

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Geräte

Für die Versuche wurden folgende Geräte verwendet:

Autoklav	Guwina Hofman, Berlin
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Dermatom	Aesculap, Tuttlingen
Differential Scanning Calorimeter DCS 821	Mettler Toledo, Gießen
Digitalkamera für Fluoreszenzmikroskop DXM1200	Nikon, Tokyo, Japan
Digitalthermometer	VWR Darmstadt
Filtrationseinheit Millipore®	Millipore-Waters, Eschborn
Fluoreszenzmikroskop BX41	Olympus, Tokyo, Japan
Franz-Zelle, Modell 4G-01-00-15-12	Permegear, Bethlehem, PA, USA
Frequenz-Analysator Typ ZVRE	Fa. Rohde & Schwarz, München
Gefriermikrotom Frigocut® 2800N	Leica, Bensheim
Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40	APV Gaulin, Lübeck
HPLC System:	BIO-TEK® Instruments GmbH, Neufahrn
Autosampler BIO-TEK 565	
UV-Detektor BIO-TEK 535	
Pumpe BIO-TEK 525	
Software KS 3000	
Säule 250 x 4,6 Multohyp ODS-3	CS-Chromatographie, Langerwehe
Vorsäule 20 x 4 Multohyp ODS-5	CS-Chromatographie, Langerwehe
Laserdiffraktometer Coulter LS 230	Coulter, Miami, FL
Magnetrührer IKAMAG® RCT	Janke & Kunkel, Staufen
Neubauer-Zählkammer (0,0025mm <sup>2</sup> /0,1mm)	Zeiss, Jena
Phasenkontrast-Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, Jena
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Nürnberg
Photonkorrelationspektrometer Zetasizer 4	Malvern Instruments, Malvern, UK
Pipetten, Eppendorf Reference®	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy®	Integra Bioscience, Fernwald

Schüttler IKA <sup>®</sup> MTS 2	Janke & Kunkel, Staufen
Sterilarbeitsbank LaminAir <sup>®</sup>	Heraeus, Hanau
Szintillationszähler 1450 Microbeta <sup>™</sup> Plus	Wallack, Freiburg
Thermoblock	Biometra, Göttingen
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Ultraschallbad Sonorex <sup>®</sup> RK 100	Bandelin, Berlin
Ultra-Turrax IKA <sup>®</sup> T25	Janke & Kunkel, Staufen
Vakuumpumpe Rotavapor	Büchi, Flawil, Schweiz
Vakuumpumpe Universal Vacuum System	Life Science, Frankfurt
Vakuum-Zentrifuge Speed-Vac <sup>®</sup> SC 100A	Savant, Bethesda, MD
Vortex-Gerät	Bender und Hobein, Zürich, Schweiz
Wasserbad DC3/W26	Haake, Karlsruhe
Zentrifuge Ependorf 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge <sup>®</sup> 1.0R	Heraeus, Hanau

### 2.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Folgende Reagenzien und Verbrauchsmaterialien wurden verwendet:

Acetonitril, HPLC Qualität	VWR, Darmstadt
Acrylamid/Bisacrylamid 40 %, 29:1	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Agarose (Elektrophoresis grade)	Life Technologies, Paisley
Agarosegelmarker	New England Biolabs, Frankfurt
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Ammoniumpuffersulfat	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Amphotericin B	Biochrom, Berlin
Androgenrezeptorantikörper	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Basis Creme DAC, Cremor basalis	Caelo, Minden
Borsäure	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Boviner Hypophysenextrakt, BPE	Cell Systems, St. Katharinen
Chloroform absolut	Sigma Aldrich, Deisenhofen

Compritrol® 888 ATO	Gatefossé, Saint-Priest, Frankreich
Cyanoacrylat Klebstoff Pattex	Henkel, Düsseldorf
Cyproteronacetat (CPA)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Deoxycholinsäure	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Dihydrotestosteron (DHT)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
1,2,6,7- <sup>3</sup> H-Dihydrotestosteron ( <sup>3</sup> H-DHT)	Amersham, Buckinghamshire, UK
Dimethylsulfoxid (DMSO)	VWR, Darmstadt
Dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Advanced Biotechnologies Ltd, Epsom, Surrey, U.K.
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Einbettmedium für das Gefriermikrotom	Leica, Bensheim
Epidermaler Wachstumsfaktor, human (hEGF)	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
Reaktionsgefäße Safe-Lock (0,5, 1,5, 2ml)	Biochrom, Berlin
Ethanol	VWR, Darmstadt
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Fetales Kälberserum, Aktivkohlebehandelt (akFKS)	Biochrom, Berlin
Gentamicinsulfat	Biochrom, Berlin
Glutamin	Biochrom, Berlin
Glycerol	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Glycin	ICN, Eschwege
HPR-gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG- Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Keratinocytenbasalmedium (KBM)	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
Kieselgel 60 mesh	VWR, Darmstadt

Insulin	Clonetics, San Diego, CA
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Clonetics, San Diego, CA
Magermilchpulver	Reichelt, Berlin
Miglyol® 812	Caelo, Minden
Multititerplatten (6-, 96-Loch, Flachboden)	Biochrom, Berlin
Multititerplatten Falcon (24-Loch, Flachboden)	VWR, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	VWR, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Natronlauge (NaOH) 1N	VWR, Darmstadt
Nonidet P-40	Sigma Aldrich, Deisenhofen
19-Nortestosteron (19-NT)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Oligo(dT)-Primer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ölsäure	Caelo, Minden
Poloxamer 188	BASF, Ludwigshafen
Polyklonaler AR-Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg
Precirol® ATO 188	Gatefossé, Saint-Priest, Frankreich
QuickPrep™ Micro mRNA Purification Kit	Amersham, Buckinghamshire, UK
Roller	Bauhaus, Berlin
RU 58841	Sanofi-Aventis Pharma, Berlin
RU 58841-myristat (RUM)	Institut für Pharmazie, FU Berlin
Sebomed Basalmedium (SBM)	Biochrom, Berlin
Skalpelle	Hammacher, Solingen
Stickstoff, flüssig	Air Liquide, Berlin
Scintillationsflüssigkeit Optiphase®	Wallack, Freiburg
Tesafilm®	Beiersdorf, Hamburg
N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin, TEMED	Biometria, Göttingen
[Methyl- <sup>3</sup> H]Thymidin	Amersham, Buckinghamshire, U.K.
Triessigsäure	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Trizma (Tris)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Trypsin	Biochrom, Berlin

Tween 20	ICN, Eschwege
Vancomycin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Wattestäbchen	Drospa, Berlin
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	Renner, Dannstadt
Zellschaber	Renner, Dannstadt
Zentrifugefilter Centrex 0,22 µm	Schleicher& Schuell, Dassel

### 2.3 Nährmedien und Lösungen

Die im Folgenden aufgeführten Nährmedien und Lösungen wurden in den Experimenten eingesetzt. Ihre Herstellung erfolgte in aseptischen Bedingungen.

**Keratinocytenmedium.** Für Anzucht, Kultivierung und für die Experimente wurde Keratinocytenwachstumsmedium (KGM) eingesetzt. Die Herstellung erfolgte aus Keratinocytenbasalmedium (KBM) durch Zusatz folgender Supplemente:

BPE	30 µg/ml
hEGF	0,1 µg/ml
Hydrocortison	0,5 µg/ml
Insulin	5 µg/ml
Amphotericin B	50 ng/ml
Gentamicinsulfat	50 µg/ml

**Fibroblastenmedium.** Für Anzucht, Kultivierung und für die Experimente wurde Fibroblastenwachstumsmedium (FGM) eingesetzt. Die Herstellung erfolgte aus Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) durch Zusatz folgender Supplemente:

FKS	10 %
Glutamin	2 mM
Amphotericin B	50 ng/ml
Gentamicinsulfat	20 µg/ml

**Medium für die Sebozytenzelllinie SZ95.** Für die Kultivierung diente Sebozytenwachstumsmedium (SGM), dessen Herstellung erfolgte aus Sebozytenbasalmedium (SBM, Sebomed basal) durch Zusatz folgender Supplemente:

FKS	10 %
hEGF	0,1 ng/ml
Amphotericin B	50 ng/ml
Gentamicinsulfat	20 µg/ml

Weiter wurde Sebozytenstimulationsmedium mit normalem (SGM) oder aktivkohlebehandeltem (SGM-ak) FKS eingesetzt. Die Herstellung erfolgte aus Sebozytenbasalmedium (Sebomed basal) durch Zusatz folgender Supplemente:

FKS oder FKS-aktiv kohle behandelt	5 %
Amphotericin B	50 ng/ml
Gentamicinsulfat	20 µg/ml

**Medium für die Mausfibroblastenzelllinie GR+/29+.** Für die Kultivierung wurde Wachstumsmedium (GRGM), für die Experimente Basalmedium (GRBM) eingesetzt. Das Basalmedium wurde aus Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) durch Zusatz folgender Supplemente hergestellt:

Glutamin	2 mM
Amphotericin B	50 ng/ml
Gentamicinsulfat	20 µg/ml

Das Wachstumsmedium wurde aus Basalmedium durch Zusatz von 10 % FKS hergestellt.

