

Lipidsysteme als Stratum corneum Modelle
Charakterisierung und Eignung für Permeationsuntersuchungen

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Bettina Glombitza

aus Northeim

1. Referentin oder Referent: Prof. Dr. C. C. Müller-Goymann

2. Referentin oder Referent: Prof. Dr. K.-H. Gericke

eingereicht am: 22.02.2001

mündliche Prüfung (Disputation) am: 28.05.2001

Druckjahr 2001

Für
meinen Vater
meinen Bruder Wolfgang
meine Schwester Monika
...und meine Mutter †
(wish you were here)

La vie sera une fête, un grand festival,
parce qu' elle est toujours le moment,
que nous sommes en train de vivre.

"L' alchimiste", Paulo Coelho

Die vorliegende Arbeit entstand unter Anleitung von Frau Prof. Dr. C. C. Müller-Goymann am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann

danke ich sehr herzlich für die Zuweisung des Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung während dessen Bearbeitung sowie für ihre persönliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Gericke danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Ich möchte mich bei allen technischen und wissenschaftlichen Mitarbeitern des Institutes für die freundliche Arbeitsatmosphäre sowie die gute Zusammenarbeit und Hilfe bedanken, die die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Laborkollegen Herrn Dr. Christoph Specht und Frau Dr. Inken Stoye für Ihre großartige motivierende Unterstützung und die zahlreichen fachlichen Diskussionen, die wertvolle Anregungen für diese Arbeit geben konnten. Weiterhin danke ich Frau Dr. Inken Stoye für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Mein großer Dank gilt außerdem Herrn Horst Wojahn, durch dessen Ideen und Erfindungsgabe ein großer Teil dieser Arbeit nicht entstanden wäre.

Weiterhin möchte ich mich bei folgenden Mitarbeitern bedanken:

Frau Carmen Gröchtemeier und Frau Kirsten Nebelung für die Anfertigung der Gefrierbrüche, Frau Dagmar Hahne und Frau Manuela Handt für die Erstellung der TEM-Abzüge, Frau Britta Meier für die Durchführung der Röntgenmessungen und Frau Juliane Schildt für die zahlreichen DSC-Messungen.

Ich danke außerdem Herrn Dr. Werner Hinkelmann und Dr. Robert Hänsch vom Institut der Botanik der TU Braunschweig für die Meßmöglichkeit am TEM und Herrn Dr. Flory vom Hollwede-Krankenhaus Braunschweig für die Überlassung der Hautproben.

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch Frau Prof. Dr. C. C. Müller-Goymann, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Glombitza B., Müller-Goymann, C. C. Investigation of interactions between silicones and stratum corneum lipids, *Int. J. Cosmet. Sci.* 23, 25-34 (2001)

Glombitza B., Müller-Goymann, C. C. Influence of different ceramides on the structure of in vitro model lipid systems of the stratum corneum lipid matrix, eingereicht in *Chem. Phys. Lipids*

Tagungsbeiträge

Glombitza, B., Häusler, P., Müller-Goymann, C. C. Characterization of human stratum corneum model lipid systems (Poster) Minutes Collection Symposium on Transdermal Administration (APGI), Paris 1997

Glombitza, B., Müller-Goymann, C. C. Permeation of Diclofenac Sodium across a human stratum corneum model lipid system (Poster), 2nd World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Paris 1998

Glombitza, B., Müller-Goymann, C. C. Permeation von Diclofenac Natrium durch verschiedene humane Stratum corneum Modell Lipid Systeme (Poster), Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Tübingen 1998; Abstract in *Arch. Pharm.* 331 (Suppl. 2), 57 (1998)

Glombitza B., Müller-Goymann, C. C. Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Silikonem und Stratum corneum Lipiden (Vortrag), Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft für Doktoranden, Freiburg 1999; Abstract in *Arch. Pharm.* 332 (Suppl. 1), 20 (1999)

Glombitza B., Müller-Goymann, C. C. Einfluß der Mikrostruktur auf die Permeabilität verschiedener humaner Stratum corneum Modell Lipid Systeme (Poster), Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Frankfurt (1999); Abstract in *Arch. Pharm.* 332 (Suppl. 2), 12 (1999)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Allgemeiner Teil	3
2.1	Lyotrope Mesophasen	3
2.1.1	Voraussetzungen zur Bildung lyotroper Mesophasen	3
2.1.2	Charakterisierung lyotroper Mesophasen	8
2.1.2.1	Polarisationsmikroskopie	8
2.1.2.2	Transmissionselektronenmikroskopie	9
2.1.2.3	Röntgenbeugung	9
2.1.2.4	Kalorimetrie	11
2.2	Die Haut	12
2.2.1	Funktionen der Haut	12
2.2.2	Allgemeiner anatomischer Aufbau der Haut	12
2.2.2.1	Aufbau der Epidermis	13
2.2.2.2	Das Stratum corneum	15
2.2.2.2.1	Struktur des Stratum corneum	15
2.2.2.2.2	Barrierefunktion der Stratum corneum Lipide	16
2.2.2.2.3	Lipidzusammensetzung des Stratum corneum	17
2.2.2.2.4	Mikrostruktur der Stratum corneum Lipide	22
2.2.2.2.5	Physikochemische Eigenschaften des Stratum corneum und der Stratum corneum Lipide	24
2.3	Stratum corneum Lipide als Permeationswege für Arzneistoffe	29
2.3.1	Wechselwirkungen zwischen topisch applizierten Stoffen und dem Stratum corneum	30
2.4	Modell Lipid Systeme als in vitro Modelle für Stratum corneum Lipide	32
2.4.1	Permeationsmodelle	34
2.5	Entwicklung eines Modells zur in vitro Arzneistoff Permeation durch Stratum corneum Lipide	35
2.5.1	Modellarzneistoffe	37

2.5.2	Permeationsuntersuchungen	39
3	Material und Methoden	41
3.1	Material	41
3.1.1	Fettsäuren	41
3.1.2	Ceramide	41
3.1.3	Arzneistoffe	44
3.1.4	Weitere Materialien	44
3.2	Methoden	45
3.2.1	In vitro Modell Systeme für die Lipide des Stratum corneum	45
3.2.1.1	Zusammensetzung der Modell Lipid Systeme	45
3.2.1.2	Herstellung der Modell Lipid Systeme	47
3.2.2	Thermogravimetrie (TG)	47
3.2.3	Dynamische Differenz Kalorimetrie (DSC)	48
3.2.4	Polarisationsmikroskopie	48
3.2.5	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) gefriergebrochener und replizierter Proben	48
3.2.6	Röntgenkleinwinkeluntersuchungen nach Kiessig	49
3.2.7	Röntgenweitwinkeldiffraktometrie	49
3.2.8	Rheologische Untersuchungen der Modell Lipid Systeme	50
3.2.9	Wechselwirkungen des Modellarzneistoffes Diclofenac-Na mit Stratum corneum Lipiden	50
3.2.10	Exzidiertes humanes Stratum corneum	50
3.2.10.1	Präparation von humanem Stratum corneum	50
3.2.10.2	Vorbehandlung des Stratum corneum	51
3.2.10.3	DSC-Untersuchungen an Stratum corneum	51
3.2.10.4	Röntgenweitwinkeluntersuchungen des Stratum corneum	51
3.3.1	Permeationsmodell zur in vitro Permeation durch Stratum corneum Modell Lipid Systeme	52
3.3.1.1	Auswahl des Trägers für die in vitro Modellmischungen	52
3.3.1.2	Hydrophobe Membran	52
3.3.1.2.1	Silikonisieren der Dialysemembran	53

3.3.1.3	Permeationsuntersuchungen	53
3.3.1.4	Permeationsuntersuchungen mit anderen Donatoren	55
3.3.1.5	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	55
3.3.1.6	Wechselwirkungen von Silikonem mit Stratum corneum Lipiden	56
3.3.1.7	Silikon-Modell Lipid Mischungen	56
4	Versuchsergebnisse und Diskussion	57
4.1	Physikochemische Charakterisierung der in vitro Modell Lipid Systeme	57
4.1.1	Physikochemische Eigenschaften der Modell Lipid Systeme M1-M7	57
4.1.1.1	Polarisationsmikroskopische Untersuchungen	57
4.1.1.2	Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung der Systeme (TEM)	64
4.1.1.3	Charakterisierung der Mischungen durch Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD)	69
4.1.1.4	Röntgenweitwinkelbeugung (WAXD)	77
4.1.1.5	Thermoanalytische Untersuchungen (DSC)	82
4.1.1.5.1	DSC-Untersuchungen der Mischungen M1-M7	82
4.1.1.5.2	DSC-Untersuchungen der Ausgangssubstanzen und deren Mischungen	85
4.1.1.5.3	DSC-Untersuchungen der wasserfreien Mischungen M1*-M7*	87
4.1.1.5.4	Untersuchungen des Aufheiz- und Abkühlverhaltens und der Lagerstabilität	89
4.1.1.6	Zusammenfassende Diskussion über die Mikrostruktur der Modell Lipid Systeme M1-M7	90
4.1.1.7	Vergleich der physikochemischen Charakteristika der untersuchten Mischungen mit bestehenden Modell Systemen	91
4.1.2	Physikochemische Eigenschaften der Komplettmischungen KM1, KM2 und KM3	93
4.1.2.1	Polarisationsmikroskopische Untersuchungen	93
4.1.2.2	TEM-Untersuchungen	96
4.1.2.3	Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD)	98
4.1.2.4	Röntgenweitwinkelbeugung (WAXD) der Komplettmischungen	99
4.1.2.5	Thermoanalytische Untersuchungen (DSC)	101

4.1.2.6	Zusammenfassende Diskussion über die Mikrostruktur der in vitro Modell Lipid Systeme mit unterschiedlichen Ceramiden (KM1-3)	106
4.2	Entwicklung eines Permeationsmodells zur in vitro Permeation durch Stratum corneum Modell Lipid Systeme	108
4.2.1	Auswahl der hydrophoben Trennmembran	109
4.2.1.1	Silikonisierungsmethode	110
4.2.1.2	Wechselwirkungen zwischen Silikonen und Stratum corneum Lipiden	112
4.2.1.2.1	Untersuchung der Wechselwirkungen von Silikonen mit M5 (UFS + GFS)	112
4.2.1.2.2	Untersuchung der Wechselwirkungen von Silikonen mit exzidiertem humanen Stratum corneum	115
4.2.2	Reproduzierbare Schichtdicken und Flächen	117
4.2.3	Permeationsuntersuchungen	118
4.2.3.1	Untersuchung der Hydratation während der Permeation	118
4.2.3.2	Permeationsuntersuchungen durch die Modell Lipid Systeme M1-M7	121
4.2.3.3	Zusammenfassende Diskussion zur Permeation des Modellarzneistoffes Diclofenac-Na durch die Modell Lipid Systeme M1-M7	128
4.2.3.4	Permeationsuntersuchungen durch KM1, KM2 und KM3	131
4.2.3.5	Zusammenfassende Diskussion zur Permeation von Diclofenac-Na durch KM1, KM2, KM3	134
4.2.3.6	Untersuchung der Hydratation der Lipidmischungen	136
4.2.3.7	Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Diclofenac-Na und den in vitro Modell Lipid Systemen	138
4.2.3.8	Permeationsuntersuchungen mit anderen Arzneistoffen	143
4.2.3.9	Zusammenfassende Diskussion zur Permeation von Ibuprofen-Lys und Hydrocortison durch KM1 und KM3 im Vergleich zu Diclofenac-Na	146
5	Abschlußdiskussion	150
5.1	Physikochemische Charakterisierung der in vitro Modell Lipid Systeme	150
5.1.1	Struktur der in vitro Modell Lipid Systeme M1-M7 und Bedeutung des Cholesterols und der freien Fettsäuren	150
5.1.2	Struktur der in vitro Modell Lipid Systeme KM1-KM3 und Bedeutung der Ceramid-Zusammensetzung	152

6.1.3	Bedeutung anderer Faktoren für die Ausbildung der multilamellaren Matrix der Stratum corneum Lipide	155
5.2	Permeationsuntersuchungen	155
5.2.1	Permeabilität der Modellmischungen M1-M7	155
5.2.2	Permeabilität der Modell Lipid Systeme KM1-KM3	156
5.2.3	Beurteilung der Modellmischungen KM1-KM3 und des Permeationsmodells als in vitro Modell für transdermale Transportprozesse	157
6	Zusammenfassung	160
7	Literaturverzeichnis	163

1 Einleitung und Problemstellung

Die Permeabilität der Haut wird im wesentlichen durch die interzelluläre Lipidsubstanz des Stratum corneum, der äußersten Schicht der Epidermis, bestimmt. Diese Interzellulärschicht enthält hauptsächlich Ceramide, Cholesterol und freie Fettsäuren, die zusammen ein hochgeordnetes System aus lamellaren Schichten bilden. Diese geordnete Barriere müssen auch Arzneistoffe überwinden, die topisch appliziert werden und anschließend in der Haut oder systemisch wirken sollen.

Bei der Permeation einer topisch applizierten Substanz kommt es zu reversiblen oder irreversiblen Wechselwirkungen mit diesem Lipidsystem, was sich in einer Veränderung der physikochemischen Eigenschaften äußern kann. In der Praxis untersucht man das Verhalten solcher Substanzen häufig an exzidiertem humanen Stratum corneum. Da dessen Verfügbarkeit begrenzt ist und die physikochemischen Eigenschaften des Stratum corneum einer starken Variabilität aufgrund der inter- und intraindividuell unterschiedlichen Lipidzusammensetzung unterworfen sind, versucht man in den letzten Jahren, Alternativen für dessen Verwendung zu finden. Neben tierischen Häuten oder Hautzellkulturen kommen zunehmend Modellsysteme, die die Eigenschaften des Stratum corneum imitieren sollen, zum Einsatz.

Als Modellsysteme werden u.a. biologische Membranen wie Eihaut aber auch künstliche Polymermembranen wie Celluloseacetat sowie Kombinationen verschiedener Polymere verwendet. Die beschriebenen Modellsysteme zeigen häufig zwar eine gute Korrelation zu erhaltenen Stratum corneum Daten, sind aber im allgemeinen auf vergleichende Untersuchungen strukturverwandter Substanzen beschränkt, so daß sie lediglich zur Qualitätskontrolle dermalen Produkte verwendet werden können.

Da die interzellulären Stratum corneum Lipide als Hauptträger der Barrierefunktion der Haut angesehen werden, erscheint es naheliegend, Modellsysteme auf Basis dieser Hautlipide zu entwickeln. Anhand dieser Modell Lipid Systeme könnten zum einen die Funktionen einzelner Bestandteile aufgeklärt und zum anderen die Wechselwirkungen topisch applizierter Stoffe mit den Stratum corneum Lipiden untersucht werden.

So stellte beispielsweise Häusler [1994] vereinfachte Modellsysteme für Stratum corneum Lipide her, um den Einfluß der freien Fettsäuren auf die Struktur der Stratum corneum Lipide näher zu untersuchen. Ein Grundsystem bestehend aus ungesättigten Fettsäuren wurde jeweils mit Stratum corneum Lipid Bestandteilen wie gesättigten Fettsäuren, Cholesterol und Ceramiden entsprechend den im humanen Stratum corneum vorkommenden Verhältnissen versetzt und die Mikrostruktur der Systeme mit unterschiedlichen physikochemischen

Methoden aufgeklärt. Ein Komplettsystem bestehend aus ungesättigten Fettsäuren, gesättigten Fettsäuren, Cholesterol und Ceramiden zeigte zwar eine zu den Stratum corneum Lipiden ähnliche Mikrostruktur, war jedoch hinsichtlich anderer physikochemischer Eigenschaften nicht direkt mit den Stratum corneum Lipiden vergleichbar. Eine Erklärung dafür war die in dem System verwendete Ceramid Mischung, die zu einem großen Anteil Phospholipide enthielt. Für diese Bestandteile, die in den Stratum corneum Lipiden normalerweise nur in Spuren zu finden sind, wurde eine störender Einfluß vermutet.

Ziele der vorliegenden Arbeit sind deshalb:

- eine in vitro Lipidmischung auf Grundlage der Häusler Systeme für die Stratum corneum Lipide zu entwickeln, die hinsichtlich der physikochemischen Eigenschaften mit den Lipiden des Stratum corneums vergleichbar ist
- den Einfluß von Phospholipiden und unterschiedlicher Ceramid Typen auf das Phasenverhalten der Lipide zu klären
- ein einfaches Permeationsmodell zu entwickeln, mit dem die Barriereigenschaften der Stratum corneum Modell Lipidmischungen und der Effekt der Bestandteile auf die Permeabilität der Systeme für bestimmte Arzneistoffe untersucht werden können
- an dem Permeationsmodell zu testen, ob das System auf dermal anwendbare Arzneistoffe ähnlich reagiert wie die Haut und somit ein geeignetes Modell darstellt, um transdermale Transportprozesse zu simulieren

2 Allgemeiner Teil

Für die Struktur der interzellulären Lipidsubstanz des Stratum corneum, die im wesentlichen aus Ceramiden, Cholesterol und freien Fettsäuren besteht, wird das Vorliegen flüssigkristalliner Strukturen diskutiert. Im folgenden sollen deshalb die Voraussetzungen zur Bildung flüssigkristalliner Strukturen und deren physikochemische Eigenschaften beschrieben werden.

2.1 Lyotrope Mesophasen

2.1.1 Voraussetzungen zur Bildung lyotroper Mesophasen

Flüssigkristalle nehmen in Bezug auf den festen kristallinen und den isotropen flüssigen Zustand eine Mittelstellung ein und werden deshalb auch als Mesophasen bezeichnet. Im Vergleich zum kristallinen Zustand besitzen die Einzelmoleküle eine stärkere Beweglichkeit jedoch eine höhere Ordnung als in einer Flüssigkeit. Die höhere Beweglichkeit macht sich in einer gewissen Fließfähigkeit des Systemes bemerkbar und der höhere Ordnungszustand durch die Anisotropie physikalischer Eigenschaften. Betrachtet man die Position und Orientierung der einzelnen Moleküle in einem Flüssigkristall zueinander, so besitzen diese eine Ordnung im Fernbereich (Fernordnung = long-range order) aber keine wie bei Kristallen zu findende definierte Ordnung im Nahbereich (Nahordnung = short-range order).

Man unterscheidet zwischen thermotropen Mesophasen, die sich in Abhängigkeit von der Temperatur ausbilden können, und lyotropen Mesophasen [Brown und Crooker 1983], die durch ein Lösungsmittel induziert werden, wobei lyotrope Mesophasen zusätzlich ebenfalls temperaturinduzierte Phasenübergänge zeigen können. Voraussetzung für die Entstehung lyotroper Mesophasen ist im allgemeinen eine anisometrische Molekülstruktur mit polaren und unpolaren Molekülteilen, meist in Form einer hydrophilen Kopfgruppe und eines lipophilen Restes. Demnach können Lipide ebenfalls mesomorphes Verhalten zeigen.

Small [1968] unterscheidet grob zwischen unpolaren und polaren Lipiden, wobei die unpolaren Lipide, wie z.B. aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe, nicht in der Lage sind, mit Wasser als Bulkphase in Wechselwirkung zu treten. Die polaren Lipide können dagegen je nach Art der Wechselwirkung mit Wasser in drei Klassen unterteilt werden.

Zur Klasse I gehören unlösliche, nichtquellende, amphiphile Lipide, die keine flüssigkristallinen Strukturen ausbilden können, jedoch in der Lage sind, sich an der

Wasseroberfläche in Form eines stabilen monomolekularen Filmes zu verteilen. Die Moleküle sind dabei so angeordnet, daß die hydrophile Kopfgruppe in das Wasser und der lipophile Molekülteil in die Gasphase hineinragt. Zu dieser Gruppe zählen beispielsweise Di- und Triglyceride, langkettige (protonierte) Fettsäuren, langkettige Alkohole und verschiedene Sterole wie Cholesterol, Sitosterol, Vitamin D, Sterolester und einige Hormone.

Klasse II-Lipide sind ebenfalls nicht in Wasser löslich, können allerdings durch Einlagerung von Wasser zwischen den hydrophilen Kopfgruppen quellen und dabei flüssigkristalline Strukturen ausbilden. Voraussetzung dafür ist eine bestimmte kritische Temperatur, bei der die aliphatischen Ketten teilweise flüssig vorliegen müssen. Diese kritische Temperatur, unterhalb der sich die Moleküle im kristallinen Zustand befinden, hängt von der Kettenlänge, dem Sättigungs- und Verzweigungsgrad und von der Substitution des jeweiligen Moleküls ab. Zu den Klasse II-Lipiden werden Bestandteile von Biomembranen und Zellorganellen wie die Phospholipide und Sphingolipide gerechnet aber auch Monoglyceride sowie verschiedene nicht-ionogene Tenside.

Die dritte Klasse der Lipide umfaßt wasserlösliche, amphiphile Lipide und wird nochmals in Klasse IIIA- und Klasse IIIB-Lipide unterteilt.

Klasse IIIA-Lipide bilden mit Wasser konzentrationsabhängig lyotrope flüssigkristalline Phasen und Mizellen aus, während die Klasse IIIB-Lipide in Wasser nur Mizellen bilden können. Der Grund hierfür ist der bei den Klasse IIIB-Lipiden weniger stark ausgeprägte Polaritätsunterschied zwischen dem polaren und unpolaren Teil des Moleküls. Zu den Klasse IIIA-Lipiden werden die Alkalisalze langkettiger Fettsäuren sowie die meisten ionogenen und nicht-ionogenen Tenside gezählt, zu den Klasse IIIB-Lipiden beispielsweise Gallensalze und Saponine.

Insgesamt sind also die Lipide der Klasse II und IIIA in der Lage, lyotrope Mesophasen in Gegenwart von Wasser auszubilden, wobei dies nicht auf wäßrige Systeme beschränkt ist, sondern auch in unpolaren Lösungsmitteln beobachtet wird.

Es können unterschiedliche flüssigkristalline Zustände resultieren, die nach ihrer Periodizität in der Fernordnung der lamellaren, hexagonalen oder kubischen Phase zugeordnet werden (Abb. 2.1.):

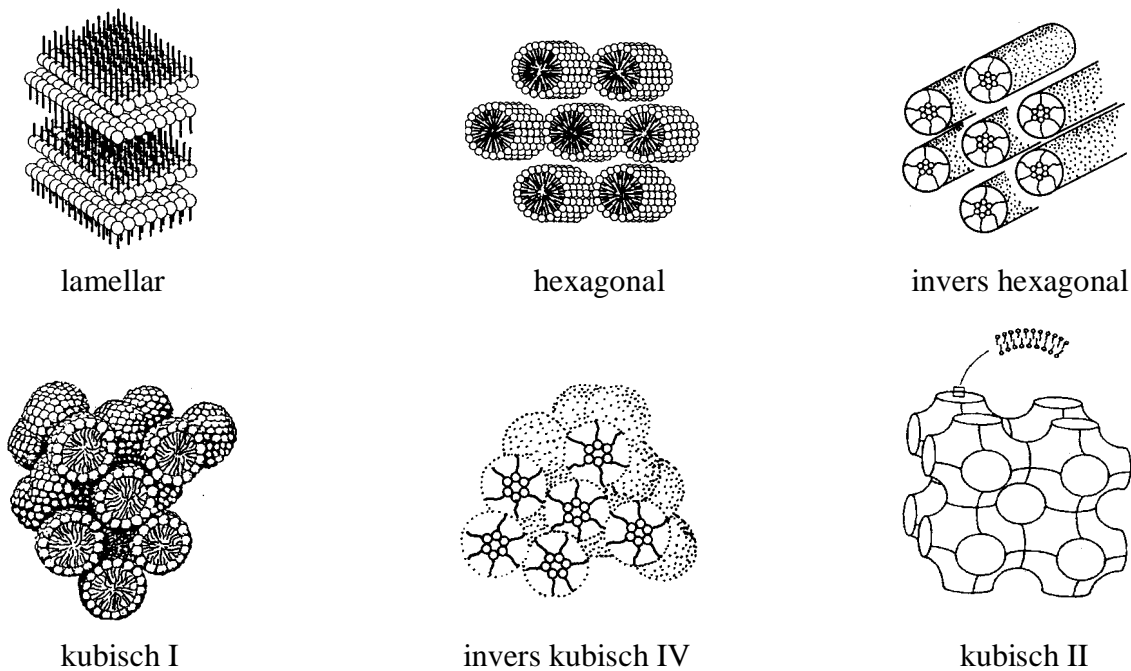


Abbildung 2.1.: Strukturmodelle lyotroper Flüssigkristalle [Müller-Goymann 1999]

- Die Lamellarphase weist eine eindimensionale Periodizität auf. Sie besteht aus übereinander gestapelten Moleküldoppelschichten, wobei innerhalb einer Doppelschicht jeweils die polaren Kopfgruppen und die hydrophilen Bereiche zueinander ausgerichtet sind. Dadurch existieren polare neben unpolaren Schichtebenen, die in der Lage sind, unter Quellung entweder hydrophobe oder hydrophile Stoffe einzulagern.
- Die Hexagonalphase ist durch das Vorliegen von langgestreckten röhrenförmigen Assoziaten, die in einer sechseckigen Anordnung gepackt sind, charakterisiert. In wässrigen Lösungsmitteln sind die hydrophilen Gruppen des Mesogens nach außen, in unpolaren Lösungsmitteln dagegen nach innen gerichtet (inverse Hexagonalphase = H_{II}). Hexagonalphasen besitzen zweidimensionale Periodizität und können lipophile oder hydrophile Stoffe nur in begrenztem Umfang aufnehmen.
- Die kubische Phase ist durch eine dreidimensionale Periodizität gekennzeichnet und besteht aus dicht gepackten, runden bis ellipsoiden Mizellen bzw. inversen Mizellen (inverse kubische Struktur). Neben diesem als diskontinuierliche Phase (kubisch I und IV) bezeichneten Modell existieren bikontinuierliche Phasen (kubisch II und kubisch III), die als Übergangsformen zwischen der Lamellarphase und der Hexagonalphase angesehen werden. Für die Geometrie dieses Systems werden verschiedene Strukturvorstellungen diskutiert. Lindblom et al. [1989] schlagen ein dreidimensionales Netzwerk mit minimierten Flächen vor, Tardieu et al. [1970] beschreiben ein Strukturmodell, das aus einem Netzwerk stäbchenförmiger Assoziante mit eingelagerten Mizellen besteht.

Kubische Flüssigkristalle besitzen aufgrund ihres dreidimensionalen periodischen Aufbaus keine anisotropen Eigenschaften. Sie zeigen oft akustische Resonanzerscheinungen, weshalb sie auch als "ringing gels" bezeichnet werden.

Lamellarphasen lassen sich durch nähere Charakterisierung des Zustandes der Kohlenwasserstoffketten weiter spezifizieren. Alkylketten können im allgemeinen in einer trans- oder gauche-Konformation vorliegen (Abb. 2.2.), wobei die trans-Konformation energetisch begünstigt ist.

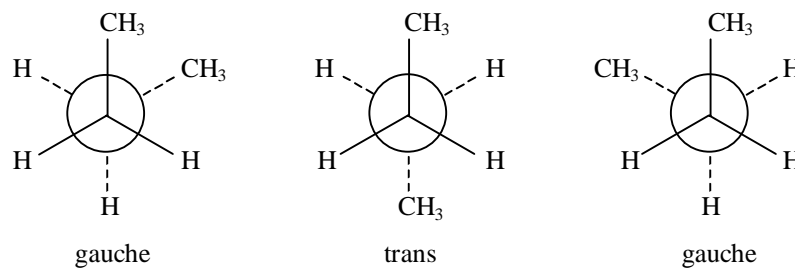


Abbildung 2.2.: Trans- und gauche-Konformation der Alkylketten

Während bei der lamellaren flüssigkristallinen Phase (L_α) die Kohlenstoffketten nicht durchgängig in der trans-Konformation vorliegen, sind sie in der lamellaren Gel-Phase (L_β) all-trans ständig, wodurch eine dichtere Packung und eine höhere Ordnung ermöglicht wird. Sind die Ketten nicht senkrecht zur Lamellarebene sondern geneigt angeordnet, so bezeichnet man die Phase als $L_{\beta'}$. Dieser Zustand resultiert aus einem erhöhten Flächenbedarf der polaren Kopfgruppe gegenüber meist gesättigten Kohlenwasserstoffketten und führt ebenfalls zu einer höheren Packungsdichte. Insgesamt sind die Alkylketten in der L_α -Phase sehr viel beweglicher als in der L_β - und der $L_{\beta'}$ -Phase, so daß im Gegensatz zu den Gel-Phasen nur eine Fernordnung vorliegt.

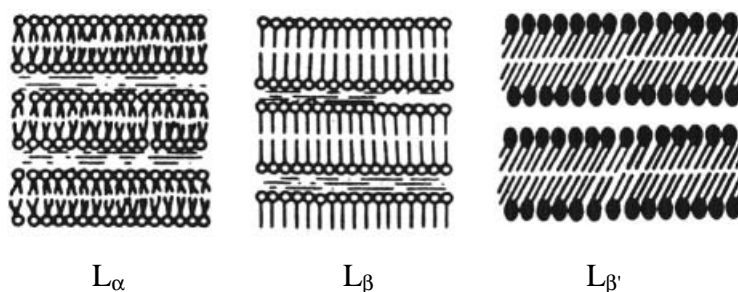


Abbildung 2.3.: Lamellarphasen

Die Ausbildung der unterschiedlichen lyotropen Mesophasen wird besonders von der Molekülgeometrie beeinflusst. Diese läßt sich mit Hilfe des Packungsparameters $P = V/(A \cdot l)$

beschreiben, einer dimensionslosen Größe, die das Verhältnis zwischen Volumen V des lipophilen Restes zur Moleküllänge l und der Querschnittsfläche A der polaren Kopfgruppe in der Grenzfläche ausdrückt [Israelachvili et al. 1977]. Über den Packungsparameter lassen sich Voraussagen über die Art der gebildeten Assoziatform machen. Abb. 2.4. gibt eine Übersicht über Packungsparameter und die möglichen resultierenden Assoziatformen.

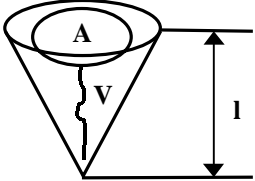
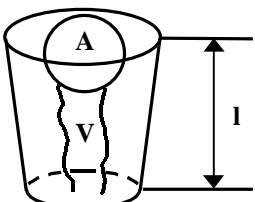
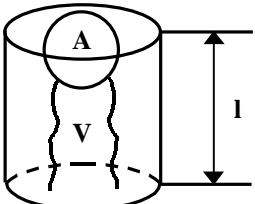
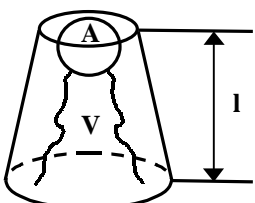
Molekülform	Packungs-Parameter	Resultierende Assoziatform	Amphiphiler Stoff
Kegel 	$< 1/3$	kugelförmige oder ellipsoide Mizellen; kubische Mesophasen	einkettige Lipide mit großer Kopfgruppe
Kegelstumpf 	1/2 bis 1	stäbchenförmige Mizellen; hexagonale Mesophasen; Vesikel	zweikettige Lipide mit großer Kopfgruppe; einkettige Lipide mit kleiner Kopfgruppe
Zylinder 	ca. 1	lamellare Mesophasen	zweikettige Lipide mit kleiner Kopfgruppe
Inverser Kegelstumpf 	> 1	inverse Mizellen invers hexagonale Mesophasen	zweikettige Lipide mit kleiner Kopfgruppe

Abbildung 2.4.: Übersicht über die kritischen Packungsparameter und die resultierenden Assoziatformen, modifiziert nach Silver [1985]

Der Packungsparameter ist seinerseits von verschiedenen physikalischen Parametern wie z.B. dem pH-Wert, der Temperatur, der Ionenstärke sowie von der Art des Lösungsmittels und den Konzentrationsverhältnissen abhängig. Bei Veränderung von ein oder mehreren Parametern können deswegen unterschiedliche Assoziatformen resultieren oder Phasentransformationen stattfinden (Abb. 2.5).

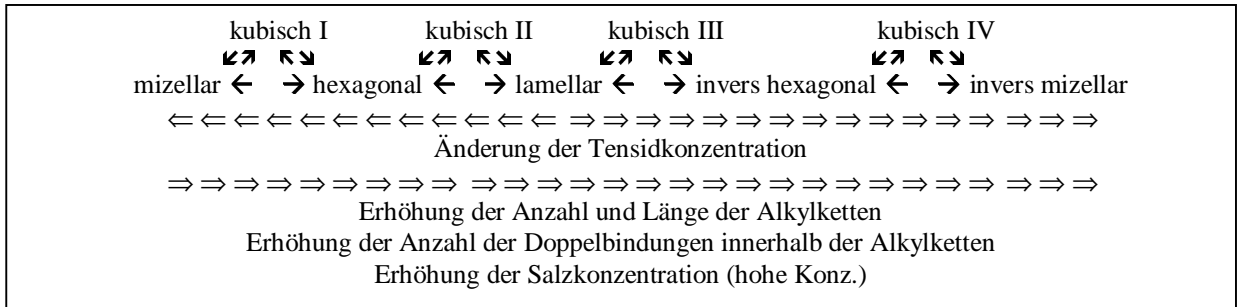


Abbildung 2.5.: Mögliche Phasentransformationen lyotroper Mesophasen nach Tiddy [1980]

Der Temperatureinfluß auf ein mesogenes System ist im allgemeinen schwierig zu beurteilen. Eine Änderung der Temperatur kann sowohl die Querschnittsfläche als auch die Länge der Alkylketten beeinflussen. Mit steigender Temperatur kommt es häufig zu einer trans-gauche Isomerisierung der Alkylketten, was eine Verkürzung der Alkylketten durch einen Knick (first-order kink) mit einer gleichzeitigen Vergrößerung des Packungsparameters zur Folge hat. Allerdings kann bei steigender Temperatur die sterische Abstoßung hydrophiler Kopfgruppen zunehmen, wodurch sich der Packungsparameter wieder verringert. Darüber hinaus überlagern sich bei Lipidmischungen die verschiedenen Parameter in vielfältiger Weise, so daß flüssigkristalline Phasen und Phasenumwandlungen nur experimentell untersucht werden können.

2.1.2 Charakterisierung lyotroper Mesophasen

2.1.2.1 Polarisationsmikroskopie

Die anisotropen Eigenschaften lyotroper Flüssigkristalle äußern sich in einer Doppelbrechung linear polarisierten Lichtes, die im Polarisationsmikroskop zwischen gekreuzten Polarisatoren (Polarisator und Analysator) durch typische Interferenzmuster und -farben (Texturen) erkannt werden können [Rosevear 1954, Brown 1972, Saupe 1977, Demus und Richter 1978]. Hexagonale Strukturen zeigen flächenhafte Texturen, lamellare Systeme dagegen streifige, teilweise vernetzte Texturen, die auch als "oily streaks" bezeichnet werden. Weiterhin sind für Lamellarphasen sogenannte Malteserkreuze als Strukturdefekte mit konzentrischem Aufbau

(confocal domains) beschrieben, die allerdings auch bei in Sphäroliten kristallisiertem Material beobachtet werden können. Eine Unterscheidung ist durch Druck auf das Deckgläschen des Präparates möglich, bei dem sich Sphärolite als diskrete Partikel im Volumen mitbewegen, flüssigkristalline Strukturen aber eine Verformbarkeit zeigen. Die kubische Phase ist, bedingt durch ihren regelmäßigen, in alle Raumrichtungen gleichartigen Bau, optisch isotrop. Desweiteren kann eine flüssigkristalline Probe ebenfalls isotropes Aussehen zeigen, wenn sich die Moleküle aufgrund der polaren Oberflächenbeschaffenheit des Objektträgers so ausrichten, daß das linear polarisierte Licht in Richtung der optischen Achse des Flüssigkristalls einfällt. Durch Scherung kann diese pseudoisotrope Textur reversibel zerstört werden, wobei sich eine charakteristische Mosaiktextur aus Malteserkreuzen bildet. Zusätzlich können mit Hilfe von Temperiereinrichtungen an einem Polarisationsmikroskop thermotrope Umwandlungen wie z.B. der Übergang einer flüssigkristallinen in eine isotrope Phase und umgekehrt verfolgt werden.

2.1.2.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Mit der Transmissionselektronenmikroskopie gefriergebrochener und replizierter Proben kann der kolloidale Aufbau flüssigkristalliner Systeme bis zu einer Auflösungsgrenze von etwa 3-5 nm sichtbar gemacht werden. Dabei wird die Probe unter Erhalt ihrer Mikrostruktur bei niedrigen Temperaturen schockgefroren, im gefrorenen Zustand gebrochen und mit Platin-Kohle unter einem Winkel von 45° bedampft. Zur mechanischen Stabilisierung erfolgt eine weitere Bedampfung mit einer Kohle Schicht. Nach Ablösen der Probenreste und Aufbringen auf entsprechende Träger können die "Probenabdrücke" im Transmissionselektronenmikroskop näher untersucht werden. Lamellare Flüssigkristalle zeigen im elektronenmikroskopischen Bild eine typische Schichtung mit einheitlichen Bruchkanten, während hexagonale Strukturen im Idealfall durch hexagonal angeordnete Röhrenden und terrassenförmige Bruchkanten mit zackigem Aussehen erkennbar sind. Bei kubischen Flüssigkristallen findet man häufig eine Grundstruktur aus dicht gepackten, annähernd kugelförmigen Mizellen [Müller-Goymann 1989].

2.1.2.3 Röntgenbeugung

Grundlage dieser Meßmethode ist die beobachtete Beugung von Röntgenstrahlen beim Durchdringen eines Systems mit geordneten Strukturen. Dabei kommt es zu einer

Intensitätsverstärkung zwischen zwei Strahlen mit gleichem Einfallswinkel θ , wenn diese, nach Reflexion an zwei parallelen Ebenen mit dem Abstand d , in Phase schwingen, also ihr Gangunterschied ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge λ beträgt (Abb. 2.6.). Die Intensitätsverstärkung läßt sich durch die Bragg'sche Reflexionsgleichung $n \cdot \lambda = 2 d \cdot \sin \theta$ beschreiben, wobei der Integer n als Ordnung der Reflexion bezeichnet wird.

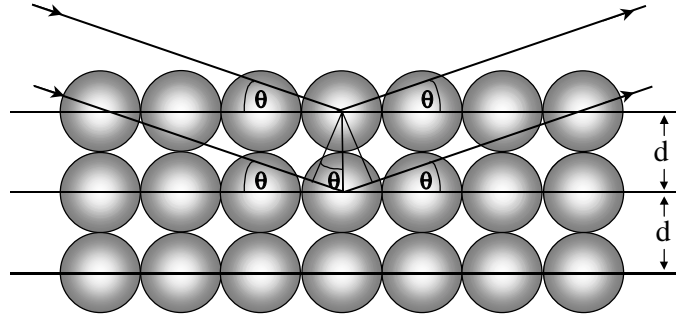


Abbildung 2.6.: Beugung von Röntgenstrahlung an einem Gitter

Durch die auftretenden charakteristischen Interferenzfolgen ist zum einen die Zuordnung zu bestimmten Mesophasen und zum anderen die Berechnung der Abstände zwischen den Molekülen bzw. Molekülebenen möglich. Die Röntgenmessungen können entweder im Kleinwinkelbereich (Beugungswinkel $\theta < 2^\circ$) oder im Weitwinkelbereich (Beugungswinkel $\theta = 2-50^\circ$) durchgeführt werden. Die Zuordnung zu den entsprechenden flüssigkristallinen Systemen erfolgt durch die auftretenden Interferenzfolgen im Kleinwinkelbereich, die verschiedene periodische Abstände aufweisen können. Bei Hexagonalphasen verhalten sich die Beugungsmaxima verschiedener Ordnungen wie $1 : 1/\sqrt{3} : 1/\sqrt{4} : 1/\sqrt{7} : 1/\sqrt{12}$, bei lamellaren Phasen $1 : 1/2 : 1/3 : 1/4 : 1/5$ [Luzatti et al. 1960]. Durch die unterschiedlichen Strukturvorstellungen für die kubische Phase existieren mehrere Möglichkeiten für die Interferenzfolgen:

$$1 : 1/\sqrt{2} : 1/\sqrt{3} : 1/\sqrt{4} : 1/\sqrt{6} : 1/\sqrt{8} \quad [\text{Luzatti et al. 1960}]$$

$$1 : 1/\sqrt{4} : 1/\sqrt{5} : 1/\sqrt{6} : 1/\sqrt{8} : 1/\sqrt{10} \quad [\text{Fontell et al. 1968}]$$

Aus dem ersten Maximum läßt sich nach Bragg zusätzlich der Netzebenenabstand d der jeweiligen flüssigkristallinen Phase im Bereich der Fernordnung und bei Hexagonalphasen zusätzlich der Röhrendurchmesser $a = (2/\sqrt{3}) \cdot d$ der entsprechenden Mesophase ermitteln.

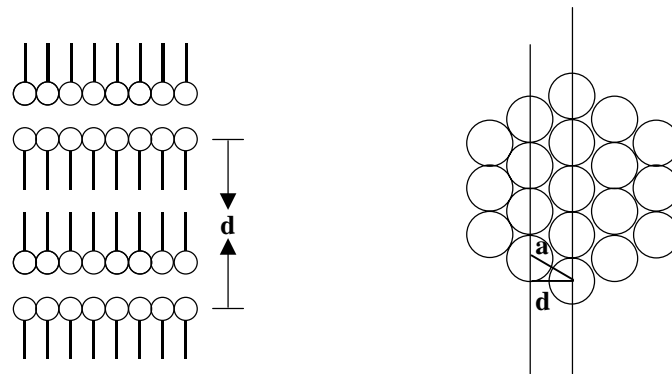


Abbildung 2.7.: Darstellung der Netzebenenabstände lamellarer und hexagonaler Mesophasen
[Usselman 1986]

Durch Messungen im Weitwinkelbereich (Beugungswinkel $\theta > 2^\circ$) werden d-Werte im Bereich der Nahordnung erfaßt. Darüberhinaus kann ein Verlust der Nahordnung anhand des Fehlens von Interferenzen bzw. eine Veränderung des Interferenzmusters gegenüber dem kristallinen Zustand überprüft werden.

2.1.2.4 Kalorimetrie

Mit Hilfe der dynamischen Differenzkalorimetrie (differential scanning calorimetry = DSC) lassen sich temperaturinduzierte Phasenumwandlungen von Systemen, die mit einer Änderung des Energieinhalts verbunden sind, verfolgen. Dabei wird im allgemeinen die Temperatur und die Enthalpie eines endo- oder exothermen Phasenübergangs, der in Form eines Peaks auftritt, bestimmt. Als charakteristische Temperatur für auftretende Phasenübergänge wird im allgemeinen die extrapolierte Anfangstemperatur T_e (onset) angegeben, da diese am wenigsten von Probenparametern wie Masse und Dicke abhängig ist. Ist die Bestimmung des onsets aufgrund einer un stetigen Basislinie nicht möglich, so kann die Peakmaximumtemperatur zur Charakterisierung herangezogen werden, wobei bei vergleichenden Messungen auf ähnliche Probeneinwaagen geachtet werden muß. Die Enthalpie des Phasenübergangs wird durch Integration der Peakfläche erhalten.

Im Unterschied zur Umwandlung kristallin \rightarrow amorph weisen Phasenumwandlungen kristallin \rightarrow flüssigkristallin bzw. flüssigkristallin \rightarrow amorph sowie die Umwandlungen zwischen verschiedenen flüssigkristallinen Zuständen meist nur geringe Übergangsenthalpien auf. Eine Änderung des Ordnungszustandes innerhalb eines kristallinen bzw. flüssigkristallinen Systems macht sich häufig durch eine Verschiebung der charakteristischen Übergangstemperatur sowie durch eine Veränderung der Peakenthalpie bemerkbar.

2.2 Die Haut

2.2.1 Funktionen der Haut

Die Haut ist mit einer Fläche von fast 2 m² und einer Masse von ca. 4 kg beim erwachsenen Menschen das größte Organ des menschlichen Körpers und bildet die Barriere zwischen der Umwelt und dem inneren Milieu des Organismus. Sie schützt gegen chemische, physikalische und mechanische Schädigungen und vor dem Eindringen von Mikroorganismen. Sie verhindert ein zu starkes Austrocknen des Körpers, läßt aber eine physiologische Wasserverdunstung zu (perspiratio insensibilis). Weiterhin wirkt sie über eine Verengung oder Erweiterung der Hautgefäße sowie durch die Schweißsekretion als Wärmeregulator des menschlichen Körpers. Daneben vermittelt die Haut als wichtiges Sinnesorgan mit Hilfe spezifischer Rezeptoren Druck-, Temperatur- und Schmerzreize und spielt ebenso eine wesentliche Rolle bei zahlreichen immunologischen Prozessen sowie im intermediären Stoffwechsel.

2.2.2 Allgemeiner anatomischer Aufbau der Haut

Die menschliche Haut gliedert sich in die Epidermis (Oberhaut), Dermis (Korium, Lederhaut) und die Subcutis (Unterhaut) (Abb. 2.8.).

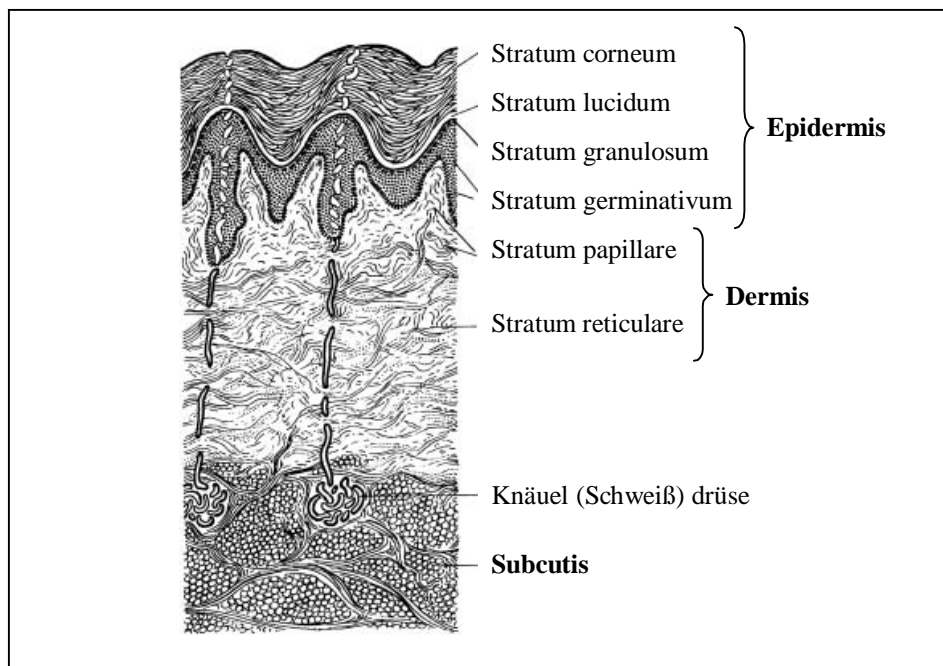


Abbildung 2.8.: Querschnitt durch die menschliche Haut [nach Junqueira und Carneiro 1991]

Die Subcutis ist ein läppchenartig aufgebautes Fettgewebe mit bindegewebigen Septen als Träger der Gefäß- und Nervenversorgung und dient im wesentlichen als Kälteschutz, Energiereserve und Druckpolster. Sie verbindet die Haut locker mit darunterliegenden Strukturen wie z.B. Knochenhaut und Muskulatur und kann in Abhängigkeit vom Ernährungszustand und der Lokalisation unterschiedliche Dicken aufweisen. An die Subcutis schließt sich die Dermis als Stütz- und Bindegewebe von hoher mechanischer Festigkeit an.

Die Dermis wird in das Stratum reticulare und das Stratum papillare unterteilt, wobei sich die beiden Schichten durch Dichte und Anordnung ihrer Bindegewebsfasern unterscheiden. In der Dermis sind als Zelltyp Fibroblasten enthalten, die in eine Matrix aus Strukturproteinen wie Kollagen, Elastin und einer amorphen Grundsubstanz aus wasserbindenden Mucopolysacchariden eingebettet sind. Desweiteren finden sich hier Zellen der Immunabwehr (Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und Mastzellen) sowie Nervenbahnen und Hautanhangsgebilde (Schweiß- und Talgdrüsen, Haarwurzeln, Haarkanäle). Die Dermis ist gefäßreich und versorgt die gefäßlose Epidermis durch Diffusion über eine Basallamina mit Nährstoffen, wobei durch kegelförmige Papillen des Stratum papillare die Kontaktfläche zwischen Dermis und Epidermis vergrößert und die Ernährung der Epidermis verbessert wird.

2.2.2.1 Aufbau der Epidermis

Die Epidermis variiert in ihrer Dicke zwischen 40 µm an den Augenlidern und 1,5 mm an Handflächen und Fußsohlen. Sie besteht aus einem verhornten Plattenepithel, das mehrere deutlich unterscheidbare Schichten erkennen läßt: Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum (Abb. 2.9.). Das Stratum basale (Basalzellschicht) und das Stratum spinosum (Stachelzellschicht) werden auch als Stratum germinativum (Keimzellschicht) zusammengefaßt. Zusätzlich findet man an stark beanspruchten Stellen zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum als Übergangszellschicht das Stratum lucidum (Glanzschicht).

Insgesamt überwiegen in der Epidermis die Zellen, die im Laufe der Zeit keratinisieren - die Keratinozyten - und durch deren Differenzierungsstadien während ihrer Wanderung von der Basalschicht zur Oberfläche die unterschiedlichen Schichten gekennzeichnet sind.

Daneben kommen im basalen Bereich der Epidermis Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen als nicht-keratinisierende Zellarten vor (ca. 15%).

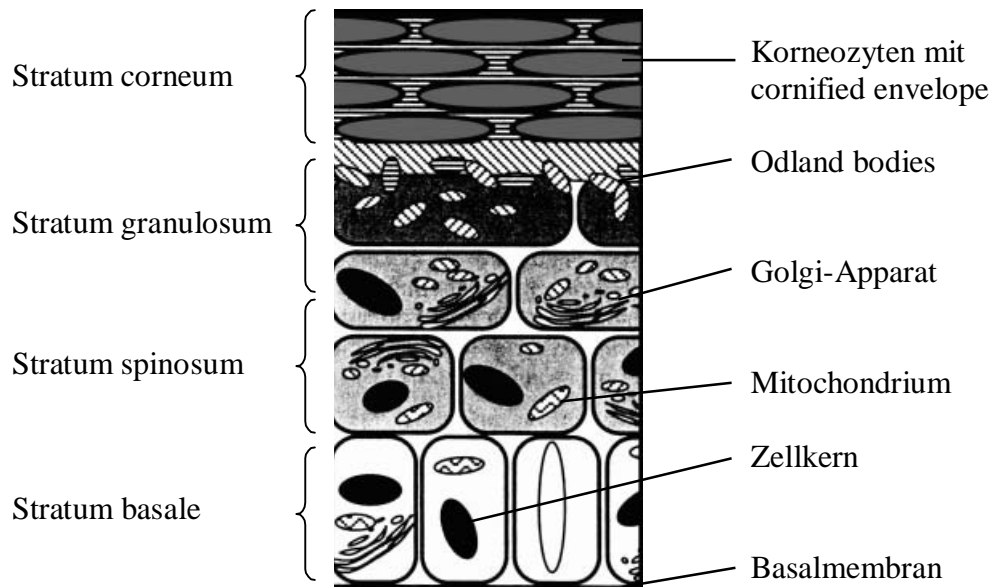


Abbildung 2.9.: Schematischer Aufbau der Epidermis nach Schürer [1998]

Die Melanozyten bilden das Pigment Melanin, das intrazellulär in spezifischen Organellen gespeichert wird und dem Schutz des Organismus vor UV-Strahlung dient. Langerhans-Zellen befinden sich vorwiegend im tieferen Stratum spinosum und besitzen als immunkompetente Zellen Makrophagen-Funktion. Bei den Merkel-Zellen handelt es sich um langsam adaptierende Mechanorezeptoren, die einzeln oder als Aggregat im Stratum basale liegen und an der verdickten Basis mit Nervenendigungen verbunden sind.

Während des epidermalen Differenzierungsprozesses, der insgesamt ca. 28-30 Tage dauert, erfahren die Keratinozyten eine drastische morphologische und histochemische Veränderung, indem sich die mitotisch aktiven Zellen der Basalzellschicht zu toten kernlosen, verhornten Korneozyten, die an der Oberfläche abgeschuppt werden, umwandeln. Im Stratum basale besitzen die Keratinozyten eine kubische bis hochzylindrische Form, deren Längsachse senkrecht zur Hautoberfläche steht. In den Zellen sind neben synthetisierenden Organellen intermediäre Filamente - die Keratine - enthalten. Es handelt sich dabei um bewegliche Filamente α -helikaler Polypeptide, die die Haut insbesondere gegen Schereinflüsse stabilisieren. Bündelartig zusammengefaßt werden sie auch als Tonofibrillen bezeichnet. Lateral und apikal weisen die basalen Keratinozyten zahlreiche Desmosomen zur Verknüpfung mit den Nachbarzellen auf. Das Stratum spinosum besteht aus 2-5 Lagen polygonaler, leicht abgeflachter Zellen, die durch viele Zytoplasmaausläufer mit Desmosomen und daran befestigten Tonofibrillen gekennzeichnet sind, die den Zellen ein stachelartiges Aussehen geben. In den oberen Schichten des Stratum spinosum sind außerdem

bereits membranumschlossene Lamellengranula mit einem Durchmesser von 0,1-0,3 μm zu finden. Diese sogenannten Odland bodies [Odland 1960] oder auch "membrane coated granules" (MCB) werden im Golgi-Apparat gebildet und enthalten hydrolytische Enzyme, Glycoproteine und bestimmte Lipide [Elias 1981]. Die Lipide sind innerhalb dieser Granula in einer membranähnlichen kontinuierlichen Doppelschicht in Form von abgeflachten Vesikeln übereinandergestapelt und spielen eine Rolle bei der späteren Bildung der Permeabilitätsbarriere des Stratum corneum [Landmann 1991].

Das Stratum granulosum (Körnerzellschicht) wird von den Keratinozyten während ihrer transepithelialen Wanderung nach durchschnittlich 10-14 Tagen erreicht. Die Zellen sind abgeflacht und bilden in der Regel 1-5 Schichten. Sie enthalten viele stark verdichtete, starre Tonofibrillen und membranlose Keratohyalingranula, die die Zellen ganz ausfüllen können. Das Keratohyalin besteht aus einer Mischung verschiedener Proteine, unter denen das histidinreiche Profillagrin besonders gut charakterisiert ist [Fritsch 1990]. Es zerfällt im oberen Stratum granulosum in das hochreaktive Fillagrin, das eine irreversible Aggregation und Polymerisation der Tonofibrillen auslöst und diese durch Disulfidbrücken vernetzt, was zur Bildung des typischen Keratinnetzes führt. Die Keratinozyten verhornen dabei zu stoffwechsellinaktiven Korneozyten, bei denen gleichzeitig die Zellorganellen durch lysosomale Enzyme aufgelöst werden. Weiterhin wird der Inhalt der Odland bodies durch Exozytose in den Interzellularraum freigesetzt und bildet dort eine kontinuierliche Lipidmatrix aus [Landmann 1991].

2.2.2.2 Das Stratum corneum

2.2.2.2.1 Struktur des Stratum corneum

Endprodukt der epidermalen Differenzierung ist das etwa 10-20 μm dicke Stratum corneum (Hornschicht). Es besteht aus ca. 15-20 Lagen stark abgeflachter Korneozyten, die eine hexagonale Form mit einer Länge von 35-45 μm und einer Dicke von 0,5-1,5 μm aufweisen [Mackenzie 1973, Plewig et al. 1970] und die in eine Lipidmatrix geordneter Struktur eingebettet sind. Im Inneren der Korneozyten befindet sich quervernetztes Keratin eingelagert in eine amorphe Grundsubstanz aus cystin- und prolinreichen Proteinen [Fritsch 1990]. Anstelle der üblichen Plasmamembran werden die Korneozyten nach außen hin durch eine 7 bis 15 nm dicke Hornhülle, den "cornified envelope", abgegrenzt. Sie besteht unter anderem aus durch Transaminasen vernetzten glutaminreichen Proteinen wie dem Involucrin [Simon et al. 1984] und dem Keratolinin [Fritsch 1990], an die kovalent Lipide gebunden sind

[Schwarzendruber et al. 1987], und stellt den chemisch widerstandsfähigsten Teil der Korneozyten dar. Histologisch gesehen sind die Zellen des Stratum corneum nicht identisch, weshalb die unteren 5 bis 6 Schichten häufig als Stratum compactum und die oberflächlichen Zellagen als Stratum disjunctum bezeichnet werden. Im Stratum disjunctum nimmt die Zahl der Desmosomen ab, wodurch der Zusammenhalt der Zellen geringer wird und die oberen Zellen leicht abgelöst werden können. Isoliertes Stratum compactum erwies sich dagegen als nahezu unempfindlich gegen eine Behandlung mit Enzymen, 6M Harnstoff und verschiedenen organischen Lösungsmitteln [Bowser et al. 1985]. Betrachtet man den Wassergehalt des Stratum corneum, so liegt dieser zwischen 10 und 40% [Warner et al. 1988], wobei ein Gradient von innen nach außen herrscht. Die innerste Zellschicht des Stratum corneum steht mit der hohen Feuchte der Zellen des Stratum granulosum, die bis zu 70% betragen kann, im Gleichgewicht, die äußerste Schicht dagegen mit der meist trockeneren Umgebungsluft. Dieser Konzentrationsgradient führt zu einer kontinuierlichen Wasserabgabe an die Umgebung (ca. 300 ml/Tag), die auch als transepidermaler Wasserverlust bezeichnet wird (transepidermal water loss = TEWL). Für den pH-Wert im Stratum corneum wird ebenfalls ein Gradient beschrieben, wobei er an der Oberfläche des Stratum corneum zwischen 4,5 und 5,5 liegt, im Inneren kontinuierlich ansteigt und in den untersten Schichten einen Wert von etwa pH 7 erreicht, welches dem pH-Wert in der lebenden Epidermis entspricht [Öhman und Vahlquist 1994, Turner et al. 1998].

2.2.2.2 Barrierefunktion der Stratum corneum Lipide

Die Struktur des Stratum corneum wird häufig mit einem Backstein-Mörtel System verglichen, dem sogenannten "mortar-brick model" [Elias 1983], bei dem die Korneozyten als Backsteine für die chemische und mechanische Stabilität der Haut zuständig sind und der interzellulären Lipidmatrix, dem Mörtel, die eigentliche Barrierefunktion hinsichtlich Wasserhomöostase und dem Eindringen fremder Substanzen zugeschrieben wird.

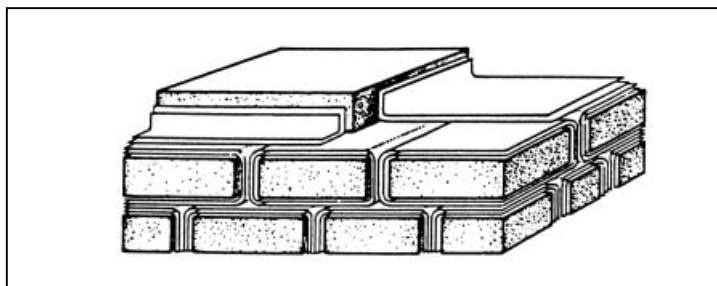


Abbildung 2.10.: Modellhafte Vorstellung des Stratum corneum nach Landmann [1991]

Die interzelluläre Lipidmatrix besitzt hydrophoben Charakter und ist nahezu wasserundurchlässig, wobei die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Lipide wichtig ist und erheblich durch Nahrungsfaktoren beeinflusst wird. So führt beispielsweise ein Mangel an essentiellen Fettsäuren wie der Linolsäure (essential fatty acid deficiency = EFAD), die auch Bestandteil der Stratum corneum Lipide ist, zu einer starken Zunahme der Permeabilität des Stratum corneum mit einer 5- bis 8-fachen Erhöhung des TEWL und einer fehlerhaften Differenzierung der Korneozyten [Lowe et al. 1977, Elias et al. 1980]. Eine topische und systemische Supplementierung der fehlenden Fettsäure resultierte in einer Verbesserung der Hautsymptome [Prottey et al. 1975, Hansen et al. 1985]. Für einige humane Hautkrankheiten werden ebenfalls Störungen im Lipidstoffwechsel der Haut als Ursache postuliert. Paige et al. [1994] konnten zeigen, daß bei verschiedenen Formen der Ichthyose ein Mangel an bestimmten Acylceramidfraktionen zu erkennen ist, und Motta et al. [1994] beobachteten eine Veränderung in der Verteilung der Ceramide bei psoriatischen Patienten. Desweiteren führt eine Entfernung der Hautlipide durch Extraktion mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln ebenfalls zu einer Erhöhung der Permeabilität des Stratum corneum mit einem deutlichen Anstieg des TEWL [Smith et al. 1982]. Durch diese und zahlreiche andere Untersuchungen wurde somit die Bedeutung der interzellulären Lipide für die Barriereigenschaften der Haut eindeutig belegt.

2.2.2.3 Lipidzusammensetzung des Stratum corneum

Die Lipide im Interzellularraum machen etwa 10-30% des Gesamtvolumens bzw. 10-15% der Gesamtmasse des Stratum corneum aus [Grayson et al. 1982]. Die Bildung beginnt bereits im Stratum spinosum und im Stratum granulosum mit dem vermehrten Auftreten der Odland bodies, die im Inneren hauptsächlich aus übereinandergestapelten, abgeflachten, unilamellaren Lipidvesikeln bestehen. Kurz vor der terminalen Differenzierung der Epidermis verschmilzt die Membran der Lamellengranula mit der Zellmembran und die Lipidvesikel werden in den Interzellularraum der Grenzschicht zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum exozytiert. Dort ordnen sie sich parallel zur Zellmembran der verhornten Zellen an, wobei sie durch Schrumpfung der Korneozyten während der Verhornung näher aneinander rücken und schließlich zu kontinuierlichen Lipidlamellen verschmelzen, die ein multilamellares System aus Lipiddoppelschichten bilden [Landmann 1986]. Während des Zelldifferenzierungsprozesses verändert sich die Lipidzusammensetzung der Epidermis grundlegend (Tab. 2.11.). Hauptbestandteile der Lipide des Stratum basale sind

Phospholipide, freie Fettsäuren, Cholesterol, Cholesterolderivate, Triglyceride und Glucosylceramide bzw. Ceramide.

Lipidklasse	Stratum basale	Stratum granulosum	Stratum corneum		
			[Lampe 1983]	[Elias 1990]	[Wertz 1996]
1. Polare Lipide					
Phospholipide	44,5	25,3	4,9	Spuren	-
Cholesterolsulfat	2,4	5,5	1,5	4,0	-
2. Neutrale Lipide					
Cholesterol	11,2	11,5	14,0	20,0	25,0
Freie Fettsäuren	7,0	9,2	19,3	25,0	10,0-15,0
Triglyceride	12,4	24,7	25,2	Spuren	Spuren
Sterole und Wachsester	5,3	4,7	5,4	5,0	5,0
Squalen	4,9	4,6	4,8	4,0	-
n-Alkane	3,9	3,8	6,1	4,0	-
3. Sphingolipide					
Glucosylceramide	3,5	5,8	Spuren	-	-
Ceramide	3,8	11,7	18,1	35,0	50,0

Tabelle 2.11.: Lipidzusammensetzung (% m/m) der lebenden Epidermis [Lampe et al. 1983] und von verschiedenen Autoren angegebene Zusammensetzung für die Stratum corneum Lipide

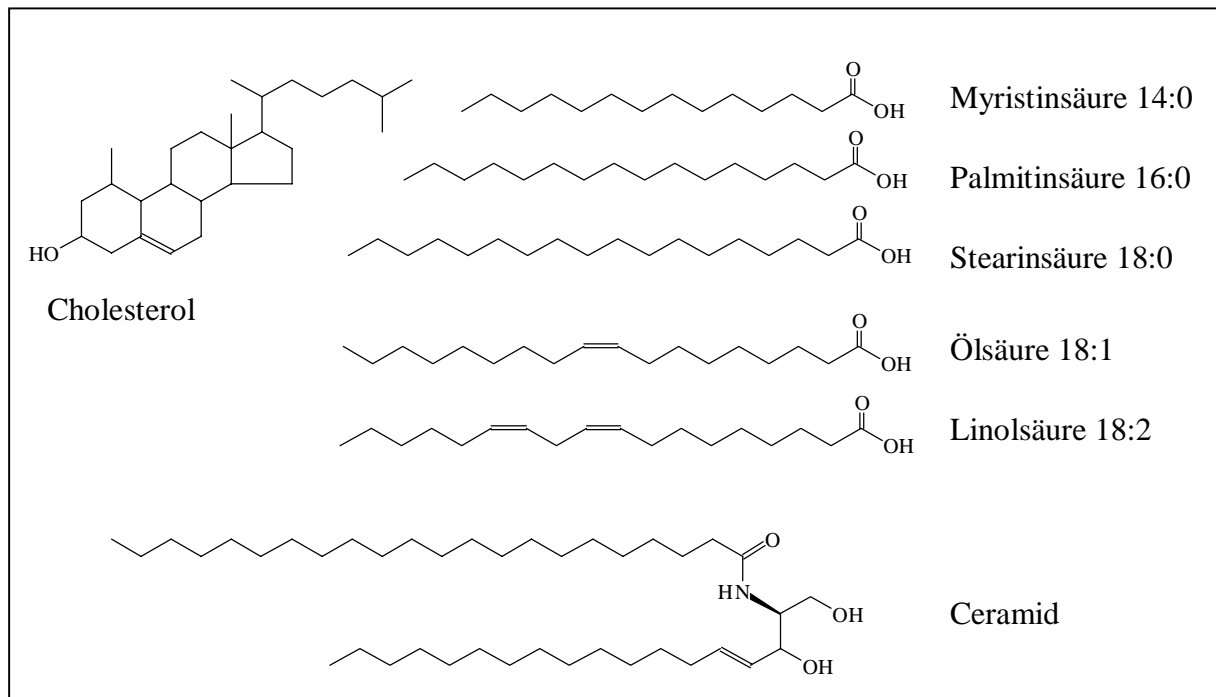


Abbildung 2.12.: Molekülstruktur der wichtigsten Stratum corneum Lipide

Letztere werden der Gruppe der Sphingolipide zugeordnet. Daneben findet man geringe Mengen Wachsester, Squalen und n-Alkane. Mit fortschreitender Differenzierung nach außen nimmt der Gehalt an Ceramiden und Glucosylceramiden zu. Schließlich werden die Phospholipide nahezu vollständig katabolisiert und die Glucosylceramide deglucosyliert [Yardley et al. 1981, Wertz et al. 1989c]. Die Lipide im Stratum corneum setzen sich dann hauptsächlich aus Ceramiden, Cholesterol, Cholesterolestern und freien Fettsäuren zusammen (Abb. 2.12.).

Die prozentuellen Angaben für die einzelnen Lipide im Stratum corneum sind je nach Autor sehr unterschiedlich (Tab. 2.11.), was auf die Verwendung unterschiedlicher Extraktionsmethoden und Extraktionsmittel zurückgeführt werden kann. Für den schwankenden Gehalt an Triglyceriden macht man zum einen eine Kontamination der Haut mit Talgdrüsenlipiden und zum anderen die Mitextraktion subcutanen Fettgewebes bei der Verwendung exzidierte Haut verantwortlich [Elias et al. 1983, Wertz et al. 1987b]. Die Hauptursache der Variabilität der Lipidzusammensetzung ist jedoch, daß die Lipide sowohl einer interindividuellen Schwankung unterworfen sind als auch eine Abhängigkeit von der jeweiligen untersuchten Körperregion aufweisen [Lampe et al. 1983].

Betrachtet man die sehr heterogene Zusammensetzung der Stratum corneum Lipide, so ist diese im Vergleich zu Biomembranen des menschlichen Körpers sehr ungewöhnlich, da Phospholipide als Bilayer bildende Komponente nur in Spuren zu detektieren sind. Der Cholesterolanteil dagegen steigt bis zum Stratum corneum an und ist mit 20-25% größer als in jeder anderen Membran. Zu finden sind neben dem freien Cholesterol auch Cholesterolester, wobei besonders das bei Raumtemperatur flüssige Cholesterololeat während der Differenzierung akkumuliert [Wertz et al. 1987b]. Das in geringen Mengen vorkommende Cholesterolsulfat wird meistens zu den polaren Lipiden gezählt und erreicht die höchste Konzentration in der Schicht zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum, bevor es anschließend enzymabhängig desulfatiert wird [Elias 1983]. Im Stratum corneum selbst existiert ein Konzentrationsgradient an Cholesterolsulfat mit abnehmenden Mengen in den äußeren Zellschichten und im abgeschuppten Material, weshalb ihm eine Funktion bei der Modulation des Desquamationsprozesses und der Cholesterolsynthese in der Epidermis in Form eines Rückkopplungsmechanismus zugeschrieben wird [Williams 1992].

Triglyceride spielen bei den Stratum corneum Lipiden nur eine untergeordnete Rolle. Dagegen kommen meist freie Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 14-28 Kohlenstoffatomen vor, wobei nach Lampe et al. [1983] gesättigte C₁₆- und ungesättigte C₁₈-Fettsäuren dominieren (Tab. 2.13.).

