

8 Zusammenfassung und Ausblick

8.1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Solubilisierung lipophiler aromatischer Substanzen durch Phosphatidylcholinvesikel. Mit spektroskopischen, kalorimetrischen und videomikroskopischen Methoden erfolgte eine umfassende Charakterisierung des bislang wenig berücksichtigten Einflusses unpolarer Solubilisate auf die Eigenschaften unilamellarer Vesikel. Die Verwendung der Video-Kontrastverstärkungs-Mikroskopie ermöglichte neuartige Einblicke in die Dynamik des Einbaus von Toluol in die Doppelschicht einzelner Vesikel. Ferner wurde die Interaktion schadstoffbeladener Vesikel *in-vitro* an CHO-Zellen untersucht. Bei der Erforschung möglicher Anwendungen vesikulärer Systeme gelang mittels templatgestützter Polymerisation die Erzeugung eines Polymernetzwerkes im lipophilen Membranbereich von Vesikeln sowie die Konstruktion morphologisch schaltbarer vesikulärer Systeme auf der Basis eines lipophilen Solubilisats.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß das Solubilisierungsvermögen unilamellarer Phospholipidvesikel für lipophile Substanzen deutlich von der Membrankrümmung der Vesikel und dem Aggregatzustand des Lipids abhängt. Große Vesikel im fluiden Zustand weisen ein hohes Solubilisierungsvermögen im Vergleich zu kleinen, gespannten Strukturen oder Vesikeln im Gelzustand auf. Die Solubilisierungskapazität ist zudem von der Form und Größe des lipophilen Solubilisats abhängig. Kleine kompakte Moleküle werden in vergleichbar großer Menge eingelagert.

Hinsichtlich der Lokalisierung konnte gezeigt werden, daß unpolare aromatische Substanzen bevorzugt im lipophilen Bereich der Doppelschicht von Phosphatidylcholinvesikeln solubilisiert werden. Mit steigender Solubilisatkonzentration erhöht sich die Tendenz zur Anreicherung im Kopfgruppenbereich, wodurch die Membranspannung der Vesikel steigt. Die strukturelle Integrität der Doppelschicht wird hierdurch deutlich beeinträchtigt und die Polarität nimmt im inneren Membranbereich zu, da Wasser vermehrt in die lipophile Doppelschicht eindringt. Zudem werden Fusionen von Vesikeln zu größeren Aggregaten begünstigt. Der Einfluß lipophiler Solubilisate auf die intrinsischen Eigenschaften der Doppelschicht manifestiert sich überdies in dem Anstieg der Fluidität des inneren Membranbereichs der Vesikel.

Anhand der durchgeführten Studien zur Dynamik des Solubilisierungsprozesses wurde eine laterale Ausdehnung der Lipiddoppelschicht nachgewiesen, die auf der palisadenförmigen Einlagerung des Solubilisats im Zwischenlipidbereich beruht. Röntgenstreuexperimente sowie theoretische Abschätzungen bestätigen die laterale Expansion der Doppelschicht, die mit einer gleichzeitigen Dickenzunahme verbunden ist. Aufgrund der Konstanz des eingeschlossenen inneren Vesikelvolumens verändert sich im Verlauf der Solubilisierung die ursprüngliche Vesikelgestalt.

Der Einbau lipophiler Substanzen in die Doppelschicht erfolgt selektiv in Bereichen niedriger Packungsdichte, ein bislang wenig beachteter Effekt. Diese Selektivität konnte unter Verwendung kleiner unilamellarer Vesikel nachgewiesen werden, die eine hohe Membrankrümmung aufweisen und lipophile Solubilisate bevorzugt im weniger dicht gepackten lipophilen Bereich der inneren Monoschicht einlagern.

