische Morphinanwendung wäre aufgrund der von Rook gezeigten Ergebnisse (Rook et al., 2009; Rook & McC Carson, 2007) somit zu überlegen, ob die Verzögerung der Inflammationsphase möglicherweise durch eine gleichzeitige Gabe von beispielsweise Substanz P gemeinsam mit Morphin einer Morphin-induzierten verminderten Substanz P-Bildung entgegenwirken könnte. Lokal appliziertes Substanz P beschleunigte nämlich die Wundheilung (Delgado et al., 2005).

5.2 Interaktion von Morphin mit verschiedenen Trägern

Die Ergebnisse des Migrationsassays mit unbeladenen Nanopartikeln (Abb. 20) deuten auf eine Interaktion von TGF- β 1 und Morphin mit den Partikeln hin. Wurde das hydrophile Peptid TGF- β 1 zusammen mit unbeladenen SLN im Migrationsassay eingesetzt, scheint eine synergistische Wirkung einzutreten (Abb. 20). Das weist darauf hin, dass TGF- β 1 während der fünfstündigen Versuchsdauer nicht an SLN adsorbiert und in seiner Wirksamkeit gemindert wurde. CMS Nanotransporter haben dagegen den TGF- β 1-Effekt leicht abgeschwächt (Abb. 20). Dies ist ein Zeichen für eine zumindest teilweise Aufnahme des Wachstumsfaktors in die Matrix der CMS Nanotransporter, welche hydrophile und lipophile Stoffe gut inkorporieren können (Haag, 2004). Bei gleichzeitiger Applikation von Morphin zusammen mit CMS Nanotransportern wurde dann auch der Opioideneffekt durch die Partikel partial abgeschwächt (Abb. 20). Von einer Aufnahme des lipophilen Morphins in die lipophile CMS Nanotransporter-Hülle ist somit auszugehen. Wurden SLN zusammen mit Morphin zugegeben, konnte keine weitere Steigerung der schon durch SLN bzw. Morphin alleine erhöhten Migration erreicht werden (Abb. 20). Deswegen wird eine zumindest teilweise Adsorption der Substanz an die Partikeloberfläche vermutet. Zwar kommt auch eine maximale Stimulation des Systems durch jede der beiden Komponenten allein in betracht, die einen Synergismus maskiert, dies wird aber durch die mit TGF- β 1 und SLN beobachteten Migrationsversuche nicht gestützt.

Die postulierten Interaktionen von Morphin mit SLN bzw. CMS Nanotransportern wurden schließlich in einem zellfreien Testsystem mit der Raman-Spektroskopie untersucht. Mithilfe dieser Untersuchungen lassen sich physikalische Interaktionen eines Stoffes mit Partikeln wie SLN oder CMS Nanotransportern aufzeigen (Blaschke et al., 2007), welche auch die trägergesteuerte Aufnahme von Arzneistoffen in die Haut entscheidend beeinflussen können (Lombardi Borgia et al., 2005a; Stecova et al., 2007). Interaktionen ergeben sich aus Änderungen der beiden Partikel-Parameter Dipolmobilität und Dipoldichte bei Interaktion mit weiteren Stoffen. Die Raman-Spektroskopie wies bereits die Aufnahme des hydrophoben Farbstoffes Nilrot in SLN (Lombardi Borgia et al., 2005a) bzw. in CMS Nanotransporter nach (Küchler et al., 2009b), ebenso wie die Adsorption von Prednicarbat und Betamethason 17-Valerat an die Oberfläche von SLN (Sivaramakrishnan et al., 2004).

Die in Tab. 9 gezeigte Erhöhung der Dipoldichte und Verminderung der Dipolmobilität der Partikelsuspensionen im Vergleich zum reinen Lösungsmittel (PBS/0,4% BSA) resultiert dabei aus der höheren Masse der Transporter und ihrer somit höheren Dipoldichte. Dagegen

ist bei Vergleich der Dipoldichte der reinen Morphinlösung mit der Mischung aus Morphinlösung und unbeladenen Trägern eine Abnahme des Signals festzustellen, was eine Interaktion der Partikel mit der Testsubstanz belegt, entweder in Form einer Aufnahme in die Matrix der Partikel oder aber durch Anheften des Stoffes auf ihrer Oberfläche. Im Falle der CMS Nanotransporter wurde von einer Inkorporation des Stoffes in die Partikel ausgegangen, wie sie bereits für die Stoffe Nilrot (Küchler et al., 2009b), Karotin und Kongorot (Radowski et al., 2007) gezeigt wurde. Bei SLN hingegen ist eine Adsorption von Morphin auf der Partikeloberfläche wahrscheinlicher.

5.3 Toxizitätsuntersuchungen

Das Ziel des Projektes ist letztendlich, eine geeignete Opioidformulierung für die lokale Applikation zu finden. Da die Substanzen dabei in unmittelbarem Kontakt mit den Zellen der Epidermis (Keratinocyten) kommen, ist es wichtig, mögliche schädigende Effekte der Opioide auf die Zellviabilität auszuschließen. Die Zytotoxizität von Morphin auf Hautzellen wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben, jedoch existieren zahlreiche Untersuchungen hinsichtlich der Beeinflussung von Zellen des Immunsystems sowie neuronaler Zellen durch Opioide. Die Ergebnisse sind dabei jedoch widersprüchlich: Ausgehend von der oftmals geschwächten Immunabwehr bei Heroinabhängigen wurde eine durch Opioide hervorgerufene verstärkte Apoptose von Zellen des Immunsystems postuliert. Tests an murinen sowie humanen Makrophagen bestätigten diese These zunächst. Höchst- und Propidiumjodidfärbung apoptotischer Zellen ergab nach Stimulation mit Morphin (0,1 mM - 10 nM für 12 - 48 h) eine mit Naloxon hemmbare Zunahme des programmierten Zelltodes (Singhal et al., 1998). Diese Ergebnisse konnten kurze Zeit später auch an einer T-Zelllinie sowie humanen T-Lymphozyten gesunder Probanden reproduziert werden. Der Effekt war von einer erhöhten Expression des proapoptotischen bax-Proteins, einer Caspase-3-Aktivierung und von einer Downregulation der bcl-2-Expression, eines der bax-Gegenspieler, begleitet (Singhal et al., 1999). Ferner induzierte Morphin die Expression des Fas-(CD95-)Proteins (Yin et al., 1999). Dagegen stieg bei humanen Blutleukozyten nach 48-stündiger Morphininkubation (0,1 mM - 10 nM) die Apoptoserate nicht (Ohara et al., 2005). Ferner stieg die Überlebensrate einer Neuroblastom-Zelllinie sowie von primären murinen kortikalen Neuronen nach 24-stündiger Morphinexposition (0,1 - 10 µM), Naloxon hemmte diesen Effekt (Iglesias et al., 2003). 48 h-Exposition der PC12-Zelllinie (Modell für neuronale Zellen) gegenüber hohen Morphinkonzentrationen (0,1 - 0,8 mM) ergab jedoch eine erhöhte Zellapoptose (Sahebgharani et al., 2008). Humane Endothelzellen (HDMEC-Zellen) zeigten eine durch Morphin ausgelöste verstärkte Proliferation und damit eine Viabilitäts-

stimulierende Wirkung des Opioids (Gupta et al., 2002). Als Mechanismus wurde die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) postuliert. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Viabilitätsuntersuchungen wurden sowohl an der Keratinozytenzelllinie HaCaT als auch an primären humanen Keratinozyten durchgeführt. Stimulation über 48 Stunden mit Morphinkonzentrationen bis zu 100 µM beeinflussten die Zellviabilität nicht nennenswert (Tab. 7). Somit können die getesteten Konzentrationen als unbedenklich für die lokale Morphinapplikation eingestuft werden. Die Unbedenklichkeit der in Frage kommenden Trägersysteme wurde in einer bereits veröffentlichten Arbeit dargelegt (Wolf et al., 2009).