Fettsäure	C-Atome : Doppelbindungen	Menge [%]
Myristinsäure	14:0	3,8
Palmitinsäure	16:0	36,8
Palmitoleinsäure	16:1	3,6
Stearinsäure	18:0	9,9
Ölsäure	18:1	33,1
Linolsäure	18:2	12,5
Arachinsäure	20:0	0,3

Tabelle 2.13.: Fettsäurezusammensetzung (% m/m) des Stratum corneum (Bauch) [Lampe et al. 1983]

Sphingolipide bilden mit bis zu 50% den größten Anteil der Stratum corneum Lipide. Diese leiten sich vom Sphingamin (D-Erythro 2-Aminooctadecan-1,3-diol) bzw. vom Sphingosin (D-Erythro 2-Aminoocta-4-decen-1,3-diol) und Phytosphingosin (D-Erythro 2-Aminoocta-4-decen-1,3,4-triol) als langkettige Base ab und enthalten eine Fettsäure in Amidbindung. Durch Verknüpfung der primären OH-Gruppe mit einem Glucose-Molekül entstehen Glucosylceramide (Cerebroside), die bevorzugt in den unteren Epidermisschichten als Bestandteile der Lamellengranula auftreten. Das ungewöhnlichste dieser Gruppe ist das Glucosylceramid A oder auch Acylglucosylceramid genannt. Es besteht aus einer langkettigen ω -Hydroxyfettsäure in Amidbindung mit einer Sphingosinbase, wobei die OH-Gruppe der ω -Hydroxyfettsäure wiederum mit einer Fettsäure, der ungesättigten Linolsäure, verknüpft ist. Die ω -Hydroxyfettsäure ist mit einer durchschnittlichen Kettenlänge von 30 bis 34 C-Atomen fast zweimal so lang wie die üblich vorkommenden Fettsäuren der membranbildenden Phospholipide. Die Anwesenheit des Acylglucosylceramids führt zur Abflachung und Stapelung der lamellaren Vesikel in den Lamellengranula [Wertz et al. 1982]. Weiterhin wird für dieses Molekül eine mögliche Rolle als Precursor bei der Bildung der kovalent gebundenen Lipide des cornified envelope diskutiert [Wertz et al. 1987a]. Aus den Glucosylceramiden entstehen dann nach Exozytose der Lamellengranula durch Einwirkung von extrazellulären Enzymen die Ceramide.

Die Stratum corneum Ceramide stellen eine sehr heterogene Mischung dar, die aus mindestens 6 verschiedenen Klassen bestehen, die sich zum einen durch die verschiedenen Sphingosinbasen und zum anderen durch die Art der mit der Kopfgruppe des Sphingosinderivates verknüpften Fettsäure unterscheiden. Abb. 2.14. zeigt repräsentative Strukturen der Ceramide und die gefundenen relativen Anteile (% m/m) im Stratum corneum

[Wertz et al. 1992], wobei diesen in Abhängigkeit ihrer Polarität Nummern zugeordnet wurden.

Das am wenigsten polare Ceramid ist das aus dem Acylglucosylceramid entstandene Ceramid 1, dessen langkettige ω -Hydroxyfettsäure zu 80% mit Linolsäure verestert ist. In Ceramid 2 sind bevorzugt gesättigte Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 24, 26 und 28 C-Atomen enthalten, die an Sphingosin oder Dihydrosphingosin gebunden sind. Ceramid 3 enthält die gleichen Fettsäuretypen, allerdings in Amidbindung mit Phytosphingosin als langkettige Base. Bei Ceramid 4 und 5 sind dagegen α -Hydroxyfettsäuren mit Sphingosin bzw. Dihydrosphingosin verknüpft, wobei bei Ceramid 4 die Fettsäuren aus 24 bis 28 C-Atomen bestehen und bei Ceramid 5 hauptsächlich α -Hydroxypalmitinsäure gefunden wurde. Das polarste Ceramid 6 enthält schließlich α -Hydroxyfettsäuren verknüpft mit Phytosphingosin. Zusätzlich zu den hier aufgeführten Strukturen besteht die Ceramid 6 Klasse aus einem geringen Anteil einer Komponente, die eine veresterte ω -Hydroxyfettsäure enthält [Wertz und Downing 1989c].

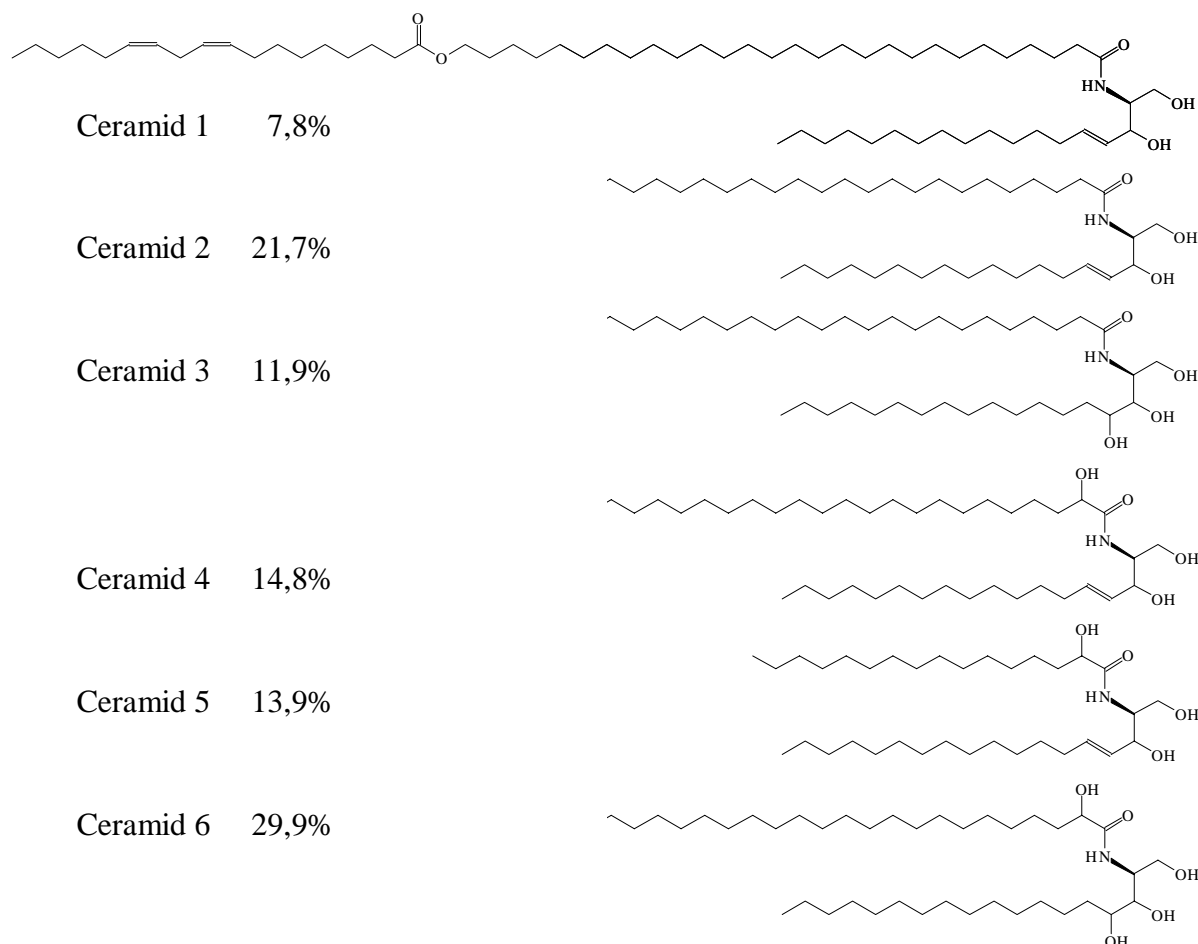


Abbildung 2.14.: Struktur der im humanen Stratum corneum vorkommenden Ceramidtypen

Rieger [1996] berechnete beispielhaft, daß allein Ceramid 2 durch eine Kombination verschieden langkettiger Sphingosinbasen und Fettsäuren aus einer Mischung von 250 unterschiedlichen Komponenten bestehen kann und machte so die große Variabilität der Gruppe der Ceramide deutlich.

Zusätzlich zu den bereits genannten Lipiden findet man in Stratum corneum ω -Hydroxyceramide, die die Außenseite des cornified envelope in Form eines Monolayers umhüllen [Wertz et al. 1987]. Dabei werden diese über eine Esterbindung des Proteinanteiles des cornified envelopes sowohl zur Hälfte mit der ω -Hydroxylgruppe der Fettsäure als auch mit einer Hydroxylfunktion des Sphingosins kovalent gebunden [Wertz et al. 1989]. Durch Radiomarkierungsstudien konnte die Herkunft dieses Hydroxyceramids als Abbauprodukt des Acylglucosylceramides belegt werden [Hedberg et al. 1988]. Im Gegensatz zu den anderen Lipiden des Stratum corneum sind die Lipide des cornified envelope durch organische Lösungsmittel nicht extrahierbar.

Der Vollständigkeit halber soll an dieser Stelle kurz auf die Lipide eingegangen werden, die sich auf der Oberfläche der Haut befinden und Bestandteile des sogenannten Hydrolipidfilmes der Haut sind. Sie bestehen u.a. aus Squalen, Wachsestern, Triglyceriden, Cholesterol und Cholesterolestern und werden hauptsächlich von den Schweiß- und Talgdrüsen sezerniert [Nicolaidis et al. 1968]. Auf der Oberfläche der Haut erfolgt dann eine teilweise Spaltung der Triglyceride durch bakterielle Lipasen in Mono- und Diglyceride und freie Fettsäuren, wodurch der pH-Wert auf Werte zwischen 5,5-6,5 absinkt. Der Hydrolipidfilm, der außerdem noch verschiedene hydrophile Substanzen wie organische Carbonsäuren, Aminosäuren und Salze enthält, besitzt eine gewisse antimikrobielle Schutzwirkung ("Säureschutzmantel") und hält die Haut geschmeidig, hat aber kaum Einfluß auf die Barrierefunktion, da nach einer Entfernung der Oberflächenlipide kein Anstieg des TEWL, als Maß für die Permeabilität der Haut, resultiert [Rougier et al. 1987].

2.2.2.2.4 Mikrostruktur der Stratum corneum Lipide

Trotz des Fehlens der Phospholipide als physiologische Lipide der Biomembranen sind sämtliche Lipide des Stratum corneum in der Lage, ein hochgeordnetes multilamellares System zu bilden, das den Raum zwischen den Kerneozyten vollständig ausfüllt. Für die Fusion der Doppelschichten der von den Odland bodies exozytierten Lipid-Scheibchen scheint die Anwesenheit von Cholesterolsulfat und freien Fettsäuren notwendig zu sein. Zusätzlich findet sich im Interzellularraum zwischen Stratum granulosum und Stratum

corneum eine höhere Konzentration an Calciumionen als intrazellulär. Wahrscheinlich verbindet ein divalentes Calciumion zwei negativ geladene Fettsäuren bzw. Cholesterolsulfatmoleküle, die sich in einander gegenüberliegenden Doppelschichten befinden und stellt so den engen Kontakt der Doppelschichten als Voraussetzung für die Fusion her [Landmann 1991]. Unterstützt wird diese Annahme anhand von Studien mit Liposomen bestehend aus Stratum corneum Lipiden, bei denen durch Zugabe kleiner Mengen von Calciumionen die unilamellaren Vesikel zu multilamellaren Doppelschichtsystemen transformierten [Abraham 1987]. Eine Voraussetzung für die Stabilität des phospholipidfreien multilamellaren Systems im Stratum corneum ist das Vorhandensein der Ceramide. Diese sind zwar wegen des Fehlens einer geladenen Kopfgruppe weniger polar als die Phospholipide aber in Anwesenheit von freien Fettsäuren und Cholesterol in der Lage, stabile Bilayer zu bilden, die jedoch hinsichtlich der Fluidität nicht mit anderen Biomembranen des Körpers vergleichbar sind. Mit Ausnahme des linolreichen Acylceramids (Ceramid 1), sind die Kohlenwasserstoffketten hauptsächlich gesättigt und kommen in einer geraden all-trans Konformation vor. Sie stabilisieren insgesamt die Doppelschicht durch laterale H-Brücken der OH-Gruppen und versteifen so die äußere Zone der Doppelschicht [Pascher 1976]. Durch die unterschiedlichen Kettenlängen kommt es zu einem Ineinandergreifen der Ketten im zentralen Teil des Bilayers mit einer ebenfalls resultierenden Stabilisierung. Weiterhin enthalten die Ceramide 2 bis 6 keine Methyl-Seitenketten oder cis-Doppelbindungen und die trans-Doppelbindung der Sphingosinbasen stört nicht die Kettenanordnung. Das wichtigste Ceramid ist allerdings das als Acylceramid bezeichnete Ceramid 1, dessen Funktion innerhalb der Doppelschicht häufig mit einer molekularen Niete verglichen wird. Man nimmt an, daß die ω -Hydroxyfettsäure dieses Ceramides einen Bilayer komplett durchspannt, während die Linolsäurekette in die angrenzende Doppelschicht ragt und beide Bilayer aneinander heftet [Wertz 1992]. Der hohe Cholesterolanteil führt ebenfalls zu einer Stabilisierung des Systems, da es benachbarte Fettsäureketten in eine regelmäßige Anordnung zwingt und somit die Ordnung erhöht. Die Rolle der Fettsäuren in dem System wird unterschiedlich diskutiert. Gesättigte Fettsäuren besitzen keine rotierenden Knicke und erhöhen die molekulare Ordnung der Doppelschicht, wobei das Auftreten von Lücken seltener wird. Ungesättigte Fettsäuren dagegen bewirken eine laterale Aufweitung der Lamelle, was zum einen eine gewisse Fluidität des Bilayers erhalten würde und zum anderen die Löslichkeit von Cholesterol innerhalb des Bilayers erhöhen könnte [Bouwstra et al. 1996].

Abb. 2.15. gibt die postulierte Anordnung der einzelnen Bestandteile innerhalb der Lipidlamellen wieder. Dabei bilden Ceramide, Cholesterol und freie Fettsäuren das

Grundgerüst, wobei die polaren Kopfgruppen einer Schicht an die polaren Gruppen der anderen Schicht grenzen. Die unpolaren Kohlenwasserstoffketten zeigen in die jeweils entgegengesetzte Richtung und treffen sich in der Mitte des Bilayers, wobei die unterschiedlich langen Ketten der Ceramide ineinandergreifen und die Bilayer durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen seitlich stabilisieren. Unpolare Bestandteile wie Wachse oder Kohlenwasserstoffe werden bevorzugt in die unpolaren Bereiche zwischen den Kohlenwasserstoffketten eingebaut, polare Bestandteile wie Wasser dagegen im Bereich der polaren Kopfgruppen. Das Acylceramid ragt durch die ganze hydrophobe Region des Bilayers und mit der Linolsäurekette in den angrenzenden Bilayer hinein und stabilisiert so das gesamte multilamellare System.

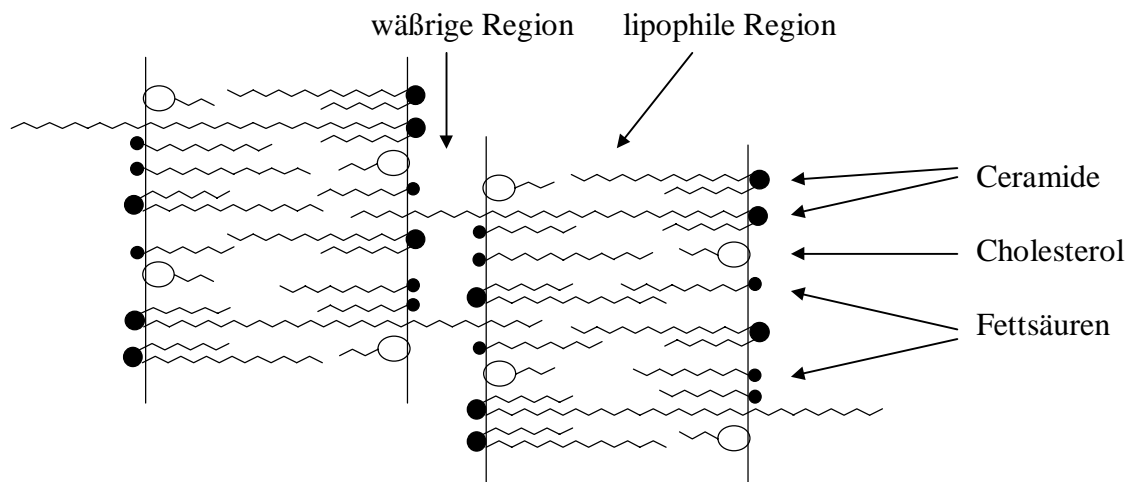


Abbildung 2.15.: Vereinfachte Darstellung der möglichen Anordnung der einzelnen Lipidkomponenten innerhalb des Bilayers

2.2.2.2.5 Physikochemische Eigenschaften des Stratum corneum und der Stratum corneum Lipide

In den letzten Jahren wurde die Organisation des Stratum corneum und insbesondere der Stratum corneum Lipide mit vielfältigen Methoden untersucht. So konnten mittels Rutheniumtetroxid (RuO_4) Fixierung die interzellulären Lipidlamellen bis in die obersten Schichten des Stratum corneum elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht werden [Swartzendruber et al. 1987, Madison et al. 1987]. Diese treten in der Regel als Bilayer Paare auf und erscheinen im elektronenmikroskopischen Bild in Form von alternierenden dunklen und hellen Banden unterschiedlicher Dicke, hervorgerufen durch elektronendurchlässige und weniger durchlässige Zonen. Die Anzahl der Bilayer zwischen den Zellen kann dabei regional variieren und wird mit bis zu 12 Bilayerschichten angegeben [Elias et al. 1977, Swartzendruber et al. 1989], wobei in einigen Bereichen des Stratum corneum diese

Bilayerstrukturen ganz fehlen. Interpretiert wird dies mit einem direkten Kontakt der Korneozyten über die Lipide des cornified envelope, wodurch der Zusammenhalt der Zellen innerhalb des Stratum corneum verstärkt werden soll [Wertz et al. 1989b]. Desweiteren sind im unterem Stratum corneum (Stratum compactum) Unterbrechungen der Lipidschichten durch Desmosomen zusammen mit amorphem Material zu erkennen, im oberen Stratum corneum (Stratum disjunctum) ist dagegen häufig eine Aufweitung durch Desmosomenreste sichtbar [Hou et al. 1991].

Röntgenkleinwinkel- und -weitwinkeluntersuchungen an exzidiertem humanen Stratum corneum bestätigten das Vorliegen der lamellaren Strukturen und der geordneten Bereiche innerhalb der Stratum corneum Lipide. Der interlamellare Abstand, ermittelt durch Röntgenkleinwinkelbeugung, wird dabei von verschiedenen Autoren zwischen 4,5 nm und 7 nm angegeben [Friberg et al. 1985a, Garson et al. 1991, Bouwstra et al. 1991a]. Bouwstra [1997] weist auf eine weitere, jeweils zwei Bilayer umfassende, detektierte "repeating unit" mit einem Netzebenenabstand von etwa 13 nm hin, was durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen verschiedener Gruppen unterstützt wird [White et al. 1988, Hou et al. 1991, Swartzendruber et al. 1992]. Röntgenweitwinkelmessungen zur Bestimmung der Nahordnung der Moleküle zeigten in mehreren Untersuchungen scharfe Interferenzen im Bereich zwischen 0,412-0,417 nm und 0,371-0,378 nm [Bouwstra et al. 1992 und 1997, Cornwell et al. 1994, Garson et al. 1991]. Beide Interferenzen sind charakteristisch für kristalline Lipide, deren Alkylketten in einer orthorhombischen, senkrechten Anordnung vorliegen, während die Interferenz zwischen 0,412-0,417 nm ebenso auf die gleichzeitige Existenz einer Gel-Phase mit einer hexagonalen lateralen Anordnung hinweist. Da die detektierten Interferenzringe Anisotropie zeigten, wird eine bevorzugte Orientierung der Lamellen parallel zur Stratum corneum Oberfläche angenommen. Bei der Interferenz im Bereich von 0,412-0,417 nm scheint eine Beteiligung der gebundenen Lipide des cornified envelope möglich, da diese auch in abgeschwächter Form nach Lipidextraktion mit Chloroform/Methanol vorhanden ist. Desweiteren treten häufig breite Interferenzen bei 0,96 nm und 0,46 nm auf, die auf die Anwesenheit von Keratin in den Korneozyten zurückgeführt werden [Garson et al. 1990, Bouwstra et al. 1992]. Bouwstra et al. [1992, 1997] beschreiben zusätzliche Interferenzen von kristallin vorliegendem Cholesterol im Bereich zwischen 0,485 nm und 0,571 nm und schlagen vor, daß dieses in Form von phasenseparierten Cholesterolkristallen interkalierend in den Lamellen lokalisiert ist. Das gleichzeitige Vorliegen einer hexagonalen neben einer orthorhombischen Packung der Lipide konnte durch FTIR-Messungen bestätigt werden, da bei Hauttemperatur sowohl die dichter gepackte trans- als auch die beweglicheren gauche-

Konformere vorhanden waren [Ongpipattanakul et al. 1994]. Bemerkenswert ist, daß bei unterschiedlichem Hydratationsgrad des Stratum corneum sowohl die interlamellaren Abstände als auch die laterale Packung der Lipide unbeeinflußt blieben [Mak et al. 1991, Cornwell et al. 1994, Bouwstra 1997] also keine Quellung der Lamellen zu beobachten war. Röntgenmessungen bei unterschiedlichen Temperaturen zeigten das Verschwinden der orthorhombischen Struktur entsprechenden Interferenz bei 0,371-0,378 nm bei etwa 40°C, wobei die Interferenz bei 0,412-0,417 nm weiterhin sichtbar war [Wilkes et al. 1973, Bouwstra et al. 1991b] Eine mögliche Erklärung dafür ist die Umwandlung der orthorhombischen in eine hexagonale laterale Packung der Lipide. Wahrscheinlich findet dies ohne Veränderung des Neigungswinkels der Kohlenwasserstoffketten in Bezug auf die Netzebenen statt, da keine Veränderung der interlamellaren Netzebenenabstände auftrat [Bouwstra et al. 1992]. Zwischen 60°C und 75°C verschwanden die Interferenzen der Lamellarstruktur, wobei die Interferenzen bei 0,412-0,147 nm trotz verringerter Intensität weiterhin vorlagen und erst bei 90°C nicht mehr nachweisbar waren. Die Nahordnung der Lipide scheint somit im Gegensatz zur Fernordnung über einen größeren Temperaturbereich beständig zu sein. Die dem Cholesterol zugeordneten Interferenzen verschwanden zwischen 90°C und 95°C, während die dem Keratin zugehörigen Reflexe über den gesamten Temperaturbereich erhalten blieben und auch nach Denaturierung der Proteine detektierbar waren.

Differentialthermoanalytische Messungen (DSC) von humanem Stratum corneum bestätigen die einzelnen spezifischen Phasenübergänge der Lipide. Abb. 2.16. zeigt ein typisches Thermogramm für humanes Stratum corneum im Temperaturbereich zwischen 0° und 130°C. Hierbei können insgesamt bis zu vier endotherme Übergänge, abhängig vom Spender und der Körperregion sowie vom Wassergehalt der Stratum corneum Probe, auftreten.

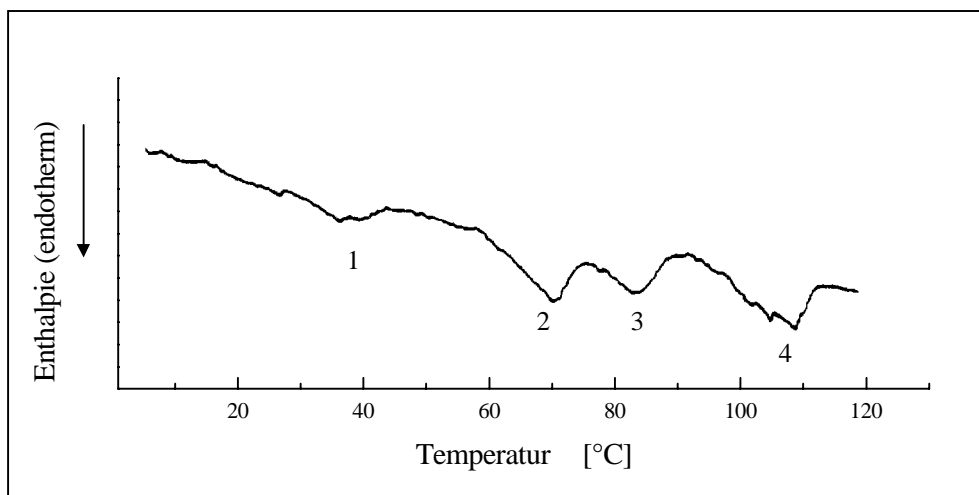


Abbildung 2.16.: DSC-Thermogramm für humanes Stratum corneum [Bouwstra et al. 1991b]

Dem Peak zwischen 30°C und 40°C wird in Übereinstimmung mit den beschriebenen Röntgendaten die Umwandlung der lateralen orthorhombischen Anordnung in eine hexagonale Packung zugeordnet [Bouwstra et al. 1991b]. Aufgrund der sehr geringen Übergangsenthalpie ist dieser Peak nicht immer detektierbar. Die im allgemeinen gut zu detektierenden Peaks bei 70°C und 80°C werden auf die Umwandlungen von Lipiden zurückgeführt, wobei man bei 70°C entweder eine allgemeine Unordnung innerhalb der Lamellen oder eine Umwandlung der lateral hexagonalen Packung der Lipide in den flüssigen Zustand diskutiert. Dem Peak bei 80°C wird eine Beteiligung der an die Proteine des cornified envelope assoziierten Lipide zugeschrieben, da dieser auch nach Lipidextraktion vorhanden ist, während die ersten beiden im Thermogramm fehlen. Der letzte Peak bei 105°C wird schließlich auf die Denaturierung der Proteinstrukturen innerhalb der Korneozyten zurückgeführt, wobei dieser nur bei einem Wassergehalt des Stratum corneum über 20% zu finden ist [van Duzee et al. 1975, Knutson et al. 1985, Golden et al. 1986, Bouwstra et al. 1991b]. Insgesamt beobachtet man bei wiederholter thermischer Untersuchung der gleichen Stratum corneum Probe das Verschwinden dieses Proteinpeaks, während die ersten beiden reversibel sind und der bei 80°C liegende Peak nach Denaturierung des Proteinanteils mit dem zweiten Übergang zusammenfällt [van Duzee et al. 1975]. Eine Veränderung des Thermogramms in Abhängigkeit vom Wassergehalt wird auch für die ersten drei Peaks beschrieben. So liegt der 1. Peak im trockenen Stratum corneum bei ca. 43°C und wird bei zunehmendem Hydratationsgrad des Stratum corneum zu niedrigeren Temperaturen verschoben, bis bei Wassergehalten über 20% ein konstanter Wert von ca. 35°C erreicht wird [van Duzee 1975, Gay et al. 1994]. Den gleichen Effekt zeigen die beiden Peaks bei 70°C und 80°C, deren Übergangstemperaturen bei gleichzeitiger Erhöhung der Peakschärfe mit zunehmenden Hydratationsgrad um 5-10°C niedriger werden und ab etwa 30% konstant bleiben [Knutson et al. 1985, Gay et al. 1994]. Diese Veränderungen weisen auf eine gewisse Fluidisierung der Lipide durch Wasser hin, bei denen die hydrophoben Bereiche in einem weniger geordneten Zustand vorliegen. Die Beobachtungen stehen im Widerspruch zu den Röntgenmessungen bei verschiedenen Hydratationsgraden, bei denen keine Veränderungen der Netzebenenabstände nachgewiesen wurden. Interpretiert wird dieses Phänomen durch eine laterale Quellung der Lipide, die durch Vergrößerung der interfazialen Oberfläche hervorgerufen wird [Bouwstra et al. 1991b]. Dadurch kommt es bei Einlagerung des Wassers im Bereich der Kopfgruppen zu einer gleichzeitigen Verkürzung der Alkylketten, wodurch sich die Netzebenenabstände insgesamt nicht verändern. Eine andere Erklärung lieferten van Hal et al. [1996], nachdem elektronenmikroskopische Studien von Gefrierbrüchen an

hydratisiertem Stratum corneum das Wasser in getrennten Domänen zwischen den Zellen eingelagert zeigt. Daraus folgerte man, daß Wasser zum einen von den Korneozyten absorbiert wird und zum anderen als Bulkwasser vorliegt.

Neben den bisher beschriebenen Peaks entdeckten Gay et al. [1994] in einigen Fällen einen bisher noch nicht beobachteten, thermisch reversiblen endothermen Übergang bei 55°C, der durch FTIR Messungen bei der gleichen Temperatur bestätigt werden konnte. Man vermutet in diesem Bereich einen Verlust des orthorhombischen Gitters in bestimmten Lipiduntereinheiten der Stratum corneum Lipide. Desweiteren kann man bei Messungen unterhalb 0°C einen zusätzlichen Peak bei -9°C nachweisen, der wahrscheinlich durch niedrig schmelzende Lipidkomponenten wie Öl- und Linolsäure hervorgerufen wird [Tanojo et al. 1994]. Untersucht man mittels DSC die Stratum corneum Lipide, die durch Extraktion mit einer Chloroform/Methanol (2:1, v/v) Mischung erhalten werden, so ist nur ein einziger endothermer Peak vorhanden (Abb. 2.17.), der auch bei nachfolgenden Messungen detektiert werden kann [Golden et al. 1986]. Das Thermogramm dieser Mischung zeigt wieder eine Abhängigkeit vom Wassergehalt, wobei die Übergangstemperatur durch Zunahme des Wassergehaltes zu niedrigeren Temperaturen verschoben wird und ab einem Hydratationsgrad von über 30 % einen konstanten Wert von 65°C erreicht.

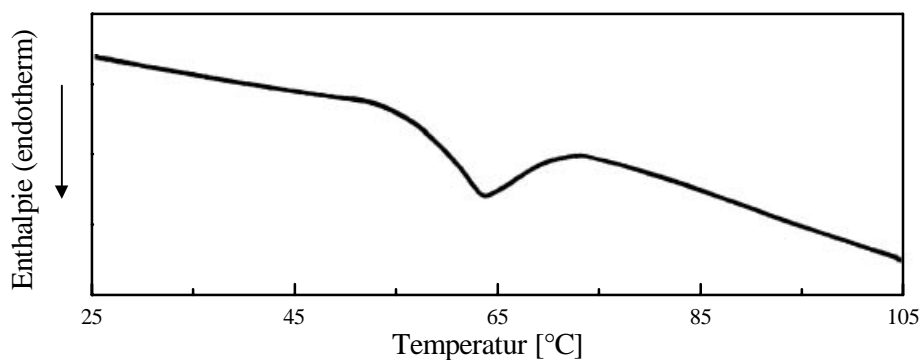


Abbildung 2.17.: DSC-Thermogramm extrahierter Stratum corneum Lipide, modifiziert nach Golden et al. [1986]

2.3 Stratum corneum Lipide als Permeationswege für Arzneistoffe

Wirkstoffe, die auf die Haut appliziert werden, sollen entweder lokal dermal in der Haut oder transdermal, d.h. systemisch, wirken.

Das Stratum corneum stellt die Hauptbarriere für die transdermale Aufnahme topisch applizierter Arzneistoffe dar, wobei diese durch passive Diffusion entlang eines Konzentrationsgefälles das Stratum corneum überwinden können [Scheuplein et al. 1971]. Hierbei erfolgt die Diffusion entweder transzellulär abwechselnd durch die Korneozyten und die multilamellare Lipidmatrix oder nur interzellulär durch die Lipidmatrix unter Umgehung der Korneozyten [Elias 1981] (Abb. 2.18.). Da die Hautanhangsgebilde wie Haarfollikel, Schweiß- und Talgdrüsen beim Menschen nur ca. 0,1% der Hautoberfläche ausmachen, wird dem transfollikulären bzw. transglandulären Weg nur eine geringe Bedeutung bei der Hautpermeation von Arzneistoffen beigemessen. Er scheint nur eine gewisse Rolle bei der Aufnahme von großen polaren oder ionischen Molekülen und bei kurzen Diffusionszeiten zu spielen [Grimnes 1984, Loth 1986, Barry 1987].

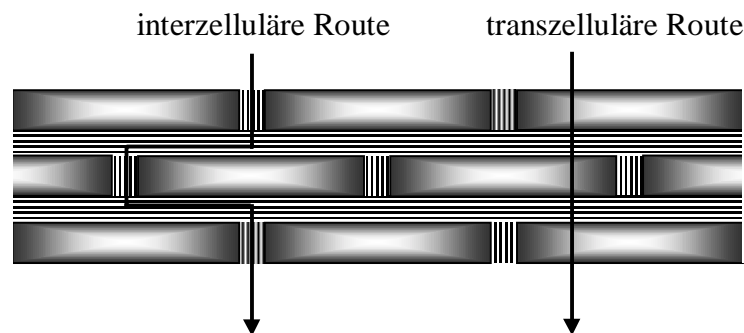


Abbildung 2.18.: Schematische Darstellung der Permeationswege durch das Stratum corneum

Verschiedene Untersuchungen belegen, daß die interzelluläre Route durch die Lipidmatrix für Arzneistoffe von größerer Bedeutung ist. So steigt nach Extraktion der Lipide mit Lösungsmitteln die Permeabilität des Stratum corneum, während keratolytische Reagentien nur einen geringen Effekt haben [Maltotsy et al. 1968, Sweeney und Downing 1970, Harada 1992, Lieckfeld et al. 1994]. Weiterhin konnte durch optische Methoden das Diffusionsverhalten von verschiedenen Substanzen durch die multilamellaren Strukturen sichtbar gemacht werden [de Haan et al. 1989, Boddé et al. 1991, Simonetti et al. 1995].

Innerhalb der Lipidlamellen kann die Diffusion, in Abhängigkeit von den physikochemischen Eigenschaften des Arzneistoffes, entweder durch die polaren Regionen entlang der hydrophilen Kopfgruppen oder durch die lipophilen Bereiche des Bilayers stattfinden. Dabei spielt zum einen die Molekülgröße und das chemische Potential des Arzneistoffes und zum

anderen der Verteilungskoeffizient zwischen den Grenzphasen, häufig durch den Öl/Wasser Verteilungskoeffizienten ausgedrückt, eine Rolle. Wirkstoffe mit einem Verteilungskoeffizienten von etwa 1 werden als günstig für die transdermale Applikation angesehen [Landmann 1991], womit die Zahl der topisch applizierbaren Wirkstoffe begrenzt ist. Zu den transdermal anwendbaren Arzneistoffen gehören verschiedene Steroide wie Estradiol, nichtsteroidale Antirheumatika (Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen), Nitroglycerin, Scopolamin, Nicotin und Fentanyl als Opioid-Analgetikum. Nach Überwindung des Stratum corneum diffundiert der Arzneistoff durch die lebenden Schichten der Epidermis und erreicht in der Dermis das Gefäßsystem, wo durch Abtransport des Arzneistoffes mit dem Blut der Konzentrationsgradient aufrechterhalten wird (perfect sink). Für besonders lipophile Arzneistoffe wird eine Depotbildung in den unteren Schichten des Stratum corneum beschrieben, da sie in der hydrophilen lebenden Epidermis nur eine geringe Löslichkeit besitzen [Wichers 1989]. Neben den Eigenschaften des Arzneistoffes beeinflussen physiologische Faktoren wie Hautzustand, Applikationsort und Alter und vor allem die Wahl des Vehikels das Ausmaß der Wirkstoffpermeation durch die Haut [Maibach et al. 1971, Ziegenmeyer 1986, Bonina et al. 1993].

2.3.1 Wechselwirkungen zwischen topisch applizierten Stoffen und dem Stratum corneum

Topisch applizierte Stoffe und Vehikel können die Struktur des Stratum corneum und der Stratum corneum Lipide und damit die Barrierefunktion der Haut reversibel oder irreversibel verändern. Im Interzellulärraum sind, abhängig von den physikochemischen Eigenschaften applizierter Moleküle, unterschiedliche Wechselwirkungen mit den Stratum corneum Lipiden möglich:

- Interaktion mit den polaren Kopfgruppen der Lipide (polare Moleküle)
- Einbau in die lipophilen Bereiche der Bilayer (unpolare Moleküle)
- Wechselwirkungen sowohl mit den polaren Kopfgruppen als auch mit den lipophilen Resten der verschiedenen Lipide (amphiphile Moleküle)

Bei den Korneozyten können Wechselwirkungen mit den geringen lipophilen Anteilen der Zellen und den Proteinen der Korneozyten stattfinden und so zu einer Schwächung der Bindungskräfte und Änderung der Helixkonformationen mit resultierender Porenbildung führen. Weiterhin kann durch topisch applizierte Stoffe eine Extraktion von Lipiden und

Proteinen stattfinden, wodurch die Porosität des Stratum corneum erhöht wird [Friend et al. 1988]. Kommt es durch die beschriebenen Wechselwirkungen mit den Stratum corneum Bestandteilen zu einer Steigerung der Permeabilität für andere Stoffe, so spricht man von einer Permeationsförderung durch sogenannte Enhancer, die insbesondere bei der transdermalen Anwendung von solchen Arzneistoffen erwünscht ist, die das Stratum corneum nicht oder nur in geringem Ausmaß penetrieren können. Die Permeabilitätssteigerung innerhalb der Bilayer kann folgendermaßen erklärt werden:

Polare Enhancer wie z.B. Wasser oder Dimethylsulfoxid (DMSO) beeinflussen durch Interaktionen im Bereich der Kopfgruppen der Lipide deren Hydratationssphäre, wodurch die Verringerung intermolekularer Kräfte und somit eine Änderung der Packungsordnung auf polarer Ebene resultiert und gleichzeitig das Volumen von chemisch nicht gebundenem Wasser zwischen den Bilayerschichten erhöht wird. Dadurch wird die Diffusion von polaren Molekülen erleichtert. Weiterhin kann durch Interaktionen mit den Kopfgruppen eine Erhöhung des Packungsparameters die Folge sein, wodurch sich der laterale Abstand zwischen den Lipiden vergrößert und die lipophilen Reste insgesamt eine höhere Beweglichkeit besitzen. Durch die Fluidisierung der Lipide wird der Diffusionswiderstand für unpolare Moleküle innerhalb der lipophilen Bereiche des Bilayers gesenkt [Montes et al. 1967, Barry 1987, 1988, 1991, Kalbitz et al. 1996].

Lipophile Enhancer wie Azone[®] [Beastall et al. 1988, Engblom und Engstrom, 1993], Terpene [Cornwell et al. 1994] oder Fettsäuren [Golden et al. 1987, Aungst et al. 1986] können bevorzugt mit den lipophilen Resten der Stratum corneum Lipide interagieren und verursachen ebenfalls eine Fluidisierung mit einer resultierenden Störung der Packungsordnung, wodurch die Diffusion unpolarer Moleküle gefördert wird.

Viele Enhancer verändern durch mehrere Wirkmechanismen die Mikrostruktur des Stratum corneum. So zeigt beispielsweise DMSO zusätzlich Interaktionen mit den Korneozytenbestandteilen (Barry 1993) und verbessert die Löslichkeit von Arzneistoffen innerhalb der multilamellaren Matrix [Barry 1987, 1991, Walker und Smith 1996]. Permeationsverbessernde Lösemitteleffekte werden ebenfalls für Ethanol und andere Alkohole beschrieben [Barry, 1991, Berner und Liu 1995].

Neben den in der Literatur beschriebenen klassischen Enhancern konnte sowohl für verschiedene topisch applizierte Arzneistoffe als auch für Vehikelbestandteile eine Permeabilitätssteigerung des Stratum corneum nachgewiesen werden [Wilisch 1993, Kriwet 1995]. Stoye [1997] konnte außerdem zeigen, daß die Mikrostruktur des Vehikels eine große Rolle für die Arzneistoffaufnahme spielen kann. Ein ternäres mischmizellares System

bestehend aus Ibuprofen-Lysinat, Phospholipiden und Wasser führte im Gegensatz zu einem liposomalen System identischer Zusammensetzung zu einer Extraktion von Stratum corneum Lipiden und bewirkte außerdem eine deutliche Permeationsbeschleunigung für den Arzneistoff.

Über den Einfluß sogenannter Retarder oder Reducer, die in der Lage sind, durch Erhöhung der Ordnung innerhalb der Bilayer die Hornschichtpermeabilität zu verringern, sind in der Literatur nur wenige Angaben zu finden. Durch deren Einsatz wäre es beispielsweise möglich, dermal angewandte Wirkstoffe in der Haut anzureichern und systemische Nebenwirkungen durch transdermale Absorption zu reduzieren.

2.4 Modell Lipid Systeme als in vitro Modelle für Stratum corneum Lipide

Da die Zusammensetzung der Stratum corneum Lipide nicht vergleichbar mit anderen Biomembranen ist, wurden häufig Untersuchungen über das Phasenverhalten und die mögliche Anordnung der einzelnen Komponenten in den Bilayern anhand von Modell Lipid Mischungen durchgeführt. Friberg et al. [1985b] stellten fest, daß Ceramide als Hauptbestandteil der Stratum corneum Lipide mit Wasser allein keine lamellaren Strukturen ausbilden können. Es wurde gezeigt, daß das Phasenverhalten einer aus repräsentativen Stratum corneum Lipiden bestehenden Modellmischung vor allem vom pH-Wert der Mischung beeinflußt wird, da diese nur in Gegenwart von Wasser lamellare flüssigkristalline Strukturen bildet, wenn ein Teil der Fettsäuren als korrespondierende Seife vorliegt. Weiterhin wurden die Einflüsse der einzelnen Stratum corneum Lipide auf die Mikrostruktur eines Grundsystems aus einer Mischung von ungesättigten, teilweise verseiften Fettsäuren in Abhängigkeit des Wassergehaltes untersucht [Friberg et al. 1988]. Die Struktur dieses Fettsäure-Seifen Systems wurde als rein lamellar beschrieben, wobei sich der interlamellare Netzebenenabstand sowohl durch Zusatz der einzelnen Lipidkomponenten als auch durch Wasserzusatz erhöhte und bei der Komplettmischung im Bereich von Literaturdaten für exzidiertes Stratum corneum lag. Friberg et al. [1990] wiesen zusätzlich auf den Einfluß der ungesättigten Fettsäuren hin, die die Kristallisation einzelner Lipidfraktionen verhindern sollen, so daß der flüssigkristalline Zustand und damit die Barrierefunktion der Stratum corneum Lipide aufrechterhalten wird.

Um die Rolle der freien Fettsäuren auf die Struktur der Stratum corneum Lipide näher zu untersuchen und die Wechselwirkungen der Lipidmatrix mit anderen Einflußfaktoren genau zu beschreiben, stellte Häusler [1994] vereinfachte Modellsysteme für Stratum corneum

Lipide unter besonderer Berücksichtigung der ungesättigten Fettsäuren her, wobei wiederum im Hinblick auf den pH innerhalb des Stratum corneum ein Teil der Fettsäuren neutralisiert wurde. Dabei erwies sich die entsprechende Grundmischung aus ungesättigten Fettsäuren abweichend zu den Ergebnissen von Friberg als Mehrphasensystem, bestehend aus einer invers hexagonalen und einer lamellaren flüssigkristallinen Phase, die über eine Intermediärstruktur ineinander umgewandelt werden können. Unterstützt wird diese Beobachtung von Schückler und Lee [1992], die bei vergleichbaren Modellmischungen ebenfalls zwei Phasen detektierten, wobei die Grundmischung aus Fettsäuren hauptsächlich aus invers hexagonalen Strukturen bestand. Der Grundmischung aus ungesättigten Fettsäuren setzte Häusler jeweils gesättigte Fettsäuren, Cholesterol und Ceramide hinzu und beobachtete nur in der kompletten Lipidmatrix aus sämtlichen Bestandteilen ein einphasiges lamellares flüssigkristallines System, das auch über weite Bereiche unterschiedlicher Wassergehalte erhalten blieb. Häusler untersuchte anschließend den Einfluß des Modellarzneistoffes Fenoprofen in Form der freien Säure und des Natrium Salzes sowohl auf das Phasenverhalten der Grundmischung aus ungesättigten Fettsäuren als auch auf die Komplettmischung. Da dieser Arzneistoff auch topisch appliziert wird und von Wilisch [1993] Interaktionen mit den Lipiden von exzidiertem Stratum corneum nachgewiesen wurden, waren entsprechende Wechselwirkungen mit den ausgesuchten Modellsystemen zu erwarten. Es konnte eine Solubilisation des Arzneistoffes in den flüssigkristallinen Strukturen beobachtet werden, wobei die Fenopropensäure bei der Grundmischung zu einer Stabilisierung des invers hexagonalen Systemes führte, das Natriumsalz dagegen eher die Ausbildung einer lamellaren Struktur begünstigte. Bei der Komplettmischung war bei Zusatz höherer Fenopropensäure bzw. -natriumkonzentrationen keine Transformation des lamellaren Flüssigkristalls, dagegen aber eine Phasentrennung des Systems zu beobachten. Das von Häusler vorgeschlagene Modellsystem aus freien Fettsäuren, Cholesterol und Ceramiden wies zwar hinsichtlich der interlamellaren Netzebenenabstände zu den Stratum corneum Lipiden vergleichbare Resultate auf, unterschied sich aber von den in vivo Bedingungen durch das Vorhandensein von Phospholipiden in der Mischung, da ein phospholipidreiches Ceramid (Ceraderm S[®]) verwendet wurde.

Moghimi et al. [1996a] charakterisierten in Anlehnung an Friberg eine Mischung aus Cholesterol, Fettsäuren, den korrespondierenden Seifen und Wasser mittels Polarisationsmikroskopie, Röntgenbeugung und DSC. Die Strukturuntersuchungen ergaben das Vorliegen einer lamellaren Matrix, bei der sich die Lipide sowohl im Gelzustand als auch im flüssigkristallinen Zustand befinden. Da die physikochemischen Eigenschaften der

Mischung zum Teil mit den Strukturvorstellungen des Stratum corneum übereinstimmten, wurde dieses vereinfachte Modell vorgeschlagen, um Interaktionen mit Penetrationenhancern und Arzneistoffen zu untersuchen [Moghimi et al. 1996b, 1996c, 1996d, 1997].

In neueren Studien von Bouwstra et al. [1996b, 1998] wird auf die besondere Rolle der Ceramide und einzelner Ceramid Fraktionen innerhalb der Stratum corneum Lipide hingewiesen, wobei besonders die Anwesenheit des Ceramid 1 in einer Modellmischung notwendig sein soll, um die molekulare Anordnung der Lipide innerhalb der Bilayer Strukturen nachzuahmen.

2.4.1 Permeationsmodelle

Um Wechselwirkungen von topisch applizierten Substanzen und Grundlagen mit der Haut, wie z.B. penetrationsfördernde Eigenschaften beurteilen zu können, werden in vivo Permeationsstudien am Menschen oder Tier und in vitro Permeationsstudien durchgeführt.

Für die in vitro Permeationsstudien wird u.a. exzidierte Vollhaut oder, da das Stratum corneum die hauptsächlichste Barriere für die Wirkstoffpermeation darstellt, exzidiertes Stratum corneum verwendet.

Nachteilig bei der Verwendung sowohl der exzidierten humanen Vollhaut als auch des exzidierten humanen Stratum corneum ist die hohe inter- und intraindividuelle Variabilität der Lipidzusammensetzung und damit der Barriereigenschaften, so daß zur statistischen Absicherung relativ viele Untersuchungen notwendig sind [Kastings et al. 1994, Cornwell und Barry 1995]. Darüberhinaus steht das menschliche Gewebe nur begrenzt zur Verfügung, weshalb häufig auch auf tierische Quellen wie Maus, Schwein, Ratte etc. zurückgegriffen wird. Hierbei findet man zwar eine geringere Variabilität hinsichtlich der Lipidzusammensetzung, es zeigen sich jedoch beträchtliche Unterschiede zum humanen Gewebe hinsichtlich der Permeabilität der Haut und der quantitativen Lipidzusammensetzung [Southman et al. 1984, Scott et al. 1986, Wester und Maibach 1987].

In den letzten Jahren testete man deswegen auch organotypische epidermale Kulturen auf deren Verwendbarkeit für Permeationsstudien. Diese zeigen im Regelfall eine höhere Permeabilität im Vergleich zur Permeation durch exzidierte Vollhaut bzw. Stratum corneum, wobei die Reihenfolge der Permeabilität für unterschiedliche Arzneistoffe teilweise identisch mit der durch exzidierte Haut ist [Ponec et al. 1990, Bell et al. 1991, Specht et al. 1998]. Die schwächer ausgeprägte Barrierefunktion der organotypischen Kulturen könnte in der

veränderten Lipidzusammensetzung und der geringeren Ordnung der Stratum corneum Lipide innerhalb der Bilayer im Vergleich zu exzidiertem Stratum corneum begründet sein [Bouwstra et al. 1995].

In der Literatur findet sich daneben eine Vielzahl anderer Modellsysteme, die entwickelt worden sind, um den Nachteil der Variabilität exzidiierter Haut zu umgehen und die perkutane Aufnahme zu simulieren.

Dabei wurden sowohl biologische Membranen wie Eihaut [Washitake et al. 1980] als auch künstliche Polymermembranen wie Celluloseacetat [Barry et al. 1976] und Polydimethylsiloxan- (PDMS) membranen [Pellet et al. 1994] eingesetzt.

Einige Arbeitsgruppen kombinierten verschiedene Polymere miteinander, um so die hydrophilen und lipophilen Bereiche des Stratum corneum zu berücksichtigen [Nastruzzi et al. 1993, Neubert et al. 1991, 1995, Faustino et al. 1996]. Die beschriebenen Modellsysteme zeigten häufig zwar eine gute Korrelation zu erhaltenen Stratum corneum Daten, waren aber im allgemeinen auf vergleichende Untersuchungen strukturverwandter Substanzen beschränkt, so daß sie lediglich zur Qualitätskontrolle dermalen Produkte im Sinne der Chargenkonformität verwendet werden können.

2.5 Entwicklung eines Modells zur in vitro Arzneistoff Permeation durch Stratum corneum Lipide

Da der interzellulären Lipidsubstanz des Stratum corneum die eigentliche Barrierefunktion hinsichtlich Wasserhomöostase und Eindringen fremder Substanzen zugeschrieben wird, erscheint es naheliegend, Modellsysteme auf Basis dieser Hautlipide zu entwickeln, was auch in früheren Arbeiten mehrmals aufgegriffen wurde.

So wurde von Firestone und Guy [1985] eine Lösung von Hautlipiden in Chloroform auf ein Millipore Filter getropft, das Lösungsmittel verdunsten gelassen und mit der so präparierten Membran Diffusionsexperimente mit einer rotierenden Diffusionszelle durchgeführt. Abraham und Downing [1989] präparierten ein Celluloseacetat/Nitrat Filter mit einer liposomalen Dispersion aus Stratum corneum Lipiden und führten Wasserperfusionsstudien durch. Eine Dissertation aus Saarbrücken [Jäckle 1996] beschäftigt sich ebenfalls mit Permeationsuntersuchungen durch Hautlipide, wobei hier für die Permeation ein Polytetrafluorethylen (PTFE) Filter mit einer aufgeschmolzenen Lipidmischung getränkt wurde. Den beschriebenen Membransystemen ist die Verwendung hautlipidähnlicher Mischungen gemeinsam, es wurden allerdings weder die Hydratisierung noch der pH-Wert

innerhalb des Stratum corneum berücksichtigt. Matzusaki et al. [1993] hydratisierten dagegen ein Filter, das mit einer Stratum corneum Lipidmischung präpariert war, vor den Permeationsuntersuchungen mit einer Pufferlösung. Die Menge des von der Lipidmischung aufgenommenen Wassers wurde allerdings nicht bestimmt, so daß kein direkter Vergleich mit den Bedingungen innerhalb des Stratum corneums möglich ist.

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb ein einfaches Permeationsmodell entwickelt werden, um die Barriereigenschaften von Stratum corneum Modell Lipidmischungen und den Effekt der zugesetzten Bestandteile auf die Permeabilität der Systeme für bestimmte Arzneistoffe zu untersuchen. An das zu entwickelnde Modell wurden folgende Anforderungen gestellt:

1. Für die Permeationsuntersuchungen sollten die hydratisierten und teilneutralisierten Lipidmischungen (Häusler Systeme) anstelle des exzidierten humanen Stratum corneum verwendet werden.
2. Dabei sollte die Permeation durch reproduzierbare definierte Schichtdicken und Flächen stattfinden, um standardisierte Permeationsbedingungen zu gewährleisten.
3. Da bei unterschiedlich zusammengesetzten Mischungen auch ein anderes Quellverhalten in Anwesenheit wäßriger Donatoren bzw. Akzeptoren zu erwarten ist, was zu einer Veränderung der Systeme führen kann, sollte eine ungehinderte Hydratation der Mischungen während der Permeation verhindert werden.
4. Die Permeation sollte mit einer einfachen statischen Zwei-Kompartiment-Diffusionszelle durchführbar sein, wie sie auch für Permeationsuntersuchungen an exzidiertem Stratum corneum eingesetzt wird.
5. Als Akzeptor sollte ein physiologisches Medium verwendet werden, das in vivo-Bedingungen möglichst gut simuliert.
6. Im Akzeptorkompartiment mußten während der Permeationsuntersuchungen perfect sink Bedingungen, also eine ungehinderte Aufnahme für den permeierenden Arzneistoff, gewährleistet sein. Diese Bedingungen sind in der Regel erfüllt, wenn zu keinem Zeitpunkt der Permeation 10% der Sättigungskonzentration des Arzneistoffes im Akzeptor überschritten wird [Skelly et al. 1987].

Die Permeationsuntersuchungen sollten zuerst mit dem Grundsystem aus ungesättigten Fettsäuren erfolgen. Anschließend sollte der Effekt von zugesetzten Stratum corneum Lipidbestandteilen wie gesättigten Fettsäuren, Cholesterol und verschiedenen Ceramiden auf die Permeabilität für einen Modellarzneistoff untersucht werden.

2.5.1 Modellarzneistoffe

Für die Permeationsuntersuchungen durch die unterschiedlichen Lipidmatrizes sollte ein topisch applizierter Arzneistoff verwendet werden, dessen Wechselwirkungen und dessen Permeationsverhalten an humanem Stratum corneum bereits untersucht sind, um einen Vergleich zwischen den erhaltenen Permeationsdaten und der vorhandenen Literatur zu ermöglichen.

Als Modellarzneistoff wurde Diclofenac Natrium (Diclofenac-Na) ausgewählt, ein Wirkstoff, der zur Gruppe der nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) vom Arylessigsäuretyp gehört (Abb. 2.19.).

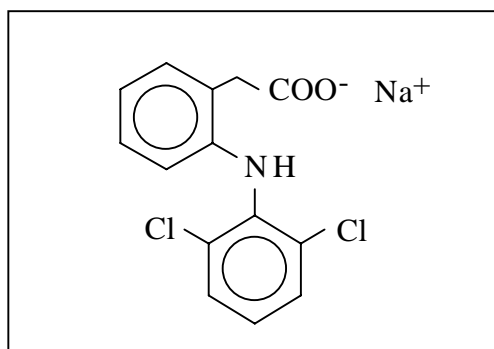


Abbildung 2.19.: Strukturformel von Diclofenac-Natrium

Die NSAR wirken über eine reversible Hemmung der Cyclooxygenase, wodurch die Bildung der an der Schmerzentstehung beteiligten Prostaglandine verhindert wird. Ausgangssubstanz für die Bildung der Prostaglandine ist die Arachidonsäure, die als regelmäßiger Baustein der Phospholipide in Zellmembranen vorkommt und nach Gewebläsionen durch die Phospholipase A₂ freigesetzt wird. Diclofenac-Na wird neben der oralen und rektalen Anwendung mit Tagesdosierungen zwischen 75 mg und 150 mg auch topisch appliziert. Seit Anfang 1999 sind Formulierungen zur kutanen Anwendung in Konzentrationen bis zu 5% zur akuten Behandlung von Schmerzen, Entzündungen und Schwellungen bei Gliedmaßenverletzungen aus der Verschreibungspflicht entlassen worden [Arthrex[®] Cellugel, Diclac[®] akut Gel, Diclophlogont[®] Gel, Effekton[®] Creme]. Neben dem Natriumsalz sind desweiteren Formulierungen mit dem Diethylammoniumsalz im Handel erhältlich [Voltaren Schmerzgel[®], Voltaren Emulgel[®]]. Das Assoziationsverhalten von Diclofenacsäure und Derivaten und deren Wechselwirkungen mit flüssigkristallinen Systemen und dem Stratum corneum ist in der Literatur mehrfach untersucht worden [Kriwet 1994, Kriwet und Müller-

Goymann 1995, Papantoniou und Müller Goymann 1995] und soll an den entsprechenden Stellen im Ergebnisteil diskutiert werden.

Um zu überprüfen, ob das entwickelte Permeationsmodell und die eingesetzten Lipidmodelle in der Lage sind, transdermale Transportprozesse nachzuahmen, sollte die Permeabilität ausgewählter Lipidmatrizes für andere transdermal angewandte Arzneistoffe getestet werden.

In weiteren Permeationsuntersuchungen wurde deshalb das Permeationsverhalten der Arzneistoffe Ibuprofen und Hydrocortison näher untersucht.

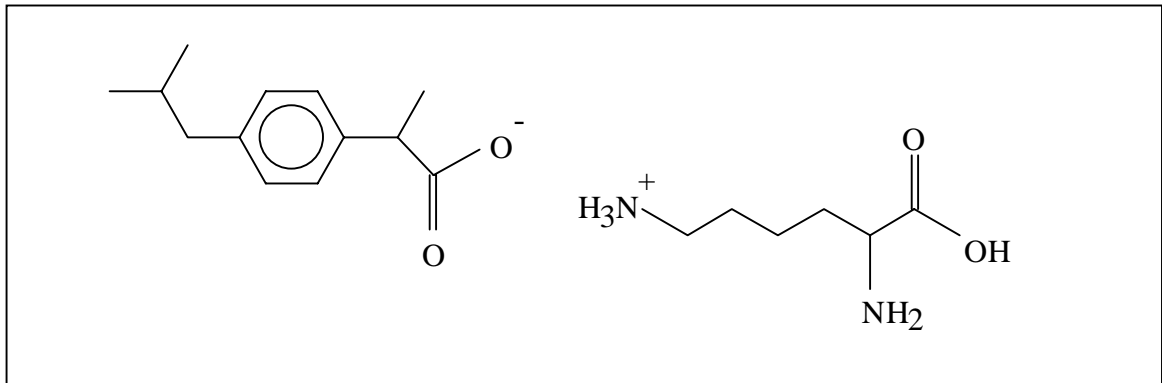


Abbildung 2.20.: Strukturformel von Ibuprofen-Lysinat

Ibuprofen ist ein NSAR vom Arylpropionsäuretyp und wird oral und rektal hauptsächlich in Form der freien Säure in Dosen von 200 mg bis zu 800 mg bei Retardformulierungen (Aktren[®], Dolgit[®], Anco[®]) oder als Lysinatz verabreicht (Dolormin[®], Imbun[®]). Zur dermalen Anwendung sind in Deutschland hauptsächlich Formulierungen mit Ibuprofensäure (Dolgit[®] Creme und Mikrogel, Ibutop[®]) in Konzentrationen von 5-10% im Handel. In der vorliegenden Arbeit kam das Razemat des Ibuprofen-Lysinates (Ibuprofen-Lys) zum Einsatz (Abb. 2.20.), das sich im Gegensatz zur freien Säure und zum Natriumsalz durch seine gute Wasserlöslichkeit auszeichnet.

Hydrocortison (Abb. 2.21.) zählt zur Gruppe der Glucocorticoide und zeigt bei topischer Anwendung antiphlogistische, immunsuppressive, vasokonstriktorische und schwach antiproliferative Wirkung. Der Wirkmechanismus auf molekularer Ebene beruht auf der Interaktion eines aktivierten Komplexes aus dem Steroidhormon und einem intrazellulären Rezeptor mit einem Akzeptor im Zellkern, wodurch es zu einer gesteigerten Synthese zunächst von m-RNA und schließlich von Proteinen kommt. Die antiphlogistische Wirkung läßt sich auf die Induktion der Synthese eines speziellen Proteins, des Lipomodulins, zurückführen, das die Phospholipase A₂ der Zellmembranen hemmt, somit in den

Arachidonsäurestoffwechsel eingreift und die Synthese von Entzündungs- und Schmerzmediatoren verhindert.

Hydrocortison ist bei 20°C schlecht wasserlöslich (28 mg/100ml) [Merck Index 1983] und wurde deshalb für die Untersuchungen zu 1% in Wasserhaltige Hydrophile Salbe (WHS) eingearbeitet, während von Diclofenac-Na und Ibuprofen-Lys wäßrige Lösungen als Donatoren eingesetzt wurden. Hydrocortison wird in topischen Zubereitungen in Konzentrationen von 0,25 bis 2,5% eingesetzt und ist in Konzentrationen bis 0,25% in Deutschland rezeptfrei erhältlich.

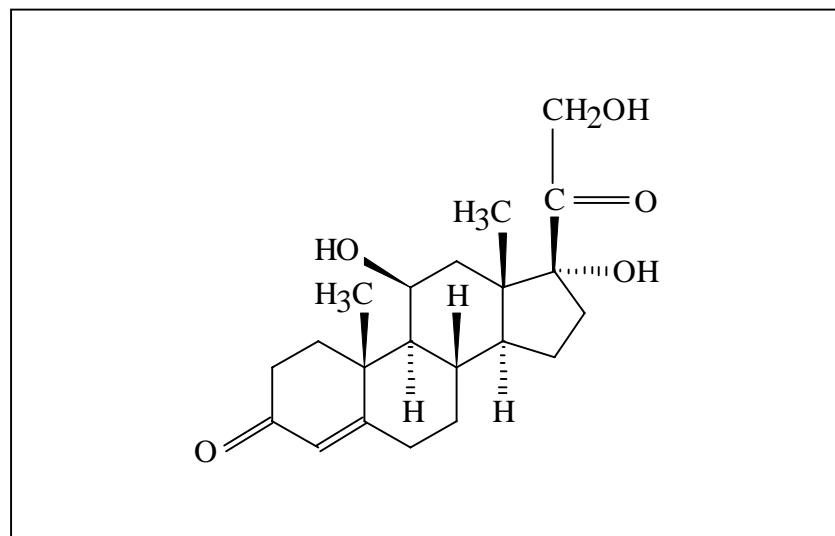


Abbildung 2.21.: Strukturformel von Hydrocortison

2.5.2 Permeationsuntersuchungen

Bei der Auswertung von Permeationsuntersuchungen unter Verwendung von exzidiertem Stratum corneum oder Hautäquivalenten wird das Gewebe vereinfacht als isotrope Membran betrachtet, durch die ein gelöster Arzneistoff passiv diffundiert. Treibende Kraft für die Diffusion ist ein Konzentrationsgradient, der die Stärke des Diffusionsflusses in einem System, d.h. die Stoffmenge pro Zeit, die durch eine bestimmte Flächeneinheit diffundiert, bestimmt. Der Stofftransport ist dem Konzentrationsgradienten entgegengesetzt und wird mathematisch durch die Fickschen Diffusionsgesetze beschrieben.

Für die Permeation durch Stratum corneum gilt in Anlehnung an das 1. Fick'sche Diffusionsgesetz unter Voraussetzung von perfect sink Bedingungen die von Flynn et al. [1974] aufgestellte Gesetzmäßigkeit (Gl. 2.22.1.):

$$J = \frac{dm}{dt \cdot A} = \frac{D_e \cdot C_o \cdot K}{h} \quad A \quad \text{Fläche [cm}^2\text{]}$$

Gleichung 2.22.1:

D_e	effektiver Diffusionskoeffizient [cm ² /s]
C_o	Ausgangskonzentration im Donator [g/cm ³]
K	Verteilungskoeffizient Haut/Donator
h	effektive Dicke der Haut [cm]

Dabei stellt J den Arzneistoffflux [g/cm²·s], also die Menge dm des pro Zeit- und Flächeneinheit permeierten Arzneistoffes dar.

Die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten K zwischen dem Donator und der entsprechenden Lipidmischung war in der Praxis nicht möglich.

Der effektive Diffusionskoeffizient in der Haut, der Verteilungskoeffizient und die Dicke der Haut werden als schlecht zugängliche Parameter oftmals zum Permeationskoeffizienten P [cm/s] zusammengefaßt (Gl. 2.22.2), wobei sich Gl. 2.22.1. vereinfacht (Gl. 2.22.3.):

$$P = \frac{D_e \cdot K}{h} \quad J = P \cdot C_o$$

Gleichung 2.22.2.:

Gleichung 2.22.3.:

Bei der Beschreibung des Permeationsprofils, bei der die kumulativ zu einem bestimmten Zeitpunkt permeierte Arzneistoffmenge pro Flächeneinheit gegen die Zeit aufgetragen wird, kann durch Bestimmung der Steigung im steady-state (Fließgleichgewicht) unter Berücksichtigung der Donatorkonzentration der Permeationskoeffizient P berechnet werden. Bei Permeationsuntersuchungen mit dem entwickelten Modell ist die Dicke der Membran durch die Abmessung des Trägers (siehe 3.3.1.1) vorgegeben und somit stets konstant. Unter der Annahme, daß die jeweilige zu untersuchende Lipidmatrix eine isotrope Membran darstellt, wurde Gl. 2.22.3. auf das entwickelte Permeationsmodell zur Berechnung der Permeationskoeffizienten angewendet. Der Permeationskoeffizient diente in der vorliegenden Arbeit sowohl als Vergleich zwischen einzelnen Modell Lipid Systemen als auch zu den bekannten Permeationsdaten der Modellarzneistoffe für exzidiertes Stratum corneum.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Fettsäuren

Ungesättigte Fettsäuren: In den Modell Lipid Mischungen wurden als ungesättigte Fettsäuren Ölsäure (Merck, D-Darmstadt) und Linolsäure (Nippon-Oil & Fats Europe GmbH, D-Düsseldorf) in hochreiner Form (> 99%) eingesetzt. Bei der Ölsäure handelt es sich um eine einfach ungesättigte (C18:1; cis-9-Octadecensäure), bei der Linolsäure um eine zweifach ungesättigte Fettsäure (C18:2; all-cis-9,12-Octadecadiensäure).

Gesättigte Fettsäuren: Als gesättigte Fettsäuren kamen Myristinsäure (C14:0; Tetradecensäure), Palmitinsäure (C16:0; Hexadecensäure) und Stearinsäure (C18:0; Octadecensäure) in jeweils 99% iger Qualität (Merck, D-Darmstadt) zur Anwendung.

3.1.2 Ceramide

Ceraderm S[®]: In den Grundmischungen und der Komplettmischung wurden zuerst Ceramide in Form von Ceraderm S[®] (Lipoid KG, D-Ludwigshafen) eingesetzt. Dabei handelt es sich um einen Extrakt aus Sphingolipiden (45-48%) und Phospholipiden (48-50%) aus Schweinehirn, der sehr heterogen zusammengesetzt ist (Abb. 3.1.):

Zusammensetzung von Ceraderm S[®] (m/m):

Sphingoglykolipide	45-48%
Galaktocerebroside Typ I	25-30%
Galaktocerebroside Typ II	7-10%
Sulfatide	5-8%
Ganglioside und andere, nicht identifizierte Verbindungen	< 5%
Phospholipide	48-50%
Phosphatidylcholin	5-8%
Phosphatidylethanolamin	20-25%
Sphingomyelin	5-10%
Phosphatidsäure	max. 3%
Lysophosphatidylcholin	< 1%
Lysophosphatidylethanolamin	< 1%
Unpolare Lipide	
Cholesterol, freie Fettsäuren	< 3%

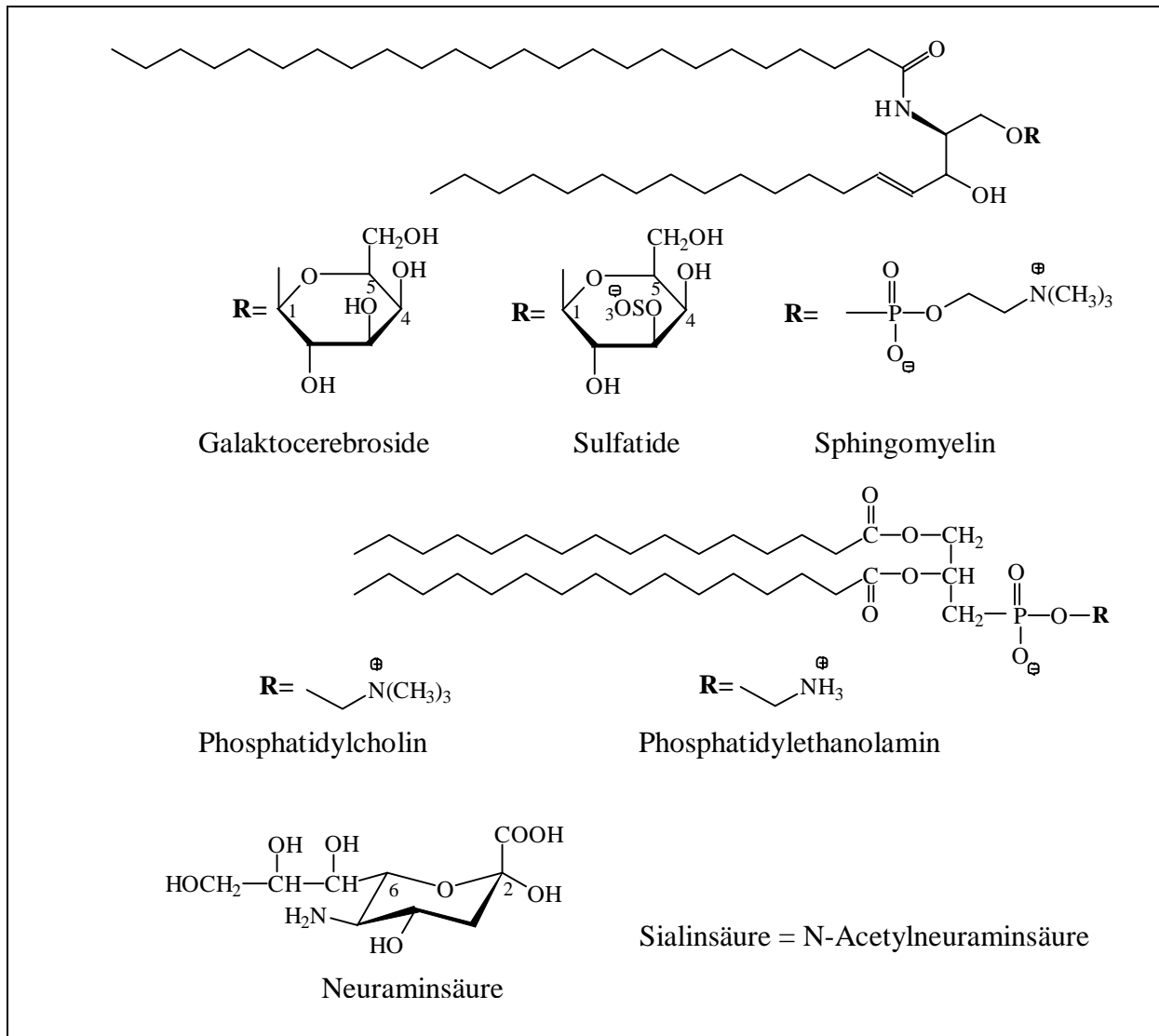


Abbildung 3.1.: Bestandteile von Ceraderm S[®]

In den Galactocerebroside des Typs I sind hauptsächlich Moleküle mit α -Hydroxyfettsäuren wie Cerebronsäure (C24:0, 2-Hydroxytetracosansäure) und Hydroxynervonsäure (2-Hydroxy-15-cis-tetracosensäure) als Acylkomponente enthalten, beim Typ II vorwiegend Lignocerinsäure (Tetracosansäure) und Nervonsäure (15-cis-Tetracosensäure). Ganglioside enthalten zusätzlich Sialinsäure als charakteristischen Bestandteil.