### Lösungen für die Keratinozyten und Fibroblastengewinnung

#### Antibiotikallösung

Amphotericin B	2,5 µg/ml
Gentamicinsulfat	50 µg/ml
in PBS	

#### Einfriermedium

DMSO	10 %
FKS	10 %
in DMEM	

#### Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

KCl	0,2 g/l
NaCl	8,0 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g/l
in Aqua bidest	

#### Stopmedium:

FKS	10 %
in DMEM	

#### RIPA-Puffer

Tris/HCl, pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
Nonidet P-40	1 %
Deoxycholinsäure	0,5 %
SDS	0,1 %
EDTA	1 mM

### **Transportmedium**

Gentamicinsulfat	50 µg/ml
Vancomycin	50 µg/ml
in DMEM	

### **Trypsin-EDTA-Lösung**

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

### **Lösungen für die Elektrophorese und Western-Blot-Analyse**

#### **Agarosegel:**

2 g Agarose (Elektrophoresegrad) werden in 100 ml TBE gekocht

#### **Blockpuffer:**

Magermilchpulver in TBST	5 %
BSA (Fraktion V, fettsäurefrei) in TBST	3 %

#### **Transferpuffer:**

Glycin	14,4 mg/ml
Tris	3,02 mg/ml
Ad Aqua bidest	

#### **Laufpuffer (pH 8,3):**

Glycin	14,4 mg/ml
Tris	3,02 mg/ml
SDS	1 mg/ml
In Aqua bidest	

### **Polyacrylamidgel (7,5 %)**

Temed	10 µl
Ammoniumpuffer	60 µl
Acrylamid/Bisacrylamid 40 %	2,5 ml
Trenngelpuffer	2,4 ml
SDS-Lösung	1,2 ml
Aqua bidest	6,15 ml

### **Sammelgelpuffer:**

Tris	0,5 M
1 M-HCl	48 %
In Aqua bidest	

### **TBE-Puffer (pH 8):**

Tris	445 mM
Borsäure	445 mM
EDTA	10 mM

### **TBST-Puffer:**

Tris	2 mM
NaCl	15 mM
Tween 20	0,05 %
In Aqua bidest	

### **Trenngelpuffer (pH 8,8):**

Tris	1,88 M
1 M-HCl	30 %
In Aqua bidest	

### **Lösungen der Testsubstanzen**

Zur Erfassung der Metabolisierung von CPA, Sebozytenproliferation, Androgenrezeptorbindung sowie für Penetrations- und Permeationversuche wurden 19-Nortestosteron, Cyproteron, Cyproteronacetat, Dihydrotestosteron und RU 58841 zu  $1 \times 10^{-3}$  M in Ethanol gelöst und vor den Experimenten bzw. zur Erstellung von Eichgraden für die HPLC-Analytik entsprechend verdünnt. Alle Lösungen bzw. Stammlösungen wurden bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt und auf Stabilität durch Bestimmung des Gehaltes per HPLC alle 4 Wochen überprüft.

### **Zellysepuffer**

10 mM Tris-HCl (pH 6,8)

10 % Glycerol

2 % SDS

### **Akzeptormedium für die Penetrations- und Permeationsuntersuchungen**

BSA 5 %

in PBS

## **2.4 Zellisolierung und -kultivierung**

**Keratinocyten und Fibroblasten.** Primäre Keratinocyten und Fibroblasten wurden aus Vorhaut, die bei der Zirkumzision von 1-6 jährigen Jungen in der chirurgischen Ambulanz von Dr. Jung, Dr. Knoblauch, Dr. Schildknecht sowie dem St. Josefkrankenhaus Berlin anfiel gewonnen und in unserem Labor kultiviert. Die Haut wurde direkt nach der OP im Transportmedium bei 4 °C ins Labor geliefert und anschließend für 1 h mit Trypsinlösung inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Stopmedium beendet, Keratinocyten die sich dabei teilweise abgelöst haben, wurden mit einer stumpfen Pinzetten von der Hautoberseite abgeschabt und bei 250 x g für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Nach Dekantierung des Überstandes, Resuspendierung der Pellets in kalter PBS-Lösung und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in KGM resuspendiert und in Zellkulturflaschen mit vorgewärmtem Medium eingesät. Zur Gewinnung von Fibroblastenkulturen wurden die Hautstücke

nochmals für 1 h in Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C eingelegt und anschließend wiederum im Stoppmedium und PBS geschwenkt. Nach Zentrifugation erfolgte die Einsaat der Fibroblasten in Fibroblasten-Wachstumsmedium (FGM). Keratinozytenkulturen wurden bei maximal 70 % Konfluenz der Zellen im Verhältnis 1:3 verbreitet, Kulturen der 2.-4. Passage wurden für die Versuche verwendet. Fibroblasten wurden alle 2 Wochen im Verhältnis 1:4 passagiert. Für die Versuche dienten Fibroblasten der 2.-6. Passage.

**Sebozyten (Zelllinie SZ95).** Die Sebozytenzelllinie wurde von Prof. Dr. Zouboulis, Klinik für Dermatologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin zur Verfügung gestellt. Zellen wurden in SGM Medium kultiviert und bei einem Konfluenzgrad von 50-70 % im Verhältnis 1:3 verbreitet. Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

**Mausfibroblasten (Zelllinie GR+/29+).** Die Zelllinie GR+/29+ wurde von Prof. Dr. Wellstein, Georgetown University, Washington D.C. zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in IMDM. Die Zellen wurden bei einem Konfluenzgrad von 80-90 % im Verhältnis 1:3 verbreitet. Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

### 2.5 Herstellung von Cyproteron

Da CPA in der Haut einer esteratischen Spaltung unterliegen könnte, die zur Bildung von Cyproteron (CP) führt, musste CP als Standard für die HPLC-Analytik hergestellt werden. Für die Herstellung von CP wurde als erstes an eine Spaltung durch tierische Leberenzyme gedacht. Eine  $10^{-3}$  M CPA-Lösung wurde bei 37 °C mit 2 U Schweineleberesterasen/ml inkubiert. Da aber nach 24 (bzw. 48) Stunden mittels Dünnschichtchromatographie (DC) kein Produkt festgestellt werden konnte, wurde CPA einer alkalischen Hydrolyse unterzogen und dadurch CP wie folgt hergestellt: 120 mg CPA wurde in Gegenwart von 1,09 g Kaliumhydroxid, 40 ml Methanol, 20 ml Aqua dest. und 10 ml Dichlormethan in 50 ml Rundkolben überführt und unter ständigen Rühren bei 40 °C erhitzt. Der Verlauf der Reaktion und entstehende Produkte wurden mittels DC verfolgt. Nach 2 Stunden wurde die Lösung dreimal mit 50 ml Chloroform extrahiert, die vereinigten Phasen wurden unter Vakuum abgedampft, dreimal mit 50 ml Wasser gewaschen, über  $MgSO_4$  getrocknet und

gewogen. Die Identitätsbestimmung erfolgte anhand der  $^1\text{H-NMR}$ -, C-H-N-Analysen und Massenspektroskopie.

### 2.6 Entwicklung und Validierung einer HPLC-Analytik

Da keine Methode für die Detektion und Bestimmung von CPA und CP in Zellkulturmedien, Haut und Akzeptormedium etabliert war, wurde eine HPLC-Methode mit UV-Detektion anhand von Literaturrecherchen konzipiert und für die geplante Untersuchungen optimiert.

#### 2.6.1 HPLC-Trennung

**Methode.** Die Quantifizierung erfolgte mittels der Methode des internen Standards. Dafür wurde 19-Nortestosteron (19-NT) gewählt. Als Fließmittel diente eine Wasser/Acetonitril Mischung im Verhältnis 61:39. Das Wasser wurde vor Gebrauch durch einen Membranfilter (0,22  $\mu\text{m}$ ) vakuumfiltriert und wie Acetonitril 15 min im Ultraschallbad entgast. Die maximale UV-Absorption wurde gleichzeitig bei zwei Wellenlängen gemessen, für 19-NT erfolgte die Messung bei 246 nm, für CPA und CP bei 284 nm. Die Flussrate betrug 1,2 ml/min.

