

Einfluss hydrophiler Penetrationenhancer auf die Nanostruktur von Stratum corneum Lipidmodellen

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Dipl.-Pharm. Josefin Müller
geb. am 08.03.1988 in Stendal

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dr. h.c. Reinhard Neubert
2. Prof. Dr. Gerald Brezesinski
3. Prof. Dr. Daniel Huster

Tag der Verteidigung: 29.11.2017

DANKSAGUNG

Ich möchte mich bedanken bei ...

... Prof. Dr. Dr. h.c. Reinhard Neubert für die Überlassung des interessanten Themas, für die mir gewährten Freiheiten bei der Umsetzung und Gestaltung des selbigen, für sein uneingeschränktes Engagement und seine Hilfestellung bei fachlichen Diskussionen.

... Prof. Dr. Gerald Brezesinski für die vielen konstruktiven fachlichen Diskussionen und seine Hilfestellung bei der Vorbereitung der LB/LS Experimente.

... Prof. Dr. Daniel Huster für den Zugang zu den Laboren und dem Fluorimeter zur Durchführung der Leakage-Experimente.

... Dr. Lars Thomas für die Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung der Leakage-Experimente.

... Professor Dr. Bodo Dobner und Mitarbeitern für die Aufreinigung einiger für diese Arbeit essentieller Substanzen.

... Dr. Marcus Trapp für die uneingeschränkte Unterstützung bei der Vorbereitung, Durchführung, Auswertung und Diskussion der Röntgen- und Neutronenreflektometrie-Experimente, sowie die umfassende fachliche Hilfestellung bezüglich der Reflektometrie-Experimente.

... Dr. Thomas Hauß für die vielen hilfreichen Diskussionen bezüglich der Reflektometrie-Experimente und den Zugang zu dem gut organisierten Biolabor am HZB.

... Dr. Roland Steitz für die fachliche Unterstützung bei der Diskussion der Röntgen- und Neutronenreflektometrie-Ergebnisse im Zuge der Messzeiten am HZB.

... Dr. Robert Barker für die umfangreiche Unterstützung bei der Vorbereitung, Durchführung und Auswertung der Neutronenreflektometrie-Experimente am ILL.

... Prof. Dr. Karsten Mäder für den Zugang zum Zetasizer zur Durchführung der PCS-Messungen an Liposomen.

... Dr. Hendrik Metz für die hilfreichen Diskussionen bezüglich mathematischer Fragestellungen.

... Heike Rudolf und Martina Heidler für die Unterstützung bei der Durchführung der IR- und PCS-Messungen.

... der Arbeitsgruppe Biopharmazie, dabei besonders Adina Eichner, Dr. Sandy Naumann, Elfi Sommer, Dr. Andrea Heinz, Dr. Annett Schröter und allen anderen Mitgliedern für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die vielen hilfreichen Diskussionen und ihre Unterstützung.

... der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), die durch ihre finanzielle Unterstützung diese Arbeit erst ermöglicht hat.

... meiner Familie und meinen Freunden und besonders meinem Freund für seine uneingeschränkte Unterstützung während der letzten Jahre.

INHALTSVERZEICHNIS

Formelzeichen- und Abkürzungsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	vi
I. Einleitung	1
II. Haut	3
1. Stratum corneum	3
2. Lipidmatrix	4
2.1. Zusammensetzung der Lipidmatrix	4
2.2. Organisation der Lipidmatrix	6
III. Enhancer – Moleküle zur Beeinflussung der Barrierefunktion	7
IV. Modellsysteme	9
1. Präparation der verschiedenen Lipidmodelle	10
1.1. Liposomen	11
1.2. einzelne, festkörpergestützte Bilayer	11
1.3. oligolamellare Lipidschichten	12
1.4. Multilamellare Lipidschichten	13
V. Methoden	15
1. Röntgen- und Neutronenreflektometrie	15
1.1. Durchführung von XR-messungen an multi- und oligolamellaren Schichten	18
1.1.1. Datenauswertung	18
1.2. Durchführung von NR-Messungen an multi- und oligolamellaren Schichten (BioRef/HZB)	20
1.2.1. Datenauswertung	21
1.3. Durchführung von NR-Messungen an festkörpergestützten einzelnen Bilayern (FIGARO/ILL)	23
1.3.1. Datenauswertung	23
2. Leakagemessungen an Liposomen	24
2.1. Durchführung und Datenauswertung	24
3. Infrarotspektroskopie	26
3.1. Durchführung von IR-Messungen an multilamellaren Schichten	27
3.1.1. Datenauswertung	27
3.2. Durchführung von IR-Messungen an oligolamellaren Schichten	27
3.2.1. Datenauswertung	27
4. Photonenkorrelationspektroskopie	28
4.1. Durchführung und Datenauswertung	28
VI. Ergebnisse und Diskussion	29

1.	Präparation eines neuartigen oligolamellaren SC-Lipidmodells	29
1.1.	Optimierung der Probenpräparation anhand von XR-Untersuchungen.....	29
1.1.1.	Lipidkonzentration beim Rotationsbeschichten.....	29
1.1.2.	Rotationsgeschwindigkeit beim Beschichten	31
1.1.3.	Polyethyleniminschicht als Bindeglied.....	31
1.1.4.	Methanolgehalt und Reproduzierbarkeit	33
1.1.5.	Cholesterolgehalt	34
1.2.	Vergleich der Probenstruktur oligo- und multilamellarer SC Lipid- modelle, sowie des Einflusses einer Annealingprozedur mit Hilfe von Röntgenreflektivitätsmessungen	35
1.3.	IR-Untersuchungen zur Tauglichkeit der Modelle für simultane NR- und IR-Messungen	39
1.4.	Zusammenfassung.....	40
2.	Hydrophile Enhancer	42
2.1.	Wasser.....	42
2.1.1.	IR- und NR-Messungen an Multilayern	43
2.1.2.	IR- und NR-Messungen an Oligolayern	48
2.1.3.	NR-Messungen an Festkörpergestützten einzelnen Bilayern	53
2.1.4.	Leakage- und PCS-Messungen an ULVs	54
2.1.5.	Zusammenfassung	56
2.2.	Harnstoff	58
2.2.1.	Multilayer.....	58
2.2.2.	Oligolayer	60
2.2.3.	Festkörpergestützte einzelne Bilayer	61
2.2.4.	Liposomen	62
2.2.5.	Zusammenfassung	64
2.3.	Taurin.....	66
2.3.1.	Multilayer.....	66
2.3.2.	Oligolayer	67
2.3.3.	Festkörpergestützte einzelne Bilayer	69
2.3.4.	Liposomen	69
2.3.5.	Zusammenfassung	71
2.4.	DMSO	72
2.4.1.	Multilayer.....	73
2.4.2.	Oligolayer	74
2.4.3.	Liposomen	77
2.4.4.	Zusammenfassung	79
2.5.	Glycerol.....	81
2.5.1.	Multilayer.....	81
2.5.2.	Oligolayer	82

2.5.3. Liposomen	83
2.5.4. Zusammenfassung	84
2.6. Propylenglykol.....	86
2.6.1. Multilayer.....	86
2.6.2. Oligolayer	87
2.6.3. Liposomen	88
2.6.4. Zusammenfassung	89
2.7. Pentandiole.....	91
2.7.1. Multilayer.....	91
2.7.2. Oligolayer	92
2.7.3. Festkörpergestützte einzelne Bilayer	96
2.7.4. Liposomen	98
2.7.5. Zusammenfassung	99
VII. Zusammenfassung und Ausblick	101
VIII. Anhang	105
A - Abbildungen & Tabellen	105
B - Ergänzungen Methoden	114
1. Röntgen- und Neutronenreflektometrie	114
1.2. Neutronen- und Röntgenstrahlung	114
1.3. Reflektometrie – Prinzip	115
1.4. Reflektivitätsmessungen an Schichtsystemen.....	118
1.5. Reflektometer.....	118
2. Molekülspektroskopie.....	120
2.1. Fluoreszenzspektroskopie	120
2.2. Infrarot Spektroskopie	121
2.2.1. Prinzip FTIR	122
3. Photonenkorrelationsspektroskopie.....	122
C - Materialien	124
IX. Literaturverzeichnis.....	125
X. Publikationsliste	139
XI. Lebenslauf.....	141
XII. Eidesstattliche Erklärung.....	142

FORMELZEICHEN- UND ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

4MW	4 matched water (H ₂ O/D ₂ O-Gemisch mit einer Streulängendichte von $4 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$)
6-CF	6-Carboxyfluorescein
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
AP	Alpha-hydroxy Phytosphingosin
ATR	Attenuated Total Reflection (abgeschwächte Totalreflexion)
BioRef	Neutronenreflektometer für biologische Anwendungen am HZB
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
CER	Ceramid
CHCl ₃	Chloroform
CHOL	Cholesterol
CS	Cholesterolsulfat
d	Bilayerschichtdicke
δ	Deformationsschwingung
D ₂ O	schweres Wasser, Deuteriumoxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	Differential scanning calorimetry (Differenzthermoanalyse)
DTGS	deuterierter Triglycinsulfat-Detektor
FFA	free fatty acid (Freie Fettsäure)
FIGARO	horizontales Neutronenreflektometer am ILL
FT	Fourier-Transform
GESTIS	Gefahrstoffinformationssystem
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBB	Wasserstoffbrückenbindung
HZB	Helmholtz-Zentrum für Materialien und Energie Berlin
ILL	Institut Laue-Langevin
IR	Infrarot
L	Leakage
LB/LS	Langmuir Blodgett / Langmuir Schaefer
LPP	Long-Periodicity Phase
m/m	Massenverhältnis

MCT	stickstoffgekühlten Quecksilber Cadmium Tellurid Detektor
MeOH	Methanol
MLVs	multilamellare Vesikel/Liposomen
MW	Mittelwert
N	Anzahl an Lipidbilayern
NaCl	Natriumchlorid
NH ₄ OH	Ammoniumhydroxid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (Kernspinresonanzspektroskopie)
NR	Neutronenreflektometrie
PA	Palmitinsäure
PCS	photon correlation spectroscopy (Photonenkorrelationsspektroskopie)
Pd	Pentandiol
PDI	Polydispersitätsindex
PEI	Polyethylenimin
PG	Propylenglykol
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SA	stearic acid (Stearinsäure)
SANS	Small Angle Neutron Scattering (Neutronenkleinwinkelstreuung)
SAXS	Small Angle X-Ray Scattering (Röntgenkleinwinkelstreuung)
SC	Stratum corneum
SD	Standardabweichung
Si	Silizium
SiO ₂	Siliziumdioxid
SL	Stammlösung
SLD	Streulängendichte
SMW	silicon matched water (H ₂ O/D ₂ O-Gemisch mit einer Streulängendichte analog zu der von Silizium von $2,07 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$)
SPP	Short-Periodicity Phase
t	Gesamtprobenschichtdicke
TA	Tetracosansäure/Lignocerinsäure
TAUT	spezieller Taurin Transporter
TOF	time-of-flight (Flugzeit)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

ULVs	unilamellare Vesikel/Liposomen
V/V	Volumenverhältnis
v	Valenzschwingung
WAXS	Wide Angle X-Ray Scattering (Röntgenweitwinkelstreuung)
XR	Röntgenreflektometrie
z-average	intensitätsgewichteter hydrodynamischer Partikeldurchmesser

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Schematischer Aufbau der Haut	3
Abb. 2: Strukturformel des CER[AP], sowie eine schematische Darstellung möglicher Konformationen der Ceramide	5
Abb. 3: Schematische Darstellung der wichtigsten Enhancerwechselwirkungen im SC	8
Abb. 4: Strukturformeln der untersuchten Enhancermoleküle	8
Abb. 5: Übersicht der angewendeten SC-Lipidmodelle	10
Abb. 6: Schematische Darstellung des Prinzips der Reflektometrie	15
Abb. 7: a) Beispielhafte NR-Kurve eines SC-Lipidmodells b) SLD-Profil der NR-Kurve mit der entsprechenden Anordnung der Lipide	17
Abb. 8: Schematischer Aufbau des BioRef am HZB	20
Abb. 9: In Motofit angewendetes Fitmodell, bestehend aus 13 Schichten	22
Abb. 10: Schematischer Aufbau des FIGARO am ILL	23
Abb. 11: Strukturformel von 6-CF	25
Abb. 12: Schematische Darstellung des Prinzips der Leakage-Messungen	25
Abb. 13: XR-Kurven: Einfluss der Lipidkonzentration beim Rotationsbeschichten	30
Abb. 14: XR-Kurven: Einfluss der Rotationsgeschwindigkeit beim Rotationsbeschichten	31
Abb. 15: a) XR-Kurven: Einfluss des wässrigen Mediums auf die Beständigkeit der Lipide auf der Waferoberfläche mit und ohne PEI-Layer; b) XR-Kurven: Strukturveränderungen des unbeschichteten PEI-Layers bei Lagerung an der Luft	32
Abb. 16: a) XR-Kurven: Einfluss des Methanolgehaltes während der Präparation auf die Reproduzierbarkeit der Reflektivitätskurven	34
Abb. 17: XR-Kurven: Einfluss Annealing ohne PEI-Schicht	35
Abb. 18: a) XR-Kurven: Einfluss Annealing auf Oligolayer mit PEI-Schicht; b) XR-Kurven: Einfluss Annealing auf Multilayer mit PEI-Schicht.	36
Abb. 19: IR-Spektren der mittels XR untersuchten Multi- bzw. Oligolayer (Vergleich unterschiedlicher Detektoren)	40
Abb. 20: IR-Spektren von Multilayern gegen H ₂ O (3000-2800 cm ⁻¹)	44
Abb. 21: IR-Spektren von Multilayern gegen H ₂ O (1800 bis 1400 cm ⁻¹)	44
Abb. 22: NR-Kurve von Multilayern gegen D ₂ O	47
Abb. 23: IR-Spektrum von Oligolayern gegen D ₂ O	49
Abb. 24: NR-Kurve von Oligolayern gegen D ₂ O inklusive Fits und SLD-Profilen	50
Abb. 25: NR-Kurven von Bilayern gegen D ₂ O inklusive Fits, SLD-Profilen und Modellvorstellung	53
Abb. 26: PCS-Messungen von ULVs in Puffer	55
Abb. 27: Leakage-Messungen von ULVs in Puffer	56
Abb. 28: IR-Spektren von Multilayern gegen Harnstoff	60
Abb. 29: a) IR-Spektren von Oligolayern gegen Harnstoff; b) NR-Kurven von Oligolayern gegen Harnstoff	61
Abb. 30: NR-Kurven von Bilayern gegen Harnstoff	61

Abb. 31: PCS-Messungen von ULVs in Harnstofflösung.....	62
Abb. 32: Leakage-Messungen von ULVs in Harnstofflösung	63
Abb. 33: NR-Kurven von Oligolayern gegen Taurin inklusive Fits und SLD-Profilen.....	68
Abb. 34: NR-Kurven von Bilayern gegen Taurin	69
Abb. 35: PCS-Messungen von ULVs in Taurinlösung	70
Abb. 36: Leakage-Messungen von ULVs in Taurinlösung	70
Abb. 37: NR-Kurven von Oligolayern gegen 10 % DMSO inklusive Fits und SLD-Profilen.....	75
Abb. 38: NR-Kurven von Oligolayern gegen 30 % DMSO inklusive Fits und SLD-Profilen.....	76
Abb. 39: PCS-Messungen von ULVs in DMSO-Lösung.....	78
Abb. 40: Leakage-Messungen von ULVs in DMSO-Lösung.....	78
Abb. 41: NR-Kurven von Oligolayern gegen Glycerol.....	83
Abb. 42: PCS-Messungen von ULVs in Glycerollösung	83
Abb. 43: Leakage-Messungen von ULVs in Glycerollösung.....	84
Abb. 44: NR-Kurven von Oligolayern gegen PG.....	87
Abb. 45: PCS-Messungen von ULVs in PG-Lösung	88
Abb. 46: Leakage-Messungen von ULVs in PG-Lösung	89
Abb. 47: NR-Kurven von Oligolayern gegen 1,5-Pd inklusive Fits und SLD-Profilen	94
Abb. 48: NR-Kurven von Oligolayern gegen 1,2-Pd inklusive Fits und SLD-Profilen	95
Abb. 49: a) NR-Kurven von Bilayern gegen 1,5-Pd in D ₂ O inklusive Fits, SLD-Profilen und Modellvorstellung; b) NR-Kurven von Bilayern gegen 1,2-Pd in D ₂ O inklusive Fits, SLD-Profilen und Modellvorstellung	97
Abb. 50: Leakage-Messungen von ULVs in 1,5-Pd- und 1,2-Pd-Lösung.....	99
Abb. 51: IR-Spektren von Multilayern gegen Taurin.....	105
Abb. 52: IR-Spektren von Multilayern gegen DMSO.....	107
Abb. 53: IR-Spektren von Multilayern gegen Glycerol	109
Abb. 54: IR-Spektren von Multilayern gegen PG	110
Abb. 55: a) IR-Spektren von Multilayern gegen 1,5-Pd; b) IR-Spektren von Multilayern gegen 1,2-Pd.....	111
Abb. 56: NR-Kurven von Bilayern gegen 1,5-Pd in D ₂ O, 4MW und SMW.....	113
Abb. 57: NR-Kurven von Bilayern gegen 1,2-Pd in D ₂ O, 4MW und SMW.....	113
Abb. 58: Schematische Darstellung des Prinzips der Reflektometrie	115
Abb. 59: Jablonski Termschema (vereinfacht).....	121
Abb. 60: Messprinzip der PCS	123

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: SLDs ausgewählter Substanzen für Röntgen- und Neutronenstrahlung	16
Tabelle 2: SLDs, Schichtdicken und Rauigkeiten für die Schichten des beschriebenen Modells aus Abb.7b	17
Tabelle 3: Schichtdicken, ermittelt aus den in Abb. 13 dargestellten XR-Kurven.....	30
Tabelle 4: Schichtdicken, ermittelt aus den in Abb. 18a und b dargestellten XR-Kurven	36
Tabelle 5: IR-Messungen: Wellenzahlen Multilayer gegen Luft und zu verschiedenen Inkubationszeiten in H ₂ O.....	45
Tabelle 6: Peakpositionen aus NR-Messungen von Multilayern gegen D ₂ O	47
Tabelle 7: in Origin bestimmte Peakpositionen des oligolamellaren Lipidmodells gegen D ₂ O	50
Tabelle 8: Fitparameter der NR-Kurve der oligolamellaren Lipidmischung gegen D ₂ O.....	51
Tabelle 9: Leakage von ULVs in Pufferlösungen mit verschiedenen pH-Werten	56
Tabelle 10: IR-Messungen: Wellenzahlen Multilayer gegen Harnstoff	59
Tabelle 11: IR-Messungen: Wellenzahlen Multilayer gegen Taurin	67
Tabelle 12: IR-Messungen: Wellenzahlen Oligolayer gegen Taurin	67
Tabelle 13: IR-Messungen: Wellenzahlen Multilayer gegen DMSO	73
Tabelle 14: IR-Messungen: Wellenzahlen Oligolayer gegen DMSO	74
Tabelle 15: Schichtdicken und Mediumanteile für NR-Messungen von Oligolayern gegen DMSO (Auszug aus Tabelle 29)	76
Tabelle 16: Werte der Leakage-Messungen von ULVs gegen DMSO	79
Tabelle 17: IR-Messungen: Wellenzahlen Multilayer gegen Glycerol	81
Tabelle 18: IR-Messungen: Wellenzahlen Oligolayer gegen Glycerol.....	82
Tabelle 19: IR-Messungen: Wellenzahlen Multilayer gegen PG.....	87
Tabelle 20: IR-Messungen: Wellenzahlen Oligolayer gegen PG.....	87
Tabelle 21: IR-Messungen: Wellenzahlen Multilayer gegen 1,5-Pd und 1,2-Pd	92
Tabelle 22: IR-Messungen: Wellenzahlen Oligolayer gegen 1,5-Pd und 1,2-Pd.....	93
Tabelle 23: Mediumanteile für NR-Messungen von Oligolayern gegen 1,5-Pd.	94
Tabelle 24: Peakpositionen aus NR-Messungen gegen 1,2-Pd	95
Tabelle 25: Schichtdicken, Mediumanteile und Rauigkeiten für NR-Messungen von Oligolayern gegen 1,2-Pd (Auszug aus Tabelle 31)	96
Tabelle 26: Zusammenfassung Enhancereinflüsse.....	102
Tabelle 27: Dicken, SLDs, Mediumanteile und Rauigkeiten für NR-Messungen von Oligolayern gegen Taurin	106
Tabelle 28: Dicken, SLDs, Mediumanteile und Rauigkeiten für NR-Messungen von Oligolayern gegen 10 % DMSO.....	107
Tabelle 29: Dicken, SLDs, Mediumanteile und Rauigkeiten für NR-Messungen von Oligolayern gegen 30 % DMSO.....	108
Tabelle 30: Dicken, SLDs, Mediumanteile und Rauigkeiten für NR-Messungen von Oligolayern gegen 1,5-Pd	111
Tabelle 31: Dicken, SLDs, Mediumanteile und Rauigkeiten für NR-Messungen von Oligolayern gegen 1,2-Pd	112

I. EINLEITUNG

Die Haut als Applikationsort bietet viele Vorteile gegenüber der peroralen Anwendung. Dabei wird durch eine dermale Anwendung ein gezielter Einsatz direkt am Wirkungsort und eine Verminderung von Nebenwirkungen ermöglicht, während bei der transdermalen Applikation von Arzneistoffen, neben verminderten systemischen Nebenwirkungen, eine Umgehung des First-Pass-Effektes erreicht werden kann¹. Nachteilig ist jedoch, dass die Bioverfügbarkeit dermal und transdermal applizierter Wirkstoffe aufgrund der außerordentlichen Barrierefunktion der Haut stark eingeschränkt ist. Hierbei spielt vor allem das Stratum corneum (SC), und besonders dessen hochgeordnete Lipidmatrix, eine entscheidende Rolle. Diese stellt die Hauptpenetrationsbarriere der menschlichen Haut für die meisten Arzneistoffe dar². Folglich gilt es, Möglichkeiten zu finden die Barriereigenschaften der Lipidmatrix reversibel herabzusetzen und somit die topische und systemische Verfügbarkeit von Arzneistoffen zu erhöhen. Neben verschiedenen physikalischen Methoden und dem Einsatz moderner Vehikelsysteme, wie z. B. Mikroemulsionen, kann dies durch Anwendung von Penetrationenhancern auf chemischem Weg erreicht werden³. Abhängig von der Polarität der Enhancer, gibt es verschiedene Theorien über den Wechselwirkungsmechanismus mit der SC-Lipidmatrix. Die in dieser Arbeit fokussierten hydrophilen Enhancer interagieren vor allem im Bereich der Kopfgruppen der Lipide⁴. Der genaue Wirkmechanismus der meisten hydrophilen Enhancer ist auf molekularer Ebene allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt.

Die Motivation dieser Arbeit bestand folglich darin weitere Informationen über die Interaktion von ausgewählten hydrophilen Penetrationenhancern mit SC-Lipiden zu erhalten. Dazu wurde eine ternäre SC-Lipidmodellmischung aus den synthetisch gewonnenen Lipiden Ceramid [AP]-C18/18 (CER[AP]), Cholesterol (CHOL) und freier Fettsäure (FFA) gewählt. Diese entspricht qualitativ (von der Art ihrer Komponenten) der Zusammensetzung der nativen SC-Lipidmatrix. Das untersuchte System ist in ähnlicher Zusammensetzung in Hinblick auf die Lipidanordnung bereits umfangreich untersucht^{5, 6, 7, 8}. Es bietet daher einen guten Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen bezüglich des Einflusses von Penetrationenhancern. Die Verwendung synthetischer Lipide bot dabei gegenüber exzidiertem humanem SC und SC-Lipidextrakten den Vorteil, dass die verwendeten Lipide eine definierte Struktur besaßen und die Komponenten der Mischung zunächst sehr einfach gestaltet werden konnten. Somit war es möglich bestimmte Effekte direkt auf einzelne Lipidspezies zurückzuführen. Unter den mittlerweile beschriebenen 19 Subspezies der Ceramide, stellt CER[AP] mit einem Anteil von etwa 9 % den sechsthäufigsten Vertreter dar⁹. Darüber

hinaus war aufgrund der größtmöglichen Menge an vier OH-Gruppen in der Kopfgruppe ein starkes Interaktionspotential mit den in dieser Arbeit im Mittelpunkt stehenden hydrophilen Enhancern zu erwarten. In Anlehnung an die Kettenlänge des CER wurde vorwiegend Stearinsäure (SA), als häufigste kurzkettige FS der SC-Lipidmatrix, eingesetzt¹⁰. Die Mischungen wurden anschließend in diverse Modellsysteme, wie multi- oder oligolamellare Schichten, einzelne festkörpergestützte Bilayer und unilamellare Liposomen (ULVs) überführt. Unter Anwendung geeigneter Methoden wurde daran schließlich der Einfluss der hydrophilen Penetrationenhancer Wasser, Harnstoff, Taurin, Dimethylsulfoxid (DMSO), Glycerol, Propylenglykol (PG), 1,2-Pentandiol und 1,5-Pentandiol (Pd) untersucht. Dabei konnten durch die Anwendung der ATR-FTIR-Spektroskopie Einflüsse auf die laterale Probenstruktur, wie beispielsweise eine Auflockerung innerhalb der Ketten, näher untersucht werden. Die Neutronenreflektivitäts(NR)-Messungen wurden an verschiedenen Reflektometern unterschiedlicher Forschungseinrichtungen durchgeführt. Sie lieferten aussagekräftige Membranprofile, aus denen Informationen über die Verteilung des Mediums und der Enhancer innerhalb der einzelnen Bilayerbereiche und deren Einfluss auf die Schichtdicke erhalten werden konnten. Mit Hilfe der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) an ULVs konnte die Stabilität in Bezug auf die Liposomengrößenverteilung ermittelt werden, während bei der fluoreszenzspektroskopischen Bestimmung des Leakage die Stabilität der ULVs unter dem Gesichtspunkt der Integrität der Membran näher untersucht wurde. Durch die Kombination der unterschiedlichen SC-Lipidmodelle mit den vielfältigen Messmethoden konnten somit umfangreiche Einblicke in das Interaktionspotential der untersuchten hydrophilen Enhancer mit den SC-Lipidmodellen gewonnen werden.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil dieser Arbeit, der den eigentlichen Untersuchungen des Enhancereinflusses vorausging, war die systematische Optimierung der Präparation eines reproduzierbaren oligolamellaren SC-Lipidmodells zur Realisierung einer simultanen NR- und IR-Messung. Dabei wurden verschiedene Parameter wie beispielsweise die Umdrehungsgeschwindigkeit, die Lipidkonzentration oder der Methanolgehalt der Lipidmischung variiert und mit Hilfe von Röntgenreflektometriemessungen bewertet. Ein nicht unwesentlicher Aspekt dabei war die Voraussetzung, dass das entwickelte Modell auch für Messungen an einer fest/flüssig-Grenzfläche geeignet ist, sodass die Lipide auch im wässrigen Medium auf der Waferoberfläche beständig sein würden.

II. HAUT

Mit einer Oberfläche von ungefähr 2 m^2 ist unsere Haut nicht nur das größte menschliche Organ, sondern besitzt auch einige wichtige Funktionen. So hat sie einerseits eine Schutzfunktion, vor allem gegenüber dem Eindringen von Mikroorganismen und physikalischen, sowie chemischen Einflüssen. Andererseits dient sie der Regulation des Wasserhaushaltes, der Wärmeregulation und als Sinnesorgan zur Weiterleitung von Schmerz-, Druck- und Temperaturreizen. Der Aufbau der menschlichen Haut gliedert sich im Wesentlichen in drei Schichten: die Epidermis, die Dermis und die Subkutis, wobei die Epidermis die äußerste Hautschicht darstellt (Abb. 1). Die Epidermis wiederum kann von innen nach außen in das Stratum basale, das Stratum spinosum, das Stratum granulosum und das Stratum corneum (SC) unterteilt werden^{11, 12}.

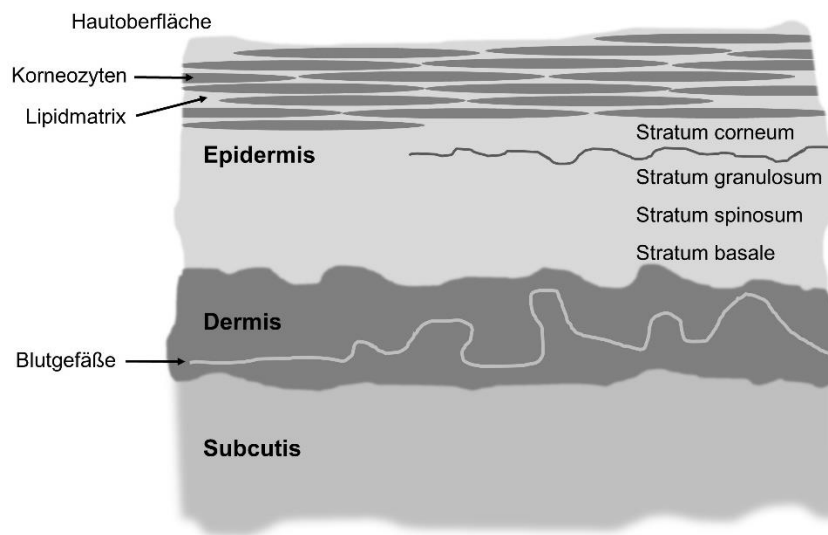


Abb. 1: Schematischer Aufbau der Haut, modifiziert nach¹²

1. STRATUM CORNEUM

Das SC besteht aus zehn bis 20 Korneozytenschichten, die in eine Lipidmatrix eingebettet sind (Abb. 1). Jeder einzelne Korneozyt ist von einer membranartigen Hülle, dem „cornified envelope“, umgeben. An diese Proteinschicht gebundene Ceramide bilden die Verbindung zur lipophilen Lipidmatrix¹³. Die Einbettung der Korneozyten in der Lipidmatrix wird häufig mit dem „brick and mortar“-Modell beschrieben¹⁴. Hierbei wird der Aufbau des SC mit einer Ziegelmauer verglichen, in der die Korneozyten die Ziegelsteine und die Lipidmatrix den Mörtel darstellen. Allerdings ist dieser Vergleich unzureichend, da hakenähnliche Strukturen, an den Korneozyten für zusätzlichen Halt sorgen. Zudem stehen die Zellen über „tight junctions“ und Korneodesmosomen in Verbindung und werden auf diesem Wege

miteinander „vernietet“. Dieser Aufbau ermöglicht eine besonders feste und undurchlässige Struktur, die hauptverantwortlich für die Stabilität und die Barrierefunktion des SC ist. Einen wesentlichen Beitrag dazu leisten auch die Bilayerstrukturen der SC-Lipidmatrix².

2. LIPIDMATRIX

2.1. ZUSAMMENSETZUNG DER LIPIDMATRIX

Die SC-Lipidmatrix setzt sich aus einer etwa äquimolaren Menge von Ceramiden (CER), freien Fettsäuren (FFA) und Cholesterol (CHOL), sowie dessen Derivaten zusammen¹⁵. Auffällig ist die nahezu vollständige Abwesenheit von Phospholipiden, die in den meisten anderen Biomembranen den Hauptbestandteil darstellen¹².

CHOLESTEROL. Der Effekt von CHOL auf die Lipidstrukturen ist abhängig von dessen Konzentration. In geringen Mengen vorhanden, stabilisiert es die *trans*-Konformation der Ketten und erhöht somit die Ordnung innerhalb der Bilayer. Bei sehr hohen Konzentrationen kommt es zu Wechselwirkungen des CHOL mit dicht gepackten Fettsäureresten. Dadurch wird die Lipidstruktur aufgelockert und die Permeabilität erhöht^{16, 17}. Die genaue Lokalisierung des CHOL ist bereits an verschiedenen SC-Lipidmodellmembranen untersucht worden^{8, 18, 19}. Demnach befindet sich die hydrophile Hydroxylgruppe in Höhe der polaren Kopfgruppen, wohingegen das lipophile Steroidgrundgerüst ins Innere der Bilayer hineinragt und mit den lipophilen Resten der anderen Lipidkomponenten wechselwirken kann. CHOL-Derivate kommen nur in sehr geringen Mengen im SC vor. Eine wichtige Rolle spielt hierbei das Cholesterolsulfat (CS), welches für den Desquamationsprozess (die Abstoßung der obersten Hautschuppen) von großer Bedeutung ist.

FREIE FETTSÄUREN. Die Fettsäurefraktion des SC besteht aus überwiegend gesättigten FFA mit Kettenlängen zwischen 14 und 28 Kohlenstoffatomen^{10, 20}. Dabei stellen die C24:0-Fettsäure (Lignocerinsäure, TA) mit 30 % und die C26:0-Fettsäure (Hexacosansäure) mit 25 % den Hauptanteil dar²¹. Neuere Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe haben außerdem gezeigt, dass die bisher als eher bedeutungslos geltenden ungeradzahigen FFA einen wesentlichen Anteil von ~20 % einnehmen (unveröffentlichte Daten). Neben CS sind die FFA die einzigen ionisierbaren Substanzen im SC und spielen deshalb bei der Ausbildung der Bilayerstrukturen eine wichtige Rolle²².

CERAMIDE kommen nicht nur im SC, sondern auch in vielen anderen Geweben des menschlichen Körpers vor. Die Besonderheit im SC ist, dass CER hier in einer Vielfalt und Menge vorkommen, wie sie in keinem anderen Kompartiment erreicht wird²³. Im SC sind sie maßgeblich am Aufbau und der Erhaltung der Barrierefunktion beteiligt^{24, 25}. CER gehören struk-

turell zu den Sphingolipiden und bestehen aus einer langkettigen Fettsäure, die über eine Amidbindung mit der Sphingoidbase verknüpft ist. Als Fettsäuren kommen Nonhydroxy-(N), α -Hydroxy- (A) oder ω -Hydroxyfettsäuren (O) in Frage. Zusätzlich können ω -Hydroxyfettsäuren mit einer weiteren Fettsäure verestert werden²⁶. Nicht nur die Anzahl an Hydroxylgruppen und der Sättigungsgrad, sondern auch das Auftreten von Methylverzweigungen und die Variation der Fettsäurekettenlänge vergrößern die Diversität der resultierenden CER-Spezies²⁷. Die Sphingoidbase, bei der ebenfalls Kettenlängen von zwölf bis 28 C-Atomen möglich sind^{28, 29}, kann entweder Sphingosin (S), ein langkettiger, einfach ungesättigter Dihydroxyaminoalkohol, das gesättigte Derivat Dihydrosphingosin (DS), Phytosphingosin (P), ein C4-Hydroxyderivat des DS, oder das 6-Hydroxysphingosin (H), ein C6-Hydroxyderivat des Sphingosin, sein. Speziell für die Nonhydroxyfettsäure (N) wurde eine weitere Sphingoidbase, das 4,X-Dihydroxydihydrosphingosin (T) beschrieben⁹, bei dem die Position der zusätzlichen OH-Gruppe bisher jedoch nicht genau zugeordnet werden konnte. Außerdem wurden für die Nonhydroxy- (N) und α -Hydroxyfettsäure (A) Sphingoidbasen identifiziert, die in 1-O-Position verestert sind (1-O-E)³⁰. Bisher konnten 19 verschiedene Ceramidklassen identifiziert werden, deren jeweilige Funktionen in Bezug auf die Barrierefunktion des SC noch nicht genau bekannt sind^{9, 23, 30}. Grundsätzlich erfolgt die Benennung der einzelnen Klassen entsprechend der Nomenklatur nach Motta et al.³¹, wobei die in Klammern angegebenen Buchstaben eine Kombination des Fettsäuretyps mit der der Sphingoidbase darstellen. Im Rahmen dieser Arbeit soll speziell das CER[AP] (Abb. 2, links) betrachtet werden. Anhand des durch die beiden Ketten des CER eingeschlossenen Winkels α lassen sich prinzipiell drei verschiedene Konformationen unterscheiden: die gestreckte ($\alpha = 180^\circ$), die V-förmige ($0 < \alpha < 180^\circ$) und die Haarnadelkonformation ($\alpha = 0^\circ$)^{32, 33} (Abb. 2, rechts). Weiterhin ist allen bisher untersuchten CER-Spezies ein ausgeprägter Polymorphismus gemein. Dabei können verschiedene Kettenpackungen (lamellar, orthorhombisch, hexagonal oder invers hexagonal) ausgebildet werden.

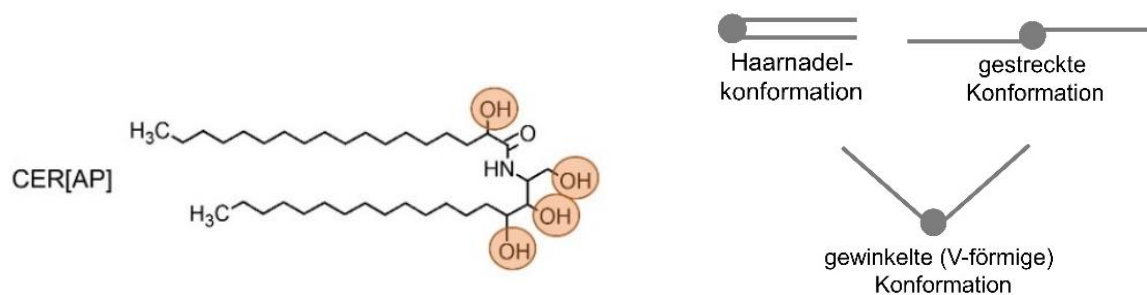


Abb. 2: Strukturformel des CER[AP] (links), sowie eine schematische Darstellung möglicher Konformationen der Ceramide (rechts).

2.2. ORGANISATION DER LIPIDMATRIX

Die SC-Lipide bilden hochgeordnete lamellare Strukturen, mit abwechselnd hydrophilen und lipophilen Bereichen aus Kopfgruppen und Alkylketten, was das Überwinden dieser Matrix für dermal und transdermal applizierte Stoffe zusätzlich erschwert. Innerhalb dieser Lamellen wird neben der Existenz von flüssig-kristallinen Bereichen auch eine orthorhombische und hexagonale Organisation der Lipide beschrieben^{34, 35, 36, 37}. In der orthorhombischen Phase sind die Lipidketten in der all-*trans* Konformation in einem rechtwinkligen Gitter angeordnet und in Bezug auf ihre Längsachse fixiert, während sie in der weniger dichten hexagonalen Packung frei um ihre Längsachse rotieren können. Der flüssig-kristalline Zustand zeichnet sich schließlich durch das Vorhandensein eines hohen Anteils an *gauche*-Konformeren aus, der die Lipidordnung verringert, wodurch es zu einem Verlust der lateralen Ordnung kommt. Durch die Koexistenz der verschieden dichten Lipidpackungen, resultiert eine Mischung aus nahezu impermeablen und sehr leicht durchlässigen Bereichen. Dabei entsteht eine Lipidstruktur, die weder zu permeabel, noch zu starr oder spröde ist und somit eine optimale Barrierefunktion des SC gewährleistet³⁸.

Während der letzten Jahrzehnte wurde intensiv daran gearbeitet die Nanostruktur der SC-Lipidmatrix aufzuklären. Basierend auf den bisherigen Erkenntnissen haben sich verschiedene theoretische Modelle über die Lipidorganisation im Interzellularraum des SC entwickelt. Zu den wichtigsten Ansätzen zählen dabei das *Stacked Monolayer Model* nach Swartzendruber et al.³⁹, das von Forslind et al. beschriebene *Domain Mosaic Model*⁴⁰, das eine trilamellare Breit-Schmal-Breit Struktur (*LPP*) beschreibende *Sandwich Model*⁴¹, das von Norlén postulierte *Single Gel Phase Model*⁴², das von Kiselev et al. entwickelte *Armature Reinforcement Model*, welches die strukturellen Veränderungen der Lipidmatrix bei Wasserüberschuss erklärt⁴³, das von Schroeter et al. beschriebene Modell, das trotz des Vorliegens eines ω -acyl-CER die alleinige Entstehung einer SPP postuliert⁵, sowie das von Iwai et al. postulierte *Asymmetriemodell*⁴⁴. Grundsätzlich ist anzumerken, dass derzeit die verschiedenen Modelle in der Diskussion stehen und weiterführende Untersuchungen zur Verifizierung eines Modelles, oder einer Kombination aus mehreren, notwendig sind. Dazu eignen sich unter anderem Untersuchungen an SC-Lipidmodellen. Sie enthalten definierte Lipide, weshalb sich, wie bereits in zahlreichen Untersuchungen gezeigt^{7, 45, 46, 47, 48}, einzelne Effekte direkt auf bestimmte Lipidspezies zurückführen lassen. Ein besonderer Vorteil dieser Mischungen besteht nicht nur darin den Einfluss der einzelnen Lipidspezies und ihre Wechselwirkungen untereinander, sondern auch Temperatur- und Feuchtigkeitseinflüsse, sowie den Einfluss von Penetrationsenhancern untersuchen zu können. Die erhaltenen Informationen können anschließend (unter Vorbehalt) auf das native SC projiziert werden.

III. ENHANCER – MOLEKÜLE ZUR BEEINFLUSSUNG DER BARRIEREFUNKTION

Penetrationsenhancer sind Stoffe, die mit Zielstrukturen des SC interagieren und so die Anreicherung eines Arzneistoffs in lebenden Hautschichten oder sogar den Eintritt in die systemische Zirkulation verbessern bzw. erst ermöglichen⁴⁹. Die systemische Wirkung durch transdermal applizierte Arzneistoffe besitzt entscheidende therapeutische Vorteile gegenüber der oralen Applikation, beispielsweise ein geringeres Ausmaß an unerwünschten Arzneimittelwirkungen und eine Umgehung des First-Pass-Effektes¹. Zur topischen Behandlung verschiedener Hautkrankheiten wird dagegen eine Anreicherung des Arzneistoffs in tieferen Hautschichten angestrebt. In jedem Fall muss der Arzneistoff zunächst in der Lage sein, das SC zu durchdringen. Grundsätzlich sollten Substanzen dafür ein Molekulargewicht von 600 Da nicht überschreiten, ausreichend gut in Wasser und lipophilen Lösungsmitteln löslich sein und einen relativ hohen Verteilungskoeffizienten besitzen. Für Moleküle, die diese Kriterien nicht erfüllen, gibt es zahlreiche Möglichkeiten, die transdermale Applikation zu optimieren, zusammengefasst in Barry et al.⁵⁰. Dazu zählen unter anderem die Verwendung von Mikroemulsionen oder Liposomen zur Verbesserung des Transportes durch das SC, die Anwendung von physikalischem Stress in Form von z. B. Wärme, wobei die Integrität des Gewebes beeinflusst wird und auch der Einsatz von chemischen Substanzen, den sogenannten Penetrationsenhancern. Hierbei stehen dem Enhancer die folgenden Möglichkeiten der Wechselwirkung zur Verfügung (siehe auch Abb. 3):

1. Innerhalb der Korneozyten: Hydratisierung oder Wechselwirkungen mit Proteinen (Keratin)
2. Zwischen den Korneozyten: Wechselwirkungen mit Proteinen (Desmosomen)
3. Innerhalb der SC-Lipidmatrix
 - a) Herauslösen von Lipiden
 - b) Phasenseparation durch Anreicherung von Wasser im Kopfgruppenbereich oder Einlagerung inverser Mizellen im Kettenbereich
 - c) Fluidisierung durch Einlagerung lipophiler Substanzen im Kettenbereich und hydrophiler Substanzen im Kopfgruppenbereich
 - d) Einlagerung und Verbesserung der Lösungseigenschaften für den Arzneistoff

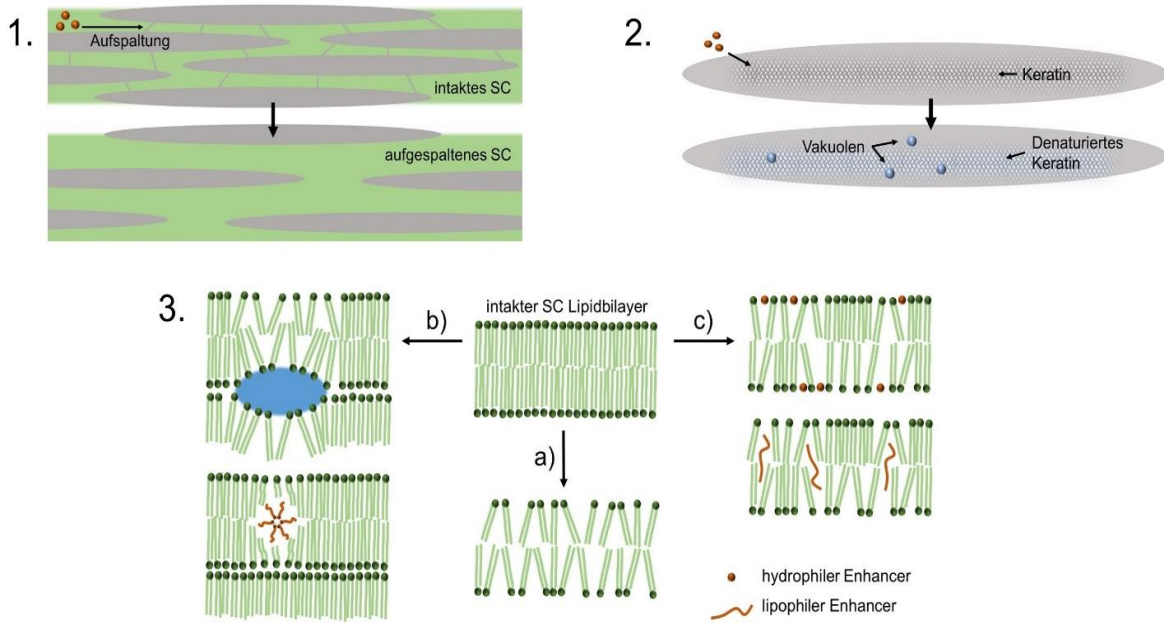


Abb. 3: Schematische Darstellung der wichtigsten Enhancerwechselwirkungen im SC, modifiziert nach^{51, 52}

Besonders potente Enhancer kombinieren dabei sogar mehrere dieser Mechanismen^{50, 53}. Da für die meisten Arzneistoffe angenommen wird, dass sie interzellulär über die Lipidmatrix das SC permeieren^{54, 55}, sind Penetrationenhancer, die mit der SC-Lipidmatrix interagieren oder die Verteilung des Arzneistoffs darin durch ihre Lösungseigenschaften verbessern, von besonderem Interesse. Dabei unterscheidet man hydrophile und lipophile Enhancer, die jeweils bevorzugt in den entsprechenden Bereichen der Bilayer wechselwirken. Es existieren bereits zahlreiche Studien, zusammengefasst in Williams et al.⁵³ bzw. Dragicevic et al.^{52, 56}, die sich mit der Untersuchung des Wirkungsmechanismus verschiedener Enhancer beschäftigen. Die bisherigen Erkenntnisse über die Wechselwirkungen der verwendeten Enhancer (Strukturformeln siehe Abb. 4) im SC konnten keine umfassende Aufklärung des Wirkungsmechanismus auf molekularer Ebene liefern. Diese werden für jeden Enhancer zusammengefasst und in Verbindung mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen, die diesbezüglich neue Erkenntnisse liefern sollen, vorgestellt und diskutiert.

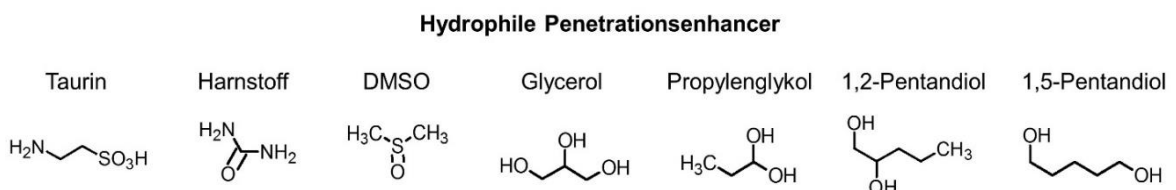


Abb. 4: Strukturformeln der untersuchten Enhancermoleküle

IV. MODELLSYSTEME

Es gibt derzeit verschiedene Ansätze, die Organisation der Lipide innerhalb der SC-Lipidmatrix und die Bedeutung einzelner Lipidspezies dabei zu erklären (Kapitel II.2.2., S. 6). Häufig werden dafür natives SC oder Extrakte der komplexen Lipidmatrix verwendet. In diesen Fällen ist es schwierig, bestimmte Eigenschaften direkt auf eine einzelne Lipidspezies zu übertragen und so zuverlässige Aussagen über deren Einfluss zu treffen. Grund dafür ist die im nativen SC sehr komplexe Lipidzusammensetzung und die Überlagerung der physikochemischen Eigenschaften der verschiedenen Lipidspezies. Für ein besseres Verständnis des Einflusses einzelner Lipidspezies oder bestimmter Substanzen ist es daher vorteilhaft zunächst einfache Lipidmodelle zu verwenden. Dazu werden Mischungen synthetischer Lipide mit definierter Zusammensetzung hergestellt. Auf diese Weise ist es möglich charakteristische Eigenschaften bestimmten Lipidspezies zuzuordnen^{32, 45, 47, 57}. Zusätzlich kann der Einfluss von Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Enhancern an derartigen Modellen mit einer stärkeren Aussagekraft untersucht werden^{58, 59, 60}. Die verwendeten Lipidmodelle können dabei unterschiedlich aufgebaut sein, z. B. hinsichtlich der Anordnung oder Dimension der lamellaren Struktur, die von Mono- bis Multilayer reichen kann. In Abb. 5 sind die in dieser Arbeit verwendeten SC-Lipidmodelle schematisch dargestellt. Bisher wurden als SC-Modellsystem vor allem auf einem geeigneten Trägermaterial aufgebraute oder in wässriger Lösung suspendierte multilamellare Proben verwendet^{5, 59, 61, 62, 63}. Zum einen kann dadurch eine für die SC-Lipidmatrix repräsentative Anordnung der Lipide erreicht werden und zum anderen sind sie mit wenig Aufwand zu präparieren. Da die Lipidmatrix im natürlichen SC aus bis zu 20 übereinander gelagerten Bilayern besteht⁶⁴, sind oligolamellare Lipidmodelle mit zwei bis 15 Bilayern eine noch realistischere Alternative zu den Multilayern, die aus bis zu einigen hundert Bilayern aufgebaut sind. Außerdem ermöglicht die reduzierte Schichtdicke genauere Einblicke in die Lipidstruktur und eine sensiblere Erfassung von geringfügigen Veränderungen, z. B. durch den Einfluss von Penetrationsenhancern. Noch sensitiver in Bezug auf strukturelle Veränderungen wird das Lipidmodell, wenn es nur noch aus einem einzigen Bilayer besteht. Diese einzelnen Bilayer sind besonders geeignet, wenn Wechselwirkungen untersucht werden sollen, die im Wesentlichen an der Grenzfläche Lipid/Medium auftreten, statt zwischen benachbarten Bilayern. Da die in dieser Arbeit verwendeten hydrophilen Enhancer im Medium gelöst sind, würden mögliche Wechselwirkungen zunächst an dieser Grenzfläche auftreten. Ein weiteres vorteilhaftes Modellsystem stellen Liposomen dar. Hierbei handelt es sich um einen oder mehrere übereinander liegende Lipidbilayer, die eine in sich geschlossene kugelige Form annehmen. Je nach Liposomentyp reichen die Durchmesser von 20 nm bis mehrere Mikrometer⁶⁵. Liposomen sind ein geeignetes Modell

um die Permeabilität der Haut und verschiedene Einflussfaktoren, wie Penetrationsenhancer, zu untersuchen⁶⁶. Sie bieten eine Vielzahl von Vorteilen gegenüber anderen Lipidmodellen. Beispielsweise ist es möglich Liposomen mit definierter Struktur und Größe zu erhalten, welche durch die Präparationsbedingungen beeinflusst werden können⁶⁷. Darüber hinaus sind besonders unilamellare Liposomen (ULVs) gut geeignet, um Wechselwirkungen von sowohl lipophilen als auch hydrophilen Enhancern und anderen Molekülen mit den Kopfgruppen der Lipide zu untersuchen.

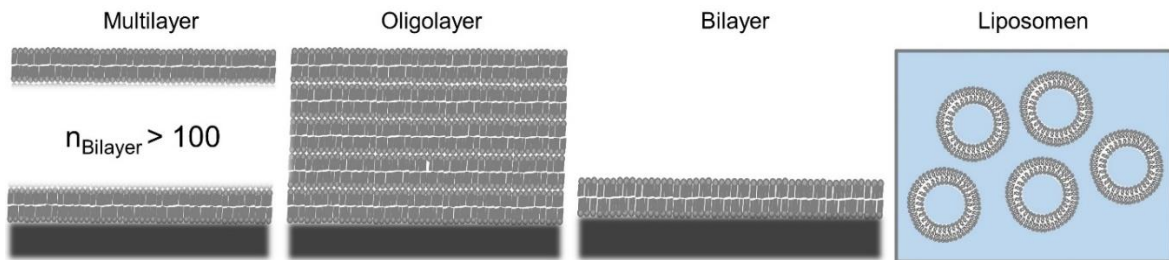


Abb. 5: Übersicht der angewendeten SC-Lipidmodelle (die Multi-, Oligo- und Bilayer sind jeweils auf einem Substrat (schwarz) aufgelagert, die Liposomen befinden sich in wässrigem Medium (blau))

1. PRÄPARATION DER VERSCHIEDENEN LIPIDMODELLE

Zur Präparation der verschiedenen Modellsysteme wurden ternäre Mischungen aus CER, CHOL und FFA verwendet. Als CER-Spezies diente CER[AP]-C18/18. Die FFA-Fraktion wurde so gewählt, dass die Kettenlängen mit der des CER übereinstimmten. Dafür wurde vor allem SA verwendet. Zur Herstellung der 10 mg/ml Stammlösungen (SL) der Lipide wurden die entsprechenden Mengen in einem Lösungsmittelgemisch aus Chloroform (CHCl_3) und Methanol (MeOH) im Verhältnis 2:1 (V/V) gelöst (= SL A). Diese Mischung ist notwendig, um das CER zu lösen. Da der relativ hohe MeOH-Anteil bei einigen Modellen zu unzureichend orientierten Proben führte, wurde in diesen Fällen für die FFA und das CHOL nur CHCl_3 als Lösungsmittel verwendet (= SL B). Die entsprechenden Mengen der Lipide wurden zu einer Mischung vereinigt, die in der Regel ein molares Verhältnis der Lipide CER:CHOL:FFA von 1:0,7:1 (in einigen Fällen wurde auch ein Verhältnis von 1:0,3:1 untersucht) aufwies. Anders als in der verwendeten Mischung liegen im nativen SC die drei Lipidspezies in etwa äquimolarem Verhältnis vor¹⁵. In diesem Verhältnis ist der CHOL-Anteil bereits zu hoch, um vollständig in die Membran inkorporiert zu werden^{46, 57}, sodass in der vorliegenden Arbeit der CHOL-Anteil reduziert wurde. Als Enhancerkonzentration wurde in Anlehnung an üblicherweise in Formulierungen verwendete Mengen eine Konzentration von 10 % (m/m), bezogen auf die wässrige Phase, gewählt. Lediglich für Taurin musste aufgrund dessen eingeschränkter Löslichkeit eine Konzentration von 5 % (m/m) gewählt werden. Die Zugabe der Enhancer erfolgte durch Lösen in der wässrigen Phase.

1.1. LIPOSOMEN

In Anlehnung an Untersuchungen von Zbytovska et al.⁷, wurde für die Präparation von Liposomen zunächst ein relativ hoher pH-Wert ~10 gewählt. Dies soll eine möglichst lange Stabilität der Liposomen gewährleisten, damit auch Messungen über einen längeren Zeitraum, wie z. B. Kleinwinkelstreuungsmessungen (mehrere Tage) oder polaritätssensitive Fluoreszenzmessungen, zuverlässige Ergebnisse liefern. Um allerdings die durch die *Leakage*-Messungen erhaltenen Werte mit den Ergebnissen der Reflektometrie- und IR-Messungen vergleichen zu können, wurden die Liposomen für *Leakage*-Untersuchungen zusätzlich bei einem pH-Wert = 7 hergestellt. Die Liposomen wurden gemäß Protokoll 1 „Präparation handgeschüttelter multilamellarer Lipidvesikel“⁶⁸ unter Berücksichtigung einiger Anpassungen für SC-Lipidmodelle⁷ hergestellt. Dazu wurden die entsprechenden Mengen der SL A in einem Rundkolben gemischt und das Lösungsmittel mit Hilfe eines Rotationsverdampfers entfernt. Der entstandene Lipidfilm wurde über Nacht unter Vakuum gelagert, um Lösungsmittelreste zu entfernen. Die Lipidfilme wurden mit einer Pufferlösung zu einer Konzentration von 1 mg/ml aufgenommen. Dabei wurde für einen pH-Wert > 9 (10) ein Tris-Puffer (10 mM Tris + 100 mM NaCl) und für einen pH-Wert = 7 ein Bis-Tris-Puffer (10 mM Bis-Tris + 100 mM NaCl) verwendet. Die Suspensionen wurden anschließend eine Stunde bei 90 °C im Trockenschrank gelagert und alle 30 Minuten mit dem Vortexer geschüttelt. Die so erhaltenen multilamellaren Vesikel (MLV) wurden in einem Miniextruder (Avanti Polar Lipids, Deutschland) 21 Mal durch eine Polycarbonatmembran (100 nm Porengröße) extrudiert. Die dadurch erzeugten ULVs wurden unmittelbar für die verschiedenen Messungen verwendet.

LIPOSOMEN FÜR LEAKAGE-MESSUNGEN: Die Präparation 6-Carboxyfluorescein (6-CF)-beladener Liposomen erfolgte entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise unter Berücksichtigung einiger Abwandlungen nach Blumenthal et al.⁶⁹ Der Puffer für die Aufnahme der Lipidfilme wurde mit 6-CF (50 mM) angereichert, um so eine Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffes im Liposomeninneren zu gewährleisten. Die entstandenen 6-CF-beladenen ULVs wurden anschließend von dem 6-CF in der äußeren wässrigen Phase getrennt. Dazu wurde eine Größenausschlusschromatographie in einer Sephadex G-50 Säule mit dem jeweiligen isoosmotischen Puffer als Laufmittel durchgeführt. Die aufgefangene Liposomenfraktion wurde anschließend für die *Leakage*-Messungen verwendet.

1.2. EINZELNE, FESTKÖRPERGESTÜTZTE BILAYER

Rechteckige Siliziumwafer (80 x 50 x 15 mm³) wurden zunächst mit der gebräuchlichen RCA Wafer-Reinigungsmethode, insbesondere dem ersten Schritt, der als „RCA standard

clean 1“ bezeichnet wird, behandelt^{26, 70, 71}. Bei dieser Reinigung wurde der Wafer in eine Lösung aus Reinstwasser (gewonnen durch ein MilliQ Reinigungssystem; <http://www.millipore.com/>; spezifischer Widerstand $> 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$), NH_4OH 29 % (m/m) und H_2O_2 30 % (m/m) (5:1:1 (V/V)) gegeben und diese für zehn Minuten auf bis zu $70\text{--}75 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt. Damit konnte sichergestellt werden, dass alles organische Material von der Waferoberfläche entfernt wurde. Zusätzlich wurde die Waferoberfläche während dieser Behandlung hydrophiler. Anschließend erfolgte nacheinander eine Reinigung im Ultraschallbad mit Aceton, Ethanol/Wasser (1:1) und Wasser. Die einzelnen Bilayer wurden mit Hilfe der Langmuir Blodgett/Langmuir Schaefer (LB/LS) Technik, die in der Literatur ausführlich beschrieben ist⁷², hergestellt. Eine 1 mM Lipidmischung wurde durch Mischen der jeweiligen Mengen der SL B und anschließendes Verdünnen mit CHCl_3 hergestellt. 550 μl dieser Mischung wurden auf den mit Reinstwasser gefüllten Langmuirtrog (Nima 1212D) gespreitet. Eine Wartezeit von 30 Minuten ermöglichte ein vollständiges Verdampfen des Lösungsmittels. Anschließend wurden die Trogbarrieren mit einer Geschwindigkeit von $25 \text{ cm}^2/\text{min}$ bis zum gewünschten Oberflächendruck zusammengeschoben. Für beide Depositionsvorgänge wurde ein Druck von 20 mN/m verwendet. Um diesen während der Präparation konstant zu halten, waren die Barrieren frei beweglich. Der erste Monolayer wurde durch Herausziehen des Siliziumwafers aus dem Trog mit einer Geschwindigkeit von $6\text{--}7 \text{ mm/min}$ aufgetragen. Um den zweiten Monolayer darauf aufzulagern, wurde der Wafer horizontal von oben nach unten mit einer Geschwindigkeit von 3 mm/min durch die lipidbedeckte Wasseroberfläche getaucht. Die so präparierten Bilayer wurden noch unter Wasser in die mit Wasser gefüllte Durchflusszelle eingebaut.

1.3. OLIGOLAMELLARE LIPIDSCHICHTEN

Für Phospholipide konnten oligolamellare Proben bereits erfolgreich präpariert und mit Hilfe der Röntgenreflektometrie (XR), sowie der Neutronenreflektometrie (NR) kombiniert mit IR-Messungen charakterisiert werden⁷³. CER, als Hauptbestandteil der SC-Lipidmatrix, sind jedoch sehr viel rigider und weisen deutlich andere physikochemische Eigenschaften als Phospholipide auf⁷⁴. Demzufolge führte eine einfache Übertragung der von Kreuzer⁷³ entwickelten Präparationsschritte nicht zu einer Probe, die sich für eine Charakterisierung mittels NR oder XR eignete. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese Präparationsmethode deshalb für die SC-Lipidmodelle optimiert. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf dessen Tauglichkeit für Untersuchungen mit hydrophilen Penetrationenhancern gelegt. Detaillierte Ausführungen zum Optimierungsprozess finden sich im Kapitel „Präparation eines neuartigen oligolamellaren SC Lipidmodells“ (Kapitel VI.1, S. 29) Nachfolgend werden die wichtigsten Erkenntnisse daraus zusammengefasst.

