

## 7 Anwendungsbeispiele vesikulärer Systeme

Im folgenden Kapitel soll exemplarisch auf die Bedeutung von Vesikeln im Bereich der supramolekularen Chemie und der Kolloidwissenschaft im Hinblick auf potentielle Anwendungen eingegangen werden. Der erste Teil widmet sich zunächst einem Weg, der zur reversiblen Änderung der Morphologie von Vesikeln führt und zeigt somit eine Möglichkeit zur Herstellung schaltbarer vesikulärer Systeme auf. Der zweite Teil beschäftigt sich mit der Verwendung von Vesikeln als Templat zur radikalischen Polymerisation lipophiler Solubilisate und erläutert die Problematik bei der Erzeugung von Kapselmaterialien.

### 7.1 Wege zu morphologisch schaltbaren vesikulären Strukturen

Der Einfluß eines Solubilisats auf die Eigenschaften der Doppelschicht von Vesikeln ist, wie bereits ausführlich diskutiert, von der Molekülgröße, aber auch von Faktoren wie der Polarität und somit der Affinität des Solubilisats zum Kopfgruppenbereich abhängig. In Anbetracht der Tatsache, daß die Doppelschicht als ein zweidimensionales Lösungsmittel geometrischen Restriktionen unterliegt, wird deutlich, daß die Geometrie und der Raumbedarf des Solubilisats sowie die Kompatibilität mit der Doppelschicht einen entscheidenden Einfluß auf die Solubilisierbarkeit hat. Entsprechend sinkt das Solubilisierungsvermögen mit steigender Molekülgröße. Das Maximum der Solubilisierungskapazität für grenzflächenaktive Substanzen wie Cholesterin liegt in Phosphatidylcholinvesikeln bei 66 Mol-% entsprechend einem Molverhältnis von 2:1, wobei oberhalb von 50 Mol-% Entmischungen unter Bildung von phasensepariertem Cholesterin auftreten [161]. Große lipophile Moleküle wie Pyren weisen mit etwa 10 - 20 Mol-% eine wesentlich geringere Löslichkeit in DMPC-Vesikeln auf.

Eine Fluktuationsanalyse von DMPC-Vesikeln nach Solubilisierung von 10 Mol-% Pyren zeigt mit  $k_c = 0.8 \cdot 10^{-19}$  J eine deutlich erniedrigte Biegesteifigkeit. Die hierzu nötige Toluolmenge liegt bei 85 Mol-% (Tabelle 7-2). Dies zeigt den auffallend höheren Einfluß von Pyren auf die elastischen Eigenschaften von DMPC-Vesikeln.

Tabelle 7-2: Vergleich des Einflusses lipophiler Substanzen auf den Modul der Biegesteifigkeit von DMPC-Vesikeln.

System	Mol-% Solubilisat	$k_c$ [ $10^{-19}$ J]
DMPC		$1.4 \pm 0.2$
DMPC/Pyren	10	$0.8 \pm 0.1$
DMPC/Pyren	10	$1.1 \pm 0.2$ *
DMPC/Toluol	85	$0.8 \pm 0.1$

(\* bei UV-Bestrahlung)

Auf der Grundlage der Erkenntnisse der Solubilisierung lipophiler Substanzen soll im folgenden ein Konzept zur morphologischen Beeinflussung vesikulärer Systeme vorgestellt werden. Es beruht auf der Beeinflussung des Gleichgewichts zwischen lipophilem Solubilisat und dem Amphiphil, wodurch letztendlich eine strukturelle Änderung der Aggregatgestalt erfolgt.

### 7.1.1 Morphologisch schaltbare Systeme auf der Basis lipophiler Solubilsate

Die Gestalt fluider Vesikel wird neben der Krümmungsenergie durch ein konstantes Verhältnis von Membranfläche und dem eingeschlossenen wässrigen Volumen bestimmt. Eine Änderung der Fläche der Doppelschicht führt bei konstantem inneren Volumen zu einer Gestaltänderung, ein Effekt der beispielsweise bei Änderungen der Temperatur auftritt. Ferner wird eine Gestaltänderung durch Variation der spontanen Krümmung der Doppelschicht möglich [162].

Lipophile Solubilsate beeinflussen den effektiven Packungsparameter des Amphiphils. Auf der Basis dieser Modellvorstellung sollte es möglich sein, durch Modifikation der Solubilsateigenschaften eine Änderung der Vesikelgeometrie zu erzwingen. Eine Möglichkeit der irreversiblen Variation des Solubilisats liefern chemische Reaktionen, die beispielsweise in Form von Polymerisationen zu einer Gestaltänderung führen und im nächsten Abschnitt behandelt werden. Interessant ist zudem die Erzeugung von Nichtgleichgewichtszuständen, aus denen das System in die jeweilige Ausgangslage relaxieren kann und die somit zu einer reversiblen Änderung der Vesikelgestalt führt. Auf diese Weise dürfte die Konstruktion morphologisch schaltbarer, supramolekularer Aggregate in einem breiten Größenbereich möglich sein. Wie aber lassen sich derartige Nichtgleichgewichtszustände auf der Basis lipophiler Solubilsate erzeugen und reversibel beeinflussen?

Zur Beantwortung dieser Frage wurde das bereits vorgestellte System Pyren/DMPC näher untersucht. Pyren zeigt, wie bereits beschreiben, nach Anregung im UV-Bereich sowohl eine Monomerfluoreszenz, als auch in hoher Konzentration eine bathochrom verschobene Excimerfluoreszenz.

Pyren wurde zunächst in Konzentrationen nahe der maximalen Solubilisierungskapazität in die Doppelschicht von DMPC eingelagert. Die somit erzeugte Dispersion zeigt eine ausgeprägte Tendenz zur Ausbildung tubusförmiger vesikulärer Strukturen. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie ist es möglich, eine UV-Anregung des solubilisierten Pyrens unter gleichzeitiger lichtmikroskopischer Beobachtung der morphologischen Veränderung der Vesikel-Strukturen vorzunehmen. Hierbei zeigt sich nach einer kurzen Initiierungsphase eine deutliche Änderung der Morphologie, die abhängig von der Intensität und Dauer der Einstrahlung ist.

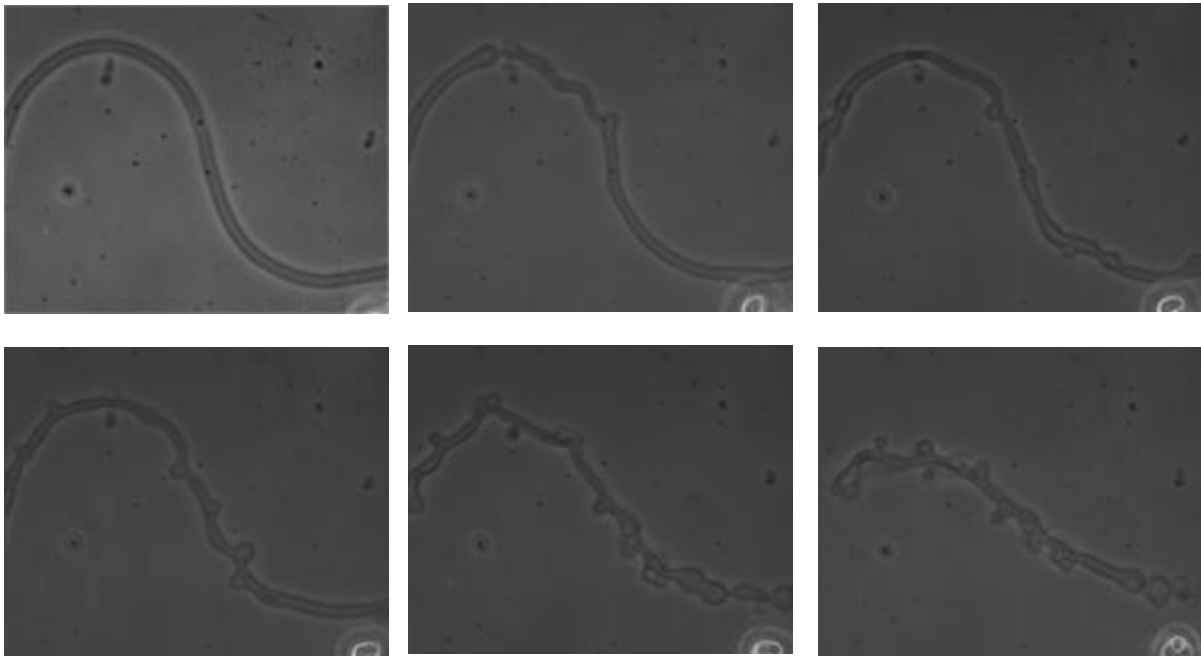


Abbildung 7-1: Morphologische Veränderung einer tubusförmigen Doppelschichtstruktur ( $r = 1.5 \mu\text{m}$ ) von DMPC mit 10 Mol-% Pyren bei permanenter UV-Anregung ( $I_{\text{Anr.}} = 330 - 385 \text{ nm}$ ). Die Bildfolge der ersten drei Bilder entspricht einem Zeitraum von jeweils 0.5 s; zwischen den folgenden beträgt das Intervall 2 s.

Abbildung 7-1 zeigt die morphologischen Änderungen tubusförmiger Doppelschichtstrukturen von DMPC/Pyren bei UV-Anregung. Die Bildfolge verdeutlicht die Änderung der Krümmung der Membran. Ein Vergleich mit unbeladenen oder toluolbeladenen Vesikeln zeigt demgegenüber keinerlei morphologische Beeinflussung im Verlauf der Bestrahlung.

Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens ist die lokale Temperaturerhöhung aufgrund strahlungsloser Desaktivierung des Chromophors. Dieser Effekt wird nach Laseranregung chromophorbeladener Vesikel vermutet [163] und kann zur Lyse kleiner Vesikel verwendet werden. Da sich jedoch offensichtlich die Krümmungseigenschaften der Doppelschicht deutlich ändern, sollte der Temperatureinfluß nicht die dominante Triebkraft der Gestaltänderung sein. Zur Aufklärung möglicher Ursachen wurde dieses Phänomen im Detail studiert.

### 7.1.2 Perlenkettenbildung zylindrischer Vesikel

Die Reduktion der UV-Strahlung auf eine pulsformige Anregung bewirkt eine Antwort des tubusförmigen Systems in Form der Propagation einer peristaltischen Welle, die sich über den Tubus ausbreitet. Nach Beendigung der Bestrahlung erfolgt eine schnelle Relaxation. Bei längerer Bestrahlung kann in einigen Fällen die Bildung einer sogenannten Perlenkette (Abbildung 7-2) beobachtet werden.

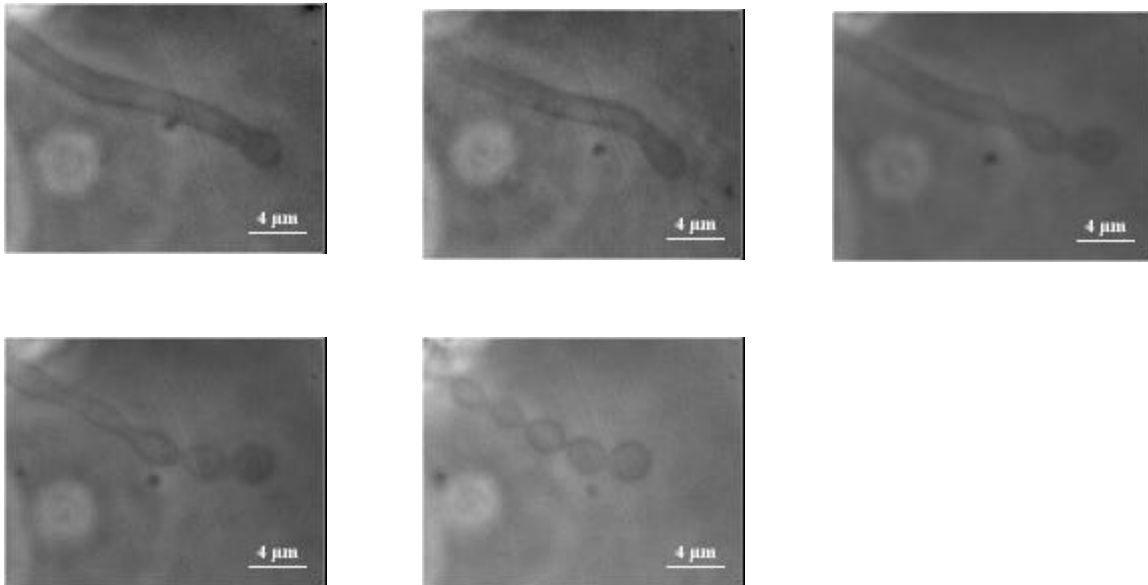


Abbildung 7-2: Perlenkettenbildung einer tubusförmigen vesikulären Struktur von DMPC/Pyren (10 Mol-%) nach UV-Bestrahlung ( $I_{\text{Anr.}} = 330 - 385 \text{ nm}$ ). Im linken oberen Bereich des Tubus existiert ein Reservoir von DMPC, aus dem der Tubus gequollen ist. Nach UV-Bestrahlung erfolgt die Ausbreitung einer peristaltischen Welle über den Tubus. Dieser Prozess ist zunächst reversibel und liefert erst nach längerer Bestrahlung eine stabile Perlenkettenanordnung. Der Radienvergleich zeigt eine höhere mittlere Krümmung  $H$  der Perlenkette  $r_p = 1.1 \mu\text{m}$ ,  $H = 0.9 \mu\text{m}^{-1}$  im Vergleich zu der des Zylinders  $r_z = 0.7 \mu\text{m}$ ,  $H = 0.7 \mu\text{m}^{-1}$ .

Dieses Phänomen, die sogenannte Perlenketten-Instabilität, zeigt eine deutliche Analogie zu den Beobachtungen der Gestaltumwandlung bei Verwendung eines Lasers als optische Pinzette [164]. Der dielektrische Effekt des Lasers führt zur Anreicherung von Lipidmolekülen im Fokus und bewirkt die Ausbildung einer lateralen Spannung im Membranbereich in der Größenordnung von  $1 \cdot 10^{-5} \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$  [3]. Der geringfügige Verlust an effektiver Membranfläche bei konstantem inneren Volumen ist vermutlich die Ursache für die Ausbildung einer peristaltischen Welle entlang des Tubus. Hierdurch erfolgt letztendlich die in Abbildung 7-3 dargestellte Gestaltänderung von der zylindrischen in eine perlenkettenartige Form [164].

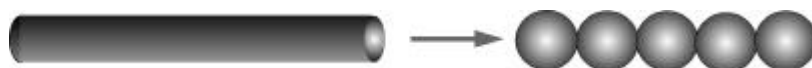


Abbildung 7-3: Schema der Perlenkettenbildung aus einer zylindrischen Vesikelgestalt.

Das analoge Verhalten nach der Fluoreszenzanregung von Pyren zeigt, daß hierdurch ebenfalls die Induktion einer Spannung im Membranbereich möglich wird. Die beobachtete Ausbildung peristaltischer Wellen ist im Vergleich zu der in der Literatur beschriebenen Induktion mittels optischer Pinzetten wesentlich diffuser. Die Spannungsinduktion ist in diesem Fall nicht auf einen Bereich der Membran beschränkt und die propagierenden Wellen gehen oftmals von unterschiedlichen Bereichen aus. Die Gestaltänderungen sind somit unsymmetrisch oder führen häufig zum Membranbruch.

Auf der Basis der Generierung einer lateralen Spannung ist es somit möglich, die Gestalt pyrenbeladener fluider Vesikel ohne direkten Kontakt, d.h. nicht-invasiv, zu ändern. An dieser Stelle bleibt jedoch die Frage nach der molekularen Ursache dieses Phänomens unbeantwortet.

### 7.1.3 Reversible Veränderung der Gestalt sphärischer Vesikel

Abbildung 7-4 zeigt die reversible Gestaltänderung eines sphärischen, fluiden Vesikels mit solubilisiertem Pyren. Das dargestellte Vesikel weist eine sehr kleine Überschussfläche  $\Delta$  auf und zeigt in der wäßrigen Phase keinerlei detektierbaren Undulationen. Nach UV-Anregung erfolgt eine deutliche Zunahme des Flächenüberschusses unter Ausbildung thermisch angeregter Fluktuationen. Hierbei wird die Gestalt zunehmend elliptisch deformiert. Nach Beendigung der Anregung erfolgt eine Relaxation unter Rückbildung der Sphäre (vgl. Abbildung 7-5). Diese zeigt in der Folge keinerlei Undulationen.

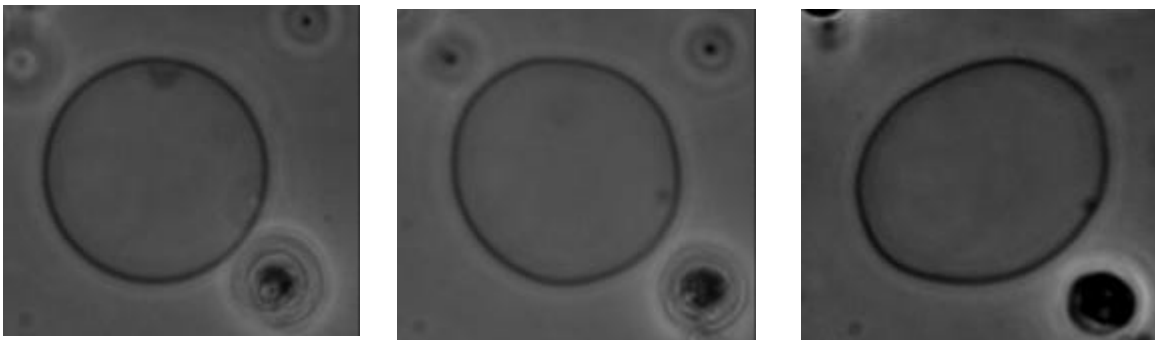


Abbildung 7-4: Sphärisches fluides DMPC-Vesikel mit geringer Überschussfläche nach Solubilisierung von Pyren (10 Mol-%) vor (linkes Bild) und nach einer UV-Bestrahlung über 30 s mit deutlich erkennbaren Undulationen (mittleres und rechtes Bild).

Dieser Vorgang ist reversibel und kann in der Folge mehrmals wiederholt werden.