5.4 Analytik

Im weiteren Verlauf des Projektes soll unter anderem die Aufnahme von lokal appliziertem Morphin untersucht werden. Dazu gehören Penetrations- und Permeationsstudien, welche unter Verwendung von Humanhaut bzw. rekonstruierter Vollhaut durchgeführt werden sollen. Hierfür und zur Untersuchung des Grades der Metabolisierung des Stoffes durch die Haut war es zunächst notwendig, eine Methode zur Detektion und Quantifizierung von Morphin und seiner beiden Hauptmetabolite Morphin-3- und Morphin-6-Glucuronid zu etablieren. Dafür stand eine Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)-Anlage mit UV-Detektor zur Verfügung. In der Literatur beschriebene und neuere Methoden zur Morphin- und -Glucuronid-Quantifizierung basieren oft auf einer HPLC-Trennung gefolgt von einer Detektion mittels Massenspektrometrie (Al-Asmari & Anderson, 2007; Mabuchi et al., 2004; Taylor & Elliott, 2009) oder Fluoreszenzmessung (Hupka et al., 2005; Ribeiro et al., 2004). Bei diesen Methoden ist aber meist eine Quantifizierung von Morphin in Plasmaproben beabsichtigt, was den Einsatz der Massenspektrometrie für eine ausreichende Sensitivität erforderlich macht. Bei kutaner Applikation von Substanzen auf intakte Vollhaut wird mit einer Permeationsrate von 1 - 5% gerechnet. Ausgehend von 3% im Mittel kann damit folgende Berechnung angestellt werden:

- für klinische Studien zur Analgesie wurde eine Minimalkonzentration von 1 mg/ml Morphin in Gel verwendet (Platzer et al., 2005),
- bei Penetrationsstudien in der Franzzelle werden etwa 500 µl Substanz auf die Haut aufgetragen,
- dies bedeutet bei einer 3%-igen Permeation eine Konzentration von 15 µg Morphin in 12,5 ml Akzeptormedium der Franzzelle, also 1,2 µg/ml;
- umgerechnet in Molarität entspricht dies etwa 3,7 µM

Somit wurde für die zu entwickelnde Detektionsmethode eine entsprechende Sensitivität benötigt, wofür die HPLC-Trennung mit UV-Detektion ausreichend erschien. Auch andere Methoden lassen die Quantifizierung von Morphin - allerdings teilweise ohne parallele Detektion der Glucuronide - mithilfe der UV-Messung zu (Ary & Rona, 2001; Milne et al., 1991).

Die hier vorgenommene Entwicklung orientierte sich an sehr ähnlichen Methoden (Chari et al., 1991; Svensson et al., 1982). Alle genannten Methoden beinhalten Acetonitril als organischen Anteil der mobilen Phase. Die Auswahl der Säule erfolgte in Anlehnung an die genannten Veröffentlichungen, bei denen zumeist RP 8-, teilweise RP 18-Säulen angewandt wurden.

Gemäß der veröffentlichten Methode (Chari et al., 1991) erfolgte die HPLC-Trennung von Morphin, der beiden Glucuronide sowie Codein als interner Standard unter isokratischen Bedingungen und mit einer mobilen Phase aus Kaliumdihydrogenphosphatpuffer mit einem 10%igen Anteil Acetonitril. Die Substanzen wurden bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert.

Da zwar Morphin und Codein, nicht aber die Peaks der beiden Metabolite gut separiert waren (Daten nicht gezeigt), wurde die Methode schrittweise optimiert und schließlich ein Gradient eingeführt. Die Trennzeit je Probe stieg dadurch von ursprünglich 12 auf 50 min. Zudem wurde die Detektionswellenlänge von 280 nm auf 210 nm umgestellt, da Morphin bei dieser Wellenlänge sein Absorptionsmaximum besitzt. Letztendlich konnten die besten Ergebnisse (Abb. 22 - 25) mit der in Abschnitt 4.5 dargestellten Methode erzielt werden. Erste Stabilitätstests mit Morphinlösungen (1 µM) deuten auf eine Stabilität bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss sowie bei Tageslichtexposition über mindestens 8 Tage hin. Die darauffolgende Prävalidierung der Methode unter Verwendung von Codein als interner Standard ergab eine untere Detektionsgrenze von 0,5 µM bei reproduzierbarer, guter Trennung der Einzelpeaks (Abb. 25).

Die in Rahmen der Dissertation optimierte HPLC-UV-Methode wurde mittlerweile im Zuge der Weiterführung des Projektes leicht abgewandelt: Es erfolgt höchstwahrscheinlich keine Metabolisierung von Morphin durch Hautzellen (erste Untersuchungen zur Enzymausstattung dieser Zellen ergaben keine Expression der UDP-Glucuronosyltransferase 2B7). Damit kann die Paralleldetektion der Glucuronide entfallen und die Trenndauer der einzelnen Proben stark verkürzt werden. Auch ein Wechsel zu Hydromorphon als interner Standard erscheint angebracht, weil der HPLC-Trennung zukünftig wahrscheinlich ein Extraktionsschritt vorausgehen muss, für den Codein weniger geeignet ist.

5.5 Ausblick

Neben der Optimierung der HPLC-Methode wird der Fokus zukünftiger Untersuchungen im Rahmen des Morphinprojektes zunächst auf der Untersuchung der Morphin-beladenen Partikel liegen. Es müssen neben Freisetzungsstudien Penetrations- und Permeationsmessungen durchgeführt werden und es muss ferner die Tolerierbarkeit der verletzten Haut für diese beladenen Partikel gewährleistet werden. Zusätzlich zu den bereits in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchen mit Morphin-beladenen SLN müssen auch die CMS Nanotransporter mit Morphin beladen werden, was in Kooperation mit Mitarbeitern der Chemie aus der Arbeitsgruppe von Prof. Haag geschehen wird. Mit diesen beladenen CMS Nanotransportern sollen in der Folge dieselben Heilungsstudien an Vollhautmodellen durchgeführt werden, um einen besseren Vergleich der beiden Trägersysteme und schließlich eine Entscheidung für eines davon zu ermöglichen.

Zur besseren Auswertbarkeit der 3D-Modell-generierten Daten zur Wundheilung sollte immunhistochemische Färbung der Gewebeschnitte erwogen werden. Durch Anfärben spezifischer Markerproteine könnte es nämlich möglich sein, bestimmte Vorgänge der Wundheilung zu visualisieren: So ist zum Beispiel der Wiederaufbau einer Basallamina durch Immunfluoreszenz-Detektion von Kollagen IV beschrieben (Vaughan et al., 2004); die Anfärbung von Involucrin gibt Hinweis auf die Ausdifferenzierung von Keratinozyten (Banks-Schlegel & Green, 1981), die während des Aufbaus einer neuen Epidermis stattfindet. Die Proteine Keratin 5 und 14 können als spezifische Marker für basale Keratinozyten eingesetzt werden (Purkis et al., 1990), während Keratin 16 nur in aktivierten Keratinozyten gefunden wird (Vaughan et al., 2004).