Das Fettsäuremuster des Gemisches entspricht dem des Schweinehirns, wobei von Häusler [1994] mit Hilfe der Gaschromatographie eine Bestimmung der Gesamtfettsäuren erfolgte. Der Hauptanteil wird demnach von Fettsäuren der Kettenlängen C18:0 (27,5%) und C18:1 (23,8%) gebildet. Daneben liegen noch C16:0 Fettsäuren (14,8%) und C20:0 Fettsäuren (2,3%) in dem Gemisch vor.

Aufgrund des heterogenen Charakters der Bestandteile konnten nicht alle Fettsäuren vollständig identifiziert werden und wurden mit Hilfe ihrer Retentionszeit im

Gaschromatogramm zum einen C14- bis C20-Verbindungen zugeordnet (13,7%) sowie andererseits zu Fettsäuren mit einer Kettenlänge oberhalb C20 (16,1%).

Ceraderm S[®] liegt als bräunliches, feinblättriges Material mit charakteristischem Geruch vor. Als Antioxidans ist 0,1% α -Tocopherol enthalten.

Es wurde aufgrund guter emulgatorischer Eigenschaften in dermale Zubereitungen und Kosmetika eingearbeitet, ist ein guter Liposomenbildner und soll den transepidermalen Wasserverlust der Haut durch Verbesserung der Barrierefunktion des Stratum corneum verringern. Als problematisierter Rohstoff tierischen Ursprungs ist das Produkt mittlerweile nicht mehr im Handel erhältlich.

Da in den Stratum corneum Lipiden Phospholipide nur noch in geringem Anteil zu finden sind, das verwendete Ceraderm S[®] aber bis zu 50% Phospholipide enthält, wurde es in der Komplettmischung durch jeweils einen der beiden folgenden Ceramid-Typen ersetzt.

Ceramid III: Ceramid III wurde von der Firma Cosmoferm B.V. (NL-Delft) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um ein gentechnologisch mit Hilfe von Hefekulturen hergestelltes, hautidentisches Ceramid des Typs III, das zu über 90% aus N-Octadecanoyl-phytosphingosin (M_r 583,99) besteht.

Nach topischer Applikation soll das Ceramid einen positiven Effekt auf die Hautbarriere und insbesondere auf die Lamellarstruktur der Stratum corneum Lipide besitzen, was sich in einer Erhöhung des Wassergehaltes der Haut mit einer gleichzeitigen Verringerung der Hautrauhigkeit äußert.

Ceramid IV: Als weiteres Ceramid wurde Ceramid Typ IV (Sigma, D-Deisenhofen), das aus Rinderhirn gewonnen wurde, in 99% iger Qualität eingesetzt. Als Fettsäurekomponente sind hauptsächlich α -Hydroxyfettsäuren mit einer Kettenlänge von 24 C-Atomen enthalten.

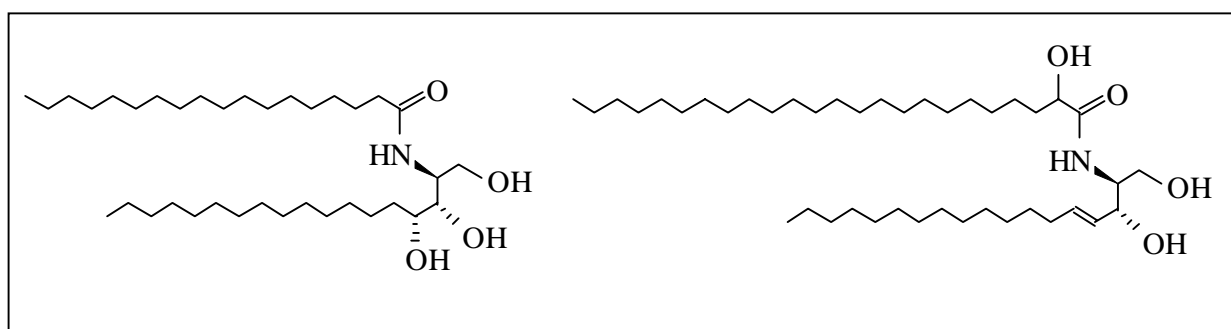


Abbildung 3.2.: Strukturformel der eingesetzten Ceramide III und IV

3.1.3 Arzneistoffe

Diclofenac: Als Modellarzneistoff für die Permeationsuntersuchungen durch die unterschiedlichen Modell Lipid Systeme wurde das Natriumsalz der Diclofenacsäure ausgewählt (M_r 318,13), das sich durch eine bessere Wasserlöslichkeit im Vergleich zur freien Säure auszeichnet. Diclofenac-Natrium (Diclofenac-Na) wurde von der Firma Ciba-Geigy (CH-Basel) zur Verfügung gestellt.

Ibuprofen: Ibuprofen wurde in Form des Lysinsalzes (Ibuprofen-Lys) (M_r 352,35) eingesetzt. Es ist außerordentlich gut wasserlöslich und wässrige Lösungen des Arzneistoffes sind über Monate hinweg chemisch stabil [Stoye 1997]. Der Arzneistoff wurde von der Firma Merckle GmbH (D-Blaubeuren) zur Verfügung gestellt.

Hydrocortison: Hydrocortison (M_r 362,5) wurde für die Untersuchungen aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit zu 1% in Wasserhaltige Hydrophile Salbe (WHS) mit Hilfe eines Cito-Unguators[®] (GAKO Konietzko GmbH, D-Bamberg) eingearbeitet. Der Wirkstoff (Synopharm, D-Barsbüttel) wurde in Arzneibuchqualität (DAB 1996) verwendet.

3.1.4 Weitere Materialien

Cholesterol: Es wurde wasserfreies kristallines Cholesterol der Firma Merck (D-Darmstadt) mit einem Gehalt von > 95% Cholesterol verwendet.

Lecithin: Phospholipon 90G[®] wurde von Rhone-Poulenc-Rorer (D-Köln) zur Verfügung gestellt. Es ist ein hochgereinigtes Sojalecithin mit einem Mindestgehalt an Phosphatidylcholin von 90% (m/m). Laut Herstellerangaben beträgt der Anteil an Lysophosphatidylcholin maximal 6% (m/m) und der Restwassergehalt maximal 1,5% (m/m). Das mittlere Molekulargewicht beträgt 800.

Wasser: Wasser wurde ausschließlich in bidestillierter Form eingesetzt.

Weitere Materialien, die ausschließlich bei einzelnen der nachfolgenden Methoden zur Anwendung gelangten, werden im Methodenteil berücksichtigt.

3.2 Methoden

3.2.1 In vitro Modell Systeme für die Lipide des Stratum corneum

3.2.1.1 Zusammensetzung der Modell Lipid Systeme

Im Verlauf der Arbeit sollten die von Häusler [1994] charakterisierten Modellmischungen näher auf deren physikochemische Eigenschaften hin untersucht und entsprechende Methoden entwickelt werden, um den Einfluß der verschiedenen Bestandteile auf die Barriereigenschaften der Systeme und deren Permeabilität zeigen zu können.

Die Zusammensetzung der Modellmischungen entspricht deshalb den von Häusler verwendeten Verhältnissen der einzelnen Lipide und lehnt sich an die von Elias [1983] gefundenen Konzentrationen für die verschiedenen Lipide an.

Ausgehend von einem Grundsystem, das aus einer Mischung ungesättigter Fettsäuren besteht, wurde dieses Modell systematisch erweitert, indem weitere Komponenten wie gesättigte Fettsäuren, Cholesterol und Ceramide hinzugesetzt wurden. Als ungesättigte Fettsäuren (UFS) wurden Ölsäure und Linolsäure verwendet, als gesättigte Fettsäuren (GFS) Myristin-, Palmitin- und Stearinsäure. Auf den Zusatz einer weiteren im humanen Stratum corneum vorkommenden Fettsäure, der einfach ungesättigten Palmitoleinsäure (C16:1; cis-9-Hexadecensäure) wurde verzichtet, da sich in Vorversuchen keinerlei signifikante Veränderungen der physikochemischen Eigenschaften der Lipidmischungen durch deren Zusatz ergaben.

Unter Berücksichtigung des im Stratum corneum herrschenden pH-Wertes von 4,5-6,0 und Wassergehaltes von 10-40% wurden 41% der Fettsäuren mit NaOH neutralisiert und ein mittlerer Wassergehalt von 32% gewählt. Im folgenden sind die Zusammensetzungen der Modell Lipid Systeme und die Verhältnisse der einzelnen Lipide zueinander aufgeführt:

- M1 Grundsystem aus ungesättigten Fettsäuren
Molares Verhältnis von Natriumsalz : freier Fettsäure von 1:1,44
- M2 Zusatz von Cholesterol
Verhältnis von Fettsäurefraktion : Cholesterol = 1,24:1
- M3 Zusatz von Ceramiden (Ceraderm S[®])
Verhältnis von Fettsäurefraktion : Ceramiden = 1,24:1
- M4 Zusatz von Cholesterol und Ceramiden (Ceraderm S[®])
Verhältnis von Fettsäurefraktion : Cholesterol : Ceramiden = 1,24:1:1,76

- M5 Zusatz gesättigter Fettsäuren
- M6 UFS + GFS + Cholesterol
Verhältnis von Fettsäurefraktion : Cholesterol = 1,24 :1
- M7 UFS + GFS + Ceramide (Ceraderm S[®])
Verhältnis von Fettsäurefraktion : Ceramiden = 1: 1,76
- KM1 UFS + GFS + Cholesterol + Ceramide (Ceraderm S[®])
Verhältnis von Fettsäurefraktion : Cholesterol : Ceramiden = 1,24:1:1,76
Es handelt sich um die aus allen Komponenten bestehende Lipidmatrix,
die als Komplettmischung (KM) bezeichnet wird.
- KM2 hierbei handelt es sich um die Komplettmischung, bei der das Ceraderm S[®]
durch Ceramid III ersetzt wurde
- KM3 in dieser KM wurde Ceraderm S[®] durch Ceramid IV ersetzt

Bestandteil	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	KM
Ölsäure	72,6	40,2	40,2	22,5	34,4	19,1	12,5	10,7
Linolsäure	27,4	15,2	15,2	8,5	13,0	7,2	4,6	4,0
Myristinsäure	-	-	-	-	3,9	2,1	1,4	1,2
Palmitinsäure	-	-	-	-	38,4	21,3	13,9	11,9
Stearinsäure	-	-	-	-	10,3	5,7	3,8	3,2
Σ	100,0	55,4	55,4	31,0	100,0	55,4	36,2	31,0
Cholesterol	-	44,6	-	25,0	-	44,6	-	25,0
Ceramide	-	-	44,6	44,0	-	-	63,8	44,0

Tabelle 3.3.: Zusammensetzung der Modell Lipid Mischungen (% m/m)

3.2.1.2 Herstellung der Modell Lipid Systeme

Die Herstellung der Modell Lipid Systeme erfolgte nach der von Friberg [1985] empfohlenen Methode. Dabei wurden die Fettsäuren in ein spezielles Zentrifugenröhrchen mit kapillarartiger Verengung im mittleren Teil eingewogen, evt. durch Temperaturerhöhung verflüssigt und in den unteren Teil des Röhrchens zentrifugiert (Sigma Laborzentrifuge 3-15, D-Osterode). Als nächstes wurde die entsprechend konzentrierte Natronlauge zugesetzt und mit den Fettsäuren durch Zentrifugieren vereinigt. Anschließend wurden alle weiteren Bestandteile zugewogen. Die Homogenisierung erfolgte durch wiederholtes Zentrifugieren (5 min mit einer Zentrifugalbeschleunigung von 2880·g) durch die Verengung der Röhrchen, wobei die Mischungen zwischen den Zentrifugierdurchgängen 30 min auf 80°C erwärmt wurden. Bis zur Homogenität der hochviskosen Mischungen (Ansatzgröße max. 1,2 g) waren ca. 40 Zentrifugierdurchgänge notwendig. Um Systeme mit höherem Wassergehalt herzustellen, wurde den fertigen Mischungen die entsprechende Menge Wasser zugesetzt und durch Zentrifugieren homogenisiert (ca. 10-15 Zentrifugierdurchgänge).

Sämtliche Geräte wurden vor der Herstellung der Mischungen mit reinem Diethylether gereinigt, um eine exogene Lipidkontamination zu vermeiden.

Die Untersuchungen der Systeme erfolgte jeweils 12 Stunden nach der Herstellung (Lagerung bei Raumtemperatur).

3.2.2 Thermogravimetrie (TG)

Der Wassergehalt der Proben wurde in offenen Aluminiumtiegeln SSC000E030 (C3-Analysentechnik, D-Baldham) und einem Leertiegel als Referenz mit einer TG/DTA 220 mit Diskstation 5200H (Seiko, J-Tokio) bestimmt. Dabei wurde mit einer Heizrate von 20 K/min auf 90°C aufgeheizt und 90 min lang isotherm gehalten. Der Ofenraum wurde mit Luft bei einer Spülrate von 300 ml/min gespült. Die Probeneinwaage betrug 6-10 mg.

Durch die Wahl des Heizprogrammes konnte die Miterfassung von niedrig siedenden Komponenten der Mischungen vermieden werden. Teilweise wurden nach der Bestimmung der Wassergehaltes mit den wasserfreien Proben DSC-Messungen durchgeführt (siehe 3.2.3.) Zur Temperaturkalibrierung wurden Indium und Zinn verwendet, zur Massenkabrierung ein 20 mg-Gewichtsstück.

3.2.3 Dynamische Differenz Kalorimetrie (DSC)

Für thermoanalytische Untersuchungen wurden die Proben mit einer DSC 220 C (Seiko, J-Tokio) in kaltverschweißten Aluminiumtiegel (SSC000C008, D-Baldham) gegen luftgefüllte Referenztiegel mit einer Standardheizrate von 5 K/min vermessen. Es wurden Einwaagen von 2-5 mg verwendet und mindestens 3 Messungen zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurde ein Temperaturbereich von 5-90°C gewählt. Die Enthalpie- und Temperaturkalibrierung erfolgte mit Indium und Zinn.

3.2.4 Polarisationsmikroskopie

Zur Untersuchung optischer Anisotropie wurde ein mit Polarisator, Analysator und λ -Plättchen (Gangunterschied = 550 nm) ausgestattetes Photomikroskop Typ III (Zeiss, D-Oberkochen) verwendet. Photoaufnahmen wurden mit Kodak Ektachrome 160 T (Kodak Eastman comp., USA-Rochester) gemacht. Thermotrope Umwandlungen wurden in einem mikroskopischen Heiztisch FP 52 mit Steuergerät FP 5 (Mettler AG, D-Gießen) bei konstanter Heiz-/Kühlrate von 1°C/min beobachtet. Um mögliche Veränderungen der Proben durch Wasserverlust während der Temperaturprogramme zu vermeiden, wurden die Objektträger mit Pattex Stabilit Express Kleber (Henkel KgaA, D-Düsseldorf) versiegelt.

3.2.5 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) gefriergebrochener und replizierter Proben

Zur Herstellung der Replika wurden die Proben zwischen zwei Probenträgern aus Gold fixiert und durch Eintauchen in schmelzenden Stickstoff unter Erhalt ihrer kolloidchemischen Struktur bei -210°C schockgefroren. Die tiefgefrorenen Proben wurden anschließend bei -100°C im Hochvakuum $< 10^{-6}$ bar gebrochen und die Bruchflächen sofort unter einem Winkel von 45° mit einer 2 nm dicken Platin-Kohle Schicht bedampft. Zur Stabilisierung der Replika erfolgte eine weitere Bedampfung mit einer 20 nm reinen Kohleschicht unter einem Winkel von 90°. Zur Ablösung von Probenresten wurden die Replika mit einer 1:1 (v/v) Mischung aus Chloroform und Methanol und mit Wasser gereinigt und anschließend auf Kupfernetzchen (Plano, D-Wetzlar) aufgebracht.

Die Durchführung der Präparation ist bei Heering [1985] ausführlich beschrieben.

Untersucht wurden die erhaltenen Replika in einem Transmissionselektronenmikroskop EM-300 (Philips, D-Kassel) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV. Als Filmmaterial diente Kodak Scienta 23 D 56 P3 (Kodak Eastman comp., USA-Rochester).

3.2.6 Röntgenkleinwinkeluntersuchungen nach Kiessig

Zur Charakterisierung der Modell Lipid Systeme und einzelner Substanzen wurden Röntgenbeugungsuntersuchungen im Kleinwinkelbereich mit einer Kiessig-Kamera (Institutseigenbau) durchgeführt. Als Röntgengenerator wurde ein PW 1730 der Philips GmbH (D-Kassel), der mit der Feinfokusröhre P 2213/20 (Cu-Anode, $\lambda = 0,154$ nm) bestückt war, eingesetzt. Die Röhre wurde mit einer Stromstärke von 25 mA und einer Beschleunigungsspannung von 40 kV betrieben.

In einen würfelförmigen, temperierbaren Probenbehälter (Institutseigenbau) wurden die Proben zwischen zwei röntgenamorphe Kaptonfolien (Krempel, D-Vaihingen) eingefüllt und auf eine Schichtdicke von 1mm zusammengepreßt. Die Meßzeit betrug 300-500s. Die Messung wurde - zur Vermeidung von Streuung an Gasmolekülen - im Vakuum von 3 Torr bei Raumtemperatur durchgeführt. Die auftretenden Interferenzen wurden mit einem ortsempfindlichen Detektor OED-50 (Braun, D-München) registriert und die Daten über einen Vielkanalanalysator MCA 8100 (Canberra Electronics, D-Frankfurt) ausgegeben.

Die Komplettmischungen wurden weiterhin bei 32°C untersucht. Hierbei wurden die auftretenden Interferenzen mit einem ortsempfindlichen Detektor PSD-50M (Braun, D-München) registriert und die Daten mittels einer ASA-SAX Karte auf einen Computer übertragen.

3.2.7 Röntgenweitwinkeldiffraktometrie

Für Röntgenweitwinkeluntersuchungen wurden die Proben in einen Aluminiumträger gefüllt und mit einem Röntgengoniometer PW 1050/25 (Philips, D-Kassel) vermessen. Die Detektion erfolgte mit einem Xe-Proportionalitätszählrohr PW 1711/10. Die Daten wurden auf einem Teleprinter und die Diffraktogramme auf einem x/y Schreiber ausgegeben.

Das Goniometer wurde auf einem Röntgengenerator PW 1730 mit einer Feinfokusröhre PW 2213/20 (Cu-Anode, $\lambda = 0,154$ nm) bei einer Betriebsspannung von 40 kV und einem Anodenstrom von 25 mA betrieben.

3.2.8 Rheologische Untersuchungen der Modell Lipid Systeme

Um die Viskosität der Systeme zu untersuchen, wurden Oszillationsmessungen mit einem Rheometer CVO der Firma Bohlin Instruments (D-Mühlacker) durchgeführt.

Dabei wurde die Schubspannung mit einer Frequenz von 1 Hz oszillierend auf die Probe aufgegeben und im sogenannten stress sweep kontinuierlich erhöht. Erfolgt die Messung im linear viskoelastischen Bereich, so sind die rheologischen Kenngrößen in einem weiten Schubspannungsbereich konstant und die Struktur der Probe bleibt erhalten. Als Kenngrößen erhält man die komplexe Viskosität η^* , Speichermodul G' , Verlustmodul G'' und Phasenwinkel δ .

Als Meßsystem diente eine Kegel-Platte Geometrie, als Meßkörper ein Kegel mit 20 mm Durchmesser und 1° Öffnungswinkel. Die Messung erfolgte bei 20°C ohne Vorscherung der Proben mit einer Equilibrierzeit von 30s. Die rheologischen Daten wurden im linear viskoelastischem Bereich als Mittelwert von 10 Einzelwerten berechnet. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden 3 Messungen durchgeführt.

3.2.9 Wechselwirkungen des Modellarzneistoffes Diclofenac-Na mit Stratum corneum Lipiden

Die in vitro Modell Mischungen wurden mit 10 bzw. 20% (m/m) einer 0,5%igen Diclofenac-Na Lösung versetzt, durch Zentrifugieren (10-15 Zentrifugierdurchgänge) homogenisiert und mit den entsprechenden Methoden (3.2.3 bis 3.2.6) charakterisiert.

3.2.10 Exzidiertes humanes Stratum corneum

3.2.10.1 Präparation von humanem Stratum corneum

Pathologisch unveränderte Haut aus der plastischen Chirurgie wurde direkt nach Entnahme gekühlt und mechanisch vom Unterhautfettgewebe und Teilen der Dermis befreit. Die Hautstücke wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -25°C bis zur Versuchsdurchführung gelagert. Die Präparation von exzidiertem humanem Stratum corneum erfolgte nach einer Methode von Kligman und Christophers [1964]. Dabei wurden die Hautstücke mit der Dermisseite auf Zellstoff gelegt, der mit einer 0,1% igen wäßrigen Trypsinlösung getränkt war und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Stratum corneum von der Dermis getrennt und mit einer Trypsin-Inhibitorlösung (0,1%;

Sigma, D-Deisenhofen) und Wasser gewaschen. Es wurde auf einem Teflonsieb im Exsikkator über Blaugel getrocknet. Für nachfolgende thermoanalytische oder röntgenographische Untersuchungen wurde das Stratum corneum 48h über einer gesättigten NaCl Lösung (rel. Luftfeuchtigkeit: 76%) gelagert und so auf einen definierten Wassergehalt von 20% hydratisiert.

3.2.10.2 Vorbehandlung des Stratum corneum

Das hydratisierte Stratum corneum wurde für 20 min bei 37°C in einen Überschuß der entsprechenden Zubereitung eingelegt und nach Inkubation mit Hilfe von Zellstoff von anhaftenden Probenresten befreit.

3.2.10.3 DSC-Untersuchungen an Stratum corneum

Hydratisierte bzw. vorbehandelte Stratum corneum Stücke wurden klein gefaltet und in einen Aluminiumtiegel eingebracht. Die Einwaage an Stratum corneum betrug 12-14 mg. Die Messung erfolgte in einem Temperaturbereich von -20°C bis 140°C mit einer Heizrate von 5 K/min mit einem Leertiegel als Referenz (Meßgerät und Tiegel siehe 3.2.3).

3.2.10.4 Röntgenweitwinkeluntersuchungen des Stratum corneum

Es wurden Röntgenweitwinkeluntersuchungen an humanem Stratum corneum mit Hilfe einer Debye-Scherrer Kamera (Umfang 360 mm) durchgeführt. Dabei wurden klein gefaltete Hornschichtproben mit Hilfe einer dünnen Nadel in röntgenamorphe Glaskapillaren ($d = 0,5$ mm) (Glas, D-Berlin) eingebracht und verdichtet und 96h lang bei Raumtemperatur vermessen. Auftretende Interferenzen wurden durch Schwärzung eines Röntgenfilms Fuji 100 (Fuji, J-Tokio) detektiert. Die Strahlung wurde bei einer Beschleunigungsspannung von 40 kV und einer Stromstärke von 40 mA von einem Röntgenerators PW 1830 (Philips, D-Kassel) mit einer Breitfokusröhre PW 2253/11 (Cu-Anode, $\lambda = 0,154$ nm, Ni-Filter) (Philips, D-Kassel) erzeugt.

3.3.1 Permeationsmodell zur in vitro Permeation durch Stratum corneum Modell Lipid Systeme

3.3.1.1 Auswahl des Trägers für die in vitro Modellmischungen

Eine Siebscheibe aus korrosionsbeständigem V2A Stahl (Institutseigenanfertigung) (Durchmesser 3,6-3,8 cm) mit definierter Dicke (0,8 mm) und definierten Lochdurchmessern wurde als Träger für die zu untersuchenden Lipidmischungen ausgewählt. Durch Einstreichen in die Löcher der Siebscheibe sollten reproduzierbare und definierte Schichtdicken und Permeationsflächen resultieren. Es wurden Scheiben mit zwei unterschiedlichen Lochdurchmessern verwendet (19 Löcher à $d = 2,5$ mm, 36 Löcher à $d = 1,6$ mm).

3.3.1.2 Hydrophobe Membran

Um eine zu starke Veränderung der Mischungen während der Permeationsuntersuchungen zu vermeiden, sollte die mit der Lipidmischung präparierte Siebscheibe zum Akzeptor und Donator hin durch eine hydrophobe Membran abgedichtet werden. Diese sollte einerseits eine Hydratation der Mischung vermeiden, andererseits aber keinen Diffusionswiderstand für die Arzneistoffpermeation darstellen. Zur Verfügung standen drei unterschiedliche hydrophobe Membranen, die zuerst auf ihre Eignung für das System getestet wurden:

1. Polytetrafluorethylen (PTFE)-Membranfilter SM-11807-25, Porengröße $0,2 \mu\text{m}$ (Sartorius, D-Göttingen)
2. Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran Immobilon P, Porengröße $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore, D-Eschborn)
3. silikonisierte Dialysemembran Spectra/Por[®]1, regenerierte Cellulose MWCO 6000-8000 (Spectral Medical Industries, USA-Los Angeles) nach Tiemessen et al. [1988]

Mit diesen Membranen wurden jeweils Permeationsuntersuchungen mit dem in 3.3.1.3 beschriebenen System durchgeführt, wobei die Siebscheibe keine Lipidmischung enthielt. Die Dialysemembran wurde vor der Verwendung auf Scheibengröße geschnitten.

3.3.1.2.1 Silikonisieren der Dialysemembran

Vor dem Silikonisieren wurde die Dialysemembran 5 min lang hydratisiert, anschließend für 2 min in eine Lösung von Silikon in Diethylether eingelegt und nach Verdampfen des Ethers verwendet. Es wurden vier verschiedene Wacker Silikone des Typs AK (AK350, AK500, AK1000, AK2000, Wacker-Chemie GmbH, D-Burghausen) zur Herstellung der Silikon-Ether Mischung eingesetzt. Dabei handelt es sich um Polydimethylsiloxane verschiedener Kettenlängen, wobei die Zahl der Typenbezeichnung die Viskosität des Silikonöls in mm^2/s bei 25°C angibt. Es wurde zum einen das Silikonöl variiert und zum anderen verschiedene Silikon Konzentrationen (3, 4 und 5%, m/m) getestet.

3.3.1.3 Permeationsuntersuchungen

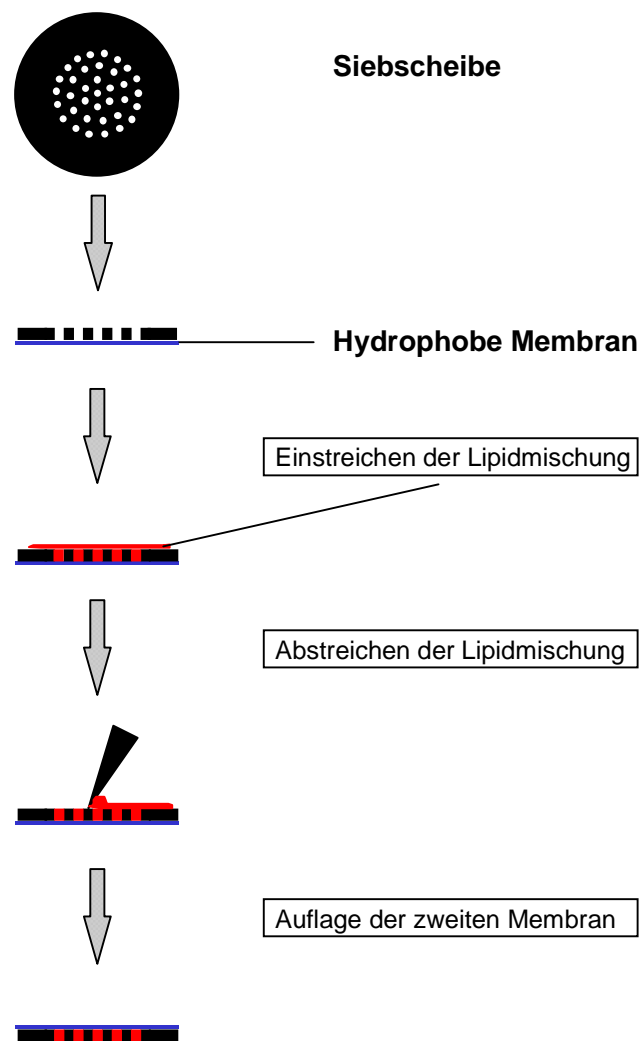


Abbildung 3.4.: Präparation der Siebscheibe für die Permeationsuntersuchungen

Vor dem Einstreichen der entsprechenden Lipidmischung wurde die Siebscheibe an den Rändern mit einer Silikonzubereitung (Baysilone, Bayer AG, D-Leverkusen) zur Abdichtung versehen und anschließend auf die hydrophobe Membran aufgelegt. Um ein planes Aufliegen der Membran sicherzustellen, wurden Siebscheibe und Membran 5 min lang mit einem 500 g Gewicht beschwert. Anschließend wurde die jeweilige Lipidmischung mit einem Spatel in die Siebscheibe eingestrichen und mit Hilfe eines riefenfreien Haarlineals (rostfrei, nach DIN 874/00) zur Schaffung einer planen Permeationsfläche (Gesamtpermeationsfläche = 0,92 cm² bzw. 0,72 cm²) abgestrichen. Die Menge der jeweils eingestrichenen Mischung wurde durch Wiegen ermittelt. Nach Abdichten der Scheibenränder mit der Silikonzubereitung wurde die zweite hydrophobe Membran aufgelegt. Das gesamte System wurde wiederum 5 min lang mit einem 500 g Gewicht beschwert und anschließend sofort in eine modifizierte Franz-Zelle [Franz 1975] mit ca. 75-85 ml Akzeptorvolumen je nach Meßzelle (Abb. 3.5.) eingespannt. Das Akzeptorkompartiment der Franz-Zelle bestand aus einem Glaskolben, das Donorkompartiment aus Teflon mit einem Volumen von ca. 8 ml.

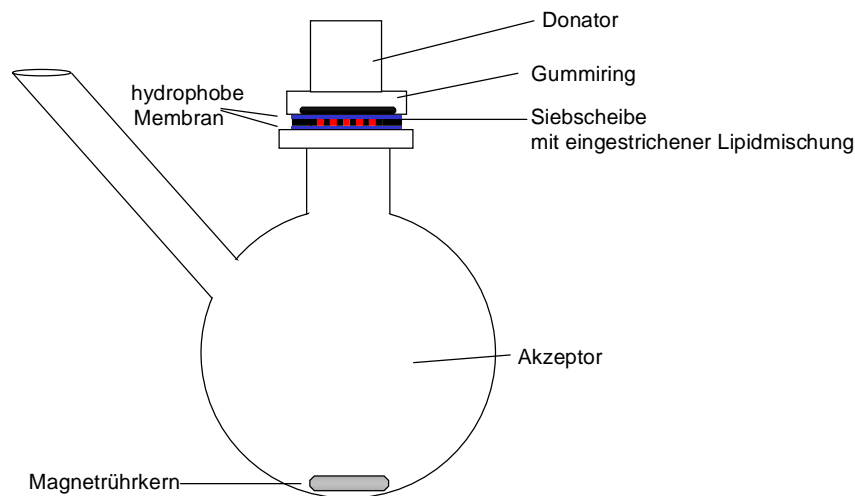


Abbildung 3.5.: Schematische Darstellung des Permeationsmodells mit Siebscheibenpräparation und modifizierter Franz-Zelle

Die Permeation wurde bei allen Mischungen bzw. bei den Membranversuchen ohne Lipidmischung mit 5 ml einer 0,5%igen (m/m) wäßrigen Lösung des Modellarzneistoffes Diclofenac-Na als Donator durchgeführt. Als Akzeptor diente hierbei isotonischer Phosphatpuffer pH 7,4, natriumchloridhaltig R (DAB 1997), der während der Untersuchungen mit Hilfe eines Magnetrührers (300 UpM) durchmischt wurde. Die Franz-Zellen befanden sich während der Untersuchungen in einem Temperierbad von 37°C, wobei an der Lipidmischung eine Temperatur von ca. 32°C erreicht wurde. Die Probenentnahme von

1 ml erfolgte über einen Zeitraum von bis zu 15h alle 60 min mit einer Eppendorf Pipette (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, D-Hamburg), wobei die entnommenen Probenvolumina sofort durch temperierten Puffer ersetzt wurden.

Die Arzneistoffkonzentration im Akzeptorkompartiment wurde HPLC-analytisch (siehe 3.3.1.5) ermittelt. Parallel zu den Permeationsversuchen wurde zu festgesetzten Zeiten mit Hilfe von Blindproben, die unter den gleichen Bedingungen angesetzt waren, der Wassergehalt der jeweiligen Lipidmischungen mittels TG (siehe 3.2.2) bestimmt.

3.3.1.4 Permeationsuntersuchungen mit anderen Donatoren

Um die Eignung des Modellsystems für Permeationsstudien zu testen, wurden bei den Komplettmischungen KM1 und KM3 zwei weitere Donatoren getestet:

- eine wäßrige Ibuprofen-Lys Lösung (0,55%, m/m), 5 ml
- 1% (m/m) Hydrocortison in Wasserhaltiger Hydrophiler Salbe (DAB 1997), 6g

Bei den Untersuchungen mit Hydrocortison wurde das Akzeptormedium ohne NaCl hergestellt, da es die verwendete HPLC-Analytik störte. Die Permeationsbedingungen entsprachen 3.3.1.3.

3.3.1.5 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die quantitative Bestimmung der Arzneistoffe im Akzeptor wurde mit Hilfe der Umkehrphasenchromatographie durchgeführt. Für die Bestimmung von Diclofenac-Na und Hydrocortison kam eine HPLC-Anlage bestehend aus einer Pumpe Beckman System Gold Solvent Delivery System 126 (Beckmann, D-München) und einem UV-Detektor Beckman System Gold Detector Module 166 zur Anwendung. Die Probenaufgabe erfolgte entweder manuell durch ein 7125/29 Rheodyneventil mit 20µl Dosierschleife oder durch einen automatischen Probengeber Promis II Autosampler mit 100µl Dosierschleife und einer Probenaufgabe von 20µl (Spark, NL-Emmen). Die Auswertung der Daten erfolgte mit der System Gold Chromatographie Software Version 6.01.

Die Ibuprofen-Lys Konzentration wurde mit einer HPLC-Anlage der Firma Waters (USA-Milford) bestimmt. Das System bestand aus einer Pumpe Waters HPLC Pump 515, einem UV-Detektor Waters 486 und einem Autosampler 717 Plus (Probenaufgabe 50 µl). Die Auswertung erfolgte mit der Software Millennium³² Version 3.0 LC.

Diclofenac-Na: Reversed-phase Säule (125 × 4 mm) mit Vorsäule (10 × 4 mm) und Säulenfüllmaterial Hypersil ODS 5µm (Grom, D-Herrenberg), mobile Phase: Acetonitril/Wasser/Eisessig im Verhältnis 40/60/2 (v/v) [Levine und Caplan 1985], Flußrate: 1,6 ml, Wellenlänge: 276 nm, Retentionszeit: 8,4 min, Proportionalität von Peakfläche und Arzneistoffkonzentration im Bereich von 0,06-25 µg/ml Diclofenac-Na (Korrelationskoeffizient > 0,999).

Hydrocortison: Reversed-phase Säule (250 × 4 mm) und Säulenfüllmaterial Hypersil ODS 5µm (Grom, D-Herrenberg), mobile Phase: Methanol/Wasser im Verhältnis 60/40 (v/v) [Way und Hadgraft 1991], Flußrate: 1,1 ml, Wellenlänge: 250 nm, Retentionszeit: 4,3 min, Proportionalität von Peakfläche und Arzneistoffkonzentration im Bereich von 0,001-1 µg/ml Hydrocortison (Korrelationskoeffizient > 0,999).

Ibuprofen-Lys: Reversed-phase Säule (125 × 4 mm) mit Vorsäule (10 × 4 mm) und Säulenfüllmaterial Hypersil ODS 5µm (Grom, D-Herrenberg), mobile Phase: Acetonitril/Wasser/Eisessig im Verhältnis 46/54/2 (v/v) [Levine und Caplan 1985], Flußrate: 1,7 ml, Wellenlänge: 264 nm, Retentionszeit: 4,7 min, Proportionalität von Peakfläche und Arzneistoffkonzentration im Bereich von 0,25-10 µg/ml Ibuprofen-Lys (Korrelationskoeffizient > 0,999).

3.3.1.6 Wechselwirkungen von Silikonen mit Stratum corneum Lipiden

Nachteilig bei der Verwendung der silikonisierten Dialysemembran als hydrophobe Trennmembran bei den Permeationsuntersuchungen ist der direkte Kontakt des entsprechenden Silikons mit den in vitro Modell Systemen. Es wurde deshalb sowohl der Einfluß der Silikone auf die Mikrostruktur einer ausgewählter Modell Lipid Mischung als auch auf exzidiertes humanes Stratum corneum (siehe 3.2.10.2) untersucht.

3.3.1.7 Silikon-Modell Lipid Mischungen

Mischung M5, bestehend aus ungesättigten und gesättigten FS wurde mit jeweils 10% (m/m) des entsprechenden Silikones (siehe 3.3.1.2.1) versetzt und die Mischung durch Zentrifugieren (10-15 Zentrifugierdurchgänge) homogenisiert. Die weitere Untersuchung erfolgte mit den unter 3.2.3 bis 3.2.6 beschriebenen Methoden.

4 Versuchsergebnisse und Diskussion

4.1 Physikochemische Charakterisierung der in vitro Modell Lipid Systeme

Um genaue Aussagen über den strukturellen Aufbau von Mehrkomponentensystemen machen zu können, müssen diese mit verschiedenen, voneinander unabhängigen Methoden untersucht werden. Am sinnvollsten erfolgt hierbei zuerst die Charakterisierung der einfach zusammengesetzten Systeme, die schrittweise durch die verschiedenen Komponenten ergänzt werden. Im folgenden werden deshalb die physikochemischen Eigenschaften der Grundsysteme M1-M7 beschrieben und miteinander verglichen, um den Effekt der zugesetzten Bestandteile auf die Mikrostruktur der Systeme aufzuzeigen.

4.1.1 Physikochemische Eigenschaften der Modell Lipid Systeme M1-M7

Rein makroskopisch handelt es sich bei allen Systemen um hochviskose, teilweise gelartige Zubereitungen wobei die reinen Fettsäuremischungen höher viskos als die entsprechenden Systeme mit Ceramiden und Cholesterol erscheinen. Bei den Cholesterol enthaltenden Mischungen **M2** und **M6** sind bereits nach dreitägiger Lagerung Kristalle sichtbar. Die anderen Systeme zeigen auch nach zweiwöchiger Lagerung keine auffälligen makroskopischen Veränderungen.

4.1.1.1 Polarisationsmikroskopische Untersuchungen

Bei der Betrachtung dünner, zwischen Glasplatten präparierter Proben unter dem Polarisationsmikroskop erkennt man ein Bild, das die effektive Doppelbrechung des polarisierten Lichtes ortsabhängig darstellt und als Textur bezeichnet wird. Da diese Doppelbrechung eng mit der inneren Struktur einer Probe zusammenhängt, ist die sichtbare Textur ein wichtiges Hilfsmittel zur Strukturaufklärung einer flüssigkristallinen Phase.

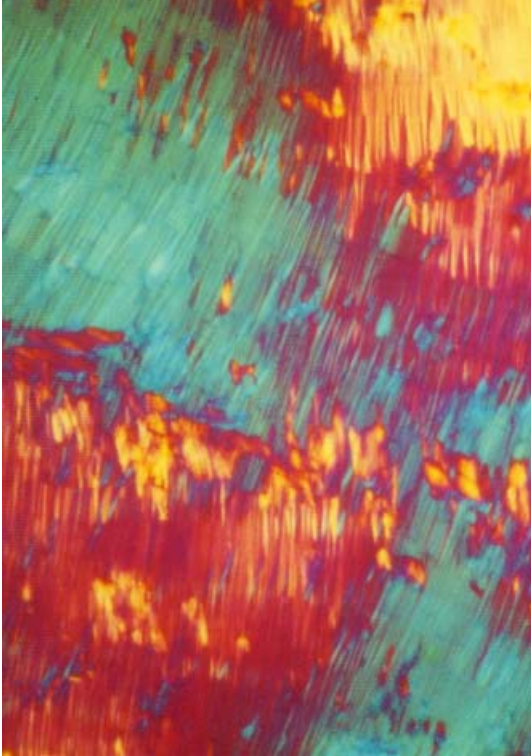
Sämtliche Mischungen zeigen eine anisotrope Textur, die je nach untersuchter Probe unterschiedlich ausgeprägt ist und die je nach Dicke des Präparates unterschiedliche Farben aufweist. Alle Mischungen wurden bei Raumtemperatur und bei 32°C, entsprechend der Temperatur an der Hautoberfläche untersucht, wobei allerdings bei keinem der Systeme eine Veränderung der Textur zu erkennen war. Außerdem wurden die Proben beim Aufheizen bis auf 100°C und anschließendem Abkühlen beobachtet. Mit Ausnahme der Mischungen **M1** und **M5** zeigten die Proben im untersuchten Temperaturbereich keine starken Veränderungen

ihrer Textur. Bei der Grundmischung aus ungesättigten Fettsäuren (**M1**) erkennt man direkt nach Auftragen der Probe eine flächige, nicht geometrische Textur (Abb. 4.1.a), die auf das Vorliegen einer hexagonalen Assoziatüberstruktur innerhalb des Systems hinweist [Rosevear 1954]. Da bei der Präparation der Proben auf dem Objektträger zur Herstellung ausreichend dünner Schichten eine Scherung der Proben unvermeidbar ist, die meist mit einer Störung der flüssigkristallinen Strukturen einhergeht, ist die Betrachtung der Proben nach einer gewissen Relaxationszeit sinnvoll. Hierbei muß darauf geachtet werden, daß bei wasserhaltigen Proben eine Veränderung der Proben während der Lagerung aufgrund eines Wasserverlustes vermieden wird. Bei **M1** tritt nach 4h Relaxationszeit eine Textur (Abb. 4.1.b) auf, die in der Literatur als fächerartig oder "fanlike" beschrieben wird [Rosevear 1954, Demus und Richter 1978]. Beim Aufheizen bleibt diese Fächertextur zwar erhalten, die Flächen der einzelnen "Fächer" scheinen aber an Größe zuzunehmen. Beim langsamen Abkühlen der auf 100°C aufgeheizten Probe bildet sich eine Textur, die einen höheren Ordnungsgrad aufweist (Abb. 4.1.c), da sich die Assoziate fast störstellenfrei arrangieren können und durch die polare Oberfläche des Objektträgers und die damit verbundenen polaren Wechselwirkungen eine Ausrichtung bzw. Umorientierung der Lipidaggregate resultiert.

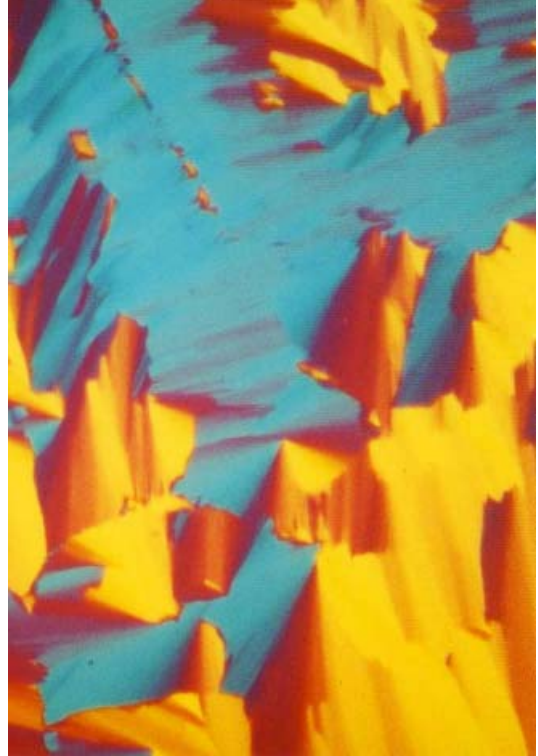
Die beobachtete Fächertextur ähnelt der in der Literatur beschriebenen focal-conic texture oder Fokalkegelschnitt-Textur smektisch flüssigkristalliner Phasen. Die smektischen Flüssigkristalle zählen zu den thermotropen Mesophasen, bei denen die Moleküle parallel zueinander und in Schichten angeordnet sind, wobei die Längsachsen entweder senkrecht (smektisch A) oder geneigt zur Schichtebene (smektisch C) ausgerichtet sein können. Durch mechanische oder thermischen Störung des flüssigkristallinen Systems ordnen sich die einzelnen Schichten zu konzentrischen Strukturdefekten, den sogenannten Dupin-Zykliden an, die ellipsoide oder hyperbelförmige Diskontinuitäten zeigen und als fokale Domänen polarisationsmikroskopisch sichtbar sind [Demus und Richter 1978].

Lamellare und hexagonale lyotrope Flüssigkristalle können ebenfalls als smektische Mesophasen angesehen werden, wobei in der Lamellarphase die Moleküle selbst und in Hexagonalphasen die Molekülassoziate schichtartig angeordnet sind. Das Auftreten von fächerartigen Texturen ist zwar sowohl für Lamellarphasen als auch für Hexagonalphasen möglich, wird aber häufiger für hexagonale Strukturen beschrieben [Rosevear 1954]. Durch das Fehlen der für Lamellarphasen typischen Polarisationskreuze (Malteserkreuze), die durch konzentrische Strukturdefekte in lamellaren Systemen zustande kommen, kann die Mischung deshalb dem hexagonalen Flüssigkristalltyp zugeordnet werden.

a)



b)



c)



Abbildung 4.1.: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen a) Grundmischung M1 (UFS) direkt nach der Präparation b) nach 4h Relaxationszeit c) nach Abkühlen der auf 100°C aufgeheizten Probe; Balkenlänge entspricht 100 μm

Durch Zusatz des Cholesterols zu dem Grundsystem aus ungesättigten Fettsäuren (**M2**) überwiegen im polarisationsmikroskopischen Bild der Mischung die für lamellare Phasen häufig beschriebene streifige, teilweise vernetzte Textur (Abb. 4.2.a) und oily streaks [Saupe 1977]. In der Literatur werden oily streaks als eine kettenartige Aneinanderreihung von Malteserkreuzen interpretiert [Saupe 1977].

Nach dreitägiger Lagerung sind neben den anisotropen Texturen stark doppelbrechende, scharf abgegrenzte Bereiche erkennbar, die aufgrund ihrer rhomboedrischen Form auf die Anwesenheit von kristallisiertem Cholesterolmonohydrat hinweisen (Abb. 4.2.b) [Loomis et al. 1979]. Im Bereich um das auskristallisierte Material treten vermehrt fächerartige Texturen auf, was darauf hindeutet, daß hier eine Transformation der lamellaren in eine hexagonale Struktur stattgefunden haben könnte.

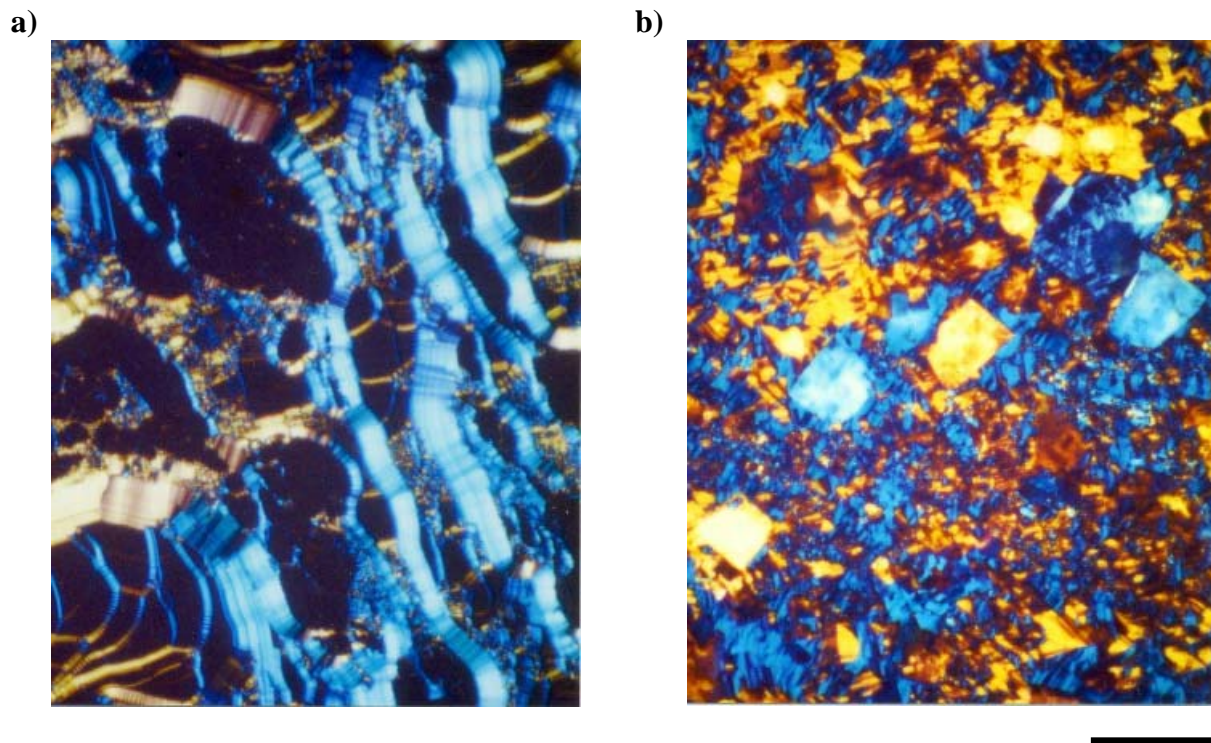


Abbildung 4.2.: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen der Mischung M2 (UFS + Cholesterol)
a) mit oily streaks b) mit Cholesterolmonohydratkristallen; Balkenlänge entspricht 100 μm

Mischung **M3** (UFS + Ceramide) zeigt eine Textur, die keine eindeutige Zuordnung zu einem flüssigkristallinen Typ erlaubt. Man erkennt farbige flächige Bereiche (Abb. 4.3.a), die zwar einen Hinweis auf das Vorliegen hexagonaler Strukturen geben könnten, ein Vergleich mit dem polarisationsmikroskopischen Bild des reinen Ceraderm S[®] (Abb. 4.3.b) macht dagegen die Ähnlichkeit beider Texturen deutlich. Demnach wird das Erscheinungsbild dieser Probe stark von den optischen Eigenschaften der Ausgangssubstanz dominiert.

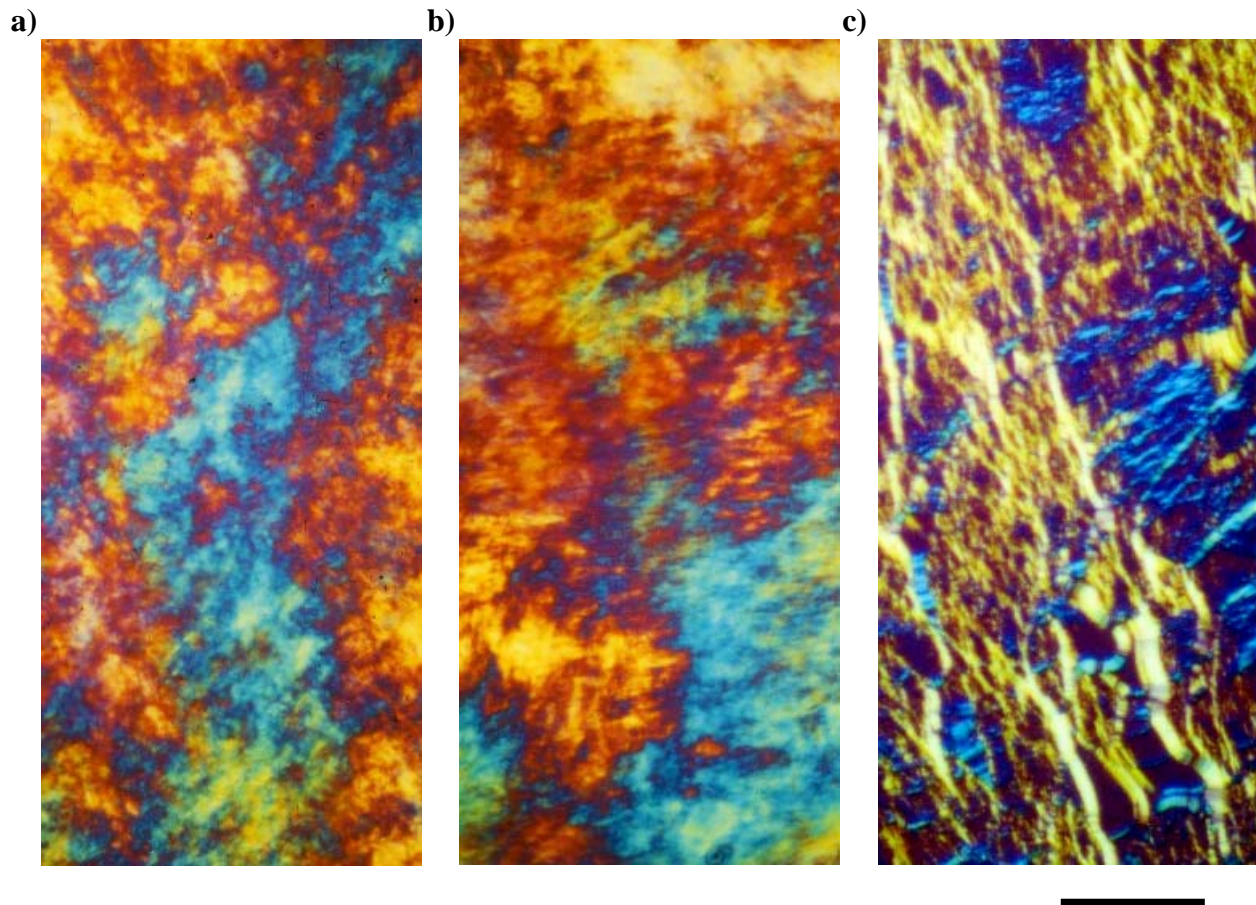


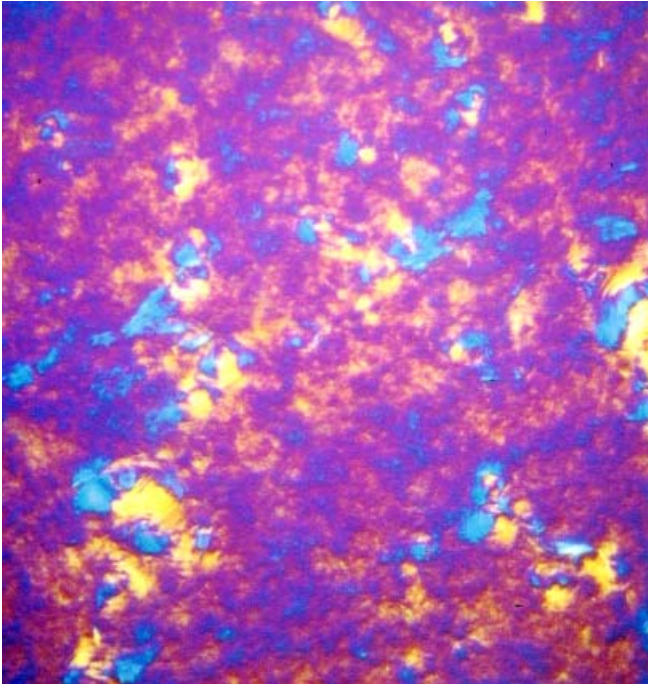
Abbildung 4.3.: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen a) Mischung M3 (UFS + Ceramide) b) Ceraderm S[®] c) M4 (UFS + Ceramide + Cholesterol); Balkenlänge entspricht 100 μm

Bei Mischung **M4** (UFS + Cholesterol + Ceramide) sind wieder die für lamellare Strukturen typischen netzartigen Texturen und oily streaks erkennbar (Abb. 4.3.c).

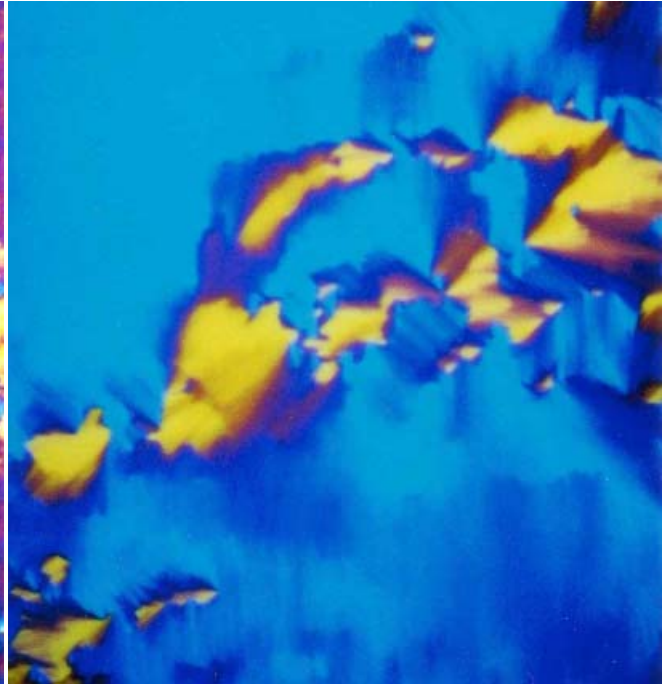
Mischung **M5**, die im Vergleich zu **M1** zusätzlich GFS enthält, zeigt im polarisationsmikroskopischen Bild ein anisotropes Erscheinungsbild aber keinerlei typische Texturen. Man erkennt vereinzelt stark doppelbrechende Bereiche, die besonders nach einer Relaxation der Probe auftreten (Abb. 4.4.a). Friberg [1988] bezeichnet eine derartige Textur als einen durch die Anwesenheit kristallinen Lipidmaterials verzerrten Flüssigkristall, bei dem Mikrokristalle in einer flüssigkristallinen homogenen Matrix eingebettet sind. Das Vorliegen von kristallin vorliegenden Lipiden wird durch die Beobachtungen der Probe beim Aufheizen und Abkühlen mittels eines Heitzisches unterstützt. Dabei transformiert die Probe bei 80°C in ein flächiges Texturbild (Abb. 4.4.b), charakteristisch für Hexagonalphasen, das beim Abkühlen eine feine Streifung aufweist (Abb. 4.4.c,d). Demus und Richter [1978] bezeichnen dies als paramorphes Verhalten des festen Zustandes, das auftritt, wenn dünne Schichten von festen Kristallen schmelzen und eine smektische Mesophase mit mehreren homogen aufgebauten Domänen bilden. Dabei besitzen die optischen Achsen unterschiedliche

Orientierung, die von der Ausrichtung des vorhergehenden Kristalls abhängt. Die einzelnen Domänen sind durch streifenförmige Banden getrennt, die der Form der festen Kristallite folgen. Da beim Übergang fest \rightarrow flüssigkristallin für Hexagonalphasen typische Texturen erkennbar sind, erscheint bei dem vorliegenden System diese Struktur zu überwiegen.

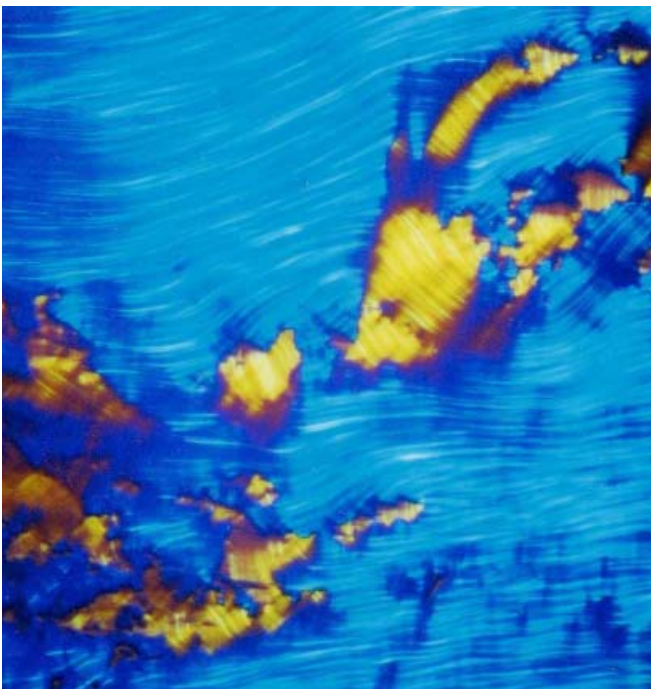
a)



b)



c)



d)

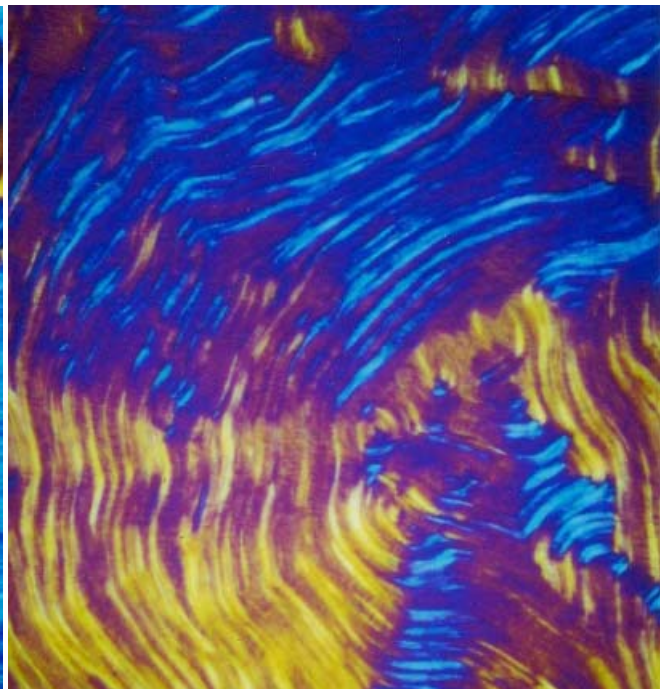
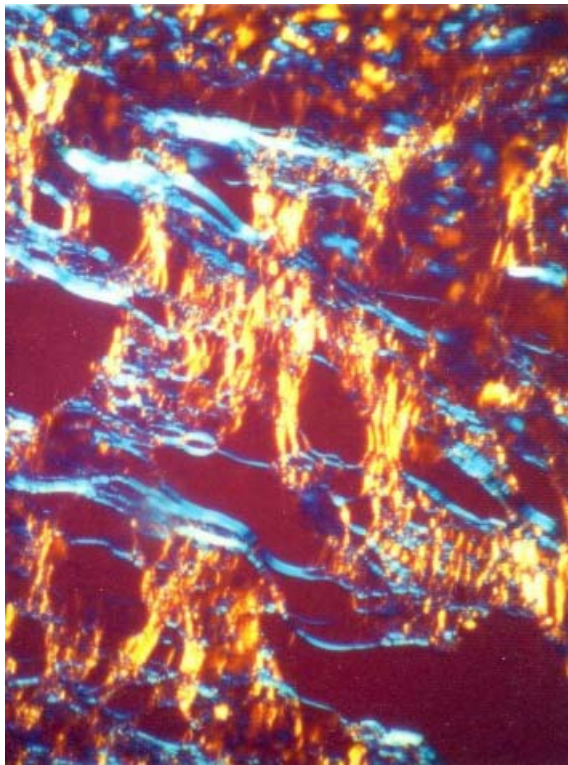


Abbildung 4.4.: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen a) Mischung M5 (UFS + GFS) b) bei 80°C c) beim Abkühlen des Präparates d) nach Abkühlen bei RT; Balkenlänge entspricht 100 μm

Mischung **M6** (UFS + GFS + Cholesterol) zeigt im Vergleich zur entsprechenden Mischung ohne GFS (**M2**) eine sehr ähnliche Textur. Oily streaks, die eine feine Streifung aufweisen erscheinen in einer homöotropen Umgebung (Abb. 4.5.a). Homöotrope oder pseudoisotrope Bereiche ohne Doppelbrechung sind häufig in lamellaren Phasen zu finden, bei denen sich die einzelnen Lamellen parallel zur Oberfläche von Objektträger und Deckglas orientieren. Da die optische Achse des Flüssigkristalls parallel zur Ausbreitungsrichtung des einfallenden Lichtes verläuft, tritt keine Doppelbrechung ein und das Präparat erscheint in einzelnen Bereichen optisch isotrop. Nach einer gewissen Relaxation sind in dem Präparat zahlreiche Malteserkreuze zu erkennen (Abb. 4.5.b).

a)



b)

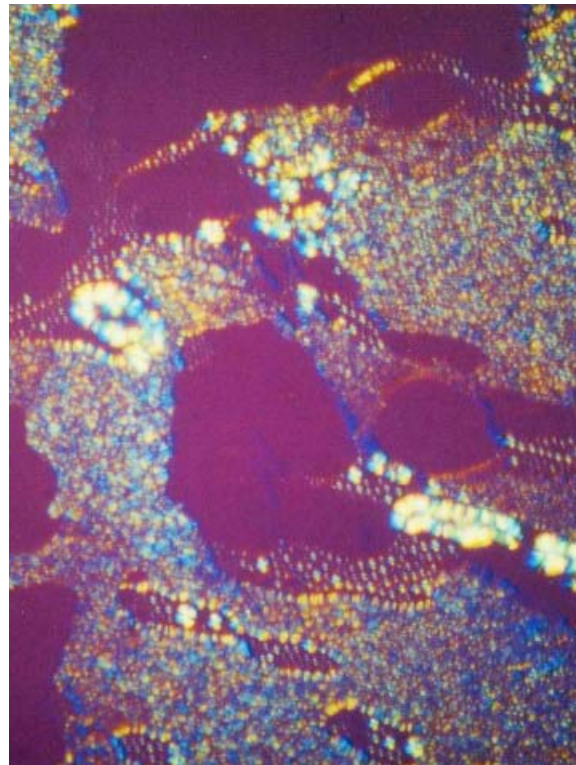


Abbildung 4.5.: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen der Mischung M6 (UFS + GFS + Cholesterol)
a) oily streaks b) Malteserkreuze; Balkenlänge entspricht 100 μm

Das polarisationsoptische Erscheinungsbild der Mischung **M7** (UFS + GFS + Ceramide) unterscheidet sich kaum von Mischung **M3** und läßt wieder eine ähnliche Textur mit flächigen Bereichen erkennen wie bei Ceraderm S[®]. Eine Zuordnung des Systems zu einer flüssigkristallinen Phase ist nur durch weitere physikochemische Untersuchungen möglich.

4.1.1.2 Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung der Systeme (TEM)

Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie können kolloidale und somit auch flüssigkristalline Strukturen sichtbar gemacht werden. Bei der für die Probenaufbereitung benutzten Gefrierbruchtechnik verläuft die Bruchzone der bei -100°C gebrochenen Probe im allgemeinen durch Bereiche der geringsten Wechselwirkungen zwischen den beteiligten Molekülen. Bei Systemen mit hydrophilen und lipophilen Bestandteilen gibt es deshalb bevorzugte Bruch- und Gleitebenen. Während im Bereich polarer Kopfgruppen die Moleküle des flüssigkristallinen Systems über Wasserstoffbrückenbindungen in Wechselwirkung miteinander treten, sind die Reste der CH-Ketten im Innern lipophiler Schichten nur über schwache Van-der-Waals-Londonkräfte miteinander verbunden, weshalb häufiger lipophile Bruchebenen mit glatterm Erscheinungsbild im elektronenmikroskopischen Bild zu erkennen sind. Da der Bruchvorgang aber auch von der zufälligen Ausrichtung der flüssigkristallinen Strukturen auf dem Probenträger abhängt, werden ebenfalls hydrophile Bruchebenen erzeugt, die meist durch absublimiertes Wasser ein leicht gekörntes Aussehen zeigen. Die TEM-Aufnahmen gefriergebrochener und replizierter Proben bestätigen für die Grundmischung **M1** aus UFS das Vorliegen eines hexagonalen Flüssigkristalls. So sind sowohl Abbruchkanten mit unterschiedlich langen röhrenförmigen Assoziaten in hexagonaler Anordnung zu erkennen, als auch eine feine parallele Streifung der Probe, die wahrscheinlich durch einen Bruch entlang der Längsachse der röhrenförmigen Assoziate resultiert (Abb. 4.6.).