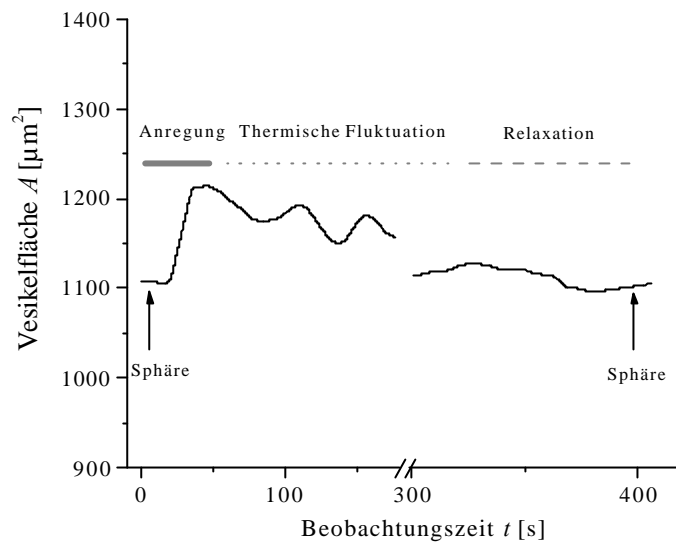


Abbildung 7-5: Zeitliche Änderung der Vesikelfläche des fluiden DMPC-Vesikels mit solubiliertem Pyren (10 Mol-%) aus Abbildung 7-4. Gezeigt ist der erste Anregungs- sowie Relaxationszyklus der Fluktuationen als Funktion der Beobachtungszeit.

Die Analyse des Relaxationsprozesses in die sphärische Gestalt ist in Abbildung 7-6 dargestellt.

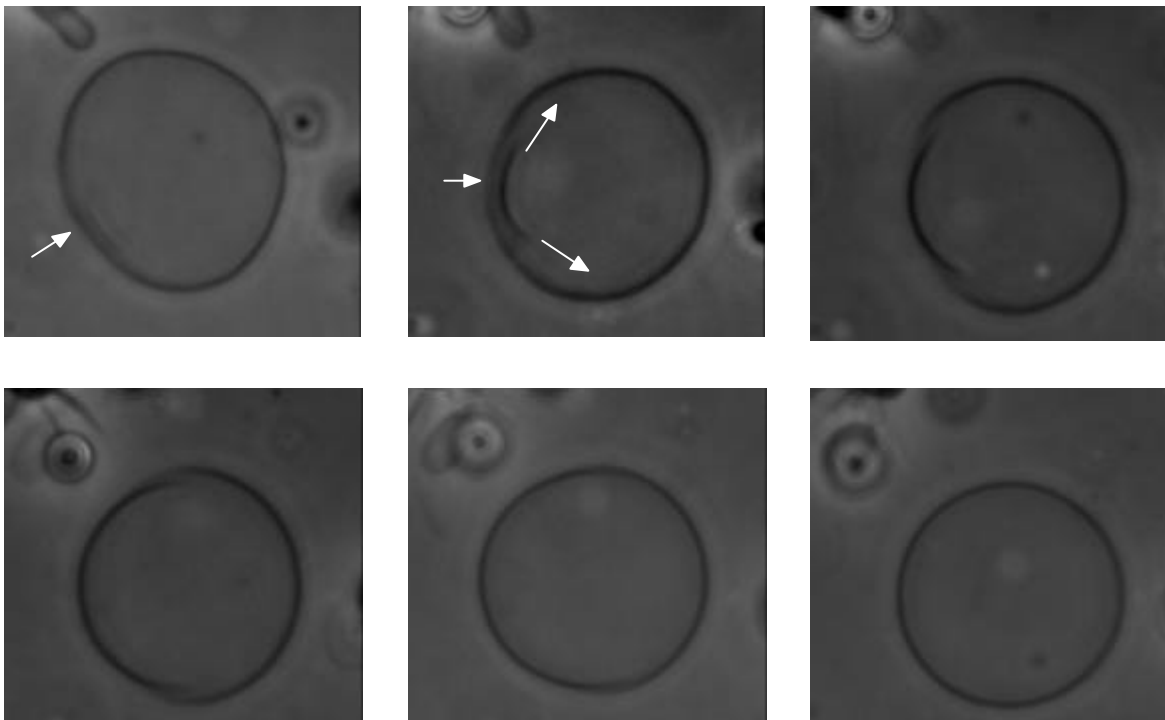


Abbildung 7-6: Relaxationsprozeß des pyrenbeladenen Vesikels (10 Mol-%) bei  $T = 30^\circ\text{C}$  in Form der Gestaltänderung von einer Ellipse zur Sphäre. Die Markierung zeigt den Beginn und die Ausbreitung der relaxierten Domäne bis zur vollständigen Ausbildung der Sphäre. Die Bildfolge entspricht dem in Abbildung 7-5 gezeigten Relaxationsbereich.

Hierbei wird deutlich, daß der eigentliche Relaxationsprozeß vermutlich in Form einer Nukleation in einem diskreten Bereich des Vesikels auftritt. Dieses Phänomen wird mikroskopisch erkennbar, da sich in diesem Bereich die Membrankrümmung ändert. Die entstehende Domäne wächst in der Folge an, bis sich im gesamten Vesikelbereich das neue Gleichgewicht eingestellt hat.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen (Abbildung 7-7) zeigen während der Anregungsphase, in der noch keinerlei Fluktuation des Vesikels zu beobachten ist, eine signifikante Abnahme der Excimerfluoreszenz (Abbildung 7-8). Diese erreicht eine konstante Intensität zu Beginn der beobachtbaren Undulationen.

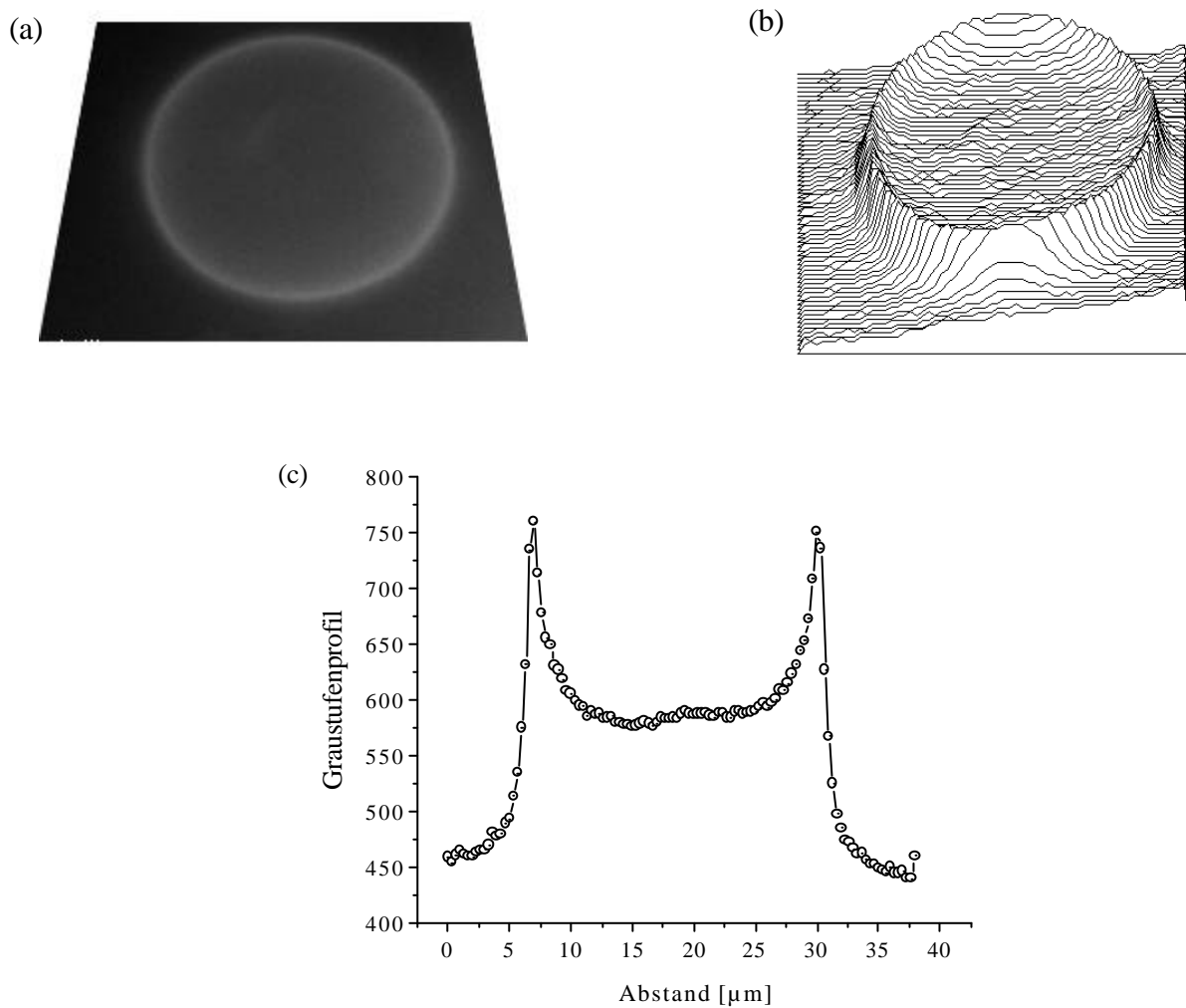


Abbildung 7-7: Fluoreszenzmikroskopisches Bild des pyrenbeladenen Vesikels nach Anregung unter Verwendung eines Breitbandanregungsfilters ( $I_{\text{Anr.}} = 330 - 385 \text{ nm}$ ) und eines Sperrfilters ( $I_{\text{Sperr.}} = 420 \text{ nm}$ ). (a) Membranbereich mit der charakteristischen bathochrom verschobenen blauen Fluoreszenz des Excimers, (b) Intensitätsprofil der Excimerfluoreszenz als Funktion der  $x,y$ -Koordinaten und (c) zweidimensionales Intensitätsprofil der Excimerfluoreszenz der Vesikeldiagonale.