REINIGUNG DER WAFER: Vor der Verwendung wurden die runden Siliziumwafer (60 x 10 mm²) mit CHCl₃ im Ultraschallbad gereinigt, um Lipidreste abzulösen. Analog zur Reinigung der Wafer für die festkörpergestützten Bilayer wurde nachfolgend die RCA-1 Standardmethode eingesetzt. Abschließend wurden die Wafer, entsprechend der Vorgehensweise von Kreuzer et al.⁷³, 21 Mal mit Reinstwasser gespült.

POLYETHYLENIMIN(PEI)-LAYER: Während der Optimierung der Probenpräparation erwies sich die Einführung einer PEI-Schicht, als Bindeglied zwischen Waferoberfläche und Lipidschicht, als notwendig. Dafür wurden die Wafer bei Raumtemperatur für 20 Minuten in einer PEI-Lösung (0,01 mol/l) inkubiert und anschließend dreimal für zwei Minuten in Reinstwasser aufbewahrt. Die Lipide wurden direkt im Anschluss an diese Vorbehandlung aufgetragen.

ROTATIONSBSCHICHTUNG: Nach der Methode von Mennicke und Salditt⁷⁵ wurde die oligomellare Lipidschicht mittels Rotationsbeschichtung (Spin-coater Modell: 6708D, Cookson Electronics, Deutschland) präpariert. Hierfür wurden 3,5 ml einer 3,5 mg/ml Lipidmischung, auf die Waferoberfläche pipettiert und anschließend bei einer Geschwindigkeit von 4000 Umdrehungen pro Minute (rpm) gespreitet. Die 3,5 mg/ml Lipidmischung wurde durch Zusammenführen der entsprechenden Mengen SL B der einzelnen Lipidkomponenten und anschließendes Verdünnen mit CHCl₃ hergestellt.

ANNEALING: Diese Probennachbehandlung ist optional und wurde nur angewendet, wenn ausdrücklich darauf hingewiesen ist. Dabei wurde die Probe, gemäß der von Schroeter et al. beschriebenen Prozedur⁵, unter 100 % Luftfeuchtigkeit zyklisch auf 75 °C aufgeheizt und wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Im ersten Zyklus wird die Probe eine Stunde aufgeheizt und anschließend 30 Minuten abgekühlt. Im zweiten und dritten Zyklus wird dagegen für 30 Minuten geheizt und für 15 Minuten abgekühlt.

1.4. MULTILAMELLARE LIPIDSCHICHTEN

MULTILAYER FÜR IR-MESSUNGEN: Eine 1 mg/ml Lipidmischung aus CER[AP], CHOL und SA wurde durch Mischen der entsprechenden Mengen von SL B und anschließendes Verdünnen mit CHCl₃ hergestellt. Für den ATR-Kristall mit einer Fläche von 1,54 cm² wurden 0,55 ml dieser Mischung (0,36 mg Lipidmischung pro cm² Fläche) entsprechend der Beschreibung von Seul und Sammon⁷⁶ mit Hilfe einer Airbrushpistole unter konstantem Fluss aufgesprüht.

MULTILAYER FÜR NR-MESSUNGEN: Zur Präparation der Multilayer für NR-Messungen wurde das Protokoll für die Präparation von Oligolayern verwendet. Anstatt der Rotationsbeschichtung wurde ein Aufsprühschritt mittels Luftdruck (Airbrush) durchgeführt. Gemäß

den Ausführungen von Seul und Sammon⁷⁶ und einigen individuellen Veränderungen für das vorliegende Lipidmodell wurde der Wafer auf einer auf 50 °C temperierten Heizplatte platziert. Unter konstantem Fluss wurden 2 ml einer 5 mg/ml Lipidlösung gleichmäßig und auf die Waferoberfläche ($\sim 28 \text{ cm}^2$) aufgesprüht. Anschließend erfolgte in jedem Fall ein Annealing, wie es im Rahmen der Präparation der Oligolayer optional beschrieben ist.

V. METHODEN

Im Rahmen dieser Arbeit soll vordergründlich der Einfluss von Penetrationenhancern hydrophiler Natur untersucht werden. Demzufolge wurden vor allem Methoden ausgewählt, bei denen Untersuchungen der Lipidschichten in wässrigem Medium bzw. an einer wässrigen Grenzfläche realisiert werden können. So geben IR-Experimente Aufschluss über die laterale Kettenordnung und das Ausmaß der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen (HBBs), während Reflektometriemessungen den schichtartigen Aufbau mit den verschiedenen Schichtdicken und der Anreicherung bestimmter Moleküle darstellen können. Mit Hilfe der *Leakage*- und photonenkorrelations-spektroskopischen Untersuchungen lassen sich unterdessen die Integrität und Stabilität des ausgewählten Lipidmodells charakterisieren.

1. RÖNTGEN- UND NEUTRONENREFLEKTOMETRIE

Im Folgenden sollen die wichtigsten Fakten zur Röntgen(XR)- und Neutronenreflektometrie (NR) erläutert werden. Eine ausführliche Betrachtung findet sich in Kapitel VIII.1 (Anhang B, S. 114). Sowohl bei der XR als auch bei der NR misst man zur Charakterisierung von dünnen Schichten die Intensität des reflektierten Neutronen- bzw. Röntgenstrahls im Winkel θ_r unter verschiedenen Einfallswinkeln θ_e (Abb. 6). Der einfallende Strahl wird dabei an Grenzflächen mit unterschiedlichen Brechungsindices n reflektiert. Dies sind in jedem Fall mindestens die Lipid/Silizium(Si)-Grenzfläche und die Lipid/Luft- bzw. Lipid/Wasser-Grenzfläche. Anstelle des Brechungsindex wird für Röntgen und Neutronen die Streulängendichte (SLD) zur Charakterisierung der Materie verwendet.

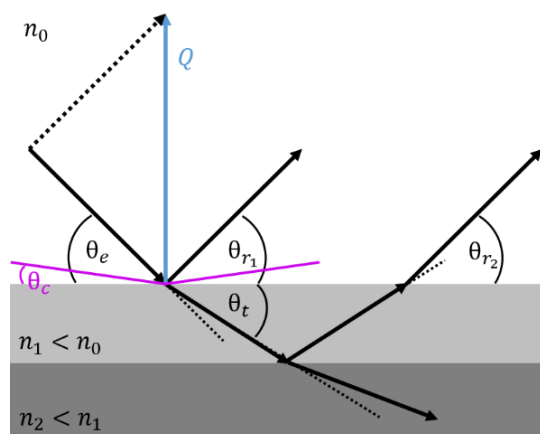


Abb. 6: Schematische Darstellung des Prinzips der Reflektometrie

In der erhaltenen Reflektivitätskurve wird anstelle des Winkels θ üblicherweise der Impulsübertrag Q dargestellt. Dieser steht mit dem Winkel θ wie folgt in Beziehung:

$$Q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\theta_e. \quad (1)$$

Unter der Bedingung, dass keine Absorption auftritt, wird bei Einstrahlwinkeln unterhalb des kritischen Winkels der Totalreflexion θ_c die gesamte Intensität reflektiert. Nach Erreichen des kritischen Winkels dringt zusätzlich ein Teil der Intensität unter dem Winkel θ_t in die Probe ein (Transmission). Bei einem Mehrschichtsystem wird an jeder Grenzfläche zwischen zwei Schichten die einfallende Strahlung teilweise reflektiert und transmittiert. Durch konstruktive und destruktive Interferenz der transmittierten und reflektierten Strahlung entstehen periodische Modifizierungen der detektierten Reflektivität in Abhängigkeit vom Einfallswinkel. Aufgrund dieser Modifizierungen kann auf die Schichtdicken und SLDs der einzelnen Schichten geschlossen werden. Die SLDs sind für jede Schicht charakteristisch und erlauben Rückschlüsse auf deren atomare Zusammensetzung. In Tabelle 1 sind deshalb einige für diese Arbeit relevante Verbindungen bzw. Gemische mit den entsprechenden SLDs für Röntgen- und Neutronenstrahlung aufgeführt. Eine Änderung der SLD einer Schicht deutet demnach auf eine veränderte Zusammensetzung hin, die beispielsweise durch ein Ablösen der Lipide oder die Anreicherung einer Substanz bedingt sein kann.

Tabelle 1: SLDs ausgewählter Substanzen für Röntgen- und Neutronenstrahlung.

Verbindung	SLD [$\cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$]	
	Röntgen	Neutronen
Luft	0	0
Si	20,1	2,07
SiO	18,9	3,47
PEI	10,06	0,59
H ₂ O	9,45	-0,56
SMW	--	2,07
4MW	--	4
D ₂ O	--	6,36
Harnstoff	--	2,15
Taurin	--	1,38
DMSO	--	-0,04
Glycerol	--	0,61
PG	--	0,13
1,5- und 1,2-Pd	--	0,00
Köpfe CER[AP]:CHOL:SA 1:0,7:1	8,98	1,37
Ketten CER[AP]:CHOL:SA 1:0,7:1	9,67	-0,25

In Abb. 7a ist beispielhaft die NR-Kurve eines aus drei Bilayern bestehenden SC-Lipidmodells, gemessen gegen D₂O, aufgezeigt. Die entsprechenden Zusammenhänge gelten für XR-Kurven gleichermaßen. Bei Einfallswinkeln unterhalb des kritischen Winkels wird die gesamte Intensität reflektiert, sodass sich zu Anfang ein Plateau ergibt. Nach Erreichen des

kritischen Winkels (kritische Kante) fällt die reflektierte Intensität mit steigenden Impulsüberträgen exponentiell ab und wird durch *Kiessig*-Oszillationen und *Bragg Peaks* überlagert. Aus diesen können die Bilayer- und Gesamtschichtdicke der Probe ermittelt werden (Datenauswertung mittels Peakanalyse, Kapitel VI.1.1.1, S. 18). Zusätzlich dazu lassen sich mithilfe der optischen Matrixmethode (Kapitel V.1.2.1, S. 21) die Schichtdicken, SLDs und Rauigkeiten für jede einzelne Teilschicht der Probe extrahieren, indem die Reflektivitätskurve durch inverse Fourier Transformation in das entsprechende SLD-Profil (Abb. 7b) umgewandelt wird. Aus dem SLD-Profil können schließlich die in Tabelle 2 enthaltenen Werte ermittelt werden.

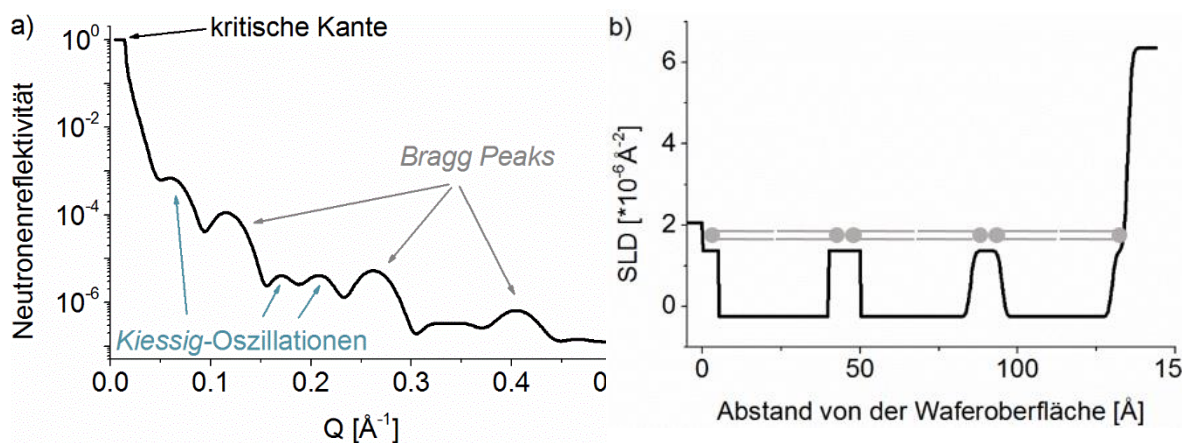


Abb. 7a) NR-Kurve eines SC-Lipidmodells bestehend aus 3 Bilayern auf einem Si-Wafer in D_2O mit den charakteristischen Kiessig-Oszillationen und Bragg Peaks **b)** durch inverse Fourier Transformation erhaltenes SLD-Profil der Reflektivitätskurve. Die entsprechende Anordnung der Lipide ist angedeutet.

Tabelle 2: Aus Abb.7b extrahierte Werte der SLDs, Schichtdicken und Rauigkeiten für die einzelnen Schichten des beschriebenen Modells.

	Dicke [\AA]	SLD [10^{-6}\AA^{-2}]	Rauigkeit [\AA]
Si	-	2,07	-
Köpfe	5	1,37	0
Ketten	35	-0,25	0
Köpfe	10	1,37	0
Ketten	35	-0,25	1
Köpfe	10	1,37	1
Ketten	35	-0,25	1
Köpfe	5	1,37	1
D_2O	-	6,36	1

Die unterschiedlichen SLDs der polaren Kopfgruppen- und lipophilen Ketten erlauben eine entsprechende Aufteilung der Bilayer. Somit lassen sich mögliche Veränderungen durch Enhancereinlagerung isoliert für diese Bereiche nachverfolgen. Die in Tabelle 2 ebenfalls enthaltenen Rauigkeiten beschreiben die Beschaffenheit der Grenzfläche zweier benachbarter Schichten. Dabei bedeutet ein Wert von Null eine ideal glatte Grenzfläche.

Der wesentliche Unterschied der Neutronen- und Röntgenstrahlung besteht darin, dass Röntgenstrahlen mit den Elektronen der Atomhülle interagieren, während Neutronen mit dem Atomkern wechselwirken. Folglich können Neutronen im Gegensatz zu Röntgenstrahlen Elemente mit gleicher Anzahl an Elektronen aber verschiedener Anzahl an Neutronen unterscheiden. Insbesondere die unterschiedlichen SLDs von Wasserstoff (H) und seinem Isotop Deuterium (D) kann man sich bei der Untersuchung biologischer Proben, die einen hohen Anteil an Wasserstoffatomen besitzen, zu Nutze machen. Dabei führt beispielsweise ein Austausch von H_2O durch D_2O zur Erhöhung des Kontrastes zwischen den Grenzflächen vom Wasser zur biologischen Probe und dadurch zur Verstärkung der Reflexe, ohne dass die chemischen Eigenschaften des Mediums verändert werden. Darüber hinaus können auch Kontrastvariation durch Mischen von H_2O und D_2O vorgenommen werden, die die Zuverlässigkeit der erhaltenen Ergebnisse erhöhen.

1.1. DURCHFÜHRUNG VON XR-MESSUNGEN AN MULTI- UND OLIGOLAMELLAREN SCHICHTEN

Die Proben wurden am Helmholtz-Zentrum für Materialien und Energie Berlin (HZB) unter Verwendung eines Bruker D5000 Diffraktometers (Bruker Optik GmbH, Deutschland) mit einer Erweiterung für Reflektometriemessungen bzw. eines Röntgenreflektometers aus Eigenanfertigung gemessen. Die erhaltenen Ergebnisse sind dabei vergleichbar. Details bezüglich des Reflektometers aus Eigenanfertigung und dessen Funktionsweise finden sich in der Literatur⁷⁷. In beiden Reflektometern wurde als anregende Strahlung die Kupfer- $K\alpha$ Linie mit einer Wellenlänge von $1,541 \text{ \AA}$ verwendet. Im D5000 wurde der einfallende Strahl durch den Linienfokus der Röntgenröhre und einen Spalt von $0,1 \text{ mm}$ definiert, während im Falle der Eigenanfertigung ein Diaphragma mit einer Breite von $0,2 \text{ mm}$ verwendet wurde. Die Auflösung der Instrumente betrug $\delta Q_z = 0.003 \text{ \AA}^{-1}$. Der reflektierte Strahl wurde in beiden Instrumenten zunächst monochromatisiert und anschließend mit einem Szintillationsdetektor registriert. Die hohe Intensität bei kleinen Winkeln würde den Detektor sättigen, weshalb eine $0,1 \text{ mm}$ dicke Absorptionsplatte aus Kupfer im D5000 und ein Nickelabsorber bei der Eigenanfertigung im reflektierten Strahl eingebracht wurden. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur und Umgebungsfeuchte durchgeführt.

1.1.1. DATENAUSWERTUNG

Die spekularen Reflektivitätsdaten wurden auf die Zeit und Intensität des einfallenden Strahls genormt. Die Daten wurden als Funktion des Impulsübertrages, senkrecht zur Probenoberfläche gemäß Gl. 1, dargestellt. Die Datenanalyse erfolgte durch Bestimmen der Peakpositionen und anschließende Berechnung der Bilayer- und Gesamtschichtdicken.

PEAKANALYSE: Die Maxima der *Kiessig*-Oszillationen $Q_{Kiessig}$, sowie die der *Bragg Peaks* Q_{Bragg} wurden durch Fitten der experimentellen Daten mit einer Gauß-Funktion bestimmt. Durch Anwendung des Bragg'schen Gesetzes

$$n \lambda = 2d \sin \theta \quad (2)$$

konnte über den Abstand zweier benachbarter *Kiessig*-Maxima (od. -Minima) durch die Kombination von Gl. 1 und 2 die Gesamtschichtdicke der Probe bestimmt werden:

$$t = \frac{2\pi}{\Delta Q_{Kiessig}}. \quad (3)$$

Der Abstand benachbarter *Bragg Peaks* konnte dagegen durch Anwendung der Gleichung

$$d = \frac{2\pi}{\Delta Q_{Bragg}} \quad (4)$$

zur Berechnung der Schichtdicke eines einzelnen Bilayers genutzt werden. Bei der Auswertung der Reflektivitätskurven von multilamellaren Systemen konnte dabei auch die Position eines einzelnen *Bragg Peaks* zur Berechnung der Bilayerschichtdicke verwendet werden. Normalerweise ist durch das Vorhandensein der PEI-Schicht die Ermittlung der Schichtdicken auf Grundlage von nur einer *Bragg Peak*-Position nicht zuverlässig, da die absoluten Positionen der Peaks verschoben sind. Im Gegensatz zu den Oligolayern spielt diese Verschiebung bei Multilayern jedoch nur eine untergeordnete Rolle. Für Oligolayer würde an dieser Stelle demnach nur eine Berechnung über den Abstand zweier *Bragg Peaks* einer Phase zuverlässige Ergebnisse liefern. Traten in der Reflektivitätskurve auch Peaks höherer Ordnung auf, konnte die Position der Peaks gegen die Ordnung n geplottet werden. Gl. 3 und 4 konnten dann als

$$\Delta Q_{Kiessig} = \frac{2\pi}{t} n \quad \text{bzw.} \quad \Delta Q_{Bragg} = \frac{2\pi}{d} n \quad (5)$$

geschrieben und die entsprechende Schichtdicke t bzw. d aus dem Anstieg des linearen Fits dieser Daten berechnet werden:

$$t \text{ bzw. } d = \frac{2\pi}{\text{Anstieg}}. \quad (6)$$

Die angegebenen Fehler entsprechen dem Fehler des linearen Fits

$$\text{Fehler } (t \text{ bzw. } d) = \frac{t \text{ bzw. } d \cdot \text{Fehler (Anstieg)}}{\text{Anstieg}} \quad (7)$$

Die Anzahl an Lipidbilayern N in der Probe konnte schließlich aus dem Verhältnis der Gesamtschichtdicke und der Schichtdicke eines einzelnen Bilayers berechnet werden:

$$N = \frac{t}{d}. \quad (8)$$

1.2. DURCHFÜHRUNG VON NR-MESSUNGEN AN MULTI- UND OLIGOLAMELLAREN SCHICHTEN (BIOREF/HZB)

Sowohl einfache NR-Messungen (ohne simultane Erfassung des IR-Signals) als auch kombinierte ATR-FTIR- und NR-Messungen fanden am BioRef⁷⁸ des Helmholtz-Zentrum für Materialien und Energie Berlin (HZB) statt. Der schematische Aufbau des Instrumentes, sowie die Strahlengänge für IR- und Neutronenstrahlung, sind in Abb. 8 dargestellt.

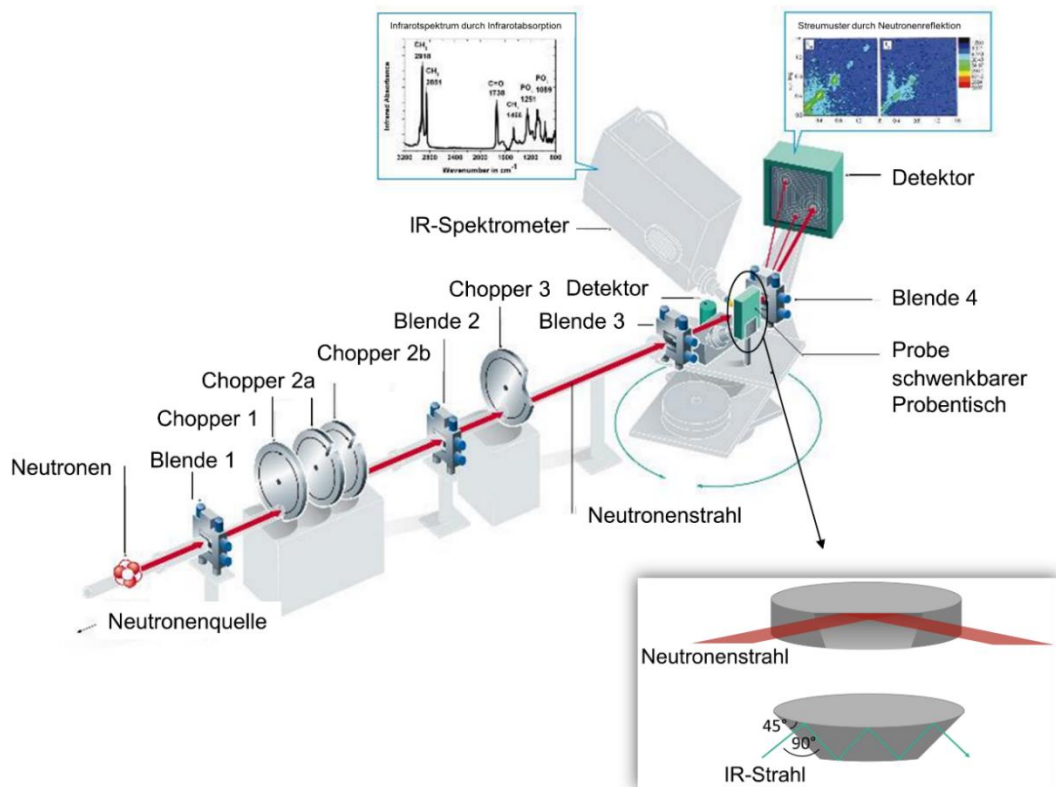


Abb. 8: Schematischer Aufbau des Flugzeitreflektometers BioRef am HZB.⁷⁹ Die spezielle Messanordnung ermöglicht eine simultane Aufnahme von IR- und NR-Spektren. Der Einschub unten rechts zeigt schematisch die Strahlengänge von IR- und Neutronenstrahlung am BioRef in rundem Wafer mit abgeschrägten Kanten.

Die mit der Lipidschicht beladenen Wafer wurden in eine Durchflusszelle mit einem Volumen von 2–3 ml eingespannt und gegen D₂O bzw. die entsprechende Enhancerlösung in D₂O vermessen. Mit Hilfe eines Wasserbades wurde die Probenumgebung auf eine Temperatur von 32 °C eingestellt. Für die NR-Messungen wurde eine Choppergeschwindigkeit von 25 Hz und drei verschiedene Streuwinkel ($\theta = 0,5^\circ$; $1,0^\circ$ und $2,8^\circ$) verwendet, um einen Q -Bereich $0,007\text{--}0,4 \text{ \AA}^{-1}$ zu realisieren. Eine konstante Wellenlängenauflösung $\Delta\lambda/\lambda$ wurde durch einen “optical blind” Modus der Chopper erreicht⁸⁰ und auf 5 % festgesetzt, wobei die Winkelauflösung $\Delta\theta/\theta$ entsprechend diesem Wert angepasst wurde. Die Q -Auflösung $\Delta Q/Q$ kann daraus mit Hilfe folgender Formel zu 7 % berechnet werden:

$$\frac{\Delta Q}{Q} = \sqrt{\left(\frac{\Delta\lambda}{\lambda}\right)^2 + \left(\frac{\Delta\theta}{\theta}\right)^2} \quad (9)$$

Die reflektierten Neutronen wurden in einer $\theta/2\theta$ -Anordnung aufgezeichnet. Dazu wurde ein ortsempfindlicher Flächendetektor (PSD), gefüllt mit ^3He und einer aktiven Fläche von $300 \times 300 \text{ mm}^2$ verwendet. Die Messzeiten betragen 3,75 h gegen D_2O bzw. Enhancer in D_2O und 6 h gegen eine auf die SLD von Silizium ($2,07 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$) angepasste Mischung aus D_2O und H_2O (= silicon matched water (SMW); 38 % D_2O). Ein FTIR Spektrometer wurde auf die Probenposition montiert, um eine gleichzeitige Erfassung von NR- und ATR-FTIR-Spektren zu ermöglichen⁷⁸. Die Durchführung und entsprechende Datenauswertung für diese Messungen sind im Abschnitt IR-Messungen (Kapitel V.3.2, S. 27) aufgeführt.

1.2.1. DATENAUSWERTUNG

Die Intensität der reflektierten Neutronenstrahlen wurde in Abhängigkeit von der Flugzeit (TOF) und ortsaufgelöst detektiert. Aus der Flugzeit konnte gemäß der Gleichung

$$\lambda = \frac{\text{TOF} \cdot h}{m \cdot l} \quad , \quad (10)$$

mit der zurückgelegten Strecke l , dem Plack'schen Wirkungsquantum h und der Masse m , die Wellenlänge λ der Neutronen bestimmt und die Intensität in Abhängigkeit von der Wellenlänge als typisches Histogramm aufgetragen werden. Aus der Wellenlänge λ und dem Streuwinkel θ ließen sich nach Gl. 1 die entsprechenden Impulsüberträge Q berechnen. Anschließend wurden diese Daten wie für die XR-Messungen (Kapitel V.1.1.1, S. 18) beschrieben genormt, dargestellt und die Schichtdicken mittels Peakanalyse bestimmt.

Um zusätzlich die verschiedenen Parameter wie Schichtdicke, SLD und Rauigkeit einer jeden Schicht zu bestimmen, müssen die experimentell ermittelten Daten gefittet werden. Dazu wird ein geeignetes Schichtmodell, sowie die zu erwartenden Werte für die entsprechenden Parameter ausgewählt und das theoretische Modell mit der experimentellen Kurve verglichen. Zur Simulation der Reflektometriedaten wurde Motofit, ein auf dem Igor-Pro 6.3 Software Paket (Wavemetrics, OR) basierendes Programm, verwendet. Dabei wurden, der Methode nach Abeles^{81, 82} folgend, Transfermatrizen zur Beschreibung des Schichtsystems verwendet. Diese Methode liefert identische Ergebnisse zu der von Parratt eingeführten Rekursionsmethode für stratifizierte dünne Filme⁸³. Hierbei wird nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate durch Veränderung der Fitparameter für Schichtdicken, SLDs und Rauigkeiten der Unterschied zwischen dem theoretisch berechneten und dem praktisch gemessenen Profil minimiert.

ANALYSE DURCH FIT MITTELS OPTISCHER MATRIXMETHODE: Als Modell wurde ein Mehrschichtmodell mit 13 Schichten verwendet, das insgesamt aus fünf SC-Lipidbilayern bestand (Abb. 9). Dabei lag direkt auf dem Siliziumwafer eine Siliziumdioxidschicht (SiO_2), gefolgt von einer PEI-Ankerschicht auf. Daran schlossen sich im Wechsel Köpfe und Ketten

der als homogen verteilt angenommenen SC-Lipidmischung an, wobei die letzte, an das wässrige Medium angrenzende Schicht durch polare Köpfe dargestellt wurde.

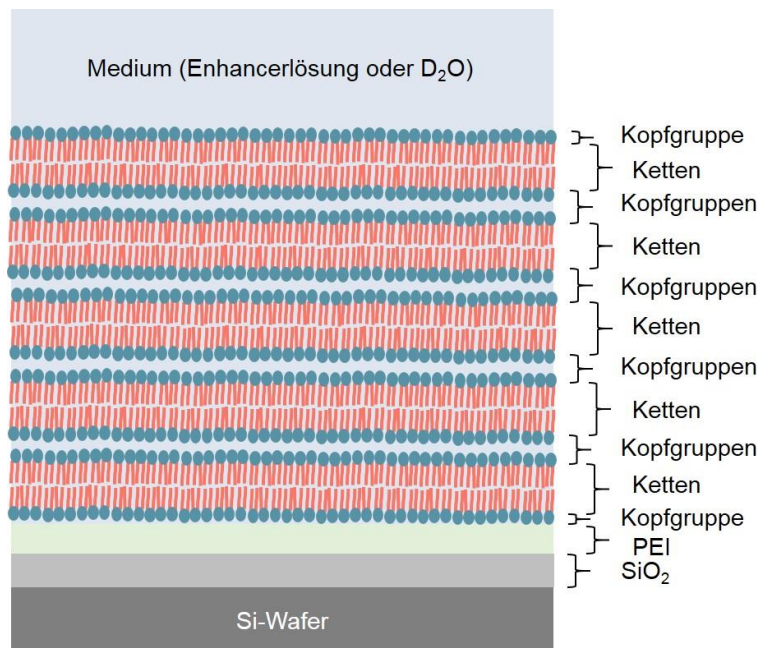


Abb. 9: In Motofit angewendetes Fitmodell, bestehend aus 13 Schichten.

Die für das Modell verwendeten SLDs für die verschiedenen Schichten sind in Tabelle 1 angegeben. Lediglich bei D_2O konnten die verwendeten SLD-Werte von dem in der Tabelle angegebenen Wert abweichen. In diesen Fällen konnte mit dem vorgegebenen Wert die kritische Kante der Reflektivitätskurve nicht abgebildet werden. Grund dafür war ein fortlaufender Austausch von Deuterium durch Wasserstoff aus dem Wasserdampf in der Luft. In der Folge verringerte sich der SLD-Wert des eingesetzten D_2O mit zunehmendem Anteil an H_2O . Durch Angleichung des modellierten Kurvenverlaufes an die tatsächliche Reflektivitätskurve im Bereich der kritischen Kante konnte dieser SLD-Wert individuell ermittelt werden. Um eine besser Einschätzung über den Einfluss des Mediums zu geben, wurden die Werte für die SLDs der Schichten fixiert und stattdessen die Anteile des Mediums ermittelt. Anschließend wurden die Schichtdicken, Mediumanteile und Rauigkeiten abwechselnd mit dem genetischen Algorithmus gefittet. Dabei wurden 500 Generationen durchgeführt, ein Populationsmultiplikator von 50, eine Multiplikationskonstante von 0,9 und eine Rekombinationskonstante von 0,1 bei einer Toleranz von 0,05 verwendet. Als Auflösung wurde entsprechend dem experimentellen Aufbau ein Wert dq/q von 7 % angenommen. Der Fit mit dem kleinsten χ^2 wurde schließlich mit dem dazugehörigen SLD-Profil, welches die Schichtdicke in Abhängigkeit von der SLD darstellt, als finale Variante extrahiert. Die SLDs dieses Profils setzten sich dabei aus den SLDs der Lipide und denen des Mediums in den entsprechenden Anteilen für die einzelnen Schichten zusammen. Dennoch muss berücksich-

tigt werden, dass beim Fitten einer einzelnen Reflektivitätskurve immer mehr als nur eine Lösung und damit mehrere mögliche SLD-Profile existieren. Mit Hilfe verschiedener Vorkenntnisse des Systems und logischer Einschränkungen konnte allerdings eine sehr wahrscheinliche und realistische Variante gefunden werden. Ein unzweifelhaftes Modell wird in der Regel aber erst durch das Fitten verschiedener Kontraste einer Probe, bei Übereinstimmung der SLD-Profile, erhalten.

1.3. DURCHFÜHRUNG VON NR-MESSUNGEN AN FESTKÖRPERGESTÜTZTEN EINZELNEN BILAYERN (FIGARO/ILL)

NR-Messungen an festkörpergestützten einzelnen Bilayern wurden am horizontalen Flugzeitreflektometer FIGARO des Institut Laue-Langevin (Grenoble, Frankreich; Abb. 10) durchgeführt⁸⁴. Dabei wurde mit Wellenlängen des einfallenden Neutronenstrahls von zwei bis 30 Å und zwei Winkeleinstellungen ($\theta = 0,8^\circ$ und $3,2^\circ$) ein Q -Bereich von 0,007 bis $0,3 \text{ \AA}^{-1}$ erreicht. Die Auflösung des Q -Bereiches für die durchgeführten Messungen wurde zu 7,5 % berechnet. Jede Probe wurde bei drei verschiedenen Kontrasten gemessen: D₂O, SMW und eine auf die SLD von $4 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ angepasste Mischung aus D₂O und H₂O (4MW; 66 % D₂O). Die Aufnahme eines kompletten Datensatzes für diese drei Kontraste betrug für jede Probe zwei Stunden.

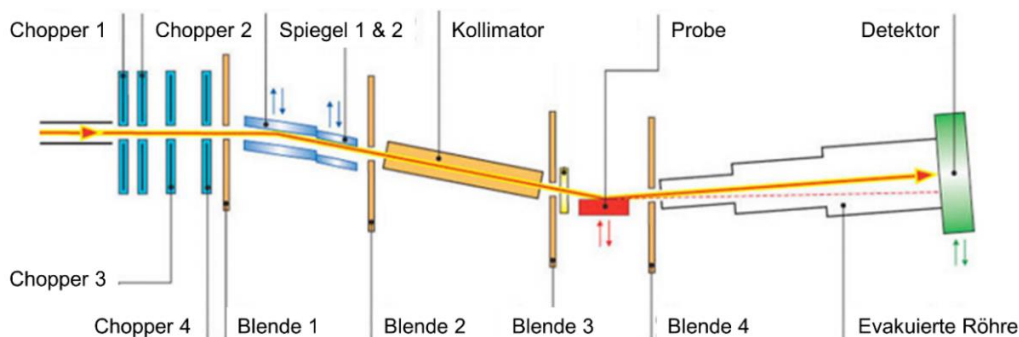


Abb. 10: Schematischer Aufbau des Flugzeitreflektometers FIGARO am ILL. Modifiziert nach⁸⁵.

1.3.1. DATENAUSWERTUNG

Die Bestimmung der Schichtdicken mittels Peakanalyse erfolgte analog zu den Beschreibungen für XR-Messungen (Kapitel V.1.1.1, S. 18). Ähnlich wie bei NR-Messungen an Oligolayern, wurde auch an den Bilayern eine Analyse mittels optischer Matrixmethode durchgeführt.

ANALYSE DURCH FIT MITTELS OPTISCHER MATRIXMETHODE: Die NR-Kurven der verschiedenen Kontraste wurden mit gebräuchlichen Methoden im RasCAL Software Paket⁸⁶ gefittet. Aufgrund der rauen Oberfläche der Lipidschicht war es nicht möglich die experimentellen Daten mit einer Abfolge einzelner Layer zu fitten, wie es in der Vergangenheit

üblicherweise für Lipidbilayer angewendet wurde⁸⁷. Stattdessen wurden Verteilungsfunktionen für verschiedene Komponenten der Mischung in Abhängigkeit vom Abstand von der Waferoberfläche gefittet. Die Vorgehensweise ist vergleichbar mit der in der Literatur beschriebenen Modellierung des SLD-Profiles, bei der die Lipidmembran in die einzelnen Komponenten zerlegt und dann mit molekulardynamischen Simulationen verglichen wird^{141, 142}. Die vorliegende Mischung ist jedoch sehr komplex und die SLDs der einzelnen Lipide unterscheiden sich kaum, sodass eine gröbere Zusammenfassung verschiedener charakteristischer Bereiche vorgenommen wurde. Dabei wurde das System in drei Bestandteile aufgeteilt: SiO₂, Kopfgruppen und Ketten der Lipide. Die dazugehörigen SLDs können aus Tabelle 1 entnommen werden. Die mögliche Verteilung der einzelnen Komponenten innerhalb 1 Å dicker Schichten wurde in Abhängigkeit von der Waferoberfläche, zeitgleich mit der Gesamtschichtdicke des Systems, gefittet. Um die Verteilung zu glätten, wurde eine Spline-Interpolation zwischen den Datenpunkten angewendet. Die Schichtdicken wurden sehr schmal gewählt, um unabhängig von einem vorgegebenen Modell die wahrscheinlichste Verteilung für dieses komplexe System zu ermitteln. Die einzige Einschränkung für die Verteilungsfunktion war die direkte Positionierung der SiO₂-Schicht an der Waferoberfläche. Nicht durch die Bestandteile der Lipidschicht abgedeckte Anteile, wurden durch das entsprechende Medium aufgefüllt.

2. LEAKAGEMESSUNGEN AN LIPOSOMEN

Zur Untersuchung der Permeabilität von Membranen für hydrophile Stoffe können unter anderem Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden. Der Durchtritt eines solchen Farbstoffes durch eine Membran weist auf eine Störung der Membranstruktur hin. Hierfür ist es notwendig, dass das Molekül nicht mit Membranbestandteilen wechselwirkt bzw. Einfluss auf deren Stabilität hat, sondern sich nur in dem hydrophilen Medium im Liposomeninneren löst. Zudem sollte das Molekül nicht in der Lage sein, intakte Membranen zu passieren. 6-Carboxyfluorescein (6-CF, Abb. 11) erfüllt diese Kriterien und kann aufgrund seiner konzentrationsabhängigen selbstquencheden Eigenschaft zur Charakterisierung der Membranpermeabilität genutzt werden (Abb. 12)⁶⁸. Dabei wird es in sehr hohen Konzentrationen (50–100 mM) in die Liposomen integriert. Durch den selbstquencheden Effekt bei hohen Konzentrationen resultiert in diesen Fällen eine minimale Fluoreszenz. Die Ursache für diese Beobachtung konnte bisher noch nicht umfassend geklärt werden. Dennoch wird vermutet, dass intermolekulare Interaktionen, insbesondere die Bildung nichtfluoreszierender Dimere einen wesentlichen Beitrag leisten⁸⁸. Treten während der Messungen Membrandefekte auf, die groß genug sind, damit das 6-CF einschließlich seiner Hydrathülle das Liposom verlassen kann, kommt es im umliegenden Medium zur Verdünnung des Fluoreszenzfarbstoffes,

was eine Abschwächung des selbstquenchenden Effektes verursacht und einen Anstieg der Fluoreszenzintensität zur Folge hat. Je stärker die Integrität der Membran gestört ist, desto größer ist der resultierende Fluoreszenzintensitätsanstieg. Für eine genauere Betrachtung des zugrunde liegenden Prinzips der Fluoreszenzspektroskopie wird auf das Kapitel VIII.2.1 (Anhang B, S. 120) verwiesen.

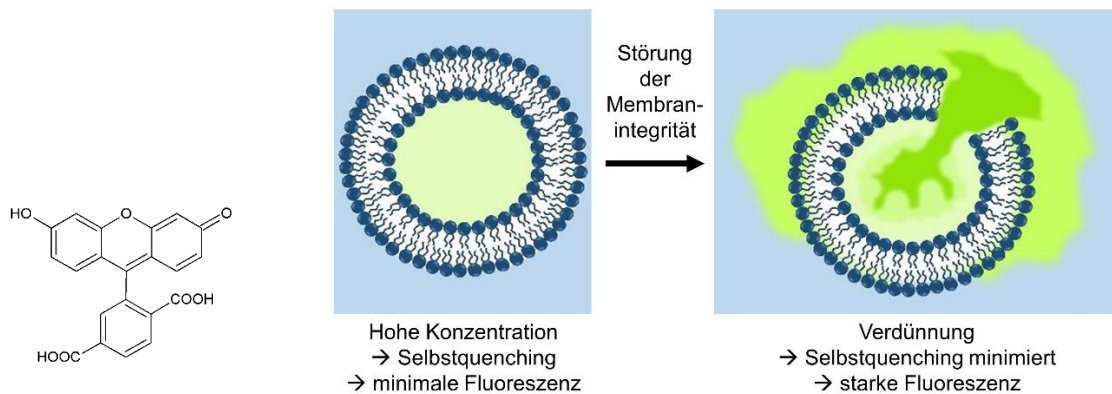


Abb. 11: Strukturformel von 6-CF

Abb. 12: Schematische Darstellung des Prinzips der Leakage-Messungen. Ist der Farbstoff in der intakten Membran eingeschlossen, wird durch Selbstquenching infolge der hohen Konzentration ein Auftreten von Fluoreszenz nahezu verhindert (links). Wird die Membranintegrität gestört, sodass sich der Farbstoff in das umliegende Medium verteilen kann (rechts), verdünnt sich dieser und zeigt eine deutliche Fluoreszenz.

2.1. DURCHFÜHRUNG UND DATENAUSWERTUNG

Die *Leakage*-Messungen wurden am FluoroMax-2 von Instruments S.A. Inc., JOBIN YVON/SPEX Division (Edison; New Jersey) analog zu *Leakage*-Messungen an Phospholipiden durchgeführt^{89, 90}. Die Probe wurde mit Strahlung der Wellenlänge 485 nm angeregt, die emittierte Fluoreszenzintensität bei einer Wellenlänge von 520 nm detektiert und mit Hilfe der ISA Software ausgewertet. Die Proben temperatur (32 °C) wurde durch ein zirkulierendes Wasserbad kontrolliert. Weil die Fluoreszenz innerhalb der Liposomen nicht zu 100 % abgeschwächt wird, ist es notwendig einen Anfangswert I_0 zu bestimmen, der als Nullwert angenommen wird. Dazu wurden 10 µl der Liposomen zu 2,7 ml (flüssige Enhancer) bzw. 3 ml (feste Enhancer) Pufferlösung in eine Quarzküvette gegeben und die Fluoreszenzintensität detektiert. Anschließend wurden die Enhancer dazugegeben. Im Falle von Harnstoff und Taurin als Feststoffe wurde die entsprechende Menge Enhancer zu den 3 ml Pufferlösung dazugegeben. Bei der Untersuchung flüssiger hydrophiler Enhancer wurden statt 3 ml Pufferlösung 2,7 ml verwendet und anschließend 300 µl Enhancer dazugegeben. Anschließend wurde für 15 Minuten die Fluoreszenzintensität gemessen. Konnte innerhalb dieser Zeit kein Plateau für die Fluoreszenzintensität erreicht werden (Harnstoff und Taurin), wurde die Messung für weitere 35 Minuten fortgesetzt. Um schließlich die Intensität bei 100 %-*Leakage* I_{100} zu bestimmen, werden die Liposomen mit 100 µl Triton X-Lösung

(20 % (V/V) in H₂O) versetzt, was ein vollständiges Auslaufen aller Vesikel hervorruft. Alle Intensitäten wurden entsprechend der Volumenunterschiede korrigiert und der 6-CF-*Leakage* für jeden Zeitpunkt t entsprechend nachfolgender Gleichung berechnet⁸⁹

$$L(t) = \frac{I(t) - I_0}{I_{100} - I_0} \quad (11)$$

3. INFRAROTSPEKTROSKOPIE

Die in dieser Arbeit verwendeten Infrarot(IR)-Messungen basieren auf dem Prinzip der Abgeschwächten Totalreflexion (ATR) unter Verwendung von Fourier Transform Infrarot(FTIR)-Geräten (Prinzip von FTIR-Geräten siehe Kapitel VIII.2.2.1, Anhang B, S. 122). Diese Methode bietet den Vorteil, dass die präparierten lamellaren Schichten selbst in wässriger Umgebung, wie sie zur Untersuchung der hydrophilen Penetrationenhancer unverzichtbar ist, realisiert werden können. Die ATR-FTIR-Methode findet in der Hautforschung bereits breite Anwendung⁹¹. Dass sie zur Charakterisierung verschiedenster SC-Modelle geeignet ist, konnte in zahlreichen Studien erfolgreich gezeigt werden. Dabei wurden unter anderem der Einfluss von Enhancern und der Temperatur an exzidierte Humanhaut⁹², temperaturabhängige Veränderungen an ternären SC-Lipidmodellen⁹³ und Interaktionen von CER mit Penetrationenhancern⁹⁴ untersucht. Bei der ATR-Methode durchläuft der einfallende IR-Strahl den Kristall und wird an der Grenzfläche zum optisch dünneren Medium (Probe) total reflektiert (Prinzip der Totalreflexion siehe Kapitel VIII.1.2, Anhang B, S. 115). Ein Teil der Strahlung dringt dabei in die Probe ein (evaneszente Welle) und wird von dieser absorbiert. Die bei der Absorption zu Grunde liegenden Vorgänge sind in Kapitel VIII.2.2 (Anhang B, S. 121) beschrieben. Als Folge der Absorption kommt es zur Abschwächung des reflektierten Strahls. Durch Mehrfachreflexion kann jedoch die Intensität des detektierten Strahls erhöht werden. Die grafische Darstellung von IR-Spektren erfolgt durch Auftragung der Absorption als Funktion der Frequenz, die das Reziproke der Wellenlänge darstellt. Der Frequenzbereich für Untersuchungen in der organischen Chemie liegt üblicherweise zwischen 4000 und 400 cm⁻¹. Die Absorption A kann unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes, mit Hilfe der Intensität des nicht absorbierten Lichtes I und der Intensität des eingestrahlten Lichtes I_0 bestimmt werden zu

$$A = \log\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (12)$$

Die erhaltenen Spektren besitzen neben den für lipophile Ketten charakteristischen Banden vor allem Banden zur Charakterisierung der polaren Kopfgruppen. Mit Hilfe der Position bzw. der Aufspaltung dieser Banden können strukturelle Veränderungen in allen Bereichen der Bilayer ermittelt werden.

3.1. DURCHFÜHRUNG VON IR-MESSUNGEN AN MULTILAMELLAREN SCHICHTEN

Die Messungen wurden an dem IR-Spektrometer IFS 28 (Bruker Optik GmbH, Karlsruhe, Deutschland) unter Verwendung eines deuterierten Triglycinsulfat(DTGS)-Detektors durchgeführt. Unter Verwendung der OPUS 4.2 Software (Bruker Optik GmbH, Deutschland) wurden IR-Spektren im Wellenzahlbereich 680–4000 cm^{-1} mit einer Auflösung von 2 cm^{-1} und 32 Scans pro Spektrum aufgenommen. Die Spektren wurden mit dem entsprechenden Hintergrund korrigiert. Der ATR-Kristall wurde in eine Teflonzelle mit Reservoir von etwa 0,4 ml eingebaut, um eine Messung der Lipidschicht gegen wässriges Medium zu ermöglichen. Nachdem die Lipidmodellmembranen 24 Stunden gegen H_2O gemessen und equilibriert wurden, wurde ein Mediaustausch gegen eine wässrige Enhancerlösung vorgenommen und erneut über einen Zeitraum von 24 Stunden gemessen. Mit Hilfe der Messeinheit (Foundation Series von Thermo Spectra-Tech), auf der die Teflonzelle auflag, wurde die Proben temperatur auf 32 °C eingestellt.

3.1.1. DATENAUSWERTUNG

Die Auswertung der IR-Spektren erfolgte mit der Software OPUS 5.5 (Bruker Optik GmbH, Deutschland). Dabei wurde eine Grundlinienkorrektur der Spektren vorgenommen. Aus den erhaltenen Spektren wurden die Peakpositionen relevanter IR-Signale durch Anfitten der Peaks mittels Gaußfunktion bestimmt. Es wurden jeweils drei unabhängig voneinander präparierte SC-Lipidmultilayer vermessen und ausgewertet.

3.2. DURCHFÜHRUNG VON IR-MESSUNGEN AN OLIGOLAMELLAREN SCHICHTEN

Zur zeitgleichen Erfassung von NR- und IR-Daten wurde auf das *BioRef* am HZB ein Bruker Vertex 70 FT-IR Spektrometer (Bruker Optik GmbH, Karlsruhe, Deutschland) montiert (Abb. 8). 128 Scans wurden pro Messung bei einer spektralen Auflösung von 2 cm^{-1} durchgeführt. Die nicht absorbierte Strahlung wurde, abhängig von der gewünschten Empfindlichkeit, entweder von einem stickstoffgekühlten Quecksilber Cadmium Tellurid(MCT)-Detektor oder einem DTGS-Detektor erfasst. Die IR-Spektren wurden im Bereich 1000–6000 cm^{-1} mit Hilfe des OPUS 6.5 Software Pakets (Bruker Optik GmbH, Germany) aufgenommen.

3.2.1. DATENAUSWERTUNG

Die erhaltenen IR-Spektren wurden zunächst mit Hilfe einer Referenzmessung des unbeschichteten Si-Wafers gegen das entsprechende Medium korrigiert. Das weitere Vorgehen zur Datenauswertung entspricht dem für multilamellare Proben. Für diese Modelle wurde aufgrund der begrenzten Messzeit jeweils nur eine einfache Messung verwendet.

4. PHOTONENKORRELATIONSSPEKTROSKOPIE

Die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) ist ein Laserstreulichtverfahren zur Ermittlung von Partikelgrößen von etwa 3 nm bis 3 μm . Hierbei wird das von den Partikeln gestreute Licht bzw. dessen Veränderung in Abhängigkeit von der Zeit detektiert. Je stärker die Änderungen dabei innerhalb einer bestimmten Zeit sind, umso kleiner sind die Partikel, da diese ihre Position schneller verändern als größere Teilchen⁹⁵. Eine genaue Betrachtung des Prinzips der PCS findet sich in Kapitel VIII.3 (Anhang B, S. 122). Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe der PCS der intensitätsgewichtete hydrodynamische Durchmesser der ULVs (z-average) und dessen Verteilung (Polydispersitätsindex (PDI)) in Abhängigkeit von der Lagerungszeit ermittelt. Der Ausgangsdurchmesser der ULVs sollte dabei in etwa so groß wie die Porendurchmesser der zur Präparation verwendeten Membran sein. Eine zeitabhängige Zunahme des z-average indiziert demnach eine Vergrößerung der ULVs und könnte beispielsweise auf ein Zusammenfließen einzelner ULVs hindeuten. Der PDI ist hingegen ein Maß für die Breite der Verteilung und gibt Auskunft über die Homogenität des Modells bezogen auf die Liposomengröße. Dabei stehen Werte von Null für monodisperse Verteilungen, 0,1 bis 0,2 für enge, 0,3 für breite und 0,5 für sehr breite Verteilungen⁹⁵.

4.1. DURCHFÜHRUNG UND DATENAUSWERTUNG

Die Messungen der Partikelgröße mittels dynamischer Lichtstreuung wurden an dem Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Großbritannien) durchgeführt. Dazu wurde die Suspension in eine Einmal-Plastikküvette gefüllt und in den Strahlengang eingebracht. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Frisch aus dem Kühlschrank entnommene Proben wurden vor der Messung bei Raumtemperatur akklimatisiert. Mit Hilfe einer Korrelationsfunktion und der Einsteinbeziehung wurde durch die dazugehörige Zetasizer Software 7.03 direkt der Partikeldurchmesser sowie der jeweilige PDI ermittelt. Die dargestellten Werte für z-average und PDI sind die Mittelwerte aus fünf Messdurchläufen.

VI. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. PRÄPARATION EINES NEUARTIGEN OLIGOLAMELLAREN SC-LIPID-MODELLS

Da der Interzellularraum im nativen SC durch bis zu 20 Bilayer der SC-Lipidmatrix ausgefüllt ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Modell entwickelt werden, welches diese Dimensionen widerspiegelt. Oligolamellare Lipidschichten entsprechen diesen Dimensionen und wurden für Phospholipide bereits zahlreich untersucht. Unter Berücksichtigung der Vorgehensweise von Kreuzer für die Präparation von oligolamellaren Phospholipidmodellen⁷³, wurde unter Anwendung der Röntgenreflektometrie (XR) ein geeignetes Modell für die verwendete SC-Lipidmischung, bestehend aus CER[AP]-C18, CHOL und SA (1:0,7:1), entwickelt⁹⁶. Bislang wurden vorwiegend multilamellare Modelle zur Untersuchung der Struktur, sowie verschiedener Einflüsse auf die SC-Lipidmatrix verwendet. Im Folgenden wird deshalb das neu entwickelte oligolamellare Modellsystem mit dem Multilayermodell auf Basis von XR-Messungen verglichen. Zudem wurde die Eignung der Modelle bezüglich zukünftiger simultaner NR- und IR-Messungen untersucht.

1.1. OPTIMIERUNG DER PROBENPRÄPARATION ANHAND VON XR-UNTERSUCHUNGEN

1.1.1. LIPIDKONZENTRATION BEIM ROTATIONSBSCHICHTEN

Zunächst wurden verschiedene Konzentrationen (10 mg/ml, 5 mg/ml, 3,5 mg/ml und 2,5 mg/ml) der Lipidmischung bei 4000 rpm direkt auf die Oberfläche des Silizium(Si)-Wafers mittels Rotationsbeschichtung aufgetragen und die Reflektivitätskurven aufgenommen. Wie in Abb. 13 dargestellt, zeigen die Kurven der Konzentrationen 10 mg/ml (schwarz) und 5 mg/ml (blau) ausgeprägte *Bragg Peaks* und nur sehr schwach ausgebildete *Kiessig*-Oszillationen. Durch eine Verringerung der Konzentration auf 3,5 mg/ml (grün) entstehen dagegen auch noch bei hohen Q -Werten sehr ausgeprägte und gut definierte *Kiessig*-Oszillationen. Die niedrigste Konzentration von 2,5 mg/ml (rot) weist ebenfalls eine große Anzahl sehr gut definierter *Kiessig*-Oszillationen auf, auch wenn diese deutlich breiter sind als bei 3,5 mg/ml. Zusätzlich zu den *Kiessig*-Oszillationen lassen sich für diese beiden Konzentrationen *Bragg Peaks* erkennen. Die mit Hilfe der *Bragg Peaks* und *Kiessig*-Oszillationen gemäß der in Kapitel V.1.1.1 (S. 18) beschriebenen Vorgehensweise zur Datenauswertung ermittelten Bilayer- und Gesamtschichtdicken sind für alle untersuchten Konzentrationen in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Gesamtschichtdicke sinkt mit abnehmender Kon-

zentration der verwendeten Lipidmischung von 472,4 Å für 10 mg/ml bis auf 172,1 Å für 2,5 mg/ml. Dennoch kann für die unterschiedlichen Konzentrationen eine vergleichbare Lipidanordnung angenommen werden, da die Dicken eines einzelnen Bilayers nicht signifikant voneinander abweichen. Die ermittelten Bilayerschichtdicken zwischen 43,5 und 45,4 Å (= Phase A) sind nur geringfügig größer als die Wiederholabstände von quaternären diastereomerenreinen Mischungen aus D- bzw. L-CER[AP], CHOL, Palmitinsäure (PA) und CS, mit 43,4 Å für L-CER[AP] und 42 Å für D-CER[AP], gemessen bei trockener Raumfeuchte⁸. Dieser Unterschied kann durch die um zwei Kohlenstoffatome verringerte Kette in der PA im Gegensatz zu der hier verwendeten SA hervorgerufen werden. Außerdem sind die Schichtdicken für die hier beschriebenen Systeme nur geringfügig kleiner als die in der Literatur für vergleichbare Mischungen beschriebenen Werte mit etwa 46,5 Å, die bei erhöhter Umgebungsfeuchte (60–100 %) bestimmt wurden^{6, 48, 97, 98}. Es ist bereits bekannt, dass sich durch eine Erhöhung der Luftfeuchtigkeit der lamellare Wiederholabstand in SC-Lipidmodellen vergrößert^{7, 8}, weshalb bei den hier durchgeführten Messungen bei Raumfeuchte ein geringerer Wiederholabstand resultiert. Nichtsdestotrotz lässt sich in der vorliegenden Konzentrationsreihe die Tendenz erkennen, dass mit abnehmender Lipidkonzentration die Bilayerschichtdicke geringfügig abnimmt. Dies könnte durch verschiedene Dehydratisierungslevel der Proben, die durch unterschiedliche Anteile der direkt an Luft angrenzenden Lipide bedingt sind, hervorgerufen worden sein.

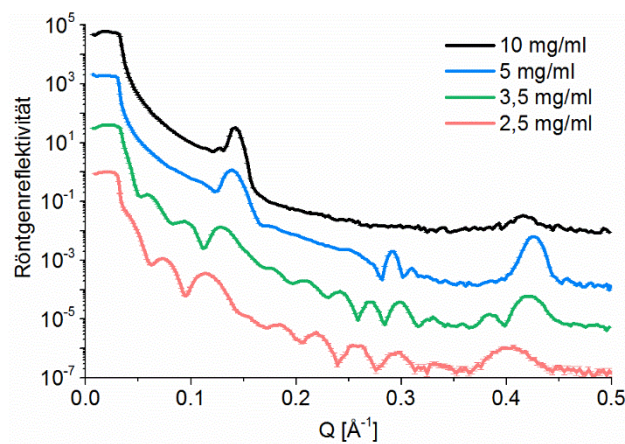


Abb. 13: XR-Kurven von Lipidmischungen aus CER[AP]:CHOL:SA (1:0,7:1 in CHCl₃:MeOH 5:1) (schwarz), 11:1 (blau), 15:1 (grün), 22:1 (rot), rotationsbeschichtet bei 4000 rpm unter Verwendung der Lipidkonzentrationen: 10 (schwarz), 5 (blau), 3,5 (grün) und 2,5 mg/ml (rot). Für eine bessere Übersicht sind die Kurven in Y-Richtung verschoben.

Tabelle 3: Bilayer- (*d*) und Gesamtschichtdicken (*t*) berechnet aus den in Abb. 13 dargestellten XR-Kurven.

	10 mg/ml	5 mg/ml	3,5 mg/ml	2,5 mg/ml
<i>d</i> [Å]	45,43 ± 0,99	44,08 ± 0,89	43,46 ± 1,51	43,92 ± 0,58
<i>t</i> [Å]	472,4 ± 8,4	223,0 ± 5,0	192,3 ± 3,2	172,1 ± 1,8

Generell ist anzumerken, dass für eine umfangreiche Charakterisierung der Probe unter Berücksichtigung der Bilayer- und Gesamtschichtdicke, sowohl die Anwesenheit von *Bragg Peaks* als auch das Vorhandensein ausgeprägter *Kiessig*-Oszillationen notwendig sind. Darüber hinaus lässt sich bei Anwesenheit von *Kiessig*-Oszillationen durch das Fitten mittels optischer Matrixmethode eine detaillierte innere Probenstruktur bestimmen. Aus dieser können dann beispielsweise Anteile an Medium in einer Schicht extrahiert werden. Demnach ist sowohl eine Lipidkonzentration von 2,5 mg/ml als auch 3,5 mg/ml, bei denen XR-Kurven mit ausgeprägten und gut definierten *Kiessig*-Oszillationen erhalten werden konnten, zu empfehlen.

1.1.1. ROTATIONSGESCHWINDIGKEIT BEIM BESCHICHTEN

Der Einfluss verschiedener Rotationsgeschwindigkeiten (1500–4000 rpm) auf die gleichmäßige Anordnung der Lipide und damit auf die Qualität der XR-Kurven ist ähnlich ausgeprägt, wie in den Untersuchungen von Kreuzer⁷³. Hierbei liefert die höchste Umdrehungsgeschwindigkeit die Reflektivitätskurve mit den am besten ausgeprägten *Kiessig*-Oszillationen (Abb. 14, schwarz). Im Gegensatz dazu sinkt die Intensität und Anzahl der *Kiessig*-Oszillationen bei geringeren Umdrehungsgeschwindigkeiten, da sich die Lipidmenge auf dem Wafer verringert (blau und grün).

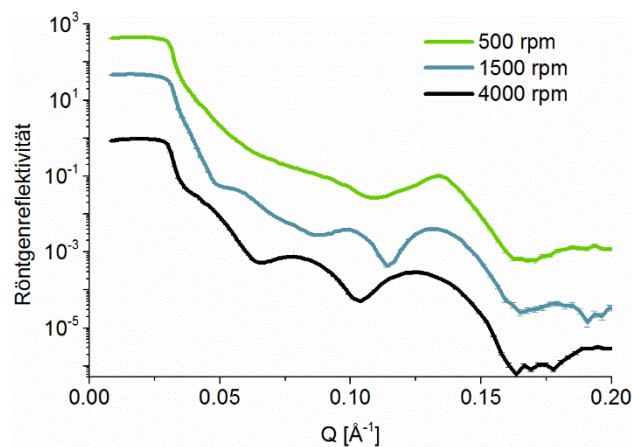


Abb. 14: XR-Kurven von Lipidmischungen aus CER[AP]:CHOL:SA (1:0,7:1 in CHCl₃:MeOH 22:1) rotationsbeschichtet bei verschiedenen Geschwindigkeiten von 500 (grün), 1500 (blau) und 4000 rpm (schwarz) unter Verwendung einer Lipidkonzentration von 2,5 mg/ml. Für eine bessere Übersicht sind die Kurven in Y-Richtung verschoben.