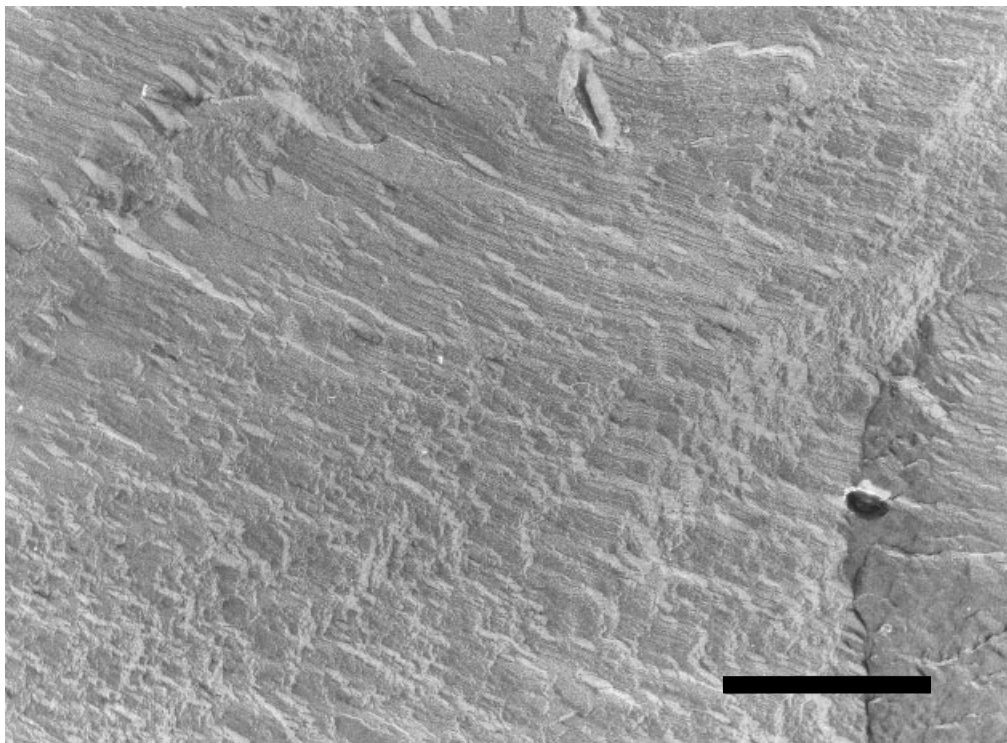


Abbildung 4.6.: TEM-Aufnahme der Grundmischung M1 (UFS); Balkenlänge entspricht 500 nm

Bei der Betrachtung der Replika von **M1** zeigen sich nur vereinzelt Bereiche mit lamellarem Aufbau. Dagegen wird bei der cholesterolhaltigen Probe (**M2**) deutlich das Vorliegen lamellarer Strukturen sichtbar, die leicht durch die terrassenförmigen unregelmäßigen Abbruchkanten identifiziert werden können (Abb. 4.7.a). Daneben erkennt man hexagonale Bereiche (nicht dargestellt), wobei nicht quantifiziert werden kann, welche der vorliegenden flüssigkristallinen Phasen dominiert.

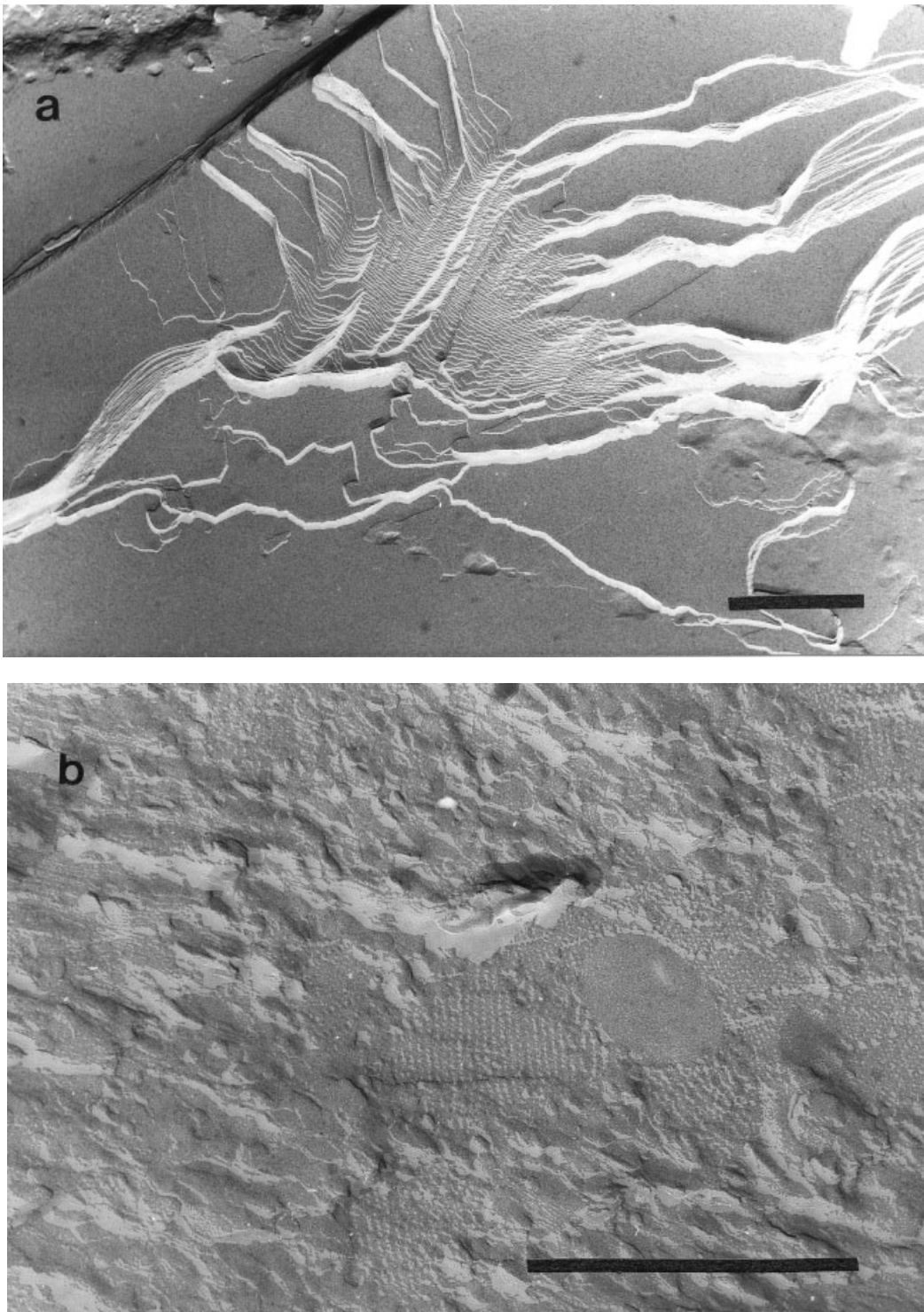


Abbildung 4.7.: TEM-Aufnahmen von a) M2 (UFS + Cholesterol) und b) M3 (UFS + Ceramide); Balkenlänge entspricht 500 nm

Durch Zusatz von Ceramiden zu den UFS (**M3**) sind in TEM-Aufnahmen hexagonale und lamellare Bereiche zu erkennen, wobei die Hexagonalphase überwiegt. Die in Abb. 4.7.b. zu sehenden punktförmigen und in einem rechten Winkel zueinander liegenden Bereiche können nicht eindeutig zugeordnet werden. Es könnte sich hier zum einen um eine kubische Packung von Mizellen handeln, zum anderen könnte der Bereich auch als Aufsicht auf eine nicht ideal zentrisch-rechtwinklige Anordnung röhrenförmiger Assoziate einer Hexagonalphase zu interpretieren sein.

Bei Mischung **M4** (UFS + Ceramide + Cholesterol) erscheint die Probe fast ausschließlich aus lamellaren Strukturen zu bestehen (Abb. 4.8.). Die unregelmäßig geschwungenen Schichten deuten auf die gute Verformbarkeit der lamellaren Mesophase hin, die durch den quasiflüssigen Charakter der lipophilen Doppelschicht hervorgerufen wird. Kristalline Schichtgitter würden dagegen nach Heering [1985] gerade und scharfkantige Bruchflächen zeigen.

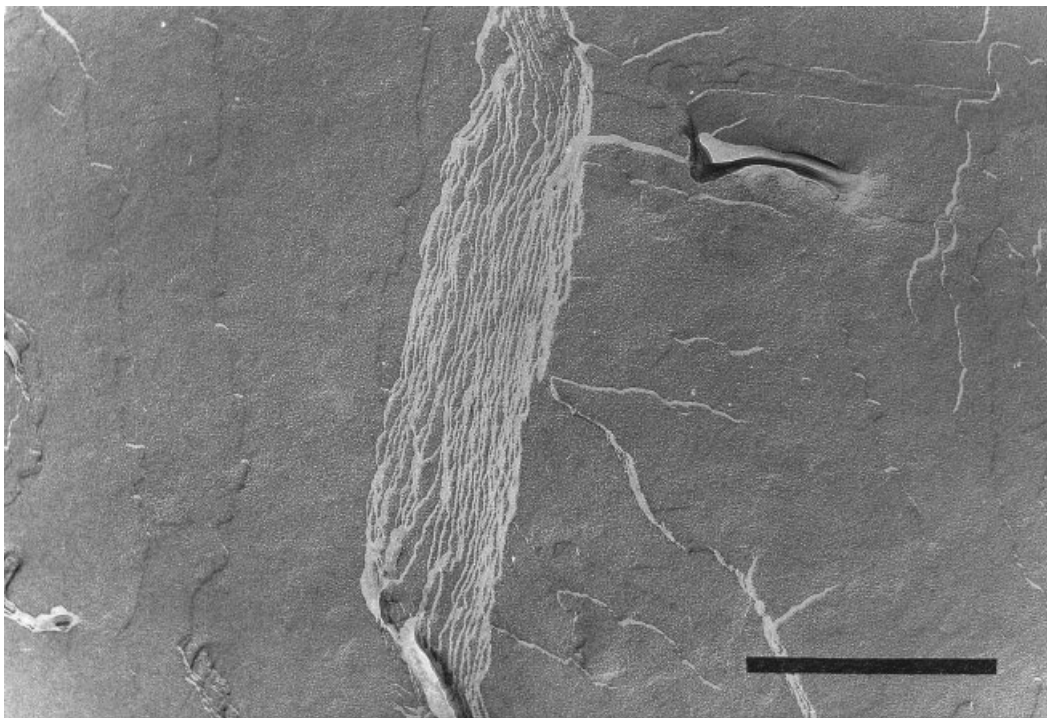


Abbildung 4.8.: TEM-Aufnahme der Mischung M4 (UFS + Ceramide + Cholesterol);
Balkenlänge entspricht 500 nm

Das Vorliegen derartiger Gelphasen konnte bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Mischung **M5**, bestehend aus UFS und GFS, visualisiert werden. Bei der Lamellarphase fallen die geraden Bruchkanten der Einzelschichten und die strenge parallele Anordnung der Schichten zueinander auf (Abb.4.9.). Derartig geordnete Mesophasen besitzen eine strukturelle Ähnlichkeit mit der smektischen B_{HEX} -Phase thermotroper Flüssigkristalle [Demus und Richter 1978]. Innerhalb einer Schicht sind die Moleküle in hexagonaler

Packung angeordnet (Abb. 4.10.), wobei insgesamt nur eine eingeschränkte Bewegungsmöglichkeit resultiert, bei der die Moleküle lediglich um die Längsachse rotieren können. Der Bruch erfolgt durch die von der Elementarzelle vorgegebenen günstigsten Gleitebenen. Da für smektische B_{HEX} -Phasen ebenfalls paramorphe Texturen bei der polarisationsmikroskopischen Betrachtung beschrieben werden, wird durch die TEM-Untersuchung das Vorliegen einer gelartigen Mikrostruktur in dieser Mischung unterstützt.

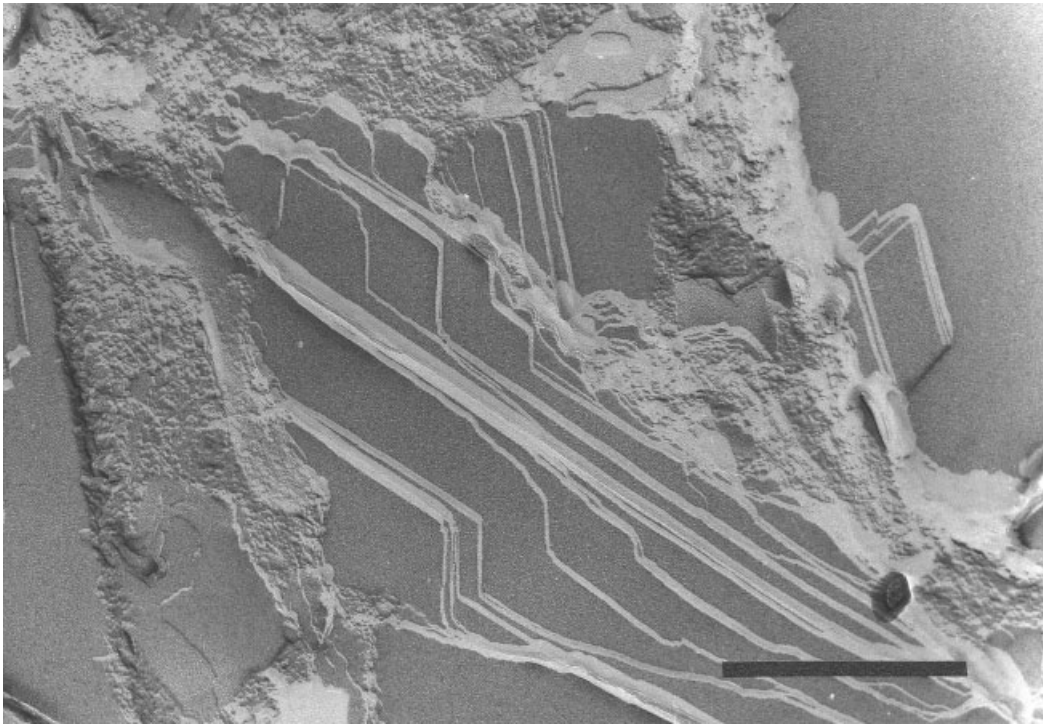


Abbildung 4.9.: TEM-Aufnahme der Mischung M5 (UFS + GFS); Balkenlänge entspricht 500 nm

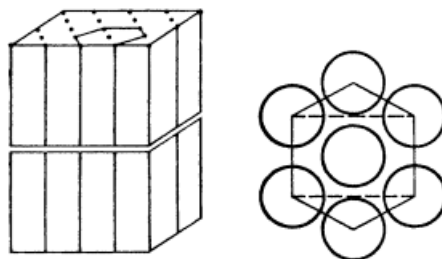


Abbildung 4.10.: Strukturmodell der smektischen B_{HEX} -Phase nach Demus und Richter [1978]

Daß der Zusatz der GFS zur Ausbildung geordneter Assoziate führt, wird auch bei der Betrachtung von **M6** (UFS + GFS + Cholesterol) und **M7** (UFS + GFS + Ceramide) deutlich. Die lamellaren Bereiche dieser Mischungen zeichnen sich durch das häufige Auftreten

gerader; scharfkantiger Bruchkanten aus (Abb. 4.10.a, b). **M6** erscheint hauptsächlich lamellar, während bei **M7** auch deutlich hexagonale Bestandteile zu erkennen sind (nicht dargestellt).

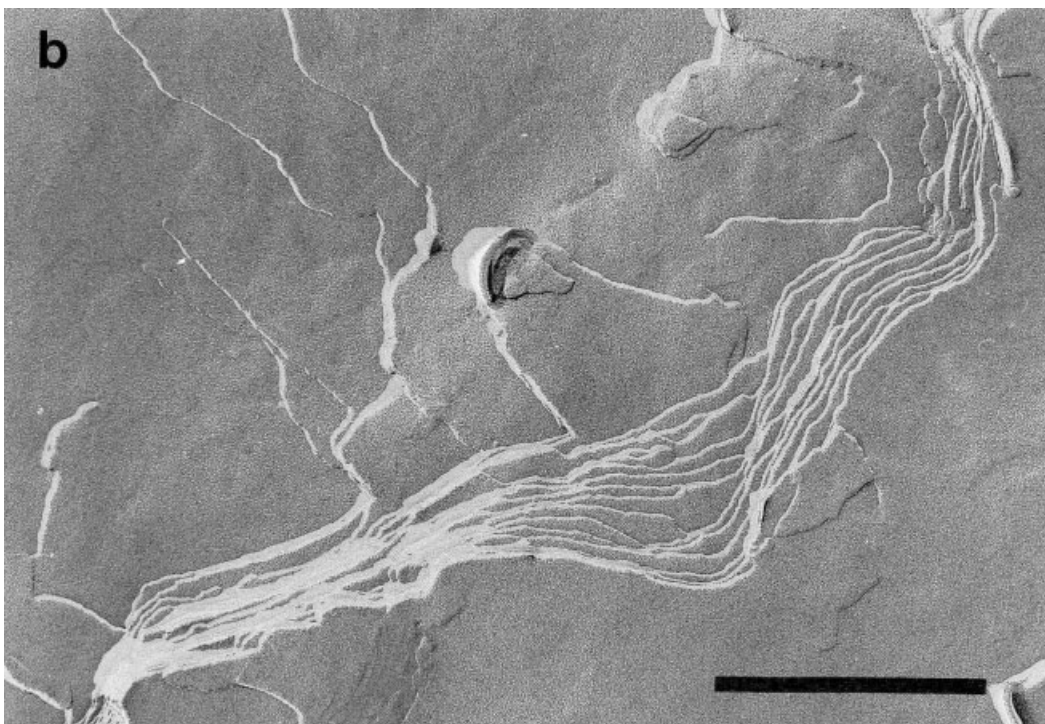
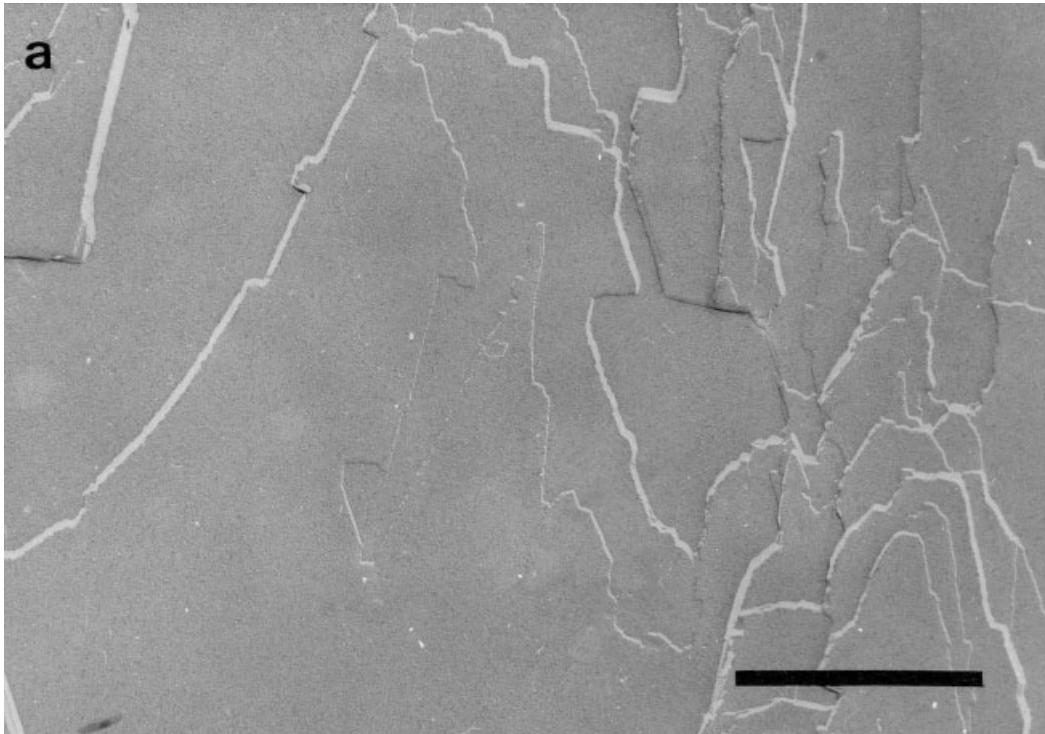


Abbildung 4.10.: TEM-Aufnahmen von a) M6 (UFS + GFS + Cholesterol) und b) M7 (UFS + GFS + Ceramide); Balkenlänge entspricht 500 nm

4.1.1.3 Charakterisierung der Mischungen durch Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD)

Durch die polarisationsmikroskopische Untersuchung einer Mehrkomponenten-Mischung ist häufig keine eindeutige Zuordnung des Systems zu einer bestimmten Mikrostruktur möglich. TEM-Aufnahmen können zwar die kolloide Struktur visualisieren, geben aber in der Regel nicht die realen Verhältnisse in mehrphasigen Systemen wieder, da nur ein kleiner Ausschnitt der Probe betrachtet wird. Durch das Schockgefrieren der Probe wird zwar im allgemeinen eine Vitrifizierung der Mikrostruktur erreicht, eine Phasentransformation kann dennoch nicht immer sicher ausgeschlossen werden, insbesondere wenn Phasengrenzbereiche untersucht werden, in denen Transformationen verschiedener flüssigkristalliner Phasen ineinander wahrscheinlich sind. Als Ergänzung zu den mikroskopischen Methoden wurden die Systeme zur Strukturaufklärung mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelbeugung (Small Ange X-Ray Diffraction = SAXD) untersucht.

Durch das Vorliegen von periodischen Strukturen mit Wiederholungslängen in der Größe des verwendeten Lichtes können hier Beugungsphänomene ausgenutzt werden, wodurch sich die vorliegenden Systeme durch die in der Literatur beschriebenen typischen Interferenzfolgen zu einer bestimmten Mesophase zuordnen lassen.

Mit Ausnahme von **M1** und **M6** sind bei allen untersuchten Mischungen sowohl die Interferenzfolgen 1. bis 3. Ordnung einer Hexagonalphase in Abständen von $1 : 1/\sqrt{3} : 1/\sqrt{4}$ als auch die einer Lamellarphase von $1 : 1/2 : 1/3$ zu detektieren.

Der für die Lamellarphase aus dem ersten Intensitätsmaximum ermittelte Netzebenenabstand d setzt sich zusammen aus der Moleküldoppelschicht und der Schicht des interlamellar eingelagerten Wassers. Aus den Netzebenenabständen für die Hexagonalphase läßt sich nach dem Satz des Pythagoras der Durchmesser der röhrenförmigen Assoziate berechnen (siehe 2.1.2.3), der sich aus dem im Inneren der Röhren befindlichen Wasser und den mit den lipophilen Ketten nach außen gerichteten amphiphilen Molekülen ergibt.

Bei dem Grundsystem **M1** sind ausschließlich die Interferenzfolgen einer Hexagonalphase detektierbar. Der Netzebenenabstand beträgt 4,90 nm mit einem daraus berechneten Röhrendurchmesser von 5,64 nm (Tab. 4.12.). Die in dem System enthaltenen UFS gehören als langkettige protonierte bzw. als Alkalisalz vorliegende Fettsäuren nach Small [1968] zu den Lipiden der Klasse I und IIIA. Für Lipide der Klasse IIIA wird die Bildung flüssigkristalliner Phasen beschrieben, so daß in den untersuchten Systemen das Auftreten mesogener Strukturen zu erwarten war. Die Bildung einer hexagonalen Mesophase ist dann wahrscheinlich, wenn die in dem System enthaltenen Bestandteile eine kegelförmige

Molekülstruktur besitzen. Die enthaltenen UFS Öl- und Linolsäure besitzen cis-ständige Doppelbindungen, wodurch bei der einfach ungesättigten Ölsäure eine gewinkelte Konformation resultiert (Abb. 4.11.). Für die zweifach ungesättigte Linolsäure sind zwei unterschiedliche Konformationen möglich. So wird für den kristallinen Zustand eine eher gestreckte kettenartige Anordnung beschrieben, bei der die beiden Doppelbindungen nahezu parallel zueinander vorliegen (Abb. 4.11.a). Bei der pseudocycloiden Konformation liegen alle cis-Doppelbindungswinkel (57°) in der gleichen Ebene und die interolefinischen CH_2 -Gruppen befinden sich in cis-(gauche)-Anordnung in Bezug auf die Doppelbindung (Abb. 4.11.b). Es resultiert eine sichelförmige Konformation der Linolsäure, die allerdings nicht im kristallinen Zustand zu finden ist, sondern nur in bestimmten biologischen Systemen auftreten kann [Small 1986].

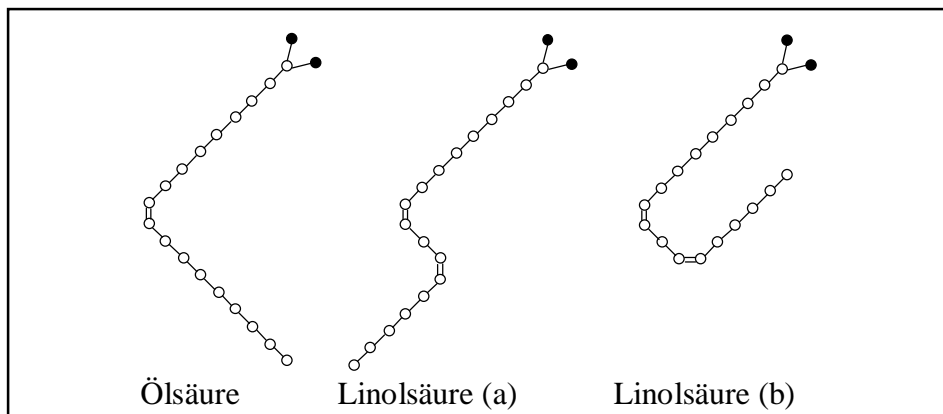


Abbildung 4.11.: Darstellung der Konformation der eingesetzten ungesättigten Fettsäuren nach Small [1986]

Bedingt durch die im flüssigen Zustand mögliche freie Rotation der Fettsäureketten um die Molekülachse besitzen die lipophilen Reste im Vergleich zur polaren Kopfgruppe ein sehr viel größeres Volumen, wodurch ein Packungsparameter > 1 und somit inverse Assoziatformen zu erwarten sind. In den untersuchten Systemen kommen jedoch 41% der Fettsäuren als Natrium-Salz vor, bei dem im Bereich der dissoziierten Carboxylfunktion eine stärkere Hydratation der Kopfgruppe als bei der undissoziierten Säure erfolgt. Dies führt zu einer Volumenvergrößerung der polaren Kopfgruppe und somit zu einer Verringerung des Packungsparameters.

Small [1968] untersuchte ternäre Systeme bestehend aus Ölsäure, Natriumoleat und Wasser und schlägt im Bereich niedriger Wasserkonzentrationen und einem Verhältnis der freien Säure zum Natriumsalz von 1:1 die vorrangige Bildung invers hexagonaler Strukturen vor.

Diese Beobachtungen werden von Cistola [1983] unterstützt, der das Phasenverhalten einer Ölsäure-Kaliumoleat Mischung 1:1 und deren Wechselwirkungen mit Wasser als Funktion

der Temperatur untersuchte. Das ermittelte Phasendiagramm zeigte eine Ähnlichkeit zum Verhalten der Klasse II-Lipide, bei denen im Bereich geringer Wasserkonzentrationen und oberhalb der sogenannten Krafft-Temperatur, der Schmelztemperatur des lipophilen Molekülteils, die Ausbildung von invers hexagonalen flüssigkristallinen Phasen beobachtet wird. Bei dem von Cistola untersuchten System existiert der invers hexagonale Bereich bis zu einem Wassergehalt von etwa 40%. Die Krafft-Temperatur des Systems beträgt in der wasserfreien Mischung 48°C, sinkt mit zunehmender Hydratation und erreicht bei 30% eine Temperatur von 11°C, die bei höheren Wasserkonzentrationen nahezu konstant bleibt. Die durch Röntgenmessungen bestimmten Netzebenenabstände liegen je nach Wassergehalt zwischen 4,0 nm und 5,7 nm (Röhrendurchmesser 4,6 nm bis 6,6 nm).

Obwohl die Zusammensetzung der Grundmischung **M1** mit dem beschriebenen System nicht direkt vergleichbar ist, ist durchaus eine Ähnlichkeit hinsichtlich physikochemischer Eigenschaften erkennbar, zumal der ermittelte Netzebenenabstand mit 4,90 nm im Bereich der Literaturdaten liegt.

Die in der Grundmischung **M1** zu detektierende flüssigkristalline Phase wird aufgrund dieser Überlegungen als invers hexagonale Struktur (H_{II}) interpretiert.

Die für lamellare Phasen typischen Interferenzfolgen können in dem untersuchten Grundsystem nicht erfaßt werden, was im Widerspruch zu den TEM-Untersuchungen steht, bei denen in dieser Probe vereinzelt lamellare Schichtungen zu erkennen waren. Eine Erklärung hierfür könnte sein, daß der mengenmäßige Anteil lamellarer Strukturen in diesem System zu gering und damit unterhalb der Nachweisgrenze ist. Andererseits darf bei der angewandten Gefrierbruchtechnik eine Veränderung der Probenstruktur aufgrund von Phasentransformationen trotz hoher Einfriergeschwindigkeiten (10^5 - 10^6 K/s) nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

In **M2** sind dagegen die Interferenzfolgen einer lamellaren und H_{II} -Phase nebeneinander zu detektieren. Der Zusatz des Cholesterols bewirkt bei der H_{II} -Phase einen Anstieg des Netzebenenabstandes von 4,90 auf 5,40 nm. Als amphiphiles Molekül kann Cholesterol mit den Fettsäuremolekülen interagieren. Während die polare Hydroxylfunktion des Cholesterols wahrscheinlich mit den polaren Kopfgruppen der Fettsäuren in Wechselwirkungen tritt, kann das steife, voluminöse Sterolskelett mit den CH-Ketten nahe der Kopfgruppen interagieren, wodurch deren Beweglichkeit stark eingeschränkt wird. Die Immobilisierung führt zu einer Streckung der lipophilen Reste und damit zu einer Vergrößerung des Netzebenenabstandes, was auch als kondensierender Effekt des Cholesterols bezeichnet wird [Small 1986]. Durch die Einschränkung der Beweglichkeit der Fettsäureketten verringert sich gleichzeitig deren

effektives Volumen, wodurch der Packungsparameter sinkt und die Ausbildung lamellarer Strukturen begünstigt wird. Das vorliegende System ist demnach zweiphasig, wobei H_{II} und lamellare Phase nebeneinander vorliegen. Betrachtet man die Intensitäten der Interferenzmaxima erster Ordnung, so kann ein Vergleich einen Hinweis darauf geben, welche Phase in einem untersuchten System überwiegt. Während bei allen anderen Mischungen eindeutige Intensitätsverteilungen zu finden sind, kann in Mischung **M2** eine solche Zuordnung aufgrund annähernd identischer Intensitäten nicht getroffen werden.

Mischung	Invers Hexagonal [nm]	Lamellar [nm]
M1 (UFS)	4,90 ± 0,07 n = 8 (5,65 ± 0,09)	—
M2 (UFS + Cholesterol)	5,54 ± 0,08 n = 8 (6,39 ± 0,09)	6,66 ± 0,21 n = 8
M3 (UFS + Ceramide)	5,85 ± 0,23 n = 3 (6,76 ± 0,26)	9,55 ± 0,07 n = 3
M4 (UFS + Ceramide + Cholesterol)	5,61 ± 0,18 n = 6 (6,48 ± 0,19)	7,32 ± 0,11 n = 6
M5 (UFS + GFS)	5,52 ± 0,08 n = 8 (6,37 ± 0,09)	4,38 ± 0,06 n = 8
M6 (UFS + GFS + Cholesterol)	—	4,44 ± 0,12 n = 8 6,01 ± 0,09 n = 8
M7 (UFS + GFS + Ceramide)	6,22 ± 0,15 n = 6 (7,18 ± 0,17)	8,55 ± 0,19 n = 6

Tabelle 4.12.: Gemessene Netzebenenabstände d der Modell Mischungen M1-M7. In Klammern sind die berechneten Röhrendurchmesser der Hexagonalphase angegeben

In der Literatur werden verschiedene Theorien zur Phasenumwandlung lamellar \rightarrow invers hexagonal diskutiert [Van Venitie und Verkleij 1981, Verkleij 1984, Caffrey, 1985, Seddon 1990]. Dabei wird durch Änderung des Packungsparameters eine Phasentransformation induziert. Die lamellare Phase wird in der Regel durch Moleküle mit zylindrischer Molekülgeometrie stabilisiert. Der Packungsparameter ändert sich beispielsweise durch Temperaturerhöhung oder Zusatz bestimmter Stoffe in eine konische Form. Van Venitie beschreibt die Phasenumwandlung eines lamellaren flüssigkristallinen Systems aus Phospholipiden, die über invers mizellare Strukturen innerhalb der Membran zur schrittweisen Umwandlung in eine H_{II} -Phase führt. Die auftretenden intramembranösen Strukturen werden als Lipidpartikel (Verkleij 1984) oder inverse micellar intermediate (IMI) bezeichnet. Abb. 4.13. gibt ein Modell der Phasenumwandlung nach Caffrey [1985] wieder.

Danach kann die Phasenumwandlung an jedem Punkt zwischen zwei Bilayern stattfinden, beginnt aber wahrscheinlich in Bereichen innerhalb eines lamellaren Systems, in dem aufgrund eines Strukturdefektes der Bilayer konzentrisch gefaltet vorliegt (Abb. 4.13. a). In dieser Region ist die innere Schicht stark gekrümmt, wodurch die freie Energie der Moleküle mit konischer Molekülgeometrie verringert wird, da sie hier den energetisch günstigsten Zustand in Bezug auf ihre Ausdehnung einnehmen. Nach Seddon [1990] wird dadurch der laterale Druck zwischen den lipophilen Ketten benachbarter Moleküle minimiert, der durch die Rotation der Kohlenwasserstoffkette um die Molekülachse entsteht. In angrenzenden Bereichen kommt es anschließend zu Ausstülpungen (Abb. 4.13 b) und zur Bildung einer Kontaktbrücke zwischen zwei Lamellen (Abb. 4.13.c), initiiert durch konische Moleküle innerhalb der planaren Layer, die sich im Zustand höherer Energie befinden. So bilden sich inverse Strukturen, die zu langen Röhren auswachsen, und deren Formation sich innerhalb der Lamelle fortsetzt (Abb. 4.13.d, e, f). Die polaren Kopfgruppen sind innerhalb der Röhren nach innen orientiert und treten mit dem eingelagerten Wasser in Wechselwirkung, während sie nach außen hin von einer Lipidschicht umgeben sind. Der beschriebene Übergang ist reversibel, so daß sich die Phasen in einem thermodynamischen Gleichgewicht befinden und eine Transformation invers hexagonal \rightarrow lamellar durch Änderung des Packungsparameters in Richtung einer Zylinderform erfolgen kann.

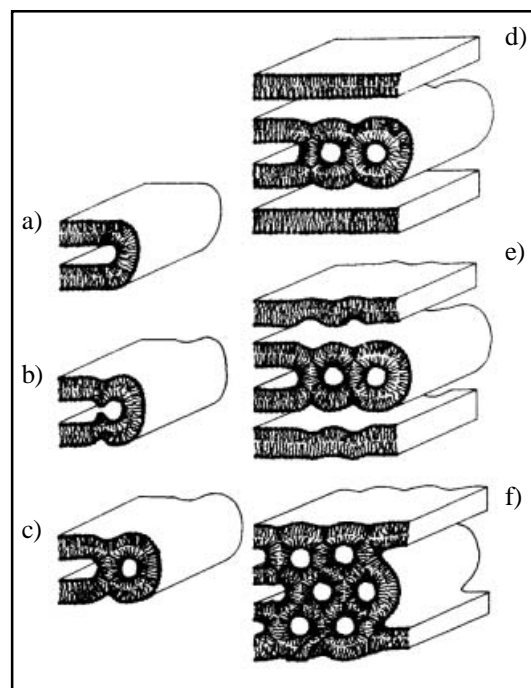


Abbildung 4.13.: Schematische Darstellung der Phasentransformation lamellar \rightarrow invers hexagonal nach Caffrey [1985]

Die Phasentransformation der Mischung **M2** kann ebenfalls als Folge der Änderung des Packungsparameters der UFS durch Cholesterol Zusatz interpretiert werden.

Die uneinheitlich detektierten Intensitätsverteilungen dieser Mischung könnten dadurch erklärt werden, daß die beiden flüssigkristallinen Phasen miteinander in einem dynamischen Gleichgewicht stehen, bei der sich die energetischen Zustände der Moleküle innerhalb der Phasen nicht stark unterscheiden und somit eine ständige Phasenumwandlung ineinander möglich ist. Das System erscheint außerdem nicht stabil, da in einigen Chargen die für Cholesterol typische Interferenz bei $d = 3,4$ nm detektiert werden konnte, was auf bereits auskristallisiertes Material hinweist.

Bei **M3** (UFS + Ceramide) dagegen ist die Intensität der H_{II} -Phase einheitlich fast dreimal so hoch wie die der ebenfalls zu detektierenden Lamellarphase, so daß davon ausgegangen werden kann, daß inverse Strukturen überwiegen. Durch den Zusatz von Ceraderm S[®] steigt der Netzebenenabstand der H_{II} -Phase bei **M3** im Vergleich zur Grundmischung (+ 0,95 nm), liegt aber im Bereich des Abstandes der Mischung **M2** mit Cholesterol. Daß der Netzebenenabstand der Lamellarphase dagegen fast 3 nm höher als bei **M2** liegt, kann durch die grundsätzlich andere Zusammensetzung der beiden lamellaren Phasen erklärt werden. Während sie bei **M2** (UFS + Cholesterol) wahrscheinlich aus hydratisierten Fettsäureanionen und Cholesterol gebildet wird, scheint bei **M3** (UFS + Ceramide) diese Phase hauptsächlich aus Ceraderm S[®] zu bestehen, bei dem teilweise UFS eingebaut werden und eine Quellung der Schichten durch Hydratation stattfindet. Dies wird durch die polarisationsmikroskopischen Untersuchungen von **M3** unterstützt, bei der diese Mischung ein ähnliches optisches Aussehen wie das Ceramid zeigte. Das eingesetzte Ceraderm S[®] besteht aus einer Mischung von Phospholipiden und Cerebrosiden, die nach Small [1986] zu den Klasse II-Lipiden gezählt werden und die meist bereits in Form multilamellarer Doppelschichten auskristallisieren. In wäßriger Umgebung lagern die Lipide das Wasser zwischen die polaren Kopfgruppen ein und können in Abhängigkeit von der Temperatur und der Molekülgeometrie lamellare flüssigkristalline Strukturen ausbilden.

Bei der SAXD-Untersuchung des reinen Ceraderm S[®] zeigt die Mischung die Interferenzfolgen von $1 : 1/2 : 1/3$ mit $d = 6,345$ nm, wodurch das Vorliegen von Bilayerstrukturen im nicht hydratisierten Zustand bestätigt wird. Bei der polarisationsmikroskopischen Untersuchung eines Kontaktpräparates Wasser-Ceraderm S[®], sind nach einiger Zeit Malteserkreuze zu erkennen, was darauf hinweist, daß bei der Substanz durch Wassereinlagerung die lamellare Struktur erhalten bleibt. Diese Beobachtungen

unterstützen die Existenz einer lamellaren Phase in **M3**, die hauptsächlich aus einem Ceraderm S[®]-Wasser Gemisch zusammengesetzt ist.

Das Assoziationsverhalten in Form von Bilayerstrukturen erklärt sich bei den Phospholipiden, die ubiquitär Bestandteile der Biomembranen sind, durch die zylindrische Molekülform mit einem Packungsparameter von etwa 1. Daneben wird für Phospholipide die Ausbildung von vesikulären konzentrisch geschichteten Strukturen beschrieben. Diese als Liposomen bezeichneten Vesikel können dabei aus einer einzigen bis hin zu vielen Lipiddoppelschichten bestehen (unilamellare, oligolamellare oder multilamellare Vesikel) [Gregoriades 1993]. Die Bildung erfolgt spontan in wäßrigen Medien, da bei offenem Ende der Doppelschicht hydrophobe Bereiche der Phospholipide mit dem Wasser in Kontakt treten müßten, was entropisch ungünstig wäre. Sphingolipide sind aufgrund fehlender Ladungen zwar weniger polar als Phospholipide, besitzen aber dennoch amphiphilen Charakter, der bei den Glucosylceramiden durch die Anwesenheit des Zuckerrestes in Position 1 der Sphingosinbase verstärkt wird. Da für die Sphingolipide die Bildung vesikulärer Partikel (häufig als Sphingosomen bezeichnet) beschrieben wird [Wertz et al. 1986, Abraham et al. 1987, 1989], müssen diese ebenfalls eine zylindrische Molekülform aufweisen, um stabile Lamellarphasen zu bilden.

Der erhöhte Netzebenenabstand der H_{II}-Phase von **M3**, der aber sehr viel geringer ausfällt als bei der Lamellarphase, läßt darauf schließen, daß nur geringe Mengen von Sphingolipiden bzw. Phospholipiden in die inversen Assoziante eingebaut werden. In den Cerebrosiden des Ceraderm S[®] sind neben gesättigten in geringem Maße auch ungesättigte CH-Ketten zu finden. Diese Bestandteile mit vergrößertem Packungsparameter können bevorzugt mit inversen Strukturen interagieren. Die Erhöhung des Netzebenenabstandes resultiert durch die größere Längenausdehnung der Substanzklasse im Vergleich zu den Fettsäuren.

Durch Zusatz von Cholesterol in Mischung **M4** (UFS + Cholesterol + Ceramide) ist die Lamellarphase mit ca. fünffacher Intensität im Vergleich zur H_{II}-Phase zu detektieren. Der Netzebenenabstand der H_{II}-Phase liegt im Bereich von **M3** (UFS + Ceramide), zeigt aber eine verringerte Schichtdicke der Lamellarphase (-2,23 nm im Vergleich zu **M3**). Cholesterol scheint somit bevorzugt in die Lamellarphase eingebaut zu werden, wohingegen die Zusammensetzung der H_{II}-Phase fast unverändert bleibt. Die beobachtete Verringerung des Netzebenenabstandes der Lamellarphase kann durch den in der Literatur ebenfalls beschriebenen fluidisierenden Effekt des Cholesterols auf lamellare Gel-Phasen zurückgeführt werden. Danach wirkt Cholesterol zwar auf lamellare flüssigkristalline Phasen kondensierend, in lamellaren Gel-Phasen dagegen stört es die Ordnung innerhalb der Alkylketten der Lipide,

so daß diese sich in einem Intermediärzustand zwischen Gel und flüssigkristalliner Phase befinden [Ladbrooke und Chapman 1969, Small 1986]. Da in dem vorliegenden Ceramid-Gemisch zum großen Teil auch gesättigte Fettsäuren nachgewiesen wurden, die zum Teil eine Kettenlänge von C:24 aufweisen, kann hier ebenfalls eine Störung geordneter Bereiche durch das Cholesterol stattgefunden haben. Eine Verkürzung der Moleküle durch die Fluidisierung ist die Folge, die sich in einem kleineren Netzebenenabstand äußert.

M5 enthält UFS und GFS und zeigt im Gegensatz zur Grundmischung die Interferenzfolgen der beiden flüssigkristallinen Phasen, wobei die Intensität der H_{II} -Phase ($d = 5,52$ nm) etwa dreimal höher als bei der Lamellarphase ($d = 4,38$ nm) liegt. Die lipophilen Ketten der GFS besitzen eine geringere laterale Volumenausdehnung, wodurch der Packungsparameter sinkt und lamellare Strukturen gebildet werden können. Unterhalb der Krafft-Temperatur liegen die lipophilen CH_2 -Ketten bevorzugt in der gestreckten all-trans Konfiguration vor, so daß insgesamt eine größere Längenausdehnung resultiert, die im Vergleich zur Grundmischung zu einem Anstieg des Netzebenenabstandes der H_{II} -Phase führt (+ 0,62). Weiterhin wird die Rotation der UFS um die Molekülachse eingeschränkt, wodurch ebenfalls eine Streckung resultiert. Aufgrund der polarisationsmikroskopischen und TEM-Untersuchungen dieses Systems wird für die Lipide der Lamellarphase der Gel-Zustand angenommen. Theoretisch sind dabei drei unterschiedliche Anordnungen der Alkylketten möglich. So können diese sowohl senkrecht zur Bilayer Achse als auch in einem bestimmten Neigungswinkel ("tilted form" = L_{β}) angeordnet sein. Die geneigte Form wird für Systeme beschrieben, bei denen die polare Kopfgruppe größer als die laterale Ausdehnung der CH-Ketten ist, was bei Monoalkylfettsäuren auch in hydratisierter Form nicht der Fall ist. Eine weitere Anordnung, bei der die CH-Ketten lateral ineinandergreifen ("interdigitated form"), wird für langkettige Monoalkyl-Systeme beobachtet [Fairhurst et al. 1998]. Der für die Lamellarphase von **M5** bestimmte Netzebenenabstand von 4,4 nm liegt im angegebenen Bereich des Abstandes eines wäßrigen lamellaren Systems aus Natriumstearat (4,6 nm) [nach Small 1986]. Berücksichtigt man unterschiedliche Kettenlängen der Lipide und geringe Anteile an inkorporierten UFS, die eine dicht gepackte Anordnung der ineinandergreifenden Alkylketten stören, so besteht die vorliegende lamellare Gel-Phase wahrscheinlich ebenfalls hauptsächlich aus den Anionen der in dem System enthaltenen gesättigten Fettsäuren.

In **M6** (UFS + GFS + Cholesterol) werden Netzebenenabstände von 6,01 nm und 4,44 nm ermittelt, wobei ersterer eine etwa fünfmal höhere Intensität aufweist. Aufgrund der Interferenzfolgen können die auftretenden Phasen einer lamellaren Struktur zugeordnet werden. Somit kommt es durch das Cholesterol zu einer zunehmenden Transformation der

H_{II} -Phase in eine lamellare Phase. In Gegenwart von Cholesterol wird die Bildung eines Zwischenzustandes induziert, bei der die Fluidität der CH-Ketten unterhalb der Phasenübergangstemperatur Gel \rightarrow flüssigkristallin erhöht wird, während die Fluidität der Ketten oberhalb dieses Übergangs eingeschränkt wird [McElhaney 1982]. Bei den UFS führt dies zu einer Verringerung des Packungsparameters, die eine Lamellarphase begünstigt, bei der Gelphase erfolgt eine Transformation $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$. Dadurch resultiert eine überwiegend lamellare Mikrostruktur, die mit den vorhergehenden Systemen nicht mehr vergleichbar ist. Da die Cholesterolmenge in dieser Mischung niedriger als die Menge der eingesetzten Fettsäuren ist, können wahrscheinlich nicht alle Fettsäure Moleküle in dieses lamellare System eingebaut werden, so daß die zweite Phase möglicherweise aus der zuvor beschriebenen lamellaren Gel-Phase aus Fettsäureanionen besteht. Dies würde auch den mit **M5** vergleichbaren Netzebenenabstand erklären.

Bei Mischung **M7** (UFS+ GFS + Ceramide) liegen dagegen wieder H_{II} -Phase ($d = 6,22$) und lamellare Phase ($d = 8,55$) mit vergleichbarer Intensität nebeneinander vor. Ceraderm S[®] wird in beide Phasen eingebaut, was an der Vergrößerung der Netzebenenabstände erkannt werden kann. Durch den in dieser Mischung mengenmäßig geringeren Anteil an Ceramiden fällt die Schichtdicke der Lamellarphase im Vergleich zu **M3** ($d = 9,55$) kleiner aus. Weiterhin scheint in Gegenwart von GFS ein vermehrter Einbau der Ceramide in die H_{II} -Phase möglich, da hier der Netzebenenabstand ebenfalls deutlich zugenommen hat. Der Zusatz von Ceramiden allein bewirkt in diesem System allerdings keine vollständige Transformation in ein System mit rein lamellarer Mikrostruktur.

4.1.1.4 Röntgenweitwinkelbeugung (WAXD)

Durch Messungen im Weitwinkelbereich kann zwischen flüssigkristalliner und Gelphase bzw. kristallin vorliegenden Strukturen unterschieden werden. Flüssigkristalline Phasen zeigen im Diffraktogramm in der Regel nur eine diffuse Bande (Halo) bei etwa 0,45 nm, die durch die "flüssigen" beweglichen Alkylketten der Moleküle hervorgerufen wird [Luzatti 1968]. Dennoch ist in diesem System eine gewisse Ordnung durch die Vorzugsorientierung der CH-Ketten zur Grenzfläche zu finden. Ist die Beweglichkeit der Ketten eingeschränkt, so treten desweiteren Intensitätsunterschiede innerhalb dieser diffusen Bande auf. Gelartige Lamellarphasen (L_{β}), bei der die Alkylketten in der starren all-trans Konformation vorliegen, sind durch einen scharfen Reflex bei 0,42 nm zu detektieren, wohingegen Weitwinkel-Diffraktogramme kristalliner Systeme durch eine größere Anzahl scharfer Interferenzen

gekennzeichnet sind. Da das Diffraktogramm der Grundmischung **M1** im Winkelbereich $2\theta = 2^\circ$ - 35° ein Halo mit Schwerpunkt bei $0,45 \text{ nm}$ zeigt (Abb. 4.14.a.), kann davon ausgegangen werden, daß das System eine flüssigkristalline Mikrostruktur aufweist. Eine zusätzliche Interferenz niedriger Intensität bei $2\theta = 3,2^\circ$ ($d = 2,76 \text{ nm}$) kann als Interferenz zweiter Ordnung der H_{II} -Phase aufgefaßt werden.

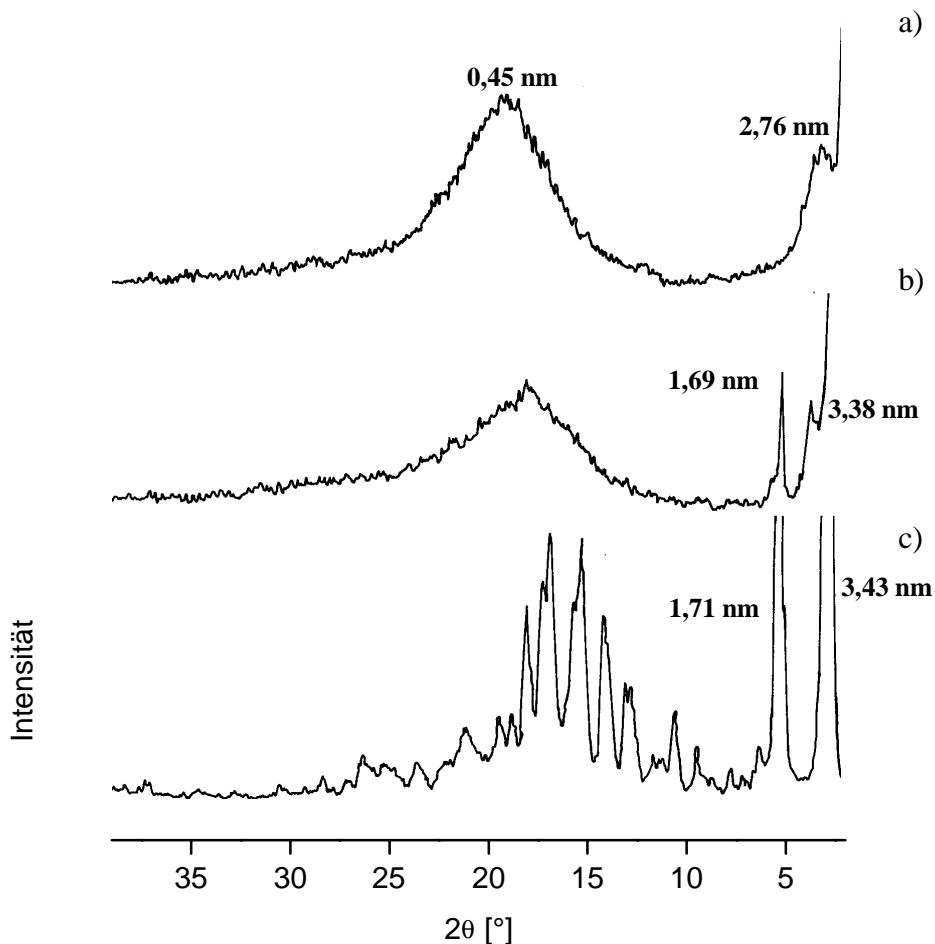


Abbildung 4.14.: Weitwinkel-Diffraktogramme von a) Mischung M1 b) Mischung M2 c) Cholesterol, aufgenommen bei 20°C

Bei Mischung **M2** sind zusätzlich einige scharfe Interferenzen zu erkennen, die beim Vergleich mit dem Diffraktogramm des reinen Cholesterol teilweise als Cholesterolinterferenzen interpretiert werden können (Abb.4.14.b,c). Die Netzebenenabstände von jeweils $d = 3,38 \text{ nm}$ und $d = 1,69 \text{ nm}$ liegen im Bereich der Literaturdaten für Cholesterol und Cholesterolmonohydrat [Craven 1986]. Demnach ist in der vorliegenden Mischung ein geringer Anteil des enthaltenen Cholesterols auskristallisiert, das in Übereinstimmung mit den polarisationsmikroskopischen Untersuchungen wahrscheinlich in Form des Monohydrates

vorliegt. Jedoch ist die Menge offensichtlich so gering oder die Kristallite so klein, daß andere für kristallines Cholesterol typische Interferenzen mit geringerer Intensität nicht mehr detektierbar sind bzw. durch den auftretenden breiten Peak überlagert werden. Dadurch ist auch keine eindeutige Zuordnung mittels WAXD möglich, ob Cholesterol oder dessen Monohydrat vorliegt.

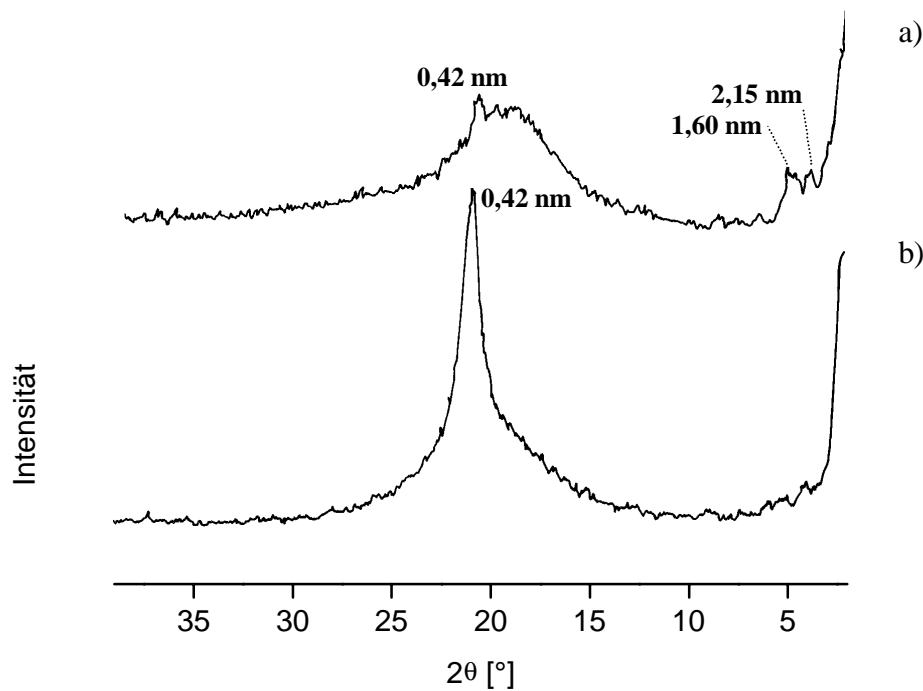


Abbildung 4.15.: Weitwinkel-Diffraktogramme von a) Mischung M3 b) von Ceraderm S[®], aufgenommen bei 20°C

Durch Zusatz der Ceramide zu **M3** bleibt die flüssigkristalline Mikrostruktur erhalten. Die zusätzlich zum Halo im Diffraktogramm erkennbaren Interferenzen können einerseits als Interferenzen höherer Ordnung der Lamellar- und der Hexagonalphase aufgefaßt werden (bei $d = 1,6 \text{ nm}$ und $2,15 \text{ nm}$) und werden andererseits durch das enthaltene Ceraderm S[®] (bei $d = 0,42 \text{ nm}$) verursacht. Abb. 4.15.b. zeigt das Diffraktogramm des Ceraderm S[®] im Vergleich zur Mischung **M3**. Die beim Ceraderm S[®] auftretende relativ scharfe Interferenz bei einem Beugungswinkel von $2\theta = 21,3^\circ$ ($d = 0,42 \text{ nm}$) stimmt gut mit dem für lamellare Gel-Phasen (L_β) beschriebenen Netzebenenabstand überein, bei dem die CH-Ketten eine hexagonale Packung einnehmen [Small 1986, Fairhurst 1998]. Danach besteht Ceraderm S[®] bereits als Reinsubstanz aus schichtartigen Strukturen, in denen einige der Alkylketten im Gelzustand mit einer eingeschränkten Mobilität vorliegen. In **M3** selbst erfolgt schließlich eine Quellung der Schichten durch Hydratation und der begrenzte Einbau von Fettsäuren in das Ceramid.

Die immer noch zu detektierende Interferenz der L_{β} -Phase könnte einerseits auf noch nicht veränderte Ceraderm S[®] Bestandteile in der Mischung hinweisen, andererseits könnte die mittels SAXD- Messungen nachgewiesene Lamellarphase als L_{β} -Phase vorliegen. Bei **M4** handelt es sich wieder um ein rein flüssigkristallines System. Das Diffraktogramm (nicht dargestellt) ähnelt dem von **M1**, in dem zum einen ein Halo bei $d = 0,45$ nm und zum anderen eine Interferenz höherer Ordnung bei $d = 1,76$ nm auftritt, die der Lamellarphase zugeordnet werden kann. Die Lamellarphase liegt in diesem System als L_{α} -Phase vor und Cholesterol kann vollständig solubilisiert werden.

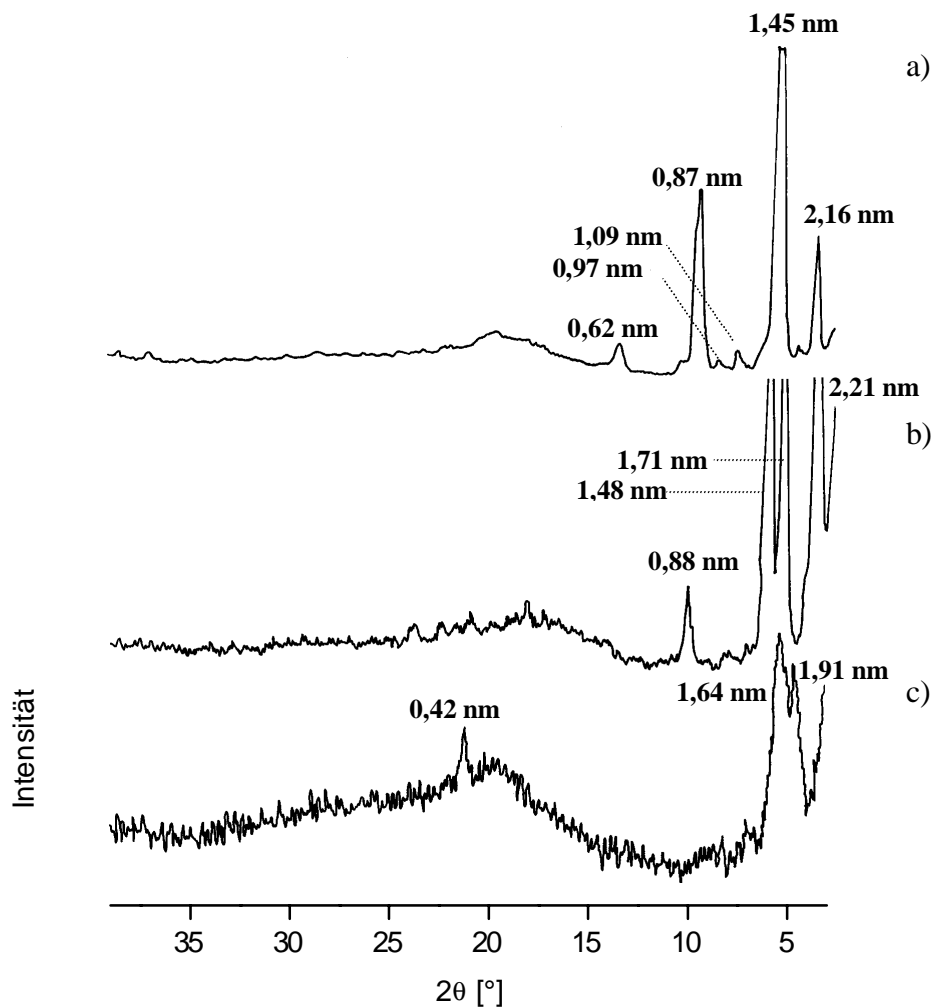


Abbildung 4.16.: Weitwinkel-Diffraktogramme von a) Mischung M5 b) Mischung M6 und c) Mischung M7, aufgenommen bei 20°C

Setzt man jetzt der Grundmischung aus UFS die GFS zu (**M5**), so sind im Diffraktogramm neben dem schwächer ausgeprägten Halo bei 0,45 nm eine Reihe scharfer Interferenzen zu erkennen (Abb. 4.16.a). Die berechneten Netzebenenabstände von 2,16 nm, 1,45 nm, 1,09 nm und 0,87 nm entsprechen dem Verhältnis $1/2 : 1/3 : 1/4 : 1/5$ des mittels SAXD ermittelten

Netzebenenabstandes für die lamellare Phase und sind somit als Interferenzen 2., 3., 4. und 5. Ordnung dieser Phase zu interpretieren. Die Interferenzen bei 0,97 nm und 0,62 nm konnten nicht zugeordnet werden.

Röntgendiffraktogramme kristalliner Stoffe zeigen im allgemeinen einige Interferenzen im Kleinwinkelbereich aber eine größere Anzahl von Interferenzen im gesamten Weitwinkelbereich. Das Fehlen scharfer Interferenzen im Winkelbereich $> 15^\circ$ deutet darauf hin, daß die regelmäßig zueinander orientierten Alkylketten der Moleküle eine gewisse Beweglichkeit beispielsweise im Hinblick auf eine Rotation um die Molekülachse besitzen. Derartige Gel-Phasen werden für Mischungen von Monoalkyl-Tensiden beschrieben, bei der Derivate mit unterschiedlichen Alkylkettenlängen (in der Regel bis zu vier C-Atome Unterschied) zusammen eine L_β -Anordnung einnehmen können [Fairhurst 1998], während dies bei den Einzelkomponenten nicht der Fall ist. Zusätzlich können die Moleküle in dem System unterschiedliche Kopfgruppen besitzen. So wird in einer Mischung aus Natriumdodecylsulfat (SDS) und Dodecanol, im Gegensatz zu SDS allein, die Ausbildung einer gemischten Gelphase beobachtet [Kékicheff 1989].

Die eingesetzten Fettsäuren in **M5** unterscheiden sich ebenfalls nur durch insgesamt vier C-Atome, weshalb die hier diskutierte Anordnung für das System ebenfalls möglich scheint.

Röntgenweitwinkelmessungen an **M6** (UFS + GFS + Cholesterol) (Abb. 4.19.b.) zeigen wie bei **M5** neben dem Halo bei 0,45 nm und einigen Cholesterolinterferenzen zusätzliche scharfe Interferenzen. Legt man die Netzebenenabstände der beiden durch SAXD nachgewiesenen Lamellarphasen zugrunde, so entsprechen die Interferenzen bei 2,21 nm, 1,48 nm und 0,88 nm den Interferenzen höherer Ordnung. Für die beiden Lamellarphasen wird in der Mischung eine jeweils unterschiedliche Zusammensetzung postuliert. Die Menge des zugesetzten Cholesterols reicht demnach nicht aus, um eine einzige Lamellarphase zu bilden.

Das Diffraktogramm von **M7** (UFS + GFS + Ceramide) ähnelt dem Diffraktogramm vom Mischung **M3** ohne GFS, wobei die Interferenzen, die wahrscheinlich als Interferenzen höherer Ordnung der mittels SAXD nachgewiesenen flüssigkristallinen Phasen interpretiert werden können, Unterschiede zu **M3** hinsichtlich des Netzebenenabstandes aufweisen. Das Halo bei 0,45 nm gibt den Hinweis auf eine flüssigkristalline Anordnung in dem System, wobei die Existenz einer L_β -Phase nicht ausgeschlossen werden kann.

4.1.1.5 Thermoanalytische Untersuchungen (DSC)

4.1.1.5.1 DSC-Untersuchungen der Mischungen M1-M7

Bei der thermoanalytischen Untersuchung extrahierter Stratum corneum Lipide zeigt das Thermogramm einen endothermen Übergang bei etwa 65°C, der als Phasenübergang Gel → flüssigkristallin innerhalb der Lipide interpretiert wird [Golden et al. 1986]. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Mischung zu erhalten, die einen Phasenübergang in diesem Bereich aufweist, weshalb ein Untersuchungsbereich zwischen 5°C und 90°C gewählt wurde.

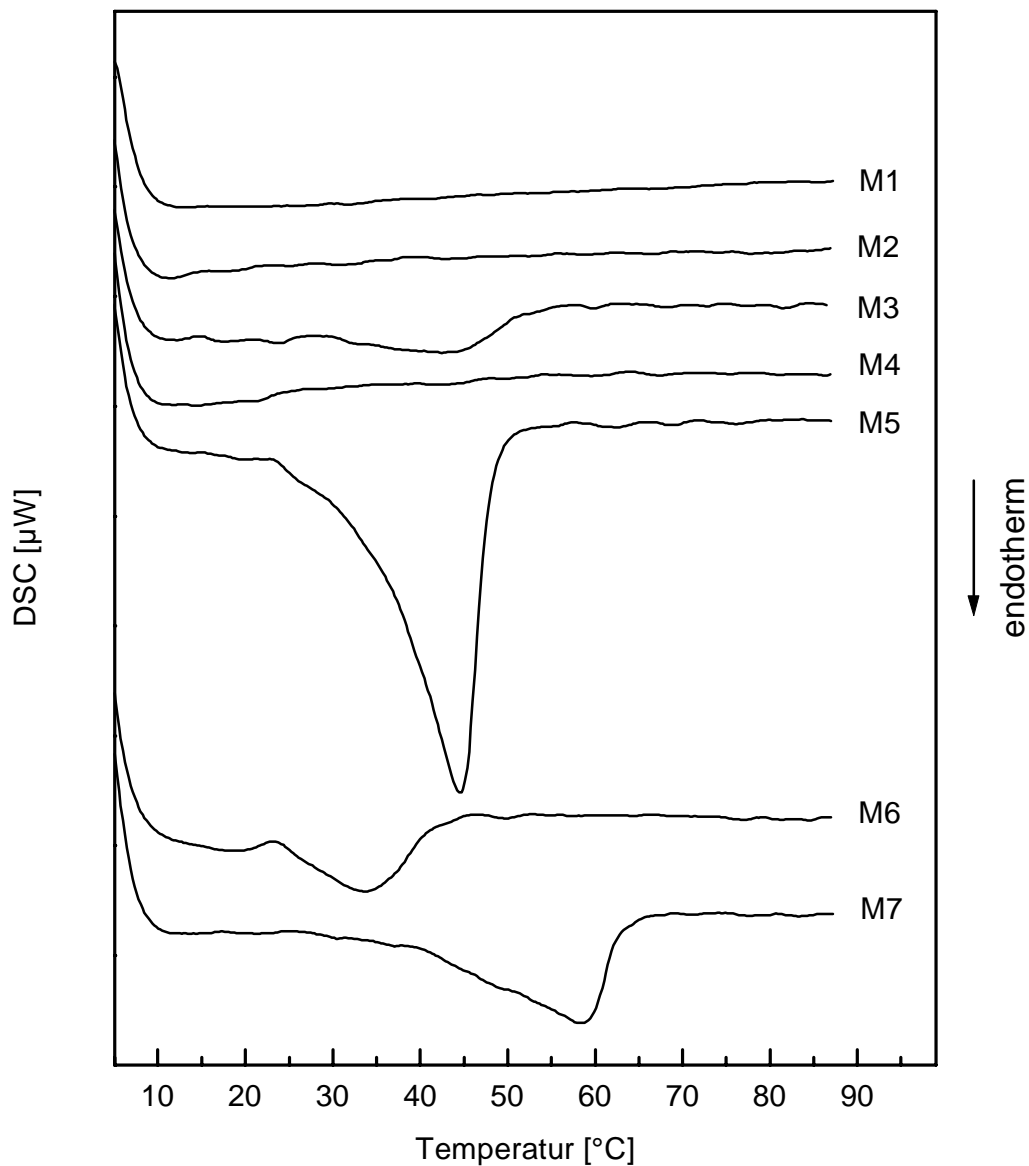


Abbildung 4.17.: DSC-Kurven der Mischungen M1-M7; die Probeneinwaage betrug zwischen 2,5 und 3,5 mg

Mischung	T _P [°C]	Enthalpie [mJ/mg]
M1 (UFS)	keine Phasenübergänge	—
M2 (UFS + Cholesterol)	keine Phasenübergänge	—
M3 (UFS + Ceramide)	42,99 ± 0,73	5,9 ± 0,1
M4 (UFS + Ceramide + Cholesterol)	keine Phasenübergänge	—
M5 (UFS + GFS)	45,10 ± 0,59	59,3 ± 1,1
M6 (UFS + GFS + Cholesterol)	31,04 ± 0,45	10,3 ± 0,7
M7 (UFS + GFS + Ceramide)	56,43 ± 0,21	29,9 ± 0,2

Tabelle 4.17.1.: Phasenübergänge und Enthalpien der Mischungen M1-M7 (n = 3)

Da bei den untersuchten Mischungen die Bestimmung der extrapolierten Anfangstemperatur T_e als Schnittpunkt zwischen Wendetangente und Basislinie (= onset) aufgrund einer abfallenden Basislinie teilweise nicht durchführbar war, werden im folgenden die Temperatur des Peakmaximums T_P und die Enthalpie des Phasenübergangs miteinander verglichen. Bei den Messungen wurde deshalb auf ähnliche Probeneinwaagen geachtet. Die Bestimmung der Enthalpie der Phasenumwandlungen erfolgt durch Integration der Fläche unter der Kurve des detektierten Peaks. Abb. 4.17. gibt das thermische Verhalten von **M1-M7** zwischen 5°C und 90°C wieder. Ein endothermer Peak ist in diesem Fall ein nach unten zeigendes Meßsignal.