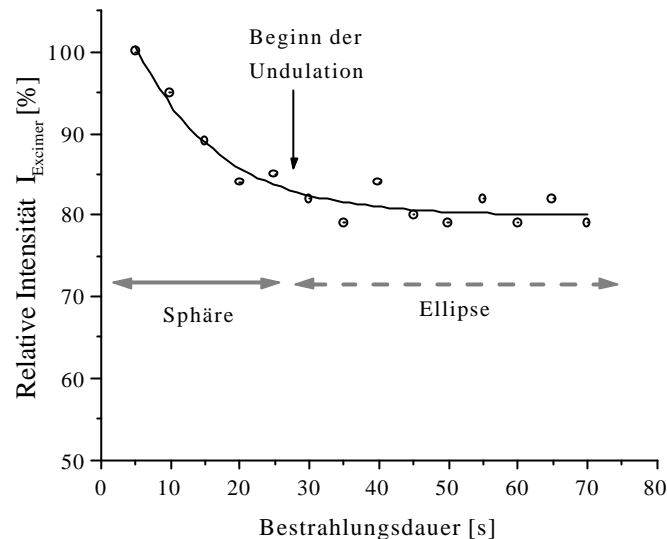


Abbildung 7-8: Verlauf der relativen Intensität der Excimerfluoreszenz als Funktion der Anregungsdauer. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Gestaltumwandlung bei Beginn der Undulation.

Ein Vergleich der Biegesteifigkeiten während und nach Bestrahlung verdeutlicht ferner einen Anstieg der Werte von  $k_c$  (vgl. Tabelle 7-2) bei UV-Bestrahlung. Da für die Biegesteifigkeit gemäß Gleichung (1.6) die vereinfachte Beziehung

$$k_c \approx 4gd_1D \quad (7.1)$$

gilt, ist dieser Anstieg vermutlich im wesentlichen die Folge einer erhöhten Grenzflächenspannung, bedingt durch den vergrößerten Platzbedarf des Amphiphils. Ferner sollte eine mögliche Temperaturerhöhung vernachlässigbar sein, da diese zu einer Erniedrigung der Biegesteifigkeit führt. Aufgrund der Reversibilität der Gestaltänderungen können chemische Reaktionen, wie Photodimerisierungen sowie die Reaktion mit Sauerstoff weitestgehend ausgeschlossen werden.

Die angeführten Ergebnisse erlauben nunmehr eine Erklärung der beobachteten Phänomene. Pyren zeigt innerhalb des lipophilen Membranbereichs aufgrund der hohen Konzentration eine ausgeprägte Tendenz zur Bildung von Excimeren durch Annäherung zweier Pyrenmoleküle auf etwa 0.3 nm. Die Einlagerung eines so ausgedehnten Moleküls ist jedoch vergleichbar ungünstig und sollte zu erheblichen Membranspannungen führen. Ferner weisen angeregte Monomere eine Lebensdauer von etwa 200 ns auf [59] und sind in der Lage, in Richtung der Kopfgruppen zu diffundieren [60]. Die entsprechenden Excimere sind hierzu nicht befähigt und verbleiben im lipophilen Bereich [62]. Entsprechend kann die Abnahme der Excimerfluoreszenz in Abbildung 7-8 mit einer Diffusion angeregter Monomere in den Kopfgruppenbereich des Amphiphils erklärt werden [60]. Die Diffusion wird durch die erhöhte Polarität des angeregten Pyren begünstigt. Als Folge des erhöhten Platzbedarfs des Solubilisats wird die Membran lateral ausgedehnt und letztendlich die Vesikelgestalt geän-



dert. Mit Beendigung der Anregung relaxiert das System relativ langsam, da eine Reorganisation von Solubilisat und Amphiphil einsetzt.

Auf dieser Grundlage werden die Beobachtungen im Bereich tubusförmiger Vesikel verständlich. Während eine Sphäre nahezu gleich viele Moleküle in den Monoschichten ausweist, resultiert bei einem Zylinder ein Amphiphilüberschuß auf der äußeren Seite. Folglich ist die Einlagerung eines Solubilisats ebenfalls unsymmetrisch und zwar umso ausgeprägter, je höher die Krümmung der vesikulären Struktur ist. Bei UV-Anregung werden die Pyrenmonomere nun bevorzugt in Richtung der äußeren Kopfgruppe verdrängt, da die Kopfgruppen der Amphiphile der inneren Monoschicht dichter gepackt sind. Hierdurch findet konsequenterweise eine Krümmung der ebenen Membran entlang der Längsrichtung des Tubus und die beschriebene Änderung der Gestalt statt.

#### 7.1.4 Zusammenfassung

Die Einlagerung von Pyren in fluide DMPC-Doppelschichten ermöglicht die Konstruktion morphologisch schaltbarer, supramolekularer vesikulärer Aggregate auf der Mikrometerskala. Gespannte unilamellare Vesikel ändern nach Anregung mit ultraviolettem Licht ihre Gestalt und relaxieren nach Beendigung der Bestrahlung in die Ausgangslage. Grund für diese reversible Änderung der Morphologie ist die Erhöhung des Platzbedarfs von Pyren im lipophilen Bereich und die hierdurch bedingte laterale Ausdehnung der Doppelschicht bei konstantem inneren Vesikelvolumen. Bei pyrenesättigter Wasserphase bleibt die Zusammensetzung des Gemisches erhalten und gespannte vesikuläre Systeme können auf diese Weise nicht-invasiv reversibel geschaltet werden.

## 7.2 Vesikel als Templat zur Polymerisation

Die spontane Selbstorganisation der Lipide in wäßriger Lösung zu supramolekularen Aggregaten eröffnet eine Vielzahl potentieller Anwendungsmöglichkeiten. In Anlehnung an das Vorbild der Natur sollte es möglich sein, die Größe und Gestalt der Mesophasen als Templat zu nutzen [165]. Durch geeignete Modifikationen kann auf diese Weise der Weg zu stabilen Kapselmaterialien sowie hochgeordneten Systemen mit neuartigen Eigenschaften geebnet werden. Eine interessante Anwendungsmöglichkeit stellt in diesem Zusammenhang die templatgestützte Polymerisation unter Verwendung von Vesikeln dar [166], auf die im folgenden näher eingegangen werden soll.

Polymerisationen oder Polykondensationen *in* und *von* Vesikeln sind vielfach verwendete Methoden zur Stabilisierung der Lipiddoppelschicht und dienen zum Beispiel der Aufrechterhaltung der Integrität der Vesikel [165]. Bei der Polymerisation *von* Vesikeln werden polymerisierbare Lipide verwendet, die im lipophilen Bereich der Acylreste oder im Kopfgruppenbereich funktionalisiert sind. Durch die Polymerisation wird die Membran weitestgehend quervernetzt und die Struktur in ihrer Mobilität eingefroren. Anwendungen

finden sich beispielsweise im Bereich der oralen Applikation wasserlöslicher liposomaler Wirkstoffe. Hier müssen die Vesikel resistent gegenüber Veränderungen in den Milieubedingungen sein, um den Wirkstoff nicht frühzeitig freizusetzen [167].

Demgegenüber steht definitionsgemäß die Polymerisation *in* Vesikeln, die eigentliche templatgestützte Polymerisation. Vesikel weisen im wesentlichen drei Bereiche auf, die für eine Polymerisation zugänglich sind (vgl. Abbildung 7-9).

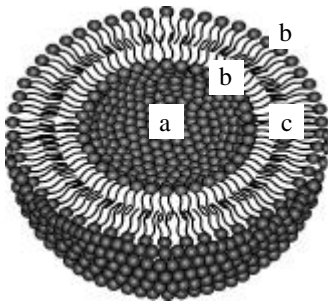


Abbildung 7-9: Schematische Darstellung der drei möglichen, zur Templatpolymersiation verwendbaren Bereiche sphärischer Vesikel (als Schnitt durch die Struktur dargestellt):

- a) inneres wässriges Kompartiment,
- b) Grenzfläche Lipid-Wasser,
- c) lipophiler Membranbereich.

Die Polymerisation eines hydrophilen Monomers im wässrigen inneren Kompartiment der Vesikel ermöglicht die Darstellung hydrophiler Polyacrylamid-Latices mit definierter Größe und sphärischer Gestalt [168].

Die sogenannten „Liposomen im Netz“ beruhen auf dem Konzept der Stabilisierung natürlicher Zellmembranen durch Ankopplung polymerer Gerüstsubstanzen im Bereich der Lipid-Wasser Grenzfläche. Unter Verwendung polymerisierbarer Gegenionen können analoge Modellsysteme dargestellt werden. Das Polymergerüst tritt nach der Synthese vorwiegend über elektrostatische Wechselwirkungen oder hydrophobe Ankergruppen mit der Membran in Wechselwirkung [169].

### 7.2.1 Polymerisation in Vesikeln

Der Schwerpunkt dieses Kapitel soll auf die dritte Möglichkeit der templatgestützten Polymerisation im lipophilen Membranbereich der Vesikel (Abbildung 7-9 c) gesetzt werden. Bei dieser Methode fungiert die vergleichsweise dünne Doppelschicht als Templat zur Konservierung der nahezu sphärischen Vesikelgestalt. Nach Einlagerung einer lipophilen, polymerisierbaren Substanz wird diese radikalisch polymerisiert und somit ein Netzwerk im lipophilen Membranbereich erzeugt. Auf diese Weise soll zum einen eine weitere Möglichkeit eröffnet werden, Vesikel zu stabilisieren. Zum anderen sollte es möglich sein, nach Entfernen des Amphiphils Polymerhohlkugeln unter Konservierung der sphärischen Gestalt darzustellen. Je nach eingesetzter Vesikelgröße kann das Kapselmaterial Größenbereiche von einigen Nanometern bis in den Mikrometerbereich abdecken [170]. Durch Funktionalisierung des Polymers eröffnen sich hierdurch Wege zu neuartigen sehr dünnen Kapselmaterialien.