In Kooperation mit Partnern der Charité sollen die *in vitro* erhaltenen Daten zur Heilungsförderung im optimalen Falle in Zukunft *in vivo* bestätigt werden.

6 Zusammenfassung

Bei schweren und schwersten Schmerzen durch Verletzungen der Haut, einerseits nach Verbrennungen und Hauttransplantationen, andererseits auch bei chronischen Wunden wie dem Ulcus cruris erfordert eine erfolgreiche Schmerzbehandlung heutzutage die systemische Applikation von hochwirksamen Opioiden. Damit verbunden ist jedoch häufig eine hohe Rate an unangenehmen (Obstipation) und teils sogar lebensgefährlichen Nebenwirkungen wie Atemdepression, weshalb eine lokale Anwendung dieser Stoffe bei Schmerzen in der Peripherie in Betracht gezogen werden muss. Wichtig dabei ist jedoch, dass der Wundheilungsprozess nicht beeinträchtigt, im besten Falle sogar gefördert wird. Um eine langfristige und gleichmäßige Substanzfreisetzung und damit einen möglichst späten Verbandwechsel von Hautwunden ohne zusätzliche systemische Opioiddosen zu ermöglichen, wird der Einsatz von Opioid-beladenen Nanopartikeln in Betracht gezogen. Deswegen war es auch Ziel der Arbeit, den Einfluss von zwei in Frage kommenden Partikelsystemen auf die Wundheilung zu klären.

Es ist zunächst gelungen, den Einfluss von Opioiden auf die für die Wundheilung bedeutende Keratinozytenmigration zu erschließen. Diese Untersuchungen erfolgten dabei mit der Keratinozytenzelllinie HaCaT. Alle Opiode (Morphin, Hydromorphon, Fentanyl, Buprenorphin) stimulierten die Keratinozytenmigration konzentrationsabhängig, der Effekt wurde durch den spezifischen Opioidrezeptorblocker Naloxon aufgehoben. Migrationsförderung konnte aber auch bei leicht sauren Bedingungen erzielt werden, was auf eine Anwendbarkeit der Opiode im entzündeten Milieu hindeutet. Zudem wurde nachgewiesen, dass diese Opioidwirkung zumindest im 5-stündigen Versuch auf rein chemotaktischen Eigenschaften der Opiode beruht. Einzig Buprenorphin als partieller Agonist hatte hier durch seine zusätzlich chemokinetische Wirkung eine Sonderstellung. Bei Verwendung der vier verschiedenen Substanzen zeigten sich am 2D-Modell kaum Unterschiede hinsichtlich der Wirkstärke der einzelnen Stoffe, weshalb die Begrenzung auf Morphin, stellvertretend für die Klasse der Opiode, bei weiterführenden aufwendigen Wundheilungsuntersuchungen gerechtfertigt erschien. Die Migrationsförderung als Ergebnis des Migrationsassays konnte in einem weiteren 2D-Versuch, dem Scratch-Test bestätigt werden.

Im Migrationsassay wurde außerdem die Eignung zweier in Frage kommender Trägersysteme (SLN und CMS Nanotransporter) geklärt, wobei sich zeigte, dass unbeladene CMS Nanotransporter die Keratinozytenmigration nicht stören, unbeladene SLN sie sogar

fördern können. Es fand offensichtlich eine Interaktion zwischen unbeladenen SLN bzw. CMS Nanotransportern und Morphin statt. Auch die Ergebnisse der Parelektrischen Spektroskopie konnten diese Vermutung bestätigen.

Um die in 2D-Zellversuchen erhaltenen Ergebnisse in einem dreidimensionalen Hautmodell zu überprüfen, wurde ein Wundheilungstest mit rekonstruierter Vollhaut (3D-Modell) etabliert, bei dem der Einfluss von Substanzen auf die Reepithelialisierung einer standardisierten Wunde verfolgt werden kann. Die Wunde wurde dabei mittels eines CO₂-Lasers induziert, der Grad der Heilung mittels HE-gefärbten Gewebeschnitten histologisch untersucht. Der gebildete Keratinozytensaum auf dem Wundgrund war vier Tage nach der Verletzung deutlich besser ausgeprägt, wenn während der Heilungsperiode eine Benetzung mit einer Morphinlösung stattfand. Ähnliche Ergebnisse wurden bei Auftragen von unbeladenen SLN auf die Wunde erhalten. Zudem zeigten auch erste Versuche mit Morphin-beladenen SLN eine deutlich verbesserte Wundheilung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Da nachgewiesen ist, dass die Produktion von Stickstoffmonoxid eine wichtige Rolle beim Wundheilungsprozess spielt, wurde ferner der Einfluss von Morphin auf die NO-Produktion von HaCaT Zellen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Zellen nach Morphinstimulation signifikant mehr NO ins Zellmedium abgaben als unstimuliert. Mittels quantitativer real-time PCR konnte allerdings kein Einfluss von Morphin auf die Expressionsmuster von NO-Synthasen verzeichnet werden. Ebenso konnte die Hypothese der Modifizierung der Expression dreier bei der Wundheilung involvierter Matrix-Metalloproteinasen (MMP-1, MMP-2, MMP-9) durch real-time PCR nicht bestätigt werden.

Zellviabilitätsuntersuchungen zeigten, dass nach einer Verletzung bei Aufbringen von Morphin direkt auf die Keratinozyten keine zellschädigenden Auswirkungen zu befürchten sind. Selbst bei der höchsten verwendeten Morphinkonzentration nahm der Anteil an lebenden Zellen kaum ab, weshalb die topische Applikation von Morphin als unbedenklich für die Keratinozyten eingestuft werden kann.

Im Hinblick auf weitere Untersuchungen zur Penetration und Permeation von Morphin bei gesunder sowie bei verletzter Haut war es ein weiteres Ziel der Arbeit, eine HPLC-Methode zur Detektion und Quantifizierung von Morphin und seinen beiden Metaboliten Morphin-3- und Morphin-6-Glucuronid zu etablieren. Auf der Grundlage einer bereits veröffentlichten Methode ist es gelungen, eine Gradientenmethode mit anschließender UV-Detektion zu entwickeln. Es konnten gut reproduzierbare und getrennte Peaks für die drei

Einzelsubstanzen sowie den internen Standard Codein erzeugt werden. Die Prävalidierung der Methode wurde erfolgreich abgeschlossen.

7 Summary

Treatment of severe pain due to skin wounds, resulting either from burns or after skin grafting as well as pain as a result from chronic wounds, asks for the systemic administration of potent opioids. This often implies a high incidence of unwanted side effects like constipation or even severe ones like respiratory depression. Therefore, for treatment of peripheral pain, a local administration of opioids has to be considered. Hereby an interference with the wound healing process has to be excluded, at the best it can even be improved. A long lasting and consistent drug release from opioid-loaded nanoparticles can enable a delayed change of wound dressing without the need of additional systemic opioids. The change of wound dressings is strongly painful for the patient. Therefore the aim of this study was to elucidate the influence of opioids as well as two different types of nanoparticles on the wound healing process.