**Herstellung der Stammlösungen.** Zur Kalibrierung der CPA-Analytik wurden jeweils drei Stammlösungen unabhängig voneinander hergestellt. 20,8 mg CPA wurden in jeweils 50 ml Ethanol verdünnt, so dass Stammlösungen mit  $10^{-3}\text{M}$  entstanden. Die Stammlösungen wurden mit Ethanol zu folgenden Konzentrationen verdünnt: 2,15, 4,3, 8,6, 17,25 und 34,5  $\mu\text{g/ml}$ . Die Stammlösungen sowie deren Verdünnungen wurden bei  $-4\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

Unter Validierung versteht man den Nachweis und die Dokumentation der Zuverlässigkeit einer (z.B. analytischen) Methode. Die Validierung dient der notwendigen Ergebnissicherheit des Bestimmungsverfahrens. Daher galt es die Selektivität, Spezifität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Richtigkeit, Präzision und Wiederfindung zu prüfen.

**Selektivität und Spezifität.** Um die Selektivität und Spezifität der HPLC-Methode zu ermitteln, wurden folgende Leermatrizes mit Proben, denen CPA, CP und 19-NT ( $10^{-6}$ - $10^{-4}$ M) zugesetzt waren, aufgearbeitet (s.2.6.2) und verglichen:

- Keratinozyten-, Fibroblasten-, Sebozyten- und GR+/29+-Medium
- Einbettmedium für das Gefriermikrotom
- Exzidierte Humanhaut (geschnitten in 50  $\mu$ m Scheiben)
- Akzeptormedium

Dabei wurde überprüft, ob die Analyten ohne Verfälschung durch Matrixinhaltsstoffe (Spezifität) und ohne gegenseitige Störungen bei ausreichender Trennung (Selektivität) erfasst werden konnten.

**Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze.** Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde nach Kalibriergradenmethode bestimmt. Dabei wurden Kalibriergraden in Dreifachbestimmung ermittelt. Als Nachweisgrenze (Limit of Detection LOD) galt die niedrigste Konzentration des Analyten, die unter den beschriebenen Bedingungen ein vom Leerwert unterscheidbares Signal ergibt. Als Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification LOQ) wurde die niedrigste quantitativ bestimmbare Konzentration festgelegt, die unter den angegebenen Analysebedingungen noch den Anforderungen auf Richtigkeit und Präzision entsprach (siehe unten). Diese Konzentration wurde als unterster Eichpunkt der jeweiligen Kalibriergraden eingesetzt.

**Richtigkeit (Accuracy).** Die Richtigkeit gibt die Übereinstimmung zwischen dem ermittelten Wert und einem als richtig angesehenen Wert an. Zur Überprüfung der Richtigkeit wurden an sieben Tagen jeweils 3 CPA Standardlösungen (4,3  $\mu$ g/ml, 8,6  $\mu$ g/ml, 17,25  $\mu$ g/ml, n=3) mittels der Methode des internen Standards quantifiziert. Zur Ermittlung der relativen Abweichung (relativer Fehler, RE) wird die mittlere berechnete Konzentration (A) aus mit der theoretischen Konzentration (B) nach folgender Formel berechnet:

$$RE (\%) = (A-B)/B \times 100$$

Abweichungen der Ergebnisse vom erwarteten Wert im Bereich der hohen und mittleren Kalibrationskonzentrationen sind bis zu 15 % und im Bereich den niedrigen Konzentrationen bis zu 20 % akzeptabel (U.S. department of health and humanservice 2001).

**Präzision (Precision).** Die Präzision ist ein Maß für den Grad der Reproduzierbarkeit der Analyseergebnisse bei wiederholter Durchführung einer analytischen Methode unter identischen Bedingungen. Dabei unterscheidet man Wiederholpräzision  $s_w$  (Tagespräzision oder intraday repeatability) und Zwischenpräzision  $s_b$  (interday reproducibility). Die Präzision wird als Standardabweichung einer Datenreihe angegeben.

Zur Bestimmung der Präzision wurden an einem bzw. sieben Tagen jeweils 3 CPA Standardlösungen (4,3 µg/ml, 8,6 µg/ml, 17,25 µg/ml) mittels der Methode des internen Standards quantifiziert.

Die Präzision wurde nach folgender Formel berechnet:

Wiederholpräzision:

$$s_w = \sqrt{\frac{\sum (f_{\text{Tagesserie}} \cdot s_{\text{Tagesserie}}^2)}{\sum f_{\text{Tagesserie}}}}$$

Zwischenpräzision:

$$s_b = \sqrt{\frac{\sum (X_{\text{Tagesserie}} - \bar{X}_{\text{gesamt}})^2}{f_{\text{Tage}}}}$$

f...Freiheitsgrade (Anzahl der Messungen -1)

s... Standardabweichung

$\bar{X}$  ... Mittelwert

Relativ zum gemessenen Wert dürfen die Präzisionen um nicht mehr als 15 % im Bereich der hohen und mittleren Konzentrationen, bzw. um nicht mehr als 20 % bei den LQCs abweichen (U.S. department of health and humanservice 2001).

**Wiederfindung (Recovery).** Die Wiederfindungsrate gibt den Prozentsatz an, der nach Probenaufarbeitung und Messung im Vergleich zur identischen Wirkstoffmenge in ethanolischer Lösung detektierbar war.

In dieser Arbeit wurde die Wiederfindung aus Zellmedien (Fibroblasten-, Keratinozyten- und Sebozytenmedium), PBS, Akzeptormedium (PBS mit 5 % BSA) und Hautgewebe an jeweils 3 Tagen (je n=3) untersucht.

Zellmedien, Akzeptormedien und 50 µm dünne Hautschnitte wurden mit CPA (17,25 µg/ml) 24 h inkubiert. Weitere Aufarbeitung und HPLC-Messung erfolgte wie unter 2.6.2 beschrieben.

Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Wiederfindung (\%)} = \frac{\text{Probe [Area CPA/ IS ]}}{\text{ethanol. Lösung [Area CPA /IS]}} \times 100$$

Anhand der Wiederfindungsraten wurden die CPA-Mengen in den Proben aus Humanhaut, dem Akzeptormedium PBS+ 5 % BSA sowie PBS korrigiert.

### 2.6.2 Probenvorbereitung

**Zellen und Zellmedien.** Das Zellmedium (je 2 ml) wurde in Plastikröhrchen überführt, mit internem Standard versetzt und dreimal mit 2 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden in Vakuumzentrifuge abgedampft, der Rückstand in 100 µl Ethanol aufgenommen und der Gehalt an CPA und CP per HPLC analysiert. Die Zellen wurden vom Boden abgekratzt, in ein 2 ml Reagenzgefäß überführt, mit internem Standard versetzt und zweimal mittels Frieren und Tauen lysiert (5-mal in flüssigen Stickstoff eingefroren und in 30 °C warmen Wasser aufgetaut). Das Zelllysate wurde fünfmal mit 1 ml Chloroform extrahiert, die vereinigten organischen Phasen abgedampft, mit 100 µl Ethanol aufgenommen und ebenfalls an CPA und CP per HPLC analysiert.

**Löslichkeit von CPA im Akzeptormedium.** Die Löslichkeit von CPA in PBS und PBS mit Zusatz von 5 % BSA wurde untersucht, in dem 0,05 g CPA in ein Maßkolben mit 50 ml Medium (PBS, PBS+5 % BSA) zugegeben wurde. Die Proben wurden auf 32 °C erwärmt und über Nacht mit einem Magnetrührer gerührt. Danach wurde je 1 ml entnommen, das ungelöste CPA abzentrifugiert, filtriert (0,22 µm Porenweite), das Filtrat mit internem Standard versetzt und dreimal mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden in Vakuumzentrifuge abgedampft, mit 100 µl Ethanol aufgenommen und Gehalt an CPA per HPLC analysiert.

**Extraktion des Akzeptormediums.** Nach dem Versuch wurde das Akzeptormedium (je 12 ml) mit internem Standard versetzt, dreimal mit 5 ml Chloroform extrahiert, die organischen

Phasen vereinigt, in Vakuumzentrifuge abgedampft, der Rückstand mit 200 µl Ethanol aufgenommen und HPLC-analytisch auf ihren Gehalt an CPA und CP untersucht.