Die ersten erfolgreichen Versuche zur radikalischen Polymerisation im lipophilen Membranbereich wurden unter Verwendung eines Gemisches aus Styrol und Divinylbenzol in Dioctadecyldimethylammoniumbromid-(DODAB)-Vesikeln im Jahre 1986 von Murtagh und Thomas durchgeführt [171]. Hierauf aufbauend erfolgten Experimente zur Erzeugung und Isolierung polymerer Hohlkugeln [172]. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten jedoch, daß die Polymerisation nicht homogen erfolgt und zur Bildung sogenannter „Fallschirmstrukturen“ unter Anreicherung des Polymers führt [173]. Erst unter Verwendung eines Gemisches aus Methacrylsäurebutylester und 1,2-Bis(methacrylsäure)glycol-ester gelang die homogene Polymerisation in Dimethyldioctadecylammoniumchlorid-(DODAC)-Vesikeln. Auf diese Weise konnten erstmals Polymerkugeln im Bereich einiger Mikrometer isoliert und mikroskopisch untersucht werden [170]. Hierbei wird angenommen, daß es sich bei den großen Polymerstrukturen um Hohlkörper handelt, die durch Fusion kleiner Vesikel und anschließender Polymerisation entstanden sind [170].

Die beschriebene Problematik der Polymerisation im lipophilen Membranbereich war Motivation zur detaillierten Untersuchung der Dynamik des Polymerisationsvorgangs im Bereich riesiger Vesikel. Hierdurch sollte es möglich sein, einen gezielten Einblick in die zur Konservierung der Templatgestalt nötigen Parameter zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden äquimolare Monomergemische von Styrol und *p*-Divinylbenzol sowie Methacrylsäurebutylester und 1,2- Bis(methacrylsäure)glycol-ester (vgl. Abbildung 7-10) zunächst in Riesenvesikeln copolymerisiert. Der eigentliche Vorgang der Polymerisation wurde hierbei videomikroskopisch untersucht. Ferner erfolgte eine protonenresonanzspektroskopische sowie kalorimetrische Charakterisierung der Polymerbildung in kleinen (SUV) bzw. großen (LUV) unilamellaren Phospholipidvesikeln.

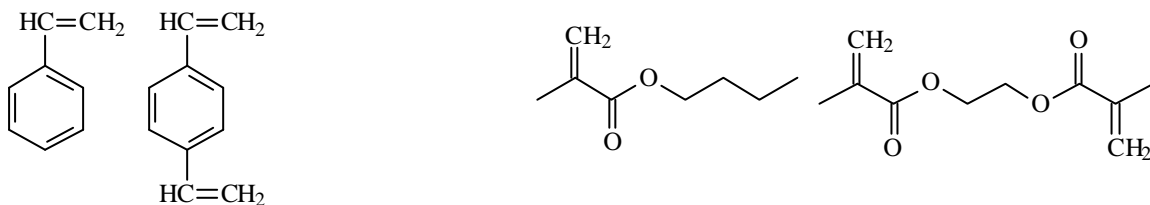


Abbildung 7-10: Strukturformeln der zur Polymerisation verwendeten lipophilen Monomergemische

- a) Styrol, *p*-Divinylbenzol
- b) Methacrylsäurebutylester, 1,2- Bis(methacrylsäure)glycol-ester.

## 7.2.2 Mikroskopische Untersuchung der Polymerisation in Riesenvesikeln

Die Verwendung einer Aufrichtfluoreszenzeinrichtung in Kombination mit Methoden der Videomikroskopie erlaubt die photochemische Initiierung der Polymerisation lipophiler Monomere im lipophilen Membranbereich von Vesikeln. Gleichzeitig können die einzelnen unilamellaren Vesikel beobachtet und auf morphologische Veränderungen während des Polymerisationsvorgangs untersucht werden.

### 7.2.2.1 Polymerisation unter Verwendung eines Styrol/Divinylbenzol-Gemisches

Abbildung 7-11 zeigt die morphologischen Veränderungen eines DMPC-Vesikels im Verlauf der Polymerisation eines Gemisches von Styrol und Divinylbenzol im lipophilen Bereich der Doppelschicht. Als photochemischer Starter wurden AIBN in Spuren zugesetzt.

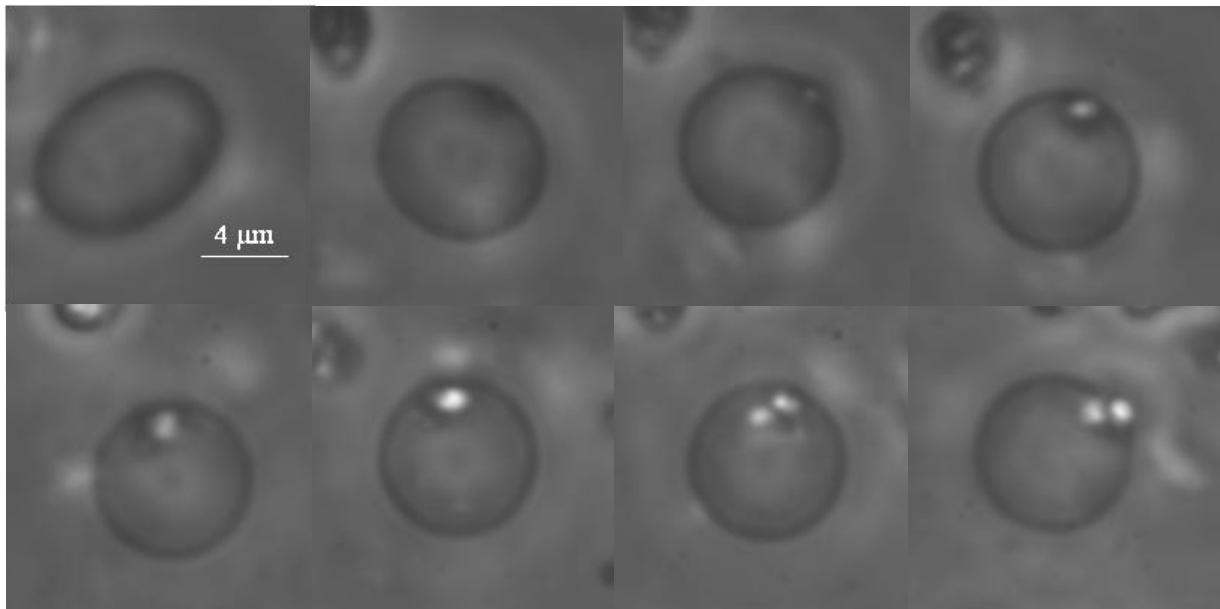


Abbildung 7-11: Verlauf der templatgestützten Polymerisation eines solubilisierten äquimolaren Gemisches von Styrol und Divinylbenzol in einem unilamellaren DMPC-Vesikel. Das Massenverhältnis von DMPC und dem Monomergemisch beträgt 1:1. Die Bildfolge entspricht einer Zeitskala von 520 s. Die Gestaltänderung des Vesikels resultiert aus der Abnahme der Membranfläche um etwa 7 % infolge einer Netzwerkbildung. Bei den hellen Bereichen der sphärischen Struktur handelt es sich um phasensepariertes Copolymer.

Die elliptische Vesikelgestalt geht im Verlauf der Polymerisation in eine sphärische Form über. Nach Ausbildung der Sphäre wird ferner die Bildung eines Polymerlatexteilchens als heller Bereich beobachtbar. Hierbei handelt es sich um phasensepariertes Polymer im Membranbereich. Diese Phasenseparation ist im allgemeinen nach einem Bestrahlungszeitraum von etwa 50 - 80 s zu beobachten und erfolgt auch bei Verwendung geringer Monomerkonzentrationen.

Sie tritt bevorzugt im Bereich von Membrandefekten auf. Die polymerhaltigen Vesikel zeigen aufgrund der höheren Dichte des Polymers eine deutliche Tendenz zur Sedimentation.

Die Polymerisation erfolgt typischerweise unter Abnahme des reduzierten Volumens des Vesikels und ist folglich mit einer Formumwandlungen verbunden (vgl. Abbildung 7-12).