M1 und **M2** weisen im untersuchten Temperaturbereich keinerlei endotherme oder exotherme Phasenübergänge auf. Dies stimmt mit den polarisationsmikroskopischen Untersuchungen überein, die beim Aufheizen der Proben bis 90°C keine Veränderung des Aussehens der Proben zeigten. Setzt man dem Grundsystem das Ceraderm S[®] hinzu (**M3**), so tritt ein breiter Phasenübergang bei 43°C mit einer relativ geringen Übergangsenthalpie von 5,9 mJ/mg auf. Dieser Peak ist bei **M4** nicht mehr vorhanden. DSC-Untersuchungen des Systems aus UFS und GFS (**M5**) zeigen hingegen einen endothermen Phasenübergang bei 45,10°C mit einer Übergangsenthalpie von etwa 59 mJ/mg. Der Zusatz von Cholesterol zu diesem System (**M6**) bewirkt eine Verschiebung dieses Übergangs um etwa 14°C zu niedrigeren Temperaturen und ist außerdem mit einer starken Verringerung der Peakenthalpie verbunden. Daneben findet man in dem Thermogramm dieser Mischung einen breiten Übergang bei etwa 20°C, dessen Enthalpie aufgrund des Einschwingvorganges der Basislinie am Anfang der Messung nicht bestimmt werden kann. In **M7** dagegen ist ein breiter Phasenübergang bei 56,43°C mit einer

Enthalpie von etwa 30 mJ/mg vorhanden. Der Zusatz des Ceramids bewirkt also eine Verschiebung des Peakmaximums zu höheren Temperaturen aber eine Verringerung der Enthalpie im Vergleich zu **M5**.

Der Phasenübergang von **M3** wird durch das enthaltene Ceramid Gemisch verursacht, das im untersuchten Temperaturbereich einen breiten Phasenübergang bei $76,89^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,70$) und eine Schulter bei 52°C aufweist (Abb. 4.18.). Bei der Untersuchung von N-Palmitoylgalactosylsphingosin beobachteten Ruocco et al. [1981] bei 96°C einen endothermen Phasenübergang, der durch röntgenanalytische Untersuchungen der Phasenumwandlung $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$ zugewiesen wurde. Durch Hydratisierung der Substanz verschob sich das Peakmaximum um etwa 14°C zu niedrigeren Temperaturen. Da es sich bei dem Ceraderm S[®] um ein Substanzgemisch vieler Komponenten handelt, bei denen die Bestandteile unterschiedliche Kettenlängen aufweisen, erwartet man einen breiteren Phasenübergangsbereich, bei dem die unterschiedlichen Alkylketten nacheinander in der Mischung schmelzen. Durch die enthaltenen Phospholipide wird zusätzlich die Kettenanordnung gestört, daher resultieren geringere Übergangstemperaturen als bei den reinen Cerebrosiden.

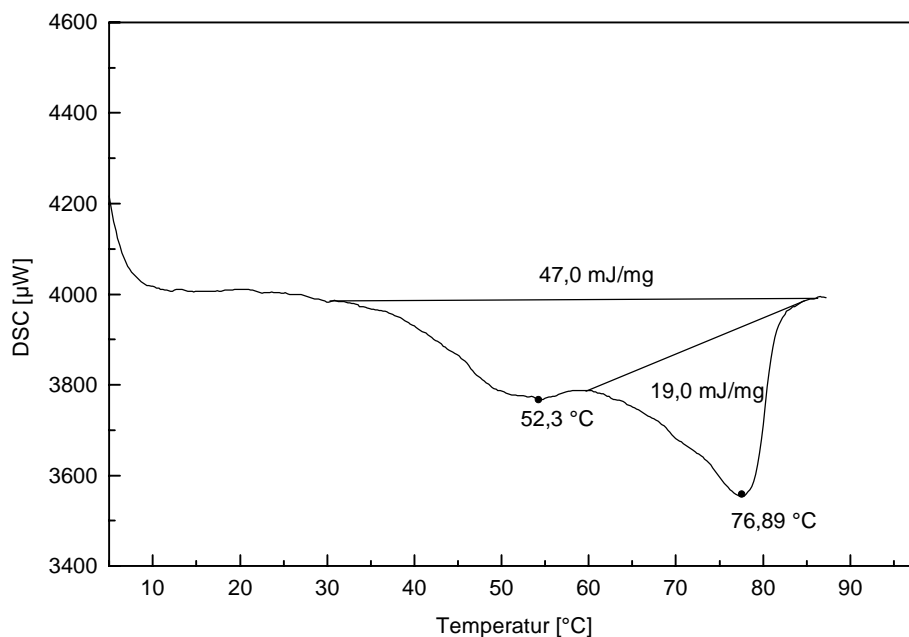


Abbildung 4.18.: Thermogramm von Ceraderm S[®]

Da polarisationsmikroskopisch keine Veränderung der Texturen im untersuchten Temperaturbereich beobachtet wurde, kann der in **M3** auftretende Peak ebenfalls dem

Phasenübergang $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$ der Lamellarphase oder noch unveränderter Ceraderm S[®] Bestandteile zugeschrieben werden.

Der Zusatz des Cholesterols (**M4**) bewirkt eine Phasentransformation dieser geordneten Gelphase in eine rein flüssigkristalline Struktur. Cholesterol selbst weist zwischen 5 und 90°C eine polymorphe Phasenumwandlung bei etwa 46°C auf, Cholesterolmonohydrat gibt bei 86°C sein Kristallwasser ab, wodurch ein endothermer Phasenübergang zustande kommt. Der Anteil von nicht solubilisierten Cholesterol muß demnach in der Mischung so gering sein, daß evt. stattfindende Umwandlungen nicht meßbar sind.

DSC-Messungen an wäßrigen Lecithin-Cholesterol Mischungen haben gezeigt, daß Cholesterol sowohl den Phasenübergang des Lecithins verbreitert und zu niedrigeren Temperaturen verschiebt als auch die Enthalpie verringert. Bei einem molaren Verhältnis von 1:1 konnte kein Übergang mehr detektiert werden [Ladbrooke und Chapman 1969]. Da **M3** nur zum Teil lamellare Gelphasen enthält, reicht somit die Menge des Cholesterols in **M4** zur vollständigen Transformation in eine rein flüssigkristalline Mikrostruktur aus. Der fluidisierende Effekt des Cholesterols prägt sich ebenfalls im Thermogramm von **M6** aus.

Die hohe Enthalpie des Überganges bei **M5** unterstützt die Hypothese, daß die lamellaren Bereiche in diesem System als L_{β} -Phase vorliegen, da Gelphasen hohe Phasenumwandlungsenthalpien zeigen, die etwa 25-75% der Schmelzenthalpie der kristallinen Reinsubstanz betragen können [Luzatti 1968, Fairhurst 1998].

Die Verschiebung des Peakmaximums zu höheren Temperaturen bei **M7** im Vergleich zu **M5** erklärt sich durch den Zusatz von Bestandteilen, die die intermolekularen Wechselwirkungen in dem System verstärken. So ist durch den an der Kopfgruppe des Sphingosins gebundenen Zuckerrest die Bildung zusätzlicher H-Brückenbindungen möglich. Die verringerte Umwandlungsenthalpie kann durch den Austausch der Fettsäuren durch das Ceraderm S[®] zustande kommen. Da der Betrag der Enthalpie relativ hoch ist, befindet sich ein Teil der Moleküle möglicherweise immer noch im gelartigen Zustand.

4.1.1.5.2 DSC-Untersuchungen der Ausgangssubstanzen und deren Mischungen

Bei der Transformation einer Gelphase in eine flüssigkristalline Anordnung der Moleküle kommt es innerhalb der Alkylketten der amphiphilen Moleküle durch die zugeführte thermische Energie zur vermehrten Bildung von gauche-Konformeren und Kinken. Man spricht hier auch von einem "Kettenschmelzen" der Alkylketten. Die Zahl der gauche-Konformationen pro CH₂-Segment relativ zu den trans-Segmenten erhöht sich von 0,07 in der

Gel-Phase auf 0,4 beim Übergang in die flüssigkristalline Phase. Aufgrund sterischer Wechselwirkungen ist die Bildung von gauche-Isomeren um ca. 2 kJ/mol pro CH₂-Gruppe energetisch ungünstiger, weshalb für den Phasenübergang L_β → L_α relativ hohe Energien notwendig sind. Die Umwandlungsenergien flüssigkristallin → flüssigkristallin bzw. flüssigkristallin → isotrop flüssig betragen dagegen nur einige mJ/mg. Da die für Gelphasen ermittelten Enthalpien zwischen 25 und 75% der Schmelzenthalpien der Reinsubstanzen betragen, wurden im folgenden die Ausgangssubstanzen und deren Mischungen ohne Wasserzusatz untersucht. Da bei Mischungen aus Fettsäuren und den entsprechenden Natriumseifen mit der üblichen Herstellungsmethode keine Homogenität erzielt werden konnte, handelt es sich hier nur um die reinen Fettsäuremischungen.

Substanz/Mischung	T _p [°C]	Enthalpie [mJ/mg]
Myristinsäure	54,55 ± 0,34	199,7 ± 3,1
Palmitinsäure	63,64 ± 0,07	216,7 ± 1,6
Stearinsäure	70,13 ± 0,15	221,9 ± 2,2
FS-Gemisch gesättigter Fettsäuren	57,37 ± 0,21	170,2 ± 6,1
FS-Gemisch gesättigt/ungesättigt	44,77 ± 0,03	84,6 ± 2,0
Cholesterol	43,63 ± 0,15	6,7 ± 1,7
FS-Gemisch gesättigt/ungesättigt und Cholesterol	49,40 ± 1,21	48,4 ± 4,5

Tabelle 4.19: Phasenübergänge und Enthalpien verschiedener Fettsäuren und Fettsäuremischungen (n = 3); Zusammensetzung der Mischungen entsprechend der Verhältnisse von Tab. 3.3.

Die UFS besitzen im untersuchten Bereich keine Phasenübergänge. Die Mischung aus GFS zeigt einen Übergang bei 57°C und liegt damit höher als bei Myristin- aber niedriger als bei Palmitin- und Stearinsäure. Die hohe Übergangsenthalpie läßt auf einen kristallinen Zustand des Systems schließen. Die Enthalpie ist erwartungsgemäß geringer als bei den Reinsubstanzen, da durch die unterschiedlichen Kettenlängen der Fettsäuren keine optimale Packungsordnung möglich ist. Dadurch werden die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Molekülen reduziert. In der Mischung aus UFS und GFS ist die Temperatur des Phasenübergangs zu niedrigeren Temperaturen verschoben und eine verringerte Enthalpie im Vergleich zu den GFS zu beobachten. Legt man eine Enthalpie von 170 mJ/mg für das Gemisch aus GFS zugrunde, so erwartet man bei einem Verhältnis GFS/UFS von 1,11:1

allein durch den Substanztausch eine Umwandlungsenthalpie von etwa 89 mJ/mg. Der ermittelte Wert von 84,6 mJ/mg ist nicht viel geringer als der berechnete Wert, was darauf hinweist, daß die UFS nur in geringem Umfang in das kristalline System mit eingebaut werden. Diese Beobachtungen decken sich mit den Untersuchungsergebnissen eines ternären Systems aus Öl-, Palmitin- und Stearinsäure [Small 1986], wonach die bei Raumtemperatur flüssige UFS (Ölsäure) kaum mit den im festen Zustand vorliegenden GFS (Palmitin- und Stearinsäure) mischbar ist.

Das FS-Gemisch aus UFS, GFS und Cholesterol zeigt eine Verschiebung des Peakmaximums um etwa 4°C zu höheren Temperaturen sowie eine Verringerung der Enthalpie im Vergleich zur Mischung ohne Cholesterol. Da es sich bei der Mischung um ein kristallines System handelt, erwartet man durch Cholesterol eher eine Fluidisierung des Systems als einen kondensierenden Effekt auf die Fettsäuren innerhalb der kristallinen Phase. Berechnet man die mögliche Enthalpie des Phasenüberganges, die sich entsprechend dem Anteil der GFS (29,1%) und des Cholesterols (44,6%) an der Gesamtmischung ergibt, so erhält man eine Übergangsenthalpie von etwa 53 mJ/mg (50 + 3 mJ/mg). Die ermittelte Enthalpie liegt um etwa 5 mJ/mg unterhalb dieses Wertes und könnte durch einen teilweisen Einbau des Cholesterols oder/und der UFS in das System der GFS mit einer resultierenden Störung der Packungsordnung erklärt werden. Dadurch wäre allerdings statt der beobachteten Erhöhung der Übergangstemperatur eine Verschiebung zu niedrigen Temperaturen zu erwarten gewesen. Möglicherweise verändert der Cholesterolzusatz das Lösungsverhalten der Fettsäuren untereinander, so daß die Zusammensetzung der kristallinen Phase in Bezug auf die Fettsäuren nicht mit der Zusammensetzung in dem Fettsäuresystem aus UFS und GFS vergleichbar ist.

4.1.1.5.3 DSC-Untersuchungen der wasserfreien Mischungen M1*-M7*

Da die einfachen Mischungen nur die Fettsäuren enthalten, nicht aber deren Natrium-Salze wie die Modell Lipid Systeme wurden zusätzlich die dehydratisierten Mischungen aus der thermogravimetrischen Bestimmungen des Wassergehaltes (siehe 3.2.2) thermoanalytisch vermessen.

Alle Mischungen bis auf M1* zeigen einen endothermen Phasenübergang (Abb. 4.20.). Die Peakmaximumtemperaturen sind im Vergleich zu den wasserhaltigen Systemen zu höheren Temperaturen verschoben, was den fluidisierenden Einfluß des Wasser auf die Systeme deutlich macht. Durch Interaktion des Wassers im Bereich der polaren Kopfgruppen der

Moleküle nimmt der Flächenbedarf der Kopfgruppen und damit auch der laterale Abstand der Moleküle zu, wodurch den Alkylketten eine stärkere Beweglichkeit ermöglicht wird. Die Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den lipophilen Ketten verringern sich, weshalb die Phasenübergänge der wasserhaltigen Systeme zu niedrigen Temperaturen verschoben werden und die Enthalpien im Vergleich zu den wasserfreien Systemen geringere Werte aufweisen. In **M2*** und **M4*** sind im Gegensatz zu den wasserhaltigen Systemen jeweils endotherme Phasenübergänge zu detektieren. Um zu untersuchen, ob eine Hydratisierung die Übergangstemperaturen so weit zu niedrigeren Temperaturen verschiebt, daß sie außerhalb des Meßbereich liegen, wurden die wasserhaltigen Systeme **M2** und **M4** nochmals zwischen -20° und 90°C vermessen. Neben dem breiten Schmelzpeak des Wassers bei 0°C waren keine weiteren Phasenübergänge zu erkennen. Da der Schmelzprozeß des Wassers bereits bei etwa -10°C beginnt und bei 15°C endet, werden auftretende Umwandlungen möglicherweise überlagert und sind deshalb nicht nachweisbar.

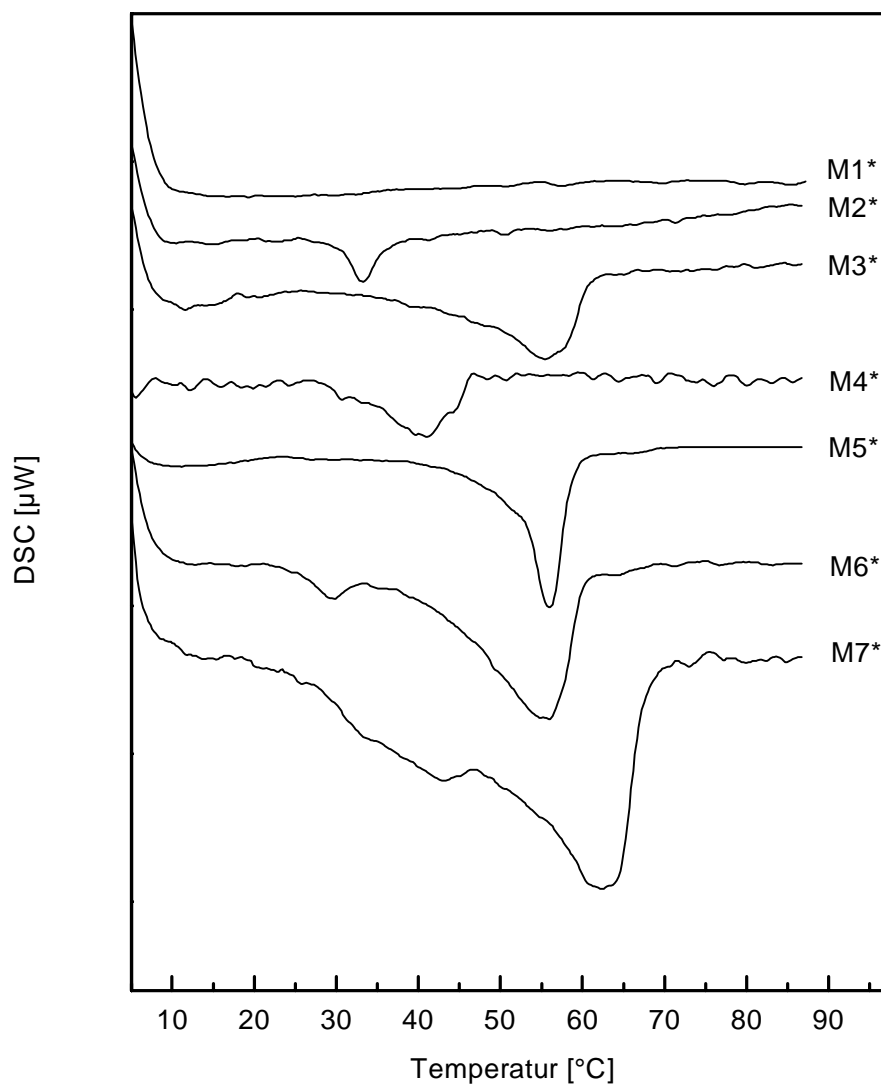


Abbildung 4.20.: DSC-Kurven der wasserfreien Mischungen; Probeneinwaage 2,8-4,0 mg

Mischung	T _p [°C]	Enthalpie [mJ/mg]
M1* (UFS)	keine Phasenübergänge	—
M2* (UFS + Cholesterol)	32,7 ± 0,77	2,3 ± 0,6
M3* (UFS + Ceramide)	55,41 ± 0,46	17,8 ± 2,1
M4* (UFS + Ceramide + Cholesterol)	41,22 ± 0,17	11,4 ± 1,1
M5* (UFS + GFS)	56,06 ± 0,15	85,4 ± 2,9
M6* (UFS + GFS + Cholesterol)	29,59 ± 0,13 55,35 ± 0,87	2,6 ± 0,4 29,6 ± 0,07
M7* (UFS + GFS + Ceramide)	42,90 ± 0,32 63,36 ± 1,41	45,7 ± 2,9

Tabelle 4.20.1.: Phasenübergänge und Enthalpien der wasserfreien Mischungen M1*-M7* (n = 3)

Die für **M5*** ermittelte Übergangsenthalpie ist etwa 30% höher als bei der wasserhaltigen Mischung und liegt somit im erwarteten Bereich, wenn man von einer Gelphase in **M5** ausgeht. Neben den Gelphasen wird in der Literatur die Existenz sogenannten lamellarer Coagel-Phasen, bestehend aus hydratisiertem, kristallinen Tensid und Wasser, diskutiert [Luzatti 1968]. Diese hätten aber im Weitwinkeldiffraktogramm von **M5** eine größere Anzahl scharfer Interferenzen im Bereich höherer Winkel zeigen müssen.

M6* zeigt bei 29°C einen zusätzlichen Peak mit einer geringen Umwandlungsenthalpie, der mit dem Übergang bei 20°C bei der wasserhaltigen Mischung zusammenhängen könnte.

Das Thermogramm von **M7*** zeigt eine Ähnlichkeit zum thermischen Verhalten des Ceraderm S[®] mit einer Phasenumwandlung bei 63°C und einer Schulter bei 43°C. Die im Vergleich zur Ausgangssubstanz niedrigeren Temperaturen lassen sich durch den Einbau der Fettsäuren in die Schichtstruktur des Ceraderm S[®] erklären. Insgesamt werden die Phasenumwandlungen der wasserfreien Mischungen wahrscheinlich durch die Transformation Gel → flüssigkristallin verursacht, da polarisationsmikroskopische Untersuchungen in allen Mischungen anisotrope Texturen zeigten, die sich beim Aufheizen aber kaum veränderten.

4.1.1.5.4 Untersuchungen des Aufheiz- und Abkühlverhaltens und der Lagerstabilität von M1-M7

Sämtliche Mischungen wurden einem Aufheiz- und Abkühlprogramm unterworfen. Dabei wurden sie im Temperaturbereich von 5-90°C aufgeheizt, abgekühlt, 10 min bei 5°C isotherm

belassen und anschließend wieder zwischen 5°C und 90°C vermessen. Die Heizrate betrug dabei jeweils 5K/min. Betrachtet man das thermische Verhalten im untersuchten Temperaturbereich, so tritt bei allen Proben, die beim Aufheizen eine endotherme Phasenumwandlung zeigen, beim Abkühlen ein exothermer Peak auf. Die Kristallisationstemperatur liegt typischerweise zu niedrigeren Temperaturen verschoben, da es sich hier um einen Zufallsprozess handelt, der an die Anwesenheit von Kristallisationskeimen gebunden ist. Die Umwandlungsenthalpie ist vom Betrag stets etwas geringer als bei den endothermen Peaks. Beim zweiten Aufheizen sind dieselben Phasenübergänge zu beobachten, die meistens um etwa 1°C zu niedrigeren Temperaturen verschoben sind und eine etwas geringere Enthalpie aufweisen. Somit sind noch nicht sämtliche Bestandteile durch das Abkühlen in einen geordneten Zustand überführt worden.

Weiterhin wurden die Systeme nach zweiwöchiger Lagerung im hermetisch verschlossenen Tiegel bei Raumtemperatur erneut mittels DSC vermessen. Bereits makroskopisch zeigen im Glasröhrchen gelagerte Proben von **M2** und **M6** neben auskristallisiertem Material eine Phasentrennung durch austretende flüssige Bestandteile. Thermoanalytisch zeigt sich bei **M2** jedoch keine Veränderung im Thermogramm, bei Mischung **M6** dagegen ist eine Verbreiterung des Peaks, eine Verschiebung des Phasenübergangs um etwa 10°C zu höheren Temperaturen sowie eine leichte Erhöhung der Enthalpie zu beobachten. Diese Beobachtungen machen wieder den Effekt des Cholesterols auf das Fettsäuresystem deutlich, da auskristallisiertes Cholesterol nicht mehr fluidisierend wirken kann. In allen anderen Mischungen sind keine Veränderungen im Thermogramm nach zweiwöchiger Lagerzeit nachweisbar.

4.1.1.6 Zusammenfassende Diskussion über die Mikrostruktur der Modell Lipid Systeme M1-M7

Bei den untersuchten Modell Lipid Systemen **M1-M7** handelt es sich um Mehrphasensysteme, die aus invers hexagonalen (H_{II}) und lamellaren flüssigkristallinen Strukturen in jeweils unterschiedlichen Anteilen bestehen. Zur Ausbildung einer H_{II} -Phase kommt es durch die Konformation der cis-ungesättigten Fettsäuren Linol- und Ölsäure, da durch die freie Rotation der Fettsäureketten um die Molekülachse ein Packungsparameter > 1 resultiert. Lamellare Phasen werden gebildet, wenn der Packungsparameter sich verringert und die Molekülgeometrie sich einer Zylinderform nähert (Packungsparameter von etwa 1). Dies kann zum einen durch Anlagerung von Wasser an die polaren Kopfgruppen der

Fettsäureanionen erfolgen und zum anderen aber auch durch den Zusatz von Molekülen, die die Beweglichkeit der Alkylketten und gleichzeitig deren Platzbedarf verringern. Bei den reinen Fettsäuremischungen (**M1** und **M5**) liegen überwiegend inverse Strukturen vor. Der Zusatz von Ceraderm S[®] und Cholesterol (**M2-M4**, **M6**, **M7**) begünstigt durch deren Molekülgeometrie jeweils die zunehmende Bildung lamellarer Phasen. Grundsätzlich sind die Lamellar- und die H_{II}-Phase hinsichtlich ihrer Zusammensetzung unterschiedlich. Während die H_{II}-Phase wahrscheinlich hauptsächlich aus freien Fettsäuren besteht, wird die lamellare Phase von den Fettsäureanionen sowie den Bestandteilen des Ceraderm S[®] und Cholesterol gebildet. Die H_{II}-Phase scheint nur in begrenztem Umfang in der Lage zu sein, Ceramide und Cholesterol in die Strukturen einzubauen. Der Zusatz der GFS führt zur vermehrten Bildung lamellarer Gelphasen, bei denen die Alkylketten im Vergleich zum flüssigkristallinen Zustand eine höhere Ordnung aufweisen und in einer hexagonalen Anordnung zueinander vorliegen. Cholesterol zeigt bei den Mischungen sowohl einen fluidisierenden Einfluß auf lamellare Gelphasen als auch einen ordnenden sog. kondensierenden Effekt auf flüssigkristalline Strukturen. Bei den Gelphasen kommt es zu einer Phasentransformation $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$, die sich bei **M6** (UFS + GFS + Cholesterol) sowohl durch eine Verschiebung der Phasenübergangstemperatur zu niedrigeren Temperaturen als auch durch eine Verringerung der Peakenthalpie im Vergleich zu **M4** (UFS + GFS) äußert. Bei den flüssigkristallinen Phasen führt die Einschränkung der Beweglichkeit zu einer Streckung der Alkylketten, was durch einen Anstieg der Netzebenenabstände bei der Lamellar- und der H_{II}-Phase von **M2** (UFS + Cholesterol) nachweisbar ist. Zudem bewirkt die dadurch resultierende Verringerung des Packungsparameters der Moleküle eine zunehmende Phasentransformation $H_{II} \rightarrow$ lamellar. Bei **M6** sind zwei Lamellarphasen mit unterschiedlichen Netzebenenabständen zu finden, die wahrscheinlich in einer unterschiedlichen Zusammensetzung begründet liegen. Insgesamt gesehen sind die inkompletten Mischungen hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften nicht mit den Stratum corneum Lipiden vergleichbar, da sie weder Phasenumwandlungen aufweisen, die im Bereich extrahierter Stratum corneum Lipide liegen, noch eine einphasige lamellare Mikrostruktur vorliegt.

4.1.1.7 Vergleich der physikochemischen Charakteristika der untersuchten Mischungen mit bestehenden Modell Systemen

Nach der physikochemischen Charakterisierung besteht die Grundmischung aus UFS aus einem flüssigkristallinen System mit hauptsächlich invers hexagonaler Mikrostruktur. Die

typischen Interferenzfolgen einer Lamellarphase sind nicht nachweisbar. Auch die polarisationsmikroskopischen Untersuchungen sprechen für ein System, bei dem die Bestandteile röhrenförmige Assoziate in hexagonaler Anordnung bilden. Auf das Vorliegen lamellarer Bereiche deuten nur einige TEM-Aufnahmen des gefriergebrochenen Systems hin. Diese Beobachtungen widerlegen somit erneut die Strukturvorstellungen von Friberg et al. [1988], die ein vergleichbares System aus UFS aufgrund von polarisationsmikroskopischen Beobachtungen und Röntgenkleinwinkeldata als rein lamellar beschreiben.

Das Vorliegen einer deutlich zweiphasigen Mikrostruktur des Systems, wie sie in einer vergleichbaren Mischung von Häusler [1994] gefunden wurde, bestätigt sich nicht. Weiterhin ist die von Häusler gefundene intermediäre H_{II} -Phase bei 13,62 nm als Zwischenstufe der Phasenumwandlung $H_{II} \rightarrow$ lamellar nicht nachweisbar. Ein Grund für diese Beobachtungen könnte in der unterschiedlichen Zusammensetzung der Ausgangssubstanzen für die Herstellung der Systeme liegen. Während in der vorliegenden Arbeit Reinsubstanzen verwendet wurden, kamen bei Häusler die Fettsäuren in 90%iger Qualität zum Einsatz und enthielten damit Begleitstoffe, die Einfluß auf die Mikrostruktur des Systems haben könnten.

Übereinstimmend mit den Beobachtungen von Häusler sind die Systeme **M2-M7** mit Ausnahme von **M6** als zweiphasig anzusehen, bestehend aus einer Lamellar- und einer H_{II} -Phase. Die Netzebenenabstände für die Lamellarphase sind mit Ausnahme von **M2** unter Berücksichtigung der Standardabweichungen mit den von Häusler ermittelten Werten vergleichbar. Die Netzebenenabstände der H_{II} -Phase liegen dagegen reproduzierbar unter den von Häusler angegebenen Werten, wobei die Differenzen jeweils unterschiedlich sind.

Bei Betrachtung der Thermogramme der einzelnen Systeme zeigen alle Mischungen bis auf **M6** und **M7** ein zu Häusler ähnliches thermisches Verhalten. Bei **M6** und **M7** sind zwei bisher nicht nachgewiesene endotherme Phasenübergänge zu detektieren.

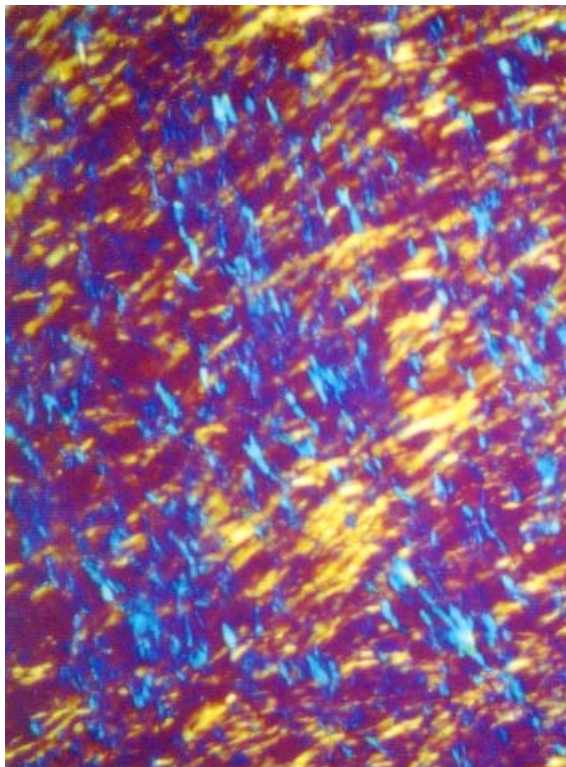
Abweichend zu den Ergebnissen von Häusler besteht die Mikrostruktur von **M6** (UFS + GFS + Cholesterol) hauptsächlich aus lamellaren Bestandteilen. Moghimi et al. [1996a] untersuchten eine ähnlich zusammengesetzte Mischung aus 55% Fettsäuren (UFS und GFS) und deren Seifen, 20% Cholesterol und 25% Wasser und fanden eine lamellare Matrix, bei der die Existenz einer lamellaren Gelphase neben einer lamellaren flüssigkristallinen Phase diskutiert wurde. Die beschriebenen Phasenübergänge dieses Systems sind zwar im Vergleich zu **M6** um etwa 5° zu höheren Temperaturen verschoben, können aber durch den höheren Cholesterol Gehalt in **M6** erklärt werden. Ansonsten stimmen die Strukturvorstellungen zu diesem System mit den ermittelten Ergebnissen überein.

4.1.2. Physikochemische Eigenschaften der Komplettmischungen KM1, KM2 und KM3

Bei den bisher charakterisierten Systemen **M1-M7** handelte es sich jeweils um Teilsysteme, die mit den Stratum corneum Lipiden nicht vergleichbar sind. Im folgenden soll deshalb untersucht werden, ob Stratum corneum Lipid Modelle, die aus allen Komponenten bestehen, in der Lage sind, eine einphasige lamellare Mikrostruktur auszubilden. Es soll deshalb die Komplettmischung (**KM**) aus UFS, GFS, Cholesterol und Ceramiden charakterisiert werden. Da das bisher eingesetzte Ceraderm S[®] zu etwa 50% aus Phospholipiden besteht, die in den Stratum corneum Lipiden nur in Spuren zu finden sind, sollen andere Ceramid Typen in das System eingearbeitet und deren Einfluß auf die Mikrostruktur des Systems aufgezeigt werden. Die Systeme werden im folgenden als **KM1**, **KM2** und **KM3** bezeichnet und enthalten entweder Ceraderm S[®], Ceramid Typ III oder Ceramid Typ IV (siehe 3.1.2).

4.1.2.1 Polarisationsmikroskopische Untersuchungen

a)



b)



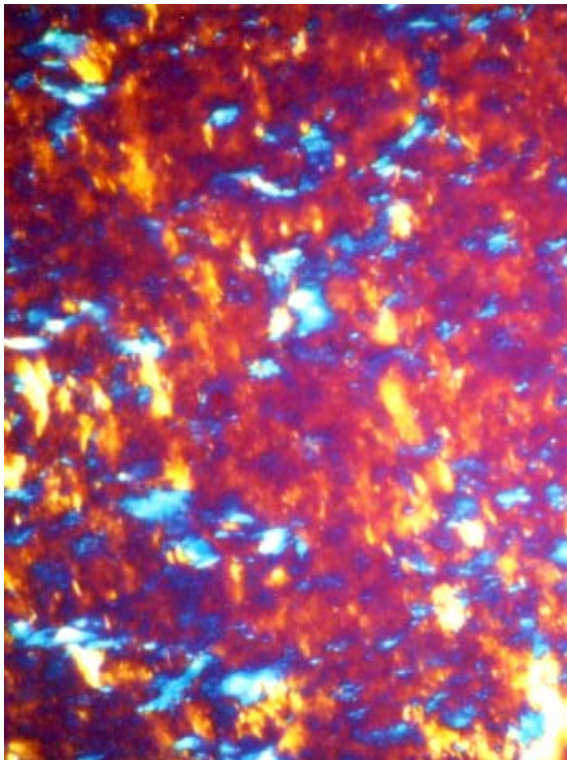
Abbildung 4.21.: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen a) KM1 bei RT b) beim Abkühlen aus der isotropen Phase ohne λ -Plättchen; Balkenlänge entspricht 100 μm

Polarisationsoptisch zeigen alle drei Mischungen ein anisotropes Erscheinungsbild.

In **KM1** mit Ceraderm S[®] ist eine typische netzartige Textur aus pseudoisotropen Bereichen und oily streaks zu erkennen (Abb. 4.21.a). Betrachtet man das Präparat bei 32°C, so zeigt sich keine veränderte Textur im Vergleich zur Raumtemperatur. Heizt man das System mit konstanter Heizrate auf, so verblaßt die farbige Textur bei etwa 70°C und man beobachtet einen Phasenübergang in ein isotropes Bild bei etwa 100°C. Beim Abkühlen des isotropen Präparates formiert sich eine Textur, die aus zahlreichen Malteserkreuzen besteht (Abb. 4.21.b), wodurch die vorliegende Mesophase eindeutig als lamellar ausgewiesen werden kann. Das Auftreten von Malteserkreuzen kann auch bei Präparaten nach einer Relaxationszeit von etwa 4h beobachtet werden.

Bei **KM2** (mit Ceramid III) findet man eine anisotrope Textur, die kaum oily streaks und pseudoisotrope Bereiche enthält (Abb.4.22.a) Man erkennt zum Teil flächige Bereiche und eine mosaikartige Textur, scharf abgegrenzte Bereiche weisen auf das Vorliegen von kristallinem Material hin. Die Textur des Präparates zeigt bei 32°C kein verändertes Erscheinungsbild, bis 100°C eine verblässende Textur, die auf das Schmelzen kristalliner Bestandteile hinweist aber keine Phasenumwandlung in ein optisch isotropes System. Nach 4h Relaxation sind ebenfalls Malteserkreuze zu beobachten, wodurch das System dem lamellaren Typ zugeordnet wird. (Abb. 4.22.b).

a)



b)

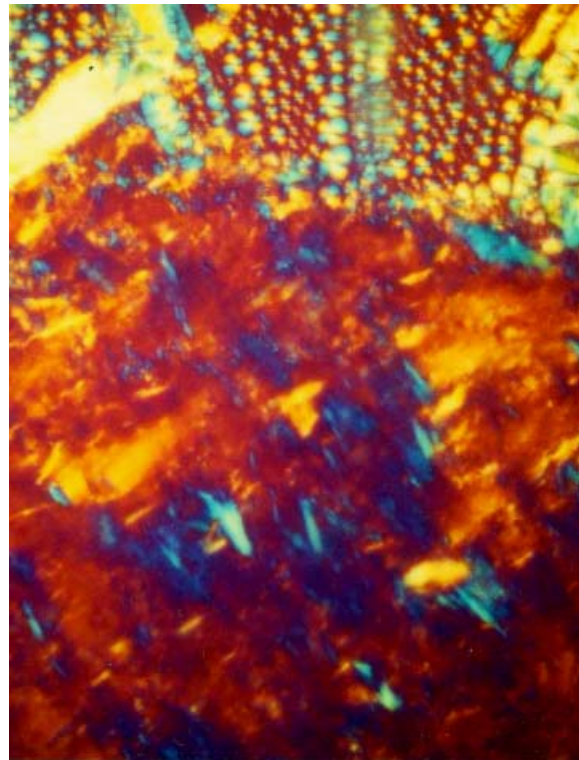
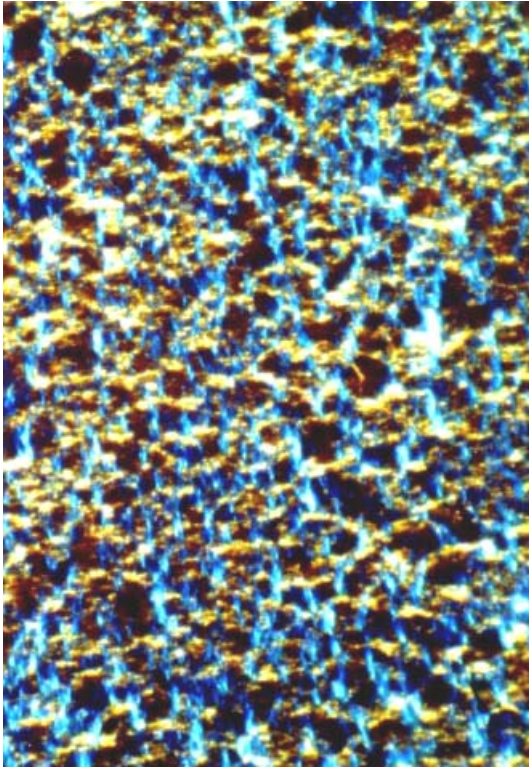


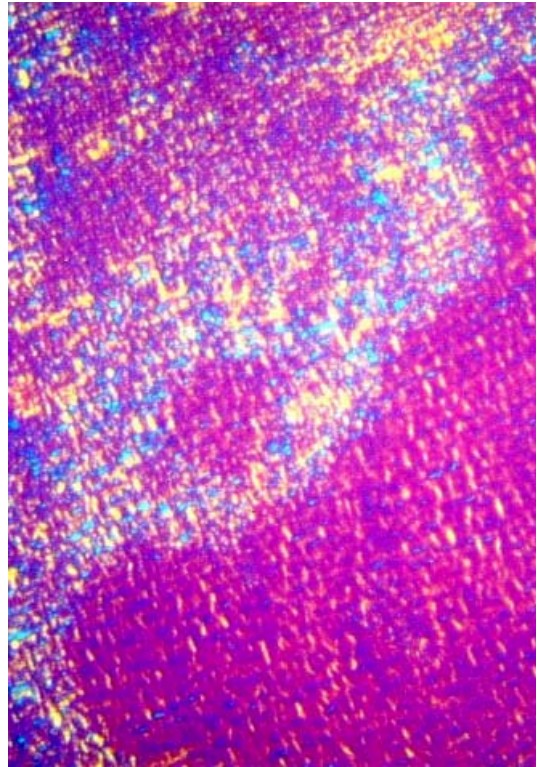
Abbildung 4.22.: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen a) KM2 bei RT b) nach 4h Relaxationszeit; Balkenlänge entspricht 100 μm

KM3 (mit Ceramid Typ IV) zeigt eine feine Mosaiktextur mit oily streaks und pseudoisotropen Bereichen (Abb. 4.23.a). Bei 32°C ähnelt die Textur der von **KM1**. Man beobachtet eine Zunahme der Pseudoisotropie, die sich beim Aufheizen fortsetzt, wobei das Präparat bei etwa 60°C nur noch ein schwach anisotropes Aussehen zeigt (Abb.4.23.b).

a)



b)



c)

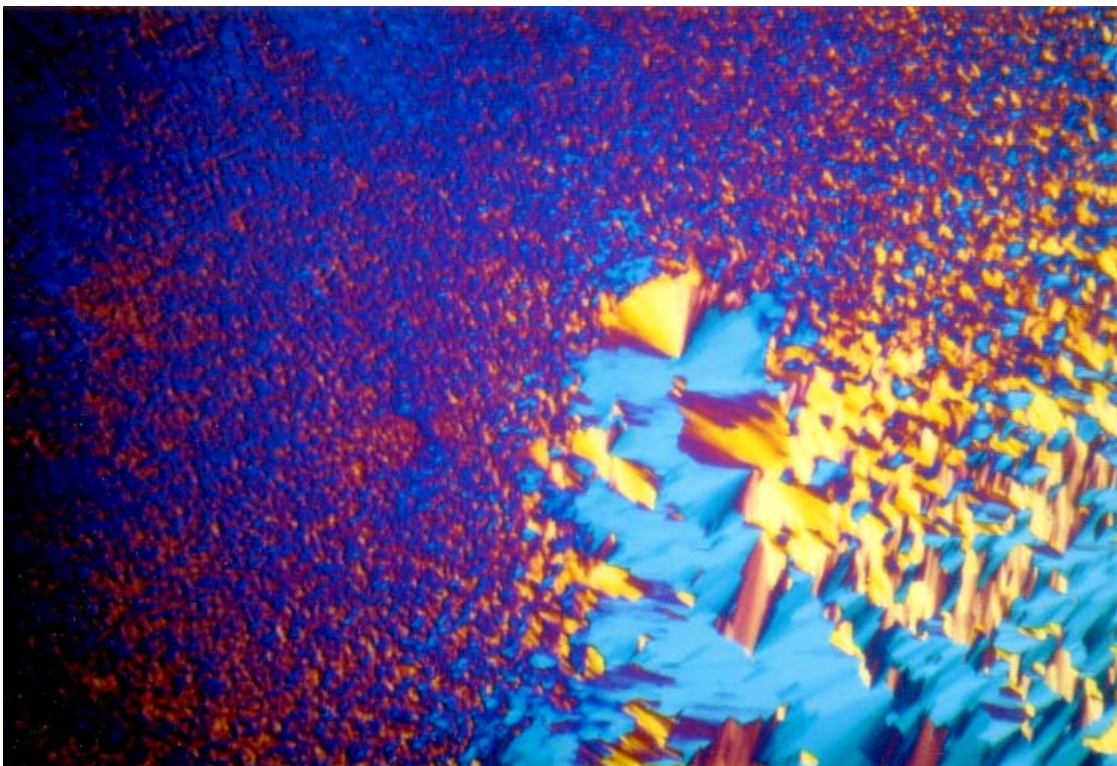


Abbildung 4.23.: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen a) KM3 bei RT b) bei 60°C c) bei 100°C;
Balkenlänge entspricht 100 µm

Zwischen 65°C und 70°C beobachtet man die Bildung einer neuen anisotropen Textur, die bei 100°C in ein fächerartiges für hexagonale Phasen typisches Erscheinungsbild transformiert (Abb. 4.23.c). Diese Beobachtungen stimmen mit der von Abraham et al. [1991, 1992] beschriebenen Polymorphie der Stratum corneum Lipide überein. So wurde mittels NMR-Messungen und durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von Gefrierbrüchen eine Phasentransformation der Bilayerstrukturen in eine invers hexagonale flüssigkristalline Phase nachgewiesen, die in einem Temperaturbereich zwischen 60°C und 80°C auftrat.

Die Bildung von Intermediärstrukturen aus inversen Mizellen wird deshalb als Zwischenstufe bei der Fusion der exozytierten Lamellengranula zu den kontinuierlichen Bilayerstrukturen des Stratum corneum diskutiert. Das polymorphe Verhalten der Stratum corneum Lipide scheint eine wesentliche Rolle in diesem Prozeß zu spielen. Da in den Matrizes **KM1** und **KM2** keine Phasenumwandlung zu hexagonalen Strukturen beobachtet werden konnte, scheint die unterschiedliche Zusammensetzung der Mischungen und somit die Molekülstruktur des eingesetzten Ceramid Typs die Art der Phasentransformation zu beeinflussen. Andererseits muß einschränkend bemerkt werden, daß die einzelnen Präparate durch die Verwendung des Spezialklebers zur Versiegelung der Objektträger während des Aufheizprozesses nur bis etwa 110°C beobachtet werden konnten, so daß mögliche Phasenumwandlungen oberhalb 110°C nicht verfolgt wurden. Bei allen Mischungen konnte aber zwischen Raumtemperatur und 70°C keine Umwandlung flüssigkristallin → isotrop beobachtet werden. Die leichte Veränderung der Texturen kommt möglicherweise durch das teilweise Schmelzen im Bereich der lipophilen Alkylketten zustande.

4.1.2.2 TEM-Untersuchungen

TEM-Aufnahmen zeigen bei allen Systemen eindeutig lamellare Strukturen mit terrassenförmig angeordneten unregelmäßigen Bruchkanten entlang der Schichtebenen (Abb.4.24.). Bei **KM2** deuten einige ungeordnete Bereiche auf das Vorliegen von invers hexagonalen Strukturen hin. Desweiteren sind hier scharfe Abbruchkanten zu erkennen, die eine höhere Ordnung innerhalb der Alkylketten belegen.

KM3 ist ebenfalls durch die auftretenden Schichtstrukturen einer lamellaren Mikrostruktur charakterisiert. In einigen TEM-Aufnahmen erkennt man zusätzlich unregelmäßig geformte Schichtstrukturen, die in den anderen Mischungen nicht zu sehen sind (Abb. 4.25.). Die unregelmäßigen Formen dieser Strukturen könnten aufgrund einer guten Verformbarkeit innerhalb der Matrix entstanden sein.

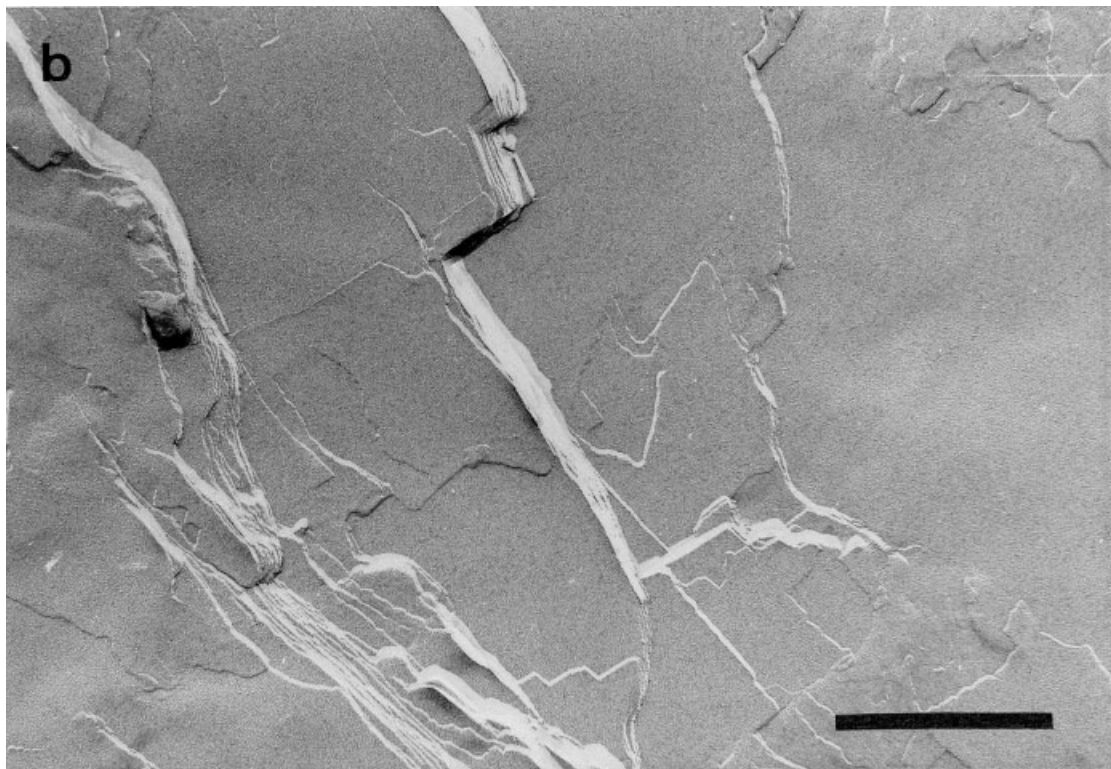
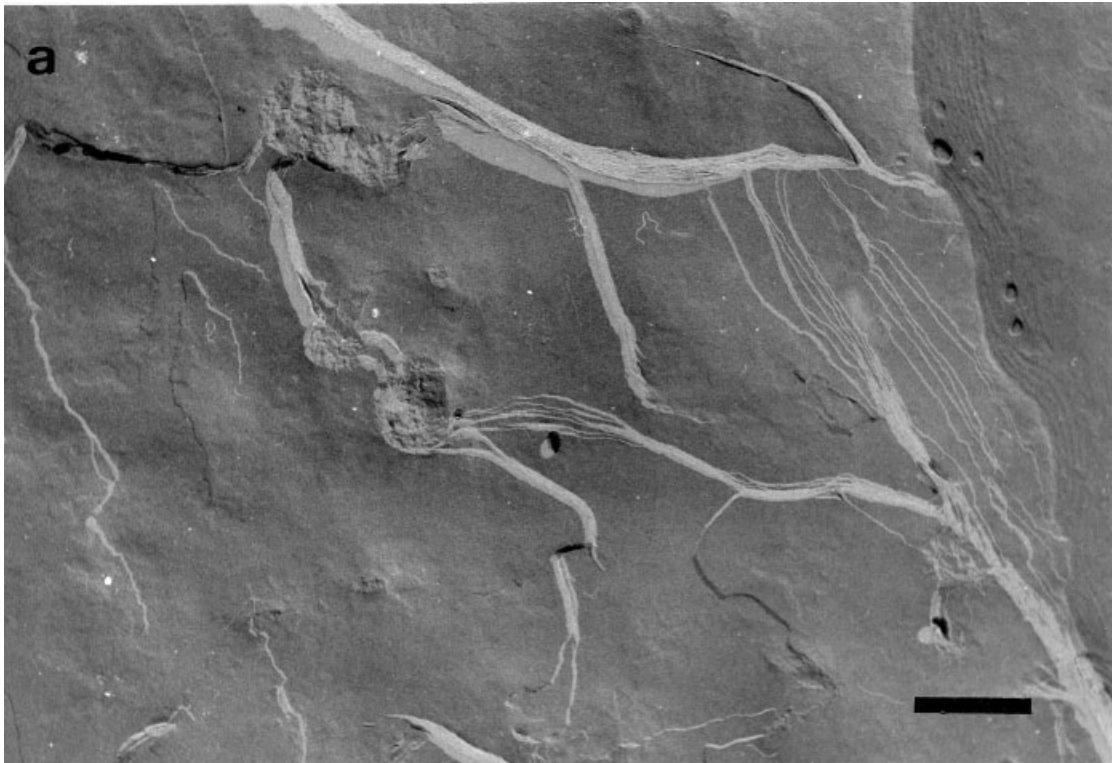


Abbildung 4.24.: TEM-Aufnahmen von KM1 (a) und KM2 (b); Balkenlänge entspricht 500 nm

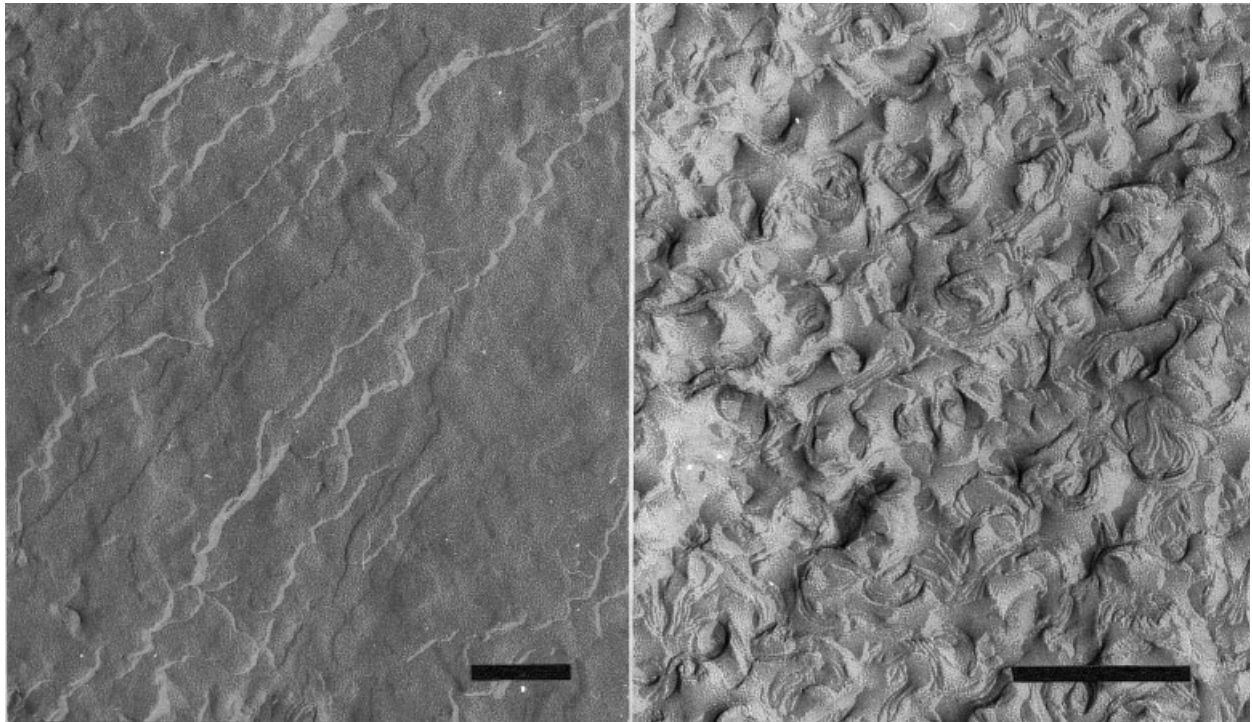


Abbildung 4.25.: TEM-Aufnahmen von KM3; Balkenlänge entspricht jeweils 200 nm

4.1.2.3 Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD)

SAXD-Messungen zeigen bei **KM1** die typischen Interferenzfolgen 1. bis 3. Ordnung einer Lamellarphase mit einem Netzebenenabstand von 6,9 nm, der im Bereich des Netzebenenabstandes der Literaturdaten von Stratum corneum Lipiden liegt. Daneben sind sehr schwache Interferenzfolgen einer invers hexagonalen Phase mit 5,4 nm Netzebenenabstand (Röhrendurchmesser $a = 6,2$ nm) zu detektieren. SAXD-Messungen der Matrix bei 32°C ergeben eine leichte Verringerung der Netzebenenabstände um jeweils 0,1 nm sowohl für die Lamellarphase als auch für die H_{II} -Phase. Durch Temperaturerhöhung kommt es zur vermehrten Bildung von gauche-Konformeren innerhalb der Alkylketten und damit zur gleichzeitigen Verkürzung, wodurch insgesamt eine Verringerung der Schichtdicke bzw. des Röhrendurchmessers resultiert.

Bei **KM2** sind die Interferenzfolgen 1. bis 5. Ordnung einer Lamellarphase mit $d = 7,45$ nm zu detektieren, wobei Messungen bei 32°C wieder eine Verringerung um etwa 0,1 nm ergeben. Die für hexagonale Strukturen typischen Interferenzen sind nicht detektierbar. Das Auftreten der Interferenzen höherer Ordnung spricht für ein System, in dem die Lipide einen höheren Ordnungsgrad aufweisen. **KM3** zeigt nur die Interferenzfolgen einer Lamellarphase

bei 6,39 nm, wobei hier keine Veränderung des Netzebenenabstandes durch Messungen bei 32°C auftritt. Insgesamt besitzen also alle Komplettmischungen eine lamellare Mikrostruktur, die sich jedoch durch die Abstände der lamellaren Schichten unterscheiden, wobei **KM2** den höchsten Netzebenenabstand aufweist. Das in dieser Mischung verwendete Ceramid besteht nur aus einem einzigen Ceramid Typ, bei dem weder die enthaltene Sphingosinbase noch die in Amidbindung veresterte Fettsäure eine Doppelbindung aufweist. Dadurch resultiert für dieses Molekül eine überwiegend gestreckte Konformation.

Bei den beiden anderen Ceramid Typen handelt es sich um Gemische aus Fettsäuren und Sphingosinbasen unterschiedlicher Kettenlängen, die zum Teil ungesättigte Alkylketten enthalten. Durch die Doppelbindungen kommt es zur Ausbildung von Kinken, die zu einer Verkürzung des Moleküls führt. Die im Vergleich zu **KM3** größere Schichtdicke der Mischung **KM1** kommt wahrscheinlich durch die größere Moleküllänge der Cerebroside zustande, die insbesondere aufgrund des voluminösen Zuckerrestes resultiert. Die in dieser Mischung zusätzlich detektierte inverse Hexagonalphase weist auf den störenden Einfluß der Phospholipide in dem System hin. Das in Ceraderm S[®] enthaltene Phosphatidylethanolamin ist in der Lage, aufgrund der kleinen Kopfgruppe oberhalb der Übergangstemperatur der Alkylketten inverse Strukturen auszubilden [Crowe und Crowe 1981], so daß in **KM1** die Bildung invers hexagonaler Bereiche ebenfalls möglich ist.

Mischung	Invers Hexagonal [nm]	Lamellar [nm]
KM1 (mit Ceraderm S [®])	5,39 ± 0,17 n = 5	6,90 ± 0,06 n = 5
KM2 (mit Ceramid III)	—	7,45 ± 0,04 n = 3
KM3 (mit Ceramid Typ IV)	—	6,41 ± 0,12 n = 7

Tabelle 4.26.: Netzebenenabstände d von KM1, KM2, KM3

4.1.2.4 Röntgenweitwinkelbeugung (WAXD) der Komplettmischungen

WAXD-Messungen an **KM1** zeigen ein Halo bei 0,45 nm, das die Existenz einer flüssigkristallinen Phase in dem System bestätigt (Abb. 4.27.). Die bei 0,42 nm auftretende Interferenz wird durch Ceraderm S[®] Bestandteile verursacht. Eine zusätzliche Interferenz bei 1,67 nm wird als Interferenz 4. Ordnung der Lamellarphase interpretiert, eine Schulter bei 2,56 nm ist als Interferenz höherer Ordnung der mittels SAXD-Messungen detektierten invers

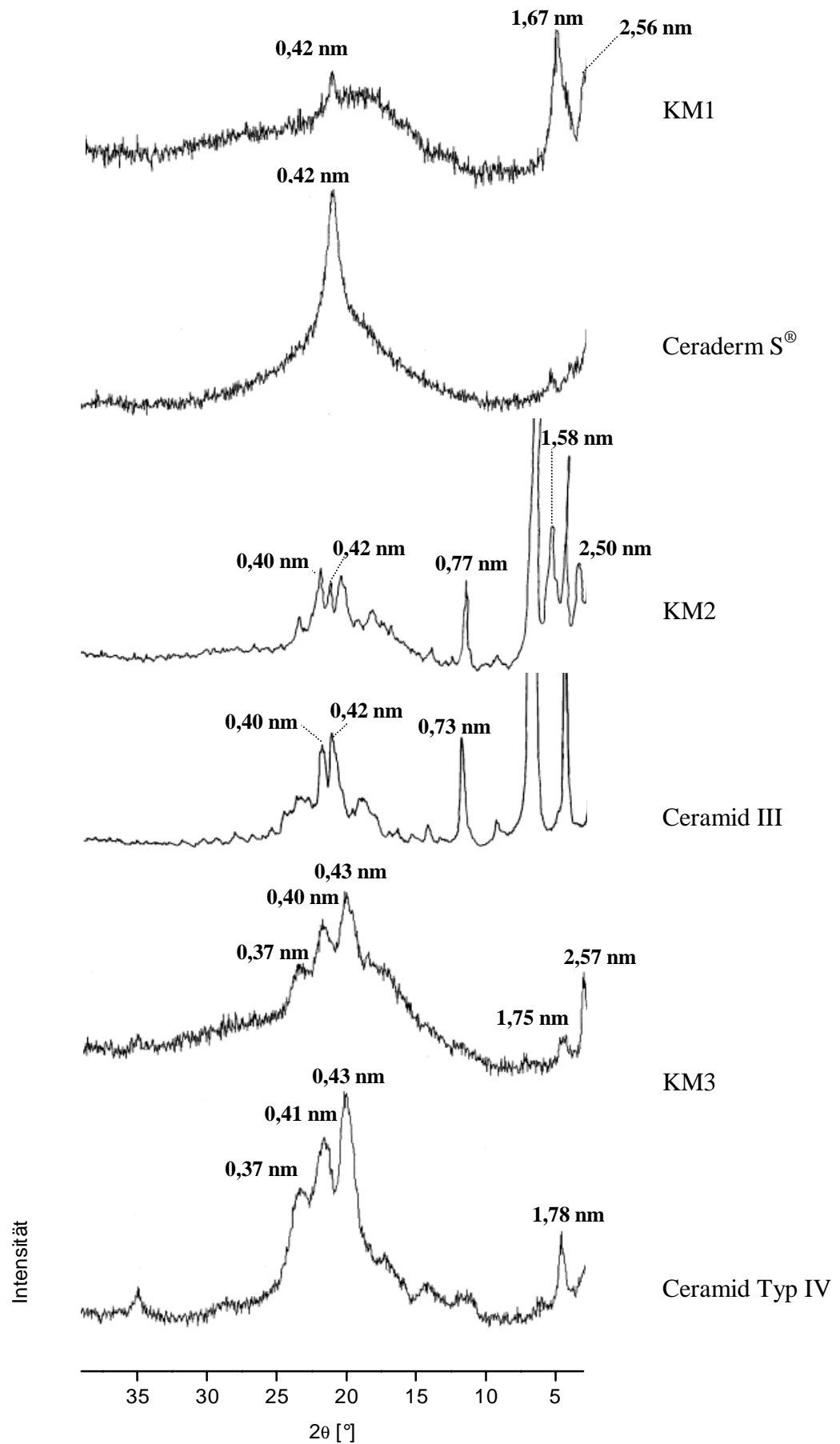


Abbildung 4.27.: Weitwinkel-Diffraktogramme, aufgenommen bei 20°C

hexagonalen Phase anzusehen. Das WAXD-Diffraktogramm von **KM2** zeigt eine Reihe scharfer Interferenzen bis in einen Winkelbereich $2\theta = 25^\circ$. Das Halo bei 0,45 nm ist nur ansatzweise zu erkennen, da es teilweise von anderen Interferenzen überlagert wird. Durch einen Vergleich mit WAXD-Messungen an Ceramid III können die auftretenden Interferenzen der Ausgangssubstanz zugeordnet werden. Die bei $d = 2,50$ nm und bei 1,58 nm detektierten Interferenzen stimmen mit den Interferenzen 3. und 5. Ordnung der Lamellarphase überein.

Obwohl bei **KM3** polarisationsoptisch keine Kristalle sichtbar waren, deuten WAXD-Messungen auch bei dieser Matrix auf das Vorliegen der Ausgangssubstanz in kristalliner Form hin. Im Diffraktogramm dieser Mischung sind Interferenzen zu erkennen, die beim Vergleich dem Ceramid Typ IV zuzuordnen sind. Das für flüssigkristalline Phasen häufig auftretende Halo bei 0,45 nm scheint wieder durch andere Interferenzen überlagert zu werden. Die bei 2,57 nm auftretende Interferenz kann nicht eindeutig zugeordnet werden, da sie weder im Bereich einer Interferenz höherer Ordnung liegt, noch einer Interferenz des Ceramides entspricht.

4.1.2.5 Thermoanalytische Untersuchungen (DSC)

Die thermoanalytische Untersuchung der **KM1** zeigt ein Thermogramm mit einem schwach ausgeprägten breiten endothermen Phasenübergang bei 34°C und einer geringen Enthalpie von etwa 3 mJ/mg (Abb.4.28.). In **KM2** sind insgesamt drei endotherme Phasenübergänge mit einem breiten Umwandlungspeak bei $83,8^\circ\text{C}$ und zwei Übergängen bei $28,6^\circ\text{C}$ und $44,6^\circ\text{C}$ zu erkennen, was auf ein komplexes Verhalten des Systems hinweist. Der Zusatz des Ceramides Typ IV in **KM3** ergibt dagegen ein System, in dem nur eine einzige Umwandlung bei 60°C detektiert werden kann. Dieser Übergang liegt im Bereich der Literaturdaten für extrahierte Stratum corneum Lipide und kann auch noch nach dreiwöchiger Lagerzeit bei unverändertem Peakmaximum und -enthalpie nachgewiesen werden. Die relativ hohe Übergangsenthalpie bei **KM2** und **KM3** weist auf das Vorliegen einer lamellaren Gelphase hin, wohingegen sich die Lipide bei **KM1** überwiegend im flüssigkristallinen Zustand befinden.

Bei der thermoanalytischen Untersuchung der dehydratisierten Mischungen zeigen alle Thermogramme eine Verschiebung der Peaks zu höheren Temperaturen, wodurch wieder der Effekt der Hydratisierung auf die Übergangstemperaturen deutlich wird (Abb. 4.29.).

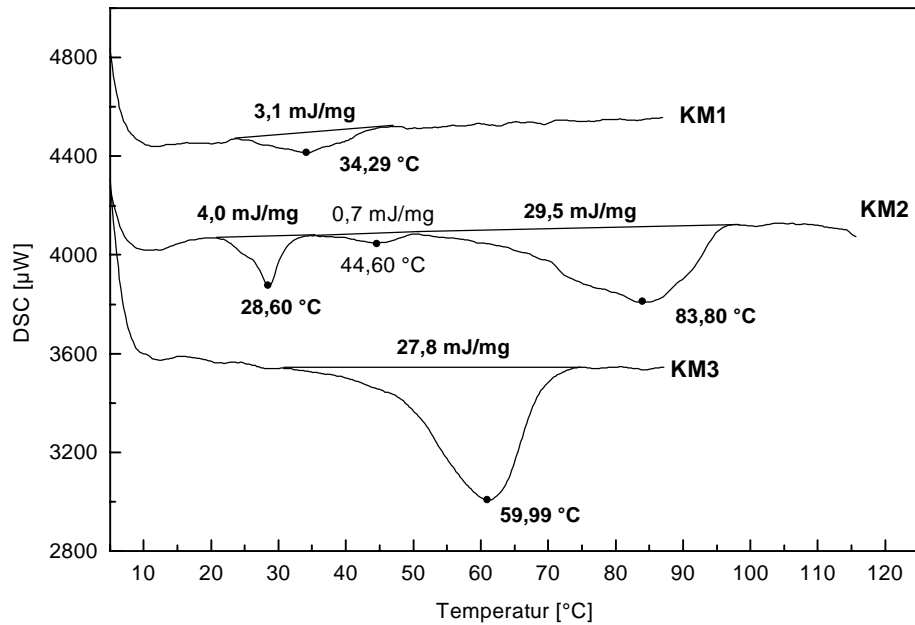


Abbildung 4.28.: Vergleich der Thermogramme von KM1, KM2 und KM3

Mischung	T _P [°C]	Peakenthalpie [mJ/mg]
KM1 (mit Ceraderm S®)	34,49 ± 0,34	3,1 ± 0,1
KM2 (mit Ceramid III)	29,00 ± 0,40	4,7 ± 1,00
	44,10 ± 0,50	0,7 ± 0,1
	84,09 ± 0,51	29,6 ± 1,5
KM3 (mit Ceramid Typ IV)	59,67 ± 0,44	27,9 ± 1,12

Tabelle 4.28.1.: Peakmaxima und Übergangsenthalpien von KM1, KM2 und KM3 (n = 3)

Die Enthalpie von **KM1** beträgt lediglich 10% von der ermittelten Enthalpie der wasserfreien Mischung. Die Enthalpie des Hauptpeaks bei **KM2** beträgt dagegen 64% und bei **KM3** fast 70% der Übergangsenthalpie im Vergleich zur wasserfreien Mischung, so daß die Annahme gelartiger Strukturen bei diesen Systemen unterstützt wird. Bei **KM3*** ist im Thermogramm ein zweiter breiter Peak zu erkennen, der im wasserhaltigen System auch bei Messungen im Bereich von -20 bis 140°C nicht detektiert werden konnte. Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß in dem wasserhaltigen System **KM3** neben der lamellaren Gelphase auch flüssigkristalline Strukturen existieren, was auch für das multilamellare System der Stratum corneum Lipide diskutiert wird.