1.1.2. POLYETHYLENIMINSCHICHT ALS BINDEGLIED

Im Zuge der Optimierung der Probenpräparation oligolamellarer SC-Lipidmodelle wurden alle XR-Messungen bei Raumtemperatur gegen Raumfeuchte durchgeführt. Diese eher trockenen Bedingungen sind für die durchgeführten Messungen vorteilhaft, da Wasser aufgrund seiner zu den Lipiden sehr ähnlichen Streulängendichte den Kontrast deutlich verringern und die resultierende Kurve kaum charakteristische Merkmale aufweisen würde.

Gerade in Hinblick auf zukünftig geplante Untersuchungen mit hydrophilen Penetrationenhancern ist jedoch eine wässrige Probenumgebung essentiell. Dabei muss die Haftung der Lipide auf der Waferoberfläche während der Messungen an der fest/flüssigen Grenzfläche gewährleistet sein. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurden die Proben für mehrere Stunden in H_2O inkubiert und anschließend erneut vermessen. Die XR-Messung dieses in H_2O inkubierten Lipidmodells zeigt eine Ablösung der Lipide von der Waferoberfläche (Abb. 15a, hellblau). Im Vergleich zur Messung vor Inkubation in H_2O (schwarz) haben sich die Intensität und die Zahl der erkennbaren Oszillationen deutlich verringert. Dies deutet auf eine fast vollständige Ablösung der Lipide und eine nur fragmentartig verbleibende Lipidschicht hin. Als Grund für das Ablösen der Lipide werden mangelnde Anziehungskräfte zwischen der negativ geladenen Si-Oberfläche und den verhältnismäßig kleinen hydrophilen Gruppen der SC-Lipide angenommen. Ähnliche Probleme, besonders in Bezug auf die Gleichmäßigkeit und Stabilität von schichtweise adsorbierten Polyelektrolytmultilayern, sind bereits bekannt⁹⁹. In den Untersuchungen von Delcea et al. und Zhu et al. hat sich gezeigt, dass quervernetztes Polyethylenimin (PEI) als erste Schicht auf dem Wafer zu einem homogeneren und stabileren Polyelektrolytmultilayerfilm führt^{100, 101}.

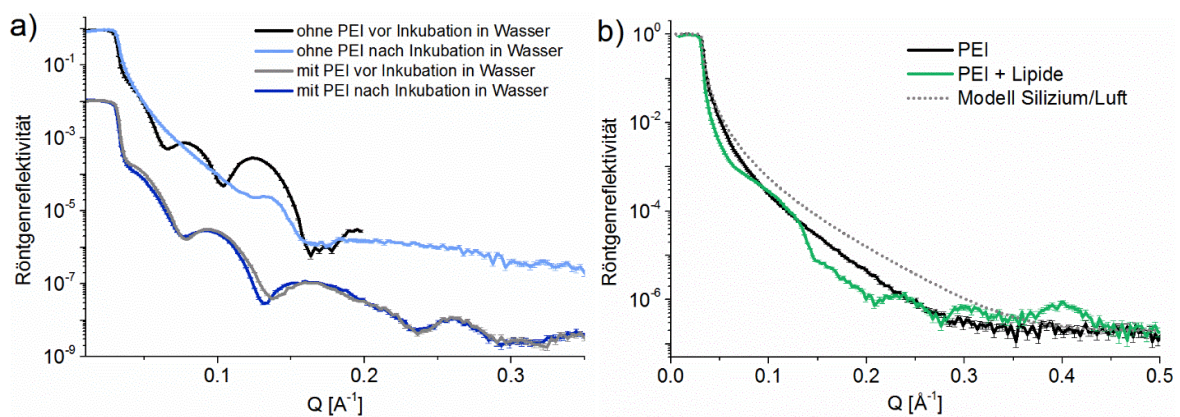


Abb. 15a) XR-Kurven einer 2,5 mg/ml Lipidmischung aus CER[AP]:CHOL:SA (1:0,7:1, $CHCl_3$: MeOH 22:1), rotationsbeschichtet bei 4000 rpm ohne PEI-Schicht, unmittelbar nach der Präparation (schwarz) und nach Inkubation in H_2O für 4,5 h (hellblau). Im Vergleich dazu sind die XR-Kurven einer 2,5 mg/ml Lipidmischung aus CER[AP]:CHOL:TA (1:0,7:1, $CHCl_3$:MeOH 24:1), rotationsbeschichtet bei 4000 rpm, unmittelbar nach PEI-Beschichtung (grau) und nach Inkubation in H_2O für 4 Stunden (dunkelblau) dargestellt. Für eine bessere Übersicht sind die Kurven in Y-Richtung verschoben. **b)** XR-Kurven einer 2,5 mg/ml Lipidmischung aus CER[AP]:CHOL:SA (1:0,7:1, $CHCl_3$:MeOH 22:1), rotationsbeschichtet bei 4000 rpm 12 h nach PEI-Beschichtung (grün) und der dazugehörigen PEI-Referenzmessung (schwarz) direkt nach PEI-Beschichtung. Die Simulation eines unbeschichteten Si-Wafers gegen Luft ist durch die grau gestrichelte Kurve angegeben.

In Anlehnung an diese Erkenntnisse wurde eine PEI-Schicht auf die Si-Oberfläche aufgebracht, die durch ihre positiven Ladungen gut auf der negativ geladenen Waferoberfläche haftet und gleichzeitig die negativ geladenen SA-Moleküle und dessen umgebende Lipide

bindet. Da die PEI-Schichten verschiedener Wafer nicht vollkommen identisch sind, ist es vorteilhaft, zunächst die Reflektivitätskurve dieser Schicht zu bestimmen, bevor die Lipide aufgebracht und vermessen werden. Beim Vergleich der XR-Kurve dieser PEI-Schicht (Abb. 15b, schwarz) mit der eines theoretischen Modells von Si gegen Luft (grau gepunktet), kann aufgrund der deutlichen Unterscheidung beider Kurven die Anwesenheit dieser PEI-Schicht nachgewiesen werden. Wie in Abb. 15b (grün) zu sehen ist, gehen bei dieser Vorgehensweise jedoch die in vorangegangenen Messungen detektierten, deutlich ausgeprägten *Kiessig*-Oszillationen der XR-Kurve verloren. Ein möglicher Grund für die Verschlechterung der Lipidstruktur könnten Veränderungen innerhalb der PEI-Schicht sein. Während der Referenzmessung gegen Luft wird die Schicht mehrere Stunden trockenen Umgebungsbedingungen ausgesetzt. Wie in der Literatur beschrieben, hat ein derartiger Trocknungsprozess einen enormen Einfluss auf die Struktur von Polyelektrolyten^{102, 103}. Dementsprechend wurden die SC-Lipide direkt im Anschluss an das Aufbringen der PEI-Schicht aufgetragen und vermessen. Wie in Abb. 15a (grau) zu sehen, sind die auftretenden *Kiessig*-Oszillationen bei dieser Vorgehensweise deutlich ausgeprägter. Auch eine Inkubation in H₂O über mehrere Stunden zeigt keinen negativen Einfluss auf den Kurvenverlauf und somit auf die Probenbeschaffenheit. Die berechnete Probendicke von $116,9 \pm 4,8 \text{ \AA}$ vor der Inkubation in H₂O und $111,9 \pm 9,5 \text{ \AA}$ nach der Wasserbehandlung zeigen keine signifikanten Unterschiede und bestätigen diese Annahme.

Diese Erkenntnisse stellen die Anwendung einer PEI-Schicht als eine zuverlässige Methode zur Fixierung der Lipide an der Waferoberfläche für Messungen an einer fest/flüssigen Grenzfläche heraus. Zudem ermöglichen sie eine ähnlich gute Probenorientierung wie ohne diese Schicht, sofern die Lipidspreitung direkt nach der Auftragung der PEI-Schicht erfolgt.

1.1.3. METHANOLGEHALT UND REPRODUZIERBARKEIT

In Anlehnung an vorangehende Studien unserer Arbeitsgruppe wurden die SLs der Lipide mit einer Mischung aus CHCl₃:MeOH (2:1, V/V) hergestellt und auch alle Verdünnungen mit dieser Mischung vorgenommen. Für die Probenpräparation mittels Rotationsbeschichtung ist der hohe MeOH-Anteil allerdings unvorteilhaft, da durch die verschiedenen Dampfdrücke der Lösungsmittel ein inhomogenes Auskristallisieren der Lipide und damit eine geringere Ordnung begünstigt werden. Diese Inhomogenität ist bereits makroskopisch auf der Waferoberfläche in Form von breiten Streifen sichtbar und kann durch die Reflektivitätsmessungen bestätigt werden (Abb. 16a). Hier indizieren die wenigen Peaks mit sehr geringer Intensität eine geringe Ordnung der Lipide innerhalb der Probe. Wie die stark unterschiedlichen Kurvenverläufe zeigen, ist es mit diesem MeOH-Anteil nicht möglich, reproduzierbare Proben herzustellen. Um jedoch das CER[AP] in Lösung bringen zu können, sind neben

CHCl_3 geringe Mengen an MeOH notwendig. Deshalb wurde für die Herstellung der CER-SL weiterhin das übliche Lösungsmittelgemisch verwendet. Für alle weiteren SL und Verdünnungsschritte wurde dagegen CHCl_3 eingesetzt, um einen möglichst geringen MeOH-Gehalt zu erzielen (SL B). Für die 3,5 mg/ml Lipidmischung CER[AP]:CHOL:SA 1:0,7:1 bedeutet das ein Volumenverhältnis CHCl_3 zu MeOH von 15:1. Wie an den Kurvenverläufen in Abb. 16b ersichtlich, kann durch dieses Verhältnis eine gut orientierte Probe mit vielen *Kiessig*-Oszillationen erhalten werden. Um letztendlich verschiedene Proben vergleichen zu können, ist eine reproduzierbare Probenpräparation notwendig. Diese kann durch den Vergleich der Kurvenverläufe zweier nach demselben Protokoll hergestellten Proben (Abb. 16b) bereits erahnt werden. Die berechneten Wiederholabstände von $43,06 \pm 1,31 \text{ \AA}$ für Probe 1 und $42,95 \pm 1,28 \text{ \AA}$ für Probe 2, die innerhalb der Fehler identisch sind, bestätigen diese Annahme und deuten auf eine vergleichbare Lipidstruktur innerhalb der Bilayer hin. Die Gesamtschichtdicken unterscheiden sich mit $258,9 \pm 1,2 \text{ \AA}$ für Probe 1 und $212,0 \pm 2,2 \text{ \AA}$ für Probe 2 um etwa eine Bilayerschichtdicke. Folglich ergibt sich für Probe 1 eine Anzahl von sechs und für Probe 2 eine Anzahl von fünf Bilayern.

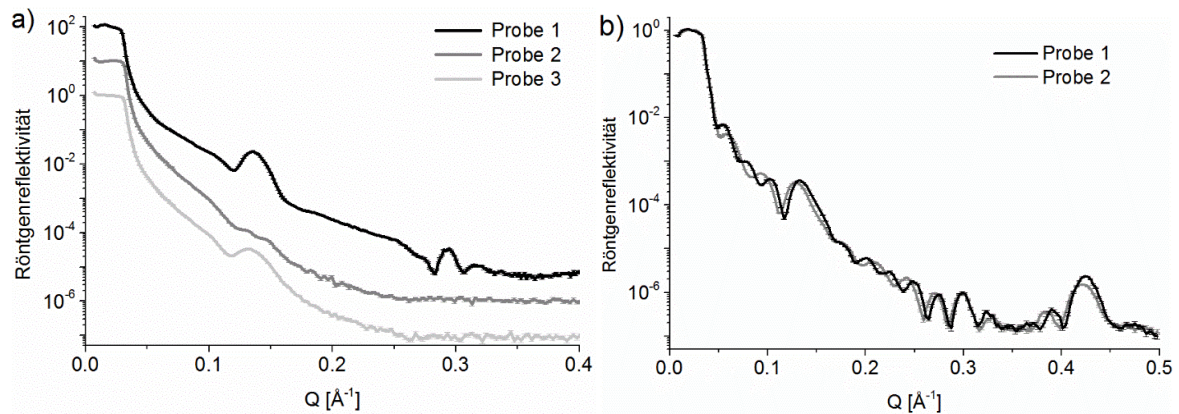


Abb. 16a) XR-Kurven von 3,5 mg/ml Lipidmischungen aus CER[AP]:CHOL:SA (1:0,7:1, CHCl_3 : MeOH 2:1), rotationsbeschichtet bei 4000 rpm unmittelbar nach PEI-Beschichtung. Für eine bessere Übersicht sind die Kurven in Y-Richtung verschoben. Die 3 Proben wurden auf die gleiche Art und Weise präpariert. **b)** XR-Kurven von 3,5 mg/ml Lipidmischungen aus CER[AP]:CHOL:SA (1:0,7:1, CHCl_3 :MeOH 15:1) rotationsbeschichtet bei 4000 rpm unmittelbar nach PEI-Beschichtung. Die zwei Proben wurden auf die gleiche Art und Weise präpariert.

1.1.4. CHOLESTEROLGEHALT

Der Einfluss eines verringerten CHOL-Gehaltes wurde an einer Mischung aus CER[AP]:CHOL:SA mit dem Molverhältnis 1:0,3:1 (Abb. 18a, grau) untersucht. Dabei konnte ein geringfügig vergrößerter lamellarer Wiederholabstand berechnet werden (genauere Betrachtungen werden im Abschnitt 1.2 durchgeführt). Dieser Zusammenhang wurde bereits in der Literatur beschrieben^{7, 33, 98}. Es wird davon ausgegangen, dass CHOL, unterhalb der Phasenübergangstemperatur der Mischung, die Lipidschicht fluidisiert, was eine Verringerung der Bilayerschichtdicke zur Folge hat. Je größer die CHOL-Konzen-

tration, desto ausgeprägter ist dieser Effekt. Demnach vergrößert sich, wie beobachtet, der Wiederholabstand mit abnehmender CHOL-Konzentration. Die Form, Anzahl und Intensität der Peaks ändert sich jedoch nicht.

1.2. VERGLEICH DER PROBENSTRUKTUR OLIGO- UND MULTILAMELLARER SC LIPIDMODELLE, SOWIE DES EINFLUSSES EINER ANNEALINGPROZEDUR MIT HILFE VON RÖNTGENREFLEKTIVITÄTSMESSUNGEN

Annealing ist eine übliche Probenbehandlungsroutine bei der Präparation von multilamellaren SC-Lipidmodellen, bei dem die Probe unter 100 % Luftfeuchte mehreren Aufheiz- und Abkühlzyklen unterworfen wird (siehe Kapitel IV. 1.3, S. 12). Wie bereits von Schroeter et al. festgestellt wurde, kann dadurch die lamellare Lipidorganisation in Multilayern verbessert werden⁵. Die Mosaizität der Probe wird dabei verringert, was sich in einer Verschmälerung der *Bragg Peaks* zeigt. Durch die verbesserte Orientierung der Lipide vergrößert sich zusätzlich die Intensität der Reflexe. An dieser Stelle soll der Einfluss eines Annealingprozesses auf die Lipidordnung in oligolamellaren Lipidmodellen untersucht werden. Dazu wurden zunächst Lipidmodelle ohne die Anwesenheit einer PEI-Schicht eingesetzt. Wie in Abb. 17 dargestellt, verschlechtert sich die XR-Kurve der rotationsbeschichteten Probe durch das Annealing drastisch und zeigt keinerlei auswertbare Oszillationen mehr.

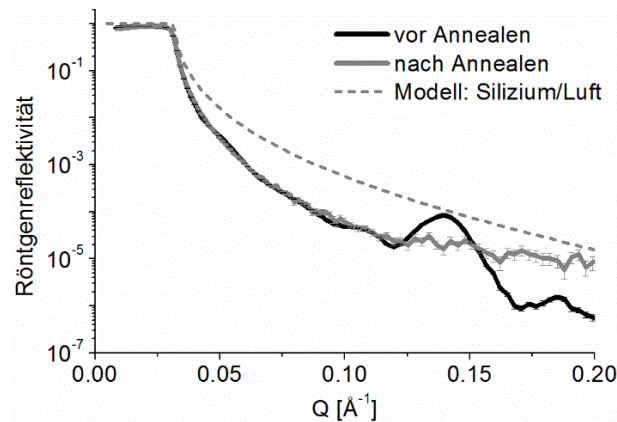


Abb. 17: XR-Kurven einer 5 mg/ml Lipidmischung aus CER[AP]:CHOL:SA (1:0,7:1; CHCl₃:MeOH 11:1) rotationsbeschichtet bei 4000 rpm.

Eine komplette Entfernung der Lipide von der Waferoberfläche ist jedoch unwahrscheinlich, da die resultierende XR-Kurve (grau) stark von dem Modell des unbeschichteten Wafers gegen Luft (grau gestrichelt) abweicht. Folglich kann eine stark ausgeprägte Unordnung der Lipide auf der Waferoberfläche angenommen werden. Durch das Einbringen von Energie während des Annealing können die ohnehin geringen Anziehungskräfte zwischen den Lipiden und dem Si-Wafer überwunden werden. Dies führt zu einem Zusammenfließen der Lipide und so zur Ausbildung von *Patches*. Dabei entsteht eine sehr inhomogene Lipidschicht, die keine ausgeprägten *Kiessig-Oszillationen* oder *Bragg Peaks* mehr hervorruft.

Da in den vorangehenden Abschnitten bereits festgestellt wurde, dass eine PEI-Schicht die Lipide an der Waferoberfläche fixiert, könnte die Anwendung dieser Schicht das beobachtete Zusammenfließen der Lipide während des Annealing verhindern. Um diesen Aspekt zu untersuchen, wurde eine oligolamellare SC-Lipidprobe der Mischung CER[AP]:CHOL:SA im Molverhältnis 1:0,3:1 mit einer PEI-Schicht präpariert und einem Annealingzyklus unterzogen. Die Probe vor Annealing zeigt gut definierte *Kiessig*-Oszillationen (Abb. 18a, grau), aus denen eine Probendicke von 215,3 Å berechnet werden kann (Tabelle 4). Die Schichtdicke eines Bilayers wird dabei bestimmt zu 45,42 Å, was mit bereits beschriebenen Wiederholabständen vergleichbarer Mischungen übereinstimmt^{6, 48, 97, 98}. In dieser Phase, hier als Phase A beschrieben, sind alle drei Komponenten der Lipidmischung vorhanden.

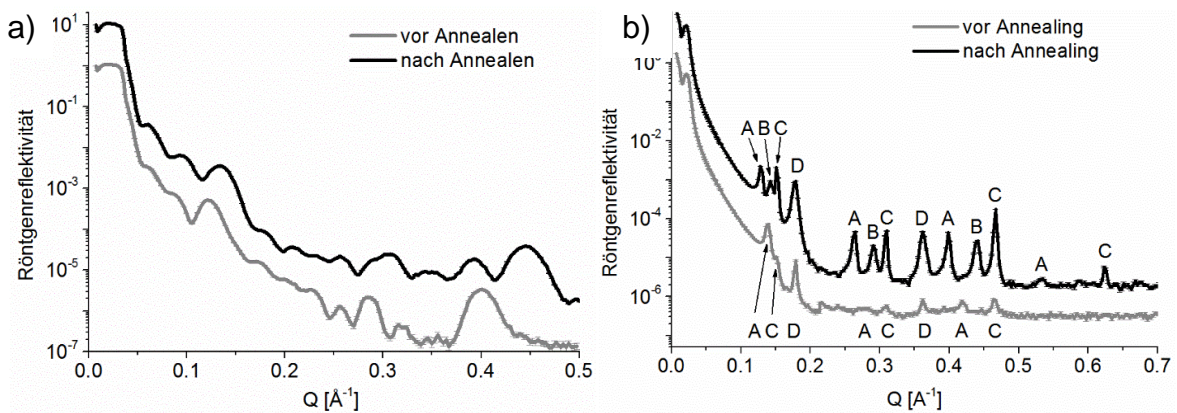


Abb. 18a) XR-Kurven einer 3,5 mg/ml Lipidmischung aus CER[AP]:CHOL:SA (1:0,3:1; CHCl₃: MeOH (13:1)), rotationsbeschichtet bei 4000 rpm unmittelbar nach PEI-Beschichtung vor (grau) und nach (schwarz) der Durchführung einer Annealingprozedur. **b)** XR-Kurven von Multilayern vor (grau) und nach (schwarz) der Durchführung einer Annealingprozedur. Die Buchstaben indizieren die Zugehörigkeit der Peaks zu den unterschiedlichen Phasen A-D. Durch den Abstand der Peaks können die in Tabelle 4 angegebenen Dicken ermittelt werden. Die Probenpräparation erfolgte durch aufsprühen von 10 mg der Lipidmischung aus CER[AP]:CHOL:SA (1:0,7:1; CHCl₃:MeOH (15:1)), bei 50 °C nach PEI-Beschichtung. Für eine bessere Übersicht sind die Kurven in Y-Richtung verschoben.

Tabelle 4: Bilayer- (*d*) und Gesamtschichtdicken (*t*), ermittelt aus den in Abb. 18a und b dargestellten XR-Kurven vor und nach Annealing. Für die untersuchten Proben konnten verschiedene Wiederholabstände ermittelt werden, für die jeweils eine mögliche Zusammensetzung angegeben ist.

	Oligolayer		Multilayer		mögliche Zusammensetzung	
	Phase	vor Annealing	nach Annealing	vor Annealing		nach Annealing
<i>d</i> [Å]	A	45,42 ± 0,66	--	44,82 ± 0,11	46,57 ± 0,06	CER[AP] + CHOL + SA
	B	--	--	--	42,26 ± 0,03	SA
	C	--	40,52 ± 0,52	40,04 ± 0,13	39,90 ± 0,01	CER[AP] + CHOL + SA
	D	--	--	34,28 ± 0,09	34,13 ± 0,02	CHOL
<i>t</i> [Å]		215,3 ± 6,3	182,8 ± 2,3	--	--	--

Nach der Anwendung des Annealingprozesses sind ebenfalls *Kiessig*-Oszillationen und *Bragg Peaks* zu erkennen (Abb. 18a, schwarz), was auf eine, nach wie vor, intakte Bilayerstruktur hinweist. Aufgrund der stärkeren Bindungskräfte in Anwesenheit des PEI sind die SC-Lipide größtenteils auf der Waferoberfläche fixiert. Sie können sich folglich nicht mehr in einem derartigen Ausmaß umordnen, wie es für die Probe ohne PEI-Schicht beschrieben ist. Allerdings sind nach dem Annealing die Maxima und Minima weniger stark ausgeprägt, sodass die XR-Kurve breitere Peaks mit geringerer Intensität zeigt. Als Resultat der kleineren Bilayerschichtdicke von 40,52 Å, hier als Phase C bezeichnet, verringert sich die berechnete Probendicke auf 182,8 Å. Es ist bereits beschrieben, dass das reine L-Enantiomer von CER[AP] nach einem Aufheiz- und Abkühlzyklus eine V-förmige Konformation mit einem Wiederholabstand von 37 Å einnehmen kann¹⁰⁴. In Verbindung mit dem nicht abgewinkelten D-CER[AP] mit einem Wiederholabstand von 47 Å und den zusätzlich eingelagerten Komponenten CHOL und SA könnte bei einem hohen Anteil an V-förmigen Konformeren eine Struktur mit etwa 40 Å Dicke ausgebildet worden sein. Ein weiterer Einflussfaktor auf die verringerte Schichtdicke könnte eine Neigung der gesamten Lipidschicht senkrecht zur Membranebene sein, hervorgerufen durch die beim Annealing zusätzlich zur Verfügung gestellte Energie. Hierbei erhöht sich auch die Mobilität der Lipide, wodurch sich die Ordnung innerhalb der Membran, wenn auch nur geringfügig, verschlechtert. Demzufolge kann der erwartete Effekt bezüglich der Verbesserung der Lipidordnung durch die Anwendung eines Annealingzyklus für die hier präparierten oligolamellaren Modelle nicht beobachtet werden.

Im Gegensatz zu oligolamellaren Lipidmodellen, ist bei multilamellaren Proben die Gesamtschichtdicke so groß, dass der Abstand benachbarter *Kiessig*-Oszillationen $\Delta Q_{Kiessig}$ zu klein wird, um noch ausreichend aufgelöst werden zu können. Dafür kann bei der Untersuchung des multilamellaren Lipidmodells einer Mischung aus CER[AP], CHOL und SA (1:0,7:1) das Auftreten zahlreicher *Bragg Peaks* beobachtet werden (Abb. 18b). Vor dem Annealing (grau) sind die Intensitäten der *Bragg Peaks*, besonders bei hohen Q-Werten, sehr gering. Dies deutet auf eine eher ungeordnete, pulverähnliche Probe hin. Die auftretenden *Bragg Peaks* beschreiben eine Probe mit drei Phasen unterschiedlicher Schichtdicke (Tabelle 4). Die Phase mit dem Wiederholabstand von 34,28 Å, hier als Phase D bezeichnet, kann phasensepariertem kristallinem CHOL-Monohydrat zugeordnet werden^{98, 105}. Die zwei Phasen mit den Schichtdicken von 44,82 Å und 40,04 Å stellen die bereits erläuterten Phasen A und C dar, die alle Lipide der Mischung enthalten, sich aber vermutlich in den Konformationen des CER[AP]-Moleküls unterscheiden. Dabei würde für Phase A unter trockenen Bedingungen eine voll gestreckte Konformation des CER energetisch bevorzugt sein³², während in Phase C große Mengen des V-förmigen Konformers enthalten sein würden.

Durch die Anwendung einer Annealingprozedur werden die wenig geordneten Lipide in eine hochgeordnete lamellare Struktur gezwungen, die durch viele scharfe *Bragg Peaks* mit hoher Intensität gekennzeichnet ist (Abb. 18b, schwarz). Dabei ordnen sich die Lipide in vier Phasen unterschiedlicher Schichtdicke an (Tabelle 4). Die Phasen C und D zeigen keine Veränderungen des Wiederholabstandes als Folge des Annealing, während der Wiederholabstand der Phase A auf 46,57 Å ansteigt. In diesem Zusammenhang ist in der Literatur beschrieben, dass es bei den unter trockenen Bedingungen voll gestreckten CER-Molekülen mit Erhöhung der Umgebungsfeuchte zur Ausbildung einer Haarnadelkonformation durch Umklappen einer der Kohlenstoffketten kommt³². Durch die beim Annealing eingebrachte Luftfeuchtigkeit könnte demzufolge eine Membran mit einem höheren Anteil an CER in Haarnadelkonformation ausgebildet werden, der zu einer Erhöhung der Schichtdicke führt. Dieser Sachverhalt könnte auch für die Schichtdickenveränderungen in der Phase A verantwortlich sein. Im Gegensatz zu den beobachteten Phasen der Probe vor Annealing tritt noch eine weitere Phase, Phase B, mit einem lamellaren Wiederholabstand von 42,26 Å auf. Da Studien zu SA-Monolayern eine Schichtdicke von etwa 21 Å aufzeigen^{106, 107}, könnte diese Phase separierter SA zugeordnet werden. Zudem ist bereits beschrieben, dass es in SC-Lipidmischungen zu einer Separierung von CER und FFA kommen kann¹⁰⁸, was in diesem Fall durch die zusätzlich eingebrachte Energie begünstigt worden sein könnte. Normalerweise würden wir als Folge des Annealing keine Phasenseparation erwarten. In diesem Fall kann jedoch die geringe Luftfeuchtigkeit eine große Rolle gespielt haben, da die in der Literatur beschriebenen Messungen von annealten Proben bei einer relativen Luftfeuchte von 60 bis 100 % durchgeführt wurden. Letztendlich können mit Hilfe der vorhandenen Daten nur Spekulationen über eine mögliche Zusammensetzung der einzelnen Phasen vorgenommen werden. Für eine Bestätigung dieser wären weiterführende Untersuchungen, beispielsweise NR-Messungen mit einzelnen perdeutierten Lipidspezies notwendig. Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass ein Annealing von multilamellaren Proben zur Ausbildung einer hochgeordneten Lipidstruktur führt.

Vergleicht man schließlich oligolamellare und multilamellare Lipidmodelle miteinander, lassen sich zwei wesentliche Unterschiede feststellen. Zum einen kann bei oligolamellaren Lipidschichten keine Phasenseparation einer einzelnen Lipidkomponente beobachtet werden, weshalb eine homogene Mischung aller Lipidspezies angenommen wird. Die Lipide in multilamellaren Proben liegen dagegen nicht homogen gemischt vor und es tritt eine Phasenseparation von CHOL (34 Å) und SA (42 Å) auf. Zum anderen hat das Annealing in beiden Modellen unterschiedliche Effekte. Für multilamellare Modelle ist die Durchführung eines Annealingprozesses essentiell, um die lamellare Lipidorganisation zu verbessern⁵. In diesem Fall existiert innerhalb der zu hunderten übereinander gelagerten, relativ ungeordne-

ten Lipidbilayern ein sehr großes Bestreben zur Ausbildung einer besser geordneten Struktur. Bei oligolamellaren Proben führt das Annealing zu einem eher gegenteiligen Effekt, bei dem sich die Ordnung der Lipide tendenziell sogar verschlechtert. Da bei der Rotationsbeschichtung bereits hochgeordnete dünne Lipidschichten entstehen, besitzen diese ein geringes Bestreben eine noch höhere Ordnung zu erreichen. Durch die zusätzlich eingebrachte Luftfeuchte und thermische Energie werden die Lipide stattdessen mobiler und bilden eine weniger geordnete Struktur.

1.3. IR-UNTERSUCHUNGEN ZUR TAUGLICHKEIT DER MODELLE FÜR SIMULTANE NR- UND IR-MESSUNGEN

In diesem Abschnitt wird weniger auf den konkreten Einfluss bestimmter Parameter und die Lipidstruktur, als vielmehr auf die potenzielle Anwendbarkeit einzelner Modelle für zukünftige Messungen eingegangen. Da am *BioRef* eine simultane NR- und IR-Messung möglich ist, werden die Modelle speziell auf ihre diesbezügliche Eignung untersucht. Dazu wurden die beiden SC-Lipidmodelle (oligo- und multilamellar) mit Detektoren unterschiedlicher Empfindlichkeit vermessen und die Spektren auf Anwesenheit charakteristischer, auswertbarer IR-Banden überprüft. Die Messungen oligolamellarer Proben mit Hilfe eines DTGS-Detektors zeigen keine ausgeprägten Banden (Abb. 19, schwarz). Für nachfolgende Untersuchungen ist diese Kombination daher ungeeignet. Durch die Verwendung eines sensitiveren MCT-Detektors konnten zwei scharfe Banden bei etwa 2920 cm^{-1} und 2850 cm^{-1} aufgenommen werden (blau), die charakteristisch für die symmetrischen ($\nu_s(\text{CH}_2)$) und asymmetrischen CH_2 -Valenzschwingungen ($\nu_{as}(\text{CH}_2)$) der SC-Lipide sind. Die Position dieser Banden gibt Auskunft über das Verhältnis von *trans*- zu *gauche*-Konformeren und die Alkylkettenpackung. Durch eine Erhöhung des Anteils an *gauche*-Konformeren verschieben sich die Wellenzahlen beider Banden zu größeren Werten^{37, 109}. Derartige Verschiebungen können beispielsweise durch Wechselwirkungen mit Enhancermolekülen hervorgerufen werden. Bei ungefähr 1700 cm^{-1} taucht eine weitere Bande, die der asymmetrischen Carbonyl-Streckschwingung ($\nu(\text{CO})$) der SA zugeordnet werden kann, auf. Bei der Anwendung von Penetrationenhancern könnte diese Bande beispielsweise beeinflusst werden oder neue, für den Enhancer charakteristische, Banden entstehen. Bei Wellenzahlen unterhalb von 1400 cm^{-1} ist eine Detektion weiterer Banden nicht mehr möglich, da der Si-Wafer hier einen großen Teil der Strahlung absorbiert. Damit in späteren Experimenten allerdings eine simultane NR- und IR-Messung durchgeführt werden kann, ist dieser Si-Wafer als Trägermaterial unverzichtbar.

Wie bereits für die oligolamellare Probe beschrieben, zeigen auch die multilamellaren Lipidmodelle charakteristische Banden für die $\nu_s(\text{CH}_2)$ und $\nu_{as}(\text{CH}_2)$. Hier sind jedoch aufgrund

der dickeren Schicht die Intensitäten um ein Vielfaches größer (Abb. 19; grün und grau). Im Bereich $1800\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ tauchen weitere Banden auf, die zur Charakterisierung der Lipidstruktur und eines möglichen Enhancereinflusses genutzt werden können. Für beide Detektoren ergeben sich ähnliche Verläufe der Spektren, wobei die aufgenommenen Banden beim MCT-Detektor (grün) deutlich schärfer sind.

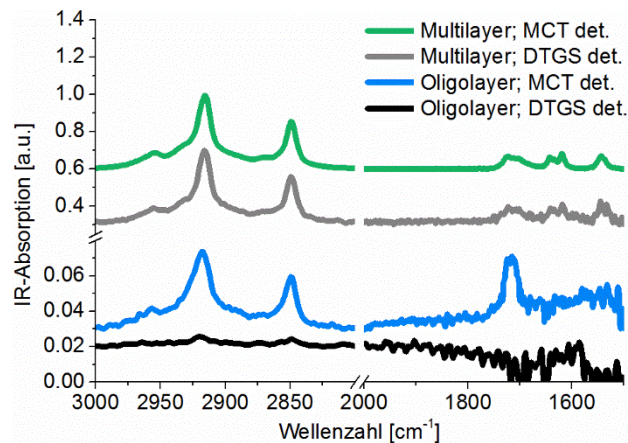


Abb. 19: IR-Messungen von mittels Luftdruck aufgespritzten bzw. rotationsbeschichteten SC-Lipidmischungen aus CER[AP]:CHOL:SA (1:0,7:1) gegen D_2O unmittelbar nach PEI-Beschichtung. Das IR-Signal wurde entweder durch einen DTGS- oder einen MCT-Detektor aufgezeichnet. Für eine bessere Übersicht sind die Spektren in Y-Richtung verschoben.

Insgesamt ist die Verwendung eines MCT-Detektors in jedem Fall vorzuziehen, da die erhaltenen Banden definierter sind. Weiterhin, kann durch die Verwendung multilamellarer Lipidmodelle eine größere Anzahl an IR-Banden und damit umfangreichere Informationen zum Modell erfasst werden. Jedoch sind auch oligolamellare Proben durchaus für eine simultane NR- und IR-Messung geeignet. Es können sowohl im Bereich von 1800 bis 1500 cm^{-1} , als auch für die $\nu_s(\text{CH}_2)$ und $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ klare, auswertbare Banden detektiert werden. Für geplante Studien bezüglich des Einflusses hydrophiler Penetrationsenhancer kann also angenommen werden, dass für den Fall eines auftretenden Effektes dieser auch an dem oligolamellaren Modell beobachtet und detektiert werden kann.

1.4. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Studie konnte mittels Rotationsbeschichtung eine Präparationsmethode für ein neuartiges oligolamellares SC-Lipidmodell, bestehend aus CER[AP], CHOL und SA etabliert werden. Die Methode wurde basierend auf Vorgehensweisen für bereits erfolgreich durchgeführte Phospholipidbeschichtungen adaptiert^{26, 73, 75}. In Hinblick auf zukünftig geplante Studien bezüglich des Einflusses hydrophiler Penetrationsenhancer oder anderer Substanzen, die über das wässrige Medium in das System eingebracht werden, ist die Integrität und Stabilität des feststoffgestützten SC-Lipidmodells erforderlich und wurde hier maßgeb-

lich optimiert. Eine reproduzierbare Präparation des neuartigen oligolamellaren SC-Lipidmodells kann demnach verwirklicht werden durch:

- (I) Vorbeschichten des Si-Wafers mit einer PEI-Schicht als Adsorptionsschicht für die SC-Lipide.
- (II) Anschließende Rotationsbeschichtung der 3,5 mg/ml SC-Lipidlösung (CER[AP]: CHOL: SA; 1:0,7:1) in CHCl_3 :MeOH 15:1 (V/V) bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 4000 rpm direkt im Anschluss an Schritt (I), ohne zwischenzeitliches Trocknen.
- (III) Vermeiden eines anschließenden Annealingprozesses, wie er bei multilamellaren Proben normalerweise angewendet wird⁵.

Im Vergleich zu den bislang üblicherweise verwendeten multilamellaren Lipidmodellen weist das neuartige oligolamellare Modell diverse Vorteile auf:

- (I) Das oligolamellare Modell ist, nach der Anzahl der Bilayer zu urteilen, der nativen SC-Lipidmatrix deutlich ähnlicher als multilamellare Lipidanordnungen.
- (II) Es besteht aus einer einzelnen Phase und weist keine Phasenseparationen auf.
- (III) Der Einfluss verschiedener Substanzen auf die Struktur des oligolamellaren SC-Lipidmodells kann mit Röntgen- oder Neutronenreflektometrie detailliert beurteilt werden. Zusätzlich zu dem lamellaren Wiederholabstand kann auch die gesamte Probendicke des SC-Modells und Veränderungen dieser beobachtet werden.
- (IV) Potentielle konformative Änderungen der Lipide im oligolamellaren SC-Lipidmodell, hervorgerufen durch Interaktionen mit Enhancern und Arzneistoffen, sind, trotz der deutlichen Reduzierung der Schichtdicke im Vergleich zu Multilayern, mit Hilfe der ATR-FTIR-Spektroskopie detektierbar.

Publiziert in:

Mueller, J.; Schroeter, A.; Steitz, R.; Trapp, M.; Neubert, R. H. *Preparation of a New Oligolamellar Stratum Corneum Lipid Model. Langmuir* 2016, 32 (18), 4673-80.

2. HYDROPHILE ENHANCER

Es existieren bereits Studien, die einen Einfluss der in dieser Arbeit untersuchten hydrophilen Penetrationenhancer auf SC- bzw. Hautmodelle beschreiben. Diese sind für jeden einzelnen Enhancer zu Beginn des jeweiligen Abschnittes zusammengefasst. Dennoch kann bisher keine abschließende Aussage zu dem genauen Wirkmechanismus auf molekularer Ebene erfolgen. Die hier zum Einsatz kommenden Untersuchungen sollen diesbezüglich neue Erkenntnisse erbringen. Dabei reichen die verwendeten Modelle von multilamellaren Schichten über die im vorangehenden Kapitel entwickelten oligolamellaren Modelle bis hin zu unilamellaren Lipidanordnungen. Durch die Anwendung diverser physikalischer Methoden kann eine vielseitige Charakterisierung der Modelle und des Enhancereinflusses, beispielsweise in Bezug auf die Schichtdicke, die Verteilung des Enhancers, die laterale Kettenordnung und die Integrität der Membran erfolgen.

2.1. WASSER

Wasser nimmt ungefähr 15–20 % des Trockengewichtes des SC ein und ist ein natürlicher Diffusionsenhancer¹¹⁰. Trotz umfangreicher Studien ist der genaue Wirkungsmechanismus, der zur Verbesserung der Penetration von sowohl hydrophilen als auch lipophilen Arzneistoffen führt, bisher unbekannt⁵². Einen wesentlichen Beitrag leistet wahrscheinlich die Tatsache, dass Wasser die Löslichkeit von hydrophilen Arzneistoffen verbessert und so die Verteilung desselben aus der Formulierung in die Haut fördert. Elias et al. gehen zudem davon aus, dass es zur Ausbildung von zusammenhängenden wassergefüllten Poren kommt, die die Permeation des Arzneistoffs durch das SC verbessern¹¹¹. Studien mittels konfokaler Mikrospektroskopie konnten zeigen, dass ein Wasserüberschuss innerhalb des SC zu linsenförmigen Einschlüssen führt, welche größer sind als maximal hydratisierte Korneozyten und ähnliche spektrale Eigenschaften wie Bulkwasser aufweisen¹¹². Durch die Anwesenheit dieser großen Wassermengen könnten die hydrophilen Kopfgruppenregionen der Lipidmatrix, insbesondere die normalerweise sehr geringfügig ausgebildete Wasserschicht, ebenfalls beeinflusst werden¹². Röntgendiffraktionsstudien an humanem SC zeigten keinerlei Anschwellung der Lipidbilayer in Abhängigkeit vom Hydratationsgrad, wobei zumindest die Ordnung eines Teils der Lipide im vollständig hydratisierten Zustand verringert wurde¹¹³. Zudem wurde anhand von Differenz-Thermoanalyse-Studien an humanem SC, eine erhöhte Fluidität der SC-Lipide durch die Applikation von Wasser festgestellt¹¹⁴. Durch die isolierte Betrachtung der Lipidbilayer in den nachfolgenden Untersuchungen sind Aussagen über eine wasserinduzierte Porenbildung, eine Fluidisierung der Lipide oder Veränderungen der Wiederholanstände möglich.

2.1.1. IR- UND NR-MESSUNGEN AN MULTILAYERN

Wird die trockene multilamellare Lipidschicht im Rahmen der IR-Messungen mit Wasser in Verbindung gebracht, ergeben sich die in Abb. 20 und Abb. 21 dargestellten Veränderungen im IR-Spektrum. Dabei werden charakteristische Schwingungen bewertet und diskutiert. Beispielfähig ist hier eine einzelne Probe beschrieben. Der Trend lässt sich jedoch für alle untersuchten Proben bestätigen.

IR-BANDEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DER KETTEN: Die symmetrischen und asymmetrischen CH_2 -Valenzschwingungen ($\nu_s(\text{CH}_2)$ bzw. $\nu_{as}(\text{CH}_2)$) bei Wellenzahlen von etwa 2850 cm^{-1} und 2915 cm^{-1} beschreiben die intramolekulare Konformation der Lipidketten. Befinden sich diese in einem gestreckten und geordneten all-*trans* Zustand, ergeben sich Positionen von $\leq 2849\text{ cm}^{-1}$ bzw. $\leq 2920\text{ cm}^{-1}$, während Wellenzahlen $\geq 2854\text{ cm}^{-1}$ und $\geq 2924\text{ cm}^{-1}$ auf einen flüssig-ähnlichen (*gauche*) Zustand hindeuten¹¹⁵. Mit Bandenpositionen von $2915,7\text{ cm}^{-1}$ und $2848,7\text{ cm}^{-1}$ im trockenen Zustand (Tabelle 5; Abb. 20, schwarz) kann demzufolge davon ausgegangen werden, dass sich die Ketten der Lipide in einem gestreckten und geordneten all-*trans* Zustand befinden. Durch die Zugabe von Wasser verringert sich die Position der $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ innerhalb von 24 h auf $2914,1\text{ cm}^{-1}$, was auf eine Erhöhung der Kettenordnung, verbunden mit einer verdichteten Kettenpackung, hindeutet^{116, 117}. Diese Beobachtung steht scheinbar im Gegensatz zu dem postulierten penetrationsfördernden Effekt des Wassers. An dieser Stelle muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Lipide im nativen SC bereits hoch geordnet vorliegen, während sie in den nicht durch Annealing behandelten multilamellaren Modellen zunächst wenig geordnet sind. Ursächlich dafür ist die hydrophobe Natur der Luft als Umgebungsmedium der Lipide, welche sich bei Zugabe von Wasser in eine hydrophile Umgebung umwandelt. In der Folge werden die zuvor weniger stark geordneten Lipide, die durch den großen Anteil an hydrophoben Ketten gut mit dem hydrophoben Umgebungsmedium wechselwirken konnten, forciert sich umzuordnen. Dabei richten sich die Lipide so aus, dass die Kontaktfläche zwischen dem hydrophilen Wasser und den lipophilen Ketten möglichst gering wird. Es resultiert eine Bilayerstruktur, die eine deutlich höhere Lipidordnung aufweist als zuvor. Für die Lipidmatrix im nativen SC würde dieser Effekt aufgrund der bereits hoch geordneten Strukturen wahrscheinlich nicht beobachtet werden. Für eine genauere Beurteilung diesbezüglich wären allerdings Untersuchungen mit multilamellaren Proben, die einer Annealingprozedur unterzogen worden sind und bereits eine hohe Grundordnung aufweisen, vorteilhaft. Die Position der $\nu_s(\text{CH}_2)$ -Bande mit $2848,5\text{ cm}^{-1}$ verändert sich nach 24 h Inkubationszeit in Wasser nicht. Zur Beschreibung der intermolekularen Kettenpackung, kann der Bereich der CH_2 -Deformationsschwingung (δCH_2) zwischen $1400\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ herangezogen werden. Die einzelne Bande bei $\sim 1467\text{ cm}^{-1}$ im trockenen Zustand (Abb. 21, schwarz), weist auf eine hexagonale

Kettenpackung hin, wie sie bereits in früheren Untersuchungen zu ternären Lipidmischungen mit CER[AP] bestimmt worden ist^{116, 118}. Eine Aufspaltung dieser Bande mit Wellenzahlen um 1462 cm^{-1} und 1473 cm^{-1} wäre hingegen charakteristisch für eine orthorhombische Packung¹¹⁸. Während der Lagerung in Wasser findet eine solche Aufspaltung nicht statt, sodass nach wie vor eine hexagonale Kettenpackung vorliegt.

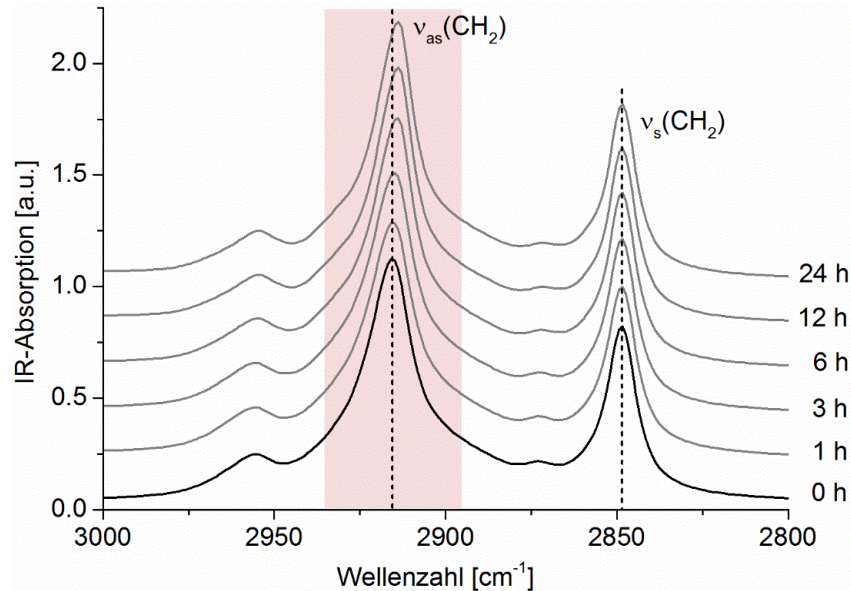


Abb. 20: ATR-FTIR-Spektren des oberen Wellenzahlenbereiches bis 2800 cm^{-1} eines multilamellaren SC-Lipidmodells (CER[AP]:CHOL:SA) gegen Luft (schwarz) und anschließend gegen H_2O (grau) nach verschiedenen Inkubationszeiten (1-24 h). Zu Vergleichszwecken sind die Spektren in Y-Richtung verschoben. Peakveränderungen sind rot hinterlegt.

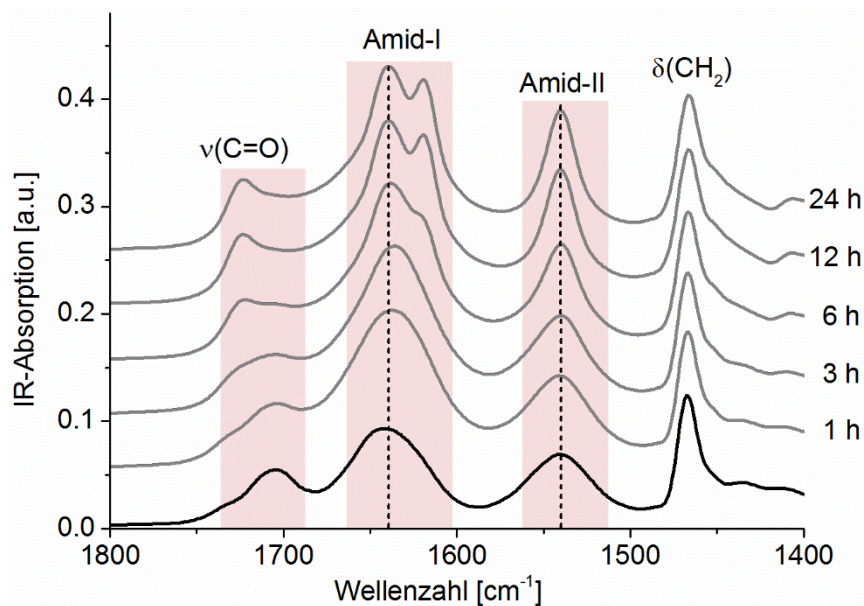


Abb. 21: ATR-FTIR-Spektren des unteren Wellenzahlenbereiches von 1800 bis 1400 cm^{-1} eines multilamellaren SC-Lipidmodells (CER[AP]:CHOL:SA) gegen Luft (schwarz) und anschließend gegen H_2O (grau) nach verschiedenen Inkubationszeiten von 1 bis 24 h. Zu Vergleichszwecken sind die Spektren in Y-Richtung verschoben. Peakveränderungen sind rot hinterlegt.

Tabelle 5: Positionen [cm^{-1}] der wichtigsten in Abb. 20 und Abb. 21 dargestellten Banden eines multilamellaren Lipidmodells gegen Luft und zu verschiedenen Inkubationszeiten in H_2O . Die Positionen von schwach ausgeprägten Banden können dabei nicht zuverlässig ermittelt werden (n.b.).

Bande	Luft	H_2O (1 h)	H_2O (3 h)	H_2O (6 h)	H_2O (12 h)	H_2O (24 h)
$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	$2915,7 \pm 0,1$	$2915,5 \pm 0,1$	$2915,2 \pm 0,1$	$2914,5 \pm 0,1$	$2914,2 \pm 0,1$	$2914,1 \pm 0,1$
$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$	$2848,7 \pm 0,1$	$2848,7 \pm 0,1$	$2848,6 \pm 0,1$	$2848,6 \pm 0,1$	$2848,6 \pm 0,1$	$2848,5 \pm 0,1$
$\nu(\text{CO})$	n.b.	n.b.	n.b.	$1721,4 \pm 0,2$	$1722,5 \pm 0,2$	$1722,6 \pm 0,2$
	$1704,7 \pm 0,1$	$1702,9 \pm 0,1$	$1704,1 \pm 0,1$	n.b.	n.b.	n.b.
Amid-I	$1640,4 \pm 0,1$	$1637,8 \pm 0,1$	$1636,2 \pm 0,1$	$1637,5 \pm 0,1$	$1639,0 \pm 0,1$	$1639,0 \pm 0,1$
	--	--	--	n.b.	$1619,9 \pm 0,1$	$1619,8 \pm 0,1$
Amid-II	$1541,0 \pm 0,1$	$1541,7 \pm 0,1$	$1541,4 \pm 0,1$	$1540,5 \pm 0,1$	$1540,4 \pm 0,1$	$1540,4 \pm 0,1$
$\delta(\text{CH}_2)$	$1467,4 \pm 0,1$	$1467,1 \pm 0,1$	$1466,9 \pm 0,1$	$1466,4 \pm 0,1$	$1466,1 \pm 0,1$	$1466,1 \pm 0,1$

IR-BANDEN ZUR CHARAKTERISIERUNG VON POLAREN GRUPPEN: Die funktionellen Gruppen der Lipidmischung besitzen ebenfalls charakteristische Valenz- und Deformationsschwingungen, deren Positionen über Konformationsänderungen oder die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen (HBBs) informieren. Die Amid-I Bande im Bereich $1630\text{--}1680\text{ cm}^{-1}$ ist hauptsächlich auf die $\nu(\text{C}=\text{O})$ -Schwingung des sekundären Amids im CER[AP] zurückzuführen. Eine etwas kleinere Bande (Amid-II), die durch die Deformationsschwingung der Aminogruppe $\delta(\text{C-N-H})$ und die C-H Valenzschwingung $\nu(\text{C-H})$ hervorgerufen wird, wird meist bei Wellenzahlen um 1550 cm^{-1} beobachtet. Je kleiner die Frequenz der Amid-I-Bande und je größer die Frequenz der Amid-II-Bande, desto stärker sind die HBBs der Amidgruppen ausgebildet^{93, 117, 119}. Wie in Abb. 21 (schwarz) und Tabelle 5 aufgezeigt, sind die beiden Amid-Banden im trockenen Zustand sehr breit. Aufgrund der für die Amid-I-Bande verhältnismäßig niedrigen und für die Amid-II-Bande verhältnismäßig hohen Wellenzahlen, sind bereits im trockenen Zustand relativ stark ausgeprägte HBBs vorhanden. Eine Aufspaltung der Banden würde auf intermolekulare Schwingungskopplungen, besonders zwischen Amidgruppen benachbarter Bilayer, hindeuten, da diese bei Untersuchungen an Monolagen nicht auftauchten⁹³. Durch das Ausbleiben dieser Aufspaltung wird angenommen, dass im nicht-hydratisierten Zustand keine bzw. nur geringfügig ausgeprägte interlamellare Wechselwirkungen vorhanden sind. Bei Kontakt mit Wasser verschiebt sich die Position der Amid-I-Bande zu kleineren Wellenzahlen, während die Wellenzahl der Amid-II-Bande steigt. Beide Beobachtungen indizieren eine verstärkte Ausbildung von HBBs. Mit zunehmender Inkubation in Wasser kommt es schließlich zur Aufspaltung der Amid-I-Bande, die die Ausbildung interlamellarer HBBs, ausgehend von der C=O-Gruppe des Amids, beschreibt. Die niedrigen Wellenzahlen um 1620 cm^{-1} repräsentieren dabei sehr stark über HBBs gebundene Spezies, während die Bande um 1640 cm^{-1} eher

schwächer wasserstoffbrückegebundene Spezies beschreibt⁹⁴. Verantwortlich für die unterschiedlich stark ausgebildeten HBBs könnten dabei die unterschiedlichen Anordnungen von L-CER[AP] und D-CER[AP] sein. In diesem Zusammenhang wurde für die C=O-Gruppe des D-CER[AP] bereits eine stärkere Einbindung in HBBs als für die des L-CER[AP] diskutiert, die wahrscheinlich auf die unterschiedliche räumliche Anordnung der beiden Enantiomere und die infolge veränderte Abschirmung der polaren Kopfgruppen zurückzuführen ist³³. Diese veränderte räumliche Anordnung könnte ebenfalls einen Einfluss auf die Lage der N-H-Gruppe haben und somit unter Umständen deren Beteiligung an HBBs reduzieren. Dieser Zusammenhang wäre eine mögliche Erklärung für die nach anfänglicher Zunahme abnehmenden Bandenpositionen für die Amid-II-Bande mit zunehmender Inkubationszeit in Wasser. Die ausbleibende Aufspaltung der Bande deutet zudem darauf hin, dass die N-H-Gruppe nicht an interlamellaren HBBs beteiligt ist. Bei Wellenzahlen zwischen 1680–1720 cm^{-1} taucht eine für die SA charakteristische asymmetrische Carbonyl-Streckschwingung ($\nu(\text{CO})$) auf. Mit zunehmender Inkubationszeit in Wasser nimmt die Intensität der Bande bei 1705 cm^{-1} stark ab, während eine neue Bande bei Wellenzahlen um 1722 cm^{-1} entsteht. Es ist bereits bekannt, dass die Wellenzahlen der $\nu(\text{CO})$ für reine SA deutlich niedriger liegen als für die SA in der ternären SC-Mischung (etwa 15 cm^{-1})¹¹⁶. Das Auftreten der beiden $\nu(\text{CO})$ -Bandenpositionen könnte demnach darauf hindeuten, dass die SA vor Inkubation in Wasser separiert vorliegt und sich infolge der Hydratisierung nach einer Kontaktzeit von sechs Stunden zumindest teilweise mit den anderen Komponenten der Mischung in einer Phase vereinigt. Dass in diesem Fall die SA nicht wie erwartet eine orthorhombische sondern eine hexagonale Kettenpackung aufweist, konnte bereits gezeigt werden¹¹⁶ und steht somit nicht im Widerspruch zu der für die vorliegende Mischung identifizierten hexagonalen Kettenpackung. In dem vorliegenden Beispiel verschwindet die Bande um 1705 cm^{-1} fast vollständig zu Gunsten der Bande bei 1720 cm^{-1} , während bei anderen, analog präparierten Modellen beide Banden in ähnlicher Intensität vorliegen. Hier ist die Menge an verbleibender phasenseparierter SA entscheidend, die aufgrund interindividueller Unterschiede nicht für jede Probe identisch sein muss. Zusätzlich nehmen die Wellenzahlen der neu entstandenen Bande bei 1720 cm^{-1} während der Inkubation in Wasser zu, wodurch eine Verringerung der HBBs indiziert wird.

Insgesamt zeigt das Verhalten der Banden bei zunehmender Inkubationszeit Parallelen zu dem in der Literatur für vergleichbare Mischungen beschriebenen Verhalten bei Temperatureinwirkung. Dabei sind die Veränderungen bei langen Inkubationszeiten (starke Hydratisierung) denen bei niedrigeren Temperaturen (etwa Hauttemperatur) am ähnlichsten, während die Charakteristika der nicht hydratisierten Mischung sehr gut mit denen bei hohen Temperaturen (70–80 °C; oberhalb des Phasenüberganges) korrelieren⁹³. Im nicht hydrati-

sierten Zustand sind die Lipide folglich deutlich ungeordneter als im hydratisierten Zustand. Die HBBs werden mit zunehmender Inkubationszeit stärker ausgebildet, was auf eine Anreicherung von Wasser in den Kopfgruppenbereichen hindeutet. Lediglich für SA wird wahrscheinlich aufgrund der Reintegration phasenseparierter SA in die Mischung der anderen Lipidbestandteile eine Verringerung der HBBs erreicht. Zusätzlich kommt es zu einer Erhöhung der Kettenordnung, sowie einer Verdichtung der Kettenpackung. Nach ungefähr zwölf Stunden ist jedoch für keine der auftretenden Banden eine Veränderung der Position mehr zu erkennen. Die Lipidorganisation wird zu diesem Zeitpunkt als stabil angenommen. Um zusätzlich zu den Erkenntnissen über die Änderung der lateralen Kettenanordnung eine Aussage über den Einfluss des Wassers auf die Schichtdicken zu treffen, wurde für die Multilayer am BioRef eine NR-Messung gegen D₂O durchgeführt (ohne simultane Bestimmung des IR-Signals). Die in Abb. 22 dargestellte NR-Kurve einer multilamellaren Probe zeigt im Vergleich zu den gegen trockene Raumfeuchte gemessenen multilamellaren Modellen (Kapitel VI.1.2, S. 35) nur wenige auswertbare *Bragg Peaks*.

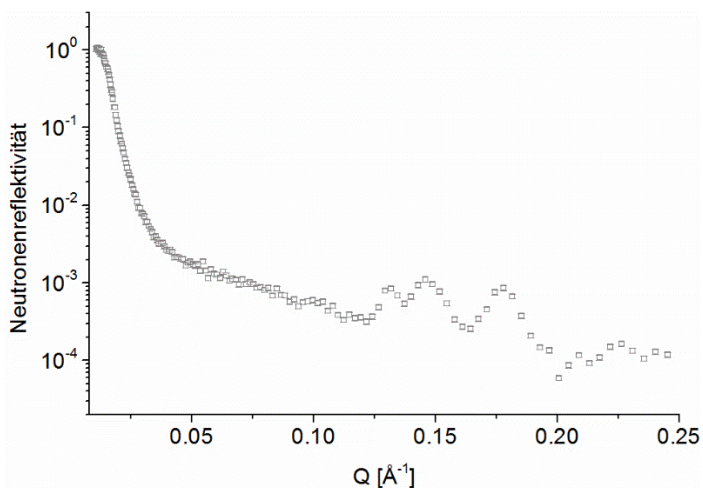


Tabelle 6: Aus Abb. 22 bestimmte Peakpositionen Q und die dazugehörigen Bilayerschichtdicken d mit der jeweils zugeordneten Phase unterschiedlicher Zusammensetzung.

Q [\AA^{-1}]	d [\AA]	Phase
$0,1319 \pm 0,0003$	$47,65 \pm 0,11$	A
$0,1463 \pm 0,0002$	$42,94 \pm 0,06$	B
$0,1775 \pm 0,0003$	$35,39 \pm 0,05$	D

Abb. 22: NR-Kurve eines multilamellaren SC-Lipidmodells (CER[AP]:CHOL:SA) gemessen gegen D₂O.

Dennoch können die Positionen von drei *Bragg Peaks* und die dazugehörigen Wiederholabstände bestimmt werden (Tabelle 6). Diese können den bereits bei XR-Messungen beschriebenen Phasen A, B und D zugeordnet werden. B und D würden dabei phasenseparierte SA bzw. kristallines CHOL darstellen, während Phase A alle Lipidkomponenten der Mischung enthalten würde. Allerdings sind die hier ermittelten Schichtdicken bei einer Messung gegen D₂O im Vergleich zu den Schichtdicken des gleichen Modells, gemessen gegen trockene Raumluft, geringfügig vergrößert. Im Rahmen der Untersuchungen von Zbytovska et al. und Kessner et al. konnte eine solche Zunahme des lamellaren Wiederholabstandes mit zunehmender Umgebungsfeuchte bereits beobachtet werden^{7, 8}. Um die gemessene Schichtdicke der Phase A von $\sim 48 \text{ \AA}$ zu realisieren, müssten sich die Lipide senkrecht zur Membranebene

ohne jegliche Neigung anordnen. In Verbindung mit der durch die IR-Messungen indizierten Erhöhung der Kettenordnung, ist eine mögliche Einschränkung der Neigung der Lipide in der Membranebene mit einer infolge vergrößerten Schichtdicke denkbar. Die Annahme, dass bei Inkubation in Wasser eine Erhöhung der Kettenordnung resultiert, wird auch durch das Fehlen der bei der Messung gegen Luft zusätzlich auftretenden Phase C bei 40 Å untermauert. Für diese Phase wird davon ausgegangen, dass sie alle Komponenten der Lipidmischung enthält und einen hohen Anteil an V-förmig ausgebildetem L-CER[AP] aufweist. Diese V-förmige Konformation könnte sich während der Inkubation in Wasser überwiegend in die Haarnadelkonformation umlagern, wodurch die Phase C, zugunsten der Ausbildung der Phase A verschwinden würde. Darüber hinaus kann für die resultierende 48 Å Phase vermutet werden, dass sich die für die trockenen Systeme beschriebenen großen Anteile an gestreckten CER[AP]-Konformeren entsprechend der von Kiselev et al. postulierten Theorie aufgrund des Überschusses an Wasser mehrheitlich in die Haarnadelkonformation umlagern³². In dieser Konformation wäre die Einlagerung von Wasser im Bereich der Kopfgruppen zwischen angrenzenden Bilayerschichten begünstigt, was die Vergrößerung der Schichtdicke erklären würde.