Durch kalorimetrische Untersuchungen des thermotropen Phasenverhaltens konnte am Beispiel des Systems DPPC/Toluol gezeigt werden, daß die Einlagerung von Toluol nicht über den gesamten Konzentrationsbereich homogen erfolgt. Vielmehr koexistieren Regionen unterschiedlicher Solubilisatkonzentration innerhalb einzelner Vesikel. Da die lokale Konzentration mit der Membrankrümmung gekoppelt ist, hat die inhomogene Zusammensetzung einen Einfluß auf die Gestalt unilamellarer Vesikel und kann zur Bildung ungewöhnlicher Vesikelformen führen. Zudem verursachen Anreicherungen des Solubilisats vermutlich aufgrund auftretender Linienspannungen Knospungen der Membran. Im Bereich hoher Solubilisatkonzentrationen kommt es zu Phasenseparationen unter Ausbildung stabiler solubilisatreicher Domänen. Die Domänenbildung konnte mit der Video-Kontrastverstärkungs-Mikroskopie visualisiert und in ihrer Dynamik studiert werden. Infolge einer Segregation entstehen linsen-, bzw. tropfenförmige Anreicherungen der lipophilen Substanz im Kernbereich der Doppelschicht.

Die Biegesteifigkeit k_c von Vesikeln ist eine wichtige mechanische Eigenschaft, die das Verhalten in porösen Materialien und bei Annäherung an Grenzflächen maßgeblich beeinflussen kann. Da der Einfluß lipophiler Solubilisate auf die Biegesteifigkeit k_c von Vesikeln bislang unbekannt war, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine videomikroskopische Methode zur Fluktuationsanalyse einzelner fluider, quasi-sphärischer Vesikel etabliert. Diese Methode erlaubt als einzige eine nicht-invasive Analyse und ermöglicht zudem die Bestimmung der Biegesteifigkeit im Verlauf von Solubilisierungsprozessen. Hierzu wurde die Methode leicht modifiziert und vorab mittels numerischer Simulation eingehend geprüft.

Fluktuationsanalysen riesiger unilamellarer DMPC-Vesikel zeigen eine Reduktion der Biegesteifigkeit nach Solubilisierung grenzflächenaktiver Substanzen wie Natriumdodecylsulfat, Myristinsäure oder Ethanol. Ferner konnte erstmals der konzentrationsabhängige Einfluß von Toluol als lipophilem Solubilisat auf die Biegesteifigkeit von DMPC-Vesikeln bestimmt werden. Die Biegesteifigkeit k_c sinkt trotz zunehmender Membrandicke von $(1.42 \pm 0.21) \cdot 10^{-19}$ J auf Werte von $(0.36 \pm 0.10) \cdot 10^{-19}$ J. Dieser Effekt kann auf der Basis der dargelegten Erkenntnisse erklärt werden und beruht vermutlich auf der hohen Mobilität von Toluol in der lipophilen Doppelschicht. Hierdurch erfolgt während der Auslenkung der Membran eine selektive Anreicherung des Solubilisats in Bereichen niedriger Packungsdichte unter Reduktion der Biegesteifigkeit.

Die Analyse des thermischen Flächenausdehnungskoeffizienten \mathbf{b} zeigte weiterhin, daß die temperaturbedingte Ausdehnung der Doppelschicht von Vesikeln nach Solubilisierung

von Toluol (85 Mol-%) deutlich herabgesetzt wird. Der Koeffizient b von DMPC-Vesikeln sinkt entsprechend von $(6.9 \pm 0.8) \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ auf $(1.6 \pm 0.3) \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$.

Anhand mikroskopischer Untersuchungen zur Kinetik der Solubilisierung wasserunlöslicher lipophiler Substanzen konnten erstmals grenzflächenbezogene Solubilisierungsraten $[-A^{-1} (dV/dt)]$ von unilamellaren Vesikeln ermittelt werden. Die Raten steigen oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur T_m der Vesikel an und werden vermutlich entsprechend micellaren Systemen durch Prozesse an der Öl/Wasser-Grenzfläche dominiert. Hierauf weisen auch Beobachtungen an der Phasengrenze hin. Ein Einfluß der Biegesteifigkeit auf die auftretenden Grenzflächenphänomene ist nicht auszuschließen.

Vesikel/Zell-Interaktionen wurden mit Hilfe des Schwesterchromatidenaustausch-Tests untersucht. Die Ergebnisse bestätigen eine Interaktion schadstoffbeladener Vesikel mit Zellen *in-vitro*. Insbesondere kleine gespannte Vesikel können den Eintrag lipophiler Substanzen ins Zellinnere verstärken, da sie vermutlich über den Mechanismus einer Phagozytose ins Cytosol gelangen. Aus diesem Grund wird durch Solubilisierung eines lipophilen Schadstoffs in kleine unilamellare Vesikel dessen mutagenes Potential auf CHO-Zellen deutlich erhöht.