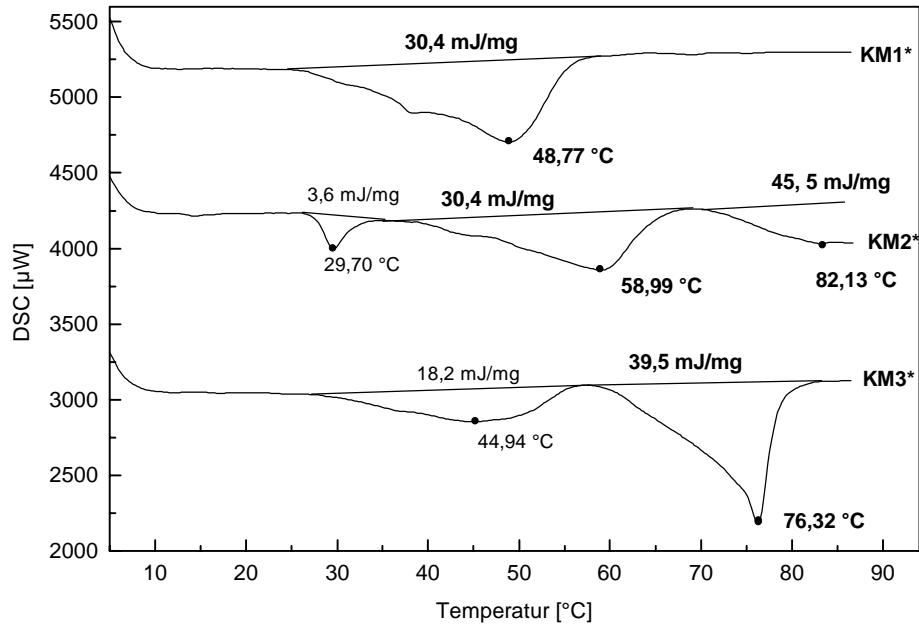


Abbildung 4.29.: Thermogramme der dehydratisierten Mischungen KM1*, KM2* und KM3* zwischen 5 und 90 $^{\circ}\text{C}$

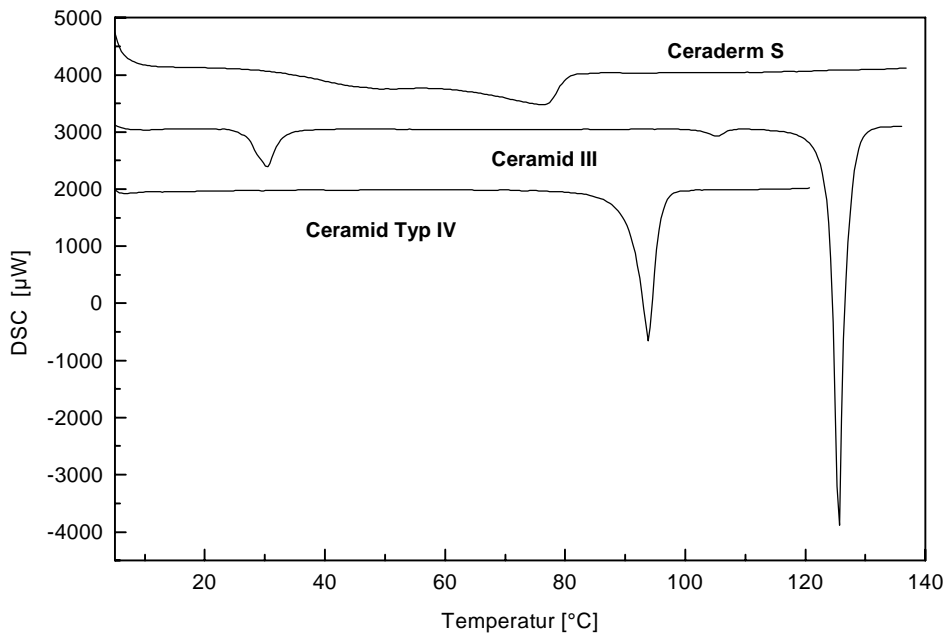


Abbildung. 4.30.: Thermogramme der verschiedenen Ceramide

Das thermische Verhalten der Systeme kommt eindeutig durch die unterschiedliche Zusammensetzung der eingesetzten Ceramide zustande. Bei der Untersuchung der Reinsubstanzen zeigt das Ceraderm S[®] aufgrund seiner multiplen Zusammensetzung einen breiten endothermen Übergang mit einer Schulter, Ceramid Typ III insgesamt drei Übergänge, wobei der letzte bei 126 $^{\circ}\text{C}$ (Enthalpie 124,4 mJ/mg) den Schmelzpeak des

Ceramids darstellt, und die ersten Übergänge (31,1°C, 15,3 mJ/mg; 105,3°C, 2,5 J/mg) von enthaltenen Begleitsubstanzen wie Phytosphingosin, Wasserresten oder polymorphen Übergängen stammen könnten. Ceramid Typ IV zeigt dagegen nur einen einzigen scharfen Schmelzpeak bei 94,5°C mit einer Enthalpie von 119,8 mJ/mg. (Abb. 4.30).

Das komplexe Verhalten von **KM2** ist mit dem von Shah et al. [1995 a,b] beschriebenen thermischen Verhalten eines ähnlichen Ceramides vergleichbar. Im hydratisierten Zustand waren hier zwei Phasenübergänge zu detektieren, die nach Röntgenmessungen den Übergängen $L_{\beta} \rightarrow L_{\beta'}$ sowie $L_{\beta'} \rightarrow$ flüssigkristallin zugeordnet werden konnten. Das Auftreten eines dritten Peaks bei **KM2** ist wahrscheinlich durch die zusätzlich enthaltenen Bestandteile im Vergleich zum in der Literatur beschriebenen System zu begründen.

Bei **KM1** scheint der störende Einfluß der Phospholipide auf das System offensichtlich, so daß zur Überprüfung dieses Verhaltens eine Mischung von **KM3** mit 50% (m/m) Phospholipon 90G[®], einem gereinigten Sojalecithin aus 90% Phosphatidylcholin, hergestellt und anschließend polarisationsoptisch, mittels TEM, SAXD und DSC untersucht wurde.

Unter dem Polarisationsmikroskop ist eine anisotrope Textur zu erkennen, die der zwischen 60°C und 70° beobachteten Textur von **KM3** sehr ähnlich ist. In TEM-Aufnahmen der Mischung sind zunehmend ungeordnete Bereiche mit verformten lamellaren Schichten sichtbar. SAXD-Messungen ergeben eine Verringerung des Netzebenenabstandes der Lamellarphase um 0,6 nm, wodurch der fluidisierende Effekt der Phospholipide bestätigt wird, der möglicherweise durch den lateralen Einbau in die Lamellarphase resultiert. Unter der Annahme, daß die Lipide in **KM3** überwiegend als L_{β} -Phase vorliegen, bewirken die Phospholipide eine zunehmende Transformation in eine L_{α} -Phase, bei der die Fettsäuren eine erhöhte Beweglichkeit haben und es durch Rotationsisomerbildung zu einer Verkürzung der Ketten mit einer resultierenden Verringerung der Netzebenenabstände kommt. Laut Herstellerangaben [Ghyzy und Niemann 1992] bestehen die in dem Phospholipid enthaltenen Fettsäuren zu 10% aus der einfach ungesättigten Ölsäure, zu 66% aus Linolsäure als zweifach ungesättigter Fettsäure und zu etwa 27% aus gesättigten Fettsäuren. Beobachtungen an Phospholipid-Biomembranen beschreiben die Einführung von cis-Doppelbindungen in der Lipidkette des Moleküls als wirksamen Weg, die Fluidität der Biomembranen über einen weiten Temperaturbereich zu erhalten und die Bildung einer Gelphase zu verhindern [Chapman 1984b]. DSC-Messungen bestätigen diese Beobachtungen und zeigen bei der 1:1 Mischung **KM3** : Phospholipid eine signifikante Verschiebung der Peakmaximumtemperatur um etwa 4°C zu niedrigeren Temperaturen im Vergleich zu **KM3** und eine Verringerung der Umwandlungsenthalpie (Abb. 4.31.). Das Phospholipon selbst besitzt einen endothermen

Phasenübergang bei 42°C mit einer Enthalpie von etwa 14 mJ/mg, der dem Schmelzen der Alkylketten zugeschrieben wird. Der Übergangsbereich von Phospholipiden hängt im allgemeinen von der Kettenlänge, dem Sättigungsgrad und dem Hydratationsgrad des Phospholipids ab. Mit abnehmender Kettenlänge, Sättigungsgrad sowie mit zunehmendem Hydratationsgrad verschiebt sich der Bereich zu niedrigeren Temperaturen [Chapman 1984a]. Bei einer Mischung verschiedener Kettenlängen beobachtet man zudem einen breiten Übergang durch das Schmelzen der einzelnen Alkylkettenfraktionen nacheinander. Für Phospholipid-Mischungen mit Lipiden, die andere polare Kopfgruppen als die Phospholipide besitzen, wird in der Literatur die Ausbildung eines Zweiphasensystems Gel-flüssigkristallin beschrieben [Chapman 1984b], was auch bei Mischungen aus Eilecithin und Cerebrosiden zu beobachten war. Es resultierte ein System mit einer Übergangstemperatur, die deutlich unter der Schmelztemperatur des reinen Cerebrosides lag.

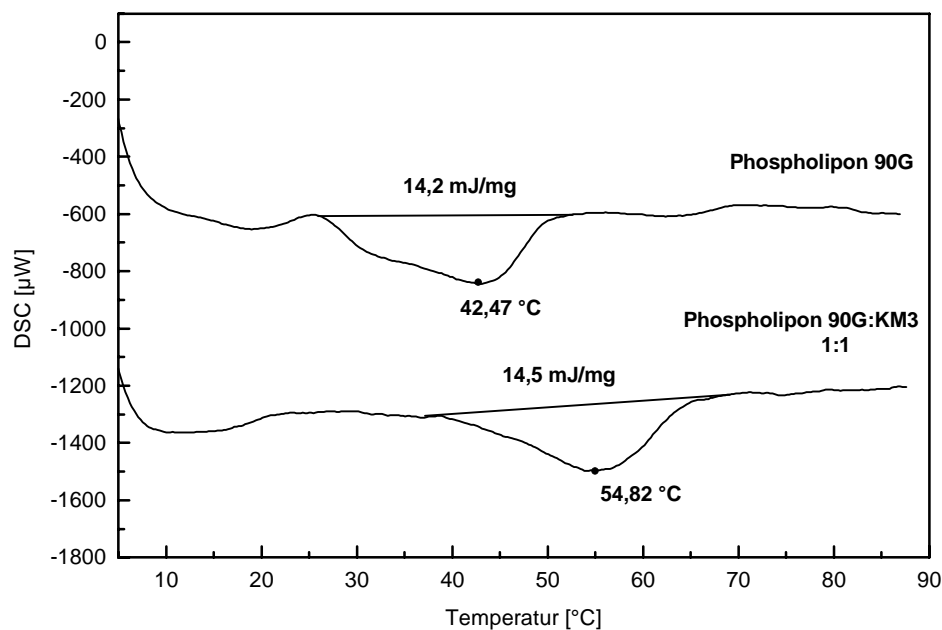


Abbildung. 4.31.: Thermogramme von Phospholipon 90G und der 1:1 Mischung mit KM3

Demnach war in der Mischung **KM3** mit Phospholipiden ein ähnliches Verhalten zu erwarten, da sich hier die polaren Kopfgruppen strukturell ebenfalls deutlich unterscheiden. Geht man vom Fehlen eines fluidisierenden Einflusses der Phospholipide aus, so müßte sich rein rechnerisch bei einer 1:1 Mischung eine Enthalpie von etwa 21 mJ/mg ergeben. Da die bestimmte Enthalpie von 14,5 mJ/mg deutlich unter dem erwarteten Wert liegt, besitzen die Phospholipide tatsächlich einen fluidisierenden Einfluß auf die Stratum corneum Lipide.

4.1.2.6 Zusammenfassende Diskussion über die Mikrostruktur der in vitro Modell Lipid Systeme mit unterschiedlichen Ceramiden (KM1-3)

Bei den in vitro Modell Mischungen aus allen Komponenten der Stratum corneum Lipide handelt es sich um lamellare Systeme, deren Schichtabstände im Bereich der für Stratum corneum Lipide beschriebenen Netzebenenabstände liegen. In **KM1** mit Ceraderm S[®] kann die Existenz einer invers hexagonalen Phase nicht ausgeschlossen werden. Da diese aber nur mit geringer Intensität mittels SAXD-Messungen nachweisbar ist, scheint der Anteil gering zu sein. WAXD-Messungen belegen bei **KM2** und **KM3** das Vorliegen von Ceramiden in kristalliner Form, was bei **KM2** auch polarisationsmikroskopisch sichtbar ist. Der Anteil an kristallinen Ceramiden scheint bei **KM2** demnach höher zu sein als bei **KM3**.

Das thermische Verhalten der drei Matrizes unterscheidet sich deutlich voneinander und kann nur bei **KM3** mit dem Verhalten extrahierter Stratum corneum Lipide verglichen werden. Bei **KM1** bewirken die im Ceraderm S[®] enthaltenen Phospholipide eine Fluidisierung der Lipide, wodurch diese überwiegend im flüssigkristallinen Zustand vorliegen, was auch durch die entsprechend geringe Umwandlungsenthalpie unterstützt wird. Der fluidisierende Einfluß der Phospholipide zeigt sich auch bei deren Zusatz zu **KM3**. Es resultiert ein System mit geringerer Umwandlungstemperatur und -enthalpie und einer reduzierten lamellaren Schichtdicke. Die Mikrostruktur von **KM2** und **KM3** scheint sowohl aus Lipiden im geordneten L_β-Zustand als auch aus einer Lamellarphase flüssigkristalliner Natur zu bestehen. Die ermittelte Übergangsenthalpie spricht allerdings für eine überwiegend gelartige lamellare Phase. Das komplexe thermische Verhalten von Matrix **KM2** weist zudem auf die Bildung einer L_β-Phase bei höheren Temperaturen hin und ist mit dem in der Literatur beschriebenen komplexen Verhalten eines Ceramid-Wasser Gemisches vergleichbar [Shah et al. 1995 a, b].

Das in Matrix **KM2** verwendete Ceramid III besteht aus einer Sphingosinbase, dem Phytosphingosin C:17, an die in Amidbindung nur ein einziger Fettsäuretyp verknüpft ist.

Das in **KM3** verwendete Ceramid Typ IV ist dagegen ein Gemisch, bei dem zum einen das Sphingosin und zum anderen die Fettsäuren unterschiedliche Kettenlängen aufweisen. Die Zusammensetzung der Sphingosinbasen beträgt laut Literatur 88,5% C18-Sphingosin, 8,5% C18-Sphinganin und 3% C-20-Sphingosin. Die α -Hydroxyfettsäuren enthalten hauptsächlich C18:0, C22:0, C24:0 und C:24:1 Fettsäuren [Curatolo und Jungalwala 1985]. Es kann eine lamellare Matrix ausgebildet werden, bei der die unterschiedlich langen CH-Ketten ineinandergreifen und durch seitliche Wechselwirkungen das lamellare System zusätzlich stabilisieren. Durch das Ineinandergreifen der Ketten und durch die ungesättigten CH-Ketten resultiert schließlich ein lamellarer Aufbau mit einem im Vergleich zu **KM2** niedrigeren

Netzebenenabstand. Abb. 4.32. gibt eine modellhafte Darstellung des Aufbaus der Lamellarphasen der Komplettmischungen wieder.

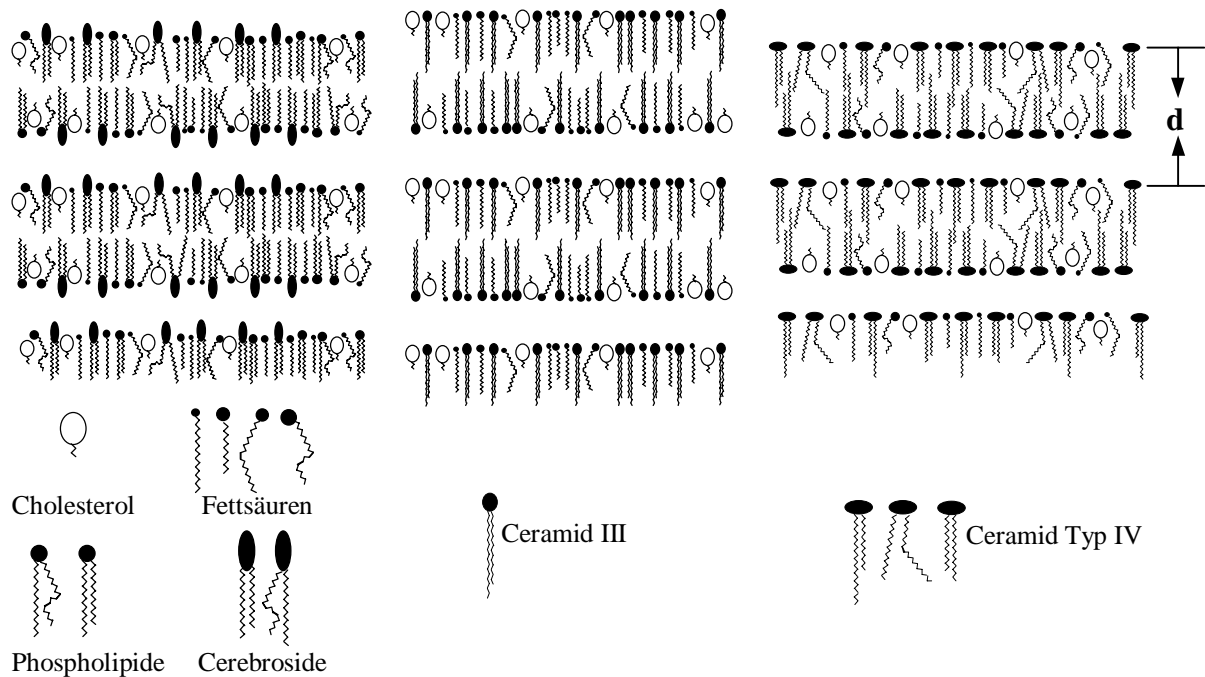


Abbildung. 4.32.: Modellhafte Darstellung des Aufbaus der Lamellarphase von KM1, KM2 und KM3

Die Lamellarphase von **KM1** wird von den Phospholipiden und den Cerebrosiden gebildet, in die Fettsäuren und das Cholesterol eingelagert sind. Die Alkylketten sind frei beweglich, wodurch es zur vermehrten Bildung von gauche-Konformeren kommt und die Dicke der Lipidschicht durch die Verkürzung der Kettenlängen abnimmt. An den voluminösen hydrophilen Zuckerrest der Cerebroside können relativ viele Wassermoleküle gebunden werden, wodurch die Dicke der wässrigen Schicht im Vergleich zu Ceramid enthaltenen Lamellarphasen zunimmt. Bei **KM2** liegen die Alkylketten bei Raumtemperatur hauptsächlich in der gestreckten all-trans-Konformation vor, wodurch eine höher geordnete Lamellarphase mit gelartigem Charakter gebildet wird. Ein Übergang dieser Lamellarphase in eine L_{β} -Phase, bei dem die CH-Ketten geneigt zur Lamellarebene angeordnet sind, ist aufgrund des beobachteten thermischen Verhaltens wahrscheinlich.

Bei der Lamellarphase von **KM3** ist durch die unterschiedlichen Kettenlängen ein Ineingreifen der Ketten möglich, wodurch die Schichtdicke der Lipidphase verringert wird. Der Ordnungsgrad der Lamellarphase erhöht sich durch die Bildung von lateralen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den OH-Gruppen der α -Hydroxyfettsäuren.

Die Kristallisation der Gelphase wird aber durch die heterogene Zusammensetzung des Ceramids und auch durch die UFS verhindert. Die Gegenwart der Hydroxylfunktion verhindert zudem möglicherweise auch die Bildung einer L_{β} -Phase, wie sie für Ceramide ohne α -Hydroxyfettsäuren beschrieben werden [Shah et al. 1995b].

4.2 Entwicklung eines Permeationsmodells zur in vitro Permeation durch Stratum corneum Modell Lipid Systeme

Im vorhergehenden Abschnitt wurden die einzelnen Modell Lipid Systeme auf deren physikochemische Eigenschaften hin untersucht und der Einfluß der einzelnen Stratum corneum Lipide auf die Mikrostruktur und das Phasenverhalten in den Mischungen aufgezeigt. Im Anschluß daran sollten anhand eines einfachen Permeationsmodells Untersuchungen durchgeführt werden, um die Barriereigenschaften der Modell Systeme, auch im Vergleich zum exzidierten humanen Stratum corneum zu testen. Als Permeationmodell wurde die sogenannte modifizierte Franz-Zelle [Franz 1975], ein Zwei-Kompartiment System in vertikaler Anordnung ausgewählt (siehe 3.3.1.3), wie sie auch für Untersuchungen an exzidiertem Stratum corneum verwendet wird. Dabei sollte das Stratum corneum, das normalerweise zwischen Donator- und Akzeptorkompartiment gespannt wird, durch die entsprechende Lipidmatrix, die sich in einem Träger befindet, ersetzt werden. Als Träger wurde eine Metallscheibe definierter Dicke mit Lochbohrungen bestimmter Größe gewählt, in die die Lipidmischung eingestrichen werden sollte. Das Volumen der Franz-Zelle betrug zwischen 75 und 85 ml, so daß bei Verwendung von 5 ml einer 0,5%igen Diclofenac-Na Lösung zu keinem Zeitpunkt der Permeation die Konzentration des Arzneistoffes im Akzeptor oberhalb 10% der Sättigungslöslichkeit lag, selbst wenn die gesamte Menge des Arzneistoffes permeiert hätte. Die Löslichkeit von Diclofenac-Na in Wasser liegt bei 30 mmol (etwa 1%), die Konzentration im Akzeptor wäre maximal 0,03%. Demnach waren während des gesamten Versuchsverlaufes perfect sink Bedingungen gewährleistet.

Vorversuche zur Permeabilität von Mischung M5 in direktem Kontakt mit einer wäßrigen Donator- und Akzeptorlösung zeigten bereits nach 3h Versuchsdauer Undichtigkeiten dieser Modellmembran durch einen sprunghaften Anstieg der permeierten Arzneistoffmenge an. Nach 4h waren rein makroskopisch Löcher in der Lipidschicht erkennbar sowie eine Trübung der Akzeptorlösung, die durch herausgelöste Matrixbestandteile verursacht wurde. Deshalb sollte die Lipidmischung zum Donator und Akzeptor hin durch eine hydrophobe Membran abgedichtet werden.

4.2.1 Auswahl der hydrophoben Trennmembran

Die für die Permeationsuntersuchungen verwendete hydrophobe Membran muß einerseits die Hydratation der verschiedenen Mischungen während der Permeationsuntersuchungen minimieren, darf aber andererseits keinen Diffusionswiderstand für den Modellarzneistoff Diclofenac-Na darstellen. Deshalb wurde zuerst das Permeationsverhalten von Diclofenac-Na durch verschiedene Membran-Typen ohne Lipidmischung untersucht. Die Untersuchungen wurden mit der modifizierten Franz-Zelle und der Trägerscheibe durchgeführt. Die silikonisierte Dialysemembran wurde doppelt verwendet, die anderen Membranen aus Kostengründen nur einfach. Zum Silikonisieren der Dialysemembran wurde diese 5 min lang durch Einlegen in Wasser hydratisiert und anschließend 2 min in eine 2%ige (m/m) Lösung von Silikon AK350 in Diethylether eingelegt. Nach dem Verdunsten des Ethers wurde die Dialysemembran wie die anderen Membranen plan auf die Metallscheibe aufgelegt, in die Franz-Zelle eingespannt und die Permeationsuntersuchung durchgeführt.

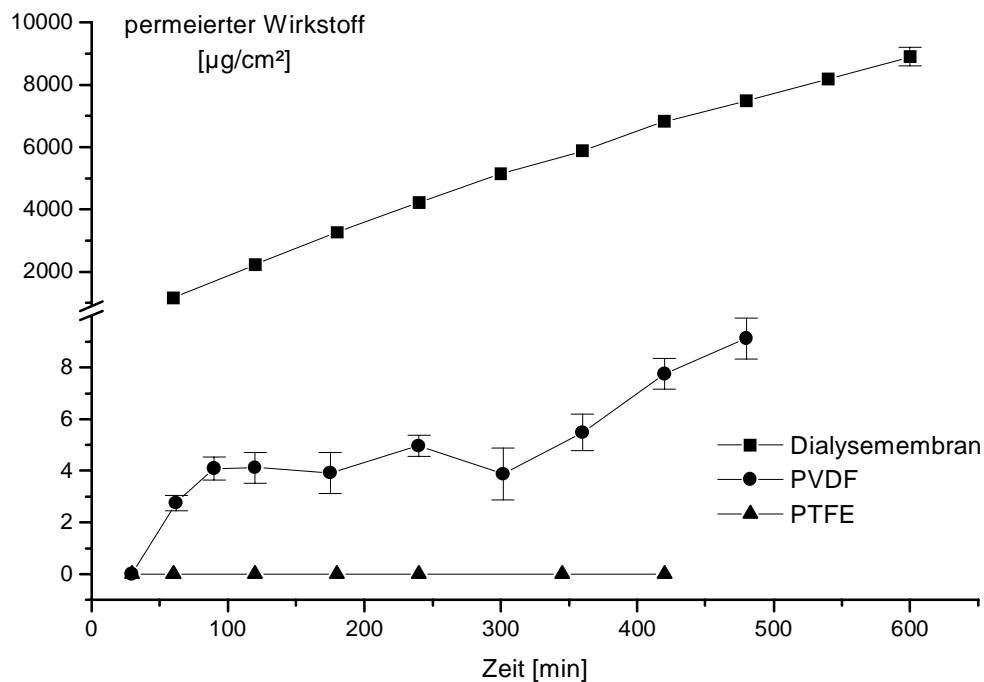


Abbildung 4.33.: Permeation von Diclofenac-Na aus 0,5%iger wäßriger Lösung durch verschiedene hydrophobe Membranen; Dialysemembran (n = 3), PVDF (n = 3), PTFE (n = 2)

Abb. 4.33. zeigt die durch die hydrophoben Membranen permeierte Arzneistoffmenge. Bei der PTFE-Membran ist keinerlei Arzneistoffpermeation während der Versuchsdauer detektierbar. Dagegen zeigt die PVDF-Membran eine geringe Permeabilität für Diclofenac-Na, die nur wenig oberhalb der Nachweisgrenze liegt, wodurch die starken Schwankungen

innerhalb der Kurve zu erklären sind. Bei der silikonisierten Dialysemembran tritt schon nach einer Stunde ein großer Anteil des Arzneistoffes durch diese hindurch, wobei der Diclofenac-Na Fluß aus der wäßrigen Lösung einer annähernd linearen Beziehung zwischen der kumulativ freigesetzten Arzneistoffmenge und der Zeit gehorcht. Dieser lineare Zusammenhang weist auf eine membrankontrollierte Diffusionsgeschwindigkeit für den Arzneistoff hin. Diese wäre aber unkritisch und könnte vernachlässigt werden, falls die Diffusion durch die Modell Lipid Mischungen langsamer verläuft als durch die Dialysemembran.

Insgesamt gesehen stellt von allen drei Membranen die silikonisierte Dialysemembran den geringsten Diffusionswiderstand für den Arzneistoff dar, weshalb diese als geeignet für die Permeationsuntersuchungen erscheint. Der Grund für die geringe Permeabilität der beiden ersten Membran-Typen liegt möglicherweise in der sehr geringen Benetzbarkeit durch wäßrige Lösungen, so daß der in Wasser gelöste Arzneistoff nicht durch diese hindurchtreten kann. Bei der silikonisierten Membran handelt es sich zwar um eine hydrophobisierte Membran, es wird aber das Vorhandensein wassergefüllter Poren in der Membran diskutiert [Zatz 1995], die eine Diffusion des gelösten Arzneistoffes durch die Membran ermöglichen. Daß durch die so präparierte Membran dennoch ein übermäßiger Wasserdurchtritt verhindert wird, wurde sowohl von Kriwet [1994] bestätigt, die bei Freisetzungsuntersuchungen nur einen Wassereinstrom in den Donator $< 3\%$ (m/m) nach 6-stündiger Versuchsdauer nachweisen konnte, als auch von Stoye [1997] beschrieben, die über einen Zeitraum von 8h ebenfalls keinen Wassereinstrom in das Donatorkompartiment beobachtete.

4.2.1.1 Silikonisierungsmethode

Nachfolgend wurde überprüft, ob die Art der Silikonisierung einen starken Einfluß auf die Permeabilität der Dialysemembran für den Arzneistoff hat. Untersuchungen von Konjer und Helmholz [1999] beschäftigten sich mit unterschiedlichen Silikonisierungsmethoden einer Dialysemembran, wobei zum einen verschiedene Silikontypen (AK350, 500, 1000, 2000) getestet und die Konzentration der Silikon-Ether Mischung bei der Präparation variiert wurde. Mit den unterschiedlich präparierten Membranen wurden jeweils Permeationen einer wäßrigen Diclofenac-Na und Ibuprofen-Lys Lösung durchgeführt. Die Ergebnisse von Konjer und Helmholz ergaben zwar eine schlechtere Durchlässigkeit der Membranen bei zunehmender Kettenlänge des Silikons, die Unterschiede sowohl zwischen den einzelnen Konzentrationen als auch zwischen den verschiedenen Silikontypen hinsichtlich der

Permeabilität waren aber nur sehr gering. Gleiche Ergebnisse wurden auch für den Arzneistoff Ibuprofen-Lys erhalten.

Eigene Untersuchungen bestätigen die Ergebnisse von Konjer und Helmholz insofern, als daß der Diffusionswiderstand für den Arzneistoff um so höher war, je höher der Polymerisationsgrad und damit die Viskosität der Silikone war (Abb. 4.34.). Da der Diffusionswiderstand in der Lipidmatrix voraussichtlich sehr viel größer sein dürfte als in der Dialysemembran, kann letzterer in den späteren kinetischen Berechnungen vernachlässigt werden.

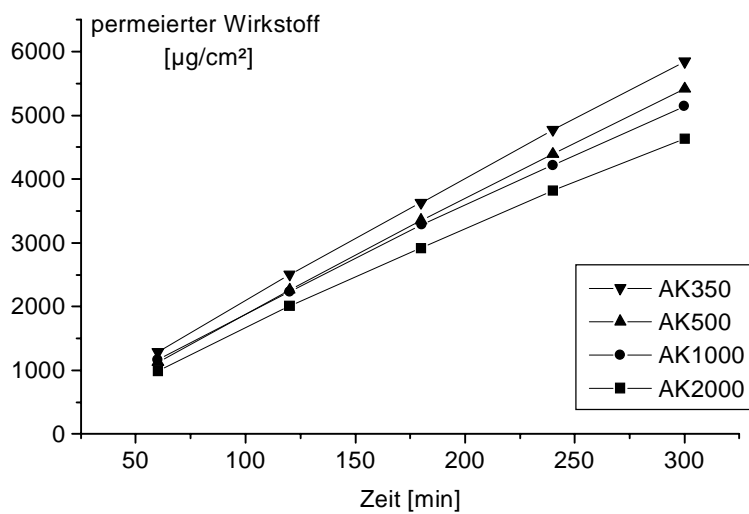


Abbildung 4.34.: Permeation von Diclofenac-Na aus 0,5%iger Lösung durch mit verschiedenen Silikonen (2%ig) imprägnierte Dialysemembran (doppelt)

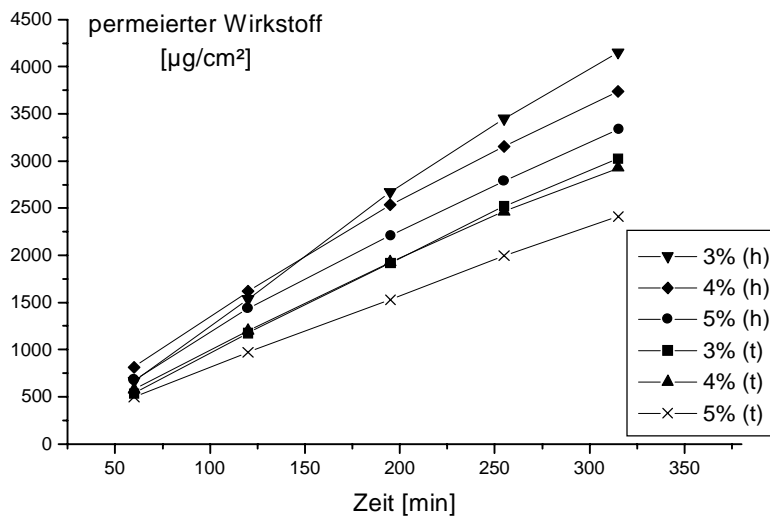


Abbildung 4.35.: Permeation von Diclofenac-Na aus 0,5%iger Lösung durch mit AK500 verschiedener Konzentrationen imprägnierte Dialysemembran (doppelt); h = hydratisiert, t = trocken

Abb. 4.35. zeigt die Durchlässigkeit der Membranen bei Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen des Silikons Typ AK500 ohne und mit vorheriger Hydratisierung. Die Permeabilität für den Arzneistoff ist bei trockener Silikonisierung geringer als bei Dialysemembranen, die vorher hydratisiert wurden und nimmt außerdem mit steigender Konzentration der Silikon-Ether Mischung ab.

Da die trocken silikonisierte Dialysemembran sehr unflexibel und wellig ist, konnte sie nicht plan auf die mit der Lipidmischung präparierte Siebscheibe aufgelegt werden. Der geringe Wassergehalt der Dialysemembran muß deshalb in den folgenden Versuchen in Kauf genommen werden. Er kann minimiert werden, indem die hydratisierte Membran vor der Silikonisierung kurz mit fusselfreiem Zellstoff abgetupft wird.

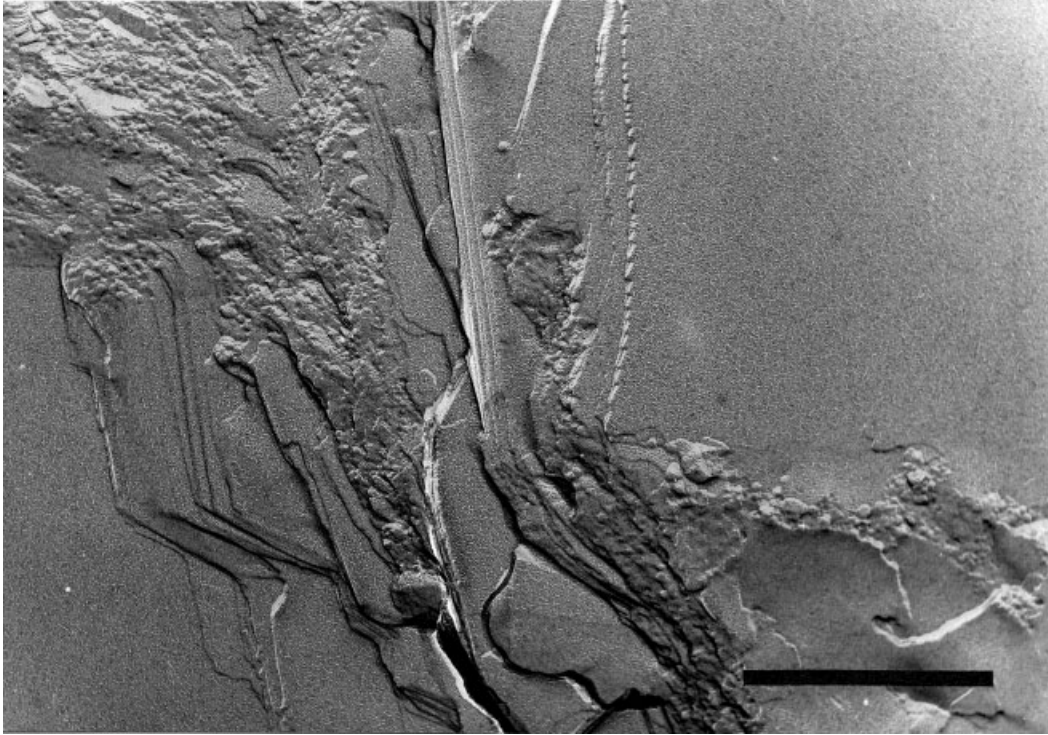
4.2.1.2 Wechselwirkungen zwischen Silikonen und Stratum corneum Lipiden

Silikone sind lineare Polymere, die aus Dimethylsiloxaneinheiten bestehen, sog. PDMS = Polydimethylsiloxane (Cosmetic and Toiletry Fragrance Association (CTFA) Name Dimethicon). Die hohe Molekülflexibilität begründet die physikochemischen Eigenschaften der Silikone wie eine geringe Oberflächenspannung und sehr gute Filmbildungseigenschaften durch einen hohen Spreitungskoeffizient [Klimisch 1991]. Die Viskosität nimmt mit steigendem Polymerisationsgrad zu, ist aber nur im geringen Maße von der Temperatur abhängig. Bei der Verwendung der silikonisierten Membran für die Permeationsuntersuchungen kommt die Lipidmischung in dem Träger direkt mit dem entsprechenden Silikon in Berührung. Es stellt sich deshalb die Frage, ob es durch das Silikon zu einer Veränderung der Systeme während der Permeation kommt und nicht mehr die ursprüngliche Matrix mit bestimmten physikochemischen Eigenschaften die Permeabilität für den Arzneistoff bestimmt. Ein ausgewähltes Modell System wurde auf mögliche Wechselwirkungen mit vier Silikonen unterschiedlicher Kettenlänge überprüft. Zusätzlich wurde der Einfluß der Silikone auf die physikochemischen Eigenschaften von exzidiertem humanen Stratum corneum untersucht, um Rückschlüsse auf das Verhalten mit anderen Stratum corneum Lipidbestandteilen zu bekommen.

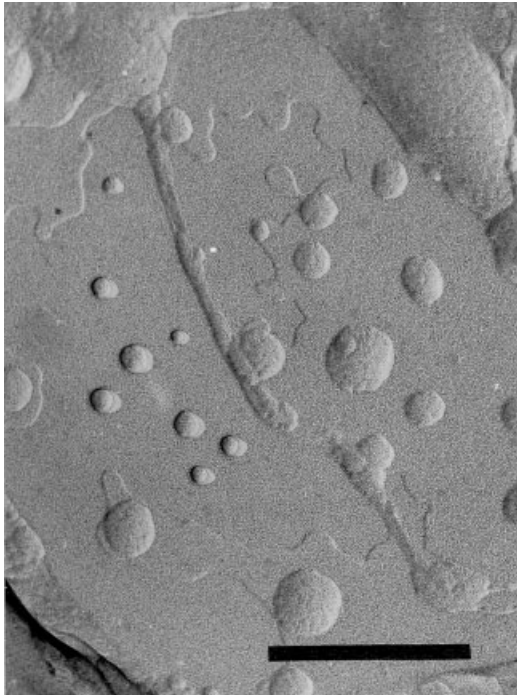
4.2.1.2.1 Untersuchung der Wechselwirkungen von Silikonen mit M5 (UFS + GFS)

Da das System aus UFS und GFS einfach zusammengesetzt ist, die enthaltenen Lipide aber einen wesentlichen Anteil an den Gesamtlipiden des Stratum corneum ausmachen, wurde der

Einfluß der Silikone zuerst anhand dieser Mischung untersucht. Dabei wurde das entsprechende Silikon zur fertigen Matrix gegeben und diese nach der Homogenisierung der Mischung polarisationsoptisch, mittels TEM, SAXD und DSC untersucht.



b)



c)

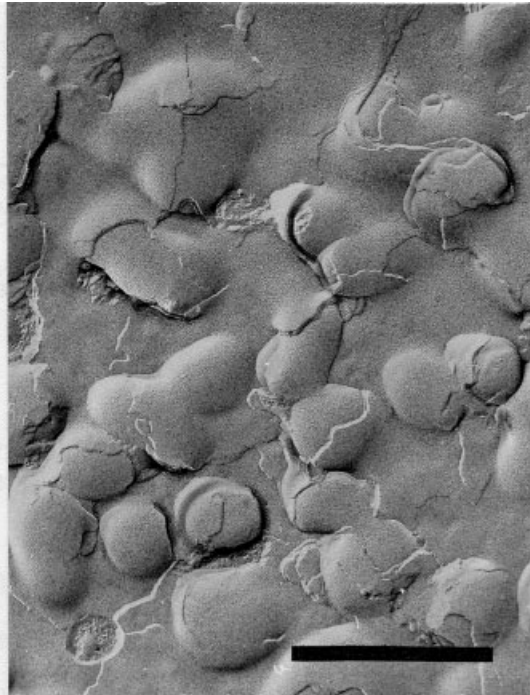


Abbildung. 4.36.: TEM-Aufnahmen von M5 a) mit 10% AK500 b) mit 10% AK2000 und c) mit 10% AK350; Balkenlänge entspricht jeweils 500 nm

Unter dem Polarisationsmikroskop betrachtet, ergeben alle Silikon-Lipid Mischungen das gleiche optisch anisotrope Bild wie das ursprüngliche System. Auch TEM-Aufnahmen zeigen die für die Mischung charakteristischen Bestandteile wie invers hexagonale und lamellare Strukturen mit geraden Bruchkanten (Abb. 4.36.a).

In einigen Bereichen sind Tröpfchen zu erkennen, die als aufgelagerte Silikotropfen interpretiert werden können, andere Aufnahmen zeigen ein emulsionsartiges System, so daß davon ausgegangen wird, daß das Silikon als separierte Phase vorliegt (Abb. 4.36. b,c).

SAXD-Messungen zeigen keine signifikante Änderung der Netzebenenabstände sowohl der invers hexagonalen als auch der lamellaren Mesophase (Abb. 4.37.).

DSC-Untersuchungen ergeben ebenfalls keine Veränderung des onsets und der Peakmaximumtemperatur allerdings eine Verringerung der Enthalpie (Abb. 4.37. b,c).

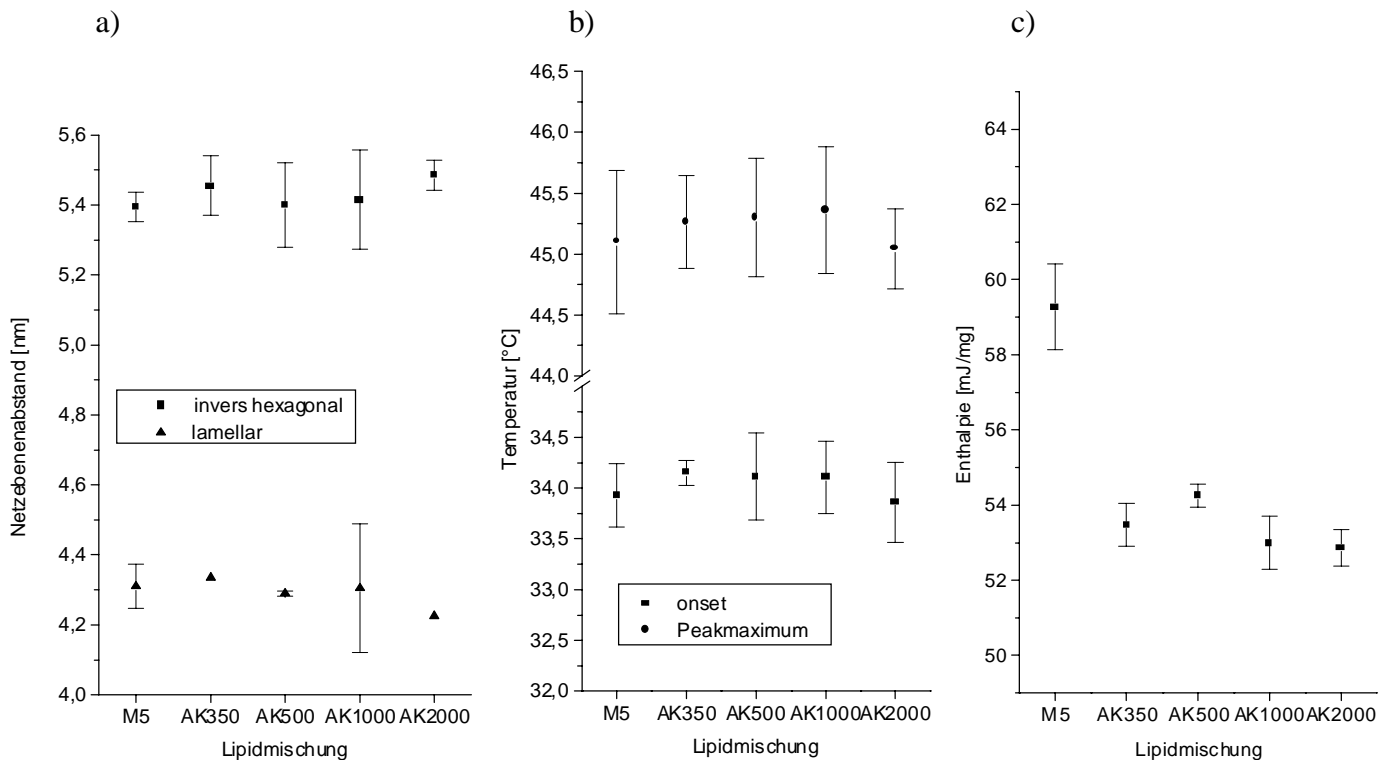


Abbildung 4.37.: Physikochemische Eigenschaften von M5 im Vergleich zu den Silikon-Lipid Mischungen mit 10% (m/m) des entsprechenden Silikons a) Netzebenenabstände (n = 3) b) onset und Peakmaximumtemperatur c) Enthalpie (jeweils n = 4)

Da die verwendeten Silikone im untersuchten Temperaturbereich keinerlei Übergänge aufweisen, erwartet man bei einem Silikonanteil von 10% eine entsprechende Verringerung der Enthalpie um ca. 6 mJ/mg mit einer resultierenden Peakenthalpie von etwa 53 mJ/mg. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung liegen die ermittelten Peakenthalpien bei allen Mischungen in diesem Bereich.

Mit den verwendeten Methoden sind demnach keine Veränderungen der physikochemischen Eigenschaften dieser Modell Lipid Mischung durch die untersuchten Silikone nachweisbar.

4.2.1.2.2 Untersuchung der Wechselwirkungen von Silikonen mit exzidiertem humanen Stratum corneum

Das verwendete Modell Lipid System M5 ist zwar aus Teilkomponenten der Stratum corneum Lipide zusammengesetzt, es fehlen aber noch Ceramide und Cholesterol als wichtige Bestandteile. Es wurden deshalb die Wechselwirkungen zwischen den Silikonen und exzidiertem Stratum corneum untersucht. Silikone werden zunehmend in topischen Formulierungen eingesetzt, da sie im Vergleich zu Kohlenwasserstoffen wie Paraffin und Vaseline einige Vorteile aufweisen [DiSapio 1994]. Sie bilden auf der Haut einheitliche, wasserabweisende aber nicht okkludierende Filme und verleihen der Haut ein glattes, nicht glänzendes Aussehen. Bei ihrem Einsatz beispielsweise in Hautlotionen, Cremes und Sonnenschutzprodukten kommt einer großer Teil der Haut mit den Silikonen in Berührung, so daß die Frage der möglichen Wechselwirkungen mit Stratum corneum Lipiden nicht nur für das zu entwickelnde Permeationsmodell relevant ist. Die Untersuchungen an exzidierter Humanhaut mittels DSC und WAXD sollten darüber Aufschluß geben, ob Silikone grundsätzlich in der Lage sind, den strukturellen Aufbau von Stratum corneum Bestandteilen zu verändern.

Wichtig bei vergleichenden Hautuntersuchungen ist die Verwendung von Hautstücken aus dem gleichen Areal eines Spenders, da die Lipidzusammensetzung und somit die physikochemischen Eigenschaften je nach Art des Spenders und der Hautregion variieren. Abb. 4.38. zeigt das Thermogramm unbehauelter und mit Silikonen behauelter Haut. Die unbehauelte Haut wies nach der Lagerung vor Versuchsbeginn einen Hydratationsgrad von etwa 20% (m/m) auf, der durch thermogravimetrische Messungen bestimmt wurde.

Das unbehauelte Stratum corneum zeigt deutlich zwei endotherme Phasenübergänge bei 69°C und 81°C und ansatzweise Peaks bei 40°C und oberhalb 100°C. Die Umwandlungen bei 69°C und 81°C werden auf die Stratum corneum Lipide zurückgeführt, wobei man bei 69°C entweder eine allgemeine Unordnung innerhalb der Lamellen oder eine Umwandlung der lateralen hexagonalen Packung der Lipide in den flüssigen Zustand diskutiert. Der Umwandlung bei 81°C wird eine Beteiligung der an die Proteinstrukturen der Korneozyten gebundenen Lipide zugeschrieben (siehe 2.2.2.2.5).

Da durch die abfallende Basislinie die Bestimmung des onsets und der Enthalpie schwierig ist, werden als charakteristische Temperaturen die Peakmaxima der beiden mittleren Peaks für vergleichende Untersuchungen verwendet.

Falls Wechselwirkungen mit dem Stratum corneum auftreten, so kann sich dies in einer Veränderung des Kurvenverlaufes wie z.B. in einer Verschiebung des Peakmaximums zu höheren oder niedrigeren Temperaturen oder dem Verschwinden eines Peaks äußern. Bei den mit den entsprechenden Silikonen behandelten Proben erkennt man weder im Kurvenverlauf noch bei der Peakmaximumtemperatur eine signifikante Veränderung im Vergleich zur unbehandelten Haut.

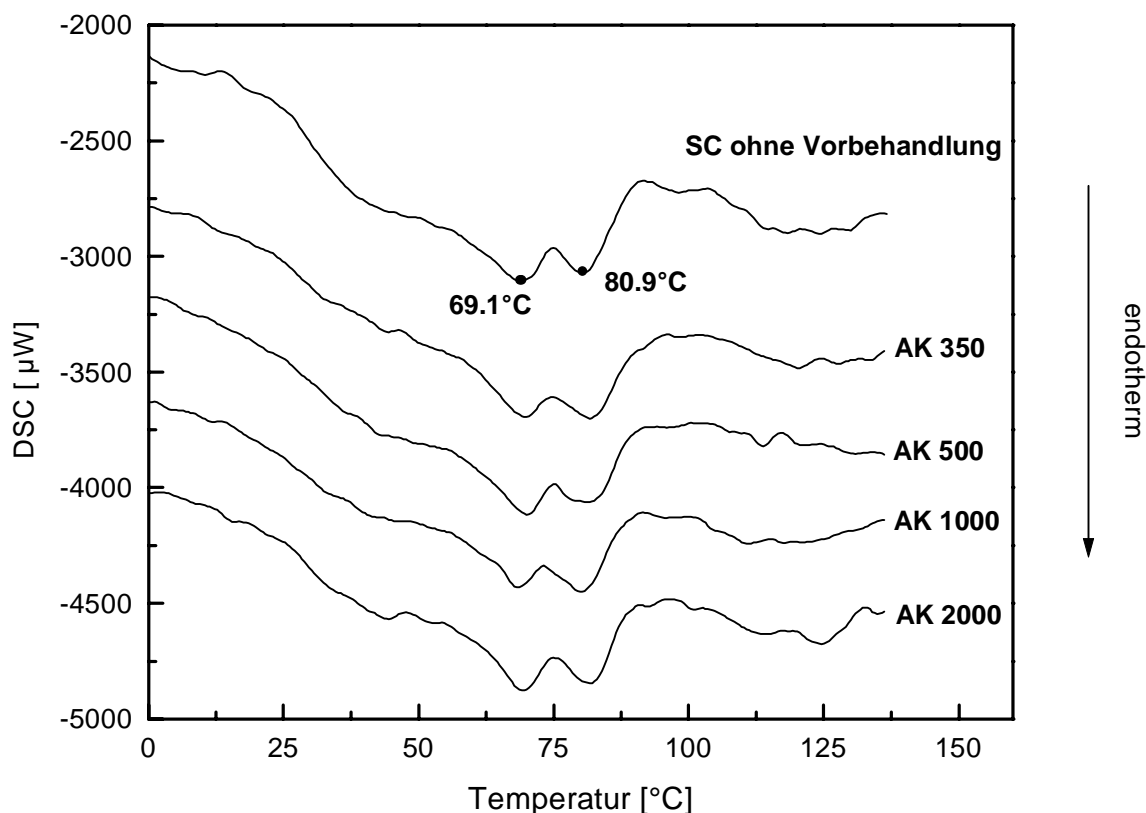


Abbildung 4.38. Thermogramm von unbehandeltem und mit Silikonen behandeltem Stratum corneum;
Spender: weiblich, Innenseite Oberschenkel, 50 Jahre

Zur Verifizierung wurden Röntgenweitwinkelmessungen an unbehandeltem und mit Silikonen behandeltem Stratum corneum durchgeführt, um die Nahordnung der Stratum corneum Bestandteile zu bestimmen. Die Detektion der Interferenzen erfolgt hier durch Schwärzung eines Röntgenfilmes, wobei sich aus dem Radius der auftretenden Beugungsringe der Beugungswinkel θ ergibt ($\theta = r/2$), mit dem anschließend der Netzebenenabstand d nach Bragg berechnet werden kann.

Das unbehandelte Stratum corneum der gleichen Spenderin weist zwei gut zu detektierende Interferenzen bei 0,370 nm und 0,411 nm auf. Die Interferenz bei 0,37 nm wird durch die orthorhombische Anordnung der Lipidketten im Gelzustand verursacht. Die Interferenz bei 0,41 nm wird den an den Korneozyten gebundenen Lipiden in hexagonaler Anordnung zugeordnet. Auch hier führt eine Behandlung des Stratum corneum mit den Silikonen zu keiner sichtbaren Veränderung des Interferenzmusters und der Nahordnungsabstände.

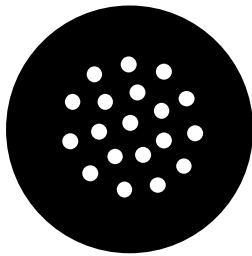
Sowohl DSC- und WAXD-Messungen an exzidiierter Humanhaut als auch die Untersuchungen der Silikon-Lipid Mischungen ergeben keine Veränderung der physikochemischen Eigenschaften der jeweiligen Systeme. Es kann daraus geschlossen werden, daß bei Verwendung einer silikonisierten Dialysemembran für das Permeationsmodell ebenfalls keine Veränderungen der zu untersuchenden Lipidmatrizes zu erwarten sind, so daß die entsprechend präparierte Membran für den Einsatz in dem Permeationsmodell geeignet erscheint. Als Konzentration für spätere Untersuchungen wurden jeweils 5% ige (m/m) Silikon-Ether Mischungen verwendet.

4.2.2 Reproduzierbare Schichtdicken und Flächen

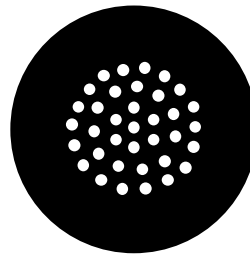
In vitro Permeationsuntersuchungen zur Abschätzung der perkutanen Absorption von Arzneistoffen sollten zur statistischen Absicherung immer mehrfach erfolgen. Bei der Verwendung von exzidiierter Haut als Permeationsmembran ist die Verfügbarkeit des menschlichen Gewebes ein limitierender Faktor. Ein Vorteil bei der Verwendung von Modell Lipid Mischungen für die Permeation ist die unbegrenzte Verfügbarkeit der Ausgangssubstanzen und die bedarfsgerechte Herstellung von Systemen mit gleichbleibenden physikochemischen Eigenschaften. Um Permeationsuntersuchungen an unterschiedlichen Lipidmatrizes miteinander vergleichen zu können, muß allerdings sichergestellt werden, daß diese immer durch reproduzierbare und definierte Flächen und Schichten stattfinden. Dies könnte durch ein inertes Trägersystem mit definierten Abmessungen, in das die entsprechende Mischung eingestrichen wird, gewährleistet werden.

Vorversuche an Trägern, die eine Permeationsöffnung mit einem Durchmesser von 1-2 cm enthielten, zeigten rein makroskopisch keine glatten Oberflächen nach Einstreichen der Mischungen. Weiterhin sollte der Materialbedarf an Lipidmischung je Permeation möglichst gering gehalten werden, um mit einer Charge mindestens 6 Untersuchungen durchführen zu können. Schließlich wurden zwei verschiedene Siebscheiben aus korrosionsbeständigem Stahl

mit unterschiedlichen Lochdurchmessern auf ihre Eignung für die Permeationsuntersuchungen getestet (Abb. 4.39.).



Träger I:
19 Löcher $d = 2,5$ mm
Permeationsfläche $0,93$ cm²



Träger II:
36 Löcher $d = 1,6$ mm
Permeationsfläche $0,72$ cm²

Abbildung 4.39.: Getestete Siebscheiben aus V2A-Stahl, Dicke 0,8 mm

Eingestrichene Mischung	Menge Lipidmischung [mg]	
	Träger I	Träger II
M5	$97,03 \pm 5,86$ (n = 6)	$97,09 \pm 1,31$ (n = 6)
KM1	$100,87 \pm 5,73$ (n = 6)	$84,20 \pm 4,46$ (n = 6)

Tabelle 4.40.: Vergleich der in die beiden Träger eingestrichene Menge an Lipiden anhand Matrix M5 und KM1

Tab. 4.40. zeigt beispielhaft anhand Matrix M5 und KM1, daß durch die Verwendung des Trägers ein reproduzierbares Einstreichen der Lipidmischung möglich ist. Eine Reduzierung der Durchmesser der Öffnungen in Träger II führt neben einer leichten Verringerung der Einwaage auch zu einer Verringerung der Standardabweichungen. Von der Handhabung erwies sich Träger II besonders bei niedrig viskosen Lipidmischungen wie M2 und M6 als besser geeignet, da hier ein glattes Aussehen der erzeugten Oberfläche erzielt werden konnte. Für die späteren Permeationsuntersuchungen wurde deshalb Träger II verwendet.

4.2.3 Permeationsuntersuchungen

4.2.3.1 Untersuchung der Hydratation während der Permeation

Nach Literaturangaben [Stoye 1997] verhindert die silikonisierte Dialysemembran in einem Zeitraum von bis zu 8h einen Wassereinstrom in den Donator. Um dies zu überprüfen,

wurden Permeationsuntersuchungen durchgeführt, bei denen während des Versuchsverlaufes die Permeation bei einzelnen Zellen in bestimmten Zeitabständen gestoppt, die verwendete Lipidmischung aus den Löchern der Siebscheibe entfernt, und der Wassergehalt mittels Thermogravimetrie bestimmt wurde. Während der ersten Stunden der Permeation bleibt der Wassergehalt relativ konstant, steigt dann etwas an und beträgt nach 6h etwa 3% mehr im Bezug zur Ausgangssubstanz. Ab 8h ist dann eine kontinuierliche Zunahme des Hydratationsgrades bis auf etwa 65% am Ende der Permeation nach 23h zu verzeichnen (Tab. 4.41.).

Zeit	Wassergehalt in % [m/m]
0h	32,2
2h	31,7
4h	33,5
6h	35,4
8h	41,3
10h	45,0
23h	64,6

Tabelle 4.41.: Wassergehalt der Lipidmischung M5 bei einer Permeation von Diclofenac-Na aus 0,5% iger wäßriger Lösung; Silikonisierung mit einer 5% igen Silikon-Ether Mischung von AK350

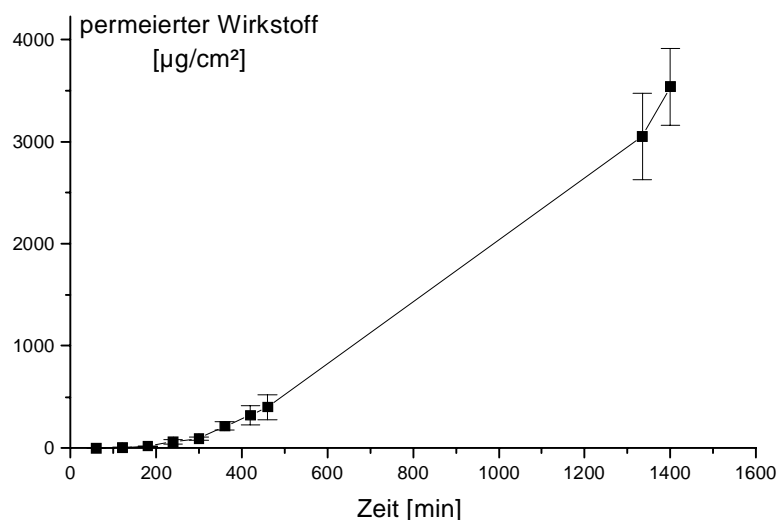


Abbildung 4.42.: Permeation von Diclofenac-Na aus 0,5% iger wäßriger Lösung durch M5 (n = 3); Silikonisierung mit einer 5% igen Silikon-Ether Mischung von AK350

Demnach findet also schon ab 6h eine geringe Hydratation der Lipidmischung statt, die aber solange zu vernachlässigen ist, wie keine Undichtigkeiten auftreten. Undichtigkeiten müßten sich durch einen starken Anstieg des Arzneistofffluxes zu erkennen geben. In einem Vorversuch ist nach einer lag-Zeit von etwa 2h eine geringe Menge Arzneistoff im Akzeptor

zu detektieren, die zwischen 4 und 7h linear zunimmt und dann überproportional ansteigt (Abb.4.42.).

Undichtigkeiten innerhalb des Systems infolge übermäßiger Hydratation äußern sich demnach auch durch einen erhöhten Anstieg der permeierten Menge an Arzneistoff. Dies konnte durch Untersuchungen an Matrix M1 und KM1 bestätigt werden, bei denen ebenfalls nach 8h eine starke Erhöhung der permeierten Arzneistoffmenge zu verzeichnen war.

Der Versuchszeitraum bei Permeationsuntersuchungen mit dem Modellsystem ist deshalb bei der Verwendung einer mit AK350 silikonisierten Dialysemembran auf 8h zu begrenzen, da diese nach diesem Zeitraum eine Minimierung des Wassereinstroms nicht mehr gewährleisten kann. Der Grund für die Veränderung der Membraneigenschaften könnte in einer zunehmenden Bildung wassergefüllter Poren durch den hydrostatischen Druck des Donators liegen, wodurch das Silikon aus den Poren der Membran verdrängt wird und sich der Silikonfilm auf der Oberfläche der Membran verändert.

Es wurde deshalb untersucht, ob durch die Verwendung längerer Silikone mit höherer Viskosität die Haftfähigkeit auf der Membran verbessert werden kann, indem ein über einen längeren Zeitraum beständiger Film resultiert. Eine Verlängerung der Versuchsdauer wäre von Vorteil, da bei der Verwendung halbfester Zubereitungen als Donator mit einer größeren lag-Zeit zu rechnen ist. Die Mikrostruktur in einer halbfesten Zubereitung stellt häufig einen größeren Diffusionswiderstand als die einer wässrigen Zubereitung dar, so daß die Zeit bis zur Gleichgewichtseinstellung, bei der pro Zeiteinheit eine konstante Menge durch die Matrix permeiert, länger dauert.

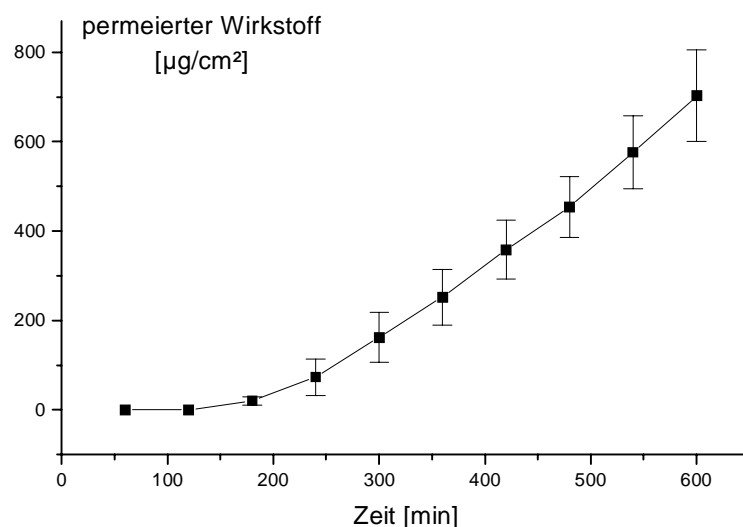


Abbildung 4.43.: Permeation von Diclofenac-Na aus 0,5%iger wässriger Lösung durch M5 (n = 3); Silikonisierung mit einer 5%igen Silikon-Ether Mischung von AK500 (n = 5)

Es wurden Permeationsuntersuchungen durchgeführt, bei der die Membranen mit 5%igen Silikon-Ether Mischungen der Silikontypen AK500, AK1000 und AK2000 hydrophobisiert wurden.

Abb. 4.43. gibt das Permeationsprofil von Diclofenac-Na durch M5 bei Verwendung von AK500 zur Silikonisierung wieder. Nach einer lag-Zeit von 2h ist ein Durchtritt des Wirkstoffes durch die Lipidmatrix zu erkennen, der nach 4h in einen linearen Anstieg der Konzentration im Akzeptorkompartiment übergeht und auch im Versuchszeitraum bis 10h konstant bleibt. Hydratationsuntersuchungen ergeben bei der Bestimmung des Wassergehaltes der Lipid Mischung nach 10h einen Wert von 40,5 %, so daß durch Verwendung des längerkettigen Silikons AK500 eine Erhöhung des Versuchszeitraumes um 2h möglich ist. Entgegen den Erwartungen brachte der Einsatz der mit AK1000 und AK2000 präparierten Membran keine signifikante Verbesserung hinsichtlich des Hydratationsverhaltens der Mischung, so daß in den folgenden Permeationsuntersuchungen jeweils eine 5%ige Lösung von Silikon AK500 in Ether zur Silikonisierung zum Einsatz kam.

4.2.3.2 Permeationsuntersuchungen durch die Modell Lipid Systeme M1-M7

Durch die beschriebenen Vorversuche konnten die Parameter der Permeationsuntersuchungen festgelegt werden. Es wurde im folgenden die Permeabilität sämtlicher Modell Lipid Systeme gegenüber dem Modell Arzneistoff Diclofenac-Na in 0,5%iger wäßriger Lösung bestimmt. Zur Absicherung der Ergebnisse wurden stets mehrere Chargen der Modell Lipid Mischung untersucht und miteinander verglichen. Bei jeder Permeation erfolgte jeweils vor und nach Ende der Permeation eine Bestimmung des Hydratationsgrades der jeweiligen Lipidmischung. Abbildung 4.44. gibt das Permeationsverhalten des Arzneistoffes durch das Grundsystem aus UFS wieder. Nach einer Zeit von etwa 2h permeiert eine zunehmende Menge an Arzneistoff durch das System und erreicht nach etwa 3h eine konstante Permeationsrate. Das Auftreten einer lag-Zeit, kommt dadurch zustande, daß sich am Anfang des Versuches noch kein Arzneistoff in der Matrix befindet und demnach eine gewisse Zeit benötigt wird, bis der Arzneistoff aus dem Donator in den Akzeptor gelangen kann. Da die Diffusionskoeffizienten von Arzneistoffen in wäßrigen Lösungen aufgrund der geringen Viskosität relativ hoch sind, kann von einem membrangesteuerten Transport des Arzneistoffes ausgegangen werden.

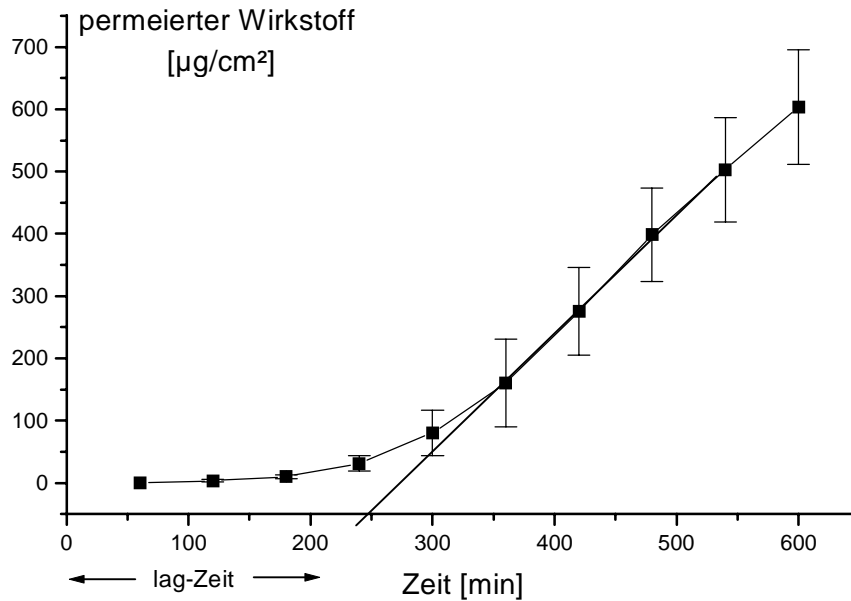


Abbildung 4.44.: Permeationsprofil von Diclofenac-Na aus 0,5%iger Lösung durch Lipidmatrix M1; durchschnittliche Einwaage $96,36 \text{ mg} \pm 5,58$ ($n = 5$), Hydratationsgrad nach Ende der Permeation 42,8%

Bei Permeationsuntersuchungen an Stratum corneum wird in der Regel der Permeationskoeffizient (siehe 2.5.2) also der Flux unter Einbeziehung der Konzentration des Donators angegeben. Deshalb erfolgt die Auswertung der Permeationen durch die Modell Lipide ebenfalls anhand des Permeationskoeffizienten, wodurch ein direkter Vergleich mit den mit Stratum corneum erhaltenen Daten möglich ist. Für das Grundsystem **M1** beträgt der Permeationskoeffizient $6,22 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ($\pm 1,51 \text{ cm/s}$) und liegt damit wesentlich höher als der von Kriwet [1994] an exzidiertem humanen Stratum corneum ermittelte Permeationskoeffizient. Unter Verwendung einer Donatorlösung gleicher Konzentration wird dieser mit $1,79 \cdot 10^{-7} \text{ cm/s}$ angegeben. Bei der quantitativen Analyse der Arzneistoffkonzentration im Akzeptor trat im Chromatogramm ein zusätzlicher Peak bei einer Retentionszeit von 3,4 min auf, dessen Fläche mit zunehmender Permeationszeit anstieg. Zur Identifizierung wurden das Silikon und die in dem Grundsystem enthaltenen UFS injiziert, wodurch der Peak den Fettsäuren zugeordnet werden konnte. Demnach wird während der Permeationsuntersuchungen ein Teil der Fettsäuren aus der Matrix herausgelöst. Da die Linol- und die Ölsäure die gleiche Retentionszeit aufwiesen, war es weder möglich, zu bestimmen, welche der Fettsäuren herausgelöst wurde, noch konnten einzelne Fettsäuren quantifiziert werden. Zur vergleichenden Beurteilung wurde deshalb die kumulierte Peakfläche des Fettsäurepeaks gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 4.45.).