2.1.2. IR- UND NR-MESSUNGEN AN OLIGOLAYERN

Mit Hilfe des entwickelten oligolamellaren Lipidmodells (Kapitel VI.1, S. 29), ist eine zeitgleiche Erfassung von NR- und IR-Daten der oligolamellaren SC-Lipidmodelle möglich. Dadurch können sowohl die laterale Anordnung und Hydratisierung der Lipide (IR), als auch deren Dichteverteilung senkrecht zur Oberfläche (NR) abgebildet werden¹²⁰. Für IR-Messungen an Oligolayern sind im Vergleich zu den bereits dargestellten IR-Messungen an Multilayern (Kapitel VI.2.1.1, S. 43) deutlich weniger Banden detektierbar (Abb. 23). Aufgrund der geringeren Probendicke sind die Banden zudem nicht so scharf und ihre Position deshalb weniger genau bestimmbar. Dennoch können anhand der in der Regel beobachtbaren drei charakteristischen Banden Aussagen über den Kopfgruppeneinfluss ($\nu(\text{CO})$ der SA) und mögliche Änderungen der Konformation der Lipidketten ($\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ und $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$) getätigt werden. Dabei sind die Positionen der $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ und $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ mit $2917,7 \pm 0,2 \text{ cm}^{-1}$ und $2849,9 \pm 0,2 \text{ cm}^{-1}$ im Gegensatz zu den Untersuchungen an Multilayern zu größeren Wellenzahlen verschoben. Die Lipide sind demnach im oligolamellaren Modell, wahrscheinlich durch die bei den unterschiedlichen Präparationsmethoden resultierenden Lipidanordnungen bedingt, geringfügig schlechter konformativ geordnet (mehr *gauche*-Konformere). Nichtsdestotrotz deuten die relativ großen Wellenzahlen insgesamt auf hochgeordnete Lipidketten mit nur geringen Anteilen an konformativer Unordnung hin¹¹⁸. Die Position der Bande für die $\nu(\text{CO})$ der SA kann, durch das bei niedrigeren Wellenzahlen sehr verrauschte Signal, nur ungefähr auf einen Wert von etwa 1717 cm^{-1} bestimmt werden. Generell indiziert

diese relativ hohe Wellenzahl eine deutliche Ausbildung von HBBs. Im Vergleich zu den bei Multilayern auftretenden HBBs sind diese jedoch verringert. Grund für die weniger starken Wechselwirkungen der Kopfgruppen ist möglicherweise die weniger geordnete Lipidstruktur des oligolamellaren Modells.

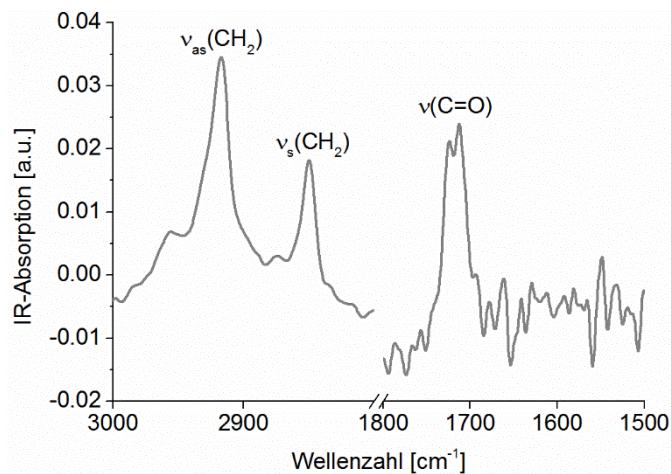


Abb. 23: IR-Spektrum eines oligolamellaren SC-Lipidmodells (CER[AP]:CHOL:SA) gegen D_2O , nach 40-minütiger Inkubation in D_2O .

Insgesamt sind als Folge des bei der dünnen Schicht sehr schwachen Signals die Banden weniger ausgeprägt und die Positionsbestimmung weniger genau. Die Peakpositionen der IR-Messungen des oligolamellaren Lipidmodells in Wasser schwanken über den gemessenen Zeitraum von 40 Minuten sehr stark, weshalb kaum signifikante Veränderungen festgestellt werden können (Daten nicht gezeigt). Dabei ist für die Position der $\nu_{as}(CH_2)$ mit zunehmender Inkubationszeit in D_2O ein Trend zu niedrigeren Wellenzahlen zu erkennen, der jedoch nach ungefähr 30 Minuten verschwindet. Die Positionen der anderen beiden Banden bei $\sim 2850\text{ cm}^{-1}$ und $\sim 1717\text{ cm}^{-1}$ verändern sich über den gesamten Zeitraum nicht. Es finden demnach lediglich zu Beginn der Messung (innerhalb der ersten 30 Minuten) geringfügige strukturelle Veränderungen statt. Diese erfolgen aufgrund der Hydratisierung der Lipidschichten beim Wechsel von Luft zu Wasser als Umgebungsmedium und können analog zu den multilamellaren Schichten mit einer geringfügigen Erhöhung der Lipidordnung in Verbindung gebracht werden. Dass diese Zeit nicht wie bei den Multilayern mehrere Stunden ($\sim 12\text{ h}$) beträgt, hängt höchstwahrscheinlich mit der sehr viel geringeren Schichtdicke der Oligolayer (5–6 Bilayer) im Vergleich zu den Multilayern (>100 Bilayer) zusammen. Da die Justage für die simultane NR-Messung mindestens 30 Minuten in Anspruch nimmt, ist eine zusätzliche Equilibrierungszeit in diesem Fall nicht notwendig. In Anlehnung an die Ergebnisse aus den IR-Daten kann davon ausgegangen werden, dass sich im Anschluss an die Justage keine signifikanten Veränderungen mehr ergeben.

In Abb. 24 (graue Quadrate) ist die aufgenommene NR-Kurve eines oligolamellaren Lipidmodells (gemessen gegen D₂O) dargestellt. Um die experimentell ermittelten Daten zu fiten, wurde ein Modell, bestehend aus 13 Schichten, gewählt (Datenauswertung der NR-Messungen an oligolamellaren Lipidmodellen, Kapitel V.1.2.1, S. 21). Fits auf Grundlage von Modellen, in denen die Parameter eines jeden Bilayers identisch sind und abhängig voneinander gefittet werden, erbrachten keine ausreichende Übereinstimmung mit dem experimentell ermittelten Kurvenverlauf. Durch das unabhängige Fitten der verschiedenen Parameter in den einzelnen Schichten konnte dagegen ein Kurvenverlauf beschrieben werden, der die experimentellen Daten sehr gut widerspiegelt (Abb. 24 graue Linie). Die entsprechenden Fitparameter sind in Tabelle 8 zusammengefasst und das resultierende SLD-Profil als Einschub in Abb. 24 dargestellt.

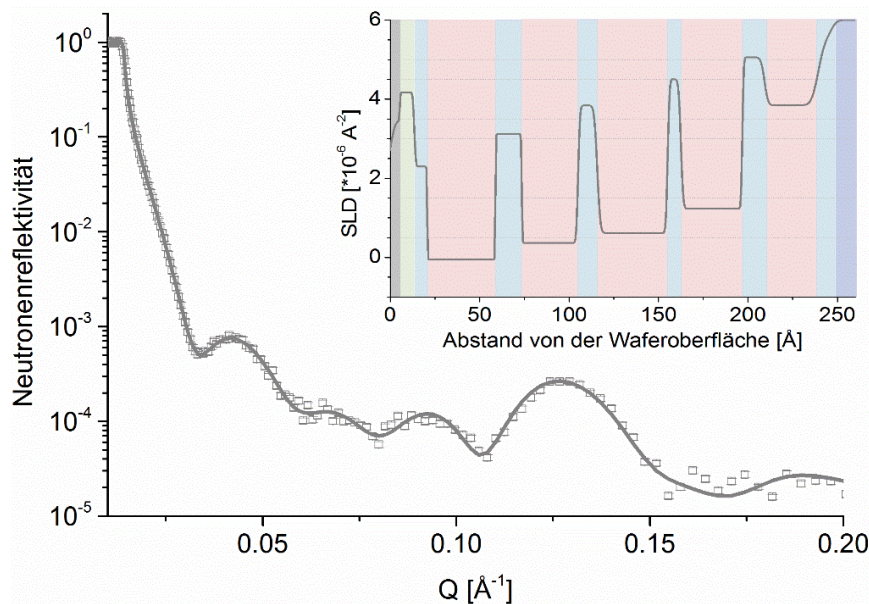


Tabelle 7: In Origin bestimmte Peakpositionen des oligolamellaren Lipidmodells und die daraus ermittelte Gesamtschichtdicke t

Peakpositionen [\AA^{-1}]
$0,0469 \pm 0,0002$
$0,0734 \pm 0,0013$
$0,0970 \pm 0,0005$
$0,1315 \pm 0,0002$
t [\AA]
$250,1 \pm 2,8$

Abb. 24: NR-Kurve (graue Quadrate) eines oligolamellaren SC-Lipidmodells (CER[AP]:CHOL:SA), gemessen gegen D₂O. Der Fit für die NR-Kurve ist als graue Linie und das dazugehörige SLD-Profil oben rechts dargestellt.

Dabei fällt auf, dass die durch den Fit beschriebenen Bilayerschichtdicken von 43,5 bis 52,8 Å sehr stark zwischen den einzelnen Bilayern schwanken (MW = 46,64 Å; SD = 3,91 Å). Ein Angleichen der Wiederholabstände bewirkte allerdings eine Verschlechterung des Fits. Aufgrund der ternären Mischung kann es vorkommen, dass, trotz des Ausbleibens einer größeren Phasenseparierung, Bereiche mit einem hohen Anteil einer der drei Lipidkomponenten, wie sie beispielsweise bereits für CHOL beschrieben sind^{7, 121}, auftreten. Diese können zu interindividuellen Unterschieden innerhalb der Bilayerschichtdicken führen. Zusätzlich wäre auch ein Prozess, ähnlich der von Kessner et al. beobachteten Phasenseparierung bei hohen Luftfeuchten denkbar⁸. Die dort an einer Mischung von L-CER[AP], CHOL, PA und CS, gemessen gegen 98 % relative Luftfeuchte, ermittelten lamellaren Wie-

derholabständen von 46,6 Å und 50,0 Å korrelieren in etwa mit denen des vorliegenden Modells, da drei der fünf Bilayer eine Schichtdicke von etwa 44 Å, und die anderen zwei einen Wiederholabstand von etwa 50 Å aufweisen. Vergleichbare Schichtdicken konnten auch bei SAXD/WAXD-Messungen an Multilayern, mit identischer Zusammensetzung wie die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modelle, beobachtet werden¹²². Aufgrund der geringen Anzahl an Peaks und der fehlenden Kontrastmessungen lässt sich die Theorie der Phasenseparierung jedoch nicht zweifelsfrei belegen.

Tabelle 8: Fitparameter der NR-Kurve der oligolamellaren Lipidmischung gegen D₂O aus Abb. 24 mit dem entsprechenden Fehler, sowie die Bilayerschichtdicke *d* und die Gesamtschichtdicke *t*.

	Dicke [Å]	<i>d</i> [Å]	SLD *10 ⁻⁶ [Å ⁻²]	Medium [%]	Rauigkeit [Å]
Si	--		--	2,07	--
SiO	5,3		3,47	0	2,13
PEI	8,1		0,59	66,3	0,28
Kopfgruppe	7,2		1,37	20,0	0,66
Ketten	38,2	52,80	-0,25	3,2	0,23
Kopfgruppen	14,8		1,37	37,8	0,22
Ketten	31,5	44,25	-0,25	9,9	0,26
Kopfgruppen	10,7		1,37	53,4	0,81
Ketten	39,4	48,45	-0,25	13,9	1,34
Kopfgruppen	7,4		1,37	67,8	0,80
Ketten	34,4	44,30	-0,25	23,7	1,02
Kopfgruppen	12,4		1,37	79,6	0,58
Ketten	30,0	43,50	-0,25	65,5	1,56
Kopfgruppe	7,3		1,37	89,7	2,92
Medium	--		6,00		2,56
t = 246,59		Ø = 46,64 ± 3,91			
Chi ²	2,3*10 ⁻³				

Nichtsdestotrotz ist für die nachfolgenden Untersuchungen weniger die absolute Schichtdicke, als vielmehr die Veränderung der Schichtdicke, relativ gesehen zur Schichtdicke vor Enhancerzugabe und die Veränderung der Mengen des Mediums innerhalb der einzelnen Schichten von Bedeutung. Diese Aspekte können mit dem gewählten Fitmodell sehr gut beschrieben werden. Beispielsweise können in dem SLD-Profil aus Abb. 24 der sich mit zunehmendem Abstand vom Wafer verändernde Bedeckungsgrad der Lipide und der zunehmende Anteil an Medium abgebildet werden. Hier lässt sich, aufliegend auf eine SiO₂- (grau) und PEI-Schicht (grün), ein fünfschichtiger Probenaufbau erkennen (abwechselnd Kopfgruppen (hellblau) und Ketten (rot)). Um die Veränderungen der SLDs im SLD-Profil besser bewerten zu können, sind in Tabelle 8 für jede Schicht die aus der Lipidzusammensetzung resultierenden SLDs und zusätzlich der Mediumanteil für jede Schicht dargestellt. Dieser Mediumanteil ergibt sich aus der Summe der SLDs aller Komponenten einer Schicht unter

Berücksichtigung der vorgegebenen SLDs für die jeweilige Lipidschicht. Er ist somit abhängig von dem Verhältnis von Lipiden und Medium. Ein hoher Anteil an Medium kann demnach einerseits eine starke Anreicherung des Mediums oder andererseits ein Ablösen von Lipiden indizieren. Darüber hinaus können beispielsweise Verringerungen des Mediumanteils auch durch eine Anreicherung einer Komponente mit einer niedrigeren SLD als das Medium hervorgerufen werden. Für das in Abb. 24 dargestellte SLD-Profil nimmt der Bedeckungsgrad mit zunehmender Entfernung von der Waferoberfläche ab, erkennbar an den tendenziell größer werdenden SLDs als Folge eines vermehrten D₂O-Anteils an der Gesamtfläche. Innerhalb der Kopfgruppen kommt es zur Anreicherung von D₂O, was zu einer starken Vergrößerung der eigentlichen SLD von ungefähr $1,37 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ in diesen Bereichen führt (hellblau hinterlegt). Letztendlich wird bei einem Abstand von 246,6 Å von der Waferoberfläche die SLD des umgebenden Mediums erreicht (dunkelblau hinterlegt). Theoretisch würde diese für D₂O einen Wert von $6,36 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ annehmen. Bei der vorliegenden Messung ist der SLD-Wert geringfügig kleiner, was durch die in Kapitel V.1.2.1 (S. 21) bereits beschriebene Problematik des Isotopenaustausches von D durch H begründet werden kann. Die Rauigkeiten der Schichten werden mit zunehmendem Abstand von der Waferoberfläche größer und indizieren damit eine weniger klar definierte Struktur, je näher sich die Lipidschicht an der Grenzfläche zum D₂O befindet. Dies hängt unter anderem mit dem abnehmenden Bedeckungsgrad zusammen, bei dem die Einheitlichkeit der Schicht mit zunehmender Nähe zum umgebenden Medium verschwindet.

Zusätzlich zu der Analyse mittels optischer Matrixmethode können zu Vergleichszwecken Berechnungen mit Hilfe der Peakanalyse (Kapitel V.1.1.1, S. 18) durchgeführt werden. Für die in Abb. 24 dargestellte NR-Messung können drei *Kiessig*-Oszillationen und ein *Bragg Peak* mit den entsprechenden Maxima (Tabelle 7) ermittelt werden. Aus den Positionen der Maxima der *Kiessig*-Oszillationen lässt sich eine Gesamtschichtdicke von $250,1 \pm 2,8 \text{ \AA}$ berechnen. Diese stimmt in etwa mit der in Motofit ermittelten Gesamtschichtdicke von 246,6 Å überein. Eine Bestimmung der Bilayerschichtdicke gemäß Peakanalyse ist, wie bereits erläutert (vgl. Kapitel V.1.1.1, S. 18), bei einem oligolamellaren Lipidmodell mit nur einem *Bragg Peak* nicht zuverlässig und wird deshalb nicht durchgeführt.

Vergleicht man die ermittelte Probenstruktur des SC-Lipidmodells in wässrigem Medium (NR) mit der beschriebenen Probenstruktur oligolamellarer Proben der gleichen Zusammensetzung, gemessen gegen Luft (XR) (Kapitel VI.1.1.3, S. 33), ergeben sich bezüglich der Bilayerschichtdicken einige Unterschiede. Während bei den XR-Messungen der Oligolayer die Bilayerschichtdicke mittels Peakanalyse bestimmt werden konnte und somit ein Mittelwert der auftretenden Schichten gebildet wurde, kann durch das bei NR-Messungen erhaltene SLD-Profil jede Schicht einzeln betrachtet werden. Dadurch werden interindividuelle

Unterschiede der einzelnen Schichten sichtbar, die beispielsweise durch Clusterbildung einzelner Komponenten entstanden sein können. Geht man davon aus, dass bei dem oligo-lamellaren Modell in Wasser eine einheitliche Phase mit interindividuellen Unterschieden ohne größere Phasenseparation vorliegt, erhält man eine durchschnittliche Schichtdicke von 47 Å (Tabelle 8). Im Vergleich zu den XR-Messungen bedeutet das eine Vergrößerung um 4 Å. Dieser Zusammenhang lässt sich durch die erhöhte Feuchtigkeit der Probenumgebung während der NR-Messung (wässriges Medium) im Vergleich zur XR-Messung (trockene Raumfeuchtigkeit), analog zu den Ausführungen bei Multilayern (Kapitel VI.2.1.1, S. 43) erklären.

2.1.3. NR-MESSUNGEN AN FESTKÖRPERGESTÜTZTEN EINZELNEN BILAYERN

Die NR-Messungen des durch Langmuir Blodgett/ Langmuir Schaefer (LB/LS) präparierten SC-Lipidmodells gegen die verschiedenen Kontraste sind in Abb. 25a dargestellt. Anstelle des präparierten einzelnen Bilayers, kann durch die Anwesenheit eines Peaks bei $\sim 0,113 \text{ \AA}^{-1}$ und den anschließenden starken Abfall der NR-Kurve eine Anordnung von mindestens zwei Bilayern vermutet werden. Unter Berücksichtigung dieser Informationen konnte im Zuge der Datenauswertung (Kapitel V.1.3.1, S. 23) ein Dichteverteilungsprofil für die verschiedenen Komponenten in der Mischung ermittelt werden (Abb. 25b).

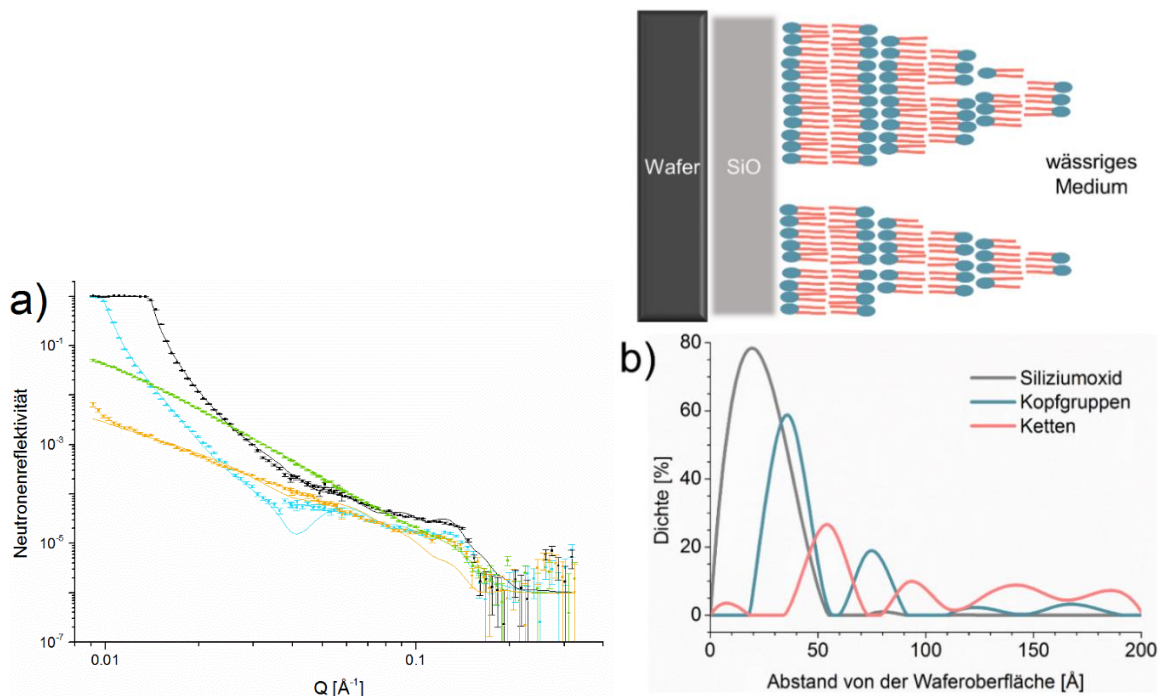


Abb. 25a) NR-Kurven der nach LB/LS präparierten SC-Lipidbilayer (CER[AP]:CHOL:SA) gemessen gegen: D_2O (schwarze Quadrate), H_2O (grüne Quadrate), 4MW (hellblaue Quadrate) und SMW (orange Quadrate). Die dazugehörigen Fits sind als Linien der jeweiligen Farbe dargestellt. **b) Dichteprofil** als Bedeckung der Waferoberfläche (Dichte) der SiO_2 -Schicht, der Lipidkopfgruppen und -ketten in Abhängigkeit vom Abstand von der Waferoberfläche mit einer mögl. Modellvorstellung.

Für die Kopfgruppen (blau) und Ketten (rot) der Lipide ergibt sich eine abwechselnde Reihenfolge mit insgesamt drei gut definierten Bilayern und einer eher diffusen Schicht an der Grenzfläche zum wässrigen Medium. Dabei nimmt, wie im oligolamellaren Modell (Kapitel VI.2.1.2, S. 48), der Bedeckungsgrad mit zunehmendem Abstand von der Waferoberfläche stark ab. Obwohl durch die Präparationsmethode des LB/LS die Entstehung eines einzelnen Bilayers erzwungen wird, ist die Umorientierung der Lipide durch den erhöhten Platzbedarf der Moleküle in der ungeordneteren Membran im Vergleich zu den stark komprimierten Monolayern, aus denen der Bilayer aufgebaut wurde, begünstigt. Zudem ist dieser Zustand den Lipiden im nativen SC weitaus ähnlicher als ein einzelner Bilayer und scheint energetisch bevorzugt zu sein. Dabei könnte unter anderem eine gestreckte Konformation des CER[AP], welche die lamellare Lipidstruktur stabilisiert, vorliegen. Dennoch ist es wahrscheinlich, dass der größte Teil der CER[AP] Moleküle in einer Haarnadelkonformation vorliegt, um unter dem Einfluss des Wasserüberschusses die Einlagerung von Wasser zwischen den Kopfgruppen benachbarter Bilayer zu ermöglichen. Weiterhin wird durch die Bildung von mehreren lamellaren Schichten die Grenzfläche zwischen den sehr lipophilen SC-Lipiden und dem wässrigen Medium minimiert. Dem Abstand der Kopfgruppen zufolge liegt die Gesamtschichtdicke bei 182,4 Å und die Dicke eines Bilayers bei $43,98 \pm 4,83$ Å. Wie auch bei dem in Motofit ermittelten Profil für das oligolamellare Modell, treten dabei starke Schwankungen zwischen den einzelnen Bilayern auf. Die generelle Anordnung der Lipide und deren Organisation mit zunehmendem Abstand von der Waferoberfläche lassen sich mit Hilfe dieses Modells jedoch sehr gut beschreiben.

2.1.4. LEAKAGE- UND PCS-MESSUNGEN AN ULVS

PCS-Messungen an ULVs in wässriger Lösung (pH-Wert = 10) wurden hauptsächlich zur Untersuchung der Stabilität durchgeführt, um die Eignung des Modells für nachfolgende Enhanceruntersuchungen zu testen. Hier kann ermittelt werden, wie sich die Größe bzw. der hydrodynamische Durchmesser (z-average) und die Verteilung (PDI) der Liposomen im Laufe der Zeit verändern. Der Einfluss von Wasser als Enhancer kann in diesem Zusammenhang jedoch nicht bewertet werden, da das Modell an sich bereits Wasser enthält und eine Referenzmessung somit nicht möglich ist. Der Vergleich erfolgt an dieser Stelle relativ mit anderen hydrophilen Enhancern. Generell ist für die Ausbildung stabiler Liposomen die Anwesenheit einer geladenen Lipidspezies notwendig¹²³. Da SA unter den gewählten Bedingungen zu einem großen Teil deprotoniert vorliegt, sollte hier eine gewisse Stabilität gewährleistet sein. Dies lässt sich anhand der Ergebnisse in Abb. 26a) bestätigen. Nachdem zur Extrusion eine Membran der Porengröße 100 nm verwendet wurde, sind die zu Beginn der Stabilitätsuntersuchung erhaltenen Liposomendurchmesser von etwa 130 nm geringfügig größer als die gewählte Porengröße. Das ist für diese Art der Probenpräparation

typisch, da die Liposomen durch den Druck bei der Passage der Poren verformt werden und anschließend aus der länglicheren eine runde Form entsteht. Über einen Zeitraum von 25 Tagen nehmen sowohl die PDI-Werte (Abb. 26b) als auch die Liposomendurchmesser (Abb. 26a) tendenziell zu. Grund dafür könnte ein zeitabhängiges Zusammenfließen der Liposomen sein, wodurch die Liposomen größer und deren Größenverteilung breiter werden. Die PDI-Werte liegen außerdem in dem gesamten Zeitraum unterhalb des kritischen Wertes von 0,3, sodass von einer monomodalen Verteilung ausgegangen werden kann. Der Liposomendurchmesser befindet sich innerhalb der ersten zehn Tage zwischen 130 und 140 nm. In diesem Zeitraum liegt demnach eine vergleichbare Liposomengröße vor. Nach etwa zehn Tagen ist schließlich ein sprunghafter Anstieg des z-average zu beobachten. Folglich kann angenommen werden, dass die Liposomen, zumindest was ihre Größe betrifft, über einen Zeitraum von zehn Tagen unter Lagerung bei 8 °C stabil sind. Diese Messungen lassen jedoch keine Aussage über die Membranbeschaffenheit zu.

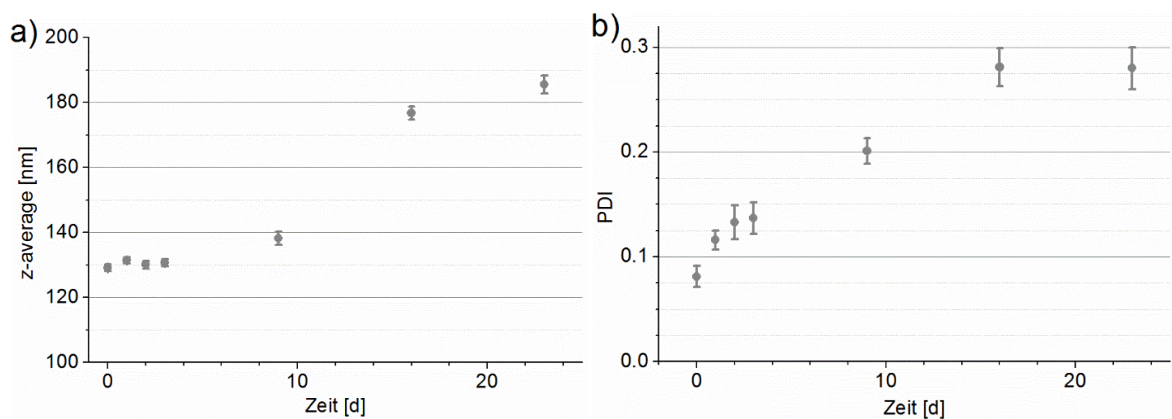


Abb. 26: Mittelwerte der Liposomendurchmesser (*z-Average*) (a) und des *PDI* (b) von SC-ULVs (CER[AP]:CHOL:SA) in Puffer (pH-Wert = 10), in Abhängigkeit von der Lagerungszeit.

Dazu werden *Leakage*-Messungen durchgeführt, die eine Bewertung der Durchlässigkeit der Lipidmembran ermöglichen. Wie in Abb. 27 dargestellt, sind die Liposomen bei Temperaturen von 32 °C, selbst über einen längeren Untersuchungszeitraum von 50 Minuten (*Leakage* unter 1,5 %) sehr stabil. Mit zunehmender Zeit von zehn über 30 bis 50 Minuten kann zwar ein geringer Anstieg des *Leakage* beobachtet werden, dieser ist allerdings nicht signifikant. Die pH-Wert abhängigen Untersuchungen zeigen, dass bei 32 °C der *Leakage* der Liposomen in Puffer (pH-Wert = 7) geringfügig größer ist als der *Leakage* der Liposomen in Puffer (pH-Wert = 10) (Tabelle 9). Dies kann durch den geringeren pH-Wert und den damit verbundenen geringeren Deprotonierungsgrad der SA bedingt sein. In der Folge stoßen sich einzelne ULVs, die sich einander annähern, nicht mehr stark genug ab und verursachen ein Zusammenfließen bzw. eine Lyse¹²⁴, wobei es zum Auslaufen der Liposomen kommt. Mit einem *Leakage* von unter 2,5 % betrifft dies jedoch nur einen sehr geringen Anteil der Liposomen, weshalb auch bei einem pH-Wert = 7 die Liposomen insgesamt als

sehr stabil angesehen werden können. Unter den gewählten Bedingungen ist der *Leakage* also relativ unabhängig vom pH-Wert des Puffers. Gestützt wird diese Aussage durch die von Zbytovska et al. durchgeführten pH-abhängigen Untersuchungen vergleichbarer SC-Lipidmodellmischungen, bei denen kein Einfluss des pH-Wertes auf die Schichtdicken innerhalb der Liposomen ermittelt werden konnte. Im Gegensatz zu dieser Beobachtung stehen Untersuchungen von Hatfield et al., bei denen bei pH-Werten = 6 eine deutliche Steigerung des *Leakage* im Vergleich zu Liposomen bei einem pH-Wert = 9 beobachtet wurde¹²⁴. Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass als CER-Komponente anstatt des hier eingesetzten CER[AP], die Ceramide CER[NP] und CER[EOH] verwendet wurden. Beide CER-Spezies weisen im Gegensatz zu den vier OH-Gruppen des CER[AP] nur drei OH-Gruppen auf. Infolge könnte eine geringere Stabilität der Liposomen durch eine verminderte Anzahl an HBBs innerhalb der Kopfgruppenbereiche resultieren. Weiterhin wurden bei den Untersuchungen von Hatfield et al. Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die in ihrer räumlichen Ausdehnung kleiner sind, als das in dieser Arbeit verwendete 6-CF, weshalb die Ergebnisse nicht unmittelbar miteinander verglichen werden können¹²⁴.

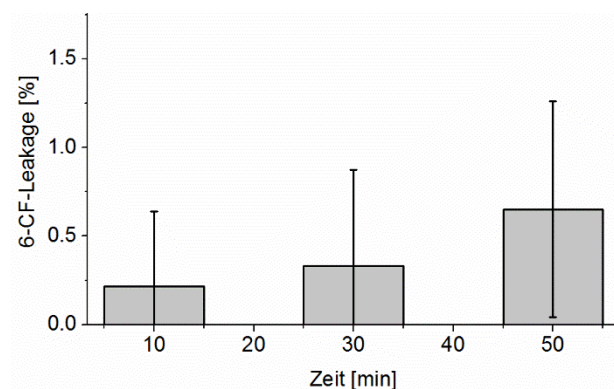


Abb. 27: 6-CF-Leakage von SC-ULVs (CER[AP]:CHOL:SA) in Pufferlösung (pH-Wert = 10), gemessen in Abhängigkeit von der Zeit.

Tabelle 9: Leakage der ULVs [%], bestehend aus CER[AP]:CHOL:SA in Pufferlösungen mit verschiedenen pH-Werten: pH-Wert = 7 und pH-Wert = 10 nach zehn, 30 und 50 Minuten.

	pH = 10	pH = 7
10 min	0,2 ± 0,4	1,4 ± 0,8
30 min	2,7 ± 0,7	--
50 min	5,3 ± 1,7	--

2.1.5. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe der verwendeten Methoden können sowohl die Lipidstruktur, als auch verschiedene Eigenschaften der Modelle, in Bezug auf den Einfluss von Wasser als Enhancer, ermittelt werden. Die in der Literatur beschriebene wasserinduzierte Porenbildung konnte allerdings im Rahmen der *Leakage*-Messungen nicht beobachtet werden. Stattdessen liegt insgesamt eine hoch geordnete und stabile Struktur der untersuchten SC-Lipidmodelle bei Anwesenheit von Wasser vor. Der hier vordergründlich zu beobachtende Effekt des Wassers beruht vor allem auf einer durch die Hydratisierung bedingten Vergrößerung der Schichtdicken. Diese steht wahrscheinlich mit der deutlichen Anreicherung von wässrigem Medium

in den Kopfgruppenbereichen der Bilayer, die auch anhand der Ergebnisse der IR-Untersuchungen an Multilayern vermutet werden kann, im Zusammenhang. Als Mechanismus kann hier gemäß den Ausführungen von Kiselev et al. eine bei Überschuss an Wasser resultierende Umlagerung der gestreckten CER[AP]-Konformation in die Haarnadelkonformation angenommen werden^{6, 32}. Zeitgleich verschwindet nach Zugabe von wässrigem Medium die alle Lipidkomponenten enthaltene Phase C mit überwiegend V-förmig angeordnetem CER[AP], was ebenfalls auf die verstärkte Ausbildung der Haarnadelkonformation hindeutet. Dass trotz der beschriebenen Umlagerungen allerdings eine sehr starke Verbindung der angrenzenden Bilayer existiert, zeigen die NR-Messungen an einzelnen Bilayern. Da sich aus den einzelnen Bilayern schnell mehrlagige Strukturen bilden, wird angenommen, dass diese Anordnung energetisch begünstigt ist. Nichtsdestotrotz ist es wahrscheinlich, dass ein Teil des CER[AP] in gestreckter Konformation vorliegt, um so als Anker zwischen angrenzenden Bilayerschichten zu fungieren und die Integrität der Membran aufrecht zu erhalten. Gerade im Hinblick auf das native SC scheint dies eine wichtige Komponente zu sein, um die Robustheit gegenüber äußeren Einflüssen zu realisieren. Diese Ergebnisse sind allerdings nur eingeschränkt auf das native SC übertragbar, da der Wassergehalt in dem für die Untersuchungen verwendeten Ausgangsmodell nicht bestimmt wurde und zudem wahrscheinlich deutlich geringer als im nativen SC ist. Die hier beobachteten Effekte könnten demnach wohlmöglich deutlich stärker ausgeprägt sein, als sie im nativen SC zu beobachten wären. Nichtsdestotrotz stehen diese Erkenntnisse im Einklang mit Untersuchungen an exzidiertem SC, bei denen eine Vergrößerung des lamellaren Wiederholabstandes bei vollständig hydratisiertem SC beobachtet werden konnte^{125, 126}. Dass bei Untersuchungen von Bouwstra et al. nach Zugabe von Wasser zu exzidiertem humanem SC keine Veränderung des Wiederholabstandes der Lipidmatrix beobachtet werden konnte¹²⁷, ist möglicherweise auf das höhere Ausgangshydratationsniveau der Probe zurückzuführen. Eine durch Wasser hervorgerufene Fluidisierung der Lipide, wie sie für NMR Messungen beschrieben ist^{128, 129}, kann im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht erfasst werden. Vielmehr indizieren IR-Messungen an Multilayern eine Erhöhung der Kettenordnung. Diese Beobachtung ist jedoch auf die geringe Anfangsordnung des verwendeten multilamellaren Lipidmodells zurückzuführen. Insgesamt ist für das native SC je nach Hydratationslevel eine durch die Anwesenheit von Wasser hervorgerufene Aufweitung der Kopfgruppen zu vermuten. Eine gleichzeitige Erhöhung der Mobilität der Lipide kann hier zwar mit dem verwendeten Modell nicht nachgewiesen werden, ist jedoch aufgrund zahlreicher in der Literatur beschriebener Untersuchungen anzunehmen.

2.2. HARNSTOFF

Harnstoff wurde bereits umfangreich in Bezug auf seine Wirkung im SC untersucht. Es gibt zahlreiche Studien, die den penetrationsfördernden Effekt für verschiedene Arzneistoffe zur Behandlung von Hauterkrankungen wie Psoriasis und Neurodermitis belegen, zusammengefasst in Trommer et al.³. In diesem Zusammenhang werden auch verschiedene Interaktionsmechanismen postuliert. Die penetrationsfördernden Eigenschaften des Harnstoffs werden vor allem auf das hohe Wasserbindungsvermögen, die keratolytischen Eigenschaften, sowie auf die Ausbildung von hydrophilen Diffusionskanälen zurückgeführt¹¹⁰. Die Fähigkeit des Harnstoffs, große Mengen Wasser zu binden, wurde bereits in zahlreichen Studien belegt^{130, 131}. Albèr et al. konnten mit Hilfe konfokaler Ramanmikrospektroskopie an SC vom Schwein eine erhöhte Wasseraufnahme und eine Vergrößerung der linsenförmigen Wassereinschlüsse feststellen¹¹². Darüber hinaus entdeckten Beastall et al. einen fluidisierenden Einfluss des Harnstoffs auf die SC-Lipide, basierend auf *in vivo* Experimenten¹³². Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse aus Röntgendiffraktionsstudien an exzidierte Schweinehaut, die keine zusätzliche Beeinflussung der lamellaren Lipidstruktur durch Harnstoff im Vergleich zur Pufferlösung zeigten¹³³. Um diese kontroverse Diskussion weiter voranzubringen und herauszufinden, ob Harnstoff die SC-Lipidmatrix direkt oder auch indirekt beeinflusst, sind Untersuchungen an isolierten Lipiden auf molekularer Ebene vorteilhaft. Es gibt bereits einige Studien mit Phospholipiden, deren Überstruktur durch die Zugabe von Harnstoff fluider wurde^{134, 135}. Dennoch können diese Ergebnisse nicht ohne Weiteres auf SC-Lipide übertragen werden, da wesentliche Unterschiede in den physikochemischen Eigenschaften von Phospholipiden und CER bestehen, zusammengefasst in Goñi und Alonso⁷⁴. Zbytovská et al. untersuchten den Einfluss von Harnstoff auf Liposomen, bestehend aus einfachen SC-Lipidmischungen⁶⁰. Bei 32 °C und Harnstoffkonzentrationen bis 30 % konnte keine Veränderung der Dicke der Wasserschicht zwischen zwei Bilayern festgestellt werden. Allerdings gab es Anzeichen dafür, dass Harnstoff eine weniger geordnete Lipidorganisation verursacht, was im Einklang mit vorangehenden Ergebnissen bezüglich dieser Fragestellung steht¹³². Insgesamt existieren für Harnstoff bereits kontroverse Diskussionen bezüglich dessen genauen Wirkmechanismus im Rahmen seiner penetrationsfördernden Eigenschaft im SC. In diesem Kapitel soll deshalb eingehend untersucht werden, ob diese Eigenschaft auf eine Auflockerung der SC-Lipidmatrix zurückzuführen ist.

2.2.1. MULTILAYER

IR-Messungen der SC-Lipidmultilayer gegen Wasser, sowie nach der Equilibrierung in Harnstofflösung ergaben für die Probe 1 die in Abb. 28 dargestellten Spektren. Die dazugehörigen Wellenzahlen der Bandenpositionen dieser Probe, sowie die zweier weiterer analog

präparierter und vermessener Proben sind in Tabelle 10 dargestellt. Dabei kann für die weniger stark wasserstoffbrückengebundene Spezies der Amid-I-Bande bei $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ eine deutliche Abnahme der Wellenzahlen beobachtet werden, die mit zunehmender Harnstoffkonzentration umso stärker ausgeprägt ist. Die Positionen der stärker wasserstoffbrückengebundenen Spezies der Amid-I-Bande bei $\sim 1620\text{ cm}^{-1}$ bleibt dagegen unbeeinflusst. Harnstoff führt demnach zu einer verstärkten Ausbildung von HBBs im Bereich der weniger stark wasserstoffbrückengebundenen Spezies. Ob die zusätzlichen HBBs mit Harnstoff selbst, oder mit Wasser infolge einer verstärkten Einlagerung des selbigen ausgebildet werden, lässt sich aufgrund des gewählten experimentellen Aufbaus nicht bewerten. Die Position der Amid-II-Bande verändert sich während der Zugabe von Harnstoff bei keiner der drei untersuchten Proben. Eine Änderung der zur N-H-Gruppe des CER[AP] ausgebildeten HBBs kann demnach nicht beobachtet werden. Der für die Beteiligung der SA an der Ausbildung eines Wasserstoffbrückennetzwerkes charakteristische Bereich um $1700\text{ bis }1720\text{ cm}^{-1}$ liefert in diesem Fall keine einheitlichen Ergebnisse für die untersuchten Proben. Ein durch den Harnstoff bedingter Einfluss auf die HBBs der SA kann demnach nicht vermutet werden. Eine Veränderung der Lipidkettenstruktur ist durch Anwendung des Harnstoffs ebenfalls nicht zu erkennen, da keine Verschiebung der Bandenpositionen der $\nu(\text{CH}_2)$ bei Zugabe von Harnstoff erfolgt. Darüber hinaus verändert sich auch die Bande bei $\sim 1466\text{ cm}^{-1}$ nach Zugabe von Harnstoff nicht und beschreibt damit nach wie vor eine hexagonale Kettenpackung.

Tabelle 10: Charakteristische IR-Bandenpositionen [cm^{-1}] eines multilamellaren SC-Lipidmodells (CER[AP]:CHOL: SA) gemessen gegen Wasser und anschließend gegen 10 % bzw. 30 % Harnstoff. Die Positionen von schwach ausgeprägten Banden können dabei nicht zuverlässig ermittelt werden (n.b.).

Bande	Probe 1			Probe 2			Probe 3		
	H ₂ O-Referenz	Harnstoff 10 %	Harnstoff 30 %	H ₂ O-Referenz	Harnstoff 10 %	Harnstoff 30 %	H ₂ O-Referenz	Harnstoff 10 %	Harnstoff 30 %
$\nu_{as}(\text{CH}_2)$	2915,4 $\pm 0,1$	2915,4 $\pm 0,1$	2915,4 $\pm 0,1$	2915,5 $\pm 0,1$	2915,6 $\pm 0,1$	2915,6 $\pm 0,1$	2914,6 $\pm 0,1$	2914,6 $\pm 0,1$	2914,6 $\pm 0,1$
$\nu_s(\text{CH}_2)$	2848,7 $\pm 0,1$	2848,7 $\pm 0,1$	2848,7 $\pm 0,1$	2849,0 $\pm 0,1$	2849,0 $\pm 0,1$	2848,9 $\pm 0,1$	2848,2 $\pm 0,1$	2848,1 $\pm 0,1$	2848,1 $\pm 0,1$
$\nu(\text{CO})$	1721,6 $\pm 0,2$	n.b.	1715,7 $\pm 0,1$	1722,5 $\pm 0,1$	1722,6 $\pm 0,1$	1722,9 $\pm 0,1$	1718,2 $\pm 0,2$	1718,1 $\pm 0,1$	1716,8 $\pm 0,1$
	n.b.	n.b.	n.b.	--	--	--	1698,0 $\pm 0,1$	1697,0 $\pm 0,1$	--
	n.b.	n.b.	n.b.	--	--	--	1683,2 $\pm 0,1$	n.b.	--
Amid-I	1637,6 $\pm 0,1$	1636,0 $\pm 0,1$	1632,9 $\pm 0,1$	1638,3 $\pm 0,1$	1635,8 $\pm 0,1$	1631,5 $\pm 0,1$	1637,4 $\pm 0,1$	1636,0 $\pm 0,1$	1633,3 $\pm 0,1$
	1620,3 $\pm 0,1$	1620,8 $\pm 0,1$	1620,2 $\pm 0,1$	n.b.	n.b.	n.b.	1619,2 $\pm 0,1$	1619,1 $\pm 0,1$	1619,1 $\pm 0,1$
Amid-II	1539,6 $\pm 0,1$	1539,5 $\pm 0,1$	1539,5 $\pm 0,1$	1539,2 $\pm 0,1$	1539,3 $\pm 0,1$	1539,1 $\pm 0,1$	1539,3 $\pm 0,1$	1539,3 $\pm 0,1$	1539,3 $\pm 0,1$
$\delta(\text{CH}_2)$	1466,0 $\pm 0,1$	1465,9 $\pm 0,1$	1465,4 $\pm 0,1$	1466,1 $\pm 0,1$	1466,0 $\pm 0,1$	1465,5 $\pm 0,1$	1465,8 $\pm 0,1$	1465,7 $\pm 0,1$	1465,3 $\pm 0,1$

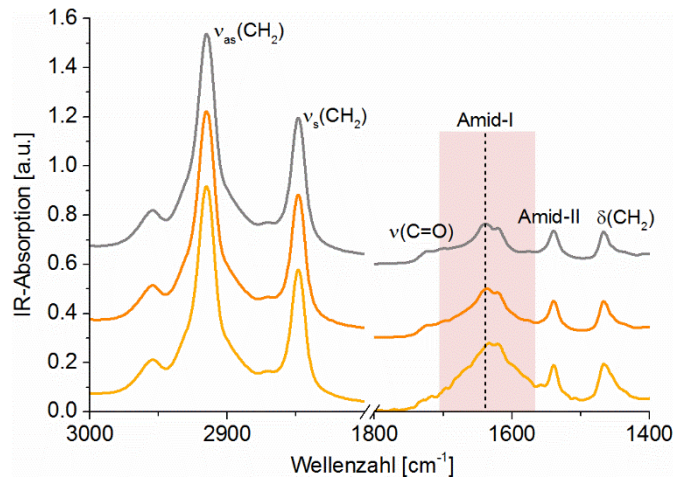


Abb. 28: ATR-FTIR-Spektren eines multilamellaren SC-Lipidmodells (CER[AP]:CHOL:SA) gegen H_2O (grau), 10 % Harnstoff (orange) und 30 % Harnstoff (gelb) nach jeweils 24 h Inkubationszeit. Zu Vergleichszwecken sind die Spektren in Y-Richtung verschoben. Peakveränderungen sind rot hinterlegt.

2.2.2. OLIGOLAYER

Die simultanen NR- und IR-Messungen an Oligolayern sind in Abb. 29 dargestellt. Im Rahmen der IR-Messungen konnten, im Gegensatz zu den Multilayern, aufgrund der geringen Probenschichtdicke und der IR-Absorption des verwendeten Wafers, nur insgesamt drei bzw. vier charakteristische Banden detektiert werden (Abb. 29a). Eine Verschiebung der Bandenpositionen der $\nu(CH_2)$ kann bei Zugabe einer 10 %igen Harnstofflösung nicht beobachtet werden. Demnach ist nicht von einer Auflockerung infolge einer Konformationsänderung im Bereich der Lipidketten auszugehen. Auch eine Veränderung der Ausbildung von HBBs, ausgehend von der SA kann durch die fehlende Verschiebung der Bandenposition der CO-Valenzschwingung ausgeschlossen werden. Nach Zugabe von Harnstoff kann jedoch eine neue Bande bei $1609,0 \pm 0,2 \text{ cm}^{-1}$ (Amid-I Bande) detektiert werden (Abb. 29a, orange). Diese deutet auf die plötzliche Zunahme von HBBs, ausgehend von der Amidgruppe, hin. Bei der Messung einer Harnstofflösung gegen einen Wafer ohne Lipide ist die Bande an dieser Stelle sogar noch intensiver (grün), weil der IR-Strahl in diesem Fall eine größere Strecke in dem mit Harnstoff angereicherten Medium durchquert und nicht zuerst die Probe passieren muss. Demzufolge ist diese Bande nicht auf Harnstoffmoleküle zurückzuführen, die an der Grenzfläche zwischen Lipidschicht und wässrigem Medium angereichert sind, sondern vielmehr auf die Harnstoffmoleküle in der wässrigen Lösung. Insgesamt zeigen diese IR-Messungen weder Interaktionen des Harnstoffs mit den Kopfgruppen, noch mit den Kettenregionen der Lipide, die sich von denen des Wassers unterscheiden.

Der Kurvenverlauf der NR-Messungen vor und nach Zugabe von Harnstoff unterscheidet sich nicht (Abb. 29b). Lediglich die kritische Kante ist im Falle der Enhancerlösung ver-

schoben, da die Streulängendichte der Harnstofflösung nicht mit der des D_2O identisch ist. Die Position des *Bragg Peaks* bleibt mit $0,1254 \pm 0,0004 \text{ \AA}^{-1}$ vor und $0,1249 \pm 0,0002 \text{ \AA}^{-1}$ nach Harnstoffzugabe unverändert. Demzufolge verändert sich die Bilayerschichtdicke der untersuchten Probe nicht. Die Gesamtschichtdicke lässt sich aufgrund der fehlenden *Kiessig-Oszillationen* nicht berechnen. Eine Änderung dieser ist jedoch angesichts des identischen Kurvenverlaufes vor und nach Harnstoffzugabe auszuschließen. Die Ergebnisse liefern keinen Hinweis darauf, dass Harnstoff sich in einer Weise in die Ketten- oder Kopfgruppenbereiche der Bilayer integriert, die mit einer Vergrößerung der Bilayerschichtdicke einhergeht. Falls eine Einlagerung in diese Bereiche stattfindet, ist diese beispielsweise mit einer Verdrängung von Wassermolekülen verbunden, sodass keine Schichtdickenveränderung erfolgt.

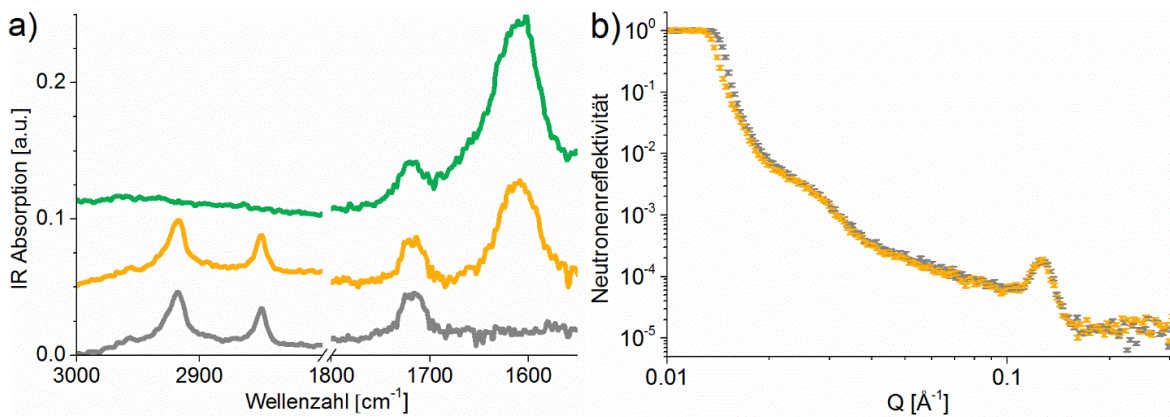


Abb. 29a) IR-Spektren eines unbeschichteten Si-Wafers gegen 10 % Harnstoff in D_2O (grün) und eines oligolamellaren SC-Lipidmodells (CER[AP]:CHOL:SA) gegen D_2O (grau) und gegen 10 % Harnstoff in D_2O (orange). **b) NR-Kurven** eines oligolamellaren SC-Lipidmodells (CER[AP]:CHOL:SA), gemessen gegen D_2O (grau) und anschließend gegen 10 % Harnstoff in D_2O (orange).

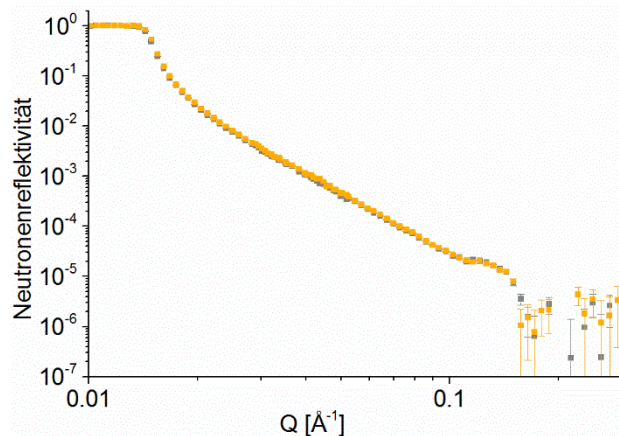


Abb. 30: NR-Kurven einer einzelnen SC-Lipid-Bilayerschicht (CER[AP]:CHOL:SA), präpariert durch LB/LS, gemessen gegen D_2O (grau) und anschließend gegen 10 % Harnstoff in D_2O (orange).

2.2.3. FESTKÖRPERGESTÜTZTE EINZELNE BILAYER

Bei der Untersuchung einzelner Bilayer mit NR-Messungen kann ebenfalls keine Veränderung des Kurvenverlaufes beobachtet werden (Abb. 30). Auch die Berechnung der Position

des *Bragg Peaks* zu $0,1335 \pm 0,0013 \text{ \AA}^{-1}$ vor und $0,1333 \pm 0,0024 \text{ \AA}^{-1}$ nach Harnstoffzugabe zeigt keine signifikanten Unterschiede. Demzufolge gilt auch für dieses Modell, dass, falls eine Interaktion des Harnstoffs mit den SC-Lipiden erfolgt, diese keine Veränderung der Bilayerschichtdicke hervorruft.

2.2.4. LIPOSOMEN

Die PCS-Untersuchungen bezüglich der Stabilität der Liposomengröße und deren Verteilung weisen bereits direkt nach der Herstellung signifikante Unterschiede auf (Abb. 31). Die Durchmesser der Liposomen in Harnstofflösung sind mit $132,4 \pm 1,2 \text{ nm}$ (orange) im Gegensatz zu $129,1 \pm 1,0 \text{ nm}$ (grau) der Liposomen in Puffer zunächst nur leicht erhöht. Im Verlauf der ersten drei Tage steigen sie bis auf $145,1 \pm 1,1 \text{ nm}$ an, während sich die Größe der Liposomen in Puffer nicht signifikant verändert (Abb. 31a). Als Ursache dafür wäre ein allmähliches Zusammenfließen der Liposomen infolge von herabgesetzten Abstoßungskräften zwischen benachbarten Liposomen denkbar. Für diese Theorie sprechen auch die dazugehörigen PDI-Werte, die die Breite der Größenverteilung beschreiben. Diese sind mit anfänglich $0,160 \pm 0,008$ deutlich größer, als die der Liposomen in Puffer mit $0,081 \pm 0,001$ (Abb. 31b). Innerhalb der ersten drei Tage steigen die PDI-Werte sogar bis knapp unter den kritischen Wert von 0,3. Die Anwesenheit des Harnstoffs führt demnach infolge des Zusammenfließens von ULVs zu einer Vergrößerung der Liposomen und damit zu einer deutlich inhomogeneren Größenverteilung selbiger.

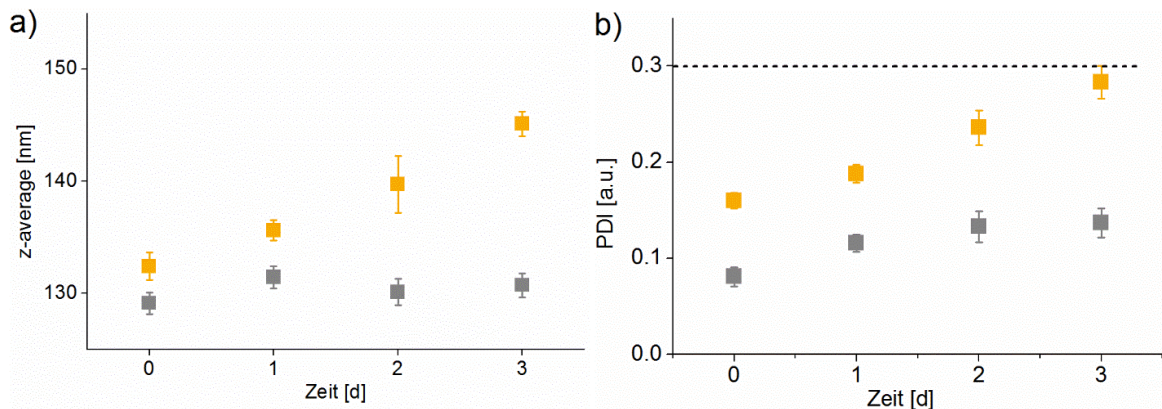


Abb. 31: Mittelwerte der Liposomendurchmesser (*z-Average*) (a) und des *PDI* (b) von SC-ULVs (CER[AP]:CHOL:SA) in Puffer (pH-Wert = 10, grau) und in 10 % Harnstoff in Puffer (pH-Wert = 10, orange), in Abhängigkeit von der Lagerungszeit.

Leakage-Messungen der ULVs zeigen, dass die Auslaufrate bereits zehn Minuten nach Zugabe des Harnstoffs mit $12,0 \pm 1,4 \%$ deutlich über der der Liposomen in Puffer liegt (Abb. 32). Damit das relativ große 6-CF-Molekül mit seiner Hydrathülle die Liposomenmembran überwinden kann, müssen entweder porenartige Strukturen ausgebildet oder die Membranstruktur des Liposoms vollständig zerstört werden. Um diesen Sachverhalt eingehend unter-

suchen zu können, müssten Experimente mit Fluoreszenzmolekülen unterschiedlicher Molekulargewichte durchgeführt werden¹³⁶. Ein vom Molekulargewicht des Fluorophors abhängiger *Leakage* würde dabei auf die Ausbildung porenartiger Strukturen hindeuten. Für die vorliegende Messung kann zumindest eine ausgeprägte Zerstörung der Vesikel ausgeschlossen werden, da in diesem Fall ein plötzlicher Anstieg des *Leakage* resultieren würde, der in diesem Fall nicht beobachtet werden kann. Vielmehr könnte der hier beobachtete kontinuierliche *Leakage* über die Zeit durch ein langsames aber anhaltendes Zusammenfließen der Liposomen, welches durch die Anwesenheit des Enhancers schneller als in Puffer stattfindet, erklärt werden. Da die Liposomen im Rahmen der PCS-Messungen zu Beginn jedoch einen im Vergleich zum Modell in Puffer ähnlichen Durchmesser und eine nur geringfügig breitere Größenverteilung aufweisen, spielt dieser Effekt möglicherweise nur eine untergeordnete Rolle. Zudem ist bei den durchgeführten *Leakage*-Messungen bereits nach 50 Minuten ein Grenzwert zu erahnen. Wäre der beobachtete *Leakage* nur durch das Zusammenfließen der Liposomen bedingt, würde das verminderte Zusammenfließen mit der Zeit im Widerspruch zu den Ergebnissen der PCS-Messung stehen, bei denen ein deutliches Zusammenfließen, vor allem bei zunehmender Lagerungszeit beobachtet werden kann. Folglich ist das Zusammenfließen der Liposomen durch einen weiteren Effekt überlagert. Denkbar wären dabei durch den Enhancer verursachte Defekte (porenartige Strukturen) in der Membran, durch die ein fortlaufendes Austreten des Fluorophors ermöglicht wird. Somit würde der *Leakage* auch nach bereits kurzer Zeit erklärt werden können, ohne dass sich die Liposomengröße deutlich verändert haben muss. Es kann zudem angenommen werden, dass geringfügige Variationen der Lipidzusammensetzung innerhalb eines Liposoms zu unterschiedlich stabilen Liposomen führen, die in unterschiedlichem Ausmaß durch Harnstoff beeinflusst werden können. Dabei findet die Porenbildung vor allem in den weniger stabilen Liposomen statt, sodass sich der *Leakage* nach einer gewissen Zeit einem Grenzwert nähert (Abb. 32).

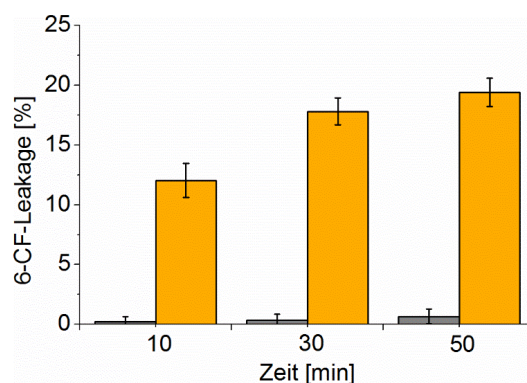


Abb. 32: Zeitabhängiger 6-CF-Leakage von SC-ULVs (CER[AP]:CHOL:SA) gegen Puffer (pH-Wert = 10, grau) bzw. 10 % Harnstoff in Puffer (pH-Wert = 10, orange).