First, the influence of different opioids on the migration of keratinocytes as an important event of wound healing was investigated using the keratinocyte cell line HaCaT. All opioids tested (morphine, hydromorphone, fentanyl and buprenorphine) stimulated keratinocyte migration in a concentration dependant manner, effects could be blocked by the opioid receptor antagonist naloxone. Induction of migration was also achieved using acidified environment, suggesting applicability even in inflamed wound areas. Furthermore it was shown that opioid action is based only on a chemotactic ability in the 5 h experiments. Only buprenorphine showed additional chemokinetic action, possibly due to its quality as a partial antagonist. Since morphine, hydromorphone, fentanyl and buprenorphine did not differ in their potency to a relevant extent, morphine was used as a representative for further investigations concerning wound healing. In the scratch assay, a second test system for 2D migration, the results from the migration assay were confirmed.

Additionally, two different carriers (SLN and CMS nanotransporters) were investigated for their potential as possible delivery systems. Unloaded CMS nanotransporters did not interfere with keratinocyte migration, unloaded SLN even induced it. Obviously unloaded SLN and CMS nanotransporters interacted with morphine. Results obtained from preelectric spectroscopy confirmed this hypothesis.

A third wound healing test system using reconstructed human full thickness skin (3D model) was established to prove the results obtained from the 2D assays. Herein the influence of

different substances on the reepithelialization of a standardized wound was followed histologically. Wound induction was achieved using a CO₂-laser, wound healing was investigated by the morphology of HE-stained tissue sections showing reepithelialization of the wound by newly formed keratinocytes. 4 days after wounding the margin of keratinocytes was considerably thicker when wounds were supplied with morphine-containing solution during the healing period. Similar results were obtained when applying unloaded SLN onto the wounds. Furthermore, morphine-loaded SLN also showed improved wound healing in comparison to the untreated control.

It has been shown that production of nitric oxide plays an important role during wound healing. Therefore the influence of morphine on the production of nitric oxide by HaCaT cells has been investigated, too. Cells stimulated with morphine produced significantly more nitric oxide than unstimulated cells. Using real-time PCR, however, no influence of morphine on the expression of NO-synthases could be confirmed. Similarly, no alterations in the expression patterns of 3 different matrix-metalloproteinases (MMP-1, MMP-2, MMP-9) involved in wound healing could be displayed.

MTT assays showed that exposure of keratinocytes in wounded skin to morphine will not affect their viability. Even with the highest concentration used, no decrease in the number of viable cells was seen, indicating a topical administration of morphine onto keratinocytes to be safe.

With regard to further investigations concerning penetration and permeation of morphine into healthy and wounded skin, the establishment of an HPLC method to detect and quantify morphine and its two major metabolites morphine-3- and morphine-6-glucuronide was a further aim. Based on a published method, a new method using a gradient of two solvents followed by an UV-detection was developed. The 3 substances and the internal standard codein were separated well and the method appeared to display good reproducibility. Prevalidation of the method was achieved successfully.

8 Literatur

<http://www.br-online.de/wissen->

[bildung/collegeradio/medien/biologie/haut/bildarchiv/aufbau_gross.jpg](http://www.br-online.de/wissen-bildung/collegeradio/medien/biologie/haut/bildarchiv/aufbau_gross.jpg).

Abbott FV and Palmour RM (1988) Morphine-6-glucuronide: analgesic effects and receptor binding profile in rats. *Life Sci* **43**:1685-95.

Aktan F (2004) iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* **75**:639-53.

Al-Asmari AI and Anderson RA (2007) Method for quantification of opioids and their metabolites in autopsy blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* **31**:394-408.

Alderton WK, Cooper CE and Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* **357**:593-615.

Andreassi A, Bilenchi R, Biagioli M and D'Aniello C (2005) Classification and pathophysiology of skin grafts. *Clin Dermatol* **23**:332-7.

Archer SB, Henke A, Greenhalgh DG and Warden GD (1998) The use of sheet autografts to cover extensive burns in patients. *J Burn Care Rehabil* **19**:33-8.

Ary K and Rona K (2001) LC determination of morphine and morphine glucuronides in human plasma by coulometric and UV detection. *J Pharm Biomed Anal* **26**:179-87.

Back IN and Finlay I (1995) Analgesic effect of topical opioids on painful skin ulcers. *J Pain Symptom Manage* **10**:493.

Banks-Schlegel S and Green H (1981) Involucrin synthesis and tissue assembly by keratinocytes in natural and cultured human epithelia. *J Cell Biol* **90**:732-7.

Barbieri CE, Tang LJ, Brown KA and Pietenpol JA (2006) Loss of p63 leads to increased cell migration and up-regulation of genes involved in invasion and metastasis. *Cancer Res* **66**:7589-97.

Bartolmäs T, Heyn T, Mickleit M, Fischer A, Reutter W and Danker K (2005) Glucosamine-glycerophospholipids that activate cell-matrix adhesion and migration. *J Med Chem* **48**:6750-5.

Baudouin JE and Tachon P (1996) Constitutive nitric oxide synthase is present in normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **106**:428-31.

Baum CL and Arpey CJ (2005) Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg* **31**:674-86; discussion 686.

Bigliardi PL, Bigliardi-Qi M, Buechner S and Ruffli T (1998) Expression of mu-opiate receptor in human epidermis and keratinocytes. *J Invest Dermatol* **111**:297-301.

- Bigliardi PL, Buchner S, Rufli T and Bigliardi-Qi M (2002) Specific stimulation of migration of human keratinocytes by mu-opiate receptor agonists. *J Recept Signal Transduct Res* **22**:191-9.
- Bigliardi-Qi M, Gaveriaux-Ruff C, Zhou H, Hell C, Bady P, Rufli T, Kieffer B and Bigliardi P (2006) Deletion of delta-opioid receptor in mice alters skin differentiation and delays wound healing. *Differentiation* **74**:174-85.
- Bigliardi-Qi M, Sumanovski LT, Buchner S, Rufli T and Bigliardi PL (2004) Mu-opiate receptor and Beta-endorphin expression in nerve endings and keratinocytes in human skin. *Dermatology* **209**:183-9.
- Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A and Engler JA (1993) Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* **4**:197-250.
- Blaschke T, Kankate L and Kramer KD (2007) Structure and dynamics of drug-carrier systems as studied by preelectric spectroscopy. *Adv Drug Deliv Rev* **59**:403-10.
- Bouwstra JA, Honeywell-Nguyen PL, Gooris GS and Ponec M (2003) Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog Lipid Res* **42**:1-36.
- Braem C, Blaschke T, Panek-Minkin G, Herrmann W, Schlupp P, Paepenmuller T, Müller-Goyman C, Mehnert W, Bittl R, Schäfer-Korting M and Kramer KD (2007) Interaction of drug molecules with carrier systems as studied by preelectric spectroscopy and electron spin resonance. *J Control Release* **119**:128-35.
- Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A and Chakraborti T (2003) Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* **253**:269-85.
- Chari G, Gulati A, Bhat R and Tebbett IR (1991) High-performance liquid chromatographic determination of morphine, morphine-3-glucuronide, morphine-6-glucuronide and codeine in biological samples using multi-wavelength forward optical detection. *J Chromatogr* **571**:263-70.
- Choiniere M, Grenier R and Paquette C (1992) Patient-controlled analgesia: a double-blind study in burn patients. *Anaesthesia* **47**:467-72.
- Clark JD, Shi X, Li X, Qiao Y, Liang D, Angst MS and Yeomans DC (2007) Morphine reduces local cytokine expression and neutrophil infiltration after incision. *Mol Pain* **3**:28.
- Coffman BL, Rios GR, King CD and Tephly TR (1997) Human UGT2B7 catalyzes morphine glucuronidation. *Drug Metab Dispos* **25**:1-4.
- Cone EJ, Gorodetzky CW, Yousefnejad D, Buchwald WF and Johnson RE (1984) The metabolism and excretion of buprenorphine in humans. *Drug Metab Dispos* **12**:577-81.