Abschließend wurde exemplarisch anhand zweier Anwendungsbeispiele die Bedeutung der Interaktion lipophiler Solubilisate mit der Phospholipiddoppelschicht aufgezeigt. Basierend auf den im Rahmen dieser Arbeit erworbenen Erkenntnissen wurde ein morphologisch schaltbares vesikuläres System entwickelt. Nach Solubilisierung von Pyren ist es möglich, die Gestalt gespannter unilamellarer DMPC-Vesikel durch UV-Bestrahlung zu ändern. Diese nicht-invasive Beeinflussung beruht auf der Erhöhung des Platzbedarfs des Solubilisats nach der Anregung und hat eine Expansion der Membranfläche bei konstantem inneren Volumen und letztendlich eine Gestaltänderung des Vesikels zur Folge. Das System relaxiert nach Beendigung der Bestrahlung und ist auf diese Weise reversibel beeinflussbar.

Mit Hilfe der templatgestützten, radikalischen Polymerisation lipophiler Monomere konnte außerdem ein zweidimensionales Netzwerk innerhalb der Doppelschicht von Phosphatidylcholinvesikeln erzeugt und die dazu nötigen Voraussetzungen studiert werden. Eine einheitliche Netzwerkbildung erfolgt nur bei homogener Verteilung des Monomers und sofern das Polymer mit der umgebenden Lipidmatrix kompatibel ist. Dies wird unter Verwendung eines äquimolaren Gemisches von Methacrylsäurebutylester und 1,2-Bis(methacrylsäure)glycolester gewährleistet. Die Polymerbildung führt zu einer Kontraktion der Membranfläche, so daß zur Vermeidung eines Bruchs der Membran Vesikel mit einem Flächenüberschuß eingesetzt werden müssen. Die Integrität der Doppelschicht bleibt während der Polymerisation erhalten, wohingegen die elastischen Eigenschaften der Membran durch das Netzwerk signifikant beeinflusst werden.

8.2 Ausblick

Die vorgestellten Ergebnisse unterstreichen die vielfältige Bedeutung von Vesikeln sowohl im Hinblick auf die lösungsvermittelnden Eigenschaften, als auch auf mögliche Anwendungen in Form maßgeschneiderter oder funktionalisierter kolloidaler Aggregate. Diese können dem Transport und der kontrollierten Freisetzung von Wirkstoffen dienen. Hierbei ist ein detailliertes Verständnis der Wechselwirkung von Solubilisat und Amphiphil sowohl für eine quantitative Prognose von Solubilisierungseigenschaften, als auch im Hinblick auf mögliche neuartige Anwendung notwendig.

Im Falle von Solubilisierungsprozessen konnte insbesondere auf die Bedeutung der Biegesteifigkeit k_c hingewiesen werden. Diese ist für das Verhalten von Vesikeln in porösen Materialien wie der Bodenmatrix sowie bei Prozessen an Phasengrenzflächen relevant. Ziel zukünftiger Arbeiten könnte eine Quantifizierung derartiger Einflüsse sein. Auf diesem Wege sollte es möglich sein, für spezielle Anwendungen vesikuläre Aggregate maßzuschneidern, die in der Lage sind, selektiv Komponenten eines lipophilen Gemisches zu solubilisieren.

Die Permeationseigenschaften sind zudem für medizinische Anwendungen relevant. Mittels lipophiler Solubilisate sollte es möglich sein, die Biegesteifigkeit von Vesikeln derart zu erniedrigen, daß ein Durchdringen der Poren der Haut ermöglicht wird. Wirkstoffe wie Insulin könnten auf diese Weise ohne Injektion in den Organismus appliziert werden.

Aber auch schaltbare Systeme, die gezielt Wirkstoffe freisetzen, sind von großem wissenschaftlichen Interesse. Auf der Basis hautverträglicher liposomal gebundener Chromophore könnten Kapselmaterialien generiert werden, die nach dem Auftragen auf der Haut, je nach Intensität des Sonnenlichts dosiert Wirkstoffe beispielsweise zum Schutz vor Hautalterungen freisetzen.