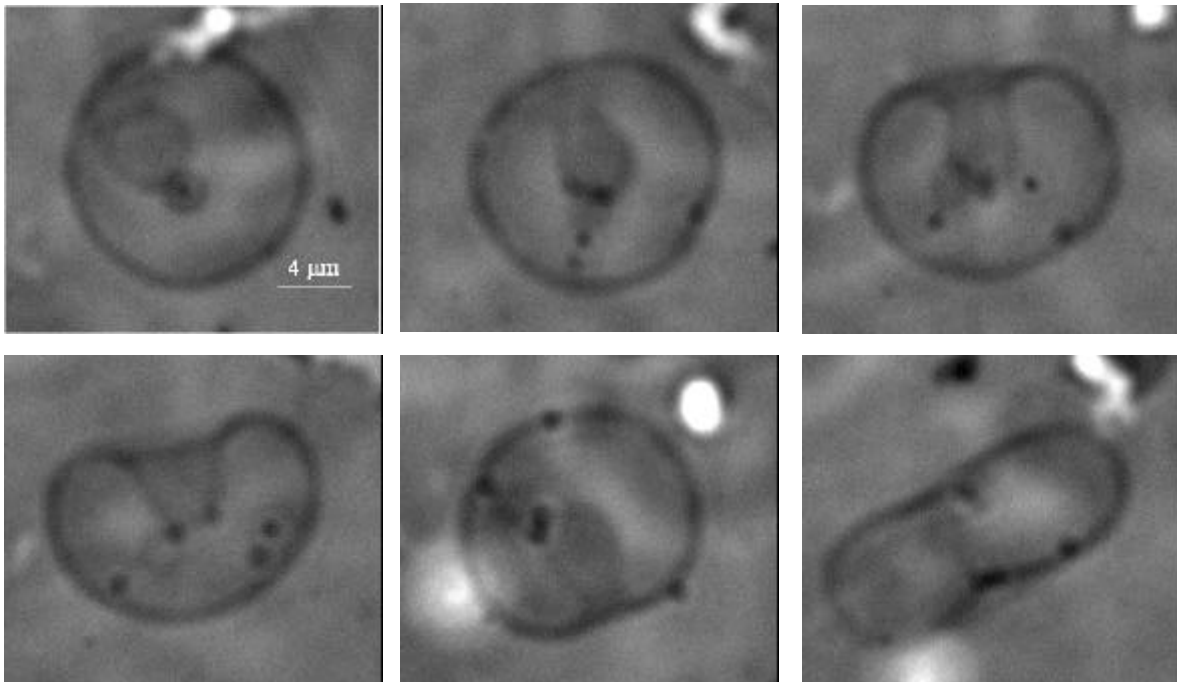


Abbildung 7-12: Durch radikalische Polymerisation eines Styrol/Divinylbenzol-Gemisches verursachte Formumwandlung eines DMPC-Vesikels von der Stomatocyte in eine Diskocyte nach UV-Bestrahlung bei  $T = 31^{\circ}\text{C}$ . Die Bilder entsprechen zeitlichen Abständen von 15 s. Die dunklen Bereiche zeigen phasensepariertes Polymer. Die diskoide Gestalt entspricht der stabilen Form nach der Polymerisation.

Grund für die Abnahme des reduzierten Volumens und respektive der Überschußfläche ist die Volumenkontraktion im lipophilen Bereich der Doppelschicht durch die Polymerbildung. Das Polymer weist im Vergleich zum Monomer eine um etwa 15 % höhere Dichte auf und bewirkt somit effektiv eine Abnahme der Vesikelfläche bei konstantem inneren Volumen. Die jeweilige Änderung der Gestalt ist aufgrund der Netzbildung irreversibel.

Ausgehend von einer sphärischen Vesikelgestalt, die die kleinste Membranfläche bei konstantem eingeschlossenem Volumen aufweist, sollte folglich eine weitere Reduktion der Membranfläche während der Polymerisation nicht möglich sein. Abbildung 7-13 zeigt den entsprechenden Polymerisationsvorgang am Beispiel eines sphärischen Vesikels mit vernachlässigbarer Überschußfläche.

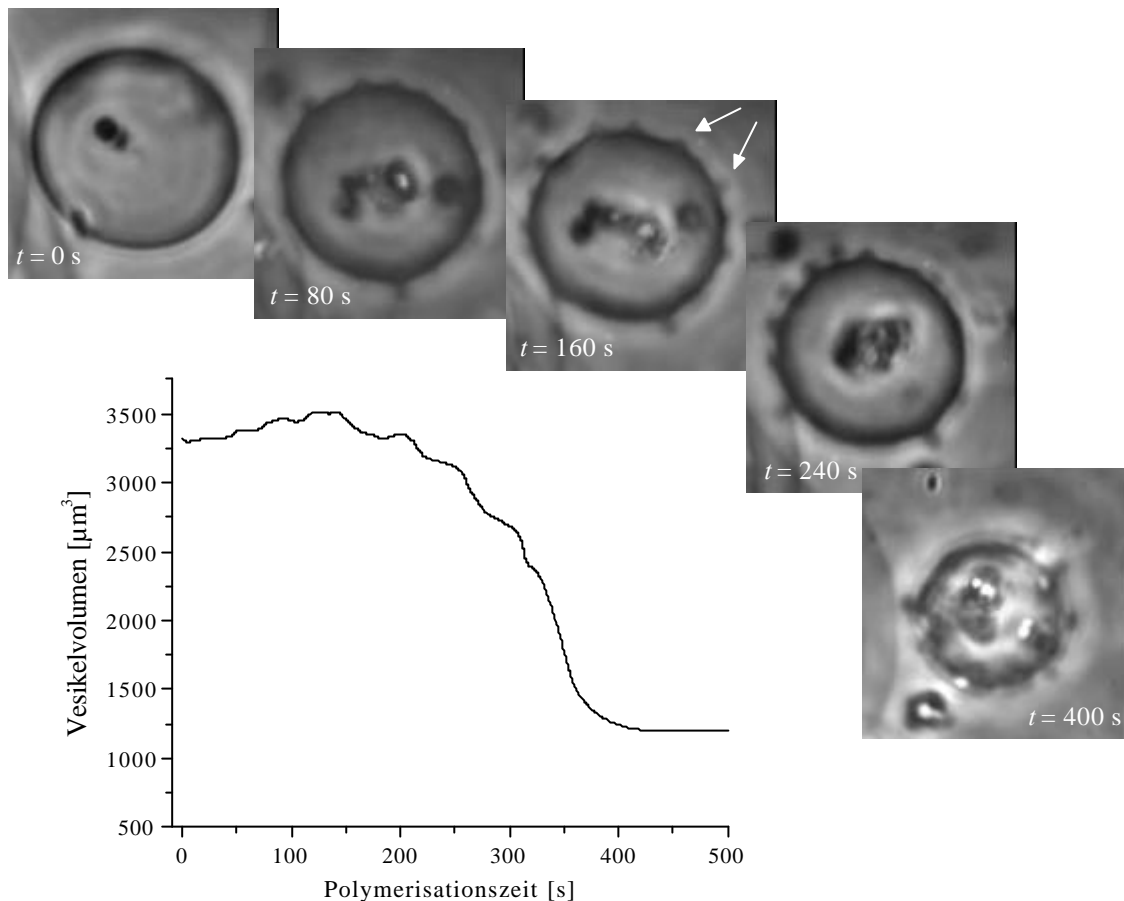


Abbildung 7-13: Zeitlicher Verlauf der photochemisch initiierten Polymerisation eines solubilisierten Styrol/Divinylbenzol-Gemisches in einem sphärischen DMPC-Vesikel. Dargestellt sind die zeitliche Entwicklung des Vesikelvolumens und die entsprechenden mikroskopischen Aufnahmen. Das Vesikel weist vor der Polymerisation zum Zeitpunkt  $t = 0$  eine geringe Überschussfläche auf. Die Entstehung des Polymers führt zur Bildung von Knospen (Markierung durch Pfeile), in denen das Polymer angereichert wird. Die Volumenabnahme ist letztendlich eine Folge des Bruchs der Membran.

Die Kontraktion der Vesikelfläche führt aufgrund des fehlenden Flächenüberschusses zu einer starken lateralen Kompression der Doppelschicht. Hierdurch steigt der Druck im wässrigen Inneren des Vesikels. Im weiteren Verlauf der Polymerisation kommt es zu einem Bruch der Membran unter Reduktion des inneren wässrigen Volumens. Auffällig ist, daß die Ausstülpung der Membran in Form gleichmäßig verteilter, nach außen gerichteter Knospen homogener Größe erfolgt, in denen eine Anreicherung des entstehenden Polymers zu beobachten ist. Hierbei handelt es sich vermutlich um ein domäneninduziertes Knospen (vgl. Kapitel 5) aufgrund auftretender Linienspannungen im Bereich der Polymerdomänen. Die zur Knospenbildung aufzuwendende Krümmungsenergie folgt aus der nach außen gerichteten Kraft aufgrund des hohen inneren Drucks.

Die Reduktion der Membranfläche während der Polymerisation sollte ferner zu einer lateralen Kompression der Phospholipidmoleküle führen. Dies wird durch die Ergebnisse der  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopischen Untersuchungen bestätigt (Tabelle 7-3).

Tabelle 7-3:  $^1\text{H}$ -NMR-Untersuchung der thermisch induzierten Styrol/Divinylbenzol-Copolymerisation in kleinen unilamellaren DMPC-Vesikeln in  $\text{D}_2\text{O}$ . Vergleichend sind jeweils die chemischen Verschiebungen  $\delta$  der Resonanzen der Methylgruppen des Kopfgruppenbereichs sowie der Methylen- und der terminalen Methylgruppen der Acylreste von DMPC aufgeführt.

Substanz	$\delta$ [ppm]		
	$\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	$(\text{CH}_2)_n$	$\text{CH}_3$
DMPC-Vesikel (SUV)	3.27	1.28	0.90
Vesikel mit Monomerenmisch	3.25	1.13	0.80
Vesikel nach Copolymerisation	3.31	1.32	0.98

Die Solubilisierung der Monomeren im lipophilen Membranbereich verursacht aufgrund der Anisotropie des aromatischen Systems eine Hochfeldverschiebung der Methylen- und Methylresonanzen von DMPC. Ein spektroskopischer Vergleich der Proben vor und nach der Polymerisation zeigt die vollständige Reaktion der Monomeren, wobei keinerlei Polymerresonanz beobachtbar ist (Daten nicht aufgeführt). Die Signale der Methylen- und Methylresonanzen der Acylreste sind bei Anwesenheit des Polymers stark verbreitert und nur mäßig unterscheidbar. Das Signal der Methylgruppe des Cholins bleibt hingegen neben einer geringfügigen Erhöhung der Halbwertsbreite nahezu unbeeinflusst. Die deutliche Tiefeldverschiebung, insbesondere der Resonanz der Methylprotonen des lipophilen Amphiphilbereichs nach der Polymerisation, ist ein deutliches Indiz für eine laterale Kompression und das Verdrängen des Solubilisats aus dem Zwischenlipidbereich in die Mitte der Doppelschicht unter Separation der beiden Monoschichten. Die resultierenden Signale ähneln in Halbwertsbreite und chemischer Verschiebung zunehmend denen des Phospholipids im Gelzustand.