- Cooper B, Brimer N and Vande Pol SB (2007) Human papillomavirus E6 regulates the cytoskeleton dynamics of keratinocytes through targeted degradation of p53. *J Virol* **81**:12675-9.
- Coulombe PA (2003) Wound epithelialization: accelerating the pace of discovery. *J Invest Dermatol* **121**:219-30.
- Cuignet O, Mbuyamba J and Pirson J (2005) The long-term analgesic efficacy of a single-shot fascia iliaca compartment block in burn patients undergoing skin-grafting procedures. *J Burn Care Rehabil* **26**:409-15.
- Cuignet O, Pirson J, Boughrough J and Duville D (2004) The efficacy of continuous fascia iliaca compartment block for pain management in burn patients undergoing skin grafting procedures. *Anesth Analg* **98**:1077-81, table of contents.
- D'Armiento J, DiColandrea T, Dalal SS, Okada Y, Huang MT, Conney AH and Chada K (1995) Collagenase expression in transgenic mouse skin causes hyperkeratosis and acanthosis and increases susceptibility to tumorigenesis. *Mol Cell Biol* **15**:5732-9.
- Delgado AV, McManus AT and Chambers JP (2005) Exogenous administration of Substance P enhances wound healing in a novel skin-injury model. *Exp Biol Med (Maywood)* **230**:271-80.
- DiPietro LA (1995) Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock* **4**:233-40.
- Donnelly TH, Laskowski M, Jr., Scheraga HA and Van Tijn BA (1956) The proteolytic action of thrombin on fibrinogen. *J Biol Chem* **222**:815-21.
- Efron JE, Frankel HL, Lazarou SA, Wasserkrug HL and Barbul A (1990) Wound healing and T-lymphocytes. *J Surg Res* **48**:460-3.
- El Ghalbzouri A, Hensbergen P, Gibbs S, Kempenaar J, van der Schors R and Ponc M (2004) Fibroblasts facilitate re-epithelialization in wounded human skin equivalents. *Lab Invest* **84**:102-12.
- Elliott SF, Coon CI, Hays E, Stadheim TA and Vincenti MP (2002) Bcl-3 is an interleukin-1-responsive gene in chondrocytes and synovial fibroblasts that activates transcription of the matrix metalloproteinase 1 gene. *Arthritis Rheum* **46**:3230-9.
- Falanga V, Isaacs C, Paquette D, Downing G, Kouttab N, Butmarc J, Badiavas E and Hardin-Young J (2002) Wounding of bioengineered skin: cellular and molecular aspects after injury. *J Invest Dermatol* **119**:653-60.
- Feierman DE and Lasker JM (1996) Metabolism of fentanyl, a synthetic opioid analgesic, by human liver microsomes. Role of CYP3A4. *Drug Metab Dispos* **24**:932-9.
- Feldman DL, Rogers A and Karpinski RH (1991) A prospective trial comparing Biobrane, Duoderm and xeroform for skin graft donor sites. *Surg Gynecol Obstet* **173**:1-5.

- Flock P (2003) Pilot study to determine the effectiveness of diamorphine gel to control pressure ulcer pain. *J Pain Symptom Manage* **25**:547-54.
- Frances B, Gout R, Campistron G, Panconi E and Cros J (1990) Morphine-6-glucuronide is more mu-selective and potent in analgesic tests than morphine. *Prog Clin Biol Res* **328**:477-80.
- Freitas C and Müller RH (1999) Stability determination of solid lipid nanoparticles (SLN) in aqueous dispersion after addition of electrolyte. *J Microencapsul* **16**:59-71.
- Freye E (1999) *Opiode in der Medizin*. Springer Verlag, Heidelberg.
- Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG and Quaranta V (1997) Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science* **277**:225-8.
- Gill SE and Parks WC (2008) Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* **40**:1334-47.
- Gupta K, Kshirsagar S, Chang L, Schwartz R, Law PY, Yee D and Hebbel RP (2002) Morphine stimulates angiogenesis by activating proangiogenic and survival-promoting signaling and promotes breast tumor growth. *Cancer Res* **62**:4491-8.
- Gysler A, Kleuser B, Sippl W, Lange K, Korting HC and Holtje HD (1999) Skin penetration and metabolism of topical glucocorticoids in reconstructed epidermis and in excised human skin. *Pharm Res* **16**:1386-91.
- Gysler A, Lange K, Korting HC and Schäfer-Korting M (1997) Prednicarbate biotransformation in human foreskin keratinocytes and fibroblasts. *Pharm Res* **14**:793-7.
- H.C. Niesel HvA (2002) *Regionalanästhesie, Lokalanästhesie, regionale Schmerztherapie*. Georg Thieme Verlag.
- Haag R (2004) Supramolecular drug-delivery systems based on polymeric core-shell architectures. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**:278-82.
- Harms K, Nozell S and Chen X (2004) The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *Cell Mol Life Sci* **61**:822-42.
- Hassan AH, Ableitner A, Stein C and Herz A (1993) Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue. *Neuroscience* **55**:185-95.
- Hebda PA, Collins MA and Tharp MD (1993) Mast cell and myofibroblast in wound healing. *Dermatol Clin* **11**:685-96.
- Herzinger T, Kleuser B, Schäfer-Korting M and Korting HC (2007) Sphingosine-1-phosphate signaling and the skin. *Am J Clin Dermatol* **8**:329-36.