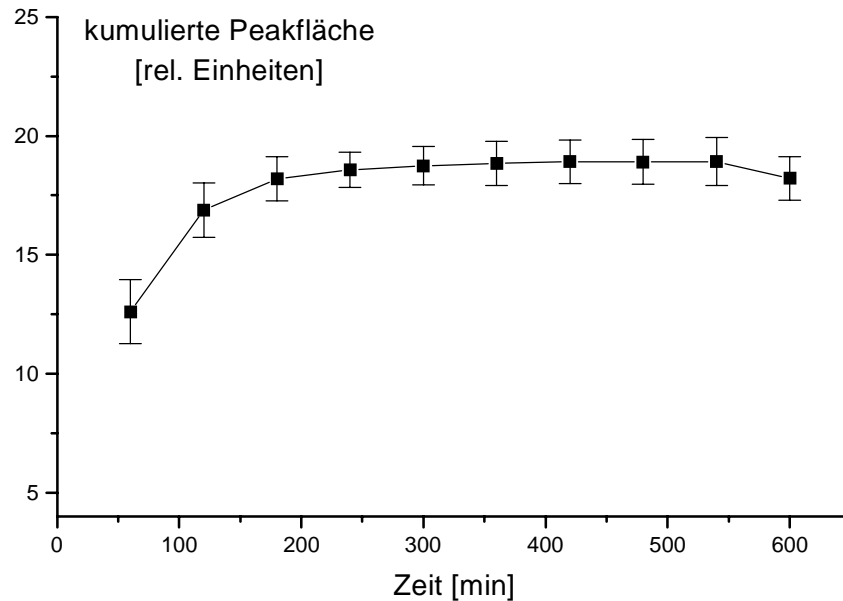


Abbildung 4.45.: Herauslösen der UFS aus Matrix M1 während der Permeation, n = 5

Man erkennt, daß bereits am Anfang der Permeation Fettsäuren aus der Matrix herausgelöst werden, deren Menge im Akzeptor nach 3h einen konstanten Wert erreicht. Auf eine Modifizierung des Akzeptormediums durch eine Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich wie sie beispielsweise in anderen Arbeiten vorgenommen wurde [Jäckle 1996, Lieckfeldt 1993] wurde bewußt verzichtet, da der Akzeptor möglichst physiologische Bedingungen simulieren sollte. Aus Stratum corneum können im Verlauf der Anwendung von topisch applizierten Substanzen ebenfalls Lipide extrahiert werden. So konnte Stoye [1997] nachweisen, daß aus exzidiertem Stratum corneum verschiedene Lipide herausgelöst wurden, nachdem die Haut mit verschiedenen mischmizellaren Systemen behandelt wurde.

Abb. 4.46. zeigt die Permeationskurven von Matrix **M2-M4** im Vergleich zur Grundmischung **M1**. Sowohl der Zusatz von Cholesterol (**M2**) als auch der Zusatz von Ceramiden (**M3**) verringert die Permeabilität für den Arzneistoff. Das macht auch ein Vergleich der Permeationskoeffizienten deutlich (Tab.4.46.1.). Der Permeationskoeffizient, der im linearen Kurvenbereich bestimmt wurde, sinkt im Vergleich zur Grundmischung **M1** bei **M2** (UFS + Cholesterol) und **M3** (UFS + Ceramide) auf etwas mehr als die Hälfte ab. Durch gleichzeitigen Zusatz von Cholesterol und Ceramiden (**M4**) verändert sich die Permeabilität für den Arzneistoff stark und liegt nur noch etwa 3,5 mal so hoch wie die Literaturdaten für exzidiertes Stratum corneum.

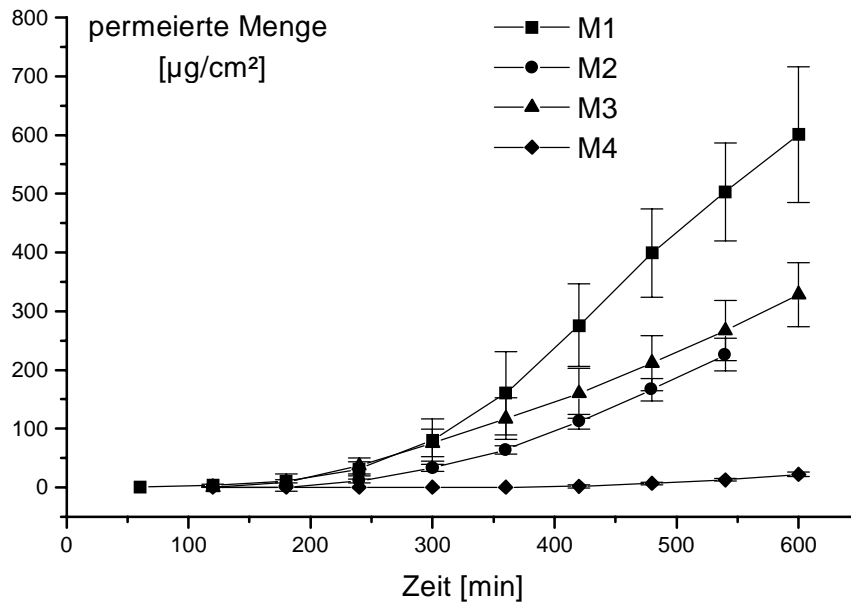


Abbildung 4.46.: Permeationsprofile von M2 (n = 4), M3 (n = 3) und M4 (n = 4) im Vergleich zur Grundmischung M1 (n = 5); Hydratationsgrad von M2 nach Permeation = 43,5%, von M3 = 44,1 % und von M4 = 43,8%

Lipidmischung	Permeationskoeffizient P [10 ⁻⁷ cm/s]	lag-Zeit [min]
M1 (UFS)	44,48 ± 12,49	229,52 ± 17,50
M2 (UFS + Cholesterol)	27,73 ± 2,64	278,68 ± 7,50
M3 (UFS + Ceramide)	26,50 ± 1,53	235,13 ± 51,03
M4 (UFS + Ceramide + Cholesterol)	3,73 ± 0,63	411,95 ± 23,16

Tabelle 4.46.1.: Vergleich der Permeationskoeffizienten von Matrix M1-M4

Bei Matrix **M2** beobachtet man wieder ein Herauslösen der UFS während der Permeation, wobei dies langsamer als bei **M1** stattfindet aber nach etwa 4h hinsichtlich der Gesamtmenge im Bereich der Grundmischung liegt (Abb. 4.47.). Bei **M3** und **M4** hingegen kann zu keinem Zeitpunkt der Permeation HPLC-analytisch ein Peak durch herausgelöste Fettsäuren detektiert werden. Ein Vergleich der lag-Zeit ergibt bei **M4** eine Verlängerung um fast das zweifache im Vergleich zur Grundmischung.

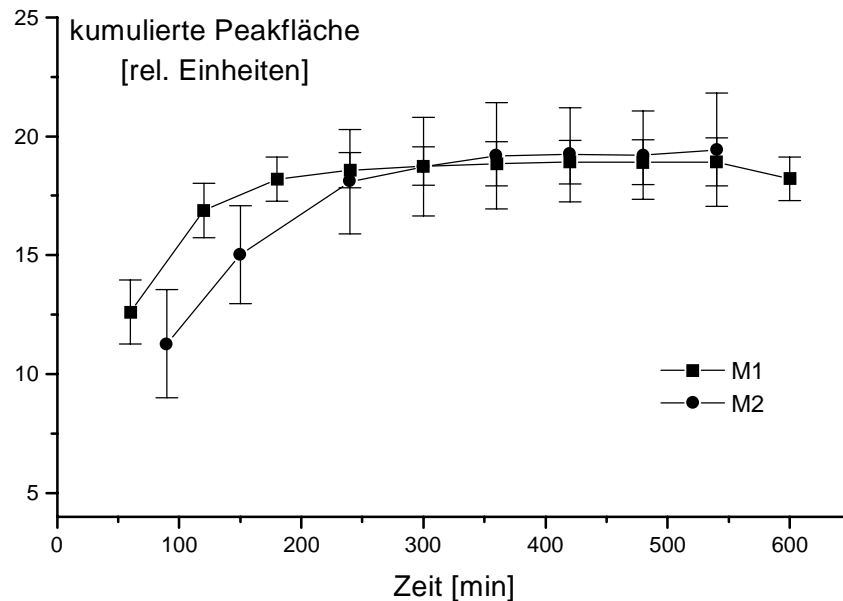


Abbildung 4.47.: Vergleich der herausgelösten Fettsäuren von M2 mit der Grundmischung M1

Der Diffusionskoeffizient von gelösten Stoffen in einem System hängt von verschiedenen Parametern wie der Temperatur, der Molekülgröße des diffundierenden Stoffes, der Viskosität und der Mikrostruktur des Diffusionsmediums ab.

Daß das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Diffusion auch von der Art der flüssigkristallinen Struktur abhängt, ist in der Literatur vielfach untersucht worden [Tiemessen et al. 1988, Ibrahim 1989, Müller-Goymann und Hamann 1993] und wird beispielsweise auch als Prinzip zur Freigabeverzögerung eines Arzneistoffes aus der Arzneiform ausgenutzt [Papantoniou et al. 1995, Schneeweis et al. 1997].

Die Permeationsuntersuchungen mit dem Modellarzneistoff sollten eine Aussage darüber liefern, in wieweit die Permeabilität der Modell Matrices mit einer Veränderung der Mikrostruktur durch den Zusatz der einzelnen Lipide korreliert. Bei dem Arzneistoff Diclofenac-Na handelt es sich um ein Molekül, daß deutlich amphiphile Eigenschaften aufweist, wobei der polare Teil durch die Carboxylfunktion und der lipophile Teil durch den Rest des Moleküls bedingt ist. Die normalerweise polare Aminogruppe wird durch die Chloratome abgeschirmt und verliert so ihren polaren Charakter. Sie fungiert als Brückengruppe und verleiht dem sonst durch die Benzolringe steifen lipophilen Rest eine gewisse Beweglichkeit [Larsen und Bungart 1980]. Aufgrund des amphiphilen Charakters des Diclofenac-Na sind Wechselwirkungen des Moleküls mit Bestandteilen von flüssigkristallinen Strukturen möglich. Dabei kann es beispielsweise zu einem lateralen

Einbau des Moleküls in die Lamellarphase der Lipidmatrix kommen, wodurch das Molekül nur noch in geringerem Maße durch die Matrix permeieren kann.

Um weiterhin eine eventuelle direkte Korrelation der Arzneistoffpermeation und der Viskosität zu überprüfen, wurden die komplexen Viskositäten der einzelnen Lipidmischungen mittels Oszillationsmessungen bestimmt und miteinander verglichen (Tab. 4.48.).

Rein makroskopisch sind **M2** und **M4** niedriger viskos als die Grundmischung, die eine gelartige festere Konsistenz besitzt. Geht man allein von der Viskosität aus, so erwartet man für Systeme mit hoher Viskosität eine geringere Diffusionsgeschwindigkeit des Arzneistoffes, die sich in einem kleinen Permeationskoeffizient äußert. Ein Vergleich ergibt aber, daß hier keinerlei Korrelation vorliegt, da **M2** und **M4** trotz der geringeren Viskosität eine geringere Permeabilität für den Modellarzneistoff besitzen.

Lipidmischung	komplexe Viskosität η^* [10 ² Pa s]	Menge Lipidmischung [mg]	Dichte [g/cm ³]
M1 (UFS)	60,59 ± 0,88	96,36 ± 5,58	1,67 ± 0,10
M2 (UFS + Cholesterol)	24,83 ± 3,04	85,06 ± 4,10	1,48 ± 0,07
M3 (UFS + Ceramide)	111,60 ± 1,71	85,46 ± 3,11	1,48 ± 0,05
M4 (UFS + Ceramide + Cholesterol)	22,20 ± 0,30	98,40 ± 2,69	1,71 ± 0,04

Tabelle 4.48.: Vergleich der Viskositäten (n = 3) und der Dichten von Matrix M1, M2, M3 und M4

Aus der eingestrichenen Menge an Lipidmischung ist über das Gesamtvolumen der zylinderförmigen Poren (= 57,6 mm³) die indirekte Bestimmung der Dichte der einzelnen Mischungen möglich. Auch hier ist kein Zusammenhang zwischen der Dichte und der Permeabilität für den Arzneistoff erkennbar. Die Permeabilität wird also offensichtlich von der Mikrostruktur und dem unterschiedlichen Verhalten von Diclofenac-Na in den verschiedenen flüssigkristallinen Phasen bestimmt.

Setzt man dem System aus UFS GFS hinzu (**M5**), so ergibt sich keine signifikante Veränderung hinsichtlich der Barriereigenschaften für den Arzneistoff Diclofenac-Na wie Abb. 4.49. zeigt. Der Zusatz von Cholesterol (**M6**) bzw. Ceramiden (**M7**) bewirkt wieder eine verringerte Permeabilität für den Arzneistoff, wobei sich die Permeationskoeffizienten im Vergleich zu den Mischungen ohne gesättigte Fettsäuren nicht deutlich unterscheiden.

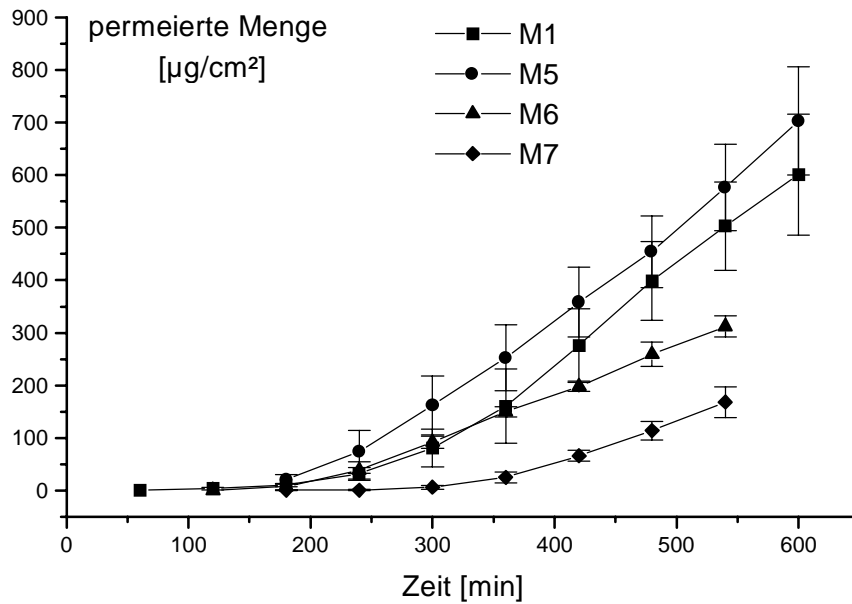


Abbildung 4.49.: Permeationsprofile von M5 (n = 5), M6 (n = 6) und M7 (n = 5) im Vergleich zur Grundmischung M1; Hydratationsgrad von M5 nach Permeation = 40,5%, von M6 = 45,9 % und von M7 = 42,1%

Lipidmischung	Permeationskoeffizient P [10^{-7} cm/s]	lag-Zeit [min]
M5 (UFS + GFS)	53,07 $\pm 4,36$	205,73 $\pm 39,63$
M6 (UFS + GFS + Cholesterol)	25,84 $\pm 5,52$	214,13 $\pm 18,26$
M7 (UFS + GFS + Ceramide)	24,83 $\pm 5,75$	325,40 $\pm 19,94$

Tabelle 4.49.1.: Vergleich der Permeationskoeffizienten von Matrix M5-M7

Lipidmischung	komplexe Viskosität η^* [10^2 Pa s]	Menge Lipidmischung [mg]	Dichte [g/cm ³]
M5 (UFS + GFS)	75,36 $\pm 4,40$	94,82 $\pm 2,48$	1,65 $\pm 0,04$
M6 (UFS + GFS + Cholesterol)	2,33 $\pm 0,13$	89,97 $\pm 4,44$	1,56 $\pm 0,08$
M7 (UF + GFS + Ceramide)	241,00 $\pm 4,00$	102,24 $\pm 8,74$	1,78 $\pm 0,15$

Tabelle 4.50.: Vergleich der Viskositäten (n = 3) und der Dichten von Matrix M5, M6 und M7

Ein Vergleich der Viskositäten sowie der Dichten (Tab. 4.50.) macht deutlich, daß hier erneut keine Korrelation zu den Permeationsdaten vorliegt.

Allerdings könnte die Erhöhung der lag-Zeit bei **M7** durch die hohe Viskosität der Mischung erklärt werden. Ansonsten sind voraussichtlich die Gründe für die unterschiedliche Permeabilität wieder in der Mikrostruktur der einzelnen Systeme zu suchen. Bei **M5** und **M6** sind erneut Fettsäuren im Akzeptor zu detektieren (Abb. 4.51.), wobei die Mengen unterhalb der der Grundmischung liegen, was durch die prozentual geringeren Anteile in den Mischungen erklärt werden kann.

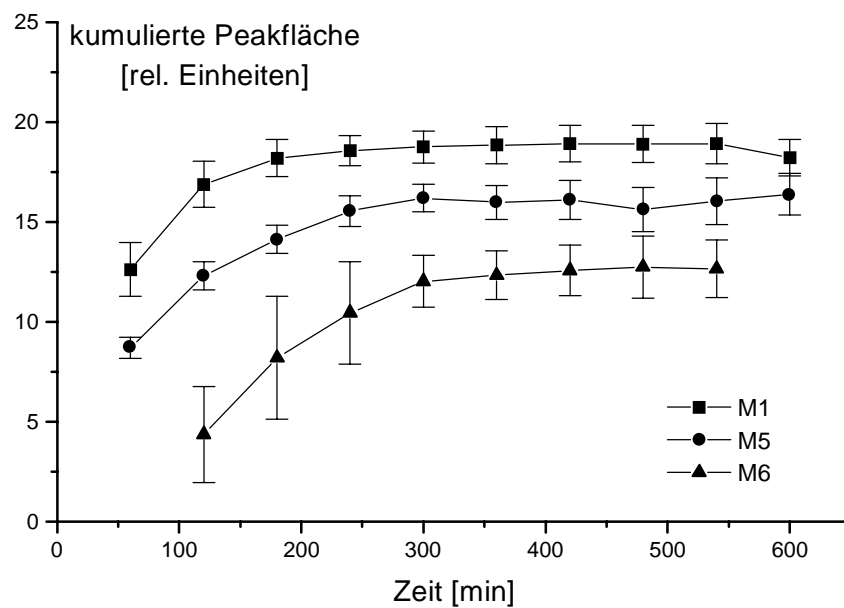


Abbildung 4.51.: Vergleich der herausgelösten Fettsäuren von M5 und M6 mit der Grundmischung M1

4.2.3.3 Zusammenfassende Diskussion zur Permeation des Modellarzneistoffes Diclofenac-Na durch die Modell Lipid Systeme M1-M7

Die Permeationsuntersuchungen zeigen, daß die Mischungen, die nur aus UFS bzw. UFS und GFS bestehen, die geringsten Barriereigenschaften besitzen.

Der Zusatz von Cholesterol (**M2** und **M6**) verringert die Permeabilität für den Arzneistoff, obwohl die Viskositäten dieser Mischungen deutlich unter den Grundmischungen liegen.

Um den Einfluß der Ceramide auf die Permeabilität zu untersuchen, wurden Ceramide in Form von Ceraderm S[®] (**M3**) zu der Matrix aus UFS bzw. aus UFS + GFS hinzugefügt, was die Permeabilität der Systeme ebenfalls reduzierte. Da sich die Permeationskoeffizienten von **M1** und **M5** bzw. **M2** und **M6** sowie von **M3** und **M7** nicht signifikant unterscheiden, scheint

der Zusatz von GFS nicht zwingend für die Barrierefunktion der Hautlipide notwendig zu sein. Die Beobachtung, daß sich die Permeabilität der Modell Lipid Systeme durch Zusatz von Cholesterol und Ceramiden verringert, deckt sich mit den Permeationsuntersuchungen von Jäckle [1996] an mit Stratum corneum Lipiden getränkten Membranfiltern, bei denen Ketoprofen als Modellarzneistoff eingesetzt wurde. Das dort verwendete Permeationsmodell ist zwar nicht direkt vergleichbar, doch führte der Zusatz von Cholesterol und Ceramiden ebenfalls zu einer verringerten Permeabilität für den Arzneistoff.

Bei allen Modell Lipid Systemen ohne Ceramide wurde während der Permeation ein Herauslösen von Fettsäuren beobachtet, was auf eine höhere Mobilität der Lipidphase in diesen Systemen zurückgeführt werden kann.

Den geringsten Permeationskoeffizient weist Mischung **M4** auf. Dieses System unterscheidet sich von der Komplettmischung **KM1** nur durch das Fehlen der GFS. Hier liegt die Permeabilität nur etwa 3,5 mal höher als die Literaturdaten für exzidiertes Stratum corneum.

Insgesamt besteht also eine Analogie zwischen den Strukturmerkmalen der Modell Lipid Systeme, die sich in den Mischungen durch den Zusatz der einzelnen Bestandteile am stärksten verändern, und der Permeabilität der Systeme.

Für die Diffusion des Diclofenac-Na durch die flüssigkristallinen Bereiche, d.h. durch die invers hexagonalen bzw. lamellaren Strukturen der Lipid Matrizes können folgende Überlegungen gelten:

Der n-Oktanol/Wasser Verteilungskoeffizient von Diclofenac-Na ist aufgrund der anionischen Struktur stark pH abhängig. Er liegt in Phosphatpuffer pH 7,0 bei 28 und verschiebt sich im sauren pH-Bereich zu höheren Werten (Verteilungskoeffizient bei pH 6,5 (ungepuffert) = 49) [Kriwet 1994], da das Verhältnis dissoziierter zu undissoziierter Säure zunehmend zugunsten der undissoziierten schlechter wasserlöslichen Säure verschoben wird. Aufgrund des pH-Wertes der Modell Lipid Systeme von etwa 5,8-6,0, der durch die teilweise Neutralisation der Fettsäuren bedingt ist, liegt auch hier ein großer Anteil des Arzneistoffes als freie Säure vor. Demnach wird sich ein Großteil des Diclofenacs in den lipophilen Bereichen der Systeme aufhalten, ein anderer Teil bedingt durch die amphihile Molekülstruktur mit den polaren Kopfgruppen der Fettsäure Moleküle bzw. der Ceramide assoziieren.

Bei den invers hexagonalen Bereichen wird die Assoziatoberfläche von den lipophilen Molekülbereichen gebildet, die nur über Van-der-Waals-London Kräfte miteinander in Wechselwirkung stehen. In den Röhrenzwischenräumen befinden sich die in flüssiger Form vorliegenden UFS. Innerhalb der invers hexagonalen Gesamtstruktur bestehen zwei mögliche Transportwege für den Arzneistoff. Neben der Diffusion innerhalb der Assoziatstruktur der

invers hexagonalen Röhren ist zusätzlich eine Diffusion im lipophilen Bereich zwischen den Molekülassoziaten möglich. Die Diffusion im lipophilen Bereich erfolgt aufgrund der geringeren Wechselwirkungen zwischen den Molekülen sowie durch die mobile lipophile Phase aus flüssigen UFS schneller als in den polaren Bereichen. Bei der lamellaren Phase kann die Diffusion in der wässrigen Schicht stattfinden, wobei es während der Diffusion zu Wechselwirkungen über H-Brücken mit den polaren Kopfgruppen an der Grenzfläche kommt. Weiterhin ist eine laterale Diffusion entlang der Alkylketten innerhalb der lipophilen Regionen der Bilayer möglich. Dabei kann ein Einbau des amphiphilen Moleküls insbesondere des Anions im Bereich der Kopfgruppen erfolgen, wodurch die Diffusion eingeschränkt wird (Abb. 4.52.). Insgesamt gesehen ist der Diffusionswiderstand in der Lamellarphase also höher als bei der invers hexagonalen Phase.

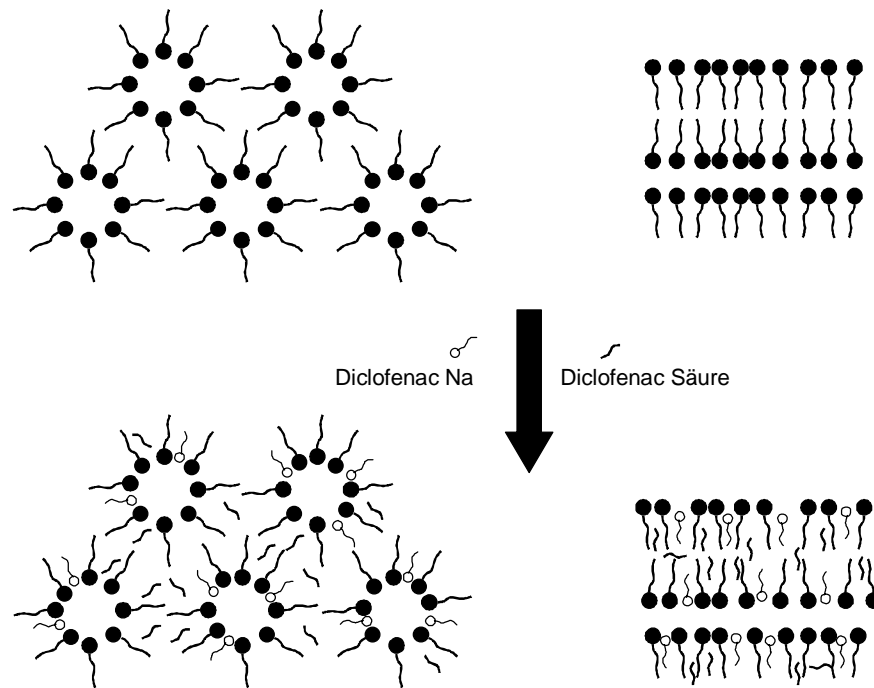


Abbildung.4.52.: Schematische Darstellung der möglichen Lokalisation des Arzneistoffes während der Permeation

Durch die höhere Mobilität der inversen Phase, die sich auch durch das Herauslösen von UFS während des Permeationsversuches äußert, erwartet man also bei Systemen mit hohem Anteil an invers hexagonalen Bereichen eine erhöhte Permeabilität für den Arzneistoff im Vergleich zu Systemen, in denen lamellare Strukturen dominieren. Der Zusatz von Cholesterol und Ceramiden führt jeweils zu einer verstärkten Transformation der invers hexagonalen Phase in eine lamellare Phase und damit auch zu Systemen mit verbesserten Barriereigenschaften.

Eine Ausnahme in Bezug auf die Herauslösbarkeit von UFS stellt **M6** (UFS + GFS + Cholesterol) dar, bei dem die physikochemische Charakterisierung eine überwiegend lamellare Mikrostruktur ergab. Somit reicht allein das Vorliegen einer lamellaren Struktur offensichtlich nicht aus, um ein Modell Lipid System mit einer zum Stratum corneum vergleichbaren Permeabilität zu bilden. Möglicherweise können trotz des Cholesterols nicht alle Fettsäuren in der Lamellarphase solubilisiert werden, so daß diese aus der Matrix während der Permeation herausgelöst werden. Dies zeigt die wichtige Funktion der Ceramide auf, die für die Bildung einer stabilen multilamellaren Matrix notwendig sind.

4.2.3.4 Permeationsuntersuchungen durch KM1, KM2 und KM3

Die Permeationsuntersuchungen mit den Matrices M1-M7 haben gezeigt, daß Cholesterol und Ceramide als Bestandteile der Stratum corneum Lipide die Permeabilität für den Modellarzneistoff Diclofenac-Na verringern. Dies läßt demnach auch auf eine Verbesserung der Barriereigenschaften der Systeme durch den Zusatz dieser Lipide schließen. Es sollte nun das Permeationsverhalten der Matrices, die aus allen Bestandteilen bestehen, überprüft und der Einfluß verschiedener Ceramid Typen auf die Barriereigenschaften der Systeme aufgezeigt werden. Abb. 4.53. zeigt die bei den Untersuchungen erhaltenen Permeationskurven für **KM1** (mit Ceraderm S)[®], **KM2** (mit Ceramid III) und **KM3** (Ceramid Typ IV).

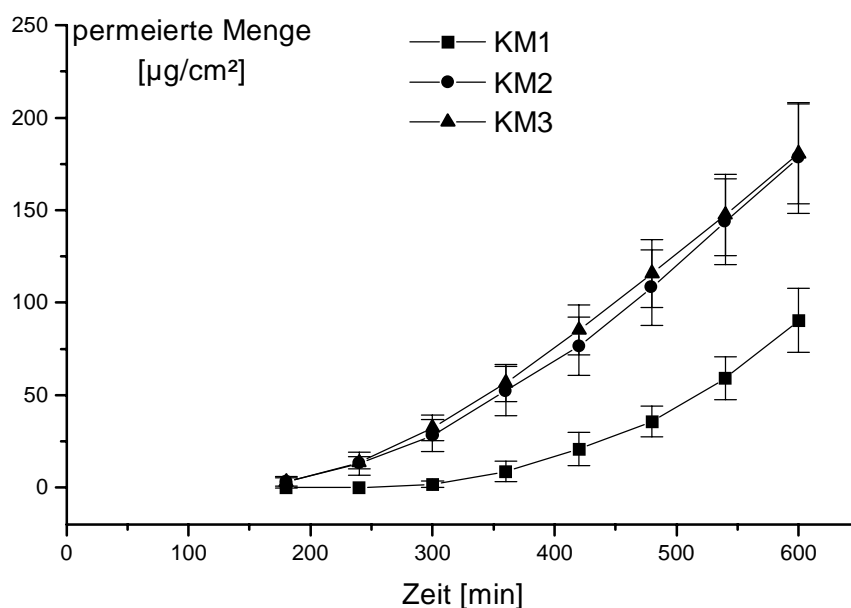


Abbildung 4.53.: Permeationsprofile von KM1 (n = 4), KM2 (n = 8) und KM3 (n = 6); Hydratationsgrad von KM1 nach Permeation = 41,2 %, von KM2 = 43,1 % und von KM3 = 43,5%

Dabei zeigt **KM1** die geringste Permeabilität für den Arzneistoff Diclofenac-Na, wobei der berechnete Permeationskoeffizient etwa halb so groß wie bei den anderen beiden Matrizes ist. Die Permeationskoeffizienten von **KM2** und **KM3** unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Tab. 4.53.1.).

Lipidmischung	Permeationskoeffizient P [10 ⁻⁷ cm/s]	lag-Zeit [min]
KM1	7,61 ± 0,39	322,72 ± 35,13
KM2	15,28 ± 2,34	244,62 ± 20,53
KM3	15,33 ± 1,62	230,80 ± 15,58
Humanes Stratum corneum [Kriwet 1994]	1,03	

Tabelle 4.53.1.: Vergleich der Permeationskoeffizienten der Komplettmischungen

Die Permeabilität von **KM1** liegt nur um den Faktor 7 höher als die Literaturdaten für exzidiertes Stratum corneum, weist aber damit eine höhere Permeabilität als die vergleichbare Mischung ohne GFS (**M4**) auf. Der für diese Mischung aus UFS, Cholesterol und Ceramiden bestimmte Permeationskoeffizient liegt bei $3,7 \cdot 10^{-7}$ cm/s und ist damit im Vergleich zu **KM1** um die Hälfte reduziert, was aber möglicherweise durch die geringere Viskosität von **KM1** begründet ist ($22,2 \cdot 10^{-2}$ Pa·s bei **M4**, bei **KM1** $4,12 \cdot 10^{-2}$ Pa·s). Die Ergebnisse weisen dennoch darauf hin, daß die Anwesenheit von GFS nicht unbedingt für die Barriereigenschaften der Stratum corneum Lipide notwendig ist.

Lipidmischung	komplexe Viskosität η^* [10 ² Pa s]	Menge Lipidmischung [mg]	Dichte [g/cm ³]
KM1	4,12 ± 0,91	89,54 ± 5,61	1,55 ± 0,10
KM2	5,39 ± 0,33	83,23 ± 4,50	1,45 ± 0,08
KM3	571,79 ± 3,51	86,37 ± 7,10	1,50 ± 0,12

Tabelle 4.54.: Vergleich der Viskositäten (bei **KM1** und **KM2** n = 3; bei **KM3** n = 2) und der Dichten der Komplettmischungen

Die physikochemische Charakterisierung zeigte bei **KM1** deutlich den fluidisierenden Effekt der Phospholipide durch die Verwendung des Ceraderm S[®], weshalb bei dieser Mischung eine höhere Permeationsrate als bei **KM2** und **KM3** erwartet wurde. Ein solches Verhalten kann jedoch nicht beobachtet werden und ist auch nicht durch einen Vergleich der komplexen Viskositäten bzw. der Dichten der Mischungen erklärbar (Tab. 4.54.).

Die verlängerte lag-Zeit bei **KM1** bis zum Auftreten des Arzneistoffes im Akzeptor um etwa 80 - 90 min weist darauf hin, daß zwischen dem amphiphilen Arzneistoff und der Lamellarphase mehr Wechselwirkungen möglich sind, so daß die Geschwindigkeit der Diffusion des Arzneistoffes durch diese Matrix geringer wird. Ein zusätzlicher interkalierender Einbau im Bereich der Kopfgruppen der Lamellarphase würde die Menge des diffundierenden Arzneistoffes zusätzlich verringern. Andererseits konnte sowohl bei **KM2** als auch bei **KM3** gleichermaßen ein Herauslösen von ungesättigten Fettsäuren beobachtet werden (Abb. 4.55.).

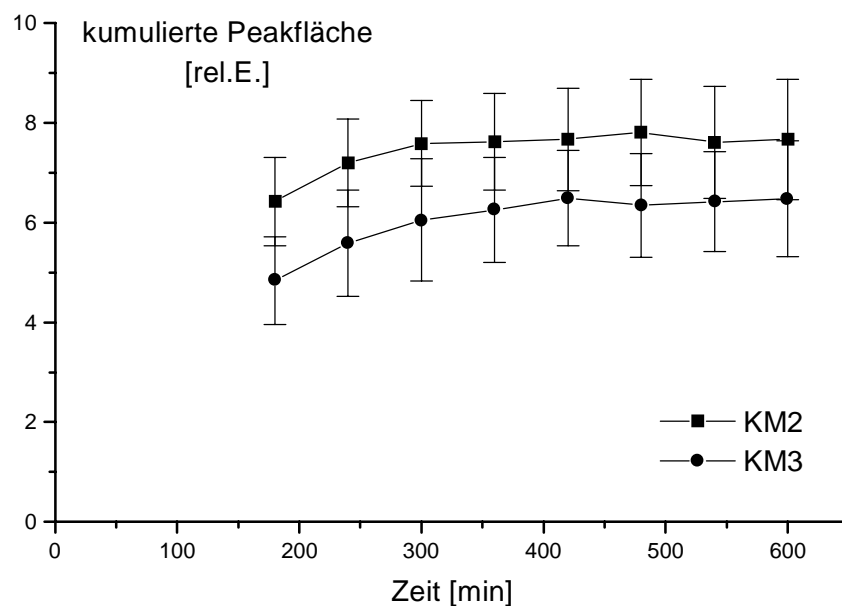


Abbildung 4.55.: Vergleich der herausgelösten Fettsäuren von KM2 und KM3

Da die Ergebnisse der Charakterisierung von **KM2** und **KM3** das Vorliegen einer lamellaren Mikrostruktur ergaben, kann hier nicht von einer mobilen Lipidphase aus UFS aufgrund invers hexagonaler Bestandteile ausgegangen werden. Der Zusatz von Ceramid III in **KM2** bzw. von Ceramid Typ IV in **KM3** verringert zwar die Permeabilitäten deutlich im Vergleich zu den Grundsystemen, möglicherweise können aber nicht alle UFS in die Lamellarphase mit eingebaut werden und befinden sich als Bulklipide in der Matrix verteilt, so daß sie aus dieser leicht herausgelöst werden können.

4.2.3.5 Zusammenfassende Diskussion zur Permeation von Diclofenac-Na durch KM1, KM2, KM3

Alle Komplettmischungen, die UFS, GFS, Cholesterol und Ceramide enthalten, zeigen im Vergleich zu den Grundsystemen **M1-M7** eine für den Arzneistoff Diclofenac-Na verringerte Permeabilität. Die einzige Ausnahme stellt Matrix **M4** dar. Diese Zubereitung enthält Ceraderm S[®] und unterscheidet sich von Matrix **KM1** nur durch das Fehlen der UFS. **M4** besitzt von allen untersuchten Matrizes den geringsten Permeabilitätskoeffizient, der nur um den Faktor 3,5 höher liegt als entsprechende Daten, die an exzidiertem Stratum corneum mit einer vergleichbaren Donatorlösung erhalten wurden. Die verringerte Permeabilität im Vergleich zu **KM1** könnte in der höheren Viskosität von **M4** begründet liegen.

Eine Verbesserung der Barriereigenschaften bei **KM2** und **KM3** durch die Verwendung reiner Ceramide in Form von Ceramid III (bei **KM2**) und Ceramid Typ IV (bei **KM3**) bestätigt sich nicht. Die Permeabilität dieser Systeme für den Arzneistoff ist zwar im Vergleich zu den Grundmischungen stark reduziert und nur um den Faktor 15 höher als bei exzidiertem Stratum corneum, liegt aber dennoch deutlich oberhalb der ermittelten Daten für **KM1**. Ein Grund für die Permeabilität der Mischungen ist die Herauslösbarkeit von Matrixbestandteilen während der Permeation. Somit sind die in den beiden Matrizes eingesetzten Ceramid Typen nicht in der Lage, dauerhaft eine homogene lamellare Struktur zu bilden, in der alle Matrixbestandteile inkorporiert sind.

Das Ceramid III besteht nur aus einem einzigen Ceramid Typ, in dem sowohl die Sphingosin Basen als auch die in Amidbindung verknüpften Fettsäuren nur eine bestimmte Kettenlänge besitzen. Nach Rieger [1996] kann allein Ceramid 2 durch Kombination der unterschiedlichen in dieser Ceramidfraktion identifizierten Fettsäuren und Sphingosinbasen aus einer Mischung von etwa 250 Komponenten bestehen. Wendet man diese Überlegungen auch auf alle anderen Ceramid Klassen an, so wird deutlich, daß die im Stratum corneum enthaltene Ceramid Fraktion eine komplexe Mischung darstellt. Nur durch die unterschiedlichen Kettenlängen und die unterschiedlichen polaren Kopfgruppen scheint die Bildung einer stabilen multilamellaren Matrix möglich. Eine Stabilisierung kann beispielsweise durch das Ineinandergreifen der unterschiedlich langen Ketten erreicht werden, wodurch mehr hydrophobe Bindungskräfte zwischen den Alkylketten der Lipide wirken können. Bei der Verwendung eines einzelnen Ceramid Typs ist eine solche Stabilisierung nicht möglich. In dem Ceramid Typ IV sind zwar Fettsäuren und Sphingosinbasen verschiedener Kettenlängen enthalten, wobei die durchschnittliche Kettenlänge der aus Rinderhirn gewonnenen Ceramide C:24 beträgt. In humanem Stratum corneum ergänzen jedoch Kettenlängen von C:26 und

C:28 die dominante Fraktion von C:24. Wichtiger als die Kettenlängen der Alkylketten scheint aber das Fehlen bestimmter Ceramid Fraktionen bei den eingesetzten Ceramid Typen zu sein. Bouwstra et al. [1996a, 1998a] weist auf die Schlüsselrolle des Ceramid 1 hin, dessen Anwesenheit unbedingt notwendig sei, um eine hochgeordnete stabile lamellare Matrix zu bilden. Dieses Ceramid besitzt eine von den anderen Ceramiden abweichende Molekülstruktur, da die mit der Sphingosinbase in Amidbindung verknüpfte ω -Hydroxyfettsäure mit einer weiteren Fettsäure (zu 80% Linolsäure) verestert ist. Bei Studien an Modell Lipid Mischungen aus verschiedenen Ceramiden und Cholesterol wurden die physikochemischen Eigenschaften einer Mischung, die Ceramide 1-6 enthielt, mit einer Mischung ohne Ceramid 1 verglichen. Es zeigte sich, daß der Zusatz dieses Ceramides den Ordnungsgrad innerhalb der lamellaren Packung erhöht. Die laterale Anordnung der Alkylketten innerhalb der Lamellarphase transformierte ohne das Ceramid 1 von einer hexagonalen in eine zunehmend flüssige ungeordnete Packung der Lipide. Zusätzlich wurde durch das Ceramid 1 die Bildung der sogenannten "long-periodicity phase" von 13 nm induziert, wie sie auch für Stratum corneum Lipide beschrieben wird [White et al. 1988, Hou et al. 1991, Swartzendruber et al. 1992, Bouwstra 1997]. Das gleiche Verhalten konnten McIntosh et al. [1996] an Modell Lipid Mischungen aus Ceramiden, Palmitinsäure und Cholesterol belegen.

Dagegen spielen die Ceramid Klassen 3-6 nach Bouwstra et al. [1996b] nur eine wesentliche Rolle bei der Bildung der Lamellarphasen im Bereich niedriger Cholesterol Gehalte.

Die geringe Permeabilität von **KM1** kann zum einen durch den festeren Einbau der Fettsäuren in die Lamellarphase zustande kommen, wodurch diese nicht so leicht aus dem System herausgelöst werden können. Zum anderen könnte auch das Diclofenac zunehmend in die Lamellarphase eingebaut werden, wodurch die insgesamt permeierende Menge verringert wird. Andererseits kann die Permeation des Arzneistoffes durch die hydrophilen Bereiche der lamellaren Schichten erschwert sein. Die polaren Kopfgruppen der im Ceraderm S[®] enthaltenen Phospholipide besitzen eine positive Ladung und können dadurch mit dem Diclofenac Anion starke Coulomb-Wechselwirkungen eingehen, die die Diffusion des Arzneistoffes behindern. Ceramide, wie sie in **KM2** und **KM3** enthalten sind, besitzen zwar polare Kopfgruppen, sind aber aufgrund der fehlenden Ladung weniger polar, so daß bei der Diffusion des Arzneistoffes durch diese Matrices nur eine Bindung über Wasserstoffbrücken möglich ist. Diese im Vergleich zu den Coulomb-Wechselwirkungen schwächere Bindungsart würde insgesamt einen geringeren Diffusionswiderstand für das Diclofenac Molekül in **KM2**

und **KM3** bedeuten, was ebenfalls die höhere Permeabilität der Mischungen im Vergleich zu **KM1** erklären könnte.

Zusammenfassend können die erreichten Permeabilitäten für die Komplettrmatrizes **KM1**, **KM2** und **KM3** mit dem entwickelten Permeationsmodell durchaus positiv bewertet werden, zumal sie nur um den Faktor 7 bzw. 15 höher als die an humanem Stratum corneum ermittelten Daten liegen. Damit liegen die Permeabilitäten auch unter den Werten, die bei Permeationsuntersuchungen an organotypischen Zellkulturen mit einer wäßrigen Diclofenac-Na Lösung ermittelt wurden. Hier war der Permeationskoeffizient im Vergleich zu humanem Stratum corneum um den Faktor 96 erhöht [Specht 1999].

4.2.3.6 Untersuchung der Hydratation der Lipidmischungen

Bei den Permeationsuntersuchungen mit den Modell Lipid Mischungen war bei allen Lipidmatrizes nach der Permeation eine Zunahme der Hydratation zwischen 9% und 13% zu verzeichnen. Diese während des Versuchsverlaufes auftretende Quellung führte zwar nicht zu Undichtigkeiten des Systems, es sollte aber überprüft werden, ob es durch eine Zunahme des Wassergehaltes zu einer Veränderung der Mikrostruktur der Matrizes beispielsweise durch eine Phasentransformation kommt. Die Ausgangssysteme wurden deshalb mit 10% bzw. 20% (m/m) Wasser versetzt, durch Zentrifugation homogenisiert und anschließend mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie, TEM, SAXD und DSC charakterisiert.

Rein makroskopisch erscheinen die Mischungen durch Wasserzusatz niedriger viskos als die Ausgangssysteme.

Unter dem Polarisationsmikroskop betrachtet sind bei einem Zusatz von 10% Wasser sowohl bei den Systemen **M1-M7** als auch bei **KM1-KM3** keine Veränderungen der für die jeweiligen Mischungen typischen Texturen erkennbar. Bei 20% Zusatz erscheinen die Texturen leichter beweglich und farblich weniger intensiv, da aufgrund der niedrigeren Viskosität bei der Probenpräparation auf dem Objektträger dünnere Präparate entstanden sind. Eine Phasentransformation tritt aber bei keinem der Objekte auf. TEM-Aufnahmen zeigen ebenfalls keinerlei Veränderung der in 4.1.1.2 bzw. 4.1.2.2 beschriebenen für die jeweiligen Systeme typischen Strukturen. Mit optischen Methoden kann also keine Veränderung der Modell Mischungen im Zuge einer Hydratation nachgewiesen werden.

SAXD-Messungen detektieren bei fast allen Mischungen wieder die typischen Interferenzfolgen für die einzelnen Phasen, die auch hinsichtlich der Intensitäten keine Veränderung ergeben. Eine Ausnahme stellt Matrix **M5** (UFS + GFS) und **M6** (UFS + GFS +

Cholesterol) dar. Bei **M5** ist eine zusätzliche Interferenz mit einem Netzebenenabstand von 10,7 nm zu beobachten, die aber keiner der flüssigkristallinen Phase zugeordnet werden kann. Bei **M6** tritt zwar keine weitere Interferenz auf, die Intensität der 2. Lamellarphase bei 4,7 nm nimmt aber deutlich ab. Hier ist außerdem eine Verringerung des Netzebenenabstandes bei höherem Wassergehalt zu detektieren, während bei allen anderen Mischungen ein Anstieg der Netzebenenabstände d sowohl für die Lamellarphase als auch für die invers hexagonale Phase mit zunehmendem Wassergehalt zu messen ist. Der Anstieg der Netzebenenabstände kommt erwartungsgemäß durch die weitere Einlagerung von Wasser in die hydrophilen Bereiche der jeweiligen Phasen zustande. Ein Vergleich der Netzebenenabstände der einzelnen Mischungen mit unterschiedlichen Wassergehalten erfolgt in Abschnitt 4.2.3.7, da dort die Unterschiede zu mit Diclofenac-Lösung versetzten Mischungen aufgezeigt werden sollen.

Die DSC-Untersuchungen der Mischungen im Bereich von 5-90°C ergeben für Matrix **M1** (UFS), **M2** (UFS + Cholesterol) und **M4** (UFS + Cholesterol + Ceramide) keine Veränderung der Thermogramme. Auch bei allen anderen Mischungen sind die in 4.1.1.5.1 beschriebenen charakteristischen Peaks detektierbar, die allerdings bei **M3** (UFS + Ceramide), **M5** (UFS + GFS) und **M7** (UFS + GFS + Ceramide) sowohl eine leichte Verringerung der Peaktemperaturen um maximal 1,5° als auch eine Erniedrigung der Enthalpie der Phasenübergänge zeigen. Die Verringerung der Enthalpie liegt im Bereich von 10% bzw. 20%, was durch die Verdünnung der Systeme mit Wasser zu erwarten war. Demnach führt zusätzlich zugesetztes Wasser zu keiner weiteren Fluidisierung der Lipide. **M6** bestehend aus UFS, GFS und Cholesterol zeigt auch bei der thermoanalytischen Untersuchung ein von den anderen Mischungen abweichendes Verhalten. Die zunehmende Hydratation des Systems führt zu einer Verschiebung des Peakmaximums um etwa 2° zu höheren Temperaturen. Trotzdem ist eine Verringerung der Peakenthalpie um 10% bzw. 20% nachzuweisen. Das beobachtete Verhalten muß mit einem Umbau der Lamellarphase zusammenhängen. Die physikochemische Charakterisierung ergab für dieses System das Vorliegen zweier Lamellarphasen nebeneinander. Wahrscheinlich erfolgt durch den Wasserzusatz ein vermehrter Einbau von GFS aus der einen Lamellarphase in die andere, wodurch die Erhöhung der Umwandlungstemperatur zustande kommt. Dies würde auch die mittels SAXD detektierte niedrigere Intensität und die Abnahme des Netzebenenabstandes dieser Phase erklären.

Bei den Komplettmischungen **KM1-KM3** sind keine signifikanten Veränderungen der spezifischen Umwandlungstemperaturen nachweisbar. Die Enthalpie ist wie erwartet um 10%

bzw. 20% reduziert, so daß davon ausgegangen kann, daß durch die verstärkte Hydratation ebenfalls keine Fluidisierung der Lipide in den Bilayerstrukturen stattgefunden hat.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bis auf Matrix **M5** und **M6** die zunehmende Hydratation zu keiner deutlichen Veränderung der physikochemischen Eigenschaften der Modell Lipid Systeme führt. Somit ist eine Phasentransformation der für die Systeme charakteristischen Mikrostrukturen auch während der Permeationsuntersuchungen durch eine Hydratation unwahrscheinlich. Die Permeabilitäten der untersuchten Systeme für den Modellarzneistoff Diclofenac-Na werden daher hauptsächlich von der Mikrostruktur der Modell Lipid Systeme bestimmt und sind nicht auf eine Veränderung der Systeme durch Hydratation zurückzuführen.

4.2.3.7 Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Diclofenac-Na und den in vitro Modell Lipid Systemen

Bei der Diffusion des Arzneistoffes durch die Lipidmatrizes ist aufgrund der möglichen Wechselwirkungen mit den einzelnen Bestandteilen des jeweiligen untersuchten Systems eine Veränderung der physikochemischen Eigenschaften beispielsweise durch Einbau in die flüssigkristallinen Bereiche möglich. Untersuchungen von Kriwet [1994] an exzidiertem Stratum corneum, das mit einer 10%igen wäßrigen Diclofenac-Diethylamin Lösung behandelt wurde, ergaben, daß der Arzneistoff den Ordnungszustand der interzellulären Stratum corneum Lipide beeinflusst. Im Thermogramm des behandelten Stratum corneum war eine Erniedrigung der Umwandlungstemperaturen der Lipid assoziierten Phasenübergänge zu verzeichnen. WAXD- und SAXD-Messungen zeigten außerdem eine Beeinflussung innerhalb der Nah- und Fernordnung der Lipide. Die Schichtdicke der Lamellarphase verringerte sich leicht und der laterale Abstand der Lipide nahm durch die Behandlung mit Diclofenac-Diethylamin zu. Daraus schloß Kriwet, daß sich die Arzneistoffmoleküle lateral im Bereich der polaren Kopfgruppen der Lipide anordnen und eine zunehmende Unordnung in den hochgeordneten Strukturen der Bilayer induzieren. Die hexagonale laterale Anordnung der Lipide weitet sich, wodurch die lipophilen Reste eine größere Bewegungsfreiheit besitzen und es durch die Rotation der Moleküle um die Längsachse zu einer Verkürzung durch die vermehrte Bildung von gauche-Konformeren kommt. Dadurch ließe sich die kleinere Schichtdicke der Bilayer erklären. Eigene Untersuchungen, bei denen exzidiertes Stratum corneum mit einer 0,5%igen wäßrigen Diclofenac-Na Lösung behandelt wurde, bestätigen den fluidisierenden Einfluß auf die Stratum corneum Lipide auch für dieses Molekül.

Abb. 4.56. zeigt das Thermogramm einer Stratum corneum Probe, die mit reinem Wasser behandelt wurde im Vergleich zu der mit Diclofenac-Na behandelten Probe. Bei der hydratisierten Probe liegen die Maxima der beiden Hauptpeaks bei 71,0 und 82,0°C. Diese Peaks werden durch die Umwandlung der Stratum corneum Lipide hervorgerufen. Nach der Behandlung der Probe mit der Diclofenac-Na Lösung tritt eine deutliche Verringerung der beiden Peaktemperaturen um fast 6° auf, was auf eine Fluidisierung der Lipide hinweist. Demnach scheint auch hier ein Einbau des Moleküls in die Lipid Bilayer stattzufinden.

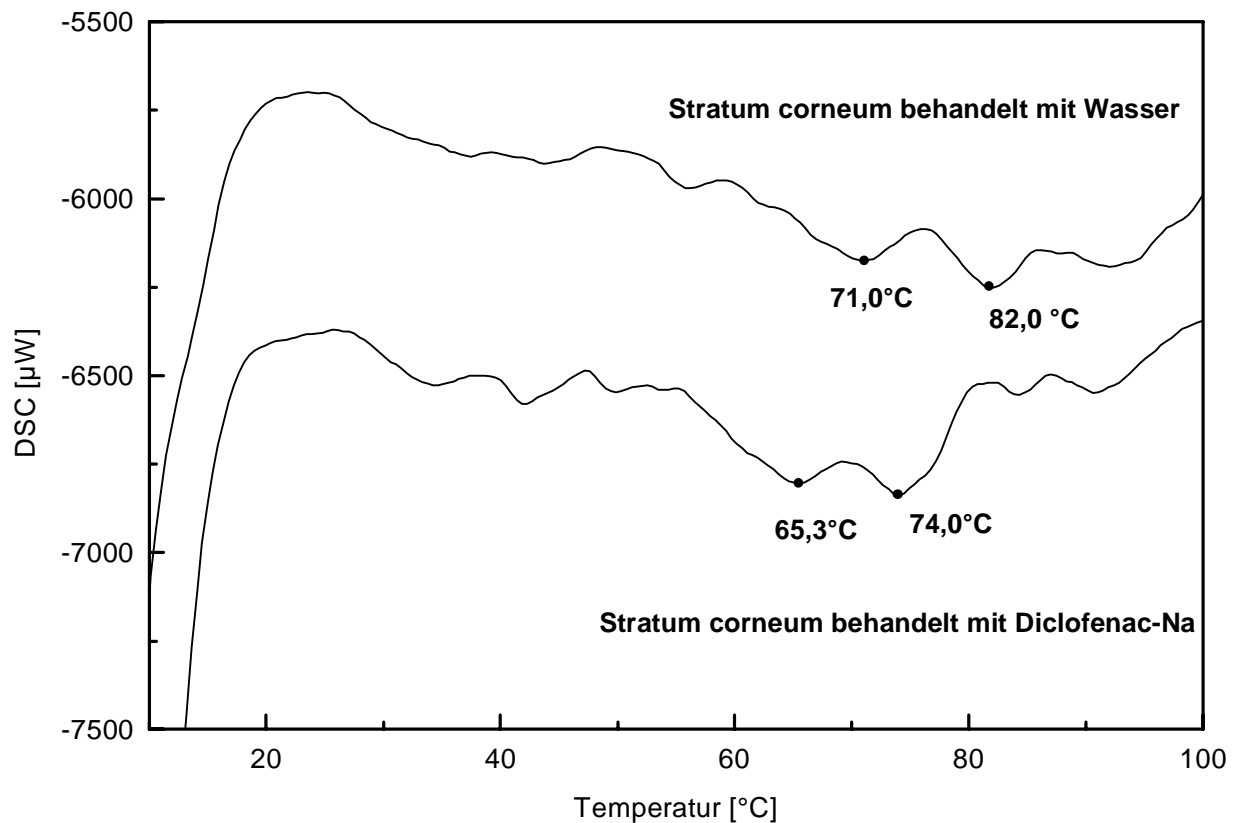


Abbildung 4.56.: Thermogramme von Stratum corneum, behandelt mit reinem Wasser und mit einer 0,5%igen Diclofenac-Na Lösung; die Einwaage betrug zwischen 22 und 24 mg; Spender: männlich, Bauch, 26 Jahre

WAXD-Messungen der Stratum corneum Proben unterstützen diese Schlußfolgerung. In der unbehandelten Probe sind scharfe Interferenzen bei $d = 0,370$ (orthorhombische Anordnung der Alkylketten) und $0,411$ nm (hexagonale Anordnung) nachzuweisen sowie eine schwache Interferenz bei $0,460$ nm (Keratin-Interferenz bzw. flüssigkristalline Anordnung). Nach der Behandlung mit Diclofenac-Na ist nur noch eine schwache Interferenz bei $0,415$ nm detektierbar. Die Interferenz bei $0,460$ nm ist verschwunden und die bei $0,370$ nm nur noch diffus ausgeprägt.

Da also Diclofenac-Na offensichtlich einen Einfluß auf den Ordnungszustand der Stratum corneum Lipide hat, werden ebenfalls Interaktionen mit den Lipiden der Modell Systeme

erwartet. Um dies zu untersuchen, wurden die Mischungen mit 10% bzw. 20% der 0,5%igen Diclofenac-Na Lösung versetzt, die auch als Donator in den Permeationsuntersuchungen verwendet wurde. Nach Homogenisierung erfolgte die physikochemische Charakterisierung polarisationsmikroskopisch, mittels TEM, SAXD- und DSC-Messungen.

Bei der polarisationsmikroskopischen Untersuchung dieser Systeme zeigen diese ähnliche Texturen wie die Systeme ohne Diclofenac-Na. Auch im Vergleich zu den mit Wasser versetzten Mischungen sind kaum Unterschiede bei den Texturen erkennbar. Unterschiede der Farbintensitäten können wieder durch die niedrigeren Viskositäten und die dadurch bedingten dünneren Schichtdicken der Objektträgerpräparate hervorgerufen werden. Bei **M2** ist eine Zunahme der als konzentrische Defektstrukturen beschriebenen Malteserkreuze zu beobachten. In TEM-Aufnahmen sind die für die jeweiligen Lipidmischungen typischen Strukturen erkennbar. Dennoch scheinen die Präparate zunehmend ungeordnete Bereiche zu enthalten. Die verwendeten optischen Methoden geben bereits teilweise Aufschluß über das Auftreten von Wechselwirkungen des Modellarzneistoffes mit den Modell Lipid Systemen. SAXD-Messungen dagegen zeigen deutlich, daß es zu Interaktionen von Diclofenac-Na mit den Bestandteilen der Modell Lipid Systeme kommt.

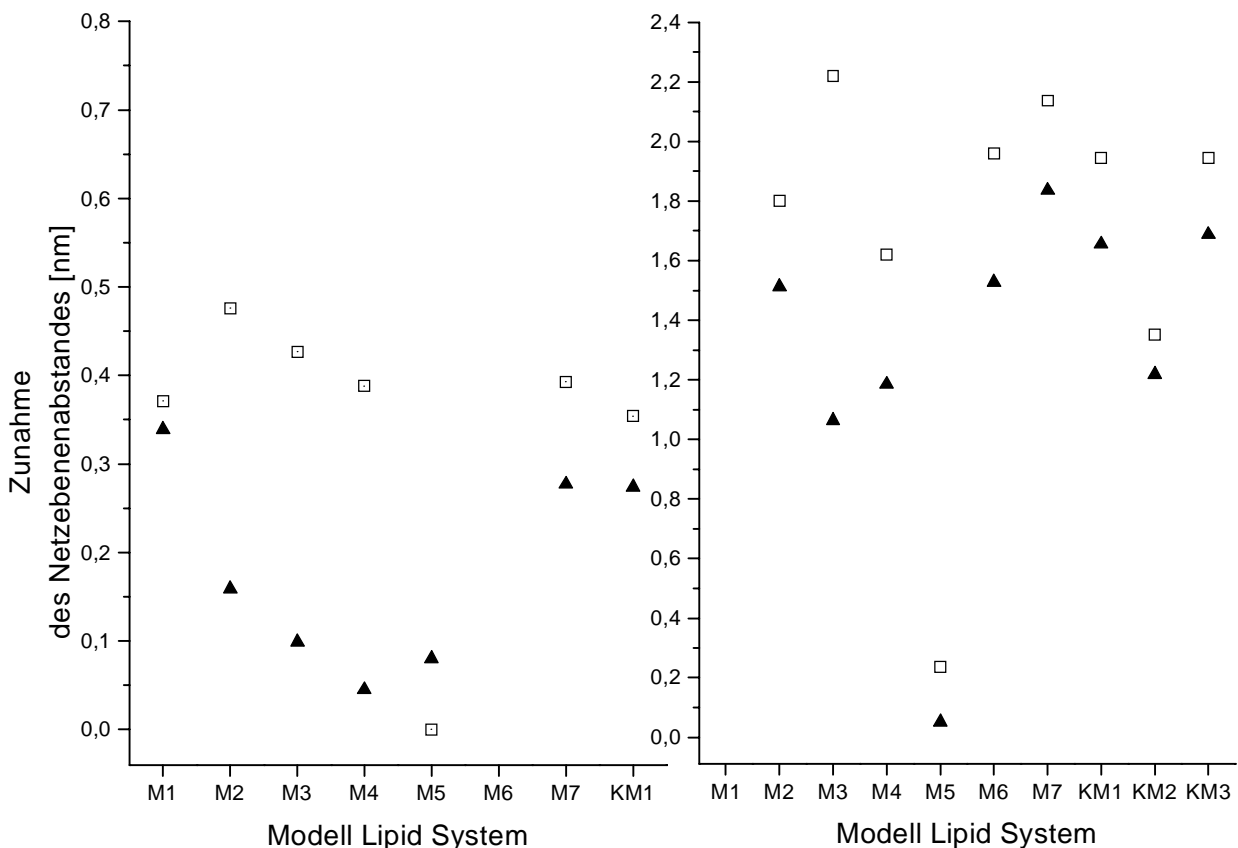


Abbildung 4.57.: Zunahme der Netzebenenabstände der flüssigkristallinen Phasen bei Zusatz von 20% Wasser (□) und 20% einer 0,5%igen Diclofenac-Na Lösung (▲); linke Abbildung = invers hexagonal; rechte Abbildung = lamellar

Der Zusatz der Diclofenac-Na Lösung zu den Modell Mischungen führt zu einem Anstieg der Netzebenenabstände, die zum einen durch die Wassereinlagerung in den hydrophilen Kern der röhrenförmigen Assoziate und zum anderen durch eine Quellung der lamellaren Schichten zustande kommt. Dieser fällt aber im Vergleich zu den Mischungen, denen lediglich Wasser in gleicher Menge zugesetzt wurde, für beide flüssigkristallinen Phasen kleiner aus, wie Abb. 4.57. verdeutlicht.

Diclofenac-Na wird wahrscheinlich lateral in die flüssigkristallinen Strukturen eingebaut. Dies führt zu einer Vergrößerung des lateralen Abstandes, der mit einer Verkürzung der Alkylketten infolge der größeren Beweglichkeit einhergeht. Dadurch wird der Anstieg der Netzebenenabstände durch Hydratation teilweise kompensiert. In welche der flüssigkristallinen Phasen der Arzneistoff bevorzugt eingebaut wird, kann aus den vorliegenden Daten nicht geschlossen werden.

Eine Ausnahme stellt **M5** (UFS + GFS) dar, da bei der invers hexagonalen Phase bei Wasserzusatz keine Veränderung des Netzebenenabstandes bzw. bei einem Zusatz von Diclofenac-Na nur eine geringe Erhöhung zu verzeichnen ist. Ein Grund für dieses Verhalten ist höchstwahrscheinlich das schon im vorherigen Abschnitt beschriebene Auftreten einer zusätzlichen Phase, die durch eine weitere Interferenz nachgewiesen wurde. Bei der hydratisierten Mischung wurde für diese Phase ein Netzebenenabstand von 10,749 nm bzw. bei der mit Diclofenac-Na versetzten Mischung von 10,563 nm ermittelt. Um welchen flüssigkristallinen Typ es sich bei diesem System handelt, konnte aufgrund der fehlenden Interferenzfolgen nicht festgelegt werden. Möglicherweise handelt es sich hier um eine Art Intermediärstruktur mit erhöhtem Netzebenenabstand, wie sie bei einer Phasenumwandlung invers hexagonaler Strukturen in einen lamellaren Flüssigkristall diskutiert wird [Verklej 1984].

Ein von den übrigen Mischungen abweichendes Verhalten zeigt außerdem Matrix **M6** (UFS + GFS + Cholesterol). Hier nimmt der Netzebenenabstand der zweiten Lamellarphase (graphisch nicht dargestellt) sowohl bei der mit 20% Wasser (-0,533 nm) als auch mit Diclofenac-Na (-0,600 nm) versetzten Mischung ab, wobei die Verringerung bei Zusatz der Diclofenac-Na Lösung stärker ausfällt, was wieder mit dem fluidisierenden Einfluß der Substanz in Einklang steht.

Bei der thermoanalytischen Untersuchung der mit Diclofenac-Na Lösung versetzten Mischungen zeigen die Systeme **M1**, **M2** und **M4** wie die hydratisierten Mischungen kein von den Ausgangssystemen unterschiedliches thermisches Verhalten. Für **M3** (UFS + Ceramide) kann bei einem Zusatz von 20% Diclofenac-Na eine signifikante Verringerung des

Peakmaximums um $5,3^\circ$ (im Vergleich zu 20% Wasserzusatz = $-1,44^\circ$), für **M7** und **KM2** eine Verringerung um 2° nachgewiesen werden, die jedoch innerhalb der meßtechnisch begründeten Schwankungsbreite liegt. Bei **KM2** ist bei einem 20%igem Zusatz der Diclofenac-Na Lösung der bei dem Ausgangssystem auftretende Peak bei 44°C verschwunden. Eine deutliche Veränderung zeigt ebenfalls das Thermogramm von **KM1**. Hier ist bei 20% Zusatz von Diclofenac-Na Lösung eine starke Verbreiterung des Umwandlungspeaks sowie eine Verringerung der Übergangstemperatur um 4° zu erkennen. Dagegen liegen die Phasenumwandlungen von **M5** und **KM3** bei gleichen Temperaturen wie in den Ausgangssystemen. Bei **M6** kommt es wie bei den hydratisierten Proben zu einer Erhöhung der Peakmaximumtemperatur um 2° . Betrachtet man die Enthalpien der jeweiligen Phasenumwandlungen (Tab. 4.58.), so fallen diese bei allen Systemen bis auf Matrix **M5** niedriger als im Vergleich zu 10% bzw. 20%igem Wasserzusatz aus.

Modell System	Verringerung der Enthalpie nach Zusatz von 10% Diclofenac-Na Lösung [%]	Verringerung der Enthalpie nach Zusatz von 20% Diclofenac-Na Lösung [%]
M3	-23,1	-34,0
M5	-11,1	-20,5
M6	-21,8	-45,4
M7	-13,6	-27,0
KM1	-27,1	-38,0
KM2	-16,7	-23,1
KM3	-24,2	-31,0

Tabelle 4.58.: Prozentuale Verringerung der Umwandlungsenthalpien der Modell Lipid Systeme nach Zusatz von 10% bzw. 20% einer 0,5%igen Diclofenac-Na Lösung (Mittelwert aus 3 Messungen)

Die ermittelten Enthalpien liegen deutlich unter denen der hydratisierten Systeme und beweisen somit den fluidisierenden Einfluß des Diclofenac-Na auf die Modell Lipid Systeme. Eine Ausnahme zeigt wieder das System aus UFS und GFS (**M5**), bei der die Enthalpien nicht niedriger als 10% und 20% sind. Der Arzneistoff wird möglicherweise hauptsächlich in die Intermediärstruktur eingebaut, so daß die anderen flüssigkristallinen Strukturen unverändert bleiben.

Bei allen anderen Mischungen kann aber der Einfluß des Diclofenac-Na auf die Mikrostruktur der Systeme durch den Einbau in die flüssigkristallinen Strukturen nachgewiesen werden.

Dieser führt zwar nicht zu einer Phasentransformation der Systeme, wirkt aber sowohl auf die Lipide in der invers hexagonalen als auch in der lamellaren Phase fluidisierend.

4.2.3.8 Permeationsuntersuchungen mit anderen Arzneistoffen

Die Permeationsuntersuchungen an den Modell Lipidmischungen **KM1**, **KM2**, und **KM3** ergaben Permeabilitäten für den Modellarzneistoff Diclofenac-Na, die durchaus mit den Barriereigenschaften von exzidiierter Humanhaut vergleichbar sind. Es sollte darüber hinaus das Permeationsverhalten und die sich daraus ergebenden Permeabilitäten von anderen dermal anwendbaren Arzneistoffen durch diese Stratum corneum Lipide überprüft werden. Ein Vergleich der ermittelten Daten mit Permeationen durch exzidiertes humanes Stratum corneum könnte Aufschluß darüber geben, ob die Modell Lipide und das Permeationsmodell in der Lage sind, transdermale Transportprozesse zu simulieren. Damit wäre das Modell beispielsweise auch beim Screening dermal anwendbarer Arzneistoff hilfreich, wodurch Untersuchungen an exzidiierter Humanhaut, die aufgrund begrenzter Verfügbarkeit nicht immer möglich sind, minimiert werden könnten. Nachteilig bei der Verwendung von exzidiierter Humanhaut sind außerdem die beobachteten inter- und intraindividuellen Unterschiede in der Lipidzusammensetzung und damit auch der Permeabilität [Lampe 1983, Southwell 1984, Wiechers 1989], was durch die Verwendung eines standardisierten Permeationsmodells umgangen werden könnte.

Für die Permeationsuntersuchungen wurden Ibuprofen-Lys und Hydrocortison ausgewählt, da die Permeabilitäten dieser Arzneistoffe für exzidiertes Stratum corneum bereits untersucht sind.

Die Untersuchungen wurden mit Matrix **KM1** durchgeführt, da dieses System die besten Barriereigenschaften von allen Komplettmischungen zeigte. Es wurde weiterhin Matrix **KM3** verwendet, die ähnliche physikochemische Eigenschaften wie die Stratum corneum Lipide aufweist. Abb. 4.59. zeigt die Permeation von Ibuprofen-Lys aus 0,55% iger wäßriger Lösung durch die beiden in vitro Modell Lipid Systeme **KM1** und **KM3**.

Während der gesamten Versuchsdauer waren perfect sink Bedingungen gewährleistet (Löslichkeit Ibuprofen-Lys = 56,56% [Stoye 1997], max. mögliche Arzneistoffkonzentration im Akzeptor bei 100% Permeation = 0,034%).