2.2.5. ZUSAMMENFASSUNG

NR-Messungen an Oligolayern und einzelnen Bilayern zeigen, dass Harnstoff in einer Konzentration von 10 % keinen Einfluss auf den ermittelten Wiederholabstand in den SC-Lipidmodellen hat. Demzufolge lässt sich vermuten, dass keine zusätzliche Einlagerung von Wasser innerhalb der Bilayerstrukturen stattfindet. Außerdem deutet dies darauf hin, dass keine Wechselwirkung zwischen dem Harnstoff und den SC-Lipiden stattfindet, die eine Auflockerung der starren Lipidstruktur zur Folge haben würde. Die IR-Messungen an Multi- und Oligolayern untermauern diese Annahme. Hier finden trotz der verstärkten HBBs keine ausreichenden Wechselwirkungen mit den Kopfgruppen der Lipide statt, um einen Einfluss auf die Beweglichkeit der Ketten auszuüben. Möglicherweise kann jedoch das im Rahmen der PCS-Messungen beobachtete verstärkte Zusammenfließen der Liposomen in Anwesenheit von Harnstoff auf diese Wechselwirkungen zurückgeführt werden. In diesem Fall würden die HBBs der SC-Lipide untereinander herabgesetzt werden während verstärkt HBBs zum Wasser oder Harnstoff ausgebildet werden. In der Folge würde die Stabilität der Liposomen herabgesetzt sein. Die Ergebnisse der *Leakage*-Experimente an den ULVs lassen darüber hinaus vermuten, dass Harnstoff porenartige Strukturen innerhalb der Liposomen ausbildet. Untersuchungen an Monolayern mit Brewster Winkelmikroskopie und IR-Absorptionsspektroskopie unterstützen diese Theorie¹²². Demnach kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Krümmung der Membran oder der sehr hohe pH-Wert die Empfindlichkeit der Membran gegenüber dem Harnstoff erhöht haben. Das Ausmaß dieser Porenbildung ist jedoch relativ gering, da einerseits der Leakage bei nur etwa 20 % liegt und andererseits bei den NR-Messungen keine signifikante zusätzliche Ansammlung von Wasser innerhalb der Lipidschichten zu beobachten ist, wie sie bei einem großen Anteil an Poren zu erwarten wäre. Die Ausbildung der Poren würde demnach nur geringfügig zu einer penetrationsfördernden Wirkung beitragen. Zur Aufklärung des tatsächlichen Ursprungs der penetrationsfördernden Wirkung von Harnstoff wurden in der Vergangenheit bereits zahlreiche Studien mit teilweise widersprüchlichen Ergebnissen durchgeführt. Dabei konnte für einige dieser Untersuchungen eine durch Harnstoff hervorgerufene verringerte Ordnung der SC-Lipide festgestellt werden^{60, 132}. In einer dieser Studien wurde allerdings ein eher unnatürlicher pH-Wert von ungefähr 9 verwendet und zusätzlich NaCl eingesetzt, was der Literatur zu Folge den penetrationssteigernden Effekt des Harnstoffs verstärkt¹³⁷. In der Anderen wurde der Einfluss auf die Integrität der Lipide lediglich für Harnstoffkonzentrationen oberhalb von 10 % beschrieben. Demgegenüber stehen Untersuchungen von Bjorklund et al., die keinen Einfluss des Harnstoffs auf die SC-Lipidstruktur beobachten konnten¹³³. Neuste Stu-

dien von Pham et al. zeigen zudem, in Analogie zu den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnissen, keinen zusätzlichen Effekt des Harnstoffs auf die Lipidstruktur bei vollständig hydratisiertem SC¹²⁹. Insgesamt kann demnach angenommen werden, dass Harnstoff in einer Konzentration von 10 % keine strukturellen Veränderungen der SC-Lipidmatrix, im Vergleich zu den durch Wasser induzierten Veränderungen, hervorruft. Folglich muss es einen anderen Effekt geben, der zu der häufig beschriebenen penetrationsfördernden Wirkung des Harnstoffs im nativen SC, selbst bei Konzentrationen von 10 % und darunter³ führt. Eine Möglichkeit könnte ein durch Harnstoff hervorgerufenes, vermehrtes Eindringen von Wasser in das SC sein¹¹². In der Folge verringert sich die Stabilität dieser Struktur¹³⁸. Wenn das Harnstoffmolekül sich, wie beschrieben, nicht in die Lipidmatrix einlagert, bleiben als Zielstruktur die Korneozyten. Als kleines, hydrophiles Molekül ist Harnstoff in der Lage den cornified envelope zu passieren und sich im Inneren der Zellen anzureichern. Da Harnstoff eine sehr hohe Wasserbindungskapazität besitzt¹³⁰, können mit dem Molekül große Mengen an Wasser in die Korneozyten transportiert werden. Um eine Zerstörung der Zelle zu verhindern, können die Korneozyten ihre Höhe und ihr Volumen unter Hydratisierung um bis zu 50 % vergrößern¹³⁹. Dabei kann durch die angenommene tetrakaidekahedrale Struktur der Korneozyten während der Volumenzunahme eine Veränderung der Oberflächenausdehnung verhindert werden¹⁴⁰. Es gibt jedoch auch Untersuchungen zu Harnstoff, bei denen neben den Wassereinlagerungen innerhalb der Korneozyten auch solche zwischen den Korneozyten beobachtet werden konnten¹³⁸. Diese traten besonders in den äußeren Zellschichten des SC auf und führten zu einer Zerstörung der hochgeordneten Strukturen in diesen Bereichen.

Publiziert in:

Mueller, J.; Oliveira, J. S.; Barker, R.; Trapp, M.; Schroeter, A.; Brezesinski, G.; Neubert, R. H. *The effect of urea and taurine as hydrophilic penetration enhancers on stratum corneum lipid models. Biochim. Biophys. Acta 2016, 1858 (9), 2006-2018.*

2.3. TAURIN

Als eine der am häufigsten vorkommenden freien endogenen Aminosäuren in Säugetieren, besitzt Taurin eine Vielzahl von Funktionen¹⁴¹. Bezogen auf die Haut stimuliert Taurin beispielsweise die Synthese von SC-Lipiden, verhindert einen Tensid vermittelten transepidermalen Wasserverlust¹⁴² und fungiert als Osmoregulator in humanen Keratinozyten¹⁴³. Für die Umsetzung der osmoregulatorischen Funktion stehen dem Molekül spezielle Taurin-Transporter (TAUT) zur Verfügung, die überwiegend im Stratum granulosum und teilweise in Stratum spinosum lokalisiert sind¹⁴⁴. Demzufolge kann man auch in diesen Schichten der Epidermis, sowie der Dermis die höchste Konzentration an Taurin finden^{145, 146}. Darüber hinaus zeigten Penetrationsstudien an exzidiierter humaner Haut in allen Hautschichten signifikant höhere Taurinkonzentrationen gegenüber der natürlich vorkommenden Konzentration¹⁴⁶. Im SC könnte diese zusätzliche Menge an Taurin entweder in den Korneozyten oder innerhalb der Lipidmatrix im Bereich der Kopfgruppen lokalisiert sein. Da im SC keine Taurin-Transporter mehr exprimiert sind, welche die Aufnahme des Molekül in die Zellen fördern, könnte sich die hydrophile Substanz im Kopfgruppenbereich der SC-Lipide anlagern, mit diesen interagieren und einen penetrationsfördernden Effekt haben. Das penetrationsverbessernde Potential von Taurin wird bereits bei Drug Delivery Systemen in der Mundschleimhaut genutzt¹⁴⁷. Zudem gibt es Patente, die die penetrationsfördernde und hydratisierende Wirkung von Taurin auf die Haut indizieren^{148, 149, 150}. Bisher wurde dieser Aspekt jedoch nicht in Bezug auf das SC untersucht und soll folgend erstmalig an den ausgewählten Modellsystemen betrachtet werden.

2.3.1. MULTILAYER

Die IR-Spektren der Messungen an Multilayern vor und nach Zugabe von Taurin sind beispielhaft für Probe 1 in Abb. 51 (Anhang A, S. 105) dargestellt. Tabelle 11 zeigt die für die drei untersuchten Proben ermittelten charakteristischen Bandenpositionen. Die Positionen der $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ und $\nu_s(\text{CH}_2)$ verschieben sich dabei nicht. Demnach wird die Kettenordnung der Lipide durch Taurin im Vergleich zu dem System in Wasser nicht beeinflusst. Bestätigt wird dies durch die einzelne Bande der CH_2 -Deformationsschwingung bei $\sim 1466 \text{ cm}^{-1}$, die für alle Messungen nach wie vor eine hexagonale Kettenpackung indiziert. Für die Amid-I-Bande bei 1640 cm^{-1} ergibt sich ein leichter, jedoch nicht signifikanter Trend zu niedrigeren Wellenzahlen, was analog zum Harnstoff eine Verstärkung der HBBs der weniger stark wasserstoffbrückengebundenen Spezies indizieren würde. Darüber hinaus sind keine bzw. uneinheitliche Veränderungen der Banden im Bereich von 1500 bis 1800 cm^{-1} vor und nach Taurinzugabe zu beobachten, weshalb keine weiteren Wechselwirkungen im Bereich der Kopfgruppen vermutet werden.

Tabelle 11: Charakteristische IR-Bandenpositionen [cm^{-1}] eines multilamellaren SC-Lipidmodells (CER[AP]:CHOL:SA) vor und nach Zugabe von 5 % Taurin.

Bande	Probe 1		Probe 2		Probe 3	
	H ₂ O-Referenz	Taurin 5 %	H ₂ O-Referenz	Taurin 5 %	H ₂ O-Referenz	Taurin 5 %
$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	2914,6 ± 0,1	2914,6 ± 0,1	2914,9 ± 0,1	2914,7 ± 0,1	2914,7 ± 0,1	2914,6 ± 0,1
$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$	2848,5 ± 0,1	2848,5 ± 0,1	2848,4 ± 0,1	2848,4 ± 0,1	2848,5 ± 0,1	2848,5 ± 0,1
$\nu(\text{CO})$	1722,7 ± 0,1	1722,7 ± 0,1	1722,9 ± 0,1	1722,8 ± 0,1	1722,8 ± 0,1	1723,2 ± 0,1
	1702,3 ± 0,1	1702,4 ± 0,1	1703,2 ± 0,1	1702,3 ± 0,1	1701,3 ± 0,1	1702,1 ± 0,1
Amid-I	1638,7 ± 0,1	1638,7 ± 0,1	1638,9 ± 0,3	1638,6 ± 0,2	1638,8 ± 0,2	1638,7 ± 0,2
	1619,4 ± 0,1	1619,4 ± 0,1	1619,7 ± 0,1	1619,6 ± 0,1	1619,7 ± 0,1	1619,7 ± 0,1
Amid-II	1540,3 ± 0,1	1540,2 ± 0,1	1539,6 ± 0,1	1540,3 ± 0,1	1540,6 ± 0,1	1540,4 ± 0,1
$\delta(\text{CH}_2)$	1465,8 ± 0,1	1466,0 ± 0,1	1466,0 ± 0,1	1466,0 ± 0,1	1466,0 ± 0,1	1466,0 ± 0,1

2.3.2. OLIGOLAYER

Analog zu IR-Messungen an Oligolayern mit Harnstoff als Enhancer (Kapitel VI.2.2.2, S. 60), können auch für Taurin nur wenige charakteristische Banden detektiert werden. Trotz der geringeren Schichtdicke der Oligolayer im Vergleich zu den Multilayern, sind für die drei detektierten Bandenpositionen der CH₂-Valenzschwingungen und Carbonyl-Streckschwingung der SA keine Veränderungen erkennbar (Tabelle 12). Folglich beeinflusst Taurin selbst im oligolamellaren SC-Lipidmodell weder die konformative Ordnung der Lipidketten, noch das von der SA ausgehende Wasserstoffbrückennetzwerk.

Tabelle 12: IR-Bandenpositionen [cm^{-1}] eines oligolamellaren SC-Lipidmodells (CER[AP]:CHOL:SA), vor und nach Zugabe von 5 % Taurin

Bande	D ₂ O-Referenz	Taurin 5 %
$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	2917,8 ± 0,2	2917,9 ± 0,2
$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$	2849,9 ± 0,2	2850,0 ± 0,2
$\nu(\text{CO})$	1716,7 ± 0,2	1716,3 ± 0,3

NR-Messungen für die oligolamellaren Proben zeigen die in Abb. 33 dargestellten Kurvenverläufe vor (graue Quadrate) und nach Zugabe von 5 % Taurin (violette Quadrate). Aufgrund des Vorliegens einiger Kiessig-Oszillationen kann die Gesamtschichtdicke unter Zuhilfenahme der einzelnen Peakpositionen zu $232,8 \pm 10,0 \text{ \AA}$ vor und $232,7 \pm 11,3 \text{ \AA}$ nach Taurinzugabe berechnet werden. Eine Veränderung der Gesamtprobendicke ist demnach nicht zu erkennen. Auch die Positionen der Bragg Peaks zeigen mit $0,1295 \pm 0,0002 \text{ \AA}^{-1}$ vor und $0,1297 \pm 0,0003 \text{ \AA}^{-1}$ nach Taurinzugabe keine signifikanten Unterschiede auf. Die Bilayerschichtdicken sind demzufolge ebenfalls vergleichbar. Da sich die Kurvenverläufe jedoch im Bereich des ersten Minimums unterscheiden, wurde hier zusätzlich eine Auswertung mittels optischer Matrixmethode durchgeführt. Die jeweiligen Fits der Reflektivitäts-

kurven, sowie die resultierenden SLD-Profile sind in Abb. 33 dargestellt. Die dazugehörigen kalkulierten Werte für die Schichtdicken, SLDs, Mediumanteile und Rauigkeiten der verschiedenen Schichten sind in Tabelle 27 (Anhang A, S. 106) zu finden.

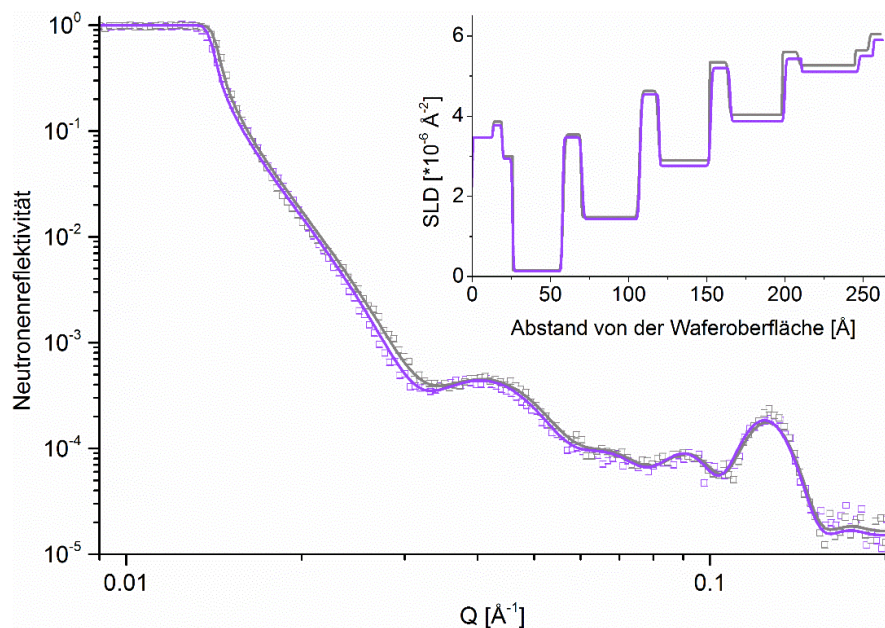


Abb. 33: NR-Kurven einer oligolamellaren Probe (CER[AP]:CHOL:SA), gemessen gegen D_2O (graue Quadrate) und anschließend gegen 5 % Taurin in D_2O (violette Quadrate). Die jeweiligen Fits sind als Linien der gleichen Farbe und die dazugehörigen SLD-Profile als Einschub oben rechts dargestellt.

Dabei sollte berücksichtigt werden, dass der vorgestellte Fit nur eine mögliche Beschreibung des Schichtsystems darstellt, die im Einklang mit den anderen Untersuchungen steht, sowie eine sinnvolle Lösung für das Modell bietet. Eine sichere Interpretationsgrundlage wird dagegen nur unter Zuhilfenahme der Messungen bei verschiedenen Kontrasten erhalten, die im Rahmen dieser Arbeit aufgrund begrenzter Messzeitkapazitäten nicht durchgeführt werden konnten. Anhand des dargestellten SLD-Profiles kann sowohl für die Probe vor, als auch nach Zugabe von Taurin der 13-schichtige Aufbau, wie er bereits für die Proben in Wasser beschrieben ist (Kapitel VI 2.1.2, S. 48), bestätigt werden. Dabei nimmt der Bedeckungsgrad bei Entfernung von der Waferoberfläche ab, erkennbar an den steigenden SLD-Werten. Durch den Einfluss von Taurin sinkt der Anteil der 10 %igen Taurinlösung in D_2O (Medium) in den unterschiedlichen Schichten, was auf eine Anreicherung des Taurin hinweist (Tabelle 27, Anhang A, S. 106). Es findet allerdings keine selektive Anreicherung im Bereich der Kopfgruppen statt, sodass eine gezielte Wechselwirkung des Taurin mit den Kopfgruppen der SC-Lipide sehr unwahrscheinlich ist. Eine direkte Interaktion mit den Kettenbereichen der Lipide erscheint aufgrund des hydrophilen Charakters ebenfalls fragwürdig. Die geringfügige Zunahme der Rauigkeit der Schichten durch die Anwesenheit von Taurin deutet darüber hinaus auf eine weniger einheitlich beschaffene Lipidstruktur hin. Zudem konnte eine

tendenzielle Zunahme der Bilayerschichtdicken und die Vergrößerung der Gesamtschichtdicke beobachtet werden. Diese sind allerdings weniger zuverlässig, als die Dickenbestimmung mittels Peakanalyse, da dort die tatsächlich gemessene NR-Kurve zugrunde gelegt wird, während für den Fit das theoretische Modell ausschlaggebend ist.

2.3.3. FESTKÖRPERGESTÜTZTE EINZELNE BILAYER

Mit Hilfe von NR-Messungen an einzelnen Bilayern vor und nach Zugabe von 5 % Taurin kann kein Unterschied im Kurvenverlauf nachgewiesen werden (Abb. 34). Ein Vergleich der bestimmten *Bragg Peak*-Positionen von $0,1335 \pm 0,0013 \text{ \AA}$ vor und $0,1338 \pm 0,0020 \text{ \AA}$ nach Taurinzugabe zeigt ebenfalls keine signifikante Abweichung, sodass von einer einheitlichen Bilayerschichtdicke ausgegangen werden kann. Eine Unterscheidung der mit Taurin behandelten Probe hinsichtlich der Schichtdicken oder Zusammensetzung der Schichten ist demnach unwahrscheinlich.

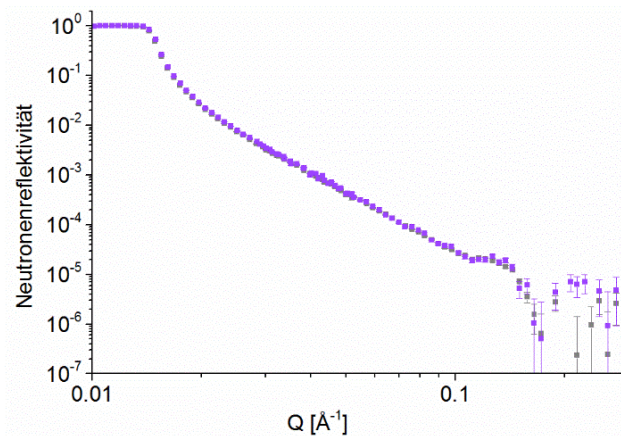


Abb. 34: NR-Kurven einer einzelnen SC-Lipid-Bilayerschicht (CER[AP]:CHOL:SA), präpariert durch LB/LS, gemessen gegen D₂O (grau) und anschließend gegen 5 % Taurin in D₂O (violett).

2.3.4. LIPOSOMEN

Bei Zugabe von 5 % Taurin kann, im Gegensatz zum Harnstoff, bereits von Beginn an eine deutliche Vergrößerung des Vesikeldurchmessers von $129,1 \pm 1,0 \text{ nm}$ auf $156,8 \pm 1,7 \text{ nm}$ beobachtet werden (Abb. 35a). Ursächlich hierfür könnte eine Einlagerung des Taurin innerhalb der Kopfgruppen der Liposomenmembran sein. Da sich der Enhancer bereits während der Präparation der Liposomen in der wässrigen Phase befindet, ist eine Inkorporation in die Membran möglicherweise begünstigt. Dadurch steigt der effektive Platzbedarf pro Kopfgruppe in der Membran an. Um die gleiche Packungsdichte der Lipidketten zu gewährleisten muss eine größere Menge an Lipiden in die Membran integriert werden. In der Folge würden Liposomen mit einem vergrößerten Durchmesser entstehen. Da der dazugehörige PDI-Wert im Vergleich zu dem der Liposomen in Puffer leicht vergrößert ist (Abb. 35b), kann zusätzlich ein schwach ausgeprägtes Zusammenfließen der Liposomen als Folge der erleichterten

Überwindung der Hydrathülle bei Anwesenheit des Enhancers, analog zum Harnstoff, vermutet werden. Innerhalb der ersten drei Tage vergrößert sich der Liposomendurchmesser geringfügig bis auf $172,0 \pm 3,1$ nm. Der PDI-Wert steigt währenddessen stark bis auf $0,31 \pm 0,01$ an und liegt damit oberhalb des kritischen Wertes von 0,3. Die Verteilung ist ab diesem Zeitpunkt eher breit und die z-average-Werte können nicht mehr zuverlässig bestimmt werden. Insgesamt entsteht während der Lagerung in 5 % Taurin, wahrscheinlich als Folge des verstärkten Zusammenfließens, Liposomen mit zunehmend inhomogener Größe.

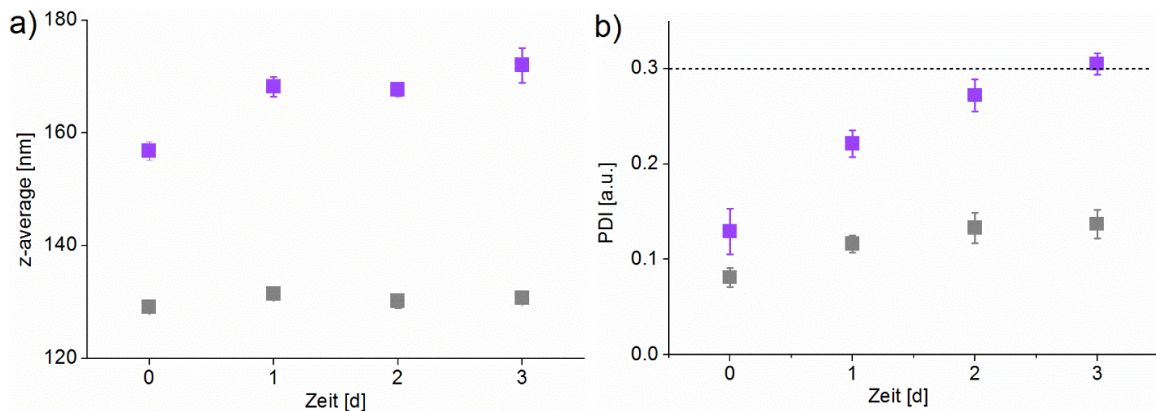


Abb. 35: Mittelwerte der Liposomendurchmesser (*z-Average*) (a) und des *PDI* (b) von SC-ULVs (CER[AP]:CHOL:SA) in Puffer (pH-Wert = 10) (grau) und in 5 % Taurin in Puffer (pH-Wert = 10), in Abhängigkeit von der Lagerungszeit.

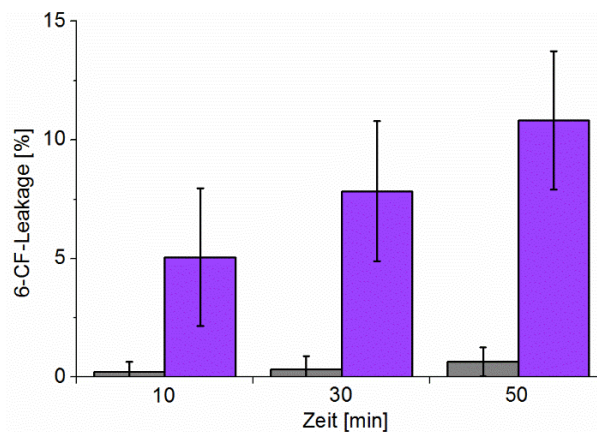


Abb. 36: Zeitabhängiger 6-CF-Leakage von SC-ULVs (CER[AP]:CHOL:SA) gegen Puffer (pH-Wert = 10, grau) bzw. 5 % Taurin in Puffer (pH-Wert = 10, violett).

Der 6-CF-*Leakage* steigt nach Zugabe von Taurin auf $5,1 \pm 2,9$ % an und nimmt dann wie bei Harnstoff mit der Zeit weiter zu auf $7,8 \pm 3,0$ % nach 30 Minuten bis zu einem Wert von $10,8 \pm 2,9$ % nach 50 Minuten (Abb. 36). In Analogie zu Harnstoff kann auch für Taurin eine Aus-bildung porenartiger Strukturen angenommen werden, da hier ebenfalls ein zeitabhängiger *Leakage* zu erkennen ist. Allerdings ist unter Verwendung von Taurin nach 50 Minuten noch keine Annäherung an einen Grenzwert zu erkennen. In Verbindung mit den sich über die Zeit verschlechternden PDI-Werten, ist für Taurin möglicherweise ein

kontinuierlicher Effekt auf die Liposomen zu vermuten. Mit verbleibenden ~89 % intakter Liposomen bei *Leakage*-Messungen, auch nach 50 Minuten, kann jedoch insgesamt von einem eher geringen Einfluss in den gewählten Konzentrationen ausgegangen werden.

2.3.5. ZUSAMMENFASSUNG

Die in diesem Abschnitt durchgeführten Untersuchungen liefern erste Einblicke in die bisher nicht untersuchte Wechselwirkung von Taurin, als potentieller Penetrationenhancer, mit SC-Lipidmodellen. Die NR-Messungen zeigen, dass Taurin den lamellaren Wiederholabstand nicht beeinflusst. Somit wird keine übermäßige Anreicherung im Bereich der Kopfgruppen angenommen. Im Rahmen der IR-Messungen ergibt sich allerdings für die Amid-I-Bande eine zwar nicht signifikante Zunahme der HBBs, die jedoch entsprechend den Ausführungen zu Harnstoff verantwortlich sein könnte für das bei den PCS-Messungen beobachtete verstärkte Zusammenfließen der Liposomen. *Leakage*-Messungen lassen darüber hinaus die Ausbildung von Poren innerhalb der Lipidschicht vermuten. Die für die NR-Messungen beobachtete unselektive Anlagerung des Taurin in der gesamten Bilayerschicht kann ebenfalls mit dieser Theorie begründet werden. Durch die Unterbrechung der lamellaren Struktur kommt es dabei zu der beobachteten Zunahme der Rauigkeiten. Da der durch Taurin hervorgerufene *Leakage* geringer ist als bei Harnstoff, ist auch das Ausmaß der Porenbildung wahrscheinlich eher gering. Erhöhte Taurin-Konzentrationen im SC, die in Penetrationsstudien an exzidiierter Humanhaut aufgezeigt wurden¹⁴⁶, können daher, wie bereits bei Harnstoff beschrieben, möglicherweise durch eine Anreicherung des Enhancers in den Korneozyten erklärt werden. Obwohl im SC keine Taurin-Transporter mehr exprimiert werden, ist das hydrophile Taurin durch sein geringes Molekulargewicht in der Lage die Korneozytenmembran zu überwinden. Im Gegensatz zu Harnstoff ist Taurin jedoch nicht hygroskopisch. Studien zeigten, dass es innerhalb einer Zeitspanne von 50 Tagen bei einer relativen Luftfeuchte von 97 % keine signifikanten Mengen an Wasser binden konnte¹³⁰. Durch den osmotischen Druck wäre dennoch eine Anreicherung von Wasser in den Korneozyten möglich, wodurch ein penetrationsfördernder Effekt hervorgerufen werden könnte.

Publiziert in:

Mueller, J.; Oliveira, J. S.; Barker, R.; Trapp, M.; Schroeter, A.; Brezesinski, G.; Neubert, R. H. *The effect of urea and taurine as hydrophilic penetration enhancers on stratum corneum lipid models. Biochim. Biophys. Acta* 2016, 1858 (9), 2006-2018

2.4. DMSO

DMSO ist einer der ersten und am umfangreichsten untersuchten Penetrationsenhancer. Seine penetrationsfördernde Eigenschaft wurde sowohl für lipophile als auch für hydrophile Arzneistoffe in zahlreichen Studien belegt^{151, 152, 153}. Nach Dragicevic et al.¹⁵⁴ können die wesentlichen Wirkmechanismen des DMSO zusammengefasst werden zu: (i) Änderung der interzellulären Keratinkonformation von α -helikal zu β -Faltblatt^{155, 156, 157}, (ii) Extraktion von Lipiden¹⁵⁸, die mit der Bildung wassergefüllter Poren einhergeht, (iii) Förderung der Verteilung des Arzneistoffs aus der Formulierung in die Haut durch die guten Lösungseigenschaften des im SC angereicherten DMSO⁵², (iv) Interaktion mit SC-Lipiden - obwohl eine Interaktion mit den lipophilen Ketten nicht ausgeschlossen werden kann, wird vielmehr eine Wechselwirkung mit den polaren Kopfgruppen vermutet. Bei der Verdrängung von Wasser durch die DMSO-Moleküle ergibt sich eine größere Solvationshülle, die folglich die dicht gepackte Lipidstruktur auflockern kann^{94, 114}. Es existieren allerdings bisher kaum Studien, die an isolierten Lipiden durchgeführt wurden, und somit eine eindeutige Aussage zur Wechselwirkung des Enhancers mit den SC-Lipiden zulassen. Obwohl Guillard et al. bei der Untersuchung des DMSO-Einflusses auf synthetisches CER[NS] eine Beeinflussung der Kopfgruppenregion feststellten⁹⁴, wäre es vorteilhaft, weitere Untersuchungen an für die SC-Lipidmatrix repräsentativeren Mischungen durchzuführen. Deshalb sollen im folgenden Abschnitt die Wechselwirkungen von DMSO mit den ternären SC-Lipidmodellen, unter Verwendung verschiedener Konzentrationen (10, 30 oder 50 %), bezogen auf das wässrige Medium, untersucht werden. Durch die Verdünnung des DMSO mit Wasser werden vermutlich dessen lösungsvermittelnde Eigenschaften, sowie die Fähigkeit zur Denaturierung von Proteinen herabgesetzt¹⁵⁸. Es ist bereits beschrieben, dass für die penetrationsfördernde Wirkung, gerade in Bezug auf die Interaktion mit der SC-Lipidmatrix, sehr hohe DMSO-Konzentrationen (~60 %) notwendig sind^{114, 156, 159}. Da derartig hohe Konzentrationen jedoch zu Hautirritationen und anderen unerwünschten Arzneimittelwirkungen führen können, ist die kommerzielle Anwendung dieses Enhancers in pharmazeutischen Formulierungen sehr stark eingeschränkt. Allerdings ist an dieser Stelle das Verhältnis DMSO/Lipid entscheidend, was in den nachfolgenden Untersuchungen nicht genau bestimmt und deshalb nicht zugrunde gelegt werden konnte. In diesem Zusammenhang soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob DMSO in physiologisch verträglichen Konzentrationen, einen signifikanten Effekt auf SC-Lipidmodelle hat. Somit ist zwar ein Vergleich mit Ergebnissen anderer Studien nur eingeschränkt möglich, eine Einschätzung des DMSO-Einflusses jedoch anwendbar.

2.4.1. MULTILAYER

Die IR-Messungen an SC-Multilayern wurden zunächst gegen eine physiologisch relevante 10 %ige DMSO-Lösung durchgeführt. Die erhaltenen IR-Spektren sind beispielhaft für Probe 1 in Abb. 52 (Anhang A, S. 107) und die entsprechenden Bandenpositionen für alle drei Proben in Tabelle 13 dargestellt. Da die für DMSO erwarteten deutlichen Effekte ausblieben, wurde eine zusätzliche, stark erhöhte Konzentration von 50 % eingesetzt. Dadurch sollte untersucht werden, ob diese Beobachtung durch eine zu geringe Konzentration bedingt ist. Die erhaltenen Daten sind ebenfalls in Abb. 52 (Anhang A, S. 107) und Tabelle 13 zu finden.

Tabelle 13: Charakteristische IR-Bandenpositionen [cm^{-1}] eines multilamellaren SC-Lipidmodells (CER[AP]:CHOL:SA) gemessen gegen Wasser und anschließend gegen 10 % bzw. 50 % DMSO. Die Positionen von schwach ausgeprägten Banden können dabei nicht zuverlässig ermittelt werden (n.b.).

Bande	Probe 1			Probe 2			Probe 3		
	H ₂ O-Referenz	DMSO 10 %	DMSO 50 %	H ₂ O-Referenz	DMSO 10 %	DMSO 50 %	H ₂ O-Referenz	DMSO 10 %	DMSO 50 %
ν_{as} (CH ₂)	2914,9 ± 0,1	2914,8 ± 0,1	2914,9 ± 0,1	2915,4 ± 0,1	2915,4 ± 0,1	2915,4 ± 0,1	2914,8 ± 0,1	2914,8 ± 0,1	2914,8 ± 0,1
ν_{s} (CH ₂)	2848,7 ± 0,1	2848,7 ± 0,1	2848,7 ± 0,1	2849,0 ± 0,1	2848,9 ± 0,1	2849,0 ± 0,1	2848,6 ± 0,1	2848,6 ± 0,1	2848,6 ± 0,1
$\nu(\text{CO})$	1722,1 ± 0,2	1722,2 ± 0,2	1722,9 ± 0,1	1723,4 ± 0,1	1723,6 ± 0,2	1723,7 ± 0,2	1723,3 ± 0,2	1723,4 ± 0,1	1723,3 ± 0,2
	1700,4 ± 0,2	1700,6 ± 0,1	1701,7 ± 0,1	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Amid-I	1638,4 ± 0,1	1638,7 ± 0,1	1639,2 ± 0,1	1638,2 ± 0,2	1638,7 ± 0,2	1639,1 ± 0,2	1638,8 ± 0,2	1639,6 ± 0,2	1639,6 ± 0,2
	1620,0 ± 0,1	1619,9 ± 0,1	1619,8 ± 0,1	1620,3 ± 0,1	1620,2 ± 0,1	1620,0 ± 0,1	1619,3 ± 0,1	1619,3 ± 0,1	1619,2 ± 0,1
Amid-II	1540,3 ± 0,1	1540,4 ± 0,1	1540,5 ± 0,1	1540,9 ± 0,1	1540,8 ± 0,1	1540,8 ± 0,1	1540,4 ± 0,1	1540,4 ± 0,1	1540,4 ± 0,1
$\delta(\text{CH}_2)$	1466,2 ± 0,1	1466,2 ± 0,1	1466,2 ± 0,1	1466,1 ± 0,1	1466,1 ± 0,1	1466,1 ± 0,1	1466,3 ± 0,1	1466,3 ± 0,1	1466,3 ± 0,1

Die Position der Amid-II-Bande verändert sich dabei nicht. Die HBBs im Bereich der N-H-Gruppe des CER[AP] bleiben demzufolge durch das DMSO unbeeinflusst. Darüber hinaus ist erkennbar, dass sich die Wellenzahl der Amid-I-Bande der weniger wasserstoffbrückengebundenen Spezies bei $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ mit zunehmender DMSO-Konzentration erhöht. Die Position der stärker wasserstoffbrückengebundenen Spezies bei $\sim 1620 \text{ cm}^{-1}$ wird dagegen nicht beeinflusst. In Analogie zu den Untersuchungen von Guillard et al.⁹⁴ kann demnach festgestellt werden, dass DMSO eine Abnahme der HBBs der weniger wasserstoffbrückengebundenen Spezies, ausgehend von der C=O-Gruppe des CER[AP], hervorruft. Der Effekt ist umso ausgeprägter, je höher die DMSO-Konzentration ist. Als mögliche Ursache für diese Beobachtung wird die Verdrängung von Wasser durch DMSO-Moleküle angenommen. Ein Einfluss auf die HBBs der stärker wasserstoffbrückengebundenen Spezies kann

jedoch auch bei einer DMSO-Konzentration von 50 % nicht beobachtet werden. Hierbei ist entweder das Verhältnis Enhancer/Lipid weiterhin zu niedrig, oder das DMSO ist nicht in der Lage diese HBBs zu beeinflussen. Für die Carbonyl-Streckschwingung im Bereich von 1700 bis 1720 cm^{-1} kann insgesamt der Trend beobachtet werden, dass die Wellenzahlen der detektierten Banden mit zunehmender DMSO-Konzentration ansteigen. Somit kann eine Abschwächung des ausgebildeten Wasserstoffbrückennetzwerkes der SA angenommen werden. Die Positionen der asymmetrischen und symmetrischen CH_2 -Valenzschwingungen bleiben sowohl für die Zugabe von 10 %, als auch für 50 % unverändert. Eine Beeinflussung der Kettenordnung kann damit ausgeschlossen werden, besonders, da sich auch für die CH_2 -Deformationsschwingung bei $\sim 1466 \text{ cm}^{-1}$ keine Veränderungen ergeben. Diese indiziert für alle Messungen eine hexagonale Kettenpackung.

2.4.2. OLIGOLAYER

Die simultanen IR- und NR-Messungen an Oligolayern wurden zunächst mit einer DMSO-Konzentration von 10 % durchgeführt. Da auch hier zunächst nur geringfügige Veränderungen detektiert werden konnten, wurde für weitere Messungen die DMSO Konzentration, wie schon bei den Multilayer-Experimenten, erhöht. In diesem Fall wurde jedoch anstatt der 50 %igen eine 30 %ige DMSO-Lösung eingesetzt. Damit sollte einem eventuellen Ablösen der aufwändig präparierten Probe bei begrenzter Messzeit am BioRef vorgebeugt werden. IR-Messungen an den im Gegensatz zu den Multilayern dünneren Oligolayern gegen 10 bzw. 30 % DMSO zeigen keine Verschiebungen der Peakpositionen der asymmetrischen und symmetrischen CH_2 -Valenzschwingungen im Vergleich zu denen der Messungen gegen D_2O auf (Tabelle 14). Die Position der Amid-I-Bande, die bei den Multilayern eine Veränderung aufwies, kann aufgrund des schwachen Signals nicht eindeutig bestimmt werden. Folglich kann über eine potentielle Änderung dieser Bande keine Aussage getroffen werden.

Tabelle 14: IR-Bandenpositionen [cm^{-1}] eines oligolamellaren SC-Lipidmodells (CER[AP]:CHOL:SA) vor und nach Zugabe von 10 % bzw. 50 % DMSO.

Bande	D_2O -Referenz	DMSO 10 %	DMSO 30 %
$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	$2917,9 \pm 0,2$	$2917,9 \pm 0,3$	$2917,9 \pm 0,1$
$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$	$2850,2 \pm 0,2$	$2850,2 \pm 0,3$	$2850,1 \pm 0,1$

Für die simultan durchgeführten NR-Messungen gegen D_2O und anschließend gegen 10 % DMSO ergeben sich die in Abb. 37 dargestellten Kurvenverläufe (graue und hellrote Quadrate). Mittels Peakanalyse kann die Gesamtschichtdicke der Lipidschicht bei der Messung gegen D_2O zu $163,4 \pm 4,2 \text{ \AA}$ berechnet werden. Diese vergrößert sich zwar nach Zugabe von 10 % DMSO auf $166,5 \pm 4,4 \text{ \AA}$, der Unterschied ist allerdings nicht signifikant. Die Positionen der *Bragg Peaks* zeigen mit $0,1297 \pm 0,0002 \text{ \AA}^{-1}$ gegen D_2O und

$0,1304 \pm 0,0002 \text{ \AA}^{-1}$ gegen 10 % DMSO eine leichte Verschiebung zu größeren Werten. In diesem Fall ist möglicherweise die Schichtdicke durch DMSO-Zugabe verändert. Um diesen Sachverhalt näher zu beleuchten, wird zusätzlich eine Analyse mittels optischer Matrixmethode durchgeführt und die tatsächlich aufgenommenen NR-Kurven mit einem theoretischen Kurvenverlauf gefittet (Abb. 37, Linien in grau und hellrot). Das dazugehörige SLD-Profil für das D_2O -Referenzsystem zeigt den bereits für Wasser beschriebenen charakteristischen fünfschichtigen Probenaufbau mit abnehmendem Bedeckungsgrad (Abb. 37 Einschub, grau). Durch die Zugabe einer 10 %igen DMSO-Lösung in D_2O verändert sich der NR-Kurvenverlauf nur geringfügig, sodass im resultierenden SLD-Profil kaum Unterschiede zu erkennen sind (hellrot). Aufgrund des 10 %igen Anteils an DMSO ist die SLD des Mediums verringert, was zu einer Verschiebung der kritischen Kante führt. Als Konsequenz nehmen die SLDs der Schichten, die einen großen Anteil an Medium enthalten, in gleichem Maße ab. Neben diesen Veränderungen, bedingt durch den Mediaustausch, ist in den äußeren Bereichen der Lipidschicht eine geringfügige Zunahme der Mediumanteile zu erkennen (Mediumanteile Tabelle 28, Anhang A, S. 107). Da jedoch keine Änderungen innerhalb der Schichtdicken zu erkennen sind, ist diese Beobachtung wahrscheinlich auf ein Ablösen der Lipide zurückzuführen. An die Stelle der abgelösten Lipide tritt dabei Medium, wodurch die ermittelte SLD für diese Schicht ansteigt und ein erhöhter Anteil an Medium berechnet wird.

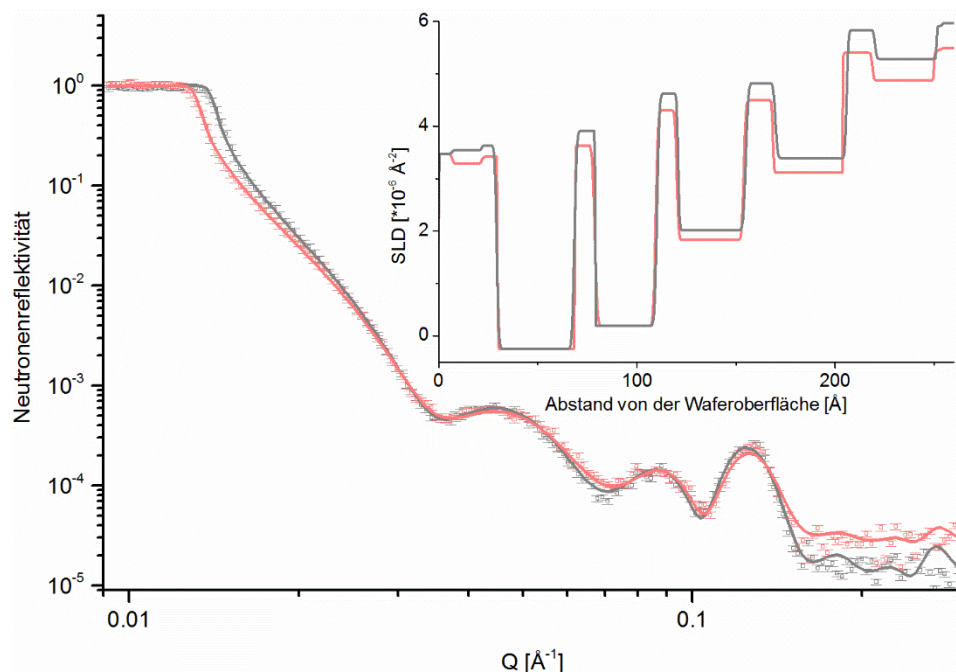


Abb. 37: NR-Kurven einer oligolamellaren Probe (CER[AP]:CHOL:SA), gemessen gegen D_2O (graue Quadrate) und anschließend gegen 10 % DMSO in D_2O (hellrote Quadrate). Die jeweiligen Fits sind als Linien der gleichen Farbe und die dazugehörigen SLD-Profile als Einschub oben rechts dargestellt.

Für die Zugabe einer 30 %igen DMSO-Lösung kann anhand der Peakanalyse eine signifikante Erhöhung der Gesamtschichtdicke auf $172,9 \pm 4,8 \text{ \AA}$ berechnet werden. Zusätzlich ist eine Verschiebung der *Bragg Peak*-Position auf $0,1318 \pm 0,0003 \text{ \AA}^{-1}$ zu erkennen. Die Fits der NR-Kurvenverläufe mittels optischer Matrixmethode und die dazugehörigen SLD-Profile weisen zudem deutliche Unterschiede auf (Abb. 38 und Tabelle 29, Anhang A, S. 108).

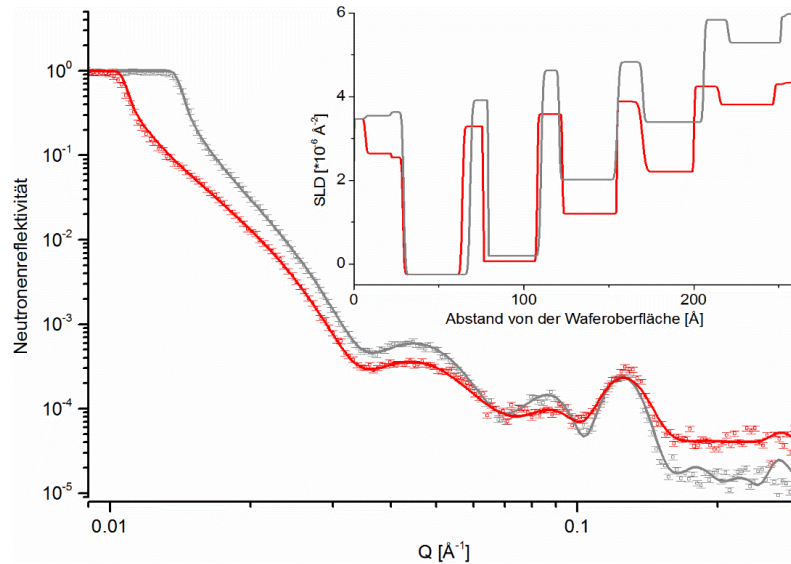


Abb. 38: NR-Kurven einer oligolamellaren Probe (CER[AP]:CHOL:SA), gemessen gegen D₂O (graue Quadrate) und anschließend gegen 30 % DMSO in D₂O (dunkelrote Quadrate). Die jeweiligen Fits sind als Linien der gleichen Farbe und die dazugehörigen SLD-Profile als Ein Schub oben rechts dargestellt.

Tabelle 15: Schichtdicken [\AA] und Mediumanteile [%] gemäß der SLD Profile aus Abb. 38 (Auszug aus Tabelle 29, Anhang A, S. 108).

	D ₂ O		DMSO 30 %	
	Dicke	Medium	Dicke	Medium
Wafer				
Köpfe	7,5	49,2	7,1	39,9
Ketten	39,2	0,02	34,9	0,12
Köpfe	10,5	55,3	12,2	64,9
Ketten	31,2	7,1	31,8	6,9
Köpfe	10,6	70,8	14,8	74,6
Ketten	34,2	36,4	32,1	31,8
Köpfe	14,9	75,0	15	84,8
Ketten	36,0	58,5	30,4	53,6
Köpfe	14,3	97,1	14,8	96,9
Ketten	31,1	89	32,5	88,5
Köpfe	2,6	98,6	5,7	98,9
Medium				

Besonders im Bereich der Kopfgruppen und auch in den äußeren Kettenschichten ist eine starke Abnahme der SLDs zu erkennen. Da DMSO mit einer SLD von etwa $-0,04 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$

im Gegensatz zu der des D_2O ($6,36 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$) einen eher geringen Wert aufweist und der Anteil an DMSO bei 30 % liegt, ist der resultierende SLD-Wert für das Medium bereits deutlich niedriger als der vom D_2O . In Tabelle 15 sind die Veränderungen der Mediumanteile durch Zugabe der 30 %igen DMSO-Lösung angegeben. Dabei steigen die Mediumanteile in den Kopfgruppenbereichen tendenziell an. In Verbindung mit den vergrößerten Schichtdicken der Kopfgruppen, kann als Ursache für die Beobachtung eine Anreicherung des DMSO/ D_2O -Gemisches in den Kopfgruppenbereichen angenommen werden. Die in der Literatur beschriebene Verdrängung von Wasser durch DMSO^{94, 114} kann mit diesem Modell allerdings nicht bestätigt werden. Für diesen Fall hätte eine Verringerung der Mediumanteile beobachtet werden müssen, da durch das Verdrängen des D_2O eine Verringerung der SLD der Schicht resultieren würde. Zusätzlich zu der Anreicherung des Mediums in den Kopfgruppenbereichen wäre auch ein Ablösen der Lipide, wie bereits für die 10 %ige DMSO-Lösung beschrieben, denkbar. Dabei würde jedoch zusätzlich eine Erhöhung der Mediumanteile in den Kettenregionen zu erwarten sein. Tatsächlich nehmen die Mediumanteile in diesen Bereichen jedoch ab. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass das Ablösen der Lipide überlagert wird von einer Anreicherung des DMSO im Bereich der Lipidketten. Durch das vermehrte Ablösen der Lipide wird die Grenzfläche zwischen den lipophilen Ketten und dem hydrophilen Medium erhöht. Demzufolge würde durch die Anlagerung des DMSO an diese Grenzflächen die Grenzflächenspannung verringert, wodurch dieser Vorgang energetisch begünstigt wäre. Die vermehrte Ablösung von Lipiden würde schließlich die beobachtete Abnahme der Schichtdicken im Bereich der Lipidketten erklären. Für die Gesamt- und Bilayerschichtdicke kann dagegen insgesamt keine signifikante Veränderung festgestellt werden (Tabelle 29, Anhang A, S. 108). Da in diesem Fall jedoch nur der theoretische Kurvenverlauf des Fits zugrunde gelegt wird, während bei der Peakanalyse die Peakpositionen des tatsächlich gemessene Kurvenverlaufes bewertet werden, kann insgesamt eine Vergrößerung der Schichtdicke angenommen werden.

2.4.3. LIPOSOMEN

PCS-Messungen nach Lagerung in 10 % DMSO zeigen, dass die Liposomen über den untersuchten Zeitraum von acht Tagen relativ stabil sind. Zu Beginn der Messungen weisen die Liposomen mit $145,2 \pm 0,9$ nm im Vergleich zu den Liposomen in Puffer ($129,1 \pm 1,0$ nm) einen leicht vergrößerten Durchmesser auf (Abb. 39a). Hierfür könnte, analog zu den Erklärungen des Enhancereinflusses von Taurin (Kapitel VI.2.3.4, S. 69), eine Einlagerung der DMSO-Moleküle innerhalb der SC-Lipidkopfgruppen während der Liposomenpräparation verantwortlich sein. Innerhalb der nachfolgenden acht Tage vergrößern sich die Liposomen nur minimal bis auf einen Durchmesser von $159,2 \pm 5,0$ nm. Während dieser Inkubationszeit vergrößert sich der PDI der ULVs in DMSO in gleichem Ausmaß, wie der der ULVs in

Puffer (Abb. 39b). Die während dieser Zeit entstandene inhomogenere Liposomengrößenverteilung ist deshalb vielmehr auf das System an sich, als auf den Einfluss des DMSO zurückzuführen. Insgesamt kann vermutet werden, dass der eigentliche Effekt des DMSO auf dem infolge der Enhancereinlagerung vergrößerten Lipidmengenbedarf pro Liposom beruht. Dieser ist durch eine kontinuierliche Fusion der Liposomen, wie sie vergleichbar auch in den Liposomen in Puffer stattfindet, überlagert.

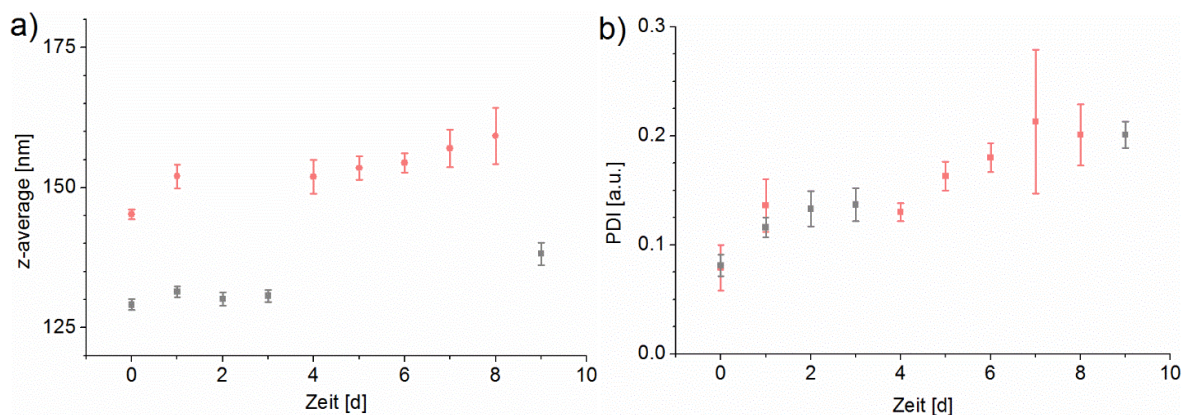


Abb. 39: Mittelwerte der Liposomendurchmesser (*z-Average*) (a) und des *PDI* (b) von SC-ULVs (CER[AP]:CHOL:SA) in Puffer (pH-Wert = 10, grau) und in 10 % DMSO in Puffer (pH-Wert = 10, hellrot), in Abhängigkeit von der Lagerungszeit.

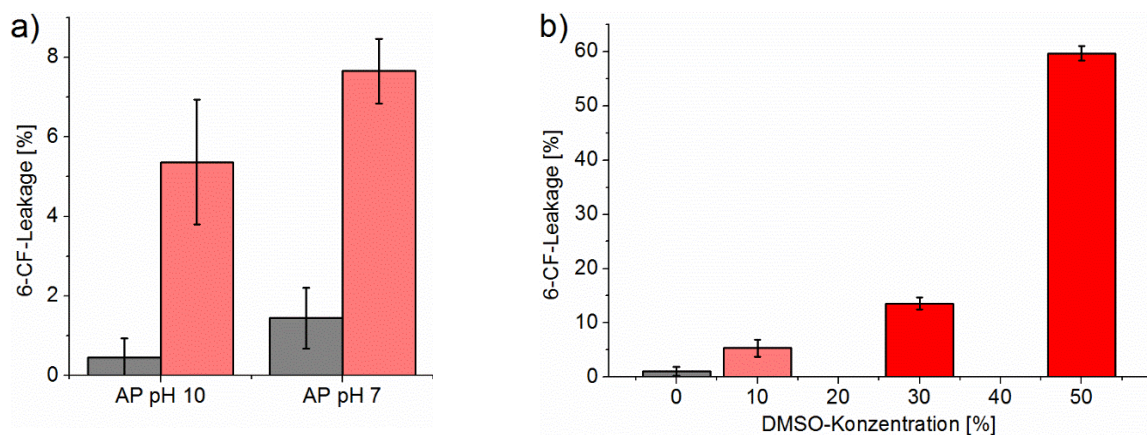


Abb. 40a) 6-CF-Leakage von ULVs aus CER[AP]:CHOL:SA in Puffer (pH-Wert = 7 bzw. 10)(grau) und unter Zugabe von 10 % DMSO in dem jeweiligen Puffer (hellrot) **b)** Konzentrationsabhängiger 6-CF-Leakage von ULVs aus CER[AP]:CHOL:SA in Puffer (pH-Wert = 10) unter Zugabe verschiedener Mengen DMSO.

Leakage-Untersuchungen der SC-ULVs mit einer DMSO-Konzentration von 10 % indizieren mit Werten zwischen 5 und 8 % (Abb. 40a und Tabelle 16) einen zwar signifikanten, jedoch eher geringen Einfluss des DMSO auf die Liposomenstruktur. Hierbei konnte auch durch eine Veränderung von pH-Wert = 10 auf einen pH-Wert = 7 keine deutliche Steigerung des *Leakage* detektiert werden. Der plötzliche aber nicht zeitabhängige *Leakage* bei beiden pH-Werten deutet auf eine Zerstörung der Liposomenstruktur, beispielsweise durch Solubilisierung der Lipide, hin, bei der das in den zerstörten Liposomen eingeschlossene 6-

CF sofort austreten kann. Dadurch kommt es zu einem abrupten Anstieg des *Leakage*, der sich mit der Zeit nicht weiter verändert (zeitabhängige Daten nicht gezeigt). Aufgrund des sehr geringen *Leakage* sind jedoch weniger als 10 % der Liposomen betroffen, was eine unterschiedlich stabile Struktur innerhalb der Liposomengesamtheit vermuten lässt. Dabei werden die weniger stabilen Liposomen bereits bei geringen DMSO-Konzentrationen zerstört.

Tabelle 16: 6-CF-*Leakage* [%] der in Abb. 40a) und b) dargestellten Messungen.

pH	Puffer	DMSO 10 %	DMSO 30 %	DMSO 50 %
10	0,5 ± 0,4	5,4 ± 1,6	13,6 ± 1,1	59,7 ± 1,4
7	1,4 ± 0,8	7,7 ± 0,8	--	--

Um zu untersuchen, ob die DMSO-Konzentration tatsächlich eine Rolle bei der Beeinflussung der SC-Lipidstruktur spielt, wurden unterschiedliche DMSO-Konzentrationen getestet (Abb. 40b). Wie erwartet steigt der *Leakage* mit zunehmender Konzentration an DMSO über 13,6 % (30 % DMSO) auf bis zu 60 % (50 % DMSO). Für Phospholipide konnte beispielsweise in MD-Simulationen bereits für deutlich geringere DMSO-Konzentrationen ein vollständiger Integritätsverlust der Membran beobachtet werden¹⁶⁰. Dass jedoch im vorliegenden Modell selbst bei einem Anteil von 50 % DMSO in der wässrigen Phase die Liposomen nicht vollständig zerstört werden, könnte auf die auffallend stabile Struktur der SC-Lipide zurückzuführen sein. Da die SC-Lipidmatrix eine enorme Schutzfunktion gegenüber äußeren Einflüssen ausüben muss, ist es notwendig, dass die gebildeten Strukturen äußerst robust und widerstandsfähig sind. Biomembranen aus Phospholipiden befinden sich dagegen im Körperinneren und müssen diese Schutzfunktion nicht erfüllen.

2.4.4. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen können bereits für DMSO-Konzentrationen von 10 % geringfügige Veränderungen festgestellt werden. So zeigen beispielsweise IR-Messungen eine Verringerung der HBBs, sowohl für die C=O-Gruppe des Amids als auch tendenziell für die SA. Ein Einfluss auf die Ordnung der Lipidketten kann in diesem Zusammenhang jedoch nicht beobachtet werden. NR-Messungen an Oligolayern indizieren darüber hinaus, dass diese Wechselwirkungen im Bereich der Kopfgruppen nicht zu einer Veränderung des lamellaren Wiederholabstandes führen. Es kann zudem keine selektive Anreicherung des DMSO in speziellen Bereichen der Bilayer ermittelt werden. Lediglich bei den PCS-Messungen zeigt sich eine geringfügige Vergrößerung der Liposomen, die mit einer Einlagerung des DMSO innerhalb der SC-Lipidkopfgruppen und einem damit einhergehenden vergrößerten Lipidmengenbedarf zur Gewährleistung der Packungsdichte erklärt werden könnte. Die Stabilität der Liposomen, in Bezug auf die Liposomengröße und deren Grö-

ßenverteilung, ist jedoch im Vergleich zur Pufferlösung unverändert. Auch die Integrität der Liposomen ist mit einem eher geringfügigen *Leakage* von max. 8 % nur wenig beeinträchtigt und könnte auf die Anwesenheit einzelner instabiler Liposomen zurückzuführen sein. Der sprunghafte und zeitunabhängige *Leakage* indiziert dabei statt einer Porenbildung, die bereits in der Literatur als einer der Wirkmechanismen von DMSO diskutiert wird¹⁵⁸, die komplette Desintegration der Liposomen. Als Ursache wird eine Solubilisierung der Lipide vermutet, wie sie auch im Rahmen der NR-Messungen beobachtet werden kann.

Eine Erhöhung der DMSO-Konzentration auf 30 % zeigt im Zuge der NR-Messungen mittels Peakanalyse eine Vergrößerung der Bilayer- und Gesamtschichtdicke. Ursächlich dafür ist höchstwahrscheinlich die Anreicherung des Mediums im Bereich der SC-Lipidkopfgruppen, wodurch eine Zunahme der Kopfgruppenschichtdicken resultiert. Gleichzeitig wird ein Teil der Lipide solubilisiert. Da der *Leakage* jedoch nur wenig größer ist als für 10 % DMSO, ist das Ausmaß der Solubilisierung für die beiden Konzentrationen vergleichbar. Ein Einfluss auf die Lipidkettenordnung kann allerdings auch für diese Konzentration nicht ermittelt werden.