- Hintermann E, Bilban M, Sharabi A and Quaranta V (2001) Inhibitory role of alpha 6 beta 4-associated erbB-2 and phosphoinositide 3-kinase in keratinocyte haptotactic migration dependent on alpha 3 beta 1 integrin. *J Cell Biol* **153**:465-78.
- Hornstein OPN, Eberhard (1985) *Externe Therapie von Hautkrankheiten*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Howdieshell TR, Webb WL, Sathyanarayana and McNeil PL (2003) Inhibition of inducible nitric oxide synthase results in reductions in wound vascular endothelial growth factor expression, granulation tissue formation, and local perfusion. *Surgery* **133**:528-37.
- Hu FQ, Yuan H, Zhang HH and Fang M (2002) Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. *Int J Pharm* **239**:121-8.
- Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA and Morris HR (1975) Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* **258**:577-80.
- Hupka Y, Beike J, Roegener J, Brinkmann B, Blaschke G and Kohler H (2005) HPLC with laser-induced native fluorescence detection for morphine and morphine glucuronides from blood after immunoaffinity extraction. *Int J Legal Med* **119**:121-8.
- Ichikawa T, Suenaga Y, Koda T, Ozaki T and Nakagawara A (2008) DeltaNp63/BMP-7-dependent expression of matrilin-2 is involved in keratinocyte migration in response to wounding. *Biochem Biophys Res Commun* **369**:994-1000.
- Igarashi J and Michel T (2008) S1P and eNOS regulation. *Biochim Biophys Acta* **1781**:489-95.
- Iglesias M, Segura MF, Comella JX and Olmos G (2003) Mu-opioid receptor activation prevents apoptosis following serum withdrawal in differentiated SH-SY5Y cells and cortical neurons via phosphatidylinositol 3-kinase. *Neuropharmacology* **44**:482-92.
- Iijima H, Kasai N, Chiku H, Murakami S, Sugawara F, Sakaguchi K, Yoshida H and Mizushima Y (2006) The inhibitory action of long-chain fatty acids on the DNA binding activity of p53. *Lipids* **41**:521-7.
- Jenning V, Schäfer-Korting M and Gohla S (2000a) Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. *J Control Release* **66**:115-26.
- Jenning V, Thunemann AF and Gohla SH (2000b) Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *Int J Pharm* **199**:167-77.
- Kampa M, Hatzoglou A, Notas G, Niniraki M, Kouroumalis E and Castanas E (2001) Opioids are non-competitive inhibitors of nitric oxide synthase in T47D human breast cancer cells. *Cell Death Differ* **8**:943-52.

- Khalil Z, Sanderson K, Modig M and Nyberg F (1999) Modulation of peripheral inflammation by locally administered endomorphin-1. *Inflamm Res* **48**:550-6.
- Kirk SJ, Hurson M, Regan MC, Holt DR, Wasserkrug HL and Barbul A (1993) Arginine stimulates wound healing and immune function in elderly human beings. *Surgery* **114**:155-9; discussion 160.
- Kogan L and Govrin-Yehudain J (2003) Vertical (two-layer) skin grafting: new reserves for autologous skin. *Ann Plast Surg* **50**:514-6.
- Koivisto L, Jiang G, Hakkinen L, Chan B and Larjava H (2006) HaCaT keratinocyte migration is dependent on epidermal growth factor receptor signaling and glycogen synthase kinase-3alpha. *Exp Cell Res* **312**:2791-805.
- Küchler S, Abdel-Mottaleb M, Lamprecht A, Radowski MR, Haag R and Schäfer-Korting M (2009a) Influence of nanocarrier type and size on skin delivery of hydrophilic agents. *Int J Pharm* **377**:169-72.
- Küchler S, Radowski MR, Blaschke T, Dathe M, Plendl J, Haag R, Schäfer-Korting M and Kramer KD (2009b) Nanoparticles for skin penetration enhancement--a comparison of a dendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* **71**:243-50.
- Ladwig GP, Robson MC, Liu R, Kuhn MA, Muir DF and Schultz GS (2002) Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers. *Wound Repair Regen* **10**:26-37.
- Laplante AF, Germain L, Auger FA and Moulin V (2001) Mechanisms of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions. *Faseb J* **15**:2377-89.
- Lee PC, Salyapongse AN, Bragdon GA, Shears LL, 2nd, Watkins SC, Edington HD and Billiar TR (1999) Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Am J Physiol* **277**:H1600-8.
- Lehrberger K, Stein C, Hassan A and Yassouridis A (1994) Opioids as novel intra-articular agents for analgesia following arthroscopic knee surgery. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* **2**:174-5.
- Likar R, Koppert W, Blatnig H, Chiari F, Sittl R, Stein C and Schafer M (2001) Efficacy of peripheral morphine analgesia in inflamed, non-inflamed and perineural tissue of dental surgery patients. *J Pain Symptom Manage* **21**:330-7.
- Likar R, Schafer M, Paulak F, Sittl R, Pipam W, Schalk H, Geissler D and Bernatzky G (1997) Intraarticular morphine analgesia in chronic pain patients with osteoarthritis. *Anesth Analg* **84**:1313-7.

- Lombardi Borgia S, Regehly M, Sivaramakrishnan R, Mehnert W, Korting HC, Danker K, Roder B, Kramer KD and Schafer-Korting M (2005a) Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement-correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and parelectric spectroscopy. *J Control Release* **110**:151-63.
- Lombardi Borgia S, Regehly M, Sivaramakrishnan R, Mehnert W, Korting HC, Danker K, Roder B, Kramer KD and Schäfer-Korting M (2005b) Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement-correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and parelectric spectroscopy. *J Control Release* **110**:151-63.
- Long TD, Cathers TA, Twillman R, O'Donnell T, Garrigues N and Jones T (2001) Morphine-Infused silver sulfadiazine (MISS) cream for burn analgesia: a pilot study. *J Burn Care Rehabil* **22**:118-23.
- Lötsch J (2005) Opioid metabolites. *J Pain Symptom Manage* **29**:S10-24.
- Lysle DT and How T (2000) Heroin modulates the expression of inducible nitric oxide synthase. *Immunopharmacology* **46**:181-92.
- Mabuchi M, Takatsuka S, Matsuoka M and Tagawa K (2004) Determination of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in monkey and dog plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* **35**:563-73.
- Machelska H, Ziolkowska B, Mika J, Przewlocka B and Przewlocki R (1997) Chronic morphine increases biosynthesis of nitric oxide synthase in the rat spinal cord. *Neuroreport* **8**:2743-7.
- Madlener M, Parks WC and Werner S (1998) Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair. *Exp Cell Res* **242**:201-10.
- Makela M, Larjava H, Pirila E, Maisi P, Salo T, Sorsa T and Uitto VJ (1999) Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) is related to migration of keratinocytes. *Exp Cell Res* **251**:67-78.
- Mattia C and Coluzzi F (2007) Acute postoperative pain management: focus on iontophoretic transdermal fentanyl. *Ther Clin Risk Manag* **3**:19-27.
- Mehnert W and Mader K (2001) Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev* **47**:165-96.
- Milne RW, Nation RL, Reynolds GD, Somogyi AA and Van Crugten JT (1991) High-performance liquid chromatographic determination of morphine and its 3- and 6-glucuronide metabolites: improvements to the method and application to stability studies. *J Chromatogr* **565**:457-64.