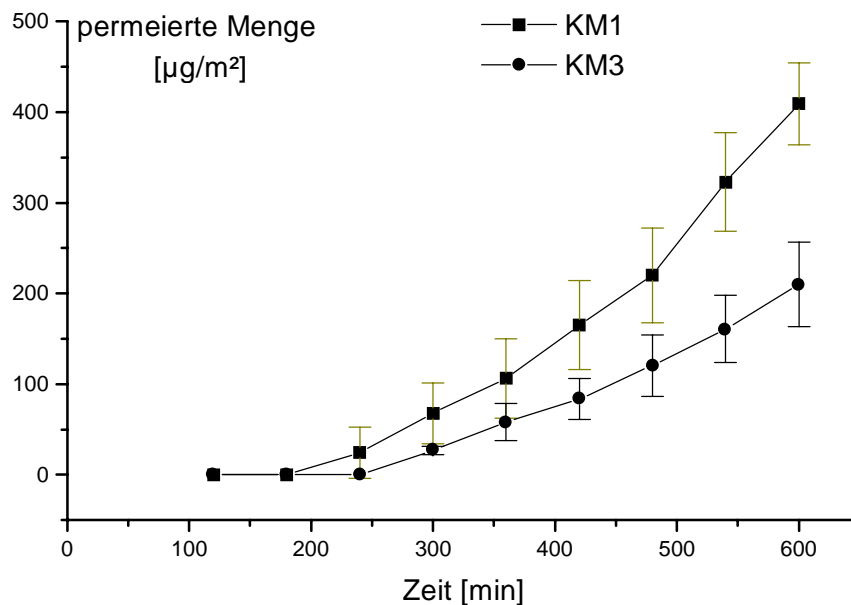


Abbildung 4.59.: Permeation von Ibuprofen-Lys aus 0,55%iger wäßriger Lösung durch **KM1** ($n = 6$) und **KM3** ($n = 5$); die durchschnittliche Einwaage betrug bei **KM1** $87,15 \pm 6,64$ mg und bei **KM3** $90,96 \pm 1,01$ mg; Hydratationsgrad von **KM1** nach Permeation = $42,3$ %, von **KM3** = $42,8$ %

Es ist eine stärkere Permeation des Arzneistoffes durch **KM1** als durch **KM3** zu verzeichnen. Die lag-Zeiten betragen bei **KM1** $210,98 \pm 31,8$ min und bei **KM3** $240,84 \pm 11,46$ min, unterscheiden sich also nicht deutlich voneinander. Vergleicht man den für **KM1** ermittelten Permeationskoeffizient von $27,05 \pm 3,02 \cdot 10^{-7}$ cm/s für Ibuprofen-Lys mit dem für Diclofenac-Na, so ergibt sich für die Matrix **KM1** eine um den Faktor 3,5 höhere Ibuprofen-Lys Permeabilität. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu Untersuchungen an humanem Stratum corneum, bei denen ein Permeationskoeffizient von $0,575 \cdot 10^{-7}$ cm/s [Stoye 1998] ermittelt wurde, der etwa halb so groß wie der für Diclofenac-Na angegebene Koeffizient ist. Die Permeabilität von Matrix **KM3** für Ibuprofen-Lys liegt mit $12,98 \pm 3,03 \cdot 10^{-7}$ cm/s etwas niedriger als für Diclofenac-Na ($15,33 \pm 1,63 \cdot 10^{-7}$ cm/s). Dies zeigt zwar ein tendenziell ähnliches Permeationsverhalten zum humanem Stratum corneum, ein statistischer Vergleich der Mittelwerte mittels t-Test ergibt aber, daß sich die Permeabilitäten von Ibuprofen-Lys und Diclofenac-Na für **KM3** mit 95%iger statistischer Sicherheit nicht signifikant unterscheiden. Bei Matrix **KM3** wird während der Permeation wieder ein Herauslösen der Fettsäuren beobachtet. Die herausgelöste Menge an Fettsäuren, repräsentiert durch die kumulierte Peakfläche, entspricht derjenigen bei der Permeation mit Diclofenac-Na (Abb. 4.60.).

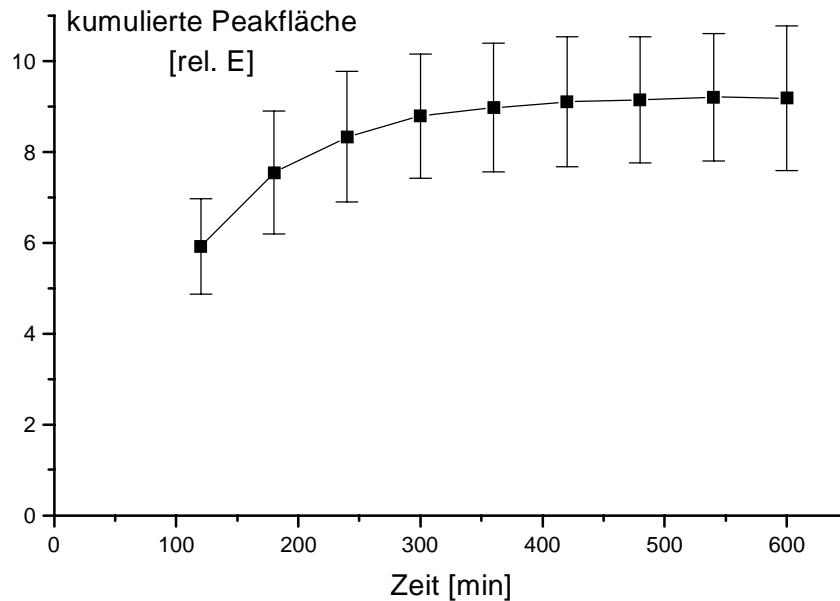


Abbildung 4.60.: Herauslösen der Fettsäuren aus KM3 während der Permeation mit Ibuprofen-Lys

Für die Permeationsuntersuchungen mit Hydrocortison wurde der Arzneistoff zu 1% in Wasserhaltige Hydrophile Salbe (WHS) eingearbeitet. In dem als Donator verwendeten System liegt der Wirkstoff zum Teil gelöst, der größere Anteil dagegen in suspendierter Form vor. Abweichend zu den bisher durchgeführten Permeationsuntersuchungen konnte bei diesen Permeationen die Versuchsdauer auf 15h verlängert werden, da auch nach 8h eine verstärkte Hydratation weder bei **KM1** (Wassergehalt nach 8h = 35,8%) noch bei **KM3** (Wassergehalt nach 8h = 37,6%) zu verzeichnen war. Der Wassergehalt der Mischung beträgt nach 15h 43,8% für **KM1** und 47,8% für **KM3**. Die verringerte Hydratation der Lipidmischungen ist möglicherweise durch den geringeren Wassergehalt des Donators bedingt (70%). Außerdem wird ein Teil des in der WHS enthaltenen Wassers durch Wechselwirkungen mit den polaren Kopfgruppen der enthaltenen Tenside innerhalb der Gerüststruktur gebunden und ist damit nicht frei beweglich. Einen weiteren Einfluß auf die Hydratation könnte der Akzeptor haben. Hier wurde abweichend zu den anderen Untersuchungen der Phosphatpuffer ohne NaCl verwendet, da dies die HPLC-Analytik störte.

Abb. 4.61. zeigt die Permeationsprofile des Arzneistoffs durch die beiden Matrices. Bei **KM3** ist in einem Zeitraum bis 5h, bei **KM1** bis 8h keine Arzneistoffpermeation nachweisbar. Danach findet eine zunehmende Permeation von Hydrocortison durch die beiden Lipidmatrices statt, wobei die Permeabilität für **KM3** sehr viel höher als für **KM1** ist.

Der im linearen Bereich bestimmte Permeationskoeffizient beträgt für **KM1** $0,343 \pm 0,097 \cdot 10^{-7}$ cm/s und für **KM3** $1,054 \pm 0,069 \cdot 10^{-7}$ cm/s.

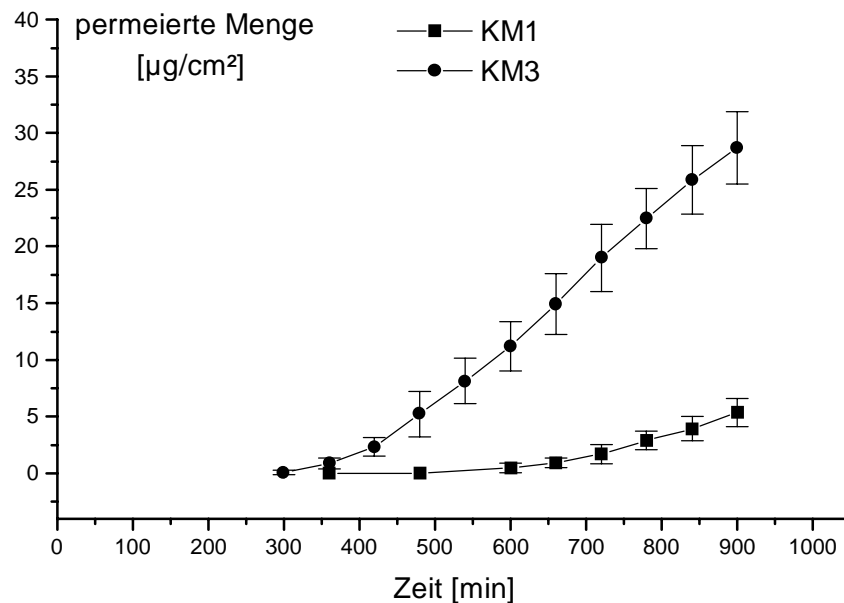


Abbildung 4.61.: Permeation von Hydrocortison aus 1%iger WHS durch KM1 (n = 5) und KM3 (n = 6); die durchschnittliche Einwaage betrug bei KM1 $87,08 \pm 2,29$ mg und bei KM3 $86,48 \pm 12,42$ mg;

Während der gesamten Versuchsdauer waren perfect sink Bedingungen gewährleistet. Die im Gegensatz zu den rein wäßrigen Donatorlösungen beobachtete längere lag-Zeit ist vermutlich auf die höhere Viskosität des halbfesten Vehikels und eine damit verbundene Verringerung der Diffusionsgeschwindigkeit des Arzneistoffes zurückzuführen. Ein Vergleich mit den für Diclofenac-Na bestimmten Permeationskoeffizienten zeigt für beide Matrices eine verringerte Permeabilität für Hydrocortison um den Faktor 22 (bei **KM1**) bzw. 14 (bei **KM3**). Refai [1999] führte Permeationsuntersuchungen an exzidiertem Stratum corneum mit einer identischen Formulierung durch und berechnete für den Arzneistoff einen Permeationskoeffizienten von $0,0101 \cdot 10^{-7}$ cm/s, der somit um den Faktor 100 geringer als für Diclofenac-Na liegt. Eine verringerte Permeabilität für Hydrocortison im Vergleich zu Diclofenac-Na kann somit für die beiden Modell Matrices, wenn auch nicht in gleichem Ausmaß beobachtet werden.

4.2.3.9 Zusammenfassende Diskussion zur Permeation von Ibuprofen-Lys und Hydrocortison durch KM1 und KM3 im Vergleich zu Diclofenac-Na

Bei einem Vergleich der Permeationskoeffizienten, die an Stratum corneum ermittelt wurden, muß immer berücksichtigt werden, daß das humane Stratum corneum von unterschiedlichen Hautspendern stammt. Dadurch ist ein direkter Vergleich erschwert, denn die Permeabilitäten

schwanken inter- und intraindividuell stark. Southwell et al.[1984] untersuchten die in vitro Variation der Permeabilitäten für unterschiedliche Substanzen und fanden in ihren Studien eine interindividuelle Variabilität von $66\% \pm 25\%$. Die Variabilität bei der Verwendung von Stratum corneum Proben von unterschiedlichen Hautregionen lag bei $43\% \pm 25\%$.

Betrachtet man die Literaturangaben für die Permeation der drei Modellarzneistoffe durch exzidiertes humanes Stratum corneum, so ist die Permeabilität für Diclofenac-Na am größten, gefolgt von Ibuprofen-Lys und Hydrocortison (Tab. 4.62.). Vergleicht man die Permeationskoeffizienten für Diclofenac-Na und Ibuprofen-Lys, so sind diese nur etwa um den Faktor 2 unterschiedlich und unterscheiden sich damit unter Berücksichtigung der möglichen Schwankungen nicht signifikant. Bei der Permeation durch die Stratum corneum Lipid Modelle **KM1** (mit Ceraderm S[®]) und **KM3** (mit Ceramid Typ IV) sollten deshalb auch nur geringe Unterschiede hinsichtlich der Permeabilität für diese beiden Arzneistoffe zu erwarten sein.

Arzneistoff	Permeationskoeffizient P [10 ⁻⁷ cm/s] Humanes Stratum corneum	Permeationskoeffizient P [10 ⁻⁷ cm/s] KM1	Permeationskoeffizient P [10 ⁻⁷ cm/s] KM3
Diclofenac-Na	1,03 [Kriwet 1994]	7,61 ± 0,39	15,33 ± 1,62
Ibuprofen-Lys	0,575 [Stoye 1998]	27,05 ± 3,02	12,98 ± 3,03
Hydrocortison	0,0101 [Refai 1999]	0,343 ± 0,097	1,054 ± 0,069

Tabelle. 4.62.: Vergleich der für KM1 und KM3 ermittelten Permeationskoeffizienten für die Modellarzneistoffe Diclofenac-Na, Ibuprofen-Lys und Hydrocortison mit Literaturdaten

Die Messungen mit Matrix **KM3** bestätigen den geringen Permeabilitätsunterschied für Diclofenac-Na und Ibuprofen-Lys (Tab. 4.62.). Damit zeigt diese Matrix ein zum humanen Stratum corneum ähnliches Permeationsverhalten, berücksichtigt man die möglichen inter- und intraindividuellen Schwankungen der Hautpermeation.

Im Gegensatz dazu permeiert Ibuprofen-Lys durch **KM1** sehr viel schneller als das Diclofenac-Na. Nach Pugh [1999] wird die Diffusion durch das Stratum corneum von der Art und Anzahl der Bindungen des permeierenden Stoffes mit den Bestandteilen des Stratum corneum beeinflusst. Die in dem Ceraderm S[®] und damit in **KM1** enthaltenen Phospholipide

und Cerebroside besitzen polare Kopfgruppen, die zum Teil eine Ladung aufweisen. Diese kommt dadurch zustande, daß die Phosphatgruppen der Phospholipide und die Sulfatgruppe der Sulfatide bei einem pH-Wert >3 zum Teil deprotoniert werden und so eine negative Ladung tragen, bzw. Phosphatidylcholin als Zwitterion vorliegt [Jacobsohn et al. 1989]. Insgesamt gesehen besitzt die Grenzfläche aus den polaren Kopfgruppen bei **KM1** durch die enthaltenen Bestandteile ein sehr viel höheres Potential als in **KM3**. Bei der Diffusion eines geladenen Moleküls entlang dieser Grenzfläche kommt es zu entsprechend starken Coulomb-Wechselwirkungen zwischen den Molekülen. Sowohl Repulsions- als auch Attraktionskräfte erschweren die Diffusion durch diese Bereiche. Moleküle, die keine Ladung tragen oder bei denen die Ladungen mehr oder weniger ausgeglichen sind, würden entsprechend schneller diffundieren. Bei Ibuprofen-Lys könnte die Matrixdiffusion als Ionenpaar, bei dem die Ladungen innerhalb des Ionenpaars ausgeglichen sind, erfolgen. Die Ausbildung eines Ionenpaars wäre theoretisch durch die Protonen der terminalen Aminofunktion des Lysinans mit dem Säureanion bzw. durch die teilweise protonierte und damit positiv geladene α -Aminofunktion möglich. Durch den Ladungsausgleich würden kaum Coulomb-Wechselwirkungen zu erwarten sein, so daß die Diffusion insbesondere durch die polaren Bereiche der Bilayerstrukturen nicht behindert wird. Bei der Diffusion von Diclofenac-Na insbesondere als Anion kann die Diffusion innerhalb der Matrix durch Repulsion und Attraktion behindert sein, so daß eine geringere Permeationsrate in **KM1** für dieses Molekül im Vergleich zu Ibuprofen-Lys resultiert.

Diese Überlegungen können zwar das Verhalten der beiden Arzneistoffe in Matrix **KM1** begründen, stehen aber sowohl im Widerspruch zu den ermittelten Permeationsdaten für **KM3** als auch zu den Literaturdaten für exzidiertes Stratum corneum. Aufgrund der fehlenden Ladungen der polaren Kopfgruppen der Ceramide, die sowohl in **KM3** vorhanden sind als auch in den Lipiden des Stratum corneum, müßte hier die Diffusion für Diclofenac-Na beispielsweise in **KM3** deutlich schneller erfolgen als bei Matrix **KM1**. Somit bestimmen bei Matrix **KM3** und dem Stratum corneum andere Einflußfaktoren die Permeabilität für die beiden Arzneistoffe.

Eine wichtige Rolle bei der Diffusion wird dem Verteilungskoeffizient eines Stoffes zwischen dem Donator und den Stratum corneum Lipiden beigemessen [Potts und Guy 1992]. Je größer dieser ist, um so höher ist die Lipophilie eines Moleküls und dementsprechend die Verteilung in den Lipiden. Der Verteilungskoeffizient zwischen Arzneistoff und Stratum corneum bzw. den Stratum corneum Lipiden ist experimentell schlecht zugänglich. Ansatzweise kann der n-Oktanol/Wasser Verteilungskoeffizient, der ein Hinweis auf das Lösungsverhalten und die

Lipophilie eines Stoffes gibt, betrachtet werden [Pugh et al. 1996]. Bei dem eingesetzten Permeationsmodell erfolgt die Permeation aus einer wäßrigen Lösung in die Lipide und anschließend in einen Phosphatpuffer pH 7,4, so daß die n-Oktanol/Puffer Verteilungskoeffizienten der beiden dissoziationsfähigen Arzneistoffe sinnvollerweise miteinander verglichen werden sollten.

Bei einem pH-Wert von 6,75 bei Einsatz eines Phosphatpuffers liegt dieser für Ibuprofen-Lys bei 36, [Stoye 1998], für Diclofenac-Na unter Verwendung eines Phosphatpuffers pH 7,0 bei 28 [Kriwet 1994], womit sich diese nicht deutlich unterscheiden. Man erwartet aufgrund des etwas höheren Wertes für Ibuprofen-Lys eine etwas geringere Permeationsrate für den Arzneistoff im Vergleich zu Diclofenac-Na, was für die Permeation durch humanes Stratum corneum und für **KM3** tendenziell zutrifft. Für **KM1** gelten diese Überlegungen nicht. Möglicherweise liegen durch die eingesetzten stark polaren Ceramide völlig andere Diffusionsverhältnisse vor, so daß andere Einflußfaktoren wie beispielsweise die beschriebenen Repulsions- und Attraktionskräfte dominieren könnten.

Für den dritten Modellarzneistoff Hydrocortison wurde bei beiden Matrices eine verringerte Permeabilität beobachtet. Das steife Sterolskelett bedingt eine voluminöse sperrige Molekülgeometrie, so daß die Diffusion durch die lamellaren Schichten stärker behindert wird als bei den anderen relativ flexiblen und kleinen Ibuprofen-Lys und Diclofenac-Na Molekülen. Weiterhin wäre auch aufgrund der zu dem Cholesterol ähnlichen sterischen Verhältnisse ein fester Einbau in die Lamellarphase möglich, so daß die Menge an permeierendem Hydrocortison reduziert wird. Der n-Oktanol/Wasser Verteilungskoeffizient für Hydrocortison liegt laut Literatur bei etwa 107 [Pugh et al. 1996] und dürfte aufgrund von fehlenden dissoziationsfähigen Gruppen keine pH-Abhängigkeit zeigen. Erwartungsgemäß müßte demnach Hydrocortison mit dem höchsten Verteilungskoeffizient die von den drei Arzneistoffen geringste Permeationsrate zeigen, was bei **KM1**, **KM3** und dem Stratum corneum beobachtet wurde.

Insgesamt gesehen ist das Permeationsverhalten von Matrix **KM3** durchaus mit dem exzidiertem Stratum corneum vergleichbar. Es werden zwar höhere Permeabilitäten erzielt, diese liegen aber deutlich unterhalb der mit Zellkulturen ermittelten Daten. **KM1** ist dagegen nicht nur hinsichtlich der physikochemischen Eigenschaften sondern auch aufgrund der Permeationsdaten für die Modellarzneistoffe nicht mit dem Stratum corneum vergleichbar. Um das abweichende Verhalten von **KM1** genauer zu untersuchen, wäre ein Vergleich der Verteilungskoeffizienten der Modellarzneistoffe zwischen Donator und Lipid bzw. zwischen Puffer und Lipid sinnvoll. Im Rahmen der Arbeit war dies experimentell nicht möglich.

5 Abschlußdiskussion

5.1 Physikochemische Charakterisierung der in vitro Modell Lipid Systeme

5.1.1 Struktur der in vitro Modell Lipid Systeme M1-M7 und Bedeutung des Cholesterols und der freien Fettsäuren

Die Modell Lipid Systeme **M1-M7** sind zweiphasige Systeme, die sowohl lamellare als auch invers hexagonale Anteile enthalten.

Je nach Zusammensetzung des Systems dominiert eine der beiden flüssigkristallinen Phasen. Systeme, die nur Fettsäuren und zu 41% deren Seifen enthalten (**M1** und **M5**), bestehen bevorzugt aus invers hexagonalen Strukturen.

Der Zusatz von Cholesterol und Ceramiden in Form des Ceraderm S[®] führt zur zunehmenden Bildung einer lamellaren Mikrostruktur, da diese Lipide entweder einen Packungsparameter von etwa 1 besitzen, der die Bildung lamellarer Phasen induziert, oder der Packungsparameter von Molekülen in den Systemen so verändert wird, daß ebenfalls lamellare Strukturen resultieren. Für die in Ceraderm S[®] enthaltenen Phospholipide und Sphingolipide wird ein Packungsparameter von 1 angenommen. Für diese Moleküle wird auch schon im wasserfreien Zustand die Ausbildung schichtartiger Strukturen diskutiert. Der Zusatz des Cholesterols verändert durch Interaktion mit den Fettsäuren deren Packungsparameter zu Werten nahe 1, so daß diese teilweise in die Lamellarphase eingebaut werden können.

Grundsätzlich unterscheiden sich die beiden flüssigkristallinen Phasen durch die enthaltenen Bestandteile voneinander. Die inverse Phase wird hauptsächlich aus Fettsäuremolekülen gebildet und kann nur in begrenztem Umfang Cholesterol und Ceraderm S[®] einbauen. Die Lamellarphase besteht voraussichtlich aus Cholesterol, Ceraderm S[®] und Fettsäureanionen.

Die Untersuchungen zeigen die Funktion des Cholesterols auf, die auch für die Stabilität von Biomembranen von großer Bedeutung ist. So besitzt Cholesterol zum einen einen fluidisierenden Effekt auf geordnete Strukturen und verhindert die Kristallisation der Lipide im Flüssigkristall, zum anderen werden flüssige Lipide wie UFS durch das steife Sterolskelett des Cholesterols in eine gerade Anordnung gezwungen und die Ausbildung von gauche-Konformeren verhindert. Die Fettsäuren können so in den Bilayern immobilisiert werden. Damit decken sich die Ergebnisse mit dem von Kitson et al. [1994] beschriebenen Effekt des Cholesterols. In einer Mischung aus Ceramiden und Palmitinsäure induzierte zugesetztes Cholesterol die Ausbildung einer lamellaren flüssigkristallinen Phase, während die Mischung ohne Cholesterol einen gelartigen und zum Teil kristallinen Zustand aufwies.

Die Ausbildung der hauptsächlich lamellaren flüssigkristallinen Mikrostruktur in Matrix **M6** wird ebenfalls durch das Cholesterol hervorgerufen. Die Struktur dieses Systems ist dennoch nicht mit den Stratum corneum Lipiden vergleichbar, da zwei Lamellarphasen mit unterschiedlichem Netzebenenabstand vorliegen. Auch hinsichtlich des thermischen Verhaltens weist diese Matrix keine ähnlichen Eigenschaften auf.

Alle anderen Modellmischungen sind ebenfalls nicht mit dem Lipid System des Stratum corneum vergleichbar. Weder die mittels SAXD bestimmten Netzebenenabstände noch das thermische Verhalten der Systeme stimmt mit den physikochemischen Eigenschaften der Stratum corneum Lipide überein. Zudem handelt es sich bei den Mischungen fast immer um zweiphasige Systeme aus zwei flüssigkristallinen Strukturen, während die interzellulären Stratum corneum Lipide nur lamellare Schichten bilden.

Die Bedeutung der Fettsäuren wird in der Literatur unterschiedlich diskutiert. Nach Wertz [1986, 1996] ist die Anwesenheit der Fettsäuren, die neben dem Cholesterolsulfat als einzige Moleküle ionisierbar sind, wichtig, um ohne die polaren Phospholipide stabile Bilayer zu bilden. Bouwstra [1996a] schlägt vor, daß die Fettsäuren nicht unbedingt für die Bildung einer lamellaren Struktur notwendig sind, da schon bei Mischungen aus Ceramiden und Cholesterol die Ausbildung lamellarer Phasen beobachtet wird. Durch die Fettsäuren wird dagegen die Löslichkeit des Cholesterols in den Bilayern erhöht, da sich durch Zusatz von Fettsäuren zu der Ceramid-Cholesterol Mischung der Anteil des mit SAXD und WAXD detektierten kristallinen Cholesterols verringerte. Neuere Studien zeigten weiterhin, daß freie langkettige gesättigte Fettsäuren eine Transformation der hexagonalen in eine geordnete orthorhombische laterale Packung der Lipide bewirken [Bouwstra et al. 1998b]. Insgesamt sollen die Stratum corneum Lipide hauptsächlich als Gel-Phase vorliegen. Dadurch würde sich auch das Wasserhaltevermögen des Stratum corneum erklären, da Gel-Phasen im Vergleich zu flüssigkristallinen und flüssigen Phasen als Diffusionsbarriere wirken. Allerdings sollen in der Gelphase noch eingelagerte flüssigkristalline Domänen und kristallines Cholesterolmonohydrat existieren. Damit stehen diese Überlegungen in Gegensatz zu den Modellvorstellungen von Friberg et al. [1990]. Nach dessen Vorstellung müssen sich die Lipide des Stratum corneum im rein flüssigkristallinen Zustand befinden, damit eine ausreichende Barrierefunktion gewährleistet ist. Dafür sei insbesondere die Anwesenheit der zweifach ungesättigten Linolsäure notwendig, um eine Kristallisation der Stratum corneum Lipide auch bei geringen Wassergehalten zu verhindern. Die Barrierefunktion der Stratum corneum Lipide würde somit über einen weiten Bereich verschiedener Hydratationsgrade aufrecht erhalten werden. Dadurch könnte auch der Effekt topisch applizierter Substanzen wie

Vaseline oder Glycerol begründet werden, die ebenfalls eine Kristallisation der Lipide verhindern und damit die Barrierefunktion der Stratum corneum Lipide verbessern [Froebe et al. 1990, Friberg et al. 1993, Mattai et al. 1993].

Eigene Untersuchungen zur physikochemischen Charakterisierung der Modell Systeme **M1-M7** bestätigen die Überlegungen von Bouwstra, daß der Zusatz von gesättigten Fettsäuren zur Ausbildung geordneter Strukturen führt. Dies ist besonders bei der Lipid Matrix aus UFS und GFS (**M5**) deutlich zu erkennen, da beispielsweise TEM-Aufnahmen des Systems die geraden scharfkantigen Bruchkanten zeigen, die für lamellare Gelphasen charakteristisch sind. Außerdem besitzt das System einen endothermen Phasenübergang mit einer relativ hohen Übergangsenthalpie, was die Strukturvorstellungen für dieses Systems unterstützt. Ob die Zusammensetzung der Fettsäurefraktion in den in vitro Modell Lipid Systemen auch einen Einfluß auf die Barrierefunktion der Lipide und hierbei auf das Permeationsverhalten des Modellarzneistoffes hat, soll im Abschnitt 5.2.1 diskutiert werden.

5.1.2 Struktur der in vitro Modell Lipid Systeme KM1-KM3 und Bedeutung der Ceramid-Zusammensetzung

In den Komplettmischungen **KM1**, **KM2** und **KM3** wurde der Einfluß verschiedener Ceramid Typen auf die Struktur der in vitro Modell Lipidmischungen untersucht.

Zur Verfügung standen zum einen das bereits verwendete Ceraderm S[®] (in **KM1**) und zum anderen zwei weitere im Handel erhältliche Ceramid Typen (Ceramid III in **KM2**, Ceramid Typ IV in **KM3**). Die eingesetzten Ceramide unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung deutlich voneinander. Ceraderm S[®] ist ein heterogenes Gemisch, das hauptsächlich aus Phospholipiden und Cerebrosiden besteht. Phospholipide wurden in den Stratum corneum Lipiden im Gegensatz zu anderen Biomembranen nur in Spuren nachgewiesen. Die ebenfalls enthaltenen Cerebroside sind in der Regel nur in den lebenden Schichten der Epidermis zu finden. Der in Position 1 befindliche Zuckerrest wird während der epidermalen Differenzierung enzymatisch entfernt. Ceramid III ist ein halbsynthetisches Produkt, das nur aus einer Sphingosinbase, die mit einer einzigen Fettsäureart verbunden ist, besteht. Ceramid Typ IV enthält zwar nur eine Ceramid Klasse, in dem Gemisch sind aber unterschiedliche Kettenlängen sowohl bei der Sphingosinbase als auch bei der in Amid-Bindung verknüpften Fettsäure zu finden. Vergleicht man **KM1** zuerst mit Matrix **M4**, die sich nur durch die fehlenden GFS von der Komplettmatrix unterscheidet, so wird hier wieder der Einfluß der GFS auf die Mikrostruktur des Systems deutlich. Bei beiden Systemen handelt es sich um

hauptsächlich lamellare Matrizes. Allerdings befinden sich die Lipide in Matrix **M4** in einem rein flüssigkristallinen Zustand, während der Zusatz von GFS zur teilweisen Ausbildung lamellarer Gel-Phasen führt. Hinsichtlich der physikochemischen Eigenschaften zeigt die Lamellarphase von **KM1** eine zu den Stratum corneum Lipiden ähnliche Bilayer-Schichtdicke. SAXD-Messungen bestätigen aber, daß in dem System, wenn auch nur in geringem Anteil, invers hexagonale Bereiche enthalten sind. Betrachtet man das thermische Profil von **KM1**, so wird außerdem der fluidisierende Effekt der Phospholipide deutlich. Im Thermogramm ist nur ein breiter Peak bei 34°C mit einer geringen Übergangsenthalpie zu finden, der mit dem thermischen Verhalten extrahierter Stratum corneum Lipide nicht übereinstimmt. Für diese Lipide wird ein endothermer Phasenübergang, der bei etwa 65°C auftritt, beschrieben.

Bonté et al. [1997] konnten an in vivo extrahierten Stratum corneum Lipiden zeigen, daß Phospholipide die Übergangstemperatur der Lipide durch die Beeinflussung der Ceramid Packung in den Bilayern reduziert. Bei der Extraktion im Bereich der Ferse enthielten die Extrakte zu 17% Phospholipide. Ein Vergleich mit Extrakten ohne Phospholipide ergab außerdem eine Verringerung der Netzebenenabstände. Die Beobachtungen stimmen mit eigenen Untersuchungen überein, bei denen der Zusatz von Phospholipiden zu **KM3** ebenfalls eine Reduktion des Netzebenenabstandes sowie eine Verringerung der Umwandlungstemperatur bewirkte. Damit konnte deutlich der störende Effekt der Phospholipide auf die Mikrostruktur der Modell Lipid Systeme aufgezeigt werden.

Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, daß durch den Einsatz eines Ceramides, das nur einen einzigen Fettsäuretyp und eine einzige Sphingosinbase enthält, das Phasenverhalten von Stratum corneum Lipiden nicht dargestellt werden kann. Matrix **KM2** besitzt zwar einen lamellaren Aufbau, das Thermogramm zeigt aber ein Profil, das auf ein komplexes Phasenverhalten der Mischung hindeutet. Somit müssen in Modell Lipid Systemen Ceramide eingesetzt werden, die unterschiedliche Kettenlängen aufweisen.

Dagegen ist das in vitro Modell **KM3** mit den Stratum corneum Lipiden vergleichbar. Der Zusatz des reinen Ceramides Typ IV, führt zu einem System, das eine einphasige lamellare Struktur mit einem Netzebenenabstand von 6,4 nm aufweist und somit mit dem von Bouwstra et al. [1991a,b] ermittelten Abstand für humanes Stratum corneum identisch ist. Zudem zeigt das System einen endothermen Übergang bei 60° C. Dieser ist zwar im Vergleich zu dem von Golden et al. [1986] beschriebenen Phasenübergang um etwa 5° zu niedrigeren Temperaturen verschoben, kommt aber durch eine andere Zusammensetzung der Lipide zustande. Die Zusammensetzung und Verhältnisse der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten

Fettsäurefraktion orientierte sich nach der von Lampe [1983] angegebenen Zusammensetzung der freien Fettsäuren. Diese wurde während der Untersuchungen nicht variiert, da die Resultate der physikochemischen Charakterisierung vor allem mit den Daten von Häusler [1994] verglichen werden sollten.

Nach Literaturangaben von Wertz et al. [1987b] besteht die Fettsäurefraktion der Stratum corneum Lipide aus geraden gesättigten Fettsäuretypen, die zwischen 14 und 28 C-Atome enthalten. Am häufigsten kommen C22-Fettsäuren (15,3%) und C24-Fettsäuren (26,9%), die zudem keine Doppelbindung aufweisen. Damit differieren diese Angaben deutlich von der Zusammensetzung nach Lampe, der hauptsächlich Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C16 und C18 detektierte, wobei 49,2% davon einfach bzw. zweifach ungesättigt waren.

Der Ersatz von ungesättigten FS durch gesättigte längerkettige Typen in den Modell Lipid Systemen wird höchstwahrscheinlich eine weitere Transformation von flüssigkristallinen Strukturen in lamellare Gelphasen induzieren. Dadurch wird eine Verschiebung der Phasenumwandlung zu höheren Temperaturen erwartet. Durch Variation der Fettsäurefraktion müßte also ein Modell Lipid System herzustellen sein, bei dem die Übergangstemperatur genau mit den Literaturangaben übereinstimmt.

Für die Ausbildung geordneter Lamellarphasen im Stratum corneum sind allerdings nicht nur die langkettigen gesättigten Fettsäuren sondern vor allem die Ceramide notwendig [Kitson et al. 1994, Bouwstra 1997]. Die langen Alkylketten der enthaltenen Ceramide sind hauptsächlich gesättigt und liegen deshalb ebenfalls in einer gestreckten Konformation vor, die eine hohe Packungsordnung erlaubt und zur Bildung einer lamellaren Gelphase führt. Die Rolle verschiedener Ceramid Fraktionen wurde bereits in Abschnitt 4.2.3.5 diskutiert. Hier wurde auf die wichtige Rolle des Ceramid 1 in den Stratum corneum Lipiden hingewiesen. Die Anwesenheit dieses Moleküls sei vor allem auch für die Ausbildung der Langperiode von 13 nm verantwortlich. In keinem der Modell Systeme **KM1-KM3** konnte eine derartige Phase mit einem entsprechenden Netzebenenabstand nachgewiesen werden. Da in den eingesetzten Ceramid Typen kein Ceramid 1 enthalten ist, entsprechen diese Beobachtungen den Erwartungen. Besonders **KM3** sollte diesbezüglich weiter untersucht werden, wobei hier das entsprechende Ceramid zugefügt und dessen Effekt auf das Phasenverhalten mit entsprechenden Methoden wie SAXD, WAXD und DSC verfolgt werden sollte. Dieser Aspekt wird allerdings als problematisch angesehen, da die Substanz im Handel nicht erhältlich ist und eine Gewebeextraktion aufwendig und schwierig erscheint.

5.1.3 Bedeutung anderer Faktoren für die Ausbildung der multilamellaren Matrix der Stratum corneum Lipide

Neben der Bedeutung der in Abschnitt 5.1.1 und 5.1.2 bereits aufgeführten Komponenten wird in der Literatur auf die Rolle von bisher nicht erwähnten Bestandteilen und Bedingungen hingewiesen. Daß der pH-Wert die Ausbildung flüssigkristalliner Phasen beeinflusst, wurde bereits von Friberg [1985b] beschrieben, wobei der pH vor allem für die Dissoziation der Fettsäuren von Bedeutung sei. Untersuchungen anderer Gruppen [Kitson et al. 1994] an Modell Mischungen zeigten, daß bei geringeren pH-Werten der Phasenübergang Gel → flüssigkristallin zu höheren Temperaturen verschoben wird, was darauf hinweist, daß sich bei niedrigen pH-Werten mehr Alkylketten im "festen" Zustand befinden. Bouwstra et al. [1998b] fanden heraus, daß der pH-Wert die lamellare Ordnung einer Cholesterol-Ceramid Mischung nicht verändert. Bei Zusatz freier Fettsäuren war dagegen ein pH-abhängiges Phasenverhalten zu erkennen, wobei bei einem höheren pH-Wert von 7,4 insbesondere die Bildung der Langperiode induziert wurde.

Daneben wird von mehreren Autoren auf die Wichtigkeit des Cholesterolsulfats in den Stratum corneum Lipiden hingewiesen. Innerhalb des Stratum corneum existiert für dieses Molekül ein Konzentrationsgradient, bei dem die Menge zur Oberfläche hin geringer wird. Wertz et al. [1986] beobachteten erst nach Zusatz von Cholesterolsulfat zu einer Mischung aus Ceramiden und Cholesterol die Bildung von Liposomen. In Modell Mischungen induzierte Cholesterolsulfat die Bildung der Langperiode und erhöhte zudem die Löslichkeit von Cholesterol in den Mischungen [Bouwstra et al. 1999]. Daraus schloß man, daß Cholesterolsulfat insbesondere in den unteren Schichten des Stratum corneum die Bilayer der multilamellaren Matrix stabilisiert.

5.2 Permeationsuntersuchungen

5.2.1 Permeabilität der Modellmischungen M1-M7

Die Permeabilitäten der Mischungen **M1-M7** und damit die Barriereigenschaften verändern sich mit den zugesetzten Bestandteilen. Diese konnten anhand eines einfachen Permeationsmodells bestimmt werden, bei dem die entsprechende Lipidmatrix in einen speziellen Träger mit definierten Lochbohrungen und definierter Dicke eingestrichen wurde, der Träger mit der Lipidmischung zur Vermeidung einer übermäßigen Hydratation mit einer silikonisierten Dialysemembran abgedichtet und anschließend anstelle des exzidierten

Stratum corneum für Permeationsuntersuchungen in eine modifizierte Franz-Zelle eingesetzt wurde. Als Modellarzneistoff für die Permeation diente Diclofenac-Na, das als NSAR auch topisch appliziert wird. Die ermittelten Permeabilitäten, die durch den Permeationskoeffizient P beschrieben werden können, korrelieren nicht mit der Viskosität und der Dichte der Matrizes. Eine während der Permeationsuntersuchungen auftretende Hydratation der Mischungen, führt zu keiner starken Veränderung der Systeme. Damit ist zu vermuten, daß das beobachtete Verhalten allein der Mikrostruktur, die sich mit der Zusammensetzung der Modell Lipid Systeme ändert, zuzuschreiben ist.

Mischungen, die nur Fettsäuren und deren Anionen enthalten, besitzen die höchste Permeabilität für den Arzneistoff. Cholesterol verbessert die Barriereigenschaften der Systeme, wobei die zusätzliche Anwesenheit der Ceramide in den Modell Lipid Systemen notwendig ist, um Permeabilitätskoeffizienten zu erhalten, die im Bereich von humanem Stratum corneum liegen. Der Zusatz von GFS zu den Systemen verbessert in keinem Fall die Barriereigenschaften. Damit wird die These unterstützt, daß Fettsäuren hauptsächlich zur Solubilisation von Cholesterol in den Stratum corneum Lipiden notwendig sind.

Die Permeabilitätsunterschiede können durch die zweiphasige Mikrostruktur der Systeme erklärt werden. Systeme mit einem erhöhten Anteil an invers hexagonalen Bereichen sind für den Arzneistoff permeabler und werden mit der Zunahme lamellarer Bereiche immer undurchlässiger. Einzige Ausnahme stellt Matrix **M6** dar, die als rein lamellares System charakterisiert wurde und dennoch eine relativ hohe Permeabilität zeigte. Dies macht einmal mehr deutlich, daß nicht nur das Vorliegen einer lamellaren Struktur sondern auch die Anwesenheit der Ceramide in der Lamellarphase wichtig für den Aufbau der Permeabilitätsbarriere ist.

5.2.2 Permeabilität der Modell Lipid Systeme **KM1-KM3**

Die Zusammensetzung des eingesetzten Ceramid Typs in den Modell Lipid Systemen hat einen Einfluß auf die Barriereigenschaften und die Permeabilität der Systeme für den Modellarzneistoff Diclofenac-Na. Der Arzneistoff Diclofenac-Na permeiert in geringerem Ausmaß durch Matrix **KM1** als durch **KM2** und **KM3**. Es wurde erwartet, daß **KM1** durch den Einsatz von Ceraderm S[®] und durch den bei der physikochemischen Charakterisierung nachgewiesenen Fluidisierungseffekt der enthaltenen Phospholipide für den Arzneistoff permeabler ist als die beiden anderen Systeme. **KM1** liegt als lamellarer Flüssigkristall vor, während sich die Lipide in der Lamellarphase bei **KM2** und **KM3** in einem hauptsächlich

gelartigen Zustand befinden. In einer Gelphase besitzen die jeweiligen Bestandteile nur eine eingeschränkte Beweglichkeit, wodurch auch die Diffusion eines Moleküls durch diese Phase behindert werden sollte. Die Ergebnisse zeigen aber, daß die Permeation durch ein Modell Lipid System von mehreren Faktoren beeinflusst wird. Ein Grund für die höhere Permeabilität von **KM2** und **KM3** ist das während der Permeation beobachtete Herauslösen der UFS, das darauf hinweist, daß nicht sämtliche UFS in die Matrix eingebaut werden können. Eine Stabilisierung könnte mit Sicherheit durch den Einsatz von Ceramid Mischungen, die alle Ceramid Klassen enthalten, erreicht werden. Offensichtlich sind aber die beiden Matrizes **KM2** und **KM3** auch hinsichtlich der Fettsäurefraktion nicht optimal zusammengesetzt. Die Zusammensetzung der Fettsäuren sollte sich an die von Wertz [1987b] angegebenen Verhältnisse für die freien Fettsäuren anlehnen, womit sich der Anteil an UFS in den Mischungen reduziert. Der Einbau der gesamten Fettsäurefraktion in die Lamellarphase von **KM1** scheint durch die enthaltenen Phospholipide und Cerebroside möglich, da die Polarität der Kopfgruppen auch aufgrund auftretender Ladungen sehr viel höher als bei den in **KM2** und **KM3** eingesetzten Ceramiden ist. Dadurch sind intermolekular stärkere Wechselwirkungen wie Coulomb-Kräfte möglich. Dies ist wahrscheinlich auch ein weiterer Grund für die im Vergleich zu **KM2** und **KM3** reduzierte Permeabilität von **KM1** für den Arzneistoff Diclofenac-Na. Die Wechselwirkungen sind nicht nur zwischen den Molekülen, die die lamellaren Strukturen bilden, möglich, sondern beeinflussen auch die Diffusion von Molekülen in der Lamellarphase durch starke Attraktions- und Repulsionskräfte. Eine verringerte Diffusionsgeschwindigkeit insbesondere für geladene Moleküle ist die Folge. Folglich sind die Permeationsbedingungen in **KM1** mit den Bedingungen innerhalb der Stratum corneum Lipide nicht vergleichbar. Dies bestätigt sich auch bei den Permeationsuntersuchungen mit dem Arzneistoff Ibuprofen-Lys, bei denen für **KM1** eine höhere Permeabilität beobachtet wurde. Dies steht im Gegensatz zu der mit exzidiertem Stratum corneum ermittelten Permeabilität für Ibuprofen-Lys und kommt höchstwahrscheinlich ebenfalls durch die zum Stratum corneum unterschiedlichen polaren Grenzflächen zustande.

5.2.3 Beurteilung der Modellmischungen KM1-KM3 und des Permeationsmodells als in vitro Modell für transdermale Transportprozesse

Alle drei in vitro Stratum corneum Modell Lipid Systeme sind hauptsächlich aus Assoziaten in lamellarer Anordnung aufgebaut. Die Netzebenenabstände liegen bei den Modell

Mischungen im Bereich der Literaturdaten der für humanes Stratum corneum angegebenen Abstände. Die für **KM3** ermittelte Schichtdicke von 6,4 nm stimmt mit Angaben von Bouwstra [1991a,b] überein. Durch den Ersatz des phospholipidhaltigen Ceraderm S[®] durch Ceramid Typ IV in **KM3** ist außerdem ein endothermer Phasenübergang zu detektieren, der mit dem Verhalten extrahierter Stratum corneum Lipide zu vergleichen ist. Bei der Untersuchung der Wechselwirkungen mit dem Modellarzneistoff Diclofenac-Na ist der fluidisierende Effekt des Diclofenac-Na auf die Stratum corneum Lipide nachweisbar wie er auch bei exzidiertem Stratum corneum beobachtet wurde. Das in vitro Modell **KM3** reagiert also ähnlich auf den Arzneistoff wie die Lipide des Stratum corneum. Bei den Permeationsuntersuchungen mit dem Permeationmodell zeigt die Matrix zudem für die ausgewählten Modellarzneistoffe Diclofenac-Na, Ibuprofen-Lys und Hydrocortison ein mit dem Stratum corneum vergleichbares Verhalten.

Die für die jeweiligen Arzneistoffe berechneten Permeationskoeffizienten liegen zwar höher als die Stratum corneum Daten, sind aber niedriger als die an Hautzellkulturen ermittelten Werte. Ein direkter Vergleich der Permeabilitätsdaten von exzidiertem Stratum corneum mit den an Lipidmischungen erhaltenen Daten muß allerdings aufgrund anderer geometrischer Verhältnisse kritisch beurteilt werden. Für humanes Stratum corneum gelten folgende Überlegungen:

- Der Aufbau des Stratum corneum ähnelt dem einer Mauer, wobei die Korneozyten als relativ impermeabel angesehen werden. Die Permeation durch das Stratum corneum findet demnach vorzugsweise durch die interzelluläre Lipidsubstanz statt, so daß der Permeationsweg länger als die effektive Dicke des Stratum corneum ist. Die Dicke des Stratum corneum beträgt im trockenen Zustand durchschnittlich 10 bis 15 µm, im vollhydratisierten Zustand also auch bei Permeationsuntersuchungen etwa 40 µm [Scheuplein 1967]. Der modellhaft berechnete Permeationsweg ist nach Albery und Hadgraft [1979] 340 µm und nach Potts und Guy [1993] 500 µm lang.
- Die effektive Diffusionsfläche, also die Querschnittsfläche der interzellulären Matrix des Stratum corneum ist geringer als die Gesamtquerschnittsfläche, die im allgemeinen für die Berechnung des Flux und damit auch des Permeationskoeffizienten herangezogen wird.
- der Volumenanteil der Stratum corneum Lipide am Gesamtvolumen beträgt etwa 10-30%, nach Raykar et al. [1988] nur 1%

Bei der Permeation durch in vitro Modell Lipid Systeme in dem entwickelten Permeationsmodell steht im Gegensatz dazu eine größere Permeationsfläche zur Verfügung.

Dies wird in gewissem Umfang durch einen von der Dicke des Trägers (0,8 mm) und der hydrophoben Membran (0,1mm) abhängigen längeren Permeationsweg ausgeglichen. In diesem Fall beträgt der Permeationsweg etwa 1000 µm und ist damit etwa doppelt so lang wie der von Potts berechnete Weg.

Berücksichtigt man allerdings zusätzlich, daß die Permeation durch das Gesamtvolumen der in dem Träger befindlichen Lipide stattfindet, so erklärt sich die höhere Permeabilität des Systems für die Modellarzneistoffe.

Der Einsatz von Matrix **KM3** in dem entwickelten einfachen Permeationsmodell erscheint damit sinnvoll und weist einige Vorteile gegenüber der Verwendung von exzidiertem Stratum corneum auf:

- Das in vitro Modell Lipid Systems **KM3** besitzt eine definierte Zusammensetzung und weist reproduzierbare physikochemische Eigenschaften auf, die mit den Eigenschaften von Stratum corneum Lipiden trotz des Fehlens einiger Ceramid Fraktionen vergleichbar sind.
- Das System kann bedarfsmäßig hergestellt werden, so daß Permeationsuntersuchungen unabhängig von Hautspenden erfolgen können.
- Die Permeation mit dem einfachen Permeationsmodell ist standardisierbar und kann unter physiologischen Bedingungen erfolgen.
- Die Schwankungsbreite bei den Permeationsuntersuchungen ist geringer als bei Untersuchungen mit exzidiertem Stratum corneum. Bei der Permeation mit den Modellarzneistoffen durch das in vitro Modell **KM3** liegen die relativen Standardabweichungen für Diclofenac-Na bei $\pm 10,6\%$, für Ibuprofen-Lys $\pm 23,2\%$ und für Hydrocortison bei $\pm 6,5\%$.
- Neben den Permeationsuntersuchungen können Interaktionen topisch applizierter Substanzen mit dem Modell System anhand anderer Methoden wie DSC und SAXD verfolgt werden.

Die hier durchgeführten Überlegungen sollten allerdings mit Einschränkungen gelten, da auf jeden Fall eine Validierung des Systems mit anderen topisch applizierbaren Arzneistoffen notwendig ist.

Weiterhin können nicht alle Aspekte der Hautpermeation bei der Verwendung des Permeationsmodells untersucht werden. Dazu gehören unter anderem Metabolisierungsprozesse wie sie für verschiedene Steroide und Nitroglycerin beobachtet werden [Hotchkiss 1998].

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden in vitro Modell Lipid Systeme für die Stratum corneum Lipide und der Einfluß einzelner Komponenten auf die Mikrostruktur der Systeme untersucht. Die Zusammensetzung der Systeme lehnte sich dabei an die von Häusler [1994] verwendeten Mischungen an, die hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften weiter charakterisiert wurden. Ausgehend von einem Grundsystem (**M1**), das aus einer Mischung ungesättigter Fettsäuren bestand, wurde dieses Modell systematisch erweitert, indem weitere Komponenten wie gesättigte Fettsäuren, Cholesterol und Ceramide in Form von Ceraderm S[®] hinzugesetzt wurden (**M2-M7**). Im Hinblick auf den pH-Wert und den Wassergehalt innerhalb des Stratum corneum wurden 41% der Fettsäuren neutralisiert und 32% Wasser zugesetzt. Die physikochemische Untersuchung der Modell Lipid Systeme **M1-M7** ergab, daß es sich bei den Mischungen um zweiphasige Systeme handelt, die aus röhrenförmigen Assoziaten in hexagonaler Anordnung sowie lamellaren Mesophasen in jeweils unterschiedlichen Anteilen bestehen. Bei der hexagonalen Struktur wird aufgrund der Packungsparameter der enthaltenen Moleküle eine inverse Anordnung vermutet.

Das Grundsystem aus UFS erweist sich abweichend zu Häusler als hauptsächlich invers hexagonal. Bei einem Zusatz von Cholesterol und Ceramiden sind zunehmend lamellare Strukturen zu detektieren. GFS führen zu der Bildung geordneter Bereiche innerhalb der Systeme, die gelartigen Charakter aufweisen. Für Cholesterol wird sowohl der fluidisierende Einfluß auf geordnete Strukturen als auch der ordnende Effekt auf flüssige Bestandteile nachgewiesen. Durch Ceraderm S[®] kann zwar auch die Ausbildung lamellarer Bereiche beobachtet werden, die Systeme enthalten aber immer noch invers hexagonale Strukturen.

In dem Komplettsystem aus UFS, GFS, Cholesterol und Ceraderm S[®] (**KM1**) dominiert dagegen eine lamellare Mikrostruktur, wobei das thermische Verhalten des Systems nicht mit dem in der Literatur beschriebenen Verhalten extrahierter Stratum corneum Lipide vergleichbar ist. Da ein störender Einfluß der in dem Ceraderm S[®] enthaltenen Phospholipide vermutet wurde, wurde das Ceramid durch zwei andere Ceramid Typen ersetzt (**KM2** und **KM3**) und die Mikrostruktur der jeweiligen Systeme untersucht. In beiden in vitro Modellen liegt ein rein lamellares System vor. Die Ergebnisse der physikochemischen Charakterisierung belegen allerdings, daß ein einziges Ceramid (Ceramid III), das nur aus einer Sphingosinbase und der in Amidbindung verknüpften Fettsäure besteht, nicht in der Lage ist, ein lamellares System mit zu den Stratum corneum Lipiden vergleichbaren Eigenschaften zu bilden (**KM2**). Das in vitro Modell Lipid System **KM3**, in dem ein Ceramid

Gemisch mit unterschiedlichen Kettenlängen verwendet wurde (Ceramid Typ IV) zeigt dagegen sowohl hinsichtlich des Netzebenenabstandes der Lamellarphase von 6,4 nm als auch durch einen endothermen Phasenübergang bei 60°C zu den Stratum corneum Lipiden vergleichbare physikochemische Eigenschaften. Anhand dieser Mischung konnte außerdem der fluidisierende und zugleich störende Einfluß der Phospholipide aufgezeigt werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte ein einfaches Permeationsmodell entwickelt werden, um die Barriereigenschaften der Stratum corneum Modell Lipidmischungen und den Effekt der zugesetzten Bestandteile auf die Permeabilität der Systeme zu untersuchen.

Das realisierte Modell besteht aus einer Siebscheibe mit definierten Abmessungen, in die die zu untersuchende Lipidmatrix eingestrichen wird, um reproduzierbare Permeationsflächen und -dicken zu erhalten. Zur Vermeidung einer übermäßigen Hydratation während der Permeationsuntersuchungen wird der Träger sowohl zum Akzeptor als auch zum Donator hin mit einer silikonisierten Dialysemembran abgedichtet und für die anschließenden Permeationsuntersuchungen in eine modifizierte Franz-Zelle eingespannt.

Mit allen Modell Mischungen wurden Permeationsstudien durchgeführt, wobei eine 0,5% ige wäßrige Diclofenac-Na Lösung als Donator diente.

Die Permeationsuntersuchungen mit dem Modellarzneistoff zeigen, daß keine Korrelation zwischen der Permeabilität der einzelnen Mischungen und den ermittelten Viskositäten vorliegt, sondern daß sich die Barriereigenschaften mit den zugesetzten Bestandteilen verändern. Das Grundsystem aus UFS bzw. zeigt die höchste Permeabilität für den Arzneistoff, die sich auch durch Zusatz von GFS nicht verändert. Dagegen verbessert sowohl Cholesterol als auch der Ceramid Zusatz die Barriereigenschaften der Systeme. Die geringste Permeabilität weist **M4** auf, die sich von **KM1** nur durch die fehlenden GFS unterscheidet. Hier liegt der ermittelte Permeationskoeffizient für den Arzneistoff nur um den Faktor 3,5 höher als die Literaturdaten für exzidiertes Stratum corneum. Ein Vergleich der physikochemischen Eigenschaften der Systeme mit den Permeationsdaten zeigt, daß die Permeabilität mit der Mikrostruktur korreliert. Modell Lipid Systeme mit einem erhöhten Anteil invers hexagonaler Strukturen sind für den Modellarzneistoff permeabler als Systeme mit hauptsächlich lamellarem Aufbau.

Die Permeationsuntersuchungen an den Komplettmischungen **KM1-KM3** beweisen außerdem, daß unterschiedliche Ceramid Typen die Barriereigenschaften eines in vitro Modell Lipid Systems beeinflussen. Dabei ist allerdings nicht nur das Vorliegen einer lamellaren Mikrostruktur ausschlaggebend sondern auch die Polarität der durch die Kopfgruppen gebildeten Grenzfläche. Hier können Wechselwirkungen mit diffundierenden

Molekülen auftreten, wodurch deren Diffusionsgeschwindigkeit verringert wird. Dadurch kann die im Vergleich zu **KM2** und **KM3** beobachtete geringere Permeabilität des Modell Systems **KM1** für den Modellarzneistoff Diclofenac-Na trotz des fluidisierenden Einflusses der Phospholipide erklärt werden. Anhand der Modell Lipid Systeme **KM1** und **KM3** wurden mit dem entwickelten Permeationsmodell die Permeabilitäten für Ibuprofen-Lys und für Hydrocortison als weitere topisch applizierte Arzneistoffe bestimmt.

Ein Vergleich der Permeationen mit den Literaturdaten von exzidiertem Stratum corneum ergibt, daß das in vitro Modell **KM3** ein mit dem Stratum corneum hinreichend vergleichbares Verhalten aufweist. Die Permeabilitäten für Diclofenac-Na und Ibuprofen-Lys unterscheiden sich dabei sowohl bei **KM3** als auch beim Stratum corneum unter Berücksichtigung der Schwankungen bei dem Modell als auch der inter- und intraindividuellen Schwankungen der Haut nicht signifikant voneinander. Hydrocortison zeigt bei **KM3** und dem Stratum corneum die geringste Permeationsrate.

Bei **KM1** ist zwar ebenfalls die geringste Permeationsrate für Hydrocortison zu beobachten dagegen aber eine signifikant erhöhte Permeabilität für den Arzneistoff Ibuprofen-Lys, womit dieses System mit dem Stratum corneum nicht vergleichbar ist.

Aufgrund der zu den Stratum corneum Lipiden ähnlichen Eigenschaften wird deshalb das Modell Lipid System **KM3** für den Einsatz als in vitro Modell für die Stratum corneum Lipide vorgeschlagen. Das System weist zwar eine im Vergleich zum Stratum corneum erhöhte Permeabilität für die untersuchten Arzneistoffe auf, was aber durch vom Stratum corneum Aufbau abweichende geometrische Bedingungen in dem Permeationsmodell erklärt werden kann. Da das Lipid System zudem bei Interaktionsstudien mit dem Modellarzneistoff Diclofenac-Na wie das Stratum corneum mit einer Fluidisierung reagierte, können mit dem Modell Lipid System sowohl Permeationsstudien durchgeführt als auch mögliche Interaktionen topisch applizierter Arzneistoffe anhand anderer physikochemischer Charakterisierungsmethoden verfolgt werden.

7 Literaturverzeichnis

Abraham, W., Wertz, P. W., Landmann L., Downing D. T. Stratum corneum lipid liposomes: calcium-induced transformation into lamellar sheets. *J. Invest. Dermatol.* 88, 212-214 (1987)

Abraham, W., Downing D. T. Preparation of model membranes for skin permeability studies using stratum corneum lipids. *J. Invest. Dermatol.* 93, 809-813 (1989)

Abraham, W., Downing, D. T. Deuterium NMR investigation of polymorphism in stratum corneum lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1068, 189-194 (1991)

Abraham, W. Structures formed by epidermal lipids in vitro. *Sem. Dermatol.* 11, 121-128 (1992)

Albery, W. J., Hadgraft, J. Percutaneous absorption: In Vivo experiments. *J. Pharm. Pharmacol.* 140-147 (1979)

Aungst, B. J., Rogers, N. J., Shefter, E. Enhancement of naloxone penetration through human skin in vitro using fatty acids, fatty alcohols, surfactants, sulfoxides and amines. *Int. J. Pharm.* 33, 225-235 (1986)

Barry, B. W., El Eini, D. D. Influence of non-ionic surfactants on permeation of hydrocortisone, dexamethasone, testosterone and progesterone across cellulose acetate membrane. *J. Pharm. Pharmacol.* 28, 219-227 (1976)

Barry, B. W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *J. Contr. Rel.* 6, 85-97 (1987)

Barry, B. W. Action of skin penetration enhancers-the lipid protein partitioning theory. *Int. J. Cosmet. Sci.* 10, 281-293 (1988)

Barry, B. W. Lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. *J. Contr. Rel.* 15, 237-248 (1991)

Barry, B. W. Skin penetration enhancers- the chemical approach. In: Gurny, R. und Teubner, A. (Hrsg.), *Dermal and transdermal drug delivery*, WVGmbH Stuttgart, 199-128 (1993)

Beastall J. C., Hadgraft, J., Washington, C. Mechanism of action of azone as a percutaneous penetration enhancer: Lipid bilayer fluidity and transition temperature effects. *Int. J. Pharm.* 43, 207-213 (1988)

Bell, E., Ehrlich, H. P., Gay, R., Nolte, C., Kemp, P., Bilbo, P., Ekstein, B., Johnson, E. The living skin equivalent: its manufacture, its organotypic properties and its response to irritants. *Toxic. in vitro* 5, 591-596 (1991)

Berner, B., Liu, P. Alcohols. In: Smith, E. W., Maibach, H. I. (Hrsg.), *Percutaneous penetration enhancers*, CRC Press Boca Raton, 45-77 (1995)

- Boddé, H. E., van der Brink, I., Korten, H. K., de Haan, F. H. N.** Visualization of in vitro percutaneous penetration of mercuric chlorid; transport through intercellular space versus cellular uptake through desmosomes. *J. Control. Rel.* 15, 227-236 (1991)
- Bonina, F. P., Crelli, V., Di Colo, G., Montenegro L., Nannipieri, E.** Vehicle effects on in vitro permeation and stratum corneum affinity for model drugs caffeine and testosterone. *Int. J. Pharm.* 100, 41-48 (1993)
- Bonté, F., Pinguet, P. Saunois, A., Meybeck, A., Beugin, S., Ollivon, M., Lesieur, S.** Thermotropic phase behaviour of in vivo extracted human stratum corneum lipids. *Lipids* 32, 653-660 (1997)
- Bowser, P. A., White R. J.** Isolation, barrier properties and lipid analysis of stratum compactum, a discrete region of the stratum corneum. *Brit. J. Dermatol.* 112, 1-14 (1985)
- Bowser, P. A., White R. J., Nugteren D. H.** Location and nature of the epidermal permeability barrier. *Int. J. Cosmet. Science* 8, 125-134 (1986)
- 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.* 97, 1005-1012 (1991a)
- Bouwstra, J. A., de Vries, M. A., Gooris, G. S., Bras, W., Brussee, J., Ponec, M.** Thermodynamic and structural aspects of the skin barrier. *J. Contr. Rel.* 15, 209-220 (1991b)
- Bouwstra, J. A., Gooris, G. S., Salomons-de Vries, M. A., van der Spek, J. A., Bras, W.** Structure of human stratum corneum as a function of temperature and hydration: A wide angle X-ray diffraction study. *Int. J. Pharm.* 84, 205-216 (1992)
- Bouwstra, J. A., Gooris G. S., Weerheim A., Kempenaar, J., Ponec, M.** Characterization of stratum corneum structure in reconstructed epidermis by X-ray diffraction. *J. Lipid Res.* 36, 496-504 (1995)
- Bouwstra, J. A., Gooris G. S., Cheng, K., Weerheim A., Bras, W., Ponec, M.** Phase behaviour of isolated skin lipids. *J. Lipid Res.* 37, 999-1011 (1996a)
- Bouwstra J. A., Cheng K. S., Gooris G. S., Weerheim A.,Ponec M.** The role of ceramides 1 and 2 in the stratum corneum lipid organisation. *Biochim. Biophys. Acta* 1300, 177-186 (1996b)
- Bouwstra, J. A.** The skin barrier, a well-organized membrane. *Colloids and Surfaces* 123, 403-413 (1997)
- Bouwstra, J. A., Gooris G. S., Dubbelaar F. E., Weerheim A. M., Ijzerman A. P., Ponec M.** Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids. *J. Lipid Res.* 39, 186-196 (1998a)
- Bouwstra, J. A., Gooris G. S., Dubbelaar F. E., Weerheim A. M., Ponec M.** PH, cholesterol sulfate and fatty acids affect the stratum corneum lipid organization. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 3, 69-74 (1998b)

- Bouwstra, J. A., Gooris G. S., Dubbelaar F. E., Ponc M.** Cholesterol sulfate and calcium affect stratum corneum lipid organization over a wide temperature range. *J. Lipid Res.* 40, 2303-2312 (1999)
- Brod, J.** Characterization and physiological role of epidermal lipids. *Int. J. Dermatol.* 30, 84-90 (1991)
- Brown, G. H.** Liquid crystals and their role in inanimate and animate systems. *Am. Sci.* 60, 64-73 (1972)
- Caffrey, M.** Kinetics and mechanism of the lamellar gel/lamellar liquid-crystal and lamellar/inverted hexagonal phase transition in phosphatylethanolamine: a real-time X-ray diffraction study using synchrotron radiation. *Biochemistry* 24, 4826-4844 (1985)
- Chapman, D.** Physicochemical properties of phospholipids and lipid-water systems. In: Gregoriadis, G. (Hrsg.), *Liposome Technology*, Bd.1 CRC Press, Boca Raton, 1-18 (1984a)
- Chapman, D., Benga, G.** Biomembrane fluidity- Studies of model and natural biomembranes. In: Chapman. D. (Hrsg.), *Biological Membranes*, Bd. 5, Academic Press, London und New York, 1-50 (1984b)
- Cistola, D. P.** Acid Soaps: The phase behaviour of anhydrous and hydrated 1:1 potassium hydrogen dioleate. *J. Am. Oil. Chem.* 60, 731 (1983)
- Cornwell, P. A., Barry, B. W., Stoddart, C. P., Bouwstra, J. A.** Wide-angle X-ray diffraction of human stratum corneum: effects of hydration and terpene enhancer treatment. *J. Pharm. Pharmacol.* 46, 938-950 (1994)
- Cornwell, P. A., Barry, B. W.** Effect of penetration enhancers treatment on the statistical distribution of human skin permeabilities. *Int. J. Pharm.* 117, 101-112 (1995)
- Craven B. M.** Cholesterol crystal structures. In: Small, D. M., *The physical chemistry of lipids*. Plenum Press, New York und London, 149-182 (1986)
- Crowe, J. H., Crowe, L. M.** Effects of dehydration on membranes and membrane stabilization at low water activities, In: Chapman. D. (Hrsg.), *Biological Membranes*, Bd. 5, Academic Press, London und New York, 58-103 (1984)
- Curatolo, W., Jungalwala, F. B.** Phase behaviour of galactocerebroside from bovine brain. *Biochemistry* 24, 6608-6613 (1985)
- De Han, F. H. N., Boddé, H. E., de Bruijn, W. C., Ginsel, L. A., Junginger, H. E.** Visualizing drug transport across stratum corneum: cryotechniques, vapor fixation, autoradiography. *Int. J. Pharm.* 56, 75-86 (1989)
- Demus, D., Richter, L.** Textures of liquid crystals. Verlag Chemie (1978)
- DAB 9** Kommentar, Deutsches Arzneibuch, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart & Govi Verlag GmbH, Frankfurt am Main, 1986
- DiSapio, A.** The evolving role of silicones: versatile alternatives to hydrocarbons

Soap Cosmetics Chemical Specialities Sept., 50-58 (1994)

Elias, P. M., Goerke, J., Friend, D. S. Mammalian epidermal barrier layer lipids: composition and influence on structure. *J. Invest. Dermatol.* 69, 535-546 (1977)

Elias, P. M., Brown B. E., Ziboh, V. A. The permeability barrier in essential fatty acid deficiency: evidence for direct role for linoleic acid in barrier function. *J. Invest. Dermatol.* 74, 230-233 (1980)

Elias, P. M. Epidermal lipids, membranes, and keratinization. *Int. J. Dermatol.* 20, 1-19 (1981)

Elias, P. M. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J. Invest. Dermatol.* 80, 44s-49s (1983)

Elias, P. M. The importance of epidermal lipids for the stratum corneum barrier. In: Osborne, D.W., Amann, A.H. (Hrsg.), *Topical drug delivery formulations*, Marcel Dekker, Inc., New York und Basel, 13-28 (1990)

Engblom, J., Engström, S. Azone and the formation of reversed mono- and bicontinuous lipid-water phases. *Int. J. Pharm.*, 173-179 (1993)

Fairhurst, C. E., Fuller, S., Gray, J., Holmes, M. C., Tiddy, G. J. T. Lyotropic surfactant liquid crystals. In: Demus, D., Goodby, J., Gray, G. W., Spiess, H.-W., Vill, V. (Hrsg.), *Handbook of liquid crystals Vol. III*, Wiley-Vch, Weinheim, 341-392 (1998)

Faustino, E. P. R., Cabral Marques, H. M., Morais, J. A., Hadgraft, J. Comparison of different models for the in vitro release of topical dosage forms. In: Brain, K. R., James, V. J., Walters, K. A. (Hrsg.), *Prediction of percutaneous penetration. Vol. 4b*, STS Publishing, Cardiff, 294-398 (1996)

Firestone, B. A., Guy R. H. Approaches to the prediction of dermal absorption and potential cutaneous toxicity. In: Goldberg A. M. (Hrsg.), *Alternative methods in toxicology: In vitro toxicology*. Mary Ann Liebert, New York, 517-538 (1985)

Flynn, G. C., Yalkowsky, S. H., Rosemann, T. J. Mass transport phenomena and models: Theoretical concepts. *J. Pharm. Sci.* 63, 479-509 (1974)

Fontell, K., Mandell, L., Ekwall, P. Some isotropic mesophases in systems containing amphiphilic compounds. *Acta Chem. Skand.* 22, 3209-3223 (1968)

Franz, T. J. Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. *J. Invest. Dermatol.* 64, 190-195 (1975)

Friberg, S. E., Osborne, D. W., Tombridge, T. L. X-ray diffraction study of human stratum corneum. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 36, 339-354 (1985a)

Friberg, S. E., Osborne, D. W. Small angle X-ray diffraction patterns of stratum corneum and a model structure for its lipids. *J. Disp. Sci. Technol.* 6, 485-495 (1985b)

- Friberg, S. E., Suhaimi, H., Goldsmith, L. B.** Stratum corneum lipids in a model structure. *J. Disp. Sci. Technol.* 9, 371-389 (1988)
- Friberg, S. E., Kayali, I.** Direct role of linoleic acid in barrier function. Effect of linoleic acid on the crystalline structure of oleic acid/oleate model stratum corneum