Die 50 %ige DMSO-Lösung zeigt schließlich einen deutlichen *Leakage* von knapp 60 % und beschreibt somit eine weitreichende Zerstörung der Lipidstruktur. Darüber hinaus indizieren IR-Messungen an Multilayern eine im Vergleich zur 10 %igen DMSO-Lösung weiter reduzierte Ausbildung der HBBs im Bereich der Kopfgruppen. Die Wechselwirkungen des DMSO mit den Kopfgruppen sind demnach auch in den vorliegenden Untersuchungen stark von der eingesetzten Konzentration abhängig. Eine Veränderung der hexagonalen Kettenpackung oder eine Abnahme der Kettenordnung ist jedoch nicht zu beobachten.

Insgesamt kann für die penetrationsfördernde Wirkung des DMSO im nativen SC eine Kombination verschiedener Effekte angenommen werden, wobei hier eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit vorliegt. Eine Solubilisierung der Lipide, sowie Wechselwirkungen im Bereich der Kopfgruppen treten bereits bei geringen DMSO-Konzentrationen auf. Ab einer Konzentration von 30 % wird zusätzlich eine Aufweitung der Kopfgruppenbereiche und eine vermehrte Anreicherung von DMSO innerhalb der Lipide erreicht. Dadurch kann sowohl die Penetration hydrophiler als auch lipophiler Arzneistoffe begünstigt werden.

2.5. GLYCEROL

Glycerol ist eine in der Haut vorkommende Substanz, die Bestandteil des natürlichen Feuchthaltefaktors ist. Dieser ist für die Durchfeuchtung der Haut verantwortlich. Unter trockenen Bedingungen kann Glycerol aufgrund seines hohen Wasserbindevermögens¹³¹ eine vermehrte Wasseraufnahme in das SC induzieren und so eine penetrationsfördernde Wirkung hervorrufen. Dabei sollen allerdings der erreichte penetrationsfördernde Effekt, sowie die Wechselwirkungen mit der SC-Lipidmatrix, vergleichbar mit denen von Wasser sein^{129, 133}. Zudem kann Glycerol als Co-Solvens die Verteilung des Arzneistoffs aus der Formulierung in das SC verstärken und so ebenfalls die Penetration von Arzneistoffen verbessern. Studien an humanem SC zeigen darüber hinaus, dass es bei der Applikation von Glycerol zur Anreicherung des Moleküls im Bereich der Kopfgruppen zwischen benachbarten Bilayern, und zusätzlich zur Einlagerung zwischen den Kopfgruppen innerhalb eines Bilayers kommt¹⁶¹. Im Zuge einer solchen Einlagerung wären Wechselwirkungen des Enhancers mit den Kopfgruppen der Lipide zu erwarten. Zusätzlich könnte ein Einfluss auf die Lipidkettenordnung resultieren, weshalb diese Aspekte nachfolgend untersucht werden sollen.

2.5.1. MULTILAYER

Nach Zugabe einer 10 %igen Glycerollösung zum multilamellaren SC-Lipidmodell sind für keine der untersuchten Proben Verschiebungen der symmetrischen und asymmetrischen CH₂-Valenzschwingungen im Gegensatz zu der Mischung in Wasser zu erkennen (Tabelle 17; beispielhaft sind für Probe 1 die Spektrenverläufe in Abb. 53, Anhang A, S. 109 dargestellt).

Tabelle 17: Charakteristische IR-Bandenpositionen [cm^{-1}] eines multilamellaren SC-Lipidmodells (CER[AP]: CHOL:SA) vor und nach Zugabe von 10 % Glycerol.

Bande	Probe 1		Probe 2		Probe 3	
	H ₂ O-Referenz	Glycerol 10 %	H ₂ O-Referenz	Glycerol 10 %	H ₂ O-Referenz	Glycerol 10 %
$\nu_{as}(\text{CH}_2)$	2914,7 ± 0,1	2914,5 ± 0,1	2915,2 ± 0,1	2915,2 ± 0,1	2914,6 ± 0,1	2914,5 ± 0,1
$\nu_s(\text{CH}_2)$	2848,3 ± 0,1	2848,4 ± 0,1	2848,8 ± 0,1	2848,8 ± 0,1	2848,3 ± 0,1	2848,3 ± 0,1
$\nu(\text{CO})$	1719,9 ± 0,1	1719,1 ± 0,1	1717,0 ± 0,1	1717,3 ± 0,1	1721,5 ± 0,2	1723,1 ± 0,1
	1699,0 ± 0,1	1699,3 ± 0,1	1697,7 ± 0,1	1697,6 ± 0,1	1700,5 ± 0,1	1703,2 ± 0,1
	1683,1 ± 0,1	1682,5 ± 0,1	1683,1 ± 0,1	1682,9 ± 0,1	1684,9 ± 0,1	1690,1 ± 0,1
Amid-I	1638,5 ± 0,1	1638,6 ± 0,1	1638,4 ± 0,2	1638,7 ± 0,2	1638,0 ± 0,1	1638,2 ± 0,2
	1619,3 ± 0,1	1619,2 ± 0,1	1619,3 ± 0,1	1619,3 ± 0,1	1619,1 ± 0,1	1619,2 ± 0,1
Amid-II	1539,6 ± 0,1	1539,9 ± 0,1	1540,2 ± 0,1	1540,2 ± 0,1	1540,1 ± 0,1	1540,2 ± 0,1
$\delta(\text{CH}_2)$	1466,4 ± 0,1	1466,2 ± 0,1	1465,7 ± 0,1	1465,8 ± 0,1	1465,9 ± 0,1	1465,9 ± 0,1

Damit wird durch Glycerol keine Konformationsänderung der Lipidketten induziert. Zudem beschreibt die unaufgespaltene Bande der CH₂-Deformationsschwingung bei Wellenzahlen um 1466 cm⁻¹ eine hexagonale Kettenpackung, wie sie bereits für die Lipidmodelle in Wasser beobachtet werden konnte. Im Bereich der Amidbanden lassen sich insgesamt keine signifikanten Veränderungen erkennen. In Anlehnung an die für DMSO beobachteten Verschiebungen kann für die Amid-I-Bande bei ~1640 cm⁻¹ jedoch eine tendenzielle Erhöhung der Wellenzahlen beobachtet werden, die eine leicht verminderte Ausbildung von HBBs induziert. Die verschiedenen Positionen der Carbonylstreckschwingungen der SA verschieben sich für die drei untersuchten Proben und auch innerhalb dieser scheinbar ohne einen bestimmten Trend und liefern widersprüchliche Resultate, was die Beeinflussung der HBBs der SA betrifft. In diesem Fall kann davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Effekte weniger durch das Glycerol, als vielmehr durch mögliche Veränderungen im System selbst hervorgerufen werden.

2.5.2. OLIGOLAYER

IR-Messungen an Oligolayern zeigen nach Glycerolzugabe keine signifikanten Verschiebungen der detektierten Bandenpositionen, weder für die asymmetrischen und symmetrischen CH₂ Valenzschwingungen, noch für die C=O Valenzschwingung der SA (Tabelle 18). Analog zu den IR-Untersuchungen an Multilayern, kann demnach keine Auswirkung des Glycerols auf die Lipidkettenordnung beobachtet werden. Die fehlende Verschiebung der C=O Valenzschwingung der SA deutet zudem auf eine ausbleibende Wechselwirkung von Glycerol mit den Lipidkopfgruppen hin.

Tabelle 18: IR-Bandenpositionen [cm⁻¹] eines oligolamellaren SC-Lipidmodells (CER[AP]:CHOL:SA) vor und nach Zugabe von 10 % Glycerol.

Bande	D ₂ O-Referenz	Glycerol 10 %
v _{as} (CH ₂)	2917,4 ± 0,2	2917,5 ± 0,1
v _s (CH ₂)	2849,8 ± 0,1	2850,1 ± 0,3
v(CO)	1716,7 ± 0,3	1717,0 ± 0,1

Die simultane Erfassung der Neutronenreflektivität lässt keine Veränderung im Kurvenverlauf der Probe, gemessen gegen eine 10 %ige Glycerollösung, im Vergleich zu D₂O erkennen (Abb. 41). Folglich sind keine strukturellen Veränderungen innerhalb der Probe bezüglich der Schichtdicken und Verteilung der Komponenten zu erwarten. Die bestimmten Peakpositionen von $0,1307 \pm 0,0004 \text{ \AA}^{-1}$ vor und $0,1315 \pm 0,0004 \text{ \AA}^{-1}$ nach Enhancerzugabe unterscheiden sich nicht signifikant und bestätigen damit, dass keine Veränderungen innerhalb der Bilayerschichtdicken aufgrund der Anwesenheit von Glycerol erfolgen.

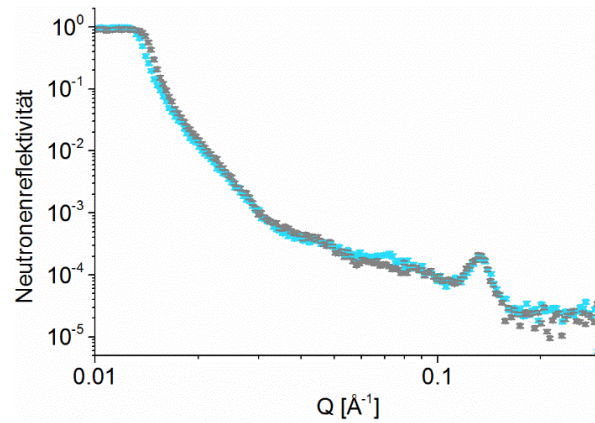


Abb. 41: NR-Kurven einer oligolamellaren Probe (CER[AP]:CHOL:SA), gemessen gegen D_2O (grau) und anschließend gegen 10 % Glycerol in D_2O (hellblau).

2.5.3. LIPOSOMEN

Die PCS-Messungen an ULVs in 10 %iger Glycerollösung liefern vergleichbare Ergebnisse wie Untersuchungen mit DMSO (Kapitel VI.2.4.3, S. 77). Bei Verwendung von Glycerol als Enhancer ist der Durchmesser der ULVs mit $155,0 \pm 2,2$ nm im Vergleich zu den ULVs in Puffer ebenfalls deutlich größer (Abb. 42a). Während der Lagerung vergrößern sich die Liposomen schließlich nicht stärker als die in Puffer und die PDI-Werte sind über den gesamten Untersuchungszeitraum mit denen von ULVs in Puffer vergleichbar (Abb. 42b). Ähnlich wie beim DMSO kann demnach auch für das Glycerol eine durch die Präparation begünstigte Einlagerung der Moleküle in die Kopfgruppenbereiche der Liposomenmembran mit einem resultierenden Mehrbedarf an Lipidmolekülen pro Liposom angenommen werden. Dieser Effekt wird zudem von einer geringfügigen aber kontinuierlichen Fusion von ULVs überlagert.

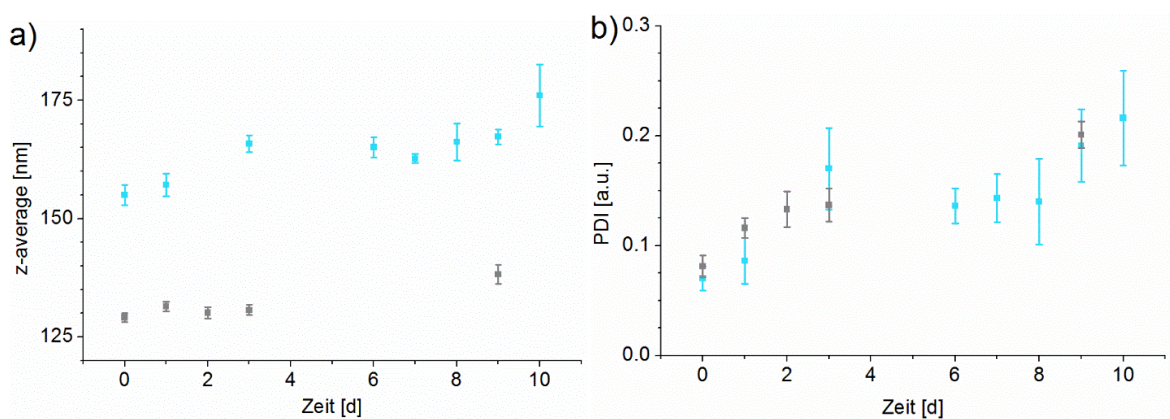


Abb. 42: Mittelwerte der Liposomendurchmesser (z-Average) (a) und des PDI (b) von SC-ULVs (CER[AP]:CHOL:SA) in Puffer (pH-Wert = 10) (grau) und in 10 % Glycerol in Puffer (pH-Wert = 10) (blau), in Abhängigkeit von der Lagerungszeit.

Der gemessene 6-CF-Leakage der ULVs in 10 % Glycerol ist bei allen drei untersuchten Modellen signifikant größer als bei der Referenz in Puffer (Abb. 43). Analog zu den Be-

obachtungen bei DMSO, tritt dieser *Leakage* direkt nach Zugabe des Enhancers auf und verändert sich dann nicht weiter. Hier kann ebenfalls von einer Zerstörung des gesamten Vesikels infolge der Solubilisierung ausgegangen werden. Allerdings wird auch nur ein sehr geringer Anteil an Liposomen beeinflusst, wie die eher geringen prozentualen *Leakage*-Werte zeigen. Für die unilamellaren SC-Liposomen bei einem pH-Wert von 10 ist der *Leakage* mit $3,4 \pm 0,9$ % nur geringfügig erhöht. Wird der pH-Wert dieser Mischung auf 7 abgesenkt, steigt der durch den Enhancer verursachte *Leakage* bereits auf $8,8 \pm 0,8$ % an. Da bei diesem pH-Wert auch die Referenzliposomen einen höheren *Leakage* aufweisen, kann, wie schon für Wasser beschrieben (Kapitel VI.2.1.4, S. 54), angenommen werden, dass die geformten Liposomen bei einem pH-Wert = 7 durch den geringen Deprotonierungsgrad instabiler bzw. anfälliger für äußere Einflüsse sind als Liposomen mit einem pH-Wert = 10.

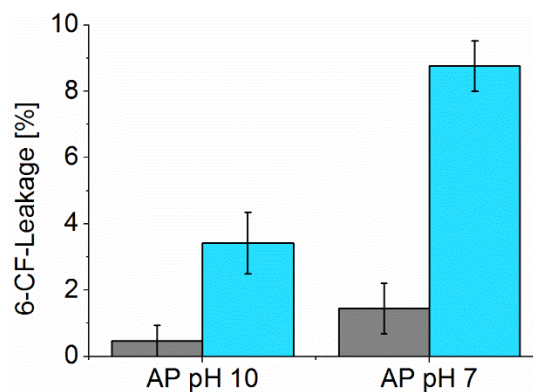


Abb. 43: 6-CF-Leakage von SC-ULVs (CER[AP]:CHOL:SA) in Puffer (pH-Wert = 7 bzw. 10, grau) und unter Zugabe von 10 % Glycerol in dem jeweiligen Puffer (hellblau).

2.5.4. ZUSAMMENFASSUNG

Mit den Ergebnissen der gewählten Untersuchungsmethoden kann eine umfangreiche Charakterisierung des Einflusses von Glycerol auf die verwendeten SC-Lipidmodellmembranen vorgenommen werden. Dabei wurde durch keine dieser Methoden ein deutlicher Einfluss des Glycerols auf die Struktur der SC-Lipidmodelle belegt. *Leakage*-Messungen der SC-Liposomen zeigen geringfügig erhöhte Werte, was auf die Anwesenheit einiger weniger stabiler Liposomen, die durch das Glycerol leicht solubilisiert werden können, hindeutet. Da der größte Teil der Liposomen jedoch unbeeinflusst bleibt, wird eine intensive Interaktion mit den Lipiden ausgeschlossen. Die mit Hilfe der PCS-Messungen detektierten, leicht vergrößerten ULVs können analog zu DMSO auf eine Einlagerung des Enhancers innerhalb der Liposomenmembran zurückgeführt werden. Da die Einlagerung durch die Art der Präparation begünstigt ist, kann hierbei ebenfalls keine direkte Interaktion mit den SC-Lipiden festgestellt werden. IR-Messungen zeigen darüber hinaus, dass Glycerol weder die Ordnung der Lipidketten noch die Kopfgruppenwechselwirkungen in multi- und oligolamellaren Sys-

temen signifikant beeinflusst. Eine verstärkte Einlagerung des Glycerols zwischen den Kopfgruppen benachbarter Bilayer, die mit einer Vergrößerung des lamellaren Wiederholabstandes verbunden ist, kann im Zuge von NR-Untersuchungen ebenfalls nicht beobachtet werden. Die Ergebnisse der Studien von Brinkmann et al., bei denen eine Zunahme des lamellaren Wiederholabstandes aufgrund der Einlagerung der Enhancer zwischen benachbarte Bilayer beobachtet wurde und auch eine Einlagerung des Glycerols zwischen nebeneinanderliegenden Lipiden innerhalb eines Bilayers vermutet wird¹⁶¹, konnten demnach nicht bestätigt werden. In diesen Untersuchungen wurde allerdings komplexes humanes SC verwendet und der Einfluss des Glycerols besonders in Bereichen mit orthorhombisch orientierten Ketten beobachtet, wohingegen hexagonale Bereiche nicht beeinflusst wurden. Wie IR-Messungen zeigen, sind in den hier vorgestellten Modellen jedoch keine orthorhombischen, sondern vielmehr hexagonal orientierte Kettenbereiche vertreten, was ebenfalls den ausbleibenden Effekt in diesem Modell erklären würde. Zusätzlich wurden die SC-Proben in den Untersuchungen von Brinkmann et al., statt bei den hier verwendeten 100 %, nur bei 75 % relativer Luftfeuchte vorbehandelt. Es kann daher vermutet werden, dass das Ausgangshydratationsniveau eine entscheidende Rolle bei Untersuchungen des Einflusses von Glycerol spielt. Neueste Untersuchungen von Pham et al. unterstützen dabei diese Theorie. Hier konnte, analog zu den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen, kein zusätzlicher Einfluss von Glycerol auf die Ordnung der Lipide bei vollständig hydratisiertem SC beobachtet werden¹²⁹. Insgesamt lassen die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungsmethoden vermuten, dass sich Glycerol zwar in geringem Ausmaß im Bereich der Kopfgruppen, und hier vor allem zwischen benachbarten Bilayern, anlagert, im Vergleich zu Wasser jedoch keine zusätzlichen strukturellen Veränderungen in den SC-Lipidmodellen induziert. Für das SC könnte das bedeuten, dass die Anwesenheit von Glycerol dafür sorgt, dass ähnliche Bedingungen wie bei Anwesenheit von Wasser geschaffen werden, sodass selbst unter trockenen Bedingungen keine größeren strukturellen Veränderungen zu erwarten sind. In Bezug auf die penetrationsfördernde Wirkung von Glycerol ist aufgrund der Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen ein direkter Einfluss auf die Struktur der Lipidmatrix als Wirkmechanismus unwahrscheinlich. Die in der Literatur beschriebene vermehrte Wasseraufnahme im SC als Folge des großen Wasserbindungsvermögens des Glycerols kann an dieser Stelle nicht bewertet werden, da diese nur im Fall von nicht vollständig hydratisierten Proben untersucht werden kann. Die in dieser Arbeit verwendeten Ausgangsmodelle liegen jedoch vollständig hydratisiert vor, sodass nur der zusätzlich entstehende Effekt durch den Enhancer beobachtet wird.

2.6. PROPYLENGLYKOL

Propylenglykol (PG) ist eines der am häufigsten in der Dermatopharmazie verwendeten Co-Solventien. Es permeiert sehr schnell durch das SC und kann durch seine Eigenschaft als Co-Solvens den Arzneistoff mit in das Gewebe hineinziehen („solvent drag effect“)¹⁶². Diese Theorie wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Eindringtiefe des Arzneistoffs in die Haut mit der Eindringtiefe des PG zusammenhängt¹⁶³. Obwohl synergistische Effekte mit Enhancern wie Ölsäure, Azonen und Terpenen bekannt sind^{161, 164}, in denen PG hauptsächlich als Vehikel dient, gibt es verschiedene Studien, die PG als eigenständigen Penetrationsenhancer herausstellen. Hierbei wird vermutet, dass PG sich sowohl in senkrechter als auch in lateraler Richtung zur Membranebene zwischen den hydrophilen Kopfgruppen einlagert und so unter anderem den lamellaren Wiederholabstand vergrößert¹⁶¹. Durch die Anreicherung im Kopfgruppenbereich der SC-Lipide werden dort die Löslichkeitseigenschaften für den Arzneistoff erhöht, was wiederum zu einem vermehrten Übertritt des Arzneistoffs aus der Formulierung in das Gewebe führt^{165, 166}. Bezüglich des Einflusses auf die Lipidketten gibt es allerdings gegensätzliche Untersuchungsergebnisse. 1987 postulierten Barry und Bennett¹⁶⁷ eine Modifizierung der unpolaren Route durch PG, während Bouwstra et al. in ihren Untersuchungen eine Einlagerung des PG im Bereich der Lipidketten ausschlossen¹²⁷. Folglich soll an dieser Stelle untersucht werden, ob tatsächlich ein direkter Einfluss des PG auf die verwendete SC-Lipidmischung, sowohl im Kopfgruppen- als auch im Lipidkettenbereich, nachgewiesen werden kann.

2.6.1. MULTILAYER

IR-Spektren vor und nach Zugabe von 10 % PG zu dem multilamellaren SC-Lipidmodell (Probe1) zeigen die Abb. 54, Anhang A, S. 110) dargestellten Verläufe. Die dazugehörigen Bandenpositionen und die der beiden weiteren untersuchten Proben sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Bei den für die Kopfgruppen charakteristischen Banden ergibt sich weder für die $\nu(\text{CO})$ der SA, noch für die Amid-I- oder Amid-II-Bande eine signifikante Positionsveränderung. Leidglich der bereits für Glycerol beschriebene Trend der Verschiebung der Amid-I-Bande der weniger stark wasserstoffbrückengebundenen Spezies bei $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ zu höheren Wellenzahlen ist erkennbar. Insgesamt kommt es durch PG jedoch nicht zu einer signifikanten Beeinflussung der im Bereich der Amidgruppe oder SA ausgebildeten HBBs. Die Positionen der symmetrischen und asymmetrischen CH_2 -Valenzschwingungen, sowie die Position der Bande bei $\sim 1466 \text{ cm}^{-1}$ verändern sich, wie bereits bei den anderen Enhancern gezeigt, nicht. Ein Einfluss auf die Kettenordnung der Lipide kann demnach auch für PG nicht beobachtet werden.

Tabelle 19: Charakteristische IR-Bandenpositionen [cm^{-1}] eines multilamellaren SC-Lipidmodells (CER[AP]:CHOL:SA) vor und nach Zugabe von 10 % Propylenglykol. Die Positionen von schwach ausgeprägten Banden können dabei nicht zuverlässig ermittelt werden (n.b.).

Bande	Probe 1		Probe 2		Probe 3	
	H ₂ O-Referenz	PG 10 %	H ₂ O-Referenz	PG 10 %	H ₂ O-Referenz	PG 10 %
$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	$2915,5 \pm 0,1$	$2915,4 \pm 0,1$	$2914,5 \pm 0,1$	$2914,5 \pm 0,1$	$2914,9 \pm 0,1$	$2914,8 \pm 0,1$
$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$	$2849,2 \pm 0,1$	$2849,3 \pm 0,1$	$2848,4 \pm 0,1$	$2848,4 \pm 0,1$	$2848,7 \pm 0,1$	$2848,8 \pm 0,1$
$\nu(\text{CO})$	$1721,9 \pm 0,3$	$1721,9 \pm 0,2$	$1723,0 \pm 0,1$	$1723,3 \pm 0,1$	$1722,7 \pm 0,1$	$1722,9 \pm 0,1$
	--	--	--	--	$1700,0 \pm 0,2$	$1700,1 \pm 0,2$
Amid-I	$1638,3 \pm 0,1$	$1638,8 \pm 0,1$	$1638,5 \pm 0,2$	$1638,6 \pm 0,2$	$1638,2 \pm 0,2$	$1638,4 \pm 0,2$
	n.b.	n.b.	$1619,2 \pm 0,1$	$1619,2 \pm 0,1$	$1619,9 \pm 0,1$	$1620,1 \pm 0,1$
Amid-II	$1540,3 \pm 0,1$	$1540,5 \pm 0,1$	$1540,2 \pm 0,1$	$1540,2 \pm 0,1$	$1540,0 \pm 0,1$	$1540,6 \pm 0,1$
$\delta(\text{CH}_2)$	$1466,4 \pm 0,1$	$1466,2 \pm 0,1$	$1465,9 \pm 0,1$	$1465,8 \pm 0,1$	$1466,2 \pm 0,1$	$1466,1 \pm 0,1$

2.6.2. OLIGOLAYER

Die Bandenpositionen der IR-Messungen an Oligolayern (Tabelle 20) zeigen weder im Bereich der für die Kopfgruppen ($\nu(\text{CO})$) noch der für die Ketten charakteristischen Banden ($\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$, $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$) eine signifikante Verschiebung durch die Einwirkung des PG. Es kann folglich weder eine Beeinflussung der Kopfgruppen- noch der Kettenregion beobachtet werden. Die im Rahmen der IR-Untersuchung an Multilayern tendenzielle Bandenverschiebung für die Amid-I-Bande konnte für die Oligolayer nicht verfolgt werden, da diese aufgrund der geringen Probenschichtdicke nicht detektierbar war.

Tabelle 20: IR-Bandenpositionen [cm^{-1}] eines oligolamellaren SC-Lipidmodells (CER[AP]:CHOL:SA), vor und nach Zugabe von 10 % PG.

Bande	H ₂ O-Referenz	PG 10 %
$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	$2917,9 \pm 0,1$	$2918,0 \pm 0,1$
$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$	$2849,9 \pm 0,1$	$2849,8 \pm 0,1$
$\nu(\text{CO})$	$1717,3 \pm 0,4$	$1716,8 \pm 0,4$

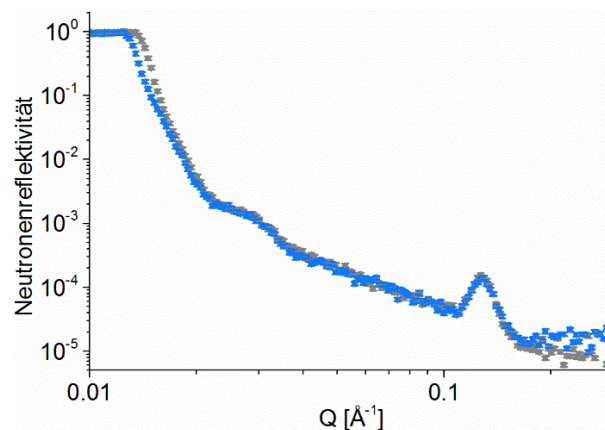


Abb. 44: NR-Kurven einer oligolamellaren Probe (CER[AP]:CHOL:SA), gemessen gegen D₂O (grau) und anschließend gegen 10 % PG in D₂O (blau).

Der Kurvenverlauf der simultanen NR-Messung ist vor und nach Zugabe des PG nahezu identisch (Abb. 44). Die bestimmten *Bragg Peak*-Positionen von $0,1304 \pm 0,0002 \text{ \AA}^{-1}$ vor bzw. $0,1301 \pm 0,0002 \text{ \AA}^{-1}$ nach Enhancerzugabe unterscheiden sich nicht. Lediglich die kritische Kante ist aufgrund der unterschiedlichen SLDs von D₂O und 10 % PG in D₂O leicht verschoben, gibt aber keinen Grund zu der Annahme einer enhancerinduzierten Veränderung der Lipidstruktur, da sich im weiteren Kurvenverlauf keine Unterschiede ergeben.

2.6.3. LIPOSOMEN

Ähnlich wie DMSO und Glycerol, kann auch bei PG eine initiale Vergrößerung des z-average auf bis zu $164,3 \pm 1,7 \text{ nm}$ beobachtet werden (Abb. 45a). Die zeitabhängigen PCS-Untersuchungen der ULVs zeigen ebenfalls vergleichbare Ergebnisse wie die Untersuchungen an DMSO und Glycerol. Dabei sind sowohl die Vergrößerung der Liposomendurchmesser als auch die PDI-Werte und deren Anstieg mit denen in Puffer vergleichbar (Abb. 45a und b). Folglich kann auch für PG ein kombinierter Effekt aus der Einlagerung in die Kopfgruppenbereiche der Liposomenmembran und dem geringfügigen aber kontinuierlichen Zusammenfließen von Liposomen als Erklärung für die Vergrößerung der ULVs dienen.

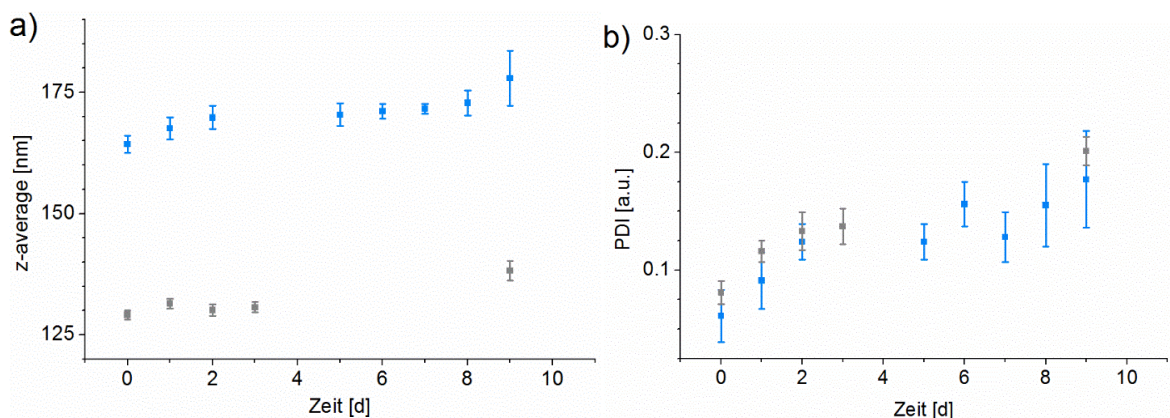


Abb. 45: Mittelwerte der Liposomendurchmesser (*z-Average*) (a) und des *PDI* (b) von SC-ULVs (CER[AP]:CHOL:SA) in Puffer (pH-Wert = 10) (grau) und in 10 % PG in Puffer (pH-Wert = 10) (blau), in Abhängigkeit von der Lagerungszeit.

Der ermittelte *Leakage* unilamellarer Liposomen von $8,0 \pm 2,1 \%$ bei einem pH-Wert von 10 und $9,3 \pm 0,8 \%$ bei einem pH-Wert von 7 unterscheidet sich nicht signifikant (Abb. 46). Beide Werte sind jedoch höher als die der Liposomen in Puffer von $0,5 \pm 0,4 \%$ bei einem pH-Wert von 10 und $1,4 \pm 0,8 \%$ bei einem pH-Wert von 7. Insgesamt kann dieser *Leakage* mit weniger als 10 % jedoch als eher gering betrachtet werden. Wie bereits für die anderen Enhancer diskutiert, ist dafür wahrscheinlich die inhomogene Zusammensetzung der Liposomen verantwortlich. Dadurch entsteht auch ein geringer Anteil an instabileren Liposomen, die durch den Enhancer leichter angegriffen werden können. Für das Ausmaß des Einflusses von PG hat der pH-Wert, ähnlich wie bei Glycerol, jedoch keinen Einfluss.

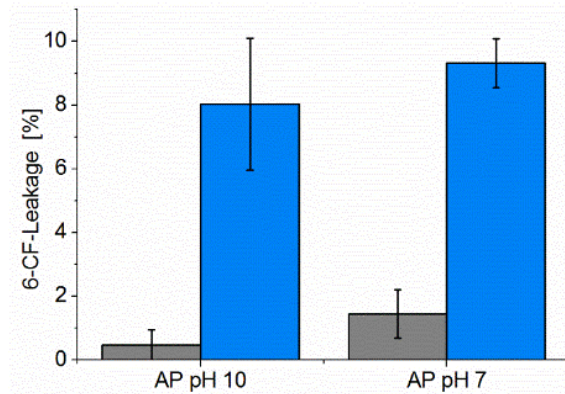


Abb. 46: 6-CF-Leakage von SC-ULVs (CER[AP]:CHOL:SA) in Puffer (pH-Wert = 7 bzw. 10) (grau) und unter Zugabe von 10 % PG in dem jeweiligen Puffer (blau).

2.6.4. ZUSAMMENFASSUNG

Da in Untersuchungen von Hoogstraate et al. keine Aufnahme von PG in die Korneozyten beobachtet werden konnte¹⁶⁸, ist dessen penetrationsfördernder Effekt wahrscheinlich im Bereich der Lipidmatrix lokalisiert. Die Ergebnisse der im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen liefern dabei neue Erkenntnisse, die zur Eingrenzung der Ursache dieses Effektes beitragen. NR-Messungen zeigen, dass durch die Anwendung von PG keine Veränderung des lamellaren Wiederholabstandes erfolgt. Dieser Zusammenhang konnte bereits im Rahmen von SAXS-Messungen an exzidiertem humanem SC beobachtet werden^{127, 169}. Da das PG-Molekül relativ klein ist, wäre dennoch eine Einlagerung zwischen den Kopfgruppen in laterale und senkrechte Richtung, ähnlich dem von Brinkmann aufgezeigten Modell, denkbar¹⁶¹, ohne dass sich dabei der lamellare Wiederholabstand verändert. Die durchgeführten IR-Messungen zeigen allerdings weder einen signifikanten Einfluss des PG auf die HBBs in den polaren Bereichen der Bilayer, noch eine Veränderung der Ordnung der Lipidketten. Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit IR-Untersuchungen von Boncheva et al., bei denen an exzidiierter Humanhaut ebenfalls kein signifikanter Einfluss des PG auf die SC-Lipidkettenordnung ermittelt werden konnte⁹². Eine Einlagerung in lateraler oder senkrechter Richtung dürfte demnach nur so geringfügig ausgeprägt sein, dass die HBBs und Lipidkettenordnung nicht beeinflusst werden. Dieser Effekt würde allerdings nicht ursächlich für die penetrationsfördernde Wirkung des PG sein. Auch die im Rahmen der PCS-Messungen aufgezeigte Vergrößerung des Liposomendurchmessers ist kein eindeutiges Indiz für eine Einlagerung des PG in eine intakte Membran. In diesem Fall ist der Enhancer bereits bei der Ausbildung der Membran beteiligt und seine Einlagerung somit begünstigt. Eine nachträgliche Einlagerung kann zudem nicht festgestellt werden. Insgesamt deuten die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungsmethoden darauf hin, dass der eigentliche Effekt des PG, wie bereits in der Literatur beschrieben, darauf beruht die Löslichkeit der Arzneistoffe in der Lipidmatrix und damit deren Penetrationsvermögen zu erhöhen. In die-

sem Zusammenhang gibt es Penetrationsstudien, die eine zunehmende Arzneistoffpenetration mit steigenden PG-Konzentrationen belegen¹⁷⁰. Es konnte darüber hinaus aufgezeigt werden, dass der Einfluss des PG in Bezug auf die Lipidmatrix nicht stärker ausgeprägt ist, als der von Wasser selbst¹¹⁴. Lediglich in Kombination mit anderen Penetrationenhancern kann ein über den Effekt des Wassers hinausgehender Einfluss vermutet werden¹¹⁴. Bei den in dieser Arbeit vorliegenden Untersuchungen werden die Effekte des PG jedoch immer im Vergleich zu dem System in wässriger Lösung, welches vollständig hydratisiert vorliegt, bewertet. Dieser Sachverhalt wäre eine mögliche und zudem sehr wahrscheinliche Erklärung für die ausbleibenden Veränderungen in Bezug auf die SC-Lipidstruktur.

2.7. PENTANDIOLE

Die Fähigkeit der zwei Regioisomere 1,5-Pentandiol (1,5-Pd) und 1,2-Pentandiol (1,2-Pd) zur Verbesserung der perkutanen Penetration ist bereits beschrieben^{171, 172, 173}. Bezüglich des genauen Wirkungsmechanismus von 1,2- und 1,5-Pd als Penetrationsenhancer gibt es bislang allerdings keine Studien. Aufgrund ihrer zusätzlich antimikrobiellen, konservierenden und lösungsvermittelnden Eigenschaften^{174, 175, 176} sind diese beiden Penetrationsenhancer besonders vorteilhafte Zusatzstoffe in topischen Formulierungen. Obwohl durch die unterschiedliche Lokalisierung der OH-Gruppe der beiden Regioisomere einerseits eine typisch amphiphile und andererseits eine bolaamphiphil-ähnliche Struktur resultiert (Abb. 4), sind die physikochemischen Eigenschaften beider Substanzen ziemlich ähnlich (GESTIS Substanzdatenbank). Dennoch ist es aufgrund der strukturellen Verschiedenartigkeit denkbar, dass bei der Wechselwirkung beider Regioisomere mit SC-Lipiden Unterschiede auftreten. Deshalb werden im Folgenden mögliche Interaktionen der beiden Substanzen mit den hier gewählten SC-Lipidmodellen untersucht.

2.7.1. MULTILAYER

IR-Messungen an multilamellaren Lipidmodellen ergeben unter Einwirkung von 10 % 1,5-Pd bzw. 10 % 1,2-Pd im Vergleich zu Wasser die in Abb. 55 (Anhang A, S. 111) beispielhaft für jeweils eine Probe dargestellten Spektrenverläufe. Die dazugehörigen Bandenpositionen, sowie die der zwei weiteren vermessenen Proben sind in Tabelle 21 zu finden. Für beide Enhancer können dabei weder für die CH₂-Valenzschwingungen, noch für die unaufgespaltene CH₂-Deformationsschwingung Veränderungen beobachtet werden. Demnach sind beide Moleküle nicht in der Lage, die hexagonale Kettenpackung sowie die Lipidkettenkonformation in dem multilamellaren System zu beeinflussen. Die Positionen der $\nu(\text{CO})$ der SA zeigen für beide Moleküle an vereinzelt Stellen signifikante Veränderungen. Diese treten jedoch nicht konsistent in allen Proben auf bzw. sind sogar teilweise widersprüchlich. Eine durch die Pentandiole hervorgerufene Veränderung des HBB-Netzwerkes der SA ist folglich nicht eindeutig nachweisbar. Im Bereich der Amid-I-Bande treten ebenfalls für keinen der beiden Enhancer nach dessen Zugabe signifikante Bandenverschiebungen auf, sodass auch die von der C=O-Gruppe des CER[AP] ausgebildeten HBBs nicht beeinflusst werden. Für die Position der Amid-II-Bande kann nach Zugabe von 1,2-Pd eine für alle drei untersuchten Proben signifikante Verkleinerung der Wellenzahlen erfasst werden. Die Ausbildung von HBBs im Bereich der N-H-Gruppe des CER[AP] wird demzufolge durch die Anwesenheit des 1,2-Pd abgeschwächt. Grund dafür könnte beispielsweise die Einlagerung des 1,2-Pd im Bereich der Kopfgruppen sein, die folglich die Wechselwirkungen der Lipidkopfgruppen

untereinander behindert. Im Gegensatz dazu kann bei Messungen mit 1,5-Pd kein einheitlicher Trend für die Verschiebung der Amid-II-Bande beobachtet werden.

Tabelle 21: Charakteristische IR-Bandenpositionen [cm^{-1}] eines multilamellaren SC-Lipidmodells (CER[AP]:CHOL:SA) vor und nach Zugabe von 10 % 1,5-Pd bzw. 1,2-Pd. Die Positionen von schwach ausgeprägten Banden können dabei nicht zuverlässig ermittelt werden (n.b.).

Bande	Probe 1		Probe 2		Probe 3	
	H ₂ O-Referenz	1,5-Pd 10 %	H ₂ O-Referenz	1,5-Pd 10 %	H ₂ O-Referenz	1,5-Pd 10 %
$\nu_{as}(\text{CH}_2)$	2914,9 ± 0,1	2914,7 ± 0,1	2914,6 ± 0,1	2914,7 ± 0,1	2914,6 ± 0,1	2914,6 ± 0,1
$\nu_s(\text{CH}_2)$	2848,6 ± 0,1	2848,6 ± 0,1	2848,4 ± 0,1	2848,4 ± 0,1	2848,4 ± 0,1	2848,4 ± 0,1
$\nu(\text{CO})$	1722,1 ± 0,1	1722,2 ± 0,1	1722,7 ± 0,1	1722,8 ± 0,1	1718,6 ± 0,1	1720,8 ± 0,2
	1700,0 ± 0,1	1700,2 ± 0,1	1701,9 ± 0,1	1701,8 ± 0,1	1700,5 ± 0,1	1701,0 ± 0,1
	n.b.	n.b.	1686,4 ± 0,1	1684,5 ± 0,1	1684,7 ± 0,1	1684,7 ± 0,1
Amid-I	1638,5 ± 0,1	1638,7 ± 0,1	1638,7 ± 0,2	1638,6 ± 0,2	1639,2 ± 0,2	1639,0 ± 0,1
	1619,5 ± 0,1	1619,5 ± 0,1	1619,2 ± 0,1	1619,1 ± 0,1	1619,1 ± 0,1	1619,1 ± 0,1
Amid-II	1540,1 ± 0,1	1540,6 ± 0,1	1540,1 ± 0,1	1539,8 ± 0,1	1540,0 ± 0,1	1539,9 ± 0,1
$\delta(\text{CH}_2)$	1465,9 ± 0,1	1465,8 ± 0,1	1465,9 ± 0,1	1465,9 ± 0,1	1466,0 ± 0,1	1466,0 ± 0,1

Bande	Probe 1		Probe 2		Probe 3	
	H ₂ O-Referenz	1,2-Pd 10 %	H ₂ O-Referenz	1,2-Pd 10 %	H ₂ O-Referenz	1,2-Pd 10 %
$\nu_{as}(\text{CH}_2)$	2914,7 ± 0,1	2914,8 ± 0,1	2914,7 ± 0,1	2914,8 ± 0,1	2915,0 ± 0,1	2915,0 ± 0,1
$\nu_s(\text{CH}_2)$	2848,4 ± 0,1	2848,4 ± 0,1	2848,3 ± 0,1	2848,3 ± 0,1	2848,6 ± 0,1	2848,7 ± 0,1
$\nu(\text{CO})$	n.b.	n.b.	n.b.	1722,7 ± 0,1	1722,4 ± 0,2	1722,7 ± 0,2
	1701,1 ± 0,1	1701,1 ± 0,1	1701,1 ± 0,1	1701,5 ± 0,1	1699,5 ± 0,1	1699,3 ± 0,1
Amid-I	1638,6 ± 0,1	1638,5 ± 0,1	1638,2 ± 0,2	1637,9 ± 0,2	1638,6 ± 0,2	1638,5 ± 0,1
	1619,4 ± 0,1	1619,6 ± 0,1	1619,2 ± 0,1	1619,3 ± 0,1	1619,8 ± 0,1	1619,9 ± 0,1
Amid-II	1540,0 ± 0,1	1539,7 ± 0,1	1540,0 ± 0,1	1539,7 ± 0,1	1539,5 ± 0,1	1539,2 ± 0,1
$\delta(\text{CH}_2)$	1465,8 ± 0,1	1465,8 ± 0,1	1465,9 ± 0,1	1466,0 ± 0,1	1465,9 ± 0,1	1465,8 ± 0,1

2.7.2. OLIGOLAYER

IR-Messungen an Oligolayern zeigen nach Zugabe von 1,5-Pd keinerlei Verschiebungen der Bandenpositionen für die $\nu(\text{CO})$ der SA. Im Zuge der Messungen mit 1,2-Pd kann überdies keine Bande der $\nu(\text{CO})$ der SA detektiert werden. Somit ist analog zu den IR-Messungen an multilamellaren Lipidmodellen kein Einfluss der beiden Enhancer auf das HBB-Netzwerk der SA erkennbar (Tabelle 22). Im Bereich der CH_2 -Valenzschwingungen sind ebenfalls keine enhancerinduzierten Positionsveränderungen beobachtbar, sodass von einer nach wie vor sehr hohen Kettenordnung ausgegangen werden kann.

Tabelle 22: IR-Bandenpositionen [cm^{-1}] eines oligolamellaren SC-Lipidmodells (CER[AP]:CHOL:SA), vor und nach Zugabe von 10 % 1,2-Pd bzw. 10 % 1,5-Pd.

Bande	D ₂ O-Referenz	1,5-Pd 10 %	D ₂ O-Referenz	1,2-Pd 10 %
$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	$2918,2 \pm 0,1$	$2918,2 \pm 0,1$	$2917,6 \pm 0,1$	$2917,6 \pm 0,1$
$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$	$2850,3 \pm 0,1$	$2850,2 \pm 0,1$	$2849,9 \pm 0,1$	$2850,1 \pm 0,1$
$\nu(\text{CO})$	$1716,8 \pm 0,2$	$1716,8 \pm 0,2$	--	--

Für die simultane NR-Messung des oligolamellaren Lipidmodells gegen D₂O und anschließend gegen 1,5-Pd ergeben sich die in Abb. 47 dargestellten Kurvenverläufe (graue bzw. pinke Quadrate). Gemäß der Peakanalyse (Kapitel V.1.1.1, S. 18) lässt sich für die SC-Lipidmischung gegen D₂O eine Gesamtschichtdicke von $200,7 \pm 6,4 \text{ \AA}$ berechnen, die sich nach Zugabe von 1,5-Pd mit einem Wert von $200,6 \pm 6,4 \text{ \AA}$ nicht verändert. Die *Bragg Peak*-Positionen, die Auskunft über die Bilayerschichtdicke geben, lassen sich für die Mischung gegen D₂O zu $0,1285 \pm 0,0003 \text{ \AA}^{-1}$ und gegen 1,5-Pd zu $0,1291 \pm 0,0003 \text{ \AA}^{-1}$ ermitteln. Sie geben ebenfalls keinen Anhaltspunkt für eine Veränderung des Wiederholabstandes nach Enhancerzugabe. Unterschiede im NR-Kurvenverlauf ergeben sich lediglich für die Ausbildung des ersten Minimums und die kritische Kante, welche jedoch auf die unterschiedlichen SLDs der Medien zurückzuführen ist. Um festzustellen, ob die unterschiedliche Ausbildung des ersten Minimums mit einer Veränderung der Probenstruktur zusammenhängt, wurde eine Analyse der Kurvenverläufe mittels optischer Matrixmethode durchgeführt (Abb. 47 und Tabelle 30, Anhang A, S. 111). Da die NR-Kurven aufgrund der in diesem Fall weniger orientierten Lipidstruktur nur sehr schwach ausgeprägte Oszillationen zeigen, ist die Erzeugung eines aussagekräftigen Modells erschwert. Ausgehend von dem Vorwissen über dieses System und unter Berücksichtigung der χ^2 -Werte der angewendeten Fits für verschiedene Modelle, sind die nachfolgend vorgestellten Modelle die Wahrscheinlichsten. Dabei ist der übliche fünfschichtige Aufbau, allerdings mit nur geringfügiger Abnahme des Bedeckungsgrades mit zunehmender Entfernung von der Waferoberfläche, zu erkennen. Im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Modellen, enthält die PEI-Schicht in diesem Fall kaum Medium. Ursächlich dafür könnte der relativ hohe Bedeckungsgrad der Lipidschicht in den wafernahen Bereichen sein, welcher eine Penetration des Mediums in die PEI-Schicht verhindert. Durch die Zugabe von 1,5-Pd ist in den wafernahen Schichten eine Zunahme des Mediumanteils zu erkennen, während in den äußeren Schichten eine Abnahme des Mediumanteils resultiert (Tabelle 23). Eine tatsächlich vermehrte Einlagerung des Mediums ist allerdings fragwürdig, da sich die Bereiche der Kopfgruppen tendenziell nicht vergrößern und auch sonst keine einheitlichen Schichtdickenveränderungen innerhalb der verschiedenen Bilayerbereiche sichtbar sind (Tabelle 30, Anhang A, S. 111). Stattdessen könnte durch die Anwesenheit des 1,5-Pd ein Teil der Lipide aus der Schicht herausgelöst werden, was sich eben-

falls in einem Anstieg der Mediumanteile widerspiegeln würde. Dies würde auch die geringfügige Abnahme der Gesamtschichtdicke erklären. In den äußeren Membranbereichen wird dieser Effekt möglicherweise durch die verstärkte Anlagerung von 1,5-Pd an die Lipide überlagert. Aufgrund der bolaamphiphilen Struktur ist eine Wechselwirkung mit den SC-Lipiden im Gegensatz zu Wechselwirkungen der Enhancermoleküle untereinander wohlmöglich bevorzugt. Vor allem im Bereich der Lipidketten ist die Grenzflächenspannung durch den geringen Bedeckungsgrad der Lipidschicht in den äußeren Membranbereichen relativ groß. Die Anlagerung des amphiphilen 1,5-Pd an diese Grenzflächen würde die Grenzflächenspannung reduzieren und wäre somit energetisch begünstigt. Durch die erhöhte Konzentration von 1,5-Pd mit einer geringeren SLD als die wässrige Lösung in diesen Bereichen wird eine Verringerung des Mediumanteils aufgrund sinkender SLDs suggeriert.

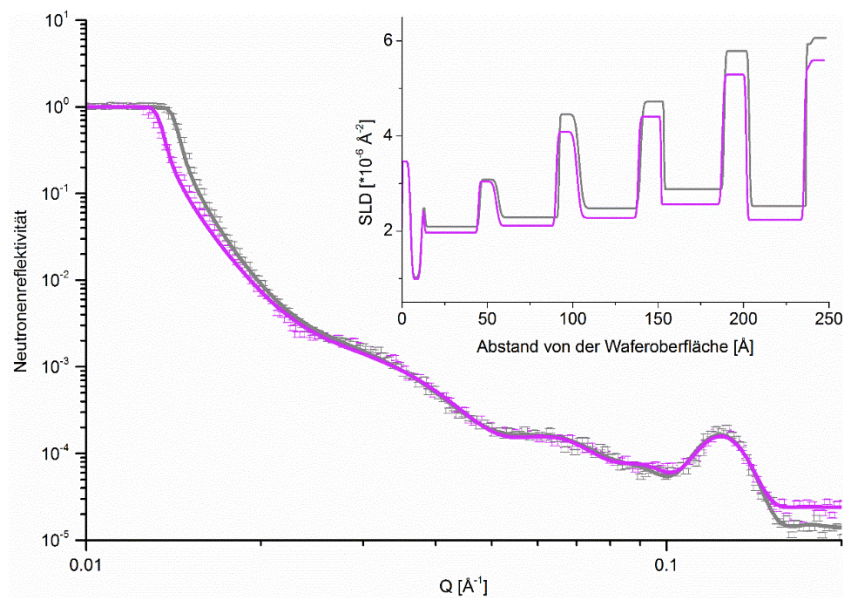


Abb. 47: NR-Kurven einer oligolamellaren Probe (CER[AP]:CHOL:SA), gemessen gegen D₂O (graue Quadrate) und anschließend gegen 10 % 1,5-Pd in D₂O (pinke Quadrate). Die jeweiligen Fits sind als Linien der gleichen Farbe und die dazugehörigen SLD-Profile als Einschub oben rechts dargestellt.

Tabelle 23: Mediumanteile [%] gemäß der SLD-Profile aus Abb. 47 (Auszug aus Tabelle 30, Anhang A, S. 111).

	D ₂ O	1,5-Pd 10 %
Wafer		
Köpfe	27,2	29,6
Ketten	37,1	37,9
Köpfe	36,5	39,6
Ketten	40,2	40,4
Köpfe	65,8	64,5
Ketten	43,2	43,3
Köpfe	71,4	71,9
Ketten	49,5	48,1
Köpfe	94,2	92,9
Ketten	43,9	42,5
Köpfe	97,2	96,0
Medium		

Die aus den Messungen des oligolamellaren Lipidmodells gegen D₂O und anschließend gegen 1,2-Pd resultierenden NR-Kurven sind in Abb. 48 dargestellt (graue bzw. grüne Quadrate). Die deutlich erkennbaren und definierten Oszillationen indizieren eine sehr gut orientierte Probe. Bei der vergleichenden Betrachtung der Kurvenverläufe kann bereits eine Veränderung der Probenstruktur vermutet werden, da nach Zugabe des 1,2-Pd die Minima und Maxima der Peaks weniger gut ausgeprägt sind als zuvor. Als Ursache dafür ist eine Abnahme der Lipidordnung naheliegend. Darüber hinaus verschieben sich die Positionen der einzelnen Peaks zu größeren Werten (Tabelle 24).

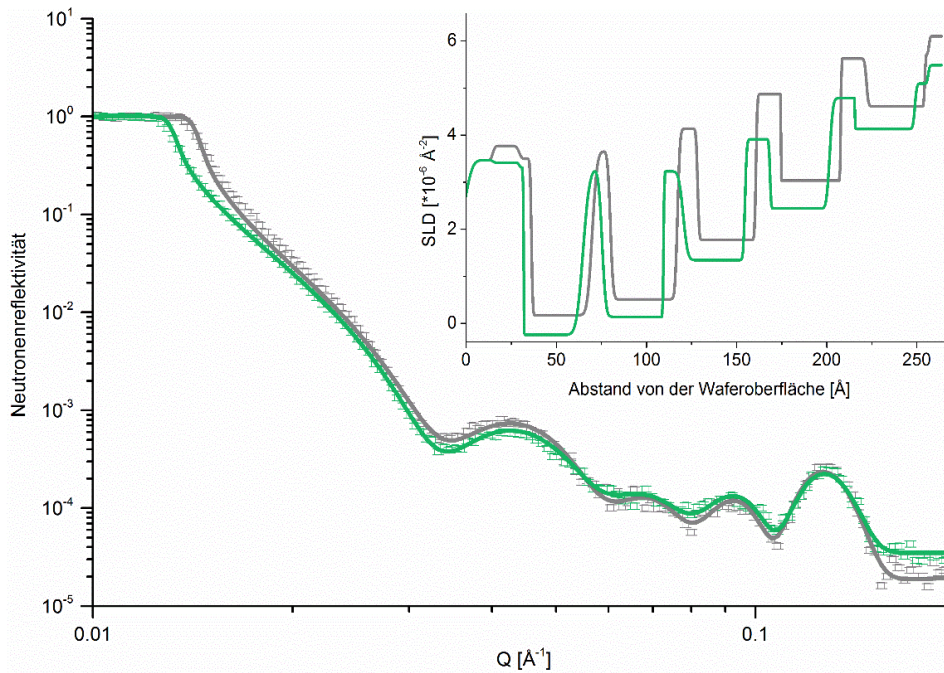


Abb. 48: NR-Kurven einer oligolamellaren Probe (CER[AP]:CHOL:SA), gemessen gegen D_2O (graue Quadrate) und anschließend gegen 10 % 1,2-Pd in D_2O (grüne Quadrate). Die jeweiligen Fits sind als Linien der gleichen Farbe und die dazugehörigen SLD-Profile als Einschub oben rechts dargestellt.

Tabelle 24: Peakpositionen der Kiessig-Oszillationen und Bragg Peaks [\AA^{-1}] aus den NR-Kurven eines oligolamellaren Lipidmodells, dargestellt in Abb. 48, gemessen gegen D_2O und anschließend gegen 10 % 1,2-Pd in D_2O .

Peakposition	1	2	3	4	t [\AA]
D_2O -Referenz	$0,0469 \pm 0,0002$	$0,0737 \pm 0,0014$	$0,0973 \pm 0,0005$	$0,1322 \pm 0,0003$	$222,6 \pm 7,8$
1,2-Pd 10 %	$0,0490 \pm 0,0003$	--	$0,0989 \pm 0,0008$	$0,1329 \pm 0,0003$	$226,6 \pm 9,1$

Ein signifikanter Unterschied der Gesamtschichtdicken resultiert allerdings aufgrund der großen Standardabweichung nicht. Für eine genauere Betrachtung der Veränderungen der Probenstruktur sind die mittels optischer Matrixmethode ermittelten Fits der NR-Kurven und die dazugehörigen SLD-Profile ebenfalls in Abb. 48 dargestellt (Fitparameter siehe Tabelle 31, Anhang A, S. 112). Das SLD-Profil zeigt ebenfalls den charakteristischen fünfschichtigen Aufbau mit einer Gesamtschichtdicke von etwa 257 \AA und einem großen Anteil an Medium in den Kopfgruppenregionen. Infolge des Austausches von D_2O durch die 1,2-Pd-Lösung nimmt der Anteil des Mediums, sowohl in den Kopfgruppen, als auch in den Kettenregionen ab (Tabelle 25). Ursächlich dafür könnte eine vermehrte Einlagerung von 1,2-Pd in die Lipidbilayer sein. Die im Vergleich zu dem wässrigen Medium niedrige SLD des 1,2-Pd von $-0,002 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ würde die vermeintliche Verringerung der Mediumanteile bewirken. Das amphiphile Molekül lagert sich dabei mit dem hydrophilen Teil im Bereich der Kopfgruppen und mit dem lipophilen Rest im Bereich der Lipidketten in die Bilayer ein. Eine wie bei 1,5-Pd beschriebene Ablösung der Lipide, die zu einer Zunahme der Mediumanteile

führt, kann hier nicht direkt beobachtet werden, ist aber auch nicht auszuschließen, da der Effekt durch die verstärkte Anlagerung des 1,2-Pd überlagert sein könnte. Die zunehmenden Rauigkeiten könnten in diesem Zusammenhang durch einen abnehmenden Bedeckungsgrad bedingt sein und somit eine Ablösung der Lipide indizieren. Andererseits könnte eine aufgelockerte Lipidstruktur für die zunehmenden Rauigkeiten verantwortlich sein. In der Folge würde sich die Beweglichkeit der Lipide erhöhen, wodurch die Dicken der einzelnen Schichten tendenziell abnehmen würden. Diese Theorie kann allerdings durch IR-Messungen nicht bestätigt werden.

Tabelle 25: Schichtdicken [\AA], Mediumanteile [%] und Rauigkeiten σ [\AA] gemäß der SLD Profile aus Abb. 48 (Auszug aus Tabelle 31, Anhang A, S. 112)

Wafer	D ₂ O-Referenz			1,2-Pd		
	Dicke	Medium	σ	Dicke	Medium	σ
Köpfe	6,8	45,0	1,12	2,4	47,2	0,59
Ketten	33,7	6,7	0,56	33,0	0,1	0,16
Köpfe	10,1	48,4	2,12	10,6	46,7	2,85
Ketten	37,2	12,0	1,21	34,1	6,8	1,63
Köpfe	11,1	58,5	1,07	10,9	45,3	0,29
Ketten	32,4	31,9	0,65	34,3	27,8	1,96
Köpfe	13,8	74,0	0,55	13,8	61,9	0,77
Ketten	33,3	51,7	0,01	33,2	46,9	0,48
Köpfe	14,3	90,0	0,26	14,1	83,0	1,39
Ketten	32,4	76,6	0,83	33,2	76,4	0,10
Köpfe	2,3	92,0	0,39	7,4	90,5	0,84
Chi ²	2,8*10 ⁻³			1,2*10 ⁻³		

2.7.3. FESTKÖRPERGESTÜTZTE EINZELNE BILAYER

NR-Messungen der einzelnen Bilayer am FIGARO zeigen die in Abb. 56 und Abb. 57, (Anhang A, S. 113) dargestellten Kurvenverläufe. Sowohl für 1,5-Pd als auch für 1,2-Pd in D₂O ergibt sich nach Enhancerzugabe ein Anstieg der *Bragg Peak*-Position von $0,1277 \pm 0,0007 \text{ \AA}^{-1}$ bzw. $0,1312 \pm 0,0013 \text{ \AA}^{-1}$ auf einen Wert von $0,1313 \pm 0,0011 \text{ \AA}^{-1}$ bzw. $0,1342 \pm 0,0008 \text{ \AA}^{-1}$. Mit Hilfe der zusätzlichen NR-Messungen bei unterschiedlichen Kontrasten (D₂O, 4MW und SMW; Abb. 56 und Abb. 57, Anhang A, S. 113), können die experimentell ermittelten Daten gefittet und entsprechende Dichteverteilungsprofile für die einzelnen Komponenten extrahiert werden (Abb. 49 a und b). Die Referenzmessungen gegen D₂O (Daten nicht gezeigt) entsprechen dabei dem bereits beschriebenen Modell der Lipidmischung in D₂O (Kapitel VI.2.1.3, S. 53). Das in Abb. 49a dargestellte Dichteverteilungsprofil nach Zugabe von 1,5-Pd zeigt eine deutliche Ablösung der Lipide. Statt der in D₂O ermittelten drei Bilayer ist hier eine einfache Kopfgruppen-Ketten-Kopfgruppen Verteilung

(grüner und roter Kurvenverlauf im wafernahen Bereich) zu erkennen, die auf der dem Wafer zugewandten Seite einen höheren Bedeckungsgrad aufweist als auf der dem Medium zugewandten Seite. Dabei kann das sehr aussagekräftige Profil der Kopfgruppen quantitativ nicht eindeutig durch die Verteilungskurve der Ketten bestätigt werden. Dennoch liefern die erhaltenen Modelle erste Anhaltspunkte für mögliche Interaktionsmechanismen der Enhancer.