**Hautschnitte.** Jeweils zwei Schnitte (1. und 2., 3. und 4, usw.) wurden in 2 ml Eppendorfgefäßen mit internem Standard versetzt und nach 15 Minuten wurde 500 µl Aqua dest. zugesetzt. Das Gewebe wurde je fünfmal in flüssigen Stickstoff eingefroren, gefolgt vom Auftauen im 30 °C warmem Wasserbad. Als nächstes folgte die dreimalige Extraktion mit je 500 µl Chloroform und Abdampfen der vereinigten organischen Phasen in Vakuumzentrifuge. Der Rückstand wurde in 100 µl Ethanol aufgenommen und per HPLC-Analyse auf den Gehalt an CPA und CP untersucht.

### 2.7 Kutane Metabolisierung

Um die Metabolisierung von CPA in Hautzellen zu untersuchen und die Ergebnisse der folgender Experimente zur kutanen Resorption und Wirkung auf Haut besser beurteilen zu können, wurden CPA auf Metabolisierung an isolierten primären Hautzellen geprüft. Primäre Fibroblasten, Keratinozyten und Zellen der Sebozytenlinie SZ95 wurden nach Bestimmung der Zellzahl in der Dichte von  $10^5$  Zellen pro Loch in 6-Loch-Platten eingesät und in je 2 ml der Wachstumsmedien bis zur Konfluenz von etwa 80 % kultiviert. Nach Absaugen des Mediums, wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und neues Medium sowie CPA zugefügt. Die Endkonzentration an CPA im Medium betrug  $10^{-6}$  M und  $10^{-5}$  M. Die Zellen wurden über 24 h bei 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Medium sowie die Zellen wurden wie unter 2.6.2 beschrieben extrahiert und an Gehalt des CPA und CP per HPLC analysiert. Da nach 24 h Inkubation keine Metaboliten nachgewiesen werden konnten, wurde im Folgenden die Zellzahl auf  $2 \times 10^5$  verdoppelt und die Inkubationszeit auf 48 h verlängert.

**Zellvitalitätsbestimmung.** Eine mögliche Beeinträchtigung der Zellvitalität durch CPA-Lösungen wurde mittels MTT-Test untersucht. Das Prinzip dieses Tests beruht auf Reduktion des gelben Farbstoffs MTT zum blauen Formazan durch mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen vitaler Zellen. Dieser Farbstoff lässt sich in DMSO gut lösen, fällt aber im wässrigen Zellkulturmedium aus.

Fibroblasten, Keratinozyten und Sebozyten (SZ95) wurden in der Dichte von  $10^5$  Zellen pro Loch in 6-Loch-Platten ausgesät und mit denselben Konzentrationen an CPA, die bei der Metabolisierung benutzt wurden, 24 h bei 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden in Dunkelheit 200 µl sterilfiltrierte MTT-Lösung dem Inkubationsmedium zugefügt, die Platte zugedeckt und für weitere 4 h im Brutschrank zur beschriebenen Reaktion inkubiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und für 1 h 1,0 ml DMSO zur Zellyse und zum Lösen der Kristalle hinzugegeben. Anschließend wurden 200 µl des Überstandes in eine 96-Loch-Platte überführt und die Formazanbildung photometrisch bei 540 nm gemessen. Als Kontrolle, die 100 % Überlebensrate darstellt, dienen ethanolbehandelte Zellen (Lösemittelkontrolle).

### 2.8 Pharmakodynamik von CPA und CP

#### 2.8.1 Rezeptorbindung

Die Rezeptorbindung wurden an GR+/29+ Zellen untersucht, einer Zelllinie, die den Androgenrezeptor exprimiert (List et al., 1999). Die Zellen wurden in 24-Loch-Platten mit 1 ml GRGM pro Loch eingesät, und bei 90-95 % Konfluenz zum Auswaschen endogener Steroide 1-3 Tage in FKS- freiem GR+/29+-Basalmedium (GRBM) kultiviert.

**Verdrängungskurven.** Da weder CPA noch CP in radioaktiv markierter Form zur Verfügung stand, wurden die Rezeptoraffinitäten über die Verdrängung von <sup>3</sup>H-DHT vom Androgenrezeptor ermittelt.

Die Zellen wurden 1 h bei 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> mit 0,5 nM <sup>3</sup>H-DHT in Gegenwart von DHT (0,05-5 nM), CPA (0,5 nM- 10 µM) oder CP (1 nM-150 µM) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden das Medium abgesaugt, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 0,5 ml Lysepuffer für 15 min auf dem Schüttler (300 U/Min) lysiert. Das Lysat wurde in 2 ml Eppendorfgefäße überführt, mit 1 ml Scintillationcocktail 10 Sekunden gevortext und anschließend die Radioaktivität als Counts pro Minute (cpm) im Betacounter gemessen. Die Verdrängungskurven wurden als verbliebene Radioaktivität (%) gegen die Konzentration

dargestellt. Die Bindung der Kontrolle (nur  $^3\text{H}$ -DHT ohne verdrängende Substanz) wurde als 100 % gesetzt.

### **2.8.2 Untersuchung der Wirkung von Androgenen und Antiandrogenen auf SZ95 Zellen**

Um die Proliferation der Sebozytenlinie SZ95 unter dem Einfluss von Dihydrotestosteron bzw. eine Hemmung des Wachstums in Gegenwart eines Antiandrogens zu bestimmen, wurde der Thymidin-Proliferations-Assay eingesetzt. Dieser Test beruht auf dem Einbau der radioaktiv markierten Nukleinsäurebase  $^3\text{H}$ -Thymidin in die DNA einer proliferierenden Zelle, der  $^3\text{H}$ -Thymidineibau kann durch Betazählung quantifiziert werden.

**Erstellung der Proliferationskurven.** Als erstes wurde die Proliferationsförderung durch  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) untersucht. Zellen wurden im Sebozytenwachstumsmedium (SGM) in kultiviert und bei einem Konfluenzgrad von 80-90 % in der Zahl von  $10^5$  pro Loch in eine 24-Loch-Platte ausgesät. Nach 2 Tagen wurde SBM, SGM oder SGM-ak zugefügt. Am dritten Tag erfolgte die Zugabe von DHT  $10^{-12}$ - $10^{-5}$  M in Form einer ethanolischen Lösung. Zellen wurden 6-14 Tage stimuliert, das Medium wurde unter erneuter DHT-Zugabe alle 2-3 Tage gewechselt. Als Kontrolle dienten ethanolbehandelte Zellen.

Am letzten Tag wurden die Zellen 6 h bei  $37\text{ }^\circ\text{C}/5\text{ }\%$   $\text{CO}_2$  mit  $5\text{ }\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -Thymidin (1 mCi) inkubiert, dreimal mit  $250\text{ }\mu\text{l}$  PBS und anschließend dreimal mit  $250\text{ }\mu\text{l}$  5 % Trichloressigsäure gewaschen. Für die Zellyse und damit zur Freisetzung von  $^3\text{H}$ -Thymidin wurden die Zellen 1 h bei 300 rph mit  $200\text{ }\mu\text{l}$  NaOH (0,3 M) geschüttelt. Die Zellsuspension wurde in Eppendorfgefäßen mit 1,8 ml Scintillationscocktail überführt und die  $^3\text{H}$ -Thymidinmenge in Betazähler gemessen.

**Antiandrogener Effekt.** Da Antiandrogene durch kompetitive Bindung an dem Androgenrezeptor Androgene verdrängen, kann der proliferationshemmende Effekt von Antiandrogenen nur in Gegenwart eines der die Proliferation fördernden Androgene bestimmt werden.

Die Zellen wurden wie oben beschrieben in eine 24-Loch-Platte ausgesät und mit  $10^{-6}$  oder  $10^{-10}$  M DHT alleine und in Gegenwart von CPA ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$ M), RU 58841 ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ M) oder RUM ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  M) 10 Tage bei  $37\text{ }^\circ\text{C}/5\text{ }\%$   $\text{CO}_2$  kultiviert. Die Aufarbeitung erfolgte wie unter 2.8.2 beschrieben.

### 2.8.3 Untersuchung von Expression und Funktion des Androgenrezeptors bei SZ95 Zellen

**Androgenrezeptorbindung von DHT.** Zellen der SZ95 Zelllinie wurden in eine 24-Loch-Platte ausgesät und in SGM bis zu einer Konfluenz von 90-95 % kultiviert. Danach wurde das Medium abgesaugt und für 2-3 Tage durch FKS- freies Medium (SBM) ersetzt.