Die ausgeprägte Tendenz zur Bildung mikroskopisch visualisierbarer Polymerpartikel im Membranbereich wird durch die Inkompatibilität des Styrol/Divinylbenzol-Copolymers mit der Lipidmatrix bedingt. Wie bereits gezeigt werden konnte, sind Moleküle wie Styrol aber auch Divinylbenzol molekular gut im lipophilen Membranbereich von Phosphatidylcholinvesikeln löslich. Das entstehende Copolymer zeigt eine schlechte Löslichkeit in Kohlenwasserstoffen [173] und ist somit weitestgehend inkompatibel mit dem lipophilen Bereich der Doppelschicht. Diese Inkompatibilität führt letztendlich zur Segregation des Polymers innerhalb der Doppelschicht unter Ausbildung eines Polymerpartikels. Ferner resultiert eine erhöhte Tendenz des Polymers sich in seinem Monomer zu lösen. Da die Beweglichkeit der Polymers in der Lipidmatrix stark eingeschränkt sein sollte, ist eine verstärkte Diffusion

des Monomers in Richtung des Polymers zu erwarten. Die durch die Polymerdomänen bedingte Störung der Lipidmatrix führt zu einer Anreicherung des Monomers und lokal zu einem verstärkten Polymerwachstum. Hierdurch entstehen Latexpartikel, die im Membranbereich verankert bleiben.

Die irreversible Gestaltänderung der Vesikel während der Polymerisation deutet dennoch auf eine Netzwerkbildung im lipophilen Membranbereich hin. Auch konnten in den meisten Fällen nach der Polymerisation netzwerkartige Strukturen isoliert werden, die jedoch kollabierten.

### 7.2.2.2 Polymerisation unter Verwendung von Methacrylaten

Die Polymerisation im lipophilen Bereich der Doppelschicht unter Verwendung eines äquimolaren Gemisches von Methacrylsäurebutylester und 1,2-Bis(methacrylsäure)glycol-ester liefert keinerlei vergleichbare Hinweise auf eine Phasenseparation des Copolymers. In Analogie zum beschriebenen Styrol/Divinylbenzol-Copolymerisat führt die Netzwerkbildung ebenfalls zu einer deutlichen Reduktion der Überschussfläche. Abbildung 7-14 zeigt die Abnahme der thermisch bedingten Undulation eines quasi-sphärischen DMPC-Vesikels aufgrund einsetzender Netzwerkbildung. Die Polymerisation verläuft ohne signifikante Änderung des inneren Vesikelvolumens. Nach vollständiger Polymerisation liegt eine sphärische Vesikelgestalt vor, die keinerlei thermisch bedingte Fluktuation zeigt.

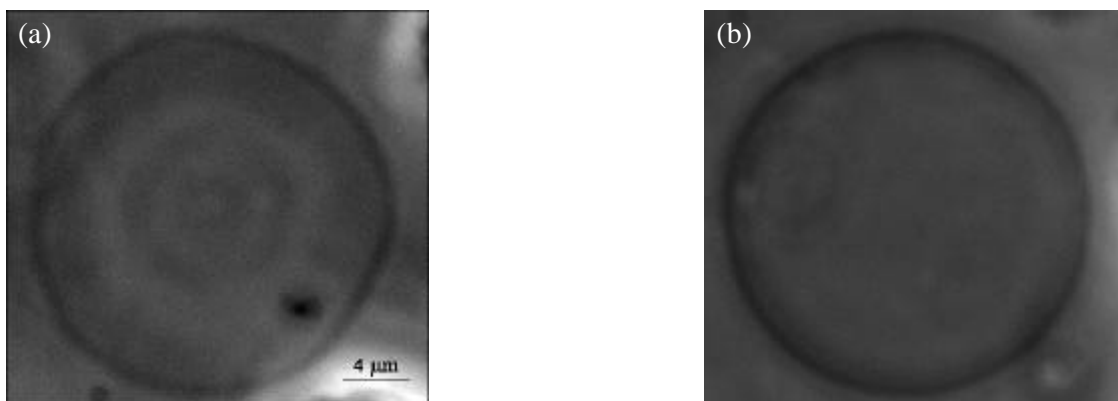


Abbildung 7-14: Polymerisation eines äquimolaren Gemisches von Methacrylsäurebutylester und 1,2-Bis(methacrylsäure)glycol-ester in einem DMPC-Vesikel bei  $T = 33^\circ\text{C}$ . (a) Vesikel vor der Polymerisation nach Einquellen der Monomere (50 Gew.-%) in die lipophile Doppelschicht. Das Vesikel zeigt thermisch angeregte Fluktuationen mit  $k_c = (0.9 \pm 0.1) \cdot 10^{-19} \text{ J}$ ,  $\bar{S} = 1$ ,  $\Delta = (66 \pm 10) \cdot 10^{-3}$ , ( $V = 4990 \mu\text{m}^3$ ). Nach dreiminütiger UV-Bestrahlung (b) sinkt aufgrund der Netzwerkbildung die Überschussfläche  $\Delta = (8 \pm 3) \cdot 10^{-3}$  unter Anstieg der elastischen Parameter  $k_c = (11 \pm 2) \times 10^{-19} \text{ J}$ ,  $\bar{S} = 20$ , ( $V = 5000 \mu\text{m}^3$ ), bis schließlich keinerlei Undulationen beobachtbar sind.



Die Biegesteifigkeit des Vesikel ist nach Solubilisierung der Monomere im Vergleich zum unbeladenen Vesikel mit  $k_c = (0.9 \pm 0.1) \cdot 10^{-19}$  J deutlich erniedrigt, steigt jedoch mit Beginn der Polymerisation sprunghaft auf  $k_c = (11 \pm 2) \cdot 10^{-19}$  J an. Im Unterschied zum Styrol/Divinylbenzol-Copolymer ist das Polymer aus Methacrylsäurebutylester und 1,2-Bis(methacrylsäure)glycolester relativ schlecht in seinen Monomeren, hingegen gut in Kohlenwasserstoffen löslich und scheinbar kompatibel mit der Membran. Während der Polymerisation konnte in keinem der Fälle eine Phasenseparation des Polymers unter Domänenbildung beobachtet werden.

Differenzkalorimetrische Untersuchungen der Polymerisation in großen unilamellaren Vesikeln (LUV) bestätigen die erfolgreiche Vernetzung (Abbildung 7-15).

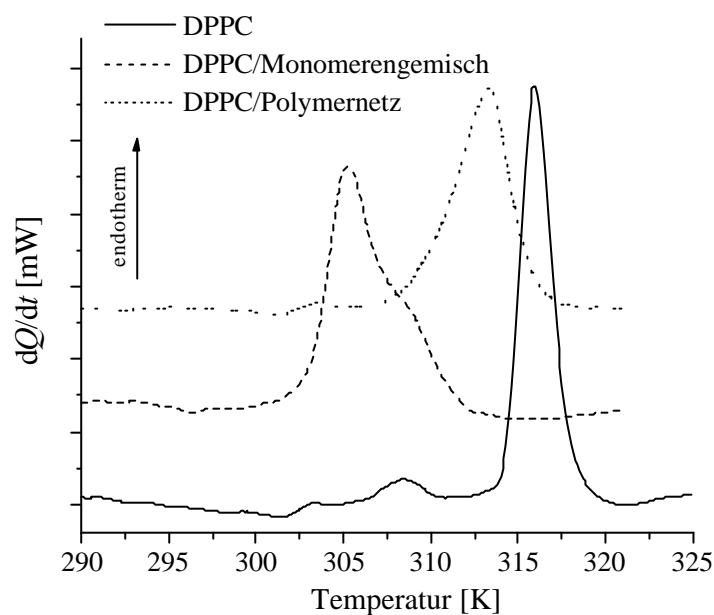


Abbildung 7-15: Kalorimetrische Untersuchung der Polymerisation eines äquimolaren Gemisches von Methacrylsäurebutylester und 1,2-Bis(methacrylsäure)glycolester in großen unilamellaren DPPC-Vesikeln (LUV). Die Thermogramme zeigen die Phasenumwandlungen des reinen DPPC, sowie von DPPC nach Solubilisierung des Monomerengemisches (50 Mol-%) und nach thermischer Polymerisation.