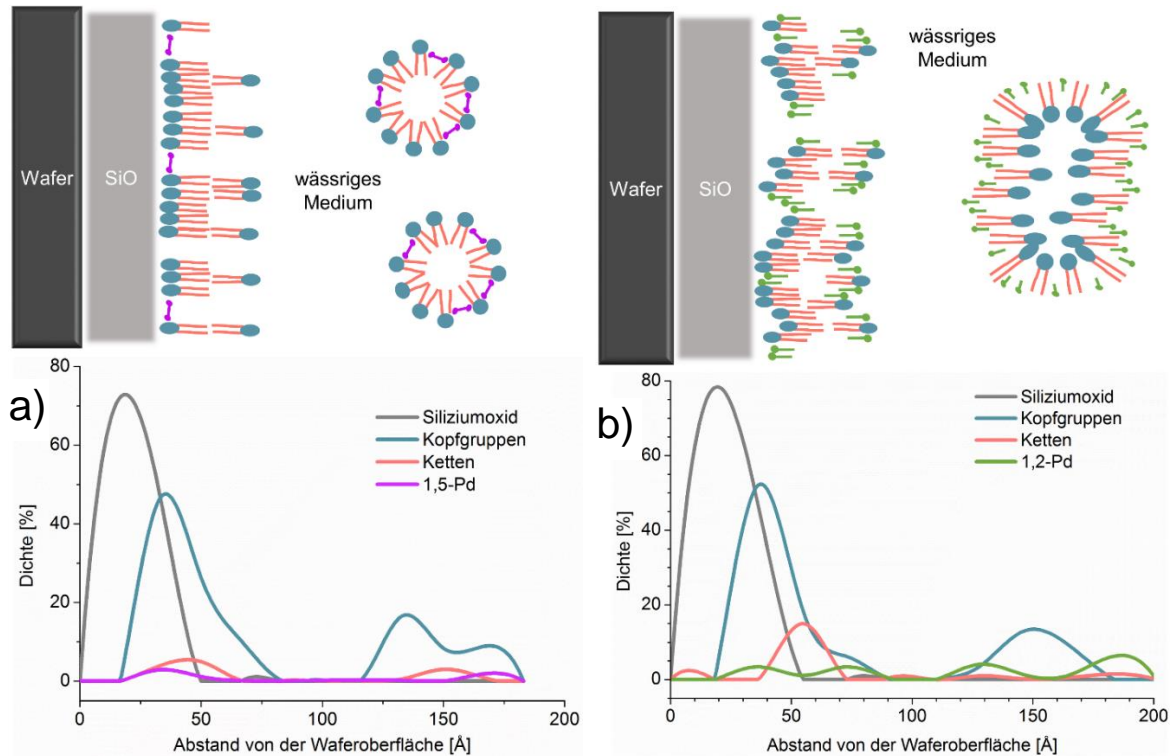


Abb. 49: Dichteverteilungsprofil der SC-Lipidmischung (CER[AP]:CHOL:SA) als Funktion des Abstandes von der Waferoberfläche, berechnet aus den NR-Kurven in Abb. 56 und Abb. 57 und das dazugehörige Modell für eine mögliche Anordnung der Lipide. **a)** gegen 10 % 1,5-Pd in D_2O und **b)** gegen 10 % 1,2-Pd in D_2O

So kann aufgrund des sehr geringen Bedeckungsgrades vor allem im Bereich der dem Medium zugewandten Seite angenommen werden, dass 1,5-Pd eine komplette Ablösung der zuvor detektierten äußeren zwei Lipidschichten und eine teilweise Ablösung der Lipidschicht direkt auf der Waferoberfläche verursacht. Innerhalb der verbleibenden Lipidschicht könnte sich das 1,5-Pd aufgrund der bolaamphiphilen Struktur, wie in Abb. 49a dargestellt, zwischen die Kopfgruppen der Lipide einlagern (pink). Da jedoch die Dichteverteilungskurve für das 1,5-Pd sehr breit ist, wäre eine unselektive Anlagerung, sowohl in Kopfgruppenbereichen als auch in den Kettenbereichen, analog zu den Ausführungen für die NR-Messungen an Oligolayern (Kapitel VI.2.7.2, S. 92), ebenfalls denkbar. Gleichzeitig ist der Enhancer in der Lage, die Lipide zu solubilisieren, und könnte so zu der beschriebenen Ablösung der Lipide führen. Im Abstand von etwa 120 Å von der Waferoberfläche, nach einer etwa 50 Å dicken wässrigen Schicht, folgt eine Kopfgruppen-

Ketten und Kopfgruppen-Kopfgruppen Abfolge, bei der die Kopfgruppen in der gesamten Struktur zu finden sind und sich die Ketten lediglich in der Mitte der Struktur konzentrieren. Diese Dichteverteilung lässt sich mit dem Vorhandensein mizellartiger Strukturen erklären. Hierbei könnte das 1,5-Pd durch eine Einlagerung zwischen die relativ kleinen Kopfgruppen der SC-Lipide deren Abstand vergrößern und somit die mizellare Struktur stabilisieren.

Die Zugabe von 1,2-Pd zu dem dreischichtigen Lipidmodell hat ebenfalls einen erheblichen Einfluss auf die Probenstruktur. Wie bereits für 1,5-Pd beschrieben, werden ebenso durch 1,2-Pd die äußeren beiden Bilayer abgelöst, sodass nur ein einzelner Bilayer auf der Waferoberfläche erhalten bleibt (Abb. 49b). Auch in diesem Fall wird vielmehr die qualitative Verteilung der einzelnen Komponenten als deren absolute Menge für die Interpretation der Enhancereffekte herangezogen. Das 1,2-Pd lagert sich dabei aufgrund seines amphiphilen Charakters wahrscheinlich zwischen die Lipide. Da es jedoch nur einen sehr kleinen hydrophoben Kettenteil besitzt, befindet es sich eher im Bereich der SC-Lipidkopfgruppen, bzw. am Übergang zwischen Kopfgruppe und Kettenregion. Als Folge dieser Einlagerung würde es zu einer Fluidisierung der Lipidschicht und somit zu einer verringerten Lipidordnung kommen. Diese erhöhte Beweglichkeit der Lipide würde die eher unscharfe Abgrenzung der Kopfgruppen- und Kettenregionen erklären. Zusätzlich zu der Einlagerung in die Lipidschicht ist das 1,2-Pd in der Lage, die Lipide zu solubilisieren, und induziert damit die beschriebene Ablösung eines Großteils der Lipide von der Waferoberfläche. Interessanterweise folgt auf eine sich anschließende etwa 30 Å dicke wässrige Schicht eine Ketten-Kopfgruppen-Ketten-Abfolge, die die Anwesenheit von inversen Mizellen indiziert. Obwohl dies in wässrigem Medium eher unwahrscheinlich ist, unterstützt die Verteilung des Enhancers diese Theorie. Dabei ist das 1,2-Pd in großen Mengen vor allem in den äußeren Bereichen der mizellaren Struktur lokalisiert und kann durch die Ausrichtung der Kopfgruppen zum wässrigen Medium die inverse Struktur stabilisieren, indem es die Grenzflächenspannung zwischen den Lipidketten und dem wässrigen Medium reduziert. Die mizellaren Strukturen sind allerdings nicht sphärisch, da in diesem Fall eine gleichmäßige Verteilung des Enhancers über die gesamte Struktur anzunehmen wäre. Stattdessen ist das 1,2-Pd vor allem an den Seiten zu finden, was auf eine eher langgestreckte Struktur schließen lässt.

2.7.4. LIPOSOMEN

In Abb. 50 ist der *Leakage* der SC-Lipidvesikel bei einem pH-Wert von 7 und 10, gemessen gegen Puffer (Kapitel VI.2.1.4, S. 54), und nach Zugabe von 1,2- bzw. 1,5-Pd, dargestellt. Die bei einem pH-Wert von 7 mit einem *Leakage* von etwa $1,4 \pm 0,8$ % (grau) als sehr stabil angenommenen Liposomen, werden durch die Zugabe von 1,5-Pd teilweise zerstört, sodass sich der *Leakage* abrupt auf $5,8 \pm 0,8$ % (pink) erhöht. Um diesen eher geringen aber signi-

fikanten plötzlichen *Leakage* zu verursachen, muss der Enhancer, analog zu den Beschreibungen für DMSO, Glycerol und PG, auf eine Weise mit den SC-Lipiden wechselwirken, die die gesamte Lipidstruktur des Liposoms zerstört. Hierbei werden jedoch nur die ULVs zerstört, die aufgrund ihrer individuellen Lipidstruktur instabiler und damit leichter angreifbar sind. Als amphiphiles Molekül könnte 1,5-Pd einen Teil der Lipide lösen und Mizellen ausbilden. Aufgrund der bolaamphiphil-ähnlichen Struktur, die verhindert, dass sich das Molekül entlang der Lipide in die Bilayer einlagert, kann das 1,5-Pd nur in geringem Maße die Struktur der Liposomen zerstören. Im Gegensatz zum 1,5-Pd, verursacht sein Regioisomer mit dem vicinalen Diol, 1,2-Pd, einen sofortigen *Leakage* von $36,7 \pm 1,2$ % (grün). Aufgrund seiner amphiphilen Struktur kann 1,2-Pd in großem Maße mit den Lipiden innerhalb der Liposomen wechselwirken, diese solubilisieren und so eine weitreichende Zerstörung der Liposomen verursachen. Die Messungen bei einem pH-Wert von 10 zeigen mit $0,5 \pm 0,5$ % in Puffer, $5,4 \pm 0,4$ % in 1,5-Pd und $34,7 \pm 6,0$ % in 1,2-Pd vergleichbare Ergebnisse wie bei einem pH-Wert von 7. Sie bestätigen damit die Aussage, dass bei Hauttemperatur (32 °C) keine Unterschiede in der Integrität der Liposomen bei pH 7 und pH 10 bestehen (vgl. Kapitel VI.2.1.4; S. 54).

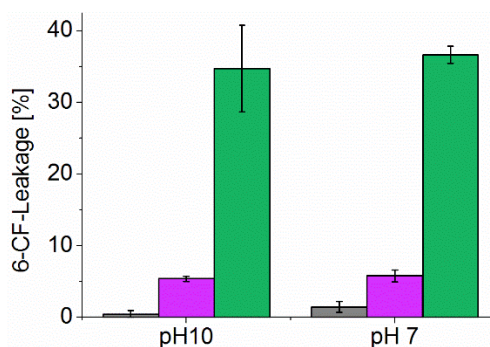


Abb. 50: 6-CF-Leakage von SC-ULVs (CER[AP]:CHOL:SA) in Puffer (pH-Wert = 7 bzw. 10) (grau), sowie in 10 % 1,5-Pd (pink) und in 10 % 1,2-Pd (grün) in dem jeweiligen Puffer.

2.7.5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen können sowohl für 1,5-Pd, als auch für 1,2-Pd eindeutige Effekte auf die SC-Lipidmodellstruktur beobachtet werden. Das Ausmaß und die Art und Weise der Wechselwirkung unterscheiden sich jedoch für die beiden Regioisomere deutlich.

Für das 1,5-Pd sind die Wechselwirkungen mit den SC-Lipiden dabei insgesamt eher schwach ausgeprägt. IR-Messungen lassen keinerlei Wechselwirkungen mit den Kopfgruppen oder Ketten der Lipide vermuten. Der niedrige Wert für den *Leakage* indiziert überdies einen nur geringfügig ausgeprägten Einfluss des Enhancers. Dieser ist auf die unzu-

reichende Möglichkeit der Einlagerung des 1,5-Pd aufgrund seiner bolaamphiphilen Struktur zurückzuführen. Eine Einlagerung des Enhancers zwischen die Lipide der intakten Bilayer kann mit den durchgeführten Untersuchungen nicht eindeutig belegt werden. Die Ergebnisse deuten vielmehr auf eine unselektive Anreicherung des 1,5-Pd in den Kopfgruppen- und Kettenbereichen der Lipidbilayer hin. Eindeutig beobachtbar ist jedoch ein Ablösen der Lipide unter Ausbildung von Mizellen. In dem Zuge wird auch eine Einlagerung des Enhancers im Bereich der Kopfgruppen zur Stabilisierung der Mizellen angenommen.

Dass der Einfluss des 1,2-Pd im Vergleich zu seinem Regioisomer deutlich erhöht ist, kann bereits durch den sechsfach gesteigerten *Leakage* vermutet werden. Sowohl IR- als auch NR-Messungen zeigen darüber hinaus, dass sich das 1,2-Pd direkt in die Lipidbilayer zwischen benachbarte Lipide einlagert. In der Folge kommt es zu einer Ablösung der Lipide, wobei, möglicherweise durch das Überangebot an Enhancer, inverse Mizellen ausgebildet werden. Dieses starke Interaktionspotential des 1,2-Pd ist auf seine amphiphile Struktur zurückzuführen. Dadurch kann sich der Enhancer einerseits gut zwischen den Lipiden anlagern und ist andererseits fähig, einen Teil der Lipide aus der Matrix zu solubilisieren. Dass bei den IR-Messungen keinerlei Einfluss des 1,2-Pd auf die Lipidkettenordnung detektiert wird, kann auf die viel größere Probenfläche, über die anschließend das Signal gemittelt wird, zurückgeführt werden. Im Vergleich dazu ist der bei den NR-Messungen untersuchte Probenausschnitt deutlich kleiner. Außerdem ist aufgrund der Wechselwirkungsweise mit der untersuchten Probe die Methode der NR-Messung sensitiver als die IR-Messung und erfasst deshalb bereits geringfügigere Veränderungen. Hinzu kommt, dass die Wechselwirkungen des Enhancers vor allem hydrophiler Natur sind und die entsprechenden Banden im IR für die sensitiveren Oligolayer schlecht zu detektieren sind.

Insgesamt sind die solubilisierenden Eigenschaften der beiden Pentandiole umso stärker ausgeprägt, je dünner die Lipidschicht ist. Dies kann zum einen auf die größere Angriffsfläche und zum anderen auf den steigenden Anteil an Enhancer pro Lipidmolekül zurückgeführt werden. In Bezug auf das native SC kann sowohl für 1,5-Pd als auch für 1,2-Pd als hauptsächlicher Mechanismus der penetrationsfördernden Wirkung ein Herauslösen von Lipiden angenommen werden, wobei der Effekt des 1,2-Pd deutlich stärker ausgeprägt ist, als der seines Regioisomers. Für das 1,5-Pd kann zusätzlich eine unselektive Anreicherung in der Lipidmatrix des nativen SC ohne deutliche Effekte auf die Struktur erwartet werden. Im Gegensatz dazu ist das 1,2-Pd in der Lage, sich in die Bilayer zu integrieren, diese geringfügig aufzulockern und somit den penetrationsfördernden Effekt noch zu verstärken.

VII. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der hydrophilen Penetrationenhancer Wasser, Harnstoff, Taurin, DMSO, Glycerol, PG, 1,5-Pd und 1,2-Pd auf unterschiedliche SC-Lipidmodelle, bestehend aus CER[AP], CHOL und SA, unter Verwendung geeigneter Methoden untersucht. Dazu konnte für simultane NR- und IR-Messungen erstmals ein reproduzierbares oligolamellares SC-Lipidmodell entwickelt werden, welches für Untersuchungen an einer fest/flüssigen Grenzfläche geeignet ist. Insgesamt gaben die Ergebnisse der umfangreichen Untersuchungen (zusammengefasst in Tabelle 26) Aufschluss über mögliche Interaktionen der Enhancer mit der SC-Lipidmatrix und lieferten so Hinweise auf den Mechanismus ihrer penetrationsfördernden Wirkung im nativen SC. Dabei konnte bereits durch die Anwesenheit von Wasser eine deutliche Vergrößerung der lamellaren Wiederholabstände beobachtet werden. Diese ist auf eine verstärkte Anreicherung von Wasser im Bereich der Kopfgruppen zurückzuführen. Für das native SC kann daher eine Verbesserung der Lösungseigenschaften für hydrophile Arzneistoffe geschlussfolgert werden. Für Harnstoff, Taurin, Glycerol und PG konnte, über den Effekt des Wassers hinaus, kein zusätzlicher Einfluss auf die SC-Lipidstruktur ermittelt werden, der im Zusammenhang mit einer penetrationsfördernden Wirkung im nativen SC steht. Für Harnstoff und Taurin wird vielmehr eine Anreicherung und damit verbundene Hydratisierung innerhalb der Korneozyten vermutet. Glycerol und PG würden dagegen innerhalb der SC-Lipidmatrix auch unter trockenen Bedingungen vergleichbare Wechselwirkungen wie im hydratisierten Zustand aufrechterhalten. Um diese Vermutung genauer zu untersuchen, könnten die durchgeführten IR-Messungen an Multilayern, zunächst im trockenen Zustand und anschließend gegen reines Glycerol bzw. PG, wiederholt werden. DMSO zeigte Wechselwirkungen im Bereich der Kopfgruppen, die, abhängig von der eingesetzten Konzentration, zu einer Aufweitung dieser Region durch eine vermehrte Anreicherung von Wasser und DMSO führten. Zusätzlich konnte ein Herauslösen der Lipide beobachtet werden. Für das native SC kann demnach ein kombinierter Effekt aus Solubilisierung der Lipide und Aufweitung der Kopfgruppen, einer daraus resultierenden Anreicherung des Enhancers und damit verbundenen verbesserten Lösungseigenschaften für den Arzneistoff abgeleitet werden. Die beiden Pentandiole reichern sich in der Lipidmatrix an, wobei sich das 1,2-Pd gezielt zwischen benachbarte Lipide eines Bilayers einlagert und damit eine Auflockerung der Lipidstruktur induzieren könnte. Zudem sind beide Regioisomere in der Lage, Lipide aus den Bilayern herauszulösen und somit einen penetrationsfördernden Effekt hervorzurufen. Diese Fähigkeit ist allerdings für 1,2-Pd deutlich stärker ausgeprägt als für 1,5-Pd.

Table 26: Zusammenfassung der wichtigsten Erkenntnisse der an den verschiedenen Penetrationenhancern durchgeführten Untersuchungen mit entsprechender Schlussfolgerung für die Wirkungsweise im SC. Der Einfluss von Wasser ist in Bezug auf das Modell bei Raumfeuchte angegeben, während für die restlichen Enhancer der im Vergleich zum Wasser zusätzlich auftretende Effekt bewertet wird.

	Wasser	Harnstoff	Taurin	DMSO	Glycerol	Propylenglykol	1,5-Pentandiol	1,2-Pentandiol
IR (Multilayer)	Erhöhung der Kettenordnung (hexagonal, all-trans); Zunahme der HBBs	Zunahme der HBBs (Amid-I)	kein Einfluss (Tendenz: Zunahme der HBBs (Amid-I))	Abnahme der HBBs (Amid-I)	kein Einfluss (Tendenz: Abnahme der HBBs (Amid-I))	kein Einfluss (Tendenz: Abnahme der HBBs (Amid-I))	kein Einfluss	Abnahme der HBBs (Amid-II)
IR (Oligolayer)	Ketten: all-trans, Köpfe: v(CO)	kein Einfluss	kein Einfluss	kein Einfluss (v(CO) n.d.)	kein Einfluss	kein Einfluss	kein Einfluss	kein Einfluss (v(CO) n.d.)
NR (Oligolayer)	Zunahme der Bilayerschichtdicke, 5-schichtiger Aufbau	kein Einfluss	kein Einfluss	Solubilisierung, Aufweitung der Kopfgruppenbereiche (30 %)	kein Einfluss	kein Einfluss	Solubilisierung, Anlagerung	Solubilisierung, Einlagerung
NR (Bilayer)	3-schichtiger Aufbau	kein Einfluss	kein Einfluss	--	--	--	Einlagerung in Bilayer, Solubilisierung, Ausbildung von Mizellen	Einlagerung in Bilayer, Solubilisierung, Ausbildung inverser Mizellen
PCS (ULVs)	~130 nm	Zusammenfließen	Einlagerung in Kopfgruppenbereiche, Zusammenfließen	Einlagerung in Kopfgruppenbereiche	Einlagerung in Kopfgruppenbereiche	Einlagerung in Kopfgruppenbereiche	--	--
Leakage (ULVs)	stabil	Porenbildung	Porenbildung	geringfügige Solubilisierung	geringfügige Solubilisierung	geringfügige Solubilisierung	geringfügige Solubilisierung	starke Solubilisierung
Schlussfolgerung für Wirkungsmechanismus im SC	Vergrößerung der Bilayerschichtdicke durch Einlagerung, Verbesserte Lösungseigenschaften für Arzneistoffe	Ausbildung von Poren in der SC-Lipidmatrix, Anreicherung in Korneozyten und vermehrte Wassereinlagerung	Ausbildung von Poren in der SC-Lipidmatrix, Anreicherung in Korneozyten und vermehrte Wassereinlagerung	Solubilisierung von Lipiden, Aufweitung der Kopfgruppenbereiche, Verbesserte Lösungseigenschaften für Arzneistoffe	Aufrechterhaltung der Wechselwirkungen in Lipidmatrix bei Wasserverlust	Aufrechterhaltung der Wechselwirkungen in Lipidmatrix bei Wasserverlust, Verbesserte Lösungseigenschaften für Arzneistoffe	Solubilisierung von Lipiden, unselektive Anreicherung in SC-Lipidmatrix	Solubilisierung von Lipiden, Einlagerung zwischen benachbarte Lipide innerhalb eines Bilayers

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass alle angewendeten Methoden geeignet sind die verschiedenen SC-Lipidmodelle und den Einfluss von Enhancern generell zu untersuchen. Allerdings gibt es auch hier im Hinblick auf das Experimentdesign Optimierungspotential. Beispielsweise wurde für keinen der untersuchten Penetrationenhancer im Rahmen der IR-Messungen eine Auflockerung der Lipidkettenordnung beobachtet. Hier könnte die Auswahl der Ceramidspezies eine entscheidende Rolle spielen. Für CER[AP] ist bereits bekannt, dass es einen starken Einfluss auf die Lipidanordnung in SC-Lipidmodellen besitzt^{5, 8}. Aufgrund der Anzahl von vier Hydroxylgruppen kann für das vorliegende Modell vermutet werden, dass CER[AP] einen starken Zusammenhalt der Bilayer bewirkt und somit für die nur in geringem Maße auftretenden Effekte verantwortlich sein könnte. Ein Austausch durch eine Ceramidspezies mit weniger Hydroxylgruppen könnte somit eine stärkere Beeinflussung durch die hydrophilen Enhancer bewirken und möglicherweise Veränderungen im Bereich der Lipidkettenordnung zeigen. Ein solcher Austausch der Ceramidspezies bietet generell für die vorliegenden Untersuchungen die Möglichkeit, Unterschiede in den Wechselwirkungen der Enhancer mit den verschiedenen Spezies festzustellen. Somit können weiterführende Informationen zum Interaktionsmechanismus und -potential der Enhancer gewonnen werden. Zusätzlich könnten, aufbauend auf die Untersuchungen an dem ternären Lipidmodell, komplexere Mischungen untersucht werden, um schließlich genauere Aussagen, über das Zusammenspiel der verschiedenen Einflüsse in Bezug auf das native SC zu treffen.

Die simultanen IR- und NR-Messungen zeigten, trotz der vielversprechenden theoretischen Vorüberlegungen, zumindest was die Resultate der IR-Messungen betrifft, für keinen der untersuchten Enhancer einen signifikanten Einfluss. Deshalb soll an dieser Stelle die Anwendbarkeit dieser Methoden kurz diskutiert werden. In diesem Fall waren die im IR zu beobachtenden Effekte für die hydrophilen Enhancer generell sehr geringfügig ausgeprägt und die IR-Messungen für diese Änderungen wohlmöglich nicht sensitiv genug. Zudem traten vor allem Wechselwirkungen im Bereich der hydrophilen Kopfgruppen auf, die aufgrund des Experimentdesigns nur in geringem Maße bzw. überhaupt nicht detektiert werden konnten. Um das Potential dieser simultanen IR- und NR-Messungen auszuschöpfen, sollten daher vor allem Untersuchungen durchgeführt werden, bei denen eine deutliche Verschiebung, speziell im Bereich der Lipidkettenkonformation, zu erwarten ist. Eine Möglichkeit wären temperaturabhängige Messungen mit den eingesetzten hydrophilen Enhancern. Diese wurden in der Vergangenheit für IR-Untersuchungen bezüglich verschiedener Einflüsse auf das SC, auch unter Einsatz hydrophiler Enhancer, angewendet^{92, 109, 177}. Dabei könnten ähnlich wie bei den genannten Studien Veränderungen im Bereich der Phasenübergänge auftreten. Diese würden einen Einfluss der Enhancer auf die Lipidketten aufzeigen, der bei niedrigen Temperaturen mit der Methode nicht detektierbar ist. Alternativ ist auch eine Untersuchung

lipophiler Enhancer erfolgversprechend, da hier eine vorrangige Interaktion im Bereich der Lipidketten zu erwarten ist. Die simultanen NR-Messungen an Oligolayern geben darüber hinaus nur erste Anhaltspunkte für mögliche Interaktionsmechanismen der Enhancer. Für eine zuverlässigere Einschätzung der genauen Lokalisierung der Enhancer und der resultierenden Einflüsse auf die Lipidstruktur wären zusätzliche Messungen bei verschiedenen H₂O/D₂O-Kontrasten erforderlich. Darüber hinaus könnte der Einsatz perdeuterierter Enhancer weitere Informationen diesbezüglich liefern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Kombination der verschiedenen Methoden mit den unterschiedlich aufgebauten SC-Lipidmodellen eine umfangreiche und zuverlässige Einschätzung der Wirkungsweise der Enhancer ermöglicht wurde. Ergänzend zu den hier angewendeten Methoden gibt es noch weitere aussagekräftige Methoden, die zusätzliche Informationen über die möglichen Wechselwirkungsmechanismen der untersuchten Enhancer liefern könnten, um die in dieser Arbeit getroffenen Aussagen zu festigen. Mithilfe von Klein- und Weitwinkelstreuungen mit Röntgenstrahlen (SAXS und WAXS) kann dabei zwischen der Verbesserung der Lösungseigenschaften innerhalb der Membran, einer Einlagerung in die Lipidmatrix und / oder Veränderung der Lipidstruktur durch den Enhancer unterschieden werden¹⁶⁹. Unter Verwendung von Neutronenstrahlen (SANS) und dem Einsatz perdeuterierter Enhancer kann darüber hinaus durch Kontrastvariation eine genaue Lokalisierung des Enhancers ermöglicht werden. Eine weitere Möglichkeit zu untersuchen, ob die Enhancer tatsächlich keinen Einfluss auf die Lipidkettenordnung haben, ist die Anwendung der Kernspinresonanzspektroskopie (NMR), wobei sogar eine Differenzierung des Einflusses auf die einzelnen Lipidkomponenten möglich ist^{129, 178}. Dass gerade auf dem Gebiet der Penetrationenhancer Bedarf an neuen Forschungserkenntnissen besteht, steht außer Frage, da dermal und transdermal angewendete Arzneistoffe, wie eingangs erwähnt, entscheidende Vorteile gegenüber oral Angewendeten bieten. Damit sie an ihren Wirkungsort gelangen können, müssen für die meisten Arzneistoffe die Barriereigenschaften des SC, beispielsweise durch die Anwendung hydrophiler Penetrationenhancer, reversibel herabgesetzt werden. Je genauer der exakte Wirkmechanismus eines jeweiligen Enhancers bekannt ist, desto gezielter und erfolgreicher lässt sich dieses Ziel verfolgen.

VIII. ANHANG

A – ABBILDUNGEN & TABELLEN

TAURIN

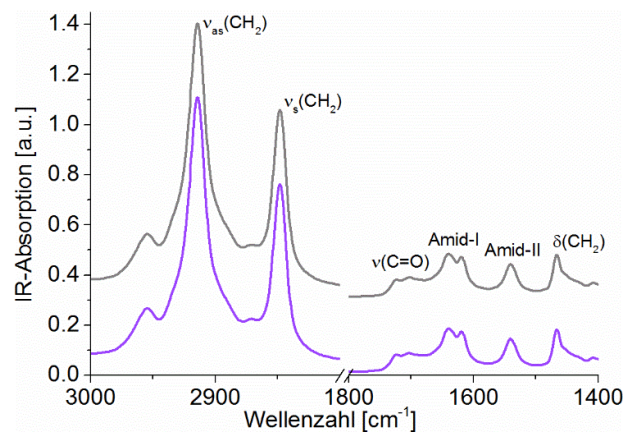


Abb. 51: ATR-FTIR-Spektren eines multilamellaren SC-Lipidmodells (Probe 1) (CER[AP]:CHOL:SA) gegen Wasser (grau) und gegen 5 % Taurin in Wasser (violett) nach jeweils 24 h Inkubationszeit. Zu Vergleichszwecken sind die Spektren in Y-Richtung verschoben.

Table 27: Resultierende Werte der gefitteten Parameter der NR-Kurven der oligolamellaren Lipidmodelle aus Abb. 33 für die Dicken, SLDs, Mediumanteile und Rauigkeiten der jeweiligen Schichten des Modells. Ebenfalls aufgeführt sind die Gesamtschichtdicke t , der Mittelwert für die Bilayerschichtdicke d und der Wert für die Abweichung der gefitteten Kurve von der experimentell ermittelten Kurve (χ^2).

	D ₂ O-Referenz				5 % Taurin			
	Dicke [Å]	SLD *10 ⁻⁶ [Å ⁻²]	Medium [%]	Rauigkeit t [Å]	Dicke [Å]	SLD *10 ⁻⁶ [Å ⁻²]	Medium [%]	Rauigkeit t [Å]
Si	--	2,07	--	--	--	2,07	--	--
SiO	13,2	3,47	0,0	0,22	13,2	3,47	0,0	0,22
PEI	5,9	0,59	60,0	0,26	5,9	0,59	60,0	0,26
Kopfgruppe	6,7	1,37	35,0	0,18	6,6	1,37	34,6	0,47
Ketten	32,3	-0,25	6,3	0,01	32,0	-0,25	6,3	0,50
Kopfgruppen	11,5	1,37	46,5	0,93	12,5	1,37	46,5	0,59
Ketten	37,4	-0,25	27,5	0,39	37,1	-0,25	27,3	0,87
Kopfgruppen	11,8	1,37	69,8	1,00	12,2	1,37	70,1	0,86
Ketten	32,9	-0,25	50,0	0,82	33,0	-0,25	49,0	0,42
Kopfgruppen	12,1	1,37	85,0	0,01	12,4	1,37	84,6	0,79
Ketten	34,5	-0,25	68,0	0,76	35,0	-0,25	67,1	0,66
Kopfgruppen	10,2	1,37	90,6	0,06	10,8	1,37	89,6	0,61
Ketten	36,3	-0,25	87,7	0,77	36,6	-0,25	87,0	0,09
Kopfgruppe	8,9	1,37	91,4	0,14	9,3	1,37	91,2	0,54
Medium	--	6,05	--	0,57	--	5,90	--	0,22
t [Å]	253,7				256,6			
MW d [Å]	46,9 ± 2,6				47,5 ± 2,8			
Chi ²	2,2*10 ⁻³				2,1*10 ⁻³			

DMSO

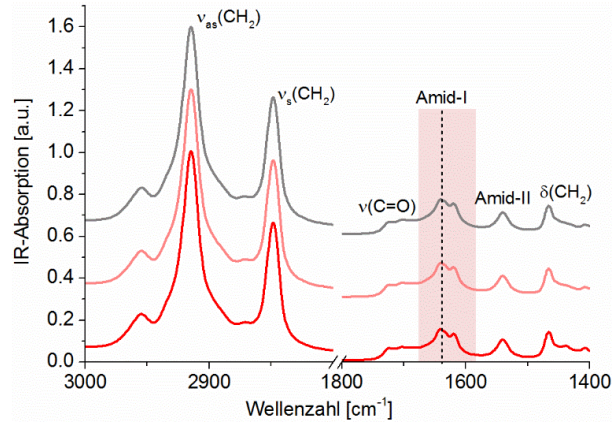


Abb. 52: ATR-FTIR-Spektren des multilamellaren SC-Lipidmodells (Probe 1) (CER[AP]:CHOL:SA) gegen H₂O (grau), 10 % DMSO in H₂O (hellrot) und 50 % DMSO in H₂O (dunkelrot) nach jeweils 24 h Inkubationszeit. Zu Vergleichszwecken sind die Spektren in Y-Richtung verschoben. Peakveränderungen sind rot hinterlegt.

Tabelle 28: Resultierende Werte der gefitteten Parameter der NR-Kurven der oligolamellaren Lipidmodelle aus Abb. 37 für die Dicken, SLDs, Mediumanteile und Rauigkeiten der jeweiligen Schichten des Modells. Ebenfalls aufgeführt sind die Gesamtschichtdicke t , der Mittelwert für die Bilayerschichtdicke d und der Wert für die Abweichung der gefitteten Kurve von der experimentell ermittelten Kurve (χ^2).

	D ₂ O-Referenz				10 % DMSO			
	Dicke [Å]	SLD *10 ⁻⁶ [Å ⁻²]	Medium [%]	Rauigkeit [Å]	Dicke [Å]	SLD *10 ⁻⁶ [Å ⁻²]	Medium [%]	Rauigkeit [Å]
Si	--	2,07	--	--	--	2,07	--	--
SiO	6,8	3,47	0	0	6,8	3,47	0	0
PEI	15	0,59	55	0,69	15	0,59	55	0,69
Kopfgruppe	7,5	1,37	49,2	0,47	8,0	1,37	49,9	0,74
Ketten	39,2	-0,25	0,02	0,80	39,0	-0,25	0,02	0,05
Kopfgruppen	10,5	1,37	55,3	0,91	10,0	1,37	55,0	0,16
Ketten	31,2	-0,25	7,1	0,10	30,7	-0,25	7,7	1,00
Kopfgruppen	10,6	1,37	70,8	0,92	10,7	1,37	71,2	0,91
Ketten	34,2	-0,25	36,4	0,55	33,8	-0,25	36,3	0,73
Kopfgruppen	14,9	1,37	75,0	0,99	14,7	1,37	75,9	0,8
Ketten	36,0	-0,25	58,5	0,84	35,5	-0,25	58,6	0,43
Kopfgruppen	14,3	1,37	97,1	0,69	14,8	1,37	97,8	0,05
Ketten	31,1	-0,25	89	0,65	31,1	-0,25	89,4	0,57
Kopfgruppe	2,6	1,37	98,6	0,24	3,1	1,37	98,7	0,23
Medium	--	5,97	--	0,6	--	5,4906	--	0,97
t [Å]	253,9				253,2			
MW d [Å]	46,42 ± 5,03				46,28 ± 4,94			
Chi ²	1,3*10 ⁻³				0,3*10 ⁻³			

Tabelle 29: Resultierende Werte der gefitteten Parameter der NR-Kurven der oligolamellaren Lipidmodelle aus Abb. 38 für die Dicken, SLDs, Mediumanteile und Rauigkeiten der jeweiligen Schichten des Modells. Ebenfalls aufgeführt sind die Gesamtschichtdicke t , der Mittelwert für die Bilayerschichtdicke d und der Wert für die Abweichung der gefitteten Kurve von der experimentell ermittelten Kurve (Chi^2).

	D ₂ O-Referenz				30 % DMSO			
	Dicke [Å]	SLD *10 ⁻⁶ [Å ⁻²]	Medium [%]	Rauigkeit [Å]	Dicke [Å]	SLD *10 ⁻⁶ [Å ⁻²]	Medium [%]	Rauigkeit [Å]
Si	--	2,07	--	--	--	2,07	--	--
SiO	6,8	3,47	0	0	6,8	3,47	0	0
PEI	15	0,59	55	0,69	15	0,59	55	0,69
Kopfgruppe	7,5	1,37	49,2	0,47	7,1	1,37	39,9	0,06
Ketten	39,2	-0,25	0,02	0,80	34,9	-0,25	0,12	0,63
Kopfgruppen	10,5	1,37	55,3	0,91	12,2	1,37	64,9	0,78
Ketten	31,2	-0,25	7,1	0,10	31,8	-0,25	6,9	0,17
Kopfgruppen	10,6	1,37	70,8	0,92	14,8	1,37	74,6	0,46
Ketten	34,2	-0,25	36,4	0,55	32,1	-0,25	31,8	0,31
Kopfgruppen	14,9	1,37	75,0	0,99	15	1,37	84,8	0,18
Ketten	36,0	-0,25	58,5	0,84	30,4	-0,25	53,6	1,64
Kopfgruppen	14,3	1,37	97,1	0,69	14,8	1,37	96,9	0,37
Ketten	31,1	-0,25	89	0,65	32,5	-0,25	88,5	0,73
Kopfgruppe	2,6	1,37	98,6	0,24	5,7	1,37	98,9	0,49
Medium	--	5,97	--	0,6	--	4,33	--	0,71
t [Å]	253,9				253,1			
MW d [Å]	46,42 ± 5,03				46,26 ± 1,25			
Chi^2	1,3*10 ⁻³				1,2*10 ⁻³			

GLYCEROL

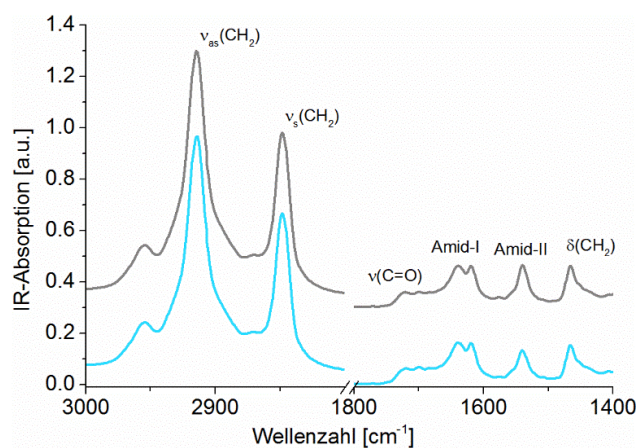


Abb. 53: ATR-FTIR-Spektren eines multilamellaren SC-Lipidmodells (Probe 1) (CER[AP]: CHOL:SA) gegen H_2O (grau) und gegen 10 % Glycerol in H_2O (hellblau) nach jeweils 24 h Inkubationszeit. Zu Vergleichszwecken sind die Spektren in Y-Richtung verschoben.

PROPYLENGLYKOL

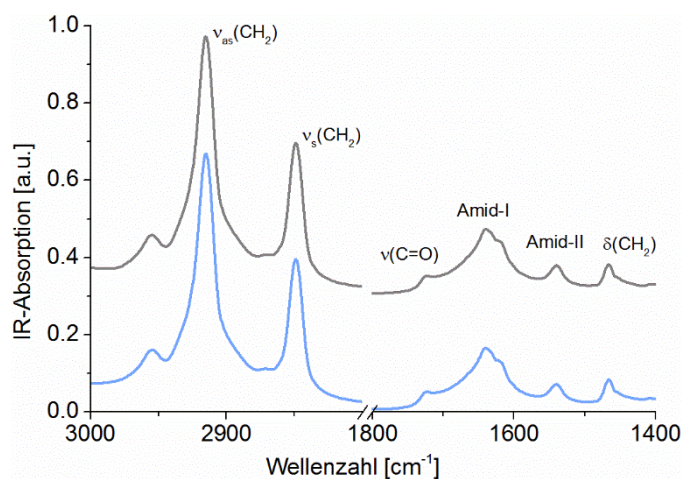


Abb. 54: ATR-FTIR-Spektren eines multilamellaren SC-Lipidmodells (Probe 1) (CER[AP]:CHOL:SA) gegen Wasser (grau), gegen 10 % PG in Wasser (blau) nach jeweils 24 h Inkubationszeit. Zu Vergleichszwecken sind die Spektren in Y-Richtung verschoben.

PENTANDIOLE

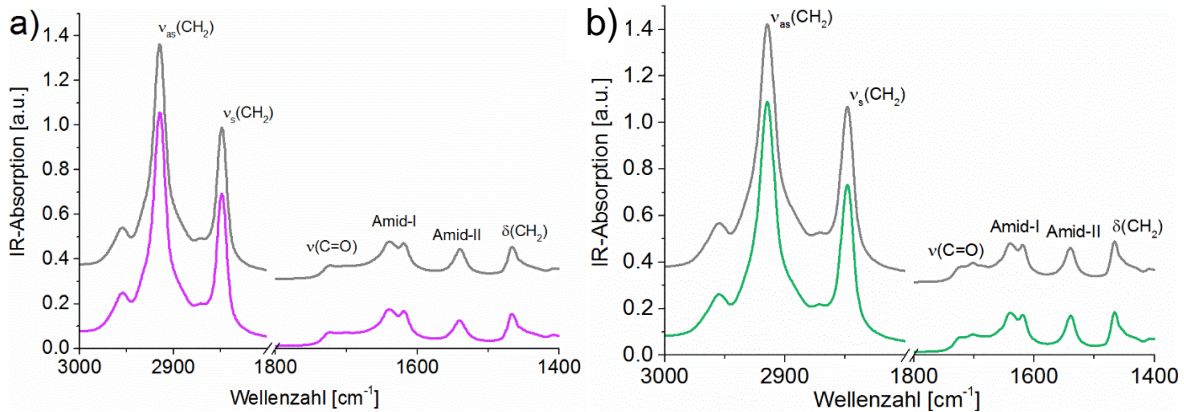


Abb. 55 ATR-FTIR-Spektren eines multilamellaren SC-Lipidmodells (Probe 1) (CER[AP]: CHOL:SA) gegen Wasser (grau) anschließend gegen **a) 10 % 1,5-Pd** in Wasser (pink) bzw. gegen **b) 10 % 1,2-Pd** in Wasser (grün) nach jeweils 24 h Inkubationszeit. Zu Vergleichszwecken sind die Spektren in Y-Richtung verschoben.

Tabelle 30: Resultierende Werte der gefitteten Parameter der NR-Kurven der oligolamellaren Lipidmodelle aus Abb. 47 für die Dicken, SLDs, Mediumanteile und Rauigkeiten der jeweiligen Schichten des Modells. Ebenfalls aufgeführt sind die Gesamtschichtdicke t , der Mittelwert für die Bilayerschichtdicke d und der Wert für die Abweichung der gefitteten Kurve von der experimentell ermittelten Kurve (χ^2).

	D ₂ O-Referenz				10 % 1,5-Pd			
	Dicke [Å]	SLD *10 ⁻⁶ [Å ⁻²]	Medium [%]	Rauigkeit [Å]	Dicke [Å]	SLD *10 ⁻⁶ [Å ⁻²]	Medium [%]	Rauigkeit [Å]
Si	--	2,07	--	--	--	2,07	--	--
SiO	5,0	3,47	0	0,05	5,0	3,47	0	0,05
PEI	6,3	0,59	8,0	0,82	6,3	0,59	8,0	0,82
Kopfgruppe	2,0	1,37	27,2	0,89	1,6	1,37	29,6	0,77
Ketten	32,1	-0,25	37,1	0,49	31,8	-0,25	37,9	0,39
Kopfgruppen	11,0	1,37	36,5	0,62	10,5	1,37	39,6	0,55
Ketten	35,5	-0,25	40,2	1,36	35,0	-0,25	40,4	1,48
Kopfgruppen	11,8	1,37	65,8	0,40	12,2	1,37	64,5	0,80
Ketten	36,0	-0,25	43,2	1,81	35,8	-0,25	43,3	1,69
Kopfgruppen	13,7	1,37	71,4	1,10	13,2	1,37	71,9	0,75
Ketten	35,2	-0,25	49,5	0,20	36,0	-0,25	48,1	0,18
Kopfgruppen	14,7	1,37	94,2	0,60	14,0	1,37	92,9	0,83
Ketten	33,4	-0,25	43,9	0,60	34,0	-0,25	42,5	0,53
Kopfgruppe	3,4	1,37	97,2	0,13	3,2	1,37	96,0	0,63
Medium	--	6,06	--	0,73	--	5,59	--	0,81
t [Å]	240,1				238,6			
MW d [Å]	45,8 ± 4,0				45,5 ± 4,3			
χ^2	2,1*10 ⁻³				2,4*10 ⁻³			

Table 31: Resultierende Werte der gefitteten Parameter der NR-Kurven der oligolamellaren Lipidmodelle aus Abb. 48 für die Dicken, SLDs, Mediumanteile und Rauigkeiten der jeweiligen Schichten des Modells. Ebenfalls aufgeführt sind die Gesamtschichtdicke t , der Mittelwert für die Bilayerschichtdicke d und der Wert für die Abweichung der gefitteten Kurve von der experimentell ermittelten Kurve (χ^2).

	D ₂ O-Referenz				10 % 1,2-Pd			
	Dicke [Å]	SLD *10 ⁻⁶ [Å ⁻²]	Medium [%]	Rauigkeit [Å]	Dicke [Å]	SLD *10 ⁻⁶ [Å ⁻²]	Medium [%]	Rauigkeit [Å]
Si	--	2,07	--	--	--	2,07	--	--
SiO	14,8	3,47	0	2,93	14,8	3,47	0	2,93
PEI	14,6	0,59	57,7	0,94	14,6	0,59	57,7	0,94
Kopfgruppe	6,8	1,37	45,0	1,12	2,4	1,37	47,2	0,59
Ketten	33,7	-0,25	6,7	0,56	33,0	-0,25	0,1	0,16
Kopfgruppen	10,1	1,37	48,4	2,12	10,6	1,37	46,7	2,85
Ketten	37,2	-0,25	12,0	1,21	34,1	-0,25	6,8	1,63
Kopfgruppen	11,1	1,37	58,5	1,07	10,9	1,37	45,3	0,29
Ketten	32,4	-0,25	31,9	0,65	34,3	-0,25	27,8	1,96
Kopfgruppen	13,8	1,37	74,0	0,55	13,8	1,37	61,9	0,77
Ketten	33,3	-0,25	51,7	0,01	33,2	-0,25	46,9	0,48
Kopfgruppen	14,3	1,37	90,0	0,26	14,1	1,37	83,0	1,39
Ketten	32,4	-0,25	76,6	0,83	33,2	-0,25	76,4	0,10
Kopfgruppe	2,3	1,37	92,0	0,39	7,4	1,37	90,5	0,84
Medium	--	6.10	--	0,47	--	5,49	--	0,58
t [Å]	256,7				256,3			
MW d [Å]	45,5 ± 2,4				45,4 ± 2,8			
χ^2	2,8*10 ⁻³				1,2*10 ⁻³			

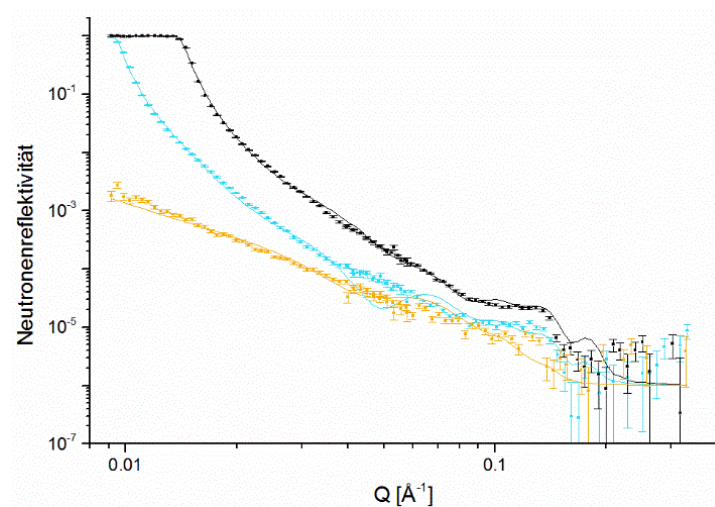


Abb. 56: NR-Kurven einer einzelnen SC Lipid-Bilayerschicht (CER[AP]:CHOL:SA), präpariert durch LB/LS, gemessen gegen 10 % 1,5-Pd in D_2O (schwarze Quadrate), 4MW (hellblaue Quadrate) und SMW (orange Quadrate). Die dazugehörigen Fits sind als Linien in der jeweils selben Farbe dargestellt.

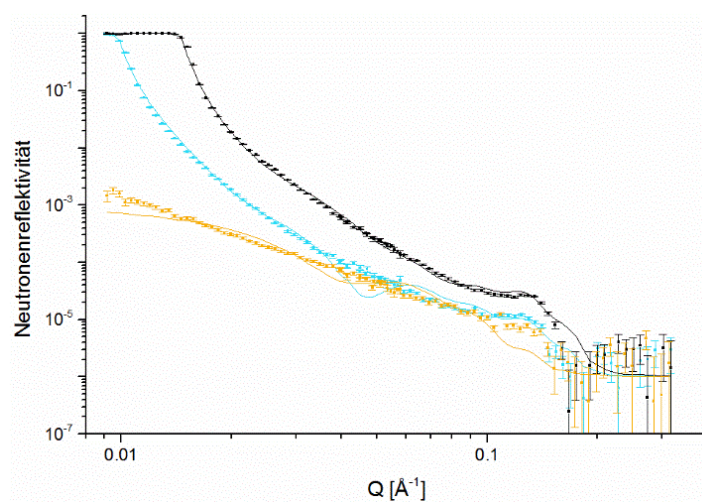


Abb. 57: NR-Kurven einer einzelnen SC Lipid-Bilayerschicht (CER[AP]:CHOL:SA), präpariert durch LB/LS, gemessen gegen 10 % 1,2-Pd in D_2O (schwarze Quadrate), 4MW (hellblaue Quadrate) und SMW (orange Quadrate). Die dazugehörigen Fits sind als Linien in der jeweils selben Farbe dargestellt.

B – ERGÄNZUNGEN METHODEN

1. RÖNTGEN- UND NEUTRONENREFLEKTOMETRIE

1.1. NEUTRONEN- UND RÖNTGENSTRAHLUNG

Um die Nanostruktur von SC-Lipidmodellen mit Hilfe von Strahlung zu untersuchen, muss die Wellenlänge der verwendeten Strahlung im Größenbereich der atomaren Abstände ($\sim 1 \text{ \AA}$) liegen. Die Wellenlänge von Röntgenstrahlung liegt in diesem Bereich ($0,1 - 10 \text{ \AA}$) und besitzt außerdem eine sehr hohe Eindringtiefe. Die Energie von Röntgenstrahlen ist im Vergleich zu kalten Neutronen um ein Vielfaches größer und lässt sich mit Hilfe der Lichtgeschwindigkeit c , der Wellenlänge λ und dem Planck'schen Wirkungsquantum h berechnen:

$$E = h * \frac{c}{\lambda} . \quad (13)$$

Röntgenstrahlen interagieren mit den Elektronen der Atomhülle. Ihre Wechselwirkung ist demnach von der Anzahl der Elektronen in der Hülle (Ordnungszahl) abhängig, wodurch ein starker Kontrast zwischen Atomen mit kleiner und hoher Ordnungszahl entsteht. Benachbarte Elemente im Periodensystem lassen sich jedoch nur schwer unterscheiden. Durch die Verwendung von Röntgenstrahlen für Reflektivitätsmessungen erhält man vor allem eine hohe Auflösung des Impulsübertrages und die Möglichkeit bis zu hohen Winkeln bzw. Impulsüberträgen zu messen.

Die Wellenlängen der kalten Neutronen, die bei Experimenten im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, liegen im Bereich von einigen Ångström, weshalb diese sich ebenfalls für Strukturuntersuchungen eignen. Aufgrund des Welle-Teilchen-Dualismus, können Neutronenstrahlen zum einen als Welle der Wellenlänge λ , mit dem Impuls $p = h/\lambda$ und der Energie $E = h * f$ und zum anderen als Teilchen der Masse m , mit dem Impuls $p = m * v$ und der Energie $E = \frac{1}{2}m * v^2$ beschrieben werden. Durch Verknüpfung beider Beziehungen gilt:

$$\text{De Broglie-Gl.} \quad \lambda = \frac{h}{p} = \frac{\hbar * k * \lambda}{m * v} \quad (14)$$

$$E = \frac{1}{2}m * v^2 = \frac{h^2}{2m * \lambda^2} = \frac{\hbar^2 * k^2}{2m} , \quad (15)$$

mit dem reduzierten Planck'schen Wirkungsquantum $\hbar = h/2\pi$ und dem Wellenvektor $k = 2\pi/\lambda$. Durch die Anwendung von Neutronen ergeben sich einige Besonderheiten und Vorteile für Strukturuntersuchungen¹⁷⁹. Im Gegensatz zur Röntgenstrahlung interagieren Neutronen mit dem Atomkern. Dieser Prozess ist Isotopenspezifisch. Insbesondere die unter-

schiedlichen Streulängendichten von Wasserstoff (H) und seinem Isotop Deuterium (D) werden häufig in der Neutronenstreuung zur Kontrastvariation benutzt. Das ist vor allem bei der Untersuchung biologischer Proben, die einen hohen Anteil an Wasserstoffatomen besitzen, vorteilhaft. Außerdem können Elemente, die eine ähnliche Anzahl von Elektronen besitzen und deshalb durch Röntgenstrahlung nicht unterschieden werden können, mit Hilfe der Neutronenstrahlung unterschieden werden. Ein Austausch von H_2O durch D_2O als Medium mit chemisch identischen Eigenschaften, führt beispielsweise zu einer Verbesserung des Kontrastes zwischen der biologischen Probe und dem wässrigen Medium. Je nach Versuchsaufbau können auch Kontrastvariation durch Mischen von H_2O und D_2O vorgenommen werden. Nachteile bei der Anwendung von Neutronen sind allerdings die geringe Intensität des Strahls und eine begrenzte Verfügbarkeit an Neutronenquellen.

1.2. REFLEKTOMETRIE – PRINZIP

Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, können Röntgen- und auch Neutronenstrahlen einerseits als Teilchen und andererseits als Welle angesehen werden. Um die Vorgänge in der Reflektometrie ausreichend beschreiben zu können, wird die untersuchte Strahlung als Welle betrachtet. Wie in Abb. 58 schematisch dargestellt, gilt analog zur klassischen Optik⁸²: Trifft ein Röntgen- bzw. Neutronenstrahl unter dem Winkel θ_e auf eine Grenzfläche zwischen zwei Medien, wird er zum Teil reflektiert und zum Teil im Medium gebrochen. Die Reflexion erfolgt nach dem Reflexionsgesetz unter dem Winkel $\theta_r = \theta_e$ (spekulare Streuung). Tritt der Strahl von dem optisch dichteren in das optisch dünnere Medium über, erfolgt nach dem Snellius'schen Gesetz (Gl. 16) eine Brechung unter dem Winkel θ_t vom Lot weg

$$n_1 * \cos(\theta_e) = n_2 * \cos(\theta_t). \quad (16)$$

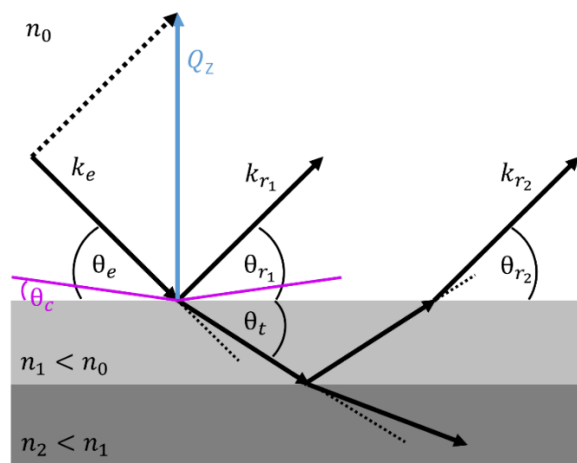


Abb. 58: Schematische Darstellung des Prinzips der Reflektometrie

Hierbei sind n_1 und n_2 die Brechungsindices des jeweiligen Mediums. Diese lassen sich sowohl für Röntgenstrahlung als auch für Neutronen, im Falle von nichtmagnetischen Substanzen und unter der Bedingung, dass keine Magnetisierung erfolgt, berechnen zu

$$n = 1 - \delta - i\beta, \quad (17)$$

wobei β der Absorptionskoeffizient ist und für die untersuchten Proben vernachlässigt werden kann. δ beschreibt die Dispersion und kann ermittelt werden gemäß nachfolgender Gleichungen

$$\delta_X = 1 - \frac{\lambda_X^2}{2\pi} \rho_e r_e \text{ (Röntgenstrahlen)} \quad \text{bzw.} \quad \delta_N = \frac{\lambda_N^2}{2\pi} \rho_N b \text{ (Neutronen)}, \quad (18)$$

mit λ als Wellenlänge der Röntgen- bzw. Neutronenstrahlung, r_e dem klassischen Elektronradius, b der Streulänge für Neutronen und der Teilchendichte ρ . Die Produkte $\rho_e r_e$ bzw. $\rho_N b$ werden auch als Streulängendichten (SLD) bezeichnet und lassen sich berechnen mit

$$SLD = \frac{\sum_{i=1}^n b_{c1}}{V_m} = \frac{N_A \rho_{mass}}{M_R} * \sum_{i=1}^n b_{c1}. \quad (19)$$

Hierbei ist N_A die Avogadrozahl, V_m das molekulare Volumen und ρ_{mass} die Massendichte des Materials, M_R die relative Molekülmasse und b die Streulänge des i ten Atoms eines Moleküls mit n Atomen. Für Röntgenstrahlen muss die Streulänge $b_i = Zr_e$ für jedes einzelne Atom bestimmt werden, wobei Z die Ordnungszahl und r_e der Comptonradius ist. Die SLD ist eine sehr charakteristische Größe für jede einzelne Schicht und lässt Rückschlüsse auf deren atomare Zusammensetzung zu.

Trifft der einfallende Strahl vom optisch dichteren auf das optisch dünnere Medium und ist dabei der Winkel des einfallenden Strahls θ_e kleiner als der kritische Winkel für die Totalreflexion θ_c , wird der Strahl in vollem Maße reflektiert und dringt nicht in das Medium ein (Abb. 58).

Bei der Charakterisierung von dünnen Schichten macht man sich diese Eigenschaft zu Nutze und misst die Intensität des reflektierten Neutronen- bzw. Röntgenstrahls im Winkel θ_r unter verschiedenen Einfallswinkeln θ_e . Dabei wird anstelle des Winkels θ üblicherweise der Impulsübertrag Q , der die Änderung des Neutronen- bzw. Elektronenimpulses bei der Reflexion an dem Material beschreibt, dargestellt. Dieser ist unabhängig von der Wellenlänge und ermöglicht so einen Vergleich der Messergebnisse verschiedener Experimente. Er ergibt sich aus der Differenz der Wellenvektoren \vec{k} des reflektierten und einfallenden Strahles (Abb. 58)

$$\vec{Q} = \vec{k}_r - \vec{k}_e \quad (20)$$

und steht mit dem Winkel θ , unter der Bedingung, dass elastische, spekulare Reflexion in der Einfallsebene vorliegt, wie folgt in Beziehung:

$$Q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\theta_e. \quad (1)$$

Der Impulsübertrag Q steht senkrecht zur Probenoberfläche und wird daher üblicherweise mit dem Index z versehen. Der Übersichtlichkeit wegen, wird im Folgenden auf diesen Index verzichtet.

Die Reflektivität R an einer ideal glatten Grenzfläche kann als das Verhältnis aus der reflektierten und der eingestrahnten Intensität nach den Fresnel'schen Gleichungen berechnet werden

$$R = \frac{I_r}{I_0} = |r|^2. \quad (21)$$

Der Reflexionskoeffizient r wird normalerweise in Abhängigkeit von der Polarisation der einfallenden Welle bestimmt. Für kleine Einfallswinkel sind die Fresnel Faktoren jedoch für die senkrechte und parallele Polarisationsrichtung gleich. Somit ergibt sich:

$$r = \frac{k_e - k_t}{k_e + k_t}. \quad (22)$$

Die Reflektivität R kann auch als Funktion vom Impulsübertrag dargestellt werden:

$$R(Q) = \left(\frac{Q - \sqrt{Q^2 - Q_c^2}}{Q + \sqrt{Q^2 - Q_c^2}} \right)^2. \quad (23)$$

Bei Einfallswinkeln $\theta_e \gg \theta_c$ vereinfacht sich die Formel zur Berechnung der Reflektivität wie folgt:

$$R = \left(\frac{\theta_c}{2\theta_e} \right)^4 = \frac{Q_c^4}{16Q^4}. \quad (24)$$

Demnach lässt sich ein starker Abfall für die Reflektivität mit steigenden Einfallswinkeln θ_e bzw. steigenden Impulsüberträgen Q erwarten. Findet keine Absorption statt, kann der transmittierte Anteil T der Strahlung berechnet werden zu:

$$T = 1 - R \quad (25)$$

Da die Reflektivität für den Fall $\theta_e > \theta_c$ proportional der Brechungsindexveränderung ist, erhält man durch inverse Fourier Transformation die Autokorrelationsfunktion der Brechungsindexveränderung, die der SLD-Funktion der Probe entspricht.

1.3. REFLEKTIVITÄTSMESSUNGEN AN SCHICHTSYSTEMEN

Mit Hilfe der Röntgen- und Neutronenreflektometrie (XR und NR) lassen sich verschiedene Eigenschaften von Dünnschichten und Multischichten bestimmen. Unter der Bedingung, dass keine Absorption auftritt, wird bei Einstrahlwinkeln unterhalb des kritischen Winkels die gesamte Intensität reflektiert. Dieser Winkel sollte in jedem Fall mit erfasst werden, da mit Hilfe des kritischen Winkels die SLD der total reflektierenden Schicht bestimmt werden kann, durch

$$\theta_c = \sqrt{2\delta}. \quad (26)$$

Nach Erreichen des kritischen Winkels fällt die reflektierte Intensität exponentiell ab und wird durch *Kiessig*-Oszillationen, periodische Modifizierungen der Reflektivität R in Abhängigkeit vom Einfallswinkel, überlagert. Diese entstehen durch die Interferenz der an den verschiedenen Grenzflächen eines Schichtsystems reflektierten Strahlen mit dem Wellenvektor k_r (Abb. 58) und enthalten Informationen über die Schichtdicke, SLD und Rauigkeit der Probe. Die Rauigkeit (Grenzflächenrauigkeit σ) entsteht, wenn die Grenzfläche zwischen zwei Schichten j und $j + 1$ eines mehrschichtigen Systems nicht ideal glatt ist. Sie wird durch das Einführen eines Exponenten berücksichtigt. Die Reflektivität wird hierbei in Anlehnung an Gl. 22 und unter der Bedingung, dass keine Mehrfachreflexion erfolgt, berechnet zu¹⁸⁰

$$r_{j,j+1} = \frac{k_j - k_{j+1}}{k_j + k_{j+1}} * e^{-2k_j k_{j+1} \sigma_{j,j+1}^2}. \quad (27)$$

Demzufolge kommt es bei einer großen Rauigkeit zur starken Abnahme der spekularen Reflektivität. Für die Gültigkeit dieses Zusammenhanges müssen die Rauigkeiten einer jeden Schicht jedoch deutlich kleiner als die Dicke der Schicht selbst sein¹⁸¹.