Die spezifische Bindung ergibt sich aus der Differenz zwischen Gesamtbindung und unspezifischer Bindung. Zur Ermittlung der Gesamtbindung wurden die Zellen mit steigender Konzentration an  $^3\text{H}$ -DHT (0,025-8 nM) in SBM 1 und 3 h bei 37 °C/5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Um die unspezifische Bindung zu ermitteln, erfolgte parallel der gleiche Ansatz in Gegenwart eines jeweils 500-fachen Überschusses an nicht radioaktiv markiertem DHT. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte wie unter 2.8.1 beschrieben.

Im Folgenden sollte die DHT Bindung anhand der Verdrängung von  $^3\text{H}$ -DHT gemessen werden. Da aber im vorherigen Experiment keine spezifische Konzentration bestimmt werden konnte, wurden die Zellen mit 4 nM  $^3\text{H}$ -DHT (Brown et al., 1981) und DHT (0,001-10000 nM) in SBM 1 h bei 37 °C/5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Die anschließende Aufarbeitung erfolgte wie unter 2.8.1 beschrieben.

**Detektion des Androgenrezeptor-Proteins.** Der *Nachweis des Androgenrezeptorproteins* in SZ95 erfolgte durch Western-Blot-Analytik. Als Positivkontrolle dienten GR+/29+ Zellen. Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen, mit RIPA-Puffer lysiert und die lysierten Zellen vom Boden abgekratzt. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 15 000 g wurden die Überstände abgenommen und mit je 5  $\mu\text{l}$  eine Proteinbestimmung durchgeführt. Zur Detektion von AR mit einem Molekulargewicht von 98 kDa dienten 7,5 %ige Polyacrylamid-Trenngele, denen Sammelgele mit 5 % Polyacrylamid vorgeschalten waren. Die Zelllysate wurden mit SDS-DTT im Verhältnis 1:3 gemischt und zur Denaturierung der Proteine für 5 min bei 95 °C gekocht. Die Auftrennung der Gele erfolgte mit 35 mA im Sammelgel und 55 mA im Trenngel in einer mit 500 ml Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer.

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden zur Immundetektion auf Polyvinyliden-difluorid (PVDF)-Membranen übertragen. Um einen optimalen Transport zu gewährleisten, mussten die Membranen zunächst mit Methanol hydrophobisiert und zusammen mit dem Gel in Transferpuffer equilibriert werden. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte bei 100 mA über Nacht in einem Tank-Blot, der mit 1000 ml Transferpuffer gefüllt war. Zur Absättigung der unspezifischen Bindungen diente eine einstündige Inkubation der Membran in 30 ml 5 %iger Magermilchlösung. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran 2 h mit der primären Antikörperlösung (1:1000 verdünnt) versetzt, um die Zielproteine spezifisch zu markieren. Anschließend erfolgte die Detektion durch einstündige Inkubation mit Sekundärantikörper-Lösung aus 1:1000 verdünnten Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Anti-Kaninchen IgG-Antikörper in Blockpuffer. Nach erneuertem Waschen wurde die Membran für 1 min mit Luminol Reagenz benetzt. Die Reaktion der antikörpergebundenen Peroxidase mit dem Substrat führte zur Chemolumineszenz, durch die ein aufgelegter Röntgenfilm innerhalb von 10-30 s geschwärzt wurde. Die Entwicklung erfolgte nach Herstellangaben.

**Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).** Zum *Nachweis der Androgenrezeptor-mRNA* diente RT-PCR. Dazu wurde mRNA aus Keratinozyten, aus der Sebozytenzelllinie SZ95 und der Fibroblastenzelllinie GR+/29+ unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Kits (QuickPrep<sup>®</sup> mRNA Purifikation Kit enthält: Extraktionspuffer, Elutionspuffer, High Salt Solution, Low Salt Solution, Glykogenlösung, Kaliumacetatlösung, Oligo(dt)-Cellulose Suspension) nach Herstellangaben isoliert. Die Zellen wurden zunächst durch einen Guanidium-Thiocyanat Extraktionspuffer, welcher zugleich zelluläre RNAsen inhibiert, aufgeschlossen und Zellschrott abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit Oligo(dt)-Cellulose versetzt, an die das poly-A Ende der mRNA bindet. Nach mehrfachen Waschen mit High Salt und Low Salt Solution der jetzt mit mRNA beladenen Oligo-(dt)-Cellulose wurde die mRNA mit auf 65 °C vorgewärmten Elutionspuffer (400µl) von der Oligo(dt)-Cellulose extrahiert. Die Quantifizierung der isolierten mRNA erfolgte UV-metrisch. Hierzu wurde die mRNA Lösung in Quarzküvetten überführt, welche zwecks Zerstörung von RNAsen zuvor für 1h in eine Mischung von Methanol/konz. HCl 1:1 eingelegt und anschließend mehrfach mit DEPC-Wasser (0,1 % Diethylpyrocarbonat in bidestilliertem Wasser) gespült worden waren. Aus der UV-Absorption bei 260 nm wurde der Gehalt an mRNA mit der Formel

$$[\text{RNA}] \mu\text{g/ml} = \text{Abs}_{260} * 40$$

errechnet. Nach der Messung erfolgte die Aufkonzentrierung der mRNA durch Ethanolfällung. Hierzu wurde die mRNA-Lösung durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  Glykogenlösung (5-10 mg Glykogen in DEPC-Wasser), 40  $\mu\text{l}$  Kaliumacetatlösung (2,5 M, pH 5,0) und 1 ml eiskaltem Ethanol (-20 °C) zur Fällung gebracht. Die gefällte mRNA wurde 30 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen, und das mRNA-Pellet mit Elutionspuffer auf eine Konzentration von 200 ng/ $\mu\text{l}$  eingestellt.

Für die *Synthese der einzelsträngigen cDNA* wurde die reverse Transkriptase ‚Superscript‘ verwendet. 1  $\mu\text{g}$  mRNA wurde in 10  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser aufgenommen. Zu diesem Ansatz wurde 1  $\mu\text{l}$  (1 pmol) Oligo(dT)-Primer gegeben und für 3 min bei 80 °C denaturiert. Danach wurde die Lösung für 10 min auf 37 °C abgekühlt und eine Stammlösung mit 4 ml 5 x Transkriptasepuffer, 2  $\mu\text{l}$  0,1 DTT, 1  $\mu\text{l}$  dNTP-Stammlösung (je 10 mM der Desoxynukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 1  $\mu\text{l}$  RNAsin und 1  $\mu\text{l}$  Reverse Transkriptase zugegeben. Dieser Ansatz, der ein Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$  hatte, wurde 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurden zur Inaktivierung der RNA 20  $\mu\text{l}$  einer 40 M NaOH Lösung und nach weiteren 10 min bei 37 °C 20  $\mu\text{l}$  1 M Tris/HCl-Lösung (pH 7,5) zur Neutralisierung zugegeben. Der Ansatz mit einem Endvolumen von 60  $\mu\text{l}$  wurde bei -20 °C gelagert.

Zur *Amplifikation der cDNA* diente die *Polymerasekettenreaktion (PCR)*. Ein Aliquot der cDNA (2  $\mu\text{l}$ ) wurde für die PCR eingesetzt. Die PCR fand in folgender Reaktionsmischung statt: 0,5  $\mu\text{M}$  spezifischer Primer, 0,2 mM dNTP Mix, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ , 75 mM Tris-HCl (pH 8,8) und 1,25 Units Taq DNA-Polymerase. Die Sequenzen der jeweiligen spezifischen Primer sind in Tab. 1 aufgeführt.

Die Reaktionsmischung wurde zu Beginn zur Denaturierung der Matrizen-cDNA für 3 min auf 94 °C erhitzt, daraufhin erfolgten 35 Zyklen: Denaturierung 1 min 94 °C, Annealing 1 min 65 °C, Synthese 2 min 72 °C. Nach Ablauf der Zyklen wurde das Reaktionsgemisch für 10 min auf 72 °C erhitzt, um begonnene DNA-Stränge zu vervollständigen. Die amplifizierten DNA-Stücke wurden in einem 2 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und nach Einlegen des Agarosegels in eine Ethidiumbromidlösung für 45 min unter UV-Licht bei 254 bzw. 366 nm sichtbar gemacht.