- Mosesson MW, Siebenlist KR and Meh DA (2001) The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Ann N Y Acad Sci* **936**:11-30.
- Mulholland B, Tuft SJ and Khaw PT (2005) Matrix metalloproteinase distribution during early corneal wound healing. *Eye* **19**:584-8.
- Müller RH, Maassen S, Weyhers H and Mehnert W (1996) Phagocytic uptake and cytotoxicity of solid lipid nanoparticles (SLN) sterically stabilized with poloxamine 908 and poloxamer 407. *J Drug Target* **4**:161-70.
- Müller RH, Radtke M and Wissing SA (2002) Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv Drug Deliv Rev* **54 Suppl 1**:S131-55.
- Nath RK, Xiong W, Humphries AD and Beri R (2007) Treatment with antisense oligonucleotide reduces the expression of type I collagen in a human-skin organ-wound model: implications for antifibrotic gene therapy. *Ann Plast Surg* **59**:699-706.
- Noiri E, Peresleni T, Srivastava N, Weber P, Bahou WF, Peunova N and Goligorsky MS (1996) Nitric oxide is necessary for a switch from stationary to locomoting phenotype in epithelial cells. *Am J Physiol* **270**:C794-802.
- Ohara T, Itoh T and Takahashi M (2005) Immunosuppression by morphine-induced lymphocyte apoptosis: is it a real issue? *Anesth Analg* **101**:1117-22, table of contents.
- Olbrich C and Müller RH (1999) Enzymatic degradation of SLN-effect of surfactant and surfactant mixtures. *Int J Pharm* **180**:31-9.
- Page M, Bejaoui N, Cinq-Mars B and Lemieux P (1988) Optimization of the tetrazolium-based colorimetric assay for the measurement of cell number and cytotoxicity. *Int J Immunopharmacol* **10**:785-93.
- Pal SK, Cortiella J and Herndon D (1997) Adjunctive methods of pain control in burns. *Burns* **23**:404-12.
- Pan J, Burgher KL, Szczepanik AM and Ringheim GE (1996) Tyrosine phosphorylation of inducible nitric oxide synthase: implications for potential post-translational regulation. *Biochem J* **314 (Pt 3)**:889-94.
- Paul D, Standifer KM, Inturrisi CE and Pasternak GW (1989) Pharmacological characterization of morphine-6 beta-glucuronide, a very potent morphine metabolite. *J Pharmacol Exp Ther* **251**:477-83.
- Pert CB and Snyder SH (1973) Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* **179**:1011-4.
- Pilcher BK, Dumin JA, Sudbeck BD, Krane SM, Welgus HG and Parks WC (1997) The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol* **137**:1445-57.

- Pilcher BK, Wang M, Qin XJ, Parks WC, Senior RM and Welgus HG (1999) Role of matrix metalloproteinases and their inhibition in cutaneous wound healing and allergic contact hypersensitivity. *Ann N Y Acad Sci* **878**:12-24.
- Platzer M, Likar R, Stein C, Beubler E and Sittl R (2005) [Topical application of morphine gel in inflammatory mucosal and cutaneous lesions]. *Schmerz* **19**:296-301.
- Poonawala T, Levay-Young BK, Hebbel RP and Gupta K (2005) Opioids heal ischemic wounds in the rat. *Wound Repair Regen* **13**:165-74.
- Purkis PE, Steel JB, Mackenzie IC, Nathrath WB, Leigh IM and Lane EB (1990) Antibody markers of basal cells in complex epithelia. *J Cell Sci* **97 (Pt 1)**:39-50.
- Radowski MR, Shukla A, von Berlepsch H, Bottcher C, Pickaert G, Rehage H and Haag R (2007) Supramolecular aggregates of dendritic multishell architectures as universal nanocarriers. *Angew Chem Int Ed Engl* **46**:1265-9.
- Remensnyder JP and Majno G (1968) Oxygen gradients in healing wounds. *Am J Pathol* **52**:301-23.
- Ribeiro MD, Joel SP and Zeppetella G (2004) The bioavailability of morphine applied topically to cutaneous ulcers. *J Pain Symptom Manage* **27**:434-9.
- Roger L, Gadea G and Roux P (2006) Control of cell migration: a tumour suppressor function for p53? *Biol Cell* **98**:141-52.
- Rook JM, Hasan W and McCarson KE (2008) Temporal effects of topical morphine application on cutaneous wound healing. *Anesthesiology* **109**:130-6.
- Rook JM, Hasan W and McCarson KE (2009) Morphine-induced early delays in wound closure: involvement of sensory neuropeptides and modification of neurokinin receptor expression. *Biochem Pharmacol* **77**:1747-55.
- Rook JM and McCarson KE (2007) Delay of cutaneous wound closure by morphine via local blockade of peripheral tachykinin release. *Biochem Pharmacol* **74**:752-7.
- Rossi GC, Brown GP, Leventhal L, Yang K and Pasternak GW (1996) Novel receptor mechanisms for heroin and morphine-6 beta-glucuronide analgesia. *Neurosci Lett* **216**:1-4.
- Sahebgharani M, Nejati M, Sepehrizadeh Z, Khorramizadeh MR, Bahrololoumi-Shapourabadi M, Hashemi-Bozchlou S, Esmaeili J and Ghazi-Khansari M (2008) Lithium chloride protects PC12 pheochromocytoma cell line from morphine-induced apoptosis. *Arch Iran Med* **11**:639-48.
- Salemi S, Aeschlimann A, Reisch N, Jungel A, Gay RE, Heppner FL, Michel BA, Gay S and Sprott H (2005) Detection of kappa and delta opioid receptors in skin--outside the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* **338**:1012-7.

- Santos Maia C, Mehnert W, Schaller M, Korting HC, Gysler A, Haberland A and Schäfer-Korting M (2002) Drug targeting by solid lipid nanoparticles for dermal use. *J Drug Target* **10**:489-95.
- Saric A, Balog T, Sobocanec S and Marotti T (2007) Endomorphin 1 activates nitric oxide synthase 2 activity and downregulates nitric oxide synthase 2 mRNA expression. *Neuroscience* **144**:1454-61.
- Sauer B, Vogler R, Zimmermann K, Fujii M, Anzano MB, Schafer-Korting M, Roberts AB and Kleuser B (2004) Lysophosphatidic acid interacts with transforming growth factor-beta signaling to mediate keratinocyte growth arrest and chemotaxis. *J Invest Dermatol* **123**:840-9.
- Schäfer-Korting M, Mehnert W and Korting HC (2007) Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Adv Drug Deliv Rev* **59**:427-43.
- Schürer N, Kohne A, Schliep V, Barlag K and Goerz G (1993) Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes. *Exp Dermatol* **2**:179-85.
- Schwentker A, Vodovotz Y, Weller R and Billiar TR (2002) Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? *Nitric Oxide* **7**:1-10.
- Shah KA, Date AA, Joshi MD and Patravale VB (2007) Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: potential in topical delivery. *Int J Pharm* **345**:163-71.
- Shariftabrizi A, Nifli AP, Ansari M, Saadat F, Ebrahimkhani MR, Alizadeh N, Nasseh A, Alexaki VI, Dehpour AR, Castanas E and Khorramizadeh MR (2006) Matrix metalloproteinase 2 secretion in WEHI 164 fibrosarcoma cells is nitric oxide-related and modified by morphine. *Eur J Pharmacol* **530**:33-9.
- Singer AJ and Clark RA (1999) Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* **341**:738-46.
- Singhal PC, Kapasi AA, Reddy K, Franki N, Gibbons N and Ding G (1999) Morphine promotes apoptosis in Jurkat cells. *J Leukoc Biol* **66**:650-8.
- Singhal PC, Sharma P, Kapasi AA, Reddy K, Franki N and Gibbons N (1998) Morphine enhances macrophage apoptosis. *J Immunol* **160**:1886-93.
- Sivaramakrishnan R, Nakamura C, Mehnert W, Korting HC, Kramer KD and Schäfer-Korting M (2004) Glucocorticoid entrapment into lipid carriers--characterisation by preelectric spectroscopy and influence on dermal uptake. *J Control Release* **97**:493-502.
- Soo C, Shaw WW, Zhang X, Longaker MT, Howard EW and Ting K (2000) Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue-derived inhibitors in cutaneous wound repair. *Plast Reconstr Surg* **105**:638-47.
- Stallmeyer B, Anhold M, Wetzler C, Kahlina K, Pfeilschifter J and Frank S (2002) Regulation of eNOS in normal and diabetes-impaired skin repair: implications for tissue regeneration. *Nitric Oxide* **6**:168-77.