Die Solubilisierung des Monomerengemisch führt zunächst zu einer deutlichen Erniedrigung der Umwandlungstemperatur der Hauptumwandlung unter Abnahme der Kooperativität der Umwandlung. Die Asymmetrie des Umwandlungspeaks deutet ferner auf eine bevorzugte Einlagerung des Solubilisats in der Gelphase von DPPC (vgl. Diskussion in Kapitel 3.1.4). Dies zeigt, wie auch der geringe Einfluß auf die Umwandlungsenthalpie (Tabelle 7-4), eine erhöhte Affinität des Methacrylatgemisches zum Kopfgruppenbereich des Amphiphils. Nach der Polymerisation ist diese Affinität nicht mehr zu beobachten. Umwandlungstemperatur und Symmetrie der Hauptumwandlung entsprechen nahezu dem reinen

DPPC. Einzig die erhöhte Halbwertsbreite deutet auf eine Beeinflussung der Lipidmoleküle hin. Das Polymer sollte somit vorwiegend im lipophilen Bereich zwischen den Monoschichten lokalisiert sein. Ferner findet eine bevorzugte Wechselwirkung des Polymers mit der fluiden Amphiphilmatrix statt.

Tabelle 7-4: Ergebnisse der kalorimetrischen Untersuchung der Copolymerisation von Methacrylsäurebutylester und 1,2-Bis(methacrylsäure)glycolester in DPPC-Vesikeln.

Substanz	$T_m$ [°C]	$\Delta T_{1/2}$ [K]	$\Delta H_m$ [kJ·mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta S_m$ [J (mol · K) <sup>-1</sup> ]
DPPC-Vesikel (LUV)	42.7	1.6	31.9	101
Vesikel mit Monomergemisch	31.9	3.9	31.3	103
Vesikel nach Copolymerisation	40.3	3.2	25.2	80

### 7.2.3 Isolierung des Polymernetzwerks

Der Nachweis der Existenz eines Polymernetzwerkes erfolgte mit Hilfe der Videomikroskopie. In einigen Fällen deuten die Beobachtungen auf die Existenz netzwerkartiger Strukturen im Membranbereich der Vesikel nach Polymerisation der lipophilen Monomere (vgl. Abbildung 7-16).

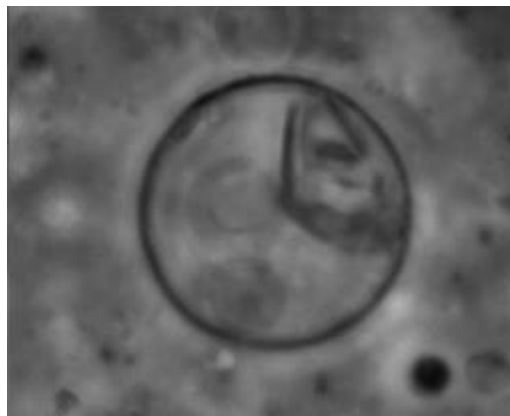


Abbildung 7-16: Polymerfragmente im Bereich der Doppelschicht eines DMPC-Vesikels ( $d = 22.9 \mu\text{m}$ ) nach Polymerisation eines äquimolaren Gemisches von Methacrylsäurebutylester und 1,2-Bis(methacrylsäure)glycolester.

Eine Visualisierung der Freisetzung des Polymers nach Entfernen des Amphiphils gelang jedoch nur unter Verwendung multilamellarer Vesikel. Diese wurden nach der Polymerisation des Monomergemisches im lipophilen Bereich der Doppelschicht in Ethanol gelöst (Abbildung 7-17).

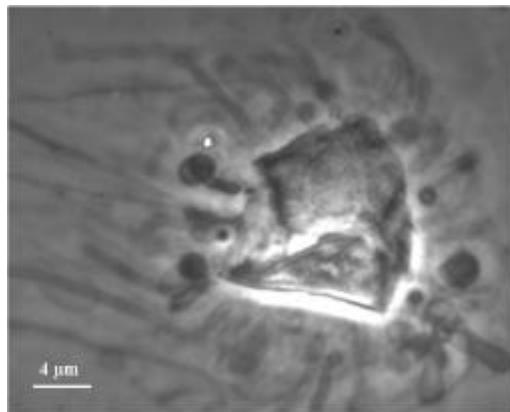


Abbildung 7-17: Langsames Ablösen der Doppelschichten eines multilamellaren Vesikels in Form tubusförmiger Doppelschichtstrukturen unter Freisetzung des Methacrylatpolymers in der Bildmitte. Der Gradient der Ethanolkonzentration fällt von rechts nach links.

Jegliche Versuche der Konservierung des Polymers in der sphärischen Gestalt scheiterten im Bereich riesiger Vesikel. Abbildung 7-18 zeigt die videomikroskopischen Aufnahmen des isolierten Polymers nach vollständiger Entfernung des Amphiphils.

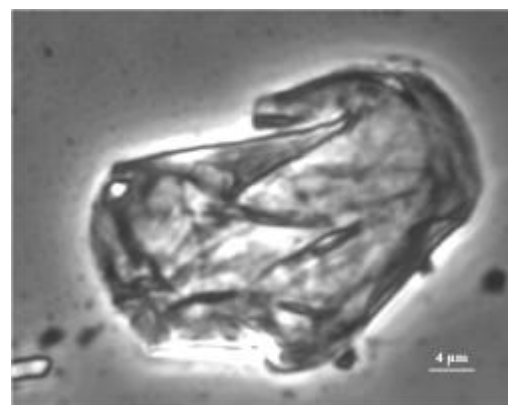
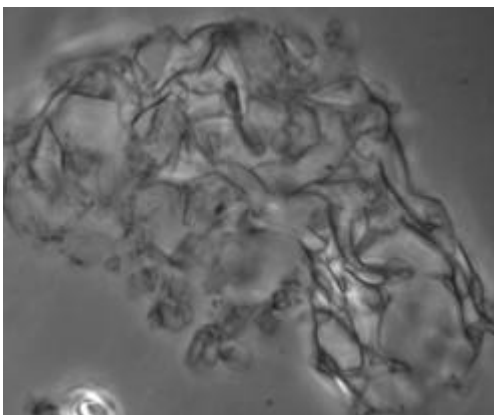


Abbildung 7-18: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der Polymerstrukturen nach Polymerisation in multilamellaren Vesikeln und anschließendem Entfernen des Amphiphils. Linkes Bild: großes Agglomerat mehrerer Fragmente von Polymethacrylat; rechtes Bild: isoliertes Polystyrol/Divinylbenzol.

Die videomikroskopischen Aufnahmen bestätigen die Bildung eines zweidimensionalen Netzwerks, welches einen Hohlraum aufspannt. Sphärische Strukturen können in dieser Größenordnung jedoch nicht beobachtet werden. Unter der Annahme der Bildung einer homogenen Polymerschicht sollte eine Schichtdicke von 1 - 3 nm zu erwarten sein. Diese ist sehr klein im Vergleich zum gesamten Durchmesser von etwa 30  $\mu\text{m}$ , so daß die sphärische Hohlraumstruktur vermutlich kollabiert.

Erschwerend kommt hinzu, daß Vesikel in diesen Größenbereichen vielfach kleinere Defekte in der Membran sowie Bereiche unterschiedlicher Krümmung aufweisen können. Diese führen zu Inhomogenitäten in der Zusammensetzung und wirken letztendlich einer einheitlichen Netzwerkbildung entgegen.

Eine wichtige Voraussetzung zur Nutzung der Vesikelgestalt als Templat für die Polymerisation ist somit die homogene Verteilung des Monomers und die Kompatibilität des Polymers mit der Lipidmatrix. Da im Bereich hoher Solubilisatkonzentrationen eine inhomogene Verteilung des Monomers innerhalb der Doppelschicht zu erwarten ist, kann das Molverhältnis von Monomer und Phospholipid nicht beliebig gewählt werden. Ist das Polymer im lipophilen Bereich der Doppelschicht schlecht löslich, so wird die Bildung von Latexpartikeln begünstigt. Voraussetzung für die Konservierung der Vesikelstruktur ist ferner ein vorhandener Flächenüberschuß der Vesikel vor der Polymerisation.

Eine einheitliche Polymerbildung scheint einzig unter Verwendung von Vesikeln nach Darstellung mittels Extruder (mit Durchmessern von etwa 100 nm) möglich. Vesikel in diesem Größenbereich sind jedoch mikroskopisch nicht zugänglich.

#### **7.2.4 Zusammenfassung**

Die templatgestützte, radikalische Polymerisation lipophiler Monomere ermöglicht die Erzeugung eines zweidimensionalen Netzwerkes innerhalb der Doppelschicht von Phosphatidylcholinvesikeln. Unter Verwendung von Vesikeln in Größenbereichen von etwa 30 µm ist mit Hilfe der Videomikroskopie der Einfluß der Polymerbildung auf die Vesikelgestalt nachweisbar. Ferner kann das gebildete Netzwerk isoliert werden. Die Ergebnisse können durch kalorimetrische sowie protonenresonanzspektroskopische Untersuchungen bekräftigt werden. Im Verlauf der Polymerisation kommt es zu einer Gestaltumwandlung aufgrund der Reduktion der Membranfläche bei konstantem inneren Volumen des Vesikels. Ausgehend von Vesikeln mit einem Flächenüberschuß ist somit eine Polymerisation unter Erzeugung einer sphärischen Vesikelgestalt möglich. Hierbei bleibt die Integrität der Doppelschicht erhalten, die elastischen Eigenschaften der Membran werden jedoch signifikant beeinflusst.

Ein wichtiger Aspekt zur Nutzung der Vesikelgestalt als Templat für eine homogene Netzwerkbildung ist die gleichmäßige Verteilung des Monomers sowie die Kompatibilität des Polymers mit der umgebenden Lipidmatrix. Letzteres ist unter Verwendung eines Polystyrol/Divinylbenzol-Gemisches nicht gewährleistet, da die Löslichkeit des Polymers im lipophilen Bereich der Doppelschicht unzureichend ist. Hierdurch kommt es im Verlauf der Polymerisation zu Phasenseparationen.