Primer	Sequenz	Position	Länge
Primer A	Sense:	GAA GAC CTG CCT GAT CTG TG	269 bp
	Antisense:	AAG CCT CTC CTT CCT CCT GT	
Primer B	Sense:	TAC CAG CTC ACC AAG CTC CT	195 bp
	Antisense:	GCT TCA CTG GGT GTG GAA AT	

*Tab. 1: Spezifische Primer für die cDNA-Amplifikation von Androgenrezeptor cDNA Sequenzen*

## 2.9 Partikuläre Arzneistoffträger: Herstellung und Charakterisierung

### 2.9.1 Nanopartikuläre Arzneistoffträger

SLN, NLC und Nanoemulsion wurden nach dem Prinzip der Hochdruckhomogenisation (Mehnert and Mäder, 2001) in der Abteilung für Pharmazeutische Technologie der FU Berlin mit einem Hochdruckhomogenisator Lab 40<sup>®</sup> hergestellt. Lipid (Compritol<sup>®</sup>, Precirol<sup>®</sup>, Miglyol, Ölsäure) und Wirkstoff (CPA, RU 58841, RUM, Nilrot) wurden in einem Glasgefäß auf einer Heizplatte zur Schmelztemperatur des Lipids (95°C bei Compritol<sup>®</sup>, 85°C Precirol<sup>®</sup>) gebracht und mit einer gleich warmen wässrigen Poloxamer 188-Lösung mit einem Ultraturax (8000 U/Min, 30 sek) gemischt. Diese Präemulsion wurde im Hochdruckhomogenisator (auf 95°C temperiert) unter 500 bar in 3 Zyklen homogenisiert, in silanisierte Glasgefäße überführt und im 20 °C warmen Wasserbad abgekühlt. Es wurden pro Charge 35 g bzw. 25 g Nanosuspension hergestellt und bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert.

### 2.9.2 Mikropartikuläre Arzneistoffträger

Mikropartikel wurden mittels Heißhomogenisation produziert. Es musste erst eine Rezeptur entwickelt werden, die zu stabilen Partikeln in Mikrometerbereich führt. Das Lipid Precirol<sup>®</sup> sowie der Emulgator Poloxamer 188 und Aqua bidest wurden jeweils separat in Glasgefäße eingewogen. Beide Gefäße wurden im Wasserbad auf 80 °C erwärmt. Nach Erreichen der Temperatur wurde die Emulgator/Wasser-Phase in die Lipidphase gegossen und das Gemisch per Ultraturax bei 8000, 9500, bzw. 13500 U/Min) 1, 3 bzw. 5 Minuten

homogenisiert. Die Chargen wurden in silikonisierten Gefäßen bei 22 °C im Wasserbad abgekühlt und anschließend bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

### **2.9.3 Creme Herstellung**

Da kein CPA-Topikum auf dem Markt zu Verfügung steht, wurde als Vergleichspräparat für Resorptionsversuche eine 0,05 %ige CPA-haltige Creme hergestellt. Basiscreme DAC wurde zu CPA unter aseptischen Bedingungen zugegeben und durch ständiges Rühren homogenisiert. Diese CPA Creme wurde bis zu sechs Monaten lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

### **2.9.4 Gehaltbestimmung**

Der CPA Gehalt aller Zubereitungen wurde kontrolliert. Dazu wurden 80 µl der Präparation 1:1 mit Aqua bidest. verdünnt, mit internem Standard versetzt und dreimal mit 500 µl Chloroform extrahiert, die organischen Phasen abgedampft und der CPA-Gehalt mittels HPLC-Analyse gemessen (s. 2.6.1).

### **2.9.5 Partikelgrößemessung**

Zur Messung der Partikelgröße der Präparationen dienten die Photonkorrelationspektroskopie (PCS) und Laserdiffraktometrie (LD). PCS stellt ein dynamisches Streulichtverfahren dar, dessen Prinzip auf unterschiedlicher Streuung des Laserlichtes an Partikeln verschiedenen Größen beruht. Mit dieser Methode kann der mittlere Durchmesser von Teilchen zwischen 3 nm und 5 µm bestimmt werden. Darüber hinaus liefert die PCS ein Maß für die Breite der Partikelgrößenverteilung, den Polydispersitätsindex (PI). Bei PI Werten bis 0,060 liegt ein monodisperses System vor, zwischen 0,100 und 0,250 eine enge und bei Werten zwischen 0,250 und 0,500 eine breite Verteilung vor. In dieser Arbeit kam ein ZetaSizer 4 mit einem Helium-Neon-Laser ( $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ ) zur Anwendung. Um Mehrfachstreuungen zu vermindern, wurden die Proben für die Messungen mit Aqua bidest. (1:1000) verdünnt. Das Streulicht wurde in einem Winkel von 90° erfasst.

Mit der Laserdiffraktometrie können Partikel im Bereich von 0,1-2000 µm erfasst werden. Die LD beruht auf einer Beugung des gerichteten Laserlichtes an dispergierten Partikeln. Je größer ein Partikel ist, desto geringer gekrümmt ist seine Oberfläche, was zu einem kleinen

Beugungswinkel führt. Kleine Partikel mit stärkerer Oberflächenkrümmung verursachen dagegen einen großen Beugungswinkel des Laserlichtes. Die Volumenverteilungen der Partikel werden als Durchmesser angegeben. So bedeutet LD (50 %) bzw. LD (95 %), dass 50 % bzw. 95 % der gemessenen Partikel einen kleineren oder gleichen Durchmesser aufweisen als den genannten.

### **2.9.6 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)**

Mit der dynamischen Wärmestrom Differenzkalorimetrie wurde die Rekristallisierung des Lipids und somit die Entstehung fester Partikeln nach der Hochdruckhomogenisation überprüft. Die Proben wurden in einem Aluminiumtiegel (Volumen 40 µl) eingewogen und mit einem Deckel verschlossen. Als Referenz diente ein leerer Tiegel. Die Aufheizrate betrug 5 K/min, der Messbereich lag zwischen -5 °C und 85 °C, der Ofen wurde mit Stickstoff gespült.

### **2.9.7 Prüfung auf Kristallisation und Rekristallisation**

Die Anwesenheit von Wirkstoffkristallen in den Dispersionen wurde nach Verdünnung mit destilliertem Wasser bei 160-facher Vergrößerung unter dem *Lichtmikroskop* untersucht. Die Messung erfolgte am Tag 1 sowie einmal pro Woche nach der Herstellung. Damit sind Kristalle detektierbar, die eine Mindestgröße von ungefähr 5 µm aufweisen.

### **2.9.8 Untersuchung der Wirkstoffbeladung der Partikel**

Um die Beladung der Lipidpartikel mit CPA zu untersuchen, wurden Wasser- und Lipidphase durch Zentrifugation in einem Filter (0,22 µm, 2,5 Std, 3000 rpm) getrennt. 100 µl der filtrierten Wasserphase wurden mit internem Standard versetzt, dreimal mit 100 µl Chloroform extrahiert und die vereinigten organischen Phasen abgedampft. Die Rückstände wurden in 100 µl Ethanol im Ultraschallbad gelöst und der CPA Gehalt per HPLC wie unter 2.6.1 beschrieben analysiert. Gleichzeitig erfolgte auch eine Gehaltbestimmung von unfiltrierten Proben. Die Absorption des Wirkstoffes an den Filter wurde im Vorversuch ausgeschlossen, indem eine ethanolische CPA-Lösung unter den gleichen Bedingungen filtriert und an CPA-Gehalt untersucht wurde.

### 2.9.9 Untersuchung der Oberflächenstruktur der Partikel

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) kann die Topographie von Oberflächenstrukturen darstellen. Die Proben wurden mittels Lufttrocknung vom Wasser befreit und im Hochvakuum untersucht. Der Vorteil dieser Methode liegt in der dreidimensionalen Darstellung bei großer Tiefenschärfe und hoher Auflösung. Die Aufnahmen wurden im Institut für Physik der Humboldt-Universität Berlin, in Zusammenarbeit mit Herrn Dipl. Phys. Spangenberg, Arbeitskreis Prof. Niehus angefertigt.

### 2.9.10 Interaktion von CPA mit dem Träger

Die Interaktion zwischen dem Wirkstoff und den Partikeln wurde mittels *Parelektrischer Spektroskopie* untersucht. Die Messung erfolgte im Institut für Experimentalphysik, Fachbereich Physik der FU Berlin (Prof. Kramer).

Diese Methode erfasst die Antwort von permanenten elektrischen Dipolmomenten auf ein elektrisches Wechselfeld, die Grundlagen sind seit 1930 bekannt. Erst seit wenigen Jahren kann man allerdings diese Antworten, ausgedrückt in den frequenzabhängigen Dielektrizitätskonstanten, messtechnisch verlässlich und schnell erfassen. Die Messgrößen Dipoldichte und –beweglichkeit beschreiben für die Arzneimittelwirkung wichtige Wechselwirkungen zwischen nanopartikulären Trägern und Arznei- (bzw. Farb)stoffen.