1.4. REFLEKTOMETER

STRAHLUNGSERZEUGUNG: Röntgenstrahlen werden in einer Röntgenröhre erzeugt, wobei Elektronen aus einer Glühkathode herausgeschlagen und beschleunigt werden. Die Elektronen werden durch das Aufprallen auf die Anode plötzlich abgebremst und interagieren mit dem Anodenmaterial. Die so entstandene Röntgenstrahlung besteht aus Bremsstrahlung und charakteristischer Röntgenstrahlung.

Neutronen können in Forschungsreaktoren durch Kernspaltung von Uran-235 oder unter Verwendung einer Spallationsquelle erzeugt werden, wobei hochenergetische Protonen auf ein neutronenreiches Material treffen und im Atomkern eine Kettenreaktion auslösen, bei

der Neutronen freigesetzt werden. Die so gewonnenen Neutronen sind sehr schnell und haben eine Energie im MeV-Bereich. Um diese abzubremesen, werden sie durch den mit Wasser gefüllten Reaktorpool (Moderator) auf thermische Energie abgekühlt. Das ist notwendig, um die Kettenreaktion im Kern aufrecht zu erhalten. Beim Durchströmen der kalten Quelle (sehr kalter Wasserstoff) am Rand des Reaktorkerns werden die Neutronen weiter abgekühlt, wodurch der Wellenlängenbereich auf bis zu einige Ångström ansteigt. Dadurch können die Neutronen einerseits entlang der Neutronenleiterrohre über eine längere Distanz bis an die Messinstrumente geleitet werden und andererseits sind sie in diesem Zustand für die meisten Strukturuntersuchungen besonders gut geeignet. Die polychromatischen Strahlen werden anschließend in Richtung Probe geleitet.

MESSANORDNUNG: Die Probe steht in aufrechter oder horizontaler Position in einem Winkel θ zum einfallenden Strahl. Auf dem Weg zur Probe kann aus dem Strahl durch Einsatz eines Monochromators eine bestimmte Wellenlänge herausgefiltert werden (bei Röntgenstrahlung $\text{CuK}_{\alpha 1}$; $\sim 0,154$ nm), die dann unter einem Winkel θ reflektiert wird. Bei TOF Instrumenten wird dagegen ein polychromatischer Strahl mit dem kompletten Wellenlängenspektrum pulsartig auf die Probe geleitet und reflektiert. Der Detektor erfasst im Winkel von 2θ zum einfallenden Strahl die reflektierten Neutronen. Dadurch können verschiedene Impulsüberträge gleichzeitig gemessen und die Messzeiten insgesamt stark verkürzt werden. Bei time-of-flight (TOF) Instrumenten wird hier die benötigte Flugzeit der Neutronen für das Zurücklegen der Strecke l von der Entstehung des Pulses bis zur Detektion bestimmt. Diese Flugzeit kann genutzt werden, um die Wellenlänge jedes einzelnen Neutrons zu bestimmen

$$\lambda = \frac{\text{TOF} \cdot h}{m \cdot l} \quad (10)$$

Um eine exakte Zeiterfassung zu ermöglichen, muss der Startzeitpunkt der Neutronen genau definiert sein. Hierzu werden Chopper in den auf die Probe geleiteten Neutronenstrahl eingebaut, die den Strahl in einzelne Pakete mit definierter Startzeit aufteilen.

DETEKTION: Röntgenstrahlen werden mit Hilfe eines Szintillationszählers detektiert. Hierbei werden in Abhängigkeit von der Energie der einfallenden ionisierenden Strahlung mehrere Lichtblitze ausgelöst. Diese setzen aus der Photokathode Elektronen frei, die an der Anode einen messbaren Stromimpuls auslösen.

Für die Detektion von Neutronenstrahlen werden z. B. zweidimensionale ^3He -Detektoren verwendet, bei denen die Neutronen mittels einer Kernreaktion eingefangen werden. Die dabei frei werdende Energie erzeugt einen Strom, der orts aufgelöst detektiert werden kann. Entsprechend der Auftreffposition in vertikaler Richtung am Detektor kann der dazugehörige Streuwinkel ermittelt werden.

2. MOLEKÜLSPEKTROSKOPIE

Bei der Molekülspektroskopie werden Moleküle durch die Absorption elektromagnetischer Strahlung angeregt. Die zum Übergang in den angeregten Zustand notwendige Energie wird beschrieben durch Gl. 13. Abhängig von der Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes kann dadurch eine Ionisation des Moleküls, eine Anregung des Elektronensystems (Fluorimetrie), eine Anregung von Molekülschwingungen (IR) oder eine Anregung von Molekülrotationen erfolgen. Die angeregten Moleküle können beim Übergang in den Grundzustand diese Energie in Form von Wärme oder Strahlungsenergie wieder abgeben. Bei der Abgabe der Energie als Wärmestrahlung (siehe IR, Kapitel VIII.2.2.) wird der absorbierte Anteil der eingestrahlten Lichtintensität in Abhängigkeit von der Wellenlänge als Absorptionsspektrum aufgenommen, während bei der Aussendung von Strahlungsenergie ein Emissionsspektrum detektiert wird (Fluorimetrie, Kapitel V.1.1)¹⁸².

2.1. FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE

Mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie lässt sich eine Vielzahl von Problemstellungen untersuchen. Dazu gehören unter anderem Wechselwirkungen zwischen Fluorophoren und Lösungsmittelmolekülen, Abstände zwischen Biomolekülen, Konformationsänderungen, Bindungswechselwirkungen und Rotationsdiffusionsbewegungen von Biomolekülen¹⁸³. Darüber hinaus lassen sich mit dieser Methode auch strukturelle Eigenschaften wie z. B. Phasenübergänge oder verschiedene Wechselwirkungen untersuchen. Bei der Fluoreszenzspektroskopie handelt es sich um eine Form der Emissionsspektroskopie, bei der die absorbierte Lichtenergie in Form von Strahlungsenergie anderer Wellenlänge wieder abgegeben wird. Diese Vorgänge werden im Jablonski-Termschema (Abb. 59) verdeutlicht. Das Molekül im Grundzustand S_0 wird in die verschiedenen Schwingungsniveaus der angeregten Zustände S_1 und S_2 gehoben. Bei der Fluoreszenz wird zunächst ein Teil der Energie in Form von strahlungsloser Deaktivierung abgegeben, sodass sich das Molekül im Schwingungsniveau $v = 0$ des angeregten Zustandes S_1 befindet. Von dort aus gelangt das Molekül durch Aussendung von Fluoreszenzlicht in die verschiedenen Schwingungszustände ($v = 0, 1, 2$ usw.) des Grundzustandes. Die Energie des Fluoreszenzlichtes ist also in der Regel geringer, als die des absorbierten Lichtes.

Die Messung des emittierten Fluoreszenzlichtes erfolgt mit Hilfe eines Fluorimeters. Dabei werden als Lichtquellen meist Xenon- oder Quecksilberdampf lampen mit einer möglichst konstanten Lichtintensität verwendet, weil die Fluoreszenzintensität von der Intensität des Anregungslichtes abhängt. Ein Monochromator im Anregungsstrahlengang ermöglicht die

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi} * \sqrt{\frac{k^*}{M}} \quad \text{mit} \quad M = \frac{m_A * m_B}{m_A + m_B} \quad (28)$$

wobei M die reduzierte Masse ist und $\tilde{\nu}$ umso größer, je kräftiger die Feder, und je kleiner die Massen m_A und m_B sind. Die Schwingungsfrequenzen vieler Atomgruppen sind besonders charakteristisch und zudem sensitiv gegenüber verschiedenen Wechselwirkungen.

2.2.1. PRINZIP FTIR

Bei der Verwendung von FTIR-Geräten wird die Strahlung des gesamten IR-Bereiches gleichzeitig auf die Probe eingestrahlt. Um die Frequenzdomäne bei der Messung in eine Zeitdomäne umzuwandeln, ist ein Michelson Interferometer zwischen Lichtquelle und Probe essentiell. Hier wird der Strahl zunächst in zwei Teile (A und B) geteilt, welche an je einem Spiegel reflektiert werden und sich wieder zu einem Strahl C vereinigen. Der Spiegel für Strahl B ist beweglich und beeinflusst dadurch den vom Strahl zurückgelegten Weg. In der Folge verändert sich die Phasenlage vom Strahl B. Bei der Wiedervereinigung von Strahl A und B treten nun je nach Phasenlage des Strahles B konstruktive oder destruktive Interferenzen auf. Durch Hin- und Herbewegung des Spiegels werden so Intensitätsmaxima und –minima erzeugt. Eine bestimmte Zeit der Spiegelbewegung korreliert dabei mit einer bestimmten Wellenlänge. Trifft der Strahl auf die Probe, werden Teile davon bei den für die Probe charakteristischen Wellenzahlen absorbiert. Die Lichtintensität, die nicht von der Probe absorbiert wurde, wird dann als Funktion der Zeit detektiert. Das so erhaltene Interferogramm wird durch Fourier-Transformation in das dazugehörige IR-Spektrum umgewandelt¹⁸².

3. PHOTONENKORRELATIONSSPEKTROSKOPIE

Die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) ist ein Laserstreulichtverfahren zur Ermittlung von Partikelgrößen von etwa 3 nm bis 3 μm . Die mit dieser Methode direkt ermittelten Größen sind die Partikel- bzw. Strömungsgeschwindigkeiten, aus denen sich die entsprechenden Partikelgrößen berechnen lassen. Dabei wird auf eine Dispersion Laserlicht eingestrahlt, welches von den Partikeln gestreut wird. Das Streulicht wird in einem 90°-Winkel detektiert. Dieses ist durch die Interferenzerscheinungen, die aufgrund einer bestimmten Anordnung der Partikel zustande kommen, sehr charakteristisch. Kurz darauf wird die Probe erneut bestrahlt und die Streulichtintensität gemessen. Haben die Partikel sich in dieser Zeit schnell bewegt (kleine Partikel), so haben sie im Vergleich zur vorhergehenden Messung eine stark veränderte Position (Abb. 60). Durch die veränderten Positionen der Teilchen ändern sich auch die Interferenzerscheinungen stark und die Streulichtintensität

weicht deutlich von der zuvor Gemessenen ab. Dagegen unterscheiden sich die beiden gemessenen Streulichtintensitäten von größeren Partikeln nur geringfügig, da diese ihre Position in der kurzen Zeit kaum verändert haben. Vom Detektor wird nun die Schwankungsgeschwindigkeit der Streulichtintensität ermittelt. Da sich kleinere Teilchen schneller bewegen als Größere, schwankt bei diesen die Streulichtintensität schneller, als bei Größeren.

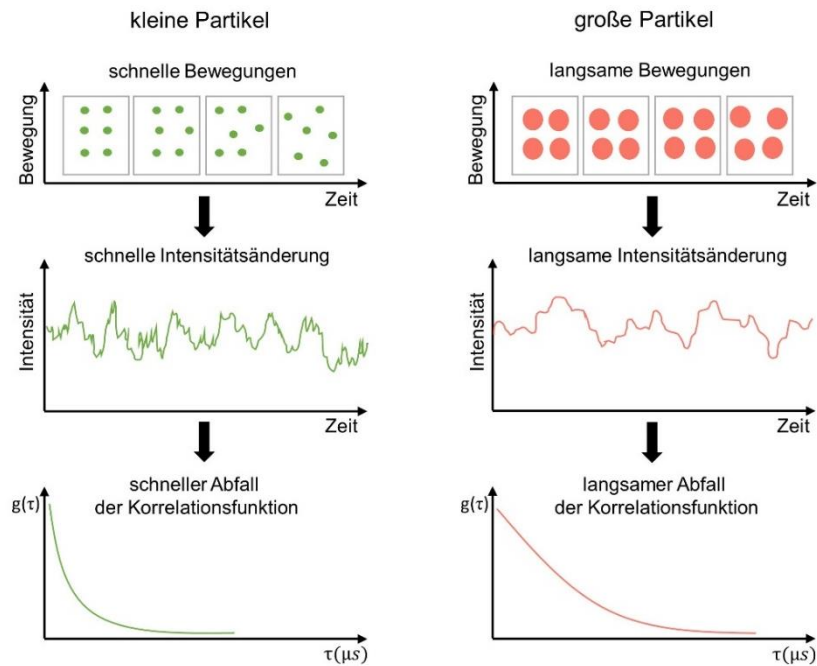


Abb. 60: Messprinzip der PCS und Auswertung der Daten; Modifiziert nach ⁹⁵

Ausgewertet werden die im Detektor erhaltenen Daten über eine Korrelationsfunktion. Dabei fällt die Korrelationsfunktion

$$g(\tau) = e^{-2DK^2} \quad (29)$$

für kleinere Partikel schneller ab, als für Größere. $g(\tau)$ entspricht y in einer Gleichung der Form $y = e^{-x}$ und kann aus den Intensitäten der verschiedenen Messzeiten τ durch einen Multiplikationsprozess erhalten werden. K ist der Streulichtvektor, der aus der Laserlichtwellenlänge und dem Detektionswinkel ermittelt werden kann. Die einzige Unbekannte - die Diffusionskonstante D - kann somit berechnet werden. Der Wert für D kann in die Einstein-Gleichung eingesetzt und diese nach dem Partikelradius r_p umgestellt werden:

$$r_p = \frac{K_b * T_a}{D6\pi\eta} \quad (30)$$

K_b stellt die Boltzmann Konstante dar, T_a die absolute Temperatur und η die Viskosität des Dispersionsmittels. Zusätzlich zur Partikelgröße, wird der Polydispersitätsindex (PDI), ein Maß für die Breite der Verteilung ermittelt. Dabei stehen Werte von Null für monodisperse Verteilungen, 0,1 bis 0,2 für enge, 0,3 für breite und 0,5 für sehr breite Verteilungen⁹⁵.

C – MATERIALIEN

Lipide zur Präparation der Modellsysteme:

Ceramid [AP]-C18:18 (92,3 %) wurde von Evonik Industries AG (Essen, Deutschland) zur Verfügung gestellt und über Säulenchromatographie zusätzlich gereinigt. Stearinsäure ($\geq 99,5\%$), Lignocerinsäure ($\geq 99,9\%$) und Cholesterol (99+ %) wurden von Sigma Aldrich GmbH (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

Enhancer:

Harnstoff (98+ %), Taurin ($\geq 99,5\%$) und 1,5-Pentandiol ($\geq 97,0\%$) wurden ebenfalls von Sigma Aldrich GmbH (Taufkirchen, Deutschland), Glycerol ($\geq 98\%$) und DMSO ($\geq 99,5\%$) von Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany) und Propylenglykol von BASF (Ludwigshafen, Deutschland) erworben. 1,2-Pentandiol (Hydrolite®) wurde von Symrise (Holzminden, Germany) zur Verfügung gestellt.

Weitere Substanzen:

Triton X 100 (reinst) wurde bei Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany), Sephadex G-50 bei MP Biomedicals (Santa Ana, CA, United States), Bis-Tris (Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methane; $\geq 98\%$), Tris(tris(hydroxymethyl)aminomethane; $\geq 99,9\%$), branched Polyethy-lenimin (50 % (w/v) wässrige Lösung; $M_w \approx 750$ kDa, $M_n \approx 60$ kDa), 5(6)-Carboxyfluorescein ($\geq 95\%$) und Natriumchlorid ($\geq 99,8\%$) bei Sigma Aldrich GmbH (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

Lösungsmittel:

D₂O (Reinheit $\geq 99,9$ Atom % D), Ammoniumhydroxid und Wasserstoffperoxid (30 %) wurden von Sigma Aldrich GmbH (Taufkirchen, Deutschland) und Chloroform und Methanol ($\geq 99,9\%$) von Merck (Darmstadt, Deutschland) erworben.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

1. Guy, R. H. Current Status and Future Prospects of Transdermal Drug Delivery. In *Pharmaceutical Research*; Springer Netherlands, **1996**; Vol. 13, pp 1765-1769.
2. Neubert, R. H. H.; Wepf, R. Struktur und Morphologie einer Barriere. *Pharmazeutische Zeitung* **2007**, *17*.
3. Trommer, H.; Neubert, R. H. Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review. *Skin Pharmacol Physiol* **2006**, *19* (2), 106-21.
4. Schroeter, A.; Eichner, A.; Mueller, J.; Neubert, R. H. H. Penetration Enhancers and Their Mechanism Studied on a Molecular Level. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*; Springer, **2015**, pp 29-37.
5. Schroter, A.; Kessner, D.; Kiselev, M. A.; Hauss, T.; Dante, S.; Neubert, R. H. Basic nanostructure of stratum corneum lipid matrices based on ceramides [EOS] and [AP]: a neutron diffraction study. *Biophys. J.* **2009**, *97* (4), 1104-14.
6. Kiselev, M. A. Conformation of ceramide 6 molecules and chain-flip transitions in the lipid matrix of the outermost layer of mammalian skin, the stratum corneum. *Crystallogr. Rep.* **2007**, *52* (3), 525-528.
7. Zbytovska, J. New insights into the stratum corneum lipid membrane organisation; an X-ray and neutron scattering study. PhD, Martin-Luther-Universität, **2006**.
8. Kessner, D. Neutron scattering on biological subjects – Neue Einblicke in die Struktur der Lipidmatrix des Stratum corneums, basierend auf Modellmembranen. PhD, Martin Luther University Halle-Wittenberg, **2010**.
9. t'Kindt, R.; Jorge, L.; Dumont, E.; Couturon, P.; David, F.; Sandra, P.; Sandra, K. Profiling and characterizing skin ceramides using reversed-phase liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (1), 403-11.
10. Norlen, L.; Nicander, I.; Lundsjo, A.; Cronholm, T.; Forslind, B. A new HPLC-based method for the quantitative analysis of inner stratum corneum lipids with special reference to the free fatty acid fraction. *Arch Dermatol Res* **1998**, *290* (9), 508-16.
11. Thews, G., Mutschler, E., Vaupel, P. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen.* ; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft,; Stuttgart, **1999**; Vol. Vol. 5.
12. Neubert, R., Wohlrab, W., Marsch, W. *Dermatopharmazie: Vehikel–Wirkstoffe-Pharmakologie*; WVG: Stuttgart, **2001**; Vol. 1.
13. Swartzendruber, D. C.; Wertz, P. W.; Madison, K. C.; Downing, D. T. Evidence that the corneocyte has a chemically bound lipid envelope. *J Invest Dermatol* **1987**, *88* (6), 709-13.

14. Elias, P. M. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol* **1983**, *80 Suppl*, 44s-49s.
15. Wertz, P. W. Stratum corneum Lipids and Water. *Exogenous Dermatology* **2004**, *3* (2), 53-56.
16. McIntosh, T. J. The effect of cholesterol on the structure of phosphatidylcholine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *513* (1), 43-58.
17. Bhattacharya, S.; Haldar, S. Interactions between cholesterol and lipids in bilayer membranes. Role of lipid headgroup and hydrocarbon chain-backbone linkage. *Bba-Biomembranes* **2000**, *1467* (1), 39-53.
18. Mojumdar, E. H.; Gooris, G. S.; Groen, D.; Barlow, D. J.; Lawrence, M. J.; Deme, B.; Bouwstra, J. A. Stratum corneum lipid matrix: Location of acyl ceramide and cholesterol in the unit cell of the long periodicity phase. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1858* (8), 1926-34.
19. Mojumdar, E. H.; Groen, D.; Gooris, G. S.; Barlow, D. J.; Lawrence, M. J.; Deme, B.; Bouwstra, J. A. Localization of cholesterol and fatty acid in a model lipid membrane: a neutron diffraction approach. *Biophys. J.* **2013**, *105* (4), 911-8.
20. Bonte, F.; Saunois, A.; Pinguet, P.; Meybeck, A. Existence of a lipid gradient in the upper stratum corneum and its possible biological significance. *Arch Dermatol Res* **1997**, *289* (2), 78-82.
21. Ponec, M.; Weerheim, A.; Lankhorst, P.; Wertz, P. New acylceramide in native and reconstructed epidermis. *J Invest Dermatol* **2003**, *120* (4), 581-8.
22. Wertz, P. W. The nature of the epidermal barrier: Biochemical aspects. *Adv. Drug Del. Rev.* **1996**, *18* (3), 283-294.
23. Holleran, W. M.; Takagi, Y.; Uchida, Y. Epidermal sphingolipids: metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS Lett* **2006**, *580* (23), 5456-66.
24. Coderch, L.; Lopez, O.; de la Maza, A.; Parra, J. L. Ceramides and skin function. *Am J Clin Dermatol* **2003**, *4* (2), 107-29.
25. Holleran, W. M.; Man, M. Q.; Gao, W. N.; Menon, G. K.; Elias, P. M.; Feingold, K. R. Sphingolipids are required for mammalian epidermal barrier function. Inhibition of sphingolipid synthesis delays barrier recovery after acute perturbation. *J Clin Invest* **1991**, *88* (4), 1338-45.
26. Leopold, A. Neue Konzepte zur Reinigung von Siliciumoberflächen. Technischen Universität München, **2003**.
27. Wertz, P. W.; Downing, D. T. Ceramides of pig epidermis: structure determination. *J Lipid Res* **1983**, *24* (6), 759-65.
28. Farwanah, H.; Pierstorff, B.; Schmelzer, C. E.; Raith, K.; Neubert, R. H.; Kolter, T.; Sandhoff, K. Separation and mass spectrometric characterization of covalently bound skin ceramides using LC/APCI-MS and Nano-ESI-MS/MS. *Journal of*

- chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **2007**, 852 (1-2), 562-70.
29. Masukawa, Y.; Narita, H.; Shimizu, E.; Kondo, N.; Sugai, Y.; Oba, T.; Homma, R.; Ishikawa, J.; Takagi, Y.; Kitahara, T.; Takema, Y.; Kita, K. Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum. *J Lipid Res* **2008**, 49 (7), 1466-76.
 30. Rabionet, M.; Bayerle, A.; Marsching, C.; Jennemann, R.; Grone, H. J.; Yildiz, Y.; Wachten, D.; Shaw, W.; Shayman, J. A.; Sandhoff, R. 1-O-acylceramides are natural components of human and mouse epidermis. *J Lipid Res* **2013**, 54 (12), 3312-21.
 31. Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Caputo, R.; Carelli, S.; Ghidoni, R. Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, 1182 (2), 147-51.
 32. Kiselev, M. A.; Ryabova, N. Y.; Balagurov, A. M.; Dante, S.; Hauss, T.; Zbytovska, J.; Wartewig, S.; Neubert, R. H. New insights into the structure and hydration of a stratum corneum lipid model membrane by neutron diffraction. *Eur Biophys J* **2005**, 34 (8), 1030-40.
 33. Raudenkolb, S. Untersuchungen zur strukturellen und physikochemischen Charakterisierung von Stratum corneum Lipiden und deren Mischsystemen. PhD, Martin Luther University Halle-Wittenberg, **2002**.
 34. Bommaman, D.; Potts, R. O.; Guy, R. H. Examination of stratum corneum barrier function in vivo by infrared spectroscopy. *J Invest Dermatol* **1990**, 95 (4), 403-8.
 35. Ongpipattanakul, B.; Francoeur, M. L.; Potts, R. O. Polymorphism in stratum corneum lipids. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1190 (1), 115-22.
 36. Pilgram, G. S.; Vissers, D. C.; van der Meulen, H.; Pavel, S.; Lavrijsen, S. P.; Bouwstra, J. A.; Koerten, H. K. Aberrant lipid organization in stratum corneum of patients with atopic dermatitis and lamellar ichthyosis. *J Invest Dermatol* **2001**, 117 (3), 710-7.
 37. Mendelsohn, R.; Flach, C. R.; Moore, D. J. Determination of molecular conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, 1758 (7), 923-33.
 38. Groen, D.; Poole, D. S.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A. Is an orthorhombic lateral packing and a proper lamellar organization important for the skin barrier function? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2011**, 1808 (6), 1529-1537.
 39. Swartzendruber, D. C.; Wertz, P. W.; Kitko, D. J.; Madison, K. C.; Downing, D. T. Molecular models of the intercellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum. *J Invest Dermatol* **1989**, 92 (2), 251-7.
 40. Forslind, B. A domain mosaic model of the skin barrier. *Acta Derm Venereol* **1994**, 74 (1), 1-6.
 41. Bouwstra, J. A.; Dubbelaar, F. E.; Gooris, G. S.; Ponc, M. The lipid organisation in the skin barrier. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* **2000**, 208, 23-30.

42. Norlen, L. Skin barrier structure and function: the single gel phase model. *J Invest Dermatol* **2001**, *117* (4), 830-6.
43. Kiselev, M. Conformation of ceramide 6 molecules and chain-flip transitions in the lipid matrix of the outermost layer of mammalian skin, the stratum corneum. In *Crystallography Reports*; MAIK Nauka/Interperiodica distributed exclusively by Springer Science+Business Media LLC., **2007**; Vol. 52, pp 525-528.
44. Iwai, I.; Han, H. M.; den Hollander, L.; Svensson, S.; Ofverstedt, L. G.; Anwar, J.; Brewer, J.; Bloksgaard, M.; Laloef, A.; Nosek, D.; Masich, S.; Bagatolli, L. A.; Skoglund, U.; Norlen, L. The Human Skin Barrier Is Organized as Stacked Bilayers of Fully Extended Ceramides with Cholesterol Molecules Associated with the Ceramide Sphingoid Moiety. *Journal of Investigative Dermatology* **2012**, *132* (9), 2215-2225.
45. de Jager, M. W.; Gooris, G. S.; Dolbnya, I. P.; Bras, W.; Ponec, M.; Bouwstra, J. A. Novel lipid mixtures based on synthetic ceramides reproduce the unique stratum corneum lipid organization. *J Lipid Res* **2004**, *45* (5), 923-32.
46. de Jager, M. W.; Gooris, G. S.; Dolbnya, I. P.; Ponec, M.; Bouwstra, J. A. Modelling the stratum corneum lipid organisation with synthetic lipid mixtures: the importance of synthetic ceramide composition. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1664* (2), 132-40.
47. de Jager, M. W.; Gooris, G. S.; Ponec, M.; Bouwstra, J. A. Lipid mixtures prepared with well-defined synthetic ceramides closely mimic the unique stratum corneum lipid phase behavior. *J Lipid Res* **2005**, *46* (12), 2649-56.
48. Schröter, A. The role of ceramide [AP] for the structural assembly of stratum corneum lipid model membranes. PhD, Martin Luther University Halle-Wittenberg, **2010**.
49. Barry, B. W. Lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. *Journal of Controlled Release* **1991**, *15* (3), 237-248.
50. Barry, B. W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci* **2001**, *14* (2), 101-14.
51. Menon, G. K.; Lee, S. H.; Roberts, M. S. Ultrastructural effects of some solvents and vehicles on the stratum corneum and other skin components: evidence for an extended mosaic-partitioning model of the skin barrier. *Drugs and the pharmaceutical sciences* **1998**, *91*, 727-751.
52. Williams, A. C.; Barry, B. W. Penetration enhancers. *Adv. Drug Del. Rev.* **2012**, *64*, 128-137.
53. Barry, B. W. Breaching the skin's barrier to drugs. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22* (2), 165-7.
54. Boddé, H. E.; van den Brink, I.; Koerten, H. K.; de Haan, F. H. N. Visualization of in vitro percutaneous penetration of mercuric chloride; transport through intercellular space versus cellular uptake through desmosomes. *Journal of Controlled Release* **1991**, *15* (3), 227-236.

55. Talreja, P.; Kleene, N. K.; Pickens, W. L.; Wang, T. F.; Kasting, G. B. Visualization of the lipid barrier and measurement of lipid pathlength in human stratum corneum. *AAPS PharmSci* **2001**, *3* (2), E13.
56. Dragicevic, N.; Maibach, H. I. *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Modification of the Stratum Corneum*; Springer, **2015**.
57. Engelbrecht, T. N.; Schroeter, A.; Hauß, T.; Demé, B.; Scheidt, H. A.; Huster, D.; Neubert, R. H. H. The impact of ceramides NP and AP on the nanostructure of stratum corneum lipid bilayer. Part I: neutron diffraction and ²H NMR studies on multilamellar models based on ceramides with symmetric alkyl chain length distribution. *Soft Matter* **2012**, *8* (24), 6599.
58. Engelbrecht, T. N.; Deme, B.; Dobner, B.; Neubert, R. H. H. Study of the Influence of the Penetration Enhancer Isopropyl Myristate on the Nanostructure of Stratum Corneum Lipid Model Membranes Using Neutron Diffraction and Deuterium Labelling. *Skin Pharmacology and Physiology* **2012**, *25* (4), 200-207.
59. Engelbrecht, T. N.; Schroeter, A.; Hauss, T.; Neubert, R. H. Lipophilic penetration enhancers and their impact to the bilayer structure of stratum corneum lipid model membranes: neutron diffraction studies based on the example oleic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808* (12), 2798-806.
60. Zbytovska, J.; Vavrova, K.; Kiselev, M. A.; Lessieur, P.; Wartewig, S.; Neubert, R. H. H. The effects of transdermal permeation enhancers on thermotropic phase behaviour of a stratum corneum lipid model. *Colloid Surface A* **2009**, *351* (1-3), 30-37.
61. Kessner, D.; Kiselev, M.; Dante, S.; Hauss, T.; Lersch, P.; Wartewig, S.; Neubert, R. H. Arrangement of ceramide [EOS] in a stratum corneum lipid model matrix: new aspects revealed by neutron diffraction studies. *Eur Biophys J* **2008**, *37* (6), 989-99.
62. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Dubbelaar, F. E.; Ponc, M. Phase behavior of lipid mixtures based on human ceramides: coexistence of crystalline and liquid phases. *J Lipid Res* **2001**, *42* (11), 1759-70.
63. Fenske, D. B.; Thewalt, J. L.; Bloom, M.; Kitson, N. Models of stratum corneum intercellular membranes: ²H NMR of macroscopically oriented multilayers. *Biophys. J.* **1994**, *67* (4), 1562-73.
64. Iwai, I.; Han, H.; den Hollander, L.; Svensson, S.; Ofverstedt, L. G.; Anwar, J.; Brewer, J.; Bloksgaard, M.; Laloef, A.; Nosek, D.; Masich, S.; Bagatolli, L. A.; Skoglund, U.; Norlen, L. The human skin barrier is organized as stacked bilayers of fully extended ceramides with cholesterol molecules associated with the ceramide sphingoid moiety. *J Invest Dermatol* **2012**, *132* (9), 2215-25.
65. Mäder, K., Weidenauer, U. *Innovative Arzneiformen - ein Lehrbuch für Studium und Praxis*, **2010**.
66. Abraham, W.; Downing, D. T. Preparation of Model Membranes for Skin Permeability Studies Using Stratum-Corneum Lipids. *Journal of Investigative Dermatology* **1989**, *93* (6), 809-813.

67. Sackmann, E. L., R. *Structure and dynamics of membranes*; Elsevier Science, **1995**; Vol. 1. Auflage.
68. Torchilin, V., P. ; Weissig, V. *Liposomes - a practical approach* **2007**; Vol. 2. Auflage.
69. Blumenthal, R.; Weinstein, J. N.; Sharrow, S. O.; Henkart, P. Liposome--lymphocyte interaction: saturable sites for transfer and intracellular release of liposome contents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1977**, *74* (12), 5603-7.
70. Kern, W.; Puotinen, D. A. Cleaning Solutions Based on Hydrogen Peroxide for Use in Silicon Semiconductor Technology. *Rca Review* **1970**, *31* (2), 187-&.
71. Kern, W. The Evolution of Silicon-Wafer Cleaning Technology. *J. Electrochem. Soc.* **1990**, *137* (6), 1887-1892.
72. Karst, J. C.; Barker, R.; Devi, U.; Swann, M. J.; Davi, M.; Roser, S. J.; Ladant, D.; Chenal, A. Identification of a region that assists membrane insertion and translocation of the catalytic domain of Bordetella pertussis CyaA toxin. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (12), 9200-12.
73. Kreuzer, M. Solid-supported lipid membranes and their response to varied environmental conditions. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **2011**.
74. Goni, F. M.; Alonso, A. Biophysics of sphingolipids I. Membrane properties of sphingosine, ceramides and other simple sphingolipids. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758* (12), 1902-21.
75. Mennicke, U.; Salditt, T. Preparation of solid-supported lipid bilayers by spin-coating. *Langmuir* **2002**, *18* (21), 8172-8177.
76. Seul, M.; Sammon, M. J. Preparation of Surfactant Multilayer Films on Solid Substrates by Deposition from Organic Solution. *Thin Solid Films* **1990**, *185* (2), 287-305.
77. Howse, J. R.; Bowers, J.; Manzanares-Papayanopoulos, E.; McLure, I. A.; Steitz, R. Neutron reflectivity studies of critical adsorption: The correspondence between a critical adsorption profile and specular neutron reflection. *Physical Review E* **1999**, *59* (5), 5577-5581.
78. Strobl, M.; Steitz, R.; Kreuzer, M.; Rose, M.; Herrlich, H.; Mezei, F.; Grunze, M.; Dahint, R. BioRef: A versatile time-of-flight reflectometer for soft matter applications at Helmholtz-Zentrum Berlin. *Review of Scientific Instruments* **2011**, *82* (5), 055101-9.
79. HZB. <http://www.helmholtz-berlin.de/quellen/ber/ber2/>.
80. van Well, A. A. Double-disk chopper for neutron time-of-flight experiments. *Physica B: Condensed Matter* **1992**, *180-181*, 959-961.
81. Heavens, O. S. Optical properties of thin films. *Rep. Prog. Phys.* **1960**, *23* (1), 1.
82. Born, M.; Wolf, E. *Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light*; CUP Archive, **2000**; Vol. 7.

83. Parratt, L. G. Surface Studies of Solids by Total Reflection of X-Rays. *Physical Review* **1954**, 95 (2), 359-369.
84. Campbell, R. A.; Wacklin, H. P.; Sutton, I.; Cubitt, R.; Fragneto, G. FIGARO: The new horizontal neutron reflectometer at the ILL. *Eur Phys J Plus* **2011**, 126 (11), 1-22.
85. <https://www.ill.eu/instruments-support/instruments-groups/instruments/figaro>.
86. Hughes, A. V. *RasCAL*, downloaded from: <http://sourceforge.net/projects/rscl/>. **2013**.
87. Yanez Arteta, M.; Ainalem, M. L.; Porcar, L.; Martel, A.; Coker, H.; Lundberg, D.; Chang, D. P.; Soltwedel, O.; Barker, R.; Nylander, T. Interactions of PAMAM dendrimers with negatively charged model biomembranes. *J. Phys. Chem. B* **2014**, 118 (45), 12892-906.
88. Chen, R. F.; Knutson, J. R. Mechanism of fluorescence concentration quenching of carboxyfluorescein in liposomes: energy transfer to nonfluorescent dimers. *Anal. Biochem.* **1988**, 172 (1), 61-77.
89. de la Maza, A.; Parra, J. L. Assembly properties of Triton X-100/phosphatidylcholine aggregates during liposome solubilization. *Colloid. Polym. Sci.* **1996**, 274 (9), 866-874.
90. Nishijo, J.; Shiota, S.; Mazima, K.; Inoue, Y.; Mizuno, H.; Yoshida, J. Interactions of cyclodextrins with dipalmitoyl, distearoyl, and dimyristoyl phosphatidyl choline liposomes. A study by leakage of carboxyfluorescein in inner aqueous phase of unilamellar liposomes. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2000**, 48 (1), 48-52.
91. Wartewig, S.; Neubert, R. H. Pharmaceutical applications of Mid-IR and Raman spectroscopy. *Adv Drug Deliv Rev* **2005**, 57 (8), 1144-70.
92. Boncheva, M.; Damien, F.; Normand, V. Molecular organization of the lipid matrix in intact Stratum corneum using ATR-FTIR spectroscopy. *Bba-Biomembranes* **2008**, 1778 (5), 1344-1355.
93. Mendelsohn, R.; Rerek, M. E.; Moore, D. J. Infrared spectroscopy and microscopic imaging of stratum corneum models and skin. Invited Lecture. *PCCP* **2000**, 2 (20), 4651-4657.
94. Guillard, E. C.; Tfayli, A.; Laugel, C.; Baillet-Guffroy, A. Molecular interactions of penetration enhancers within ceramides organization: a FTIR approach. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2009**, 36 (2), 192-199.
95. Müller, R. H. *Moderne Pharmazeutische Technologie*. **2009**.
96. Mueller, J.; Schroeter, A.; Steitz, R.; Trapp, M.; Neubert, R. H. Preparation of a New Oligolamellar Stratum Corneum Lipid Model. *Langmuir* **2016**, 32 (18), 4673-80.
97. Kessner, D.; Kiselev, M. A.; Hauss, T.; Dante, S.; Wartewig, S.; Neubert, R. H. Localisation of partially deuterated cholesterol in quaternary SC lipid model membranes: a neutron diffraction study. *Eur Biophys J* **2008**, 37 (6), 1051-7.

98. Zbytovská, J.; Kiselev, M. A.; Funari, S. S.; Garamus, V. M.; Wartewig, S.; Palát, K.; Neubert, R. Influence of cholesterol on the structure of stratum corneum lipid model membrane. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects* **2008**, *328* (1-3), 90-99.
99. Kolasinska, M.; Krastev, R.; Warszynski, P. Characteristics of polyelectrolyte multilayers: effect of PEI anchoring layer and posttreatment after deposition. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *305* (1), 46-56.
100. Delcea, M.; Krastev, R.; Gutberlet, T.; Pum, D.; Sleytr, U. B.; Toca-Herrera, J. L. Thermal stability, mechanical properties and water content of bacterial protein layers recrystallized on polyelectrolyte multilayers. *Soft Matter* **2008**, *4* (7), 1414-1421.
101. Zhu, H.; Ji, J.; Shen, J. Biomacromolecules electrostatic self-assembly on 3-dimensional tissue engineering scaffold. *Biomacromolecules* **2004**, *5* (5), 1933-9.
102. Steitz, R.; Leiner, V.; Siebrecht, R.; von Klitzing, R. Influence of the ionic strength on the structure of polyelectrolyte films at the solid/liquid interface. *Colloid Surface A* **2000**, *163* (1), 63-70.
103. Losche, M.; Schmitt, J.; Decher, G.; Bouwman, W. G.; Kjaer, K. Detailed structure of molecularly thin polyelectrolyte multilayer films on solid substrates as revealed by neutron reflectometry. *Macromolecules* **1998**, *31* (25), 8893-8906.
104. Raudenkolb, S.; Wartewig, S.; Neubert, R. H. Polymorphism of ceramide 6: a vibrational spectroscopic and X-ray powder diffraction investigation of the diastereomers of N-(alpha-hydroxyoctadecanoyl)-phytosphingosine. *Chem Phys Lipids* **2005**, *133* (1), 89-102.
105. Craven, B. M. Crystal structure of cholesterol monohydrate. *Nature* **1976**, *260* (5553), 727-9.
106. Malik, A.; Durbin, M. K.; Richter, A. G.; Huang, K. G.; Dutta, P. Structures of head-group and tail-group monolayers in a Langmuir-Blodgett film. *Physical review. B, Condensed matter* **1995**, *52* (16), 11654-11657.
107. Ren, S. L.; Yang, S. R.; Wang, J. Q.; Liu, W. M.; Zhao, Y. P. Preparation and tribological studies of stearic acid self-assembled monolayers on polymer-coated silicon surface. *Chem. Mater.* **2004**, *16* (3), 428-434.
108. Lafleur, M. Phase behaviour of model stratum corneum lipid mixtures: an infrared spectroscopy investigation. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* **1998**, *76* (11), 1501-1511.
109. Garidel, P.; Folting, B.; Schaller, I.; Kerth, A. The microstructure of the stratum corneum lipid barrier: mid-infrared spectroscopic studies of hydrated ceramide:palmitic acid:cholesterol model systems. *Biophys. Chem.* **2010**, *150* (1-3), 144-56.
110. Williams, A. C.; Barry, B. W. Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev* **2004**, *56* (5), 603-18.

111. Elias, P. M.; Tsai, J.; Menon, G. K.; Holleran, W. M.; Feingold, K. R. In *The potential of metabolic interventions to enhance transdermal drug delivery*, Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, **2002**; Nature Publishing Group, pp 79-85.
112. Alber, C.; Brandner, B. D.; Bjorklund, S.; Billsten, P.; Corkery, R. W.; Engblom, J. Effects of water gradients and use of urea on skin ultrastructure evaluated by confocal Raman microspectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1828* (11), 2470-8.
113. Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; van der Spek, J. A.; Bras, W. Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering. *J Invest Dermatol* **1991**, *97* (6), 1005-12.
114. Barry, B. W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *Journal of Controlled Release* **1987**, *6* (1), 85-97.
115. Mendelsohn, R.; Moore, D. J. Vibrational spectroscopic studies of lipid domains in biomembranes and model systems. *Chem Phys Lipids* **1998**, *96* (1-2), 141-57.
116. Rerek, M. E.; Van Wyck, D.; Mendelsohn, R.; Moore, D. J. FTIR spectroscopic studies of lipid dynamics in phytosphingosine ceramide models of the stratum corneum lipid matrix. *Chem Phys Lipids* **2005**, *134* (1), 51-8.
117. Rerek, M. E.; Chen, H. C.; Markovic, B.; Van Wyck, D.; Garidel, P.; Mendelsohn, R.; Moore, D. J. Phytosphingosine and sphingosine ceramide headgroup hydrogen bonding: Structural insights through thermotropic hydrogen/deuterium exchange. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105* (38), 9355-9362.
118. Moore, D. J.; Rerek, M. E.; Mendelsohn, R. FTIR spectroscopy studies of the conformational order and phase behavior of ceramides. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101* (44), 8933-8940.
119. Garidel, P. Calorimetric and spectroscopic investigations of phytosphingosine ceramide membrane organisation. *PCCP* **2002**, *4* (10), 1934-1942.
120. Topham, P. D.; Glidle, A.; Toolan, D. T.; Weir, M. P.; Skoda, M. W.; Barker, R.; Howse, J. R. The relationship between charge density and polyelectrolyte brush profile using simultaneous neutron reflectivity and in situ attenuated total internal reflection FTIR. *Langmuir* **2013**, *29* (20), 6068-76.
121. Mueller, J. Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen an Stratum corneum-Lipidvesikeln. Martin Luther University, **2012**.
122. Mueller, J.; Oliveira, J. S.; Barker, R.; Trapp, M.; Schroeter, A.; Brezesinski, G.; Neubert, R. H. The effect of urea and taurine as hydrophilic penetration enhancers on stratum corneum lipid models. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1858* (9), 2006-2018.
123. Wertz, P. W.; Abraham, W.; Landmann, L.; Downing, D. T. Preparation of liposomes from stratum corneum lipids. *J Invest Dermatol* **1986**, *87* (5), 582-4.

124. Hatfield, R. M.; Fung, L. W. A new model system for lipid interactions in stratum corneum vesicles: effects of lipid composition, calcium, and pH. *Biochemistry* **1999**, *38* (2), 784-91.
125. Charalambopoulou, G. C.; Steriotis, T. A.; Hauss, T.; Stubos, A. K.; Kanellopoulos, N. K. Structural alterations of fully hydrated human stratum corneum. *Physica B-Condensed Matter* **2004**, *350* (1-3), E603-E606.
126. Ohta, N.; Ban, S.; Tanaka, H.; Nakata, S.; Hatta, I. Swelling of intercellular lipid lamellar structure with short repeat distance in hairless mouse stratum corneum as studied by X-ray diffraction. *Chem. Phys. Lipids* **2003**, *123* (1), 1-8.
127. Bouwstra, J. A.; Devries, M. A.; Gooris, G. S.; Bras, W.; Brussee, J.; Ponec, M. Thermodynamic and Structural Aspects of the Skin Barrier. *Journal of Controlled Release* **1991**, *15* (3), 209-220.
128. Silva, C. L.; Topgaard, D.; Kocherbitov, V.; Sousa, J. J.; Pais, A. A.; Sparr, E. Stratum corneum hydration: phase transformations and mobility in stratum corneum, extracted lipids and isolated corneocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768* (11), 2647-59.
129. Pham, Q. D.; Bjorklund, S.; Engblom, J.; Topgaard, D.; Sparr, E. Chemical penetration enhancers in stratum corneum - Relation between molecular effects and barrier function. *J Control Release* **2016**, *232*, 175-87.
130. Gärtner, S. Bestimmung der Wasseraufnahmekapazität verschiedener Moisturizer. Diploma, Martin Luther University, **2015**.
131. Albèr, C. Humectants and Skin: effects of hydration from molecule to man. Malmö University, **2015**.
132. Beastall, J.; Guy, R. H.; Hadgraft, J.; Wilding, I. The influence of urea on percutaneous absorption. *Pharm Res* **1986**, *3* (5), 294-7.
133. Bjorklund, S.; Engblom, J.; Thuresson, K.; Sparr, E. Glycerol and urea can be used to increase skin permeability in reduced hydration conditions. *Eur J Pharm Sci* **2013**, *50* (5), 638-45.
134. Costa-Balogh, F. O.; Wennerstrom, H.; Wadso, L.; Sparr, E. How small polar molecules protect membrane systems against osmotic stress: the urea-water-phospholipid system. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (47), 23845-52.
135. Nowacka, A.; Douezan, S.; Wadso, L.; Topgaard, D.; Sparr, E. Small polar molecules like glycerol and urea can preserve the fluidity of lipid bilayers under dry conditions. *Soft Matter* **2012**, *8* (5), 1482-1491.
136. Parente, R. A.; Nir, S.; Szoka, F. C., Jr. Mechanism of leakage of phospholipid vesicle contents induced by the peptide GALA. *Biochemistry* **1990**, *29* (37), 8720-8.
137. Hagströmer, L.; Nyrén, M.; Emtestam, L. Do Urea and Sodium Chloride together Increase the Efficacy of Moisturisers for Atopic Dermatitis Skin? *Skin Pharmacology and Physiology* **2001**, *14* (1), 27-33.

138. Richter, T.; Peuckert, C.; Sattler, M.; Koenig, K.; Riemann, I.; Hintze, U.; Wittern, K. P.; Wiesendanger, R.; Wepf, R. Dead but highly dynamic--the stratum corneum is divided into three hydration zones. *Skin Pharmacol Physiol* **2004**, *17* (5), 246-57.
139. Richter, T.; Muller, J. H.; Schwarz, U. D.; Wepf, R.; Wiesendanger, R. Investigation of the swelling of human skin cells in liquid media by tapping mode scanning force microscopy. *Appl Phys a-Mater* **2001**, *72* (1), S125-S128.
140. Naegel, A.; Heisig, M.; Wittum, G. Detailed modeling of skin penetration--an overview. *Adv Drug Deliv Rev* **2013**, *65* (2), 191-207.
141. Huxtable, R. J. Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.* **1992**, *72* (1), 101-63.
142. Waldmann-Laue, M., and Forster, T. Taurine improves epidermal barrier properties stressed by surfactants A role for osmolytes in barrier homeostasis. *J. Cosmet. sci* **2006**, *57*, 1-10.
143. Warskulat, U.; Reinen, A.; Grether-Beck, S.; Krutmann, J.; Haussinger, D. The osmolyte strategy of normal human keratinocytes in maintaining cell homeostasis. *J Invest Dermatol* **2004**, *123* (3), 516-21.
144. Janeke, G.; Siefken, W.; Carstensen, S.; Springmann, G.; Bleck, O.; Steinhart, H.; Hoger, P.; Wittern, K. P.; Wenck, H.; Stab, F.; Sauermann, G.; Schreiner, V.; Doering, T. Role of taurine accumulation in keratinocyte hydration. *J Invest Dermatol* **2003**, *121* (2), 354-61.
145. Lobo, M. V.; Alonso, F. J.; Latorre, A.; Martin del Rio, R. Taurine levels and localisation in the stratified squamous epithelia. *Histochem Cell Biol* **2001**, *115* (4), 341-7.
146. da Silva, D. L.; Thiago, S. B.; Pessoa, F. A.; Mrestani, Y.; Ruttinger, H. H.; Wohlrab, J.; Neubert, R. H. Penetration profile of taurine in the human skin and its distribution in skin layers. *Pharm Res* **2008**, *25* (8), 1846-50.
147. Cunningham, P. Caffeine delivery systems. Google Patents, **2009**.
148. Cifter, Ü.; Türkyilmaz, A.; Yelken, G.; Zan, M. Hair care formulations comprising minoxidil and a penetration enhancer, **2014**.
149. Levis, G. Compositions comprising taurine and derivatives and their therapeutic and diagnostic uses for skin diseases or tissue damages, **2006**.
150. Levis, G. Taurine-based compositions and therapeutic methods, **2010**.
151. Maibach, H. I.; Feldmann, R. J. The effect of DMSO on percutaneous penetration of hydrocortisone and testosterone in man. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1967**, *141* (1), 423-7.
152. Coldman, M. F.; KALINOVSKY, T.; Poulsen, B. The in vitro penetration of fluocinonide through human skin from different volumes of DMSO. *Br. J. Dermatol.* **1971**, *85* (5), 457-461.

153. Myoung, Y.; Choi, H. K. Effects of vehicles and pressure sensitive adhesives on the penetration of isosorbide dinitrate across the hairless mouse skin. *Drug Deliv.* **2002**, *9* (2), 121-6.
154. Dragicevic, N.; Atkinson, J. P.; Maibach, H. I. Chemical Penetration Enhancers: Classification and Mode of Action. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*; Springer, **2015**, pp 11-27.
155. Oertel, R. P. Protein conformational changes induced in human stratum corneum by organic sulfoxides: an infrared spectroscopic investigation. *Biopolymers* **1977**, *16* (10), 2329-45.
156. Anigbogu, A. N. C.; Williams, A. C.; Barry, B. W.; Edwards, H. G. M. Fourier-Transform Raman-Spectroscopy of Interactions between the Penetration Enhancer Dimethyl-Sulfoxide and Human Stratum-Corneum. *International Journal of Pharmaceutics* **1995**, *125* (2), 265-282.
157. Brezesinski, G.; Vollhardt, D.; Iimura, K.; Colfen, H. Structural features of mixed monolayers of oleanolic acid and stearic acid. *J Phys Chem C* **2008**, *112* (40), 15777-15783.
158. Allenby, A. C.; Fletcher, J.; Schock, C.; Tees, T. F. S. The effect of heat, pH and organic solvents on the electrical impedance and permeability of excised human skin. *Br. J. Dermatol.* **1969**, *81* (s4), 31-39.
159. Notman, R.; Anwar, J.; Briels, W. J.; Noro, M. G.; den Otter, W. K. Simulations of skin barrier function: free energies of hydrophobic and hydrophilic transmembrane pores in ceramide bilayers. *Biophys. J.* **2008**, *95* (10), 4763-71.
160. Hughes, Z. E.; Mark, A. E.; Mancera, R. L. Molecular dynamics simulations of the interactions of DMSO with DPPC and DOPC phospholipid membranes. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (39), 11911-23.
161. Brinkmann, I.; Muller-Goymann, C. C. An attempt to clarify the influence of glycerol, propylene glycol, isopropyl myristate and a combination of propylene glycol and isopropyl myristate on human stratum corneum. *Pharmazie* **2005**, *60* (3), 215-20.
162. Hoelgaard, A.; Møllgaard, B. Dermal drug delivery—improvement by choice of vehicle or drug derivative. *Journal of Controlled Release* **1985**, *2*, 111-120.
163. Pudney, P. D.; Melot, M.; Caspers, P. J.; Van Der Pol, A.; Puppels, G. J. An in vivo confocal Raman study of the delivery of trans retinol to the skin. *Appl. Spectrosc.* **2007**, *61* (8), 804-11.
164. Cornwell, P. A.; Barry, B. W.; Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S. Modes of action of terpene penetration enhancers in human skin differential scanning calorimetry, small-angle X-ray diffraction and enhancer uptake studies. *International Journal of Pharmaceutics* **1996**, *127* (1), 9-26.
165. Kasting, G. B.; Francis, W. R.; Roberts, G. E. Skin penetration enhancement of triprolidine base by propylene glycol. *J Pharm Sci* **1993**, *82* (5), 551-2.

166. Watkinson, R. M.; Guy, R. H.; Hadgraft, J.; Lane, M. E. Optimisation of cosolvent concentration for topical drug delivery - II: influence of propylene glycol on ibuprofen permeation. *Skin Pharmacol Physiol* **2009**, *22* (4), 225-30.
167. Barry, B. W.; Bennett, S. L. Effect of Penetration Enhancers on the Permeation of Mannitol, Hydrocortisone and Progesterone through Human-Skin. *J. Pharm. Pharmacol.* **1987**, *39* (7), 535-546.
168. Hoogstraate, A. J.; Verhoef, J.; Brussee, J.; Ijzerman, A. P.; Spies, F.; Boddé, H. E. Kinetics, ultrastructural aspects and molecular modelling of transdermal peptide flux enhancement by N-alkylazacycloheptanones. *International Journal of Pharmaceutics* **1991**, *76* (1), 37-47.
169. Moghadam, S. H.; Saliyaj, E.; Wettig, S. D.; Dong, C.; Ivanova, M. V.; Huzil, J. T.; Foldvari, M. Effect of chemical permeation enhancers on stratum corneum barrier lipid organizational structure and interferon alpha permeability. *Mol. Pharm.* **2013**, *10* (6), 2248-60.
170. Diez-Sales, O.; Garrigues, T. M.; Herraiez, J. V.; Belda, R.; Martin-Villodre, A.; Herraiez, M. In vitro percutaneous penetration of acyclovir from solvent systems and Carbopol 971-P hydrogels: influence of propylene glycol. *J Pharm Sci* **2005**, *94* (5), 1039-47.
171. Faergemann, J.; Wahlstrand, B.; Hedner, T.; Johnsson, J.; Neubert, R. H.; Nystrom, L.; Maibach, H. Pentane-1,5-diol as a percutaneous absorption enhancer. *Arch Dermatol Res* **2005**, *297* (6), 261-5.
172. Duracher, L.; Blasco, L.; Hubaud, J. C.; Vian, L.; Marti-Mestres, G. The influence of alcohol, propylene glycol and 1,2-pentanediol on the permeability of hydrophilic model drug through excised pig skin. *Int J Pharm* **2009**, *374* (1-2), 39-45.
173. Heuschkel, S.; Wohlrab, J.; Schmaus, G.; Neubert, R. H. Modulation of dihydroavananthramide D release and skin penetration by 1,2-alkanediols. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* **2008**, *70* (1), 239-47.
174. Faergemann, J.; Hedner, T.; Larsson, P. The in vitro activity of pentane-1,5-diol against aerobic bacteria. A new antimicrobial agent for topical usage? *Acta Derm Venereol* **2005**, *85* (3), 203-5.
175. Faergemann, J.; Fredriksson, T. The antimycotic activity in vitro of five diols. *Sabouraudia* **1980**, *18* (4), 287-93.
176. Pillai, R.; Schmaus, G.; Lange, S.; Roeding, J. 1, 2-Pentanediol: a multifunctional ingredient for personal care applications. *SÖFW-journal* **2005**, *131* (6), 13-22.
177. Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A. Infrared spectroscopic study of stratum corneum model membranes prepared from human ceramides, cholesterol, and fatty acids. *Biophys. J.* **2007**, *92* (8), 2785-95.
178. Eichner, A.; Stahlberg, S.; Sonnenberger, S.; Lange, S.; Dobner, B.; Ostermann, A.; Schrader, T. E.; Hauss, T.; Schroeter, A.; Huster, D.; Neubert, R. H. Influence of the

penetration enhancer isopropyl myristate on stratum corneum lipid model membranes revealed by neutron diffraction and ²H NMR experiments. *Biochim. Biophys. Acta* **2017**, 1859 (5), 745-755.

179. Furrer, A.; Mesot, J.; Strässle, T. Neutron scattering in condensed matter physics. *NEUTRON SCATTERING IN CONDENSED MATTER PHYSICS. Edited by FURRER ALBERT ET AL. Published by World Scientific Press, 2009. ISBN# 9789814280921* **2009**, 1.
180. Nevot, L.; Croce, P. Caractérisation des surfaces par réflexion rasante de rayons X. Application à l'étude du polissage de quelques verres silicates. *Revue de Physique appliquée* **1980**, 15 (3), 761-779.
181. Tolan, M.; Press, W. X-ray and neutron reflectivity. *Zeitschrift Fur Kristallographie* **1998**, 213 (6), 319-336.
182. Rücker, G. N., M.; Willems, G. G. *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*; Vol. 4. Auflage.
183. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Vol. 3. Auflage.

X. PUBLIKATIONSLISTE

Originalartikel

- Mueller, J.; Schroeter, A.; Steitz, R.; Trapp, M.; Neubert, R. H.: Preparation of a New Oligolamellar Stratum Corneum Lipid Model. *Langmuir* 2016, 32 (18), 4673-80.
- Mueller, J.; Oliveira, J. S.; Barker, R.; Trapp, M.; Schroeter, A.; Brezesinski, G.; Neubert, R. H.: The effect of urea and taurine as hydrophilic penetration enhancers on stratum corneum lipid models. *Biochim. Biophys. Acta* 2016, 1858 (9), 2006-2018.

Buchbeiträge

- Schroeter, A., Eichner, A., Mueller, J., & Neubert, R. H. (2015). The Importance of Stratum Corneum Lipid Organization for Proper Barrier Function. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement* (pp. 19-38). Springer Berlin Heidelberg.
- Schroeter, A., Eichner, A., Mueller, J., & Neubert, R. H. (2015). Penetration Enhancers and Their Mechanism Studied on a Molecular Level. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement* (pp. 29-37). Springer Berlin Heidelberg.

Tagungsbeiträge

- Josefin Mueller, H. H. Ruettinger, R. H. H. Neubert, A. Schroeter: Influence of Cholesterol and Cholesterol sulfate in Stratum corneum lipid mixtures using Fluorescence spectroscopic methods. 7th Polish-German Symposium on Pharmaceutical Sciences „Interdisciplinary Research for Pharmacy“, Danzig / Polen, Mai 2013 (Poster und Vortrag zum Poster)
- Josefin Mueller, R. H. H. Neubert, A. Schroeter: Investigation of the lipid organization of Stratum corneum lipid models and the influence of penetration enhancers. Third Annual Niels Bohr International Academy Workshop on ESS, Kopenhagen / Dänemark, Juni 2013 (Poster und Vortrag)
- Josefin Mueller, H. H. Ruettinger, R. H. H. Neubert, A. Schroeter: Influence of the Penetration enhancer Oleic acid in Stratum corneum lipid mixtures using Fluorescence spectroscopic methods. Gordon Research Conference “Barrier Function of Mammalian Skin”, Waterville Valley (NH) / USA, August 2013 (Poster)

- Josefin Mueller, M. Trapp, R. H. H. Neubert, A. Schroeter: Understanding the mode of action of hydrophilic penetration accelerators to the nanostructure of stratum corneum lipid models. 5th Joint BER II and BESSY II User Meeting, Berlin / Deutschland, Dezember 2013 (Poster)
- Josefin Mueller, M. Trapp, R. H. H. Neubert, A. Schroeter: Optimized preparation of a stratum corneum lipid model for a simultaneous neutron reflectivity and ATR-FTIR measurement. *Neutrons in Biology and Biotechnology*, Grenoble / Frankreich, Februar 2014 (Poster)
- Josefin Mueller, R. H. H. Neubert, Lars Thomas, A. Schroeter: Investigation of head group interactions in stratum corneum lipid model membranes. Skin Forum 14th annual meeting; Prag / Tschechische Republik, September 2014 (Poster)
- Josefin Mueller, R. Barker, M. Trapp, L. Thomas, A. Schroeter, D. Huster, R. H. H. Neubert: Differences in SC penetration enhancement potential using different regioisomers of Pentanediol. Gordon Research Conference “Barrier Function of Mammalian Skin”, Waterville Valley (NH) / USA, August 2015 (Poster)

Berichte:

- Mueller J, Neubert R, Schroeter A, Trapp M: Understanding the mode of action of hydrophilic penetration accelerators to the nanostructure of stratum corneum lipid models using specifically deuterated enhancers. HZB (BER II) Annual Experimental Report, 2014
- Mueller J, Neubert R, Schroeter A, Trapp M: Impact of different pharmaceutical active agents to the structure of Stratum corneum lipid model membranes: A combined Neutron reflectivity and ATR-FTIR study. HZB (BER II) Annual Experimental Report, 2015
- Mueller J, Neubert R, Schroeter A, Barker R, Trapp M: Understanding the mode of action of hydrophilic penetration accelerators to the nanostructure of stratum corneum lipid models using specifically deuterated enhancers. HZB (BER II) Annual Experimental Report, 2015

XII. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich entsprechend § 5 Absatz 2b der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dass ich die Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsarbeit

„Einfluss hydrophiler Penetrationenhancer auf die Nanostruktur von Stratum corneum Lipidmodellen“

am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg selbständig und ohne fremde Hilfe erarbeitet und verfasst habe. Ferner habe ich nur die in der Dissertation angegebenen Literaturstellen und Hilfsmittel verwendet und die entnommenen und benutzten Literaturstellen auch als solche kenntlich gemacht. Ich habe mich zu keinem früheren Zeitpunkt um den Dokortitel beworben. Weiterhin habe ich die vorliegende Arbeit bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Braunschweig, im Dezember 2017

Josefin Müller