- Stallmeyer B, Kampfer H, Kolb N, Pfeilschifter J and Frank S (1999) The function of nitric oxide in wound repair: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization. *J Invest Dermatol* **113**:1090-8.
- Stecova J, Mehnert W, Blaschke T, Kleuser B, Sivaramakrishnan R, Zouboulis CC, Seltmann H, Korting HC, Kramer KD and Schäfer-Korting M (2007) Cyproterone acetate loading to lipid nanoparticles for topical acne treatment: particle characterisation and skin uptake. *Pharm Res* **24**:991-1000.
- Stefano GB, Goumon Y, Bilfinger TV, Welters ID and Cadet P (2000) Basal nitric oxide limits immune, nervous and cardiovascular excitation: human endothelia express a mu opiate receptor. *Prog Neurobiol* **60**:513-30.
- Stein C and Lang LJ (2009) Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Curr Opin Pharmacol* **9**:3-8.
- Stetler-Stevenson WG and Yu AE (2001) Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Semin Cancer Biol* **11**:143-52.
- Stiernberg J, Redin WR, Warner WS and Carney DH (1993) The role of thrombin and thrombin receptor activating peptide (TRAP-508) in initiation of tissue repair. *Thromb Haemost* **70**:158-62.
- Stricklin GP and Nanney LB (1994) Immunolocalization of collagenase and TIMP in healing human burn wounds. *J Invest Dermatol* **103**:488-92.
- Svensson JO, Rane A, Sawe J and Sjoqvist F (1982) Determination of morphine, morphine-3-glucuronide and (tentatively) morphine-6-glucuronide in plasma and urine using ion-pair high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **230**:427-32.
- Szabo I, Simon M, Jr. and Hunyadi J (2004) Plasmin promotes keratinocyte migration and phagocytic-killing accompanied by suppression of cell proliferation which may facilitate re-epithelialization of wound beds. *Clin Dev Immunol* **11**:233-40.
- Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT and Lavker RM (2000) Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* **102**:451-61.
- Taylor K and Elliott S (2009) A validated hybrid quadrupole linear ion-trap LC-MS method for the analysis of morphine and morphine glucuronides applied to opiate deaths. *Forensic Sci Int* **187**:34-41.
- Trengove NJ, Stacey MC, MacAuley S, Bennett N, Gibson J, Burslem F, Murphy G and Schultz G (1999) Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair Regen* **7**:442-52.
- Trescot AM, Datta S, Lee M and Hansen H (2008) Opioid pharmacology. *Pain Physician* **11**:S133-53.
- Twillman RK, Long TD, Cathers TA and Mueller DW (1999) Treatment of painful skin ulcers with topical opioids. *J Pain Symptom Manage* **17**:288-92.

- Vaughan MB, Ramirez RD, Brown SA, Yang JC, Wright WE and Shay JW (2004) A reproducible laser-wounded skin equivalent model to study the effects of aging in vitro. *Rejuvenation Res* **7**:99-110.
- Vigano MA, Lamartine J, Testoni B, Merico D, Alotto D, Castagnoli C, Robert A, Candi E, Melino G, Gidrol X and Mantovani R (2006) New p63 targets in keratinocytes identified by a genome-wide approach. *Embo J* **25**:5105-16.
- Vogler R, Sauer B, Kim DS, Schäfer-Korting M and Kleuser B (2003) Sphingosine-1-phosphate and its potentially paradoxical effects on critical parameters of cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol* **120**:693-700.
- Voineskos SH, Ayeni OA, McKnight L and Thoma A (2009) Systematic review of skin graft donor-site dressings. *Plast Reconstr Surg* **124**:298-306.
- Vujic V, Stanojevic S and Dimitrijevic M (2004) Methionine-enkephalin stimulates hydrogen peroxide and nitric oxide production in rat peritoneal macrophages: interaction of mu, delta and kappa opioid receptors. *Neuroimmunomodulation* **11**:392-403.
- Watterson G, Howard R and Goldman A (2004) Peripheral opioids in inflammatory pain. *Arch Dis Child* **89**:679-81.
- Werner S and Grose R (2003) Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* **83**:835-70.
- Wiechula R (2003) The use of moist wound-healing dressings in the management of split-thickness skin graft donor sites: a systematic review. *Int J Nurs Pract* **9**:S9-17.
- Wissing SA and Müller RH (2001) Solid lipid nanoparticles (SLN)--a novel carrier for UV blockers. *Pharmazie* **56**:783-6.
- Wissing SA, Müller RH, Manthei L and Mayer C (2004) Structural characterization of Q10-loaded solid lipid nanoparticles by NMR spectroscopy. *Pharm Res* **21**:400-5.
- Wolf NB, Kuchler S, Radowski MR, Blaschke T, Kramer KD, Weindl G, Kleuser B, Haag R and Schäfer-Korting M (2009) Influences of opioids and nanoparticles on in vitro wound healing models. *Eur J Pharm Biopharm.*
- Yamasaki K, Edington HD, McClosky C, Tzeng E, Lizonova A, Kovesdi I, Steed DL and Billiar TR (1998) Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *J Clin Invest* **101**:967-71.
- Yin D, Mufson RA, Wang R and Shi Y (1999) Fas-mediated cell death promoted by opioids. *Nature* **397**:218.
- Yu AE, Hewitt RE, Connor EW and Stetler-Stevenson WG (1997) Matrix metalloproteinases. Novel targets for directed cancer therapy. *Drugs Aging* **11**:229-44.
- Zambruno G, Marchisio PC, Marconi A, Vaschieri C, Melchiori A, Giannetti A and De Luca M (1995) Transforming growth factor-beta 1 modulates beta 1 and beta 5 integrin

- receptors and induces the de novo expression of the alpha v beta 6 heterodimer in normal human keratinocytes: implications for wound healing. *J Cell Biol* **129**:853-65.
- Zapata-Sirvent R, Hansbrough JF, Carroll W, Johnson R and Wakimoto A (1985) Comparison of Biobrane and Scarlet Red dressings for treatment of donor site wounds. *Arch Surg* **120**:743-5.
- Zeppetella G, Paul J and Ribeiro MD (2003) Analgesic efficacy of morphine applied topically to painful ulcers. *J Pain Symptom Manage* **25**:555-8.
- Zeppetella G and Ribeiro MD (2005) Morphine in intrasite gel applied topically to painful ulcers. *J Pain Symptom Manage* **29**:118-9.
- Zipper H, Brunner H, Bernhagen J and Vitzthum F (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res* **32**:e103.
- Zöllner C, Mousa SA, Fischer O, Rittner HL, Shaqura M, Brack A, Shakibaei M, Binder W, Urban F, Stein C and Schafer M (2008) Chronic morphine use does not induce peripheral tolerance in a rat model of inflammatory pain. *J Clin Invest* **118**:1065-73.
- Zöllner C, Shaqura MA, Bopaiah CP, Mousa S, Stein C and Schafer M (2003) Painful inflammation-induced increase in mu-opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons. *Mol Pharmacol* **64**:202-10.
- zur Mühlen A, Schwarz C and Mehnert W (1998) Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery--drug release and release mechanism. *Eur J Pharm Biopharm* **45**:149-55.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.