**Grundlagen der PS.** Trotz kompensierter Gesamtladung liegen in vielen Molekülen die Schwerpunkte von positiver Ladung +Q und negativer Ladung –Q um den Abstand s auseinander. Dann besitzt dieses Teilchen ein permanentes elektrisches Dipolmoment

$$\underline{p} = Q \cdot \underline{s}.$$

In einem äußeren elektrischen Feld  $\underline{E}$  möchte sich  $\underline{p}$  in Feldrichtung einstellen, weil dies der Zustand der geringsten Energie ist. Wäre dieses Bestreben allein maßgebend, würden bereits geringste Feldstärken  $\underline{E}$  alle N im Volumen V enthaltener Dipole  $\underline{p}$  zur Antwort Polarisation

$$\underline{P} = \sum_{i=1}^{i=N} \underline{p}_i / V$$

ausrichten! Die dipoltragenden Moleküle nehmen aber an der Wärmebewegung teil und diese will den ‚Zustand größter Unordnung‘, d.h.  $\underline{P}=0$  erzwingen. Dieses Konkurrenzunternehmen ist für eine Polarisationsantwort  $\underline{P}$  verantwortlich, die proportional zur Frage  $\underline{E}$  an unsere Probe ist. Dies macht die Definition der Dielektrizitätskonstanten  $\epsilon$  sinnvoll, nämlich

$$\epsilon = 1 + (1/ \epsilon_0) \cdot P/E.$$

Hierbei ist die Influenzkonstante  $\epsilon_0 = 8,854 \dots \cdot 10^{-12} \text{ A s V}^{-1} \text{ m}^{-1}$  eine Naturkonstante.

Unterwerfen wir nun unsere Substanz einem Wechselfeld  $\underline{E} = \underline{E}(t)$  mit der variierbaren Frequenz  $f$  ( $\rightarrow$  Anzahl der Schwingungen pro Sekunde), wird auch die Antwort  $\underline{P} = \underline{P}(t)$  zeitabhängig mit der Frequenz  $f$ . Nur: Wenn wir mit dem Feld

$$\underline{E}(t) = \underline{E}_0 \cdot \sin(2\pi ft)$$

arbeiten, enthält die Antwort  $\underline{P}(t)$  den mit  $\sin(2\pi ft)$  und mit dem  $\cos(2\pi ft)$  antwortenden Anteil, d.h. die Dispersionsantwort  $\underline{P}'(f)$  und die Absorptionsantwort  $\underline{P}''(f)$ :

$$P(t) = P'(f) \cdot \sin(2\pi ft) + P''(f) \cdot \cos(2\pi ft).$$

Erhöhen wir kontinuierlich die Frequenz  $f$ , können anfänglich die Dipole den Feldwechsel von  $E(t)$  noch folgen, bei höheren Frequenzen schließt dies jedoch die Massenträgheit der Dipol-tragenden Moleküle aus, die Polarisationsantwort  $P(t)$  geht gegen Null. Hier muss noch eine Ergänzung angebracht werden: Die sonst unpolaren Atome bilden im Feld  $E(t)$  ein induziertes Dipolmoment, was wegen der sehr viel geringeren Masse der Elektronenhülle erst bei sehr viel höheren Frequenzen ( $\rightarrow \approx 10^{15} \text{ Hz}$ ) „nicht mehr mitkommt“! Mit steigender Frequenz  $f$  geht also  $P$  nicht gegen Null, sondern verharrt erst einmal auf einem Zwischenwert. Da wir aber nur im Bereich 0,01 MHz...1000 MHz messen, dürfen wir diesen Wert als konstant annehmen. Die sehr leichten Wassermoleküle in unseren Dispersionen bzw. Emulsionen dürfen wir ebenso zu diesem Zwischenwert rechnen, da Wasser erst bei  $\approx 18\,000 \text{ MHz}$  „nicht mehr mitkommt“.

Tragen wir zum besseren Verständnis die Polarisationsantwort  $P(t)$  auf die Fragestellung  $E(t)$  einmal über der Frequenz  $f$  auf  $f$  hier als logarithmisch geteilte Abszisse finden wir das folgende Verhalten:

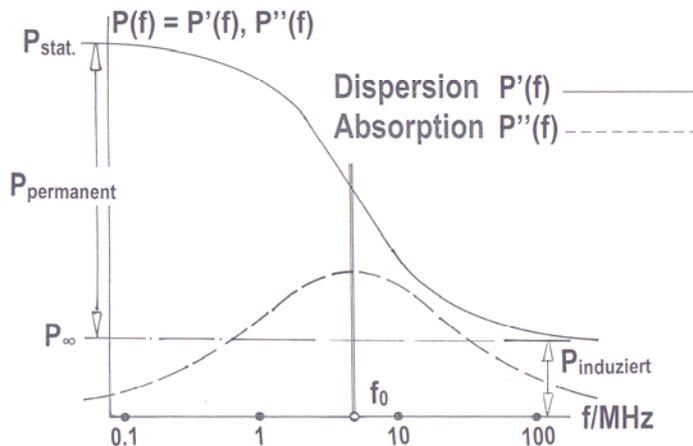


Abb. 9: Polarisation in Abhängigkeit von der Frequenz. Bei sehr tiefen Frequenzen tragen die permanenten und die induzierten Dipole zum Wert  $P_{stat}$  bei. Bei sehr hohen Frequenzen sinkt  $P$  auf den Wert  $P_{\infty}$ . Im Wendepunkt der Dispersionskurve  $P'(f)$  und damit zugleich im Maximum der Absorptionskurve  $P''(f)$  hat die Frequenz gerade den ausgezeichneten Wert  $f_0$ .

P. Debye drückte diese Zusammenhänge bereits 1930 (Kremer and Schoenhals, 2002) in den später nach ihm benannten Gleichungen für die oben eingeführte Größe Dielektrizitätskonstante  $\epsilon(f)$  aus. Auch hier ist der Einfluss interessierender permanenten Dipole durch  $\Delta \epsilon$  und der Einfluss der hier uninteressanten induzierten Dipole durch  $\epsilon_{\infty}$  beschrieben. Die Frequenz  $f_0$  ist die zweite für die Wirkstoff-Träger-Interaktion wichtige Aussage. Für den Fall einer evtl. vorhandenen elektrischen Leitfähigkeit müssen wir – nur in der Absorptionsantwort – noch einen frequenzabhängigen Summanden berücksichtigen:

$$\text{Dispersion: } \epsilon'(f) = \epsilon_{\infty} + \Delta \epsilon / (1 + f^2/f_0^2),$$

$$\text{Absorption: } \epsilon''(f) = k/f + \Delta \epsilon \cdot (f/f_0) / (1 + f^2/f_0^2).$$

Uns interessierende Parameter : Dipoldichte  $\Delta \epsilon$  und Dipolbeweglichkeit  $f_0$

**Messung von  $\epsilon'$ (f) und  $\epsilon''$ (f).** Ein Sender speist eine elektromagnetische Welle einstellbarer Frequenz in ein offenendiges Koaxialkabel. Abgeschnittener Innen- und Außenleiter bilden einen „Kondensator“, der in die Proben eintaucht. An diesem substanzgefüllten Kondensator wird die Welle reflektiert, ein Empfänger vergleicht die rücklaufende Welle bezüglich Amplitude und möglicher Verschiebung mit der Sendewelle (Abb. 10). Eine solche Anordnung steht in sog. Frequenz-Analysatoren seit wenigen Jahren zur schnellen Messung von  $\epsilon$ (f) zur Verfügung.

Es wurde ein Analysator der Firma Rohde & Schwarz benutzt, der im Frequenzbereich 0,1-100 MHz oder 1-1000 MHz die Kurven  $\epsilon'$ (f),  $\epsilon''$ (f) in 200 logarithmisch äquidistanten Schritten misst. Bei allen im Folgenden vorgestellten Messergebnissen und deren Deutung sind folgende Fehler zu erwarten:

$$\Delta \epsilon: \pm 5 \% \quad f_0: \pm 3 \%$$

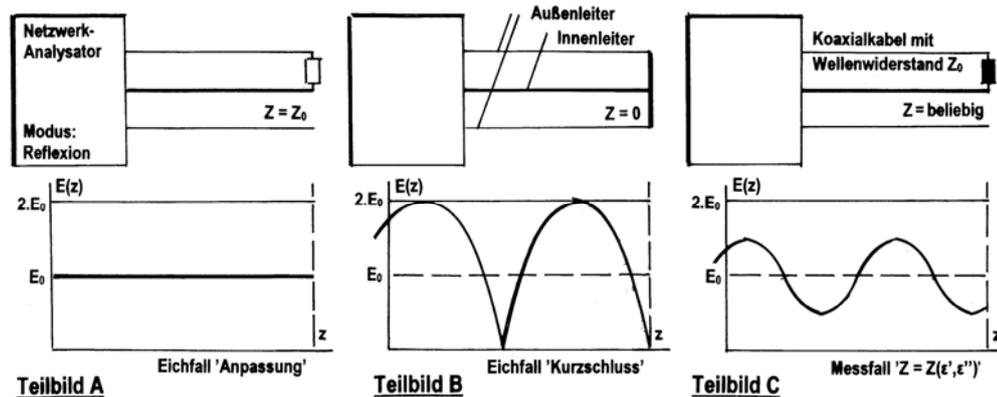


Abb. 10: Ist das Koaxialkabel mit seinem Wellenwiderstand abgeschlossen, tritt keine Reflexion auf, und die Amplitude ist über die gesamte Kabellänge konstant ( $E=E_0$ , A). Im Falle eines Kurzschlusses wird die gesamte Welle in sich zurückgeworfen und wir finden eine „stehende“ Welle, deren Amplitude längs des Koaxialkabels zwischen  $E=0$  und  $E=2E_0$  schwankt ( $E_0$ , B). Bei einem beliebigen Abschluss (z.B. durch unsere Proben) tritt stets ein Zwischenbild auf: Die Amplitude längs des Kabels erreichen weder  $E_0$  noch gehen sie auf Null zurück und die Lage des Minimums ist verschoben (C). Aus dieser eigentlichen Messung filtert der Analysator zwei Messgrößen, aus denen er für jede eingestellte Frequenz die beiden Größen Dispersion  $\epsilon'$ (f) und Absorption  $\epsilon''$ (f) errechnet.

### **2.10 In-vitro-Untersuchung kutaner Penetration und Permeation**

Penetrations- und Permeationsversuchen wurden an exzidierte Humanhaut vorgenommen. Die Haut stammte aus plastischen Operationen der Bauch- und Brustregion (Abdominalplastik, Mammareduktion) weiblicher Patientinnen im Alter von 18-63 Jahren und wurde uns mit Genehmigung durch die Berliner Ärztekammer aus dem Behring-Krankenhaus, Berlin, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Sofort nach operativer Entfernung der Haut wurde das subkutane Fettgewebe mit einem Skalpell abpräpariert, die Haut in OP-Tüchern eingeschlagen und gekühlt ins Labor transportiert. Das Material wurde entweder direkt zum (sofortigen) Experiment eingesetzt oder in kleineren Stücken in Alufolie einwickelt bis zum Gebrauch bei -20° C maximal sechs Monate gelagert (Bronaugh et al., 1986). Alle Versuche zur Penetration und Permeation erfolgten nach der Franz-Zell-Technik.

#### **2.10.1 Design des Franz-Zell-Versuchs**

Mit einem Locheisen wurden die Hautstücke (pro Spender 2-4 Proben) mit einem Durchmesser von 15 mm ausgestanzt und in der auf 32°C vortemperierten und mit Akzeptormedium (PBS mit 5 % BSA) gefüllten Franz-Diffusionszellen fixiert. Das Akzeptormedium wurde während des Experiments mit einem magnetischen Rührstab (500 rpm) gemischt. Nach 30 minutiger Vorinkubation des Akzeptormediums wurden jeweils 200 µl der wässrigen Dispersion (NE, SLN, NLC-O, NLC-M, MS) oder 200 mg Creme (alle Präparationen enthielten CPA in der Konzentration von 0,05 %) appliziert. Nach 6 Stunden wurden überflüssige Reste der Zubereitungen mit einem Papiertuch von der Hautoberfläche abgewischt, mit einer Stanze die Kontaktfläche ausgestanzt und diese fünfmal mit Klebefilm gestrippt. Das mit dem Klebefilmabrissen abgenommene CPA wurden sofort durch 5 Sekunden langes Eintauchen in 1 ml Chloroform extrahiert. Die restliche Haut wurde mit der Epidermisseite zum Boden in 6-Loch-Platte flach gelegt und später horizontal von oben nach unten in einem Gefriermikrotom bei -21°C in acht 50 µm dünne Scheiben (entspricht der Hauttiefe von 400 µm) geschnitten. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter 2.6.2 beschrieben.

Für Permeationsversuche wurde kryokonservierte Humanhaut an der Luft aufgetaut und mit dem Dermatome in eine Dicke von 500 µm geschnitten. Die Spalthaut wurde wie beschrieben in Franz-Diffusionszellen fixiert und 30 Minuten mit Akzeptormedium equilibriert. Anschließend wurden 200 µl SLN, NLC-O, NLC-M, MS und NE bzw. 200 mg Creme für 24 Stunden aufgetragen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Akzeptorflüssigkeiten entnommen und in ein Plastikröhrchen überführt. Die weiteren Schritte der Analytik erfolgten wie unter 2.6.2 beschrieben.

### **2.10.2 Penetration bei defekter Hornschicht**

Hautpräparate mit defekter Barriere wurden durch zwanzigmaliges Stippen der Humanhaut vor dem Versuch mit Tesafilm gewonnen (Weigmann et al., 1999). Klebefilm wurde auf die Hautoberfläche aufgeklebt, die gleichmäßige Anhaftung der Hornschichtzellen an das Tesaband wurde mittels Überwalzen mit einem Roller gewährleistet. Anschließend wurde der Klebefilm mit einer Pinzette abgezogen. Parallel zu den Penetrationsversuchen wurde stets intakte Haut desselben Spenders als Kontrolle eingesetzt. Die Versuchsanordnung und die weitere Aufarbeitung erfolgten wie oben beschrieben.

### **2.10.3 Untersuchung der folliculären Penetration**

Wegen des sehr geringen CPA-Gehalts in den einzelnen Haarfollikeln, der unter der Nachweisgrenze der HPLC-Analytik liegt, konnten diese Versuche nicht mit den Antiandrogenen, sondern lediglich an einem lipophilen Modellfarbstoff (Nilrot) vorgenommen werden. Da keine Haut des behaarten Kopfes verfügbar war, erfolgten die Experimente an Haut von Schweineohren. Diese Haut besitzt zahlreiche Haarfollikel, die Ähnlichkeit zu humanen Follikeln aufwies. Die Haut wurde nach der Lieferung von dem Schlachthof mit Skalpell und Pinzette vom Ohrenknorpel getrennt, sofort auf die Franz-Diffusionszelle aufgespannt und mit 200 mg Nilrot-beladener Creme, bzw. SLN und NLC-O (Konzentration von Nilrot 0,004 %) behandelt. Nach 3 bzw. 6 Stunden wurden die Kontaktfläche ausgestanzt, überflüssige Präparationen mit destilliertem Wasser mit einem Papiertuch abgewischt und Haarfollikel mit der Methode des Cyanoacrylatstrippings isoliert (Lademann et al., 2001). Dazu wurde Cyanoacrylatklebstoff für 15 min auf die Hautoberfläche aufgetragen und mit einem Objektträger zugedeckt. Anschließend wurde der

Objekträger von der Haut abgezogen. Die Haarfollikel wurden mit einer Pinzette auf einen anderen Objekträger überführt und unter einem Fluoreszenzmikroskop bei der Vergrößerung von 200 untersucht.

### 2.11 Statistik

Die Ergebnisse sind als arithmetische Mittelwerte angegeben, wobei als Maß für die Streuung die Standardabweichung ( $\pm$  SD) dient. Zur Prüfung der Signifikanz von Mittelwertsunterschieden wurde der Zweistichproben-t-Test durchgeführt. Zusätzlich wurde der Einstichproben-t-Test zum Vergleich der relativen Verhältnisse zwischen den Zubereitungen und der Creme eingesetzt. Die Normalverteilung wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test, die Varianzhomogenität mit dem F-Test untersucht. Bei Vorliegen einer Varianzhomogenität ist der Welch-Test eingesetzt worden. Bei Nichterfüllung der Voraussetzung für den t-Test wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Mann-Whitney-Test durchgeführt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  ist auf 5 % festgelegt worden. Ein  $p \leq 0,05$  wird im Sinne der explorativen Datenanalyse als Hinweis auf einen Unterschied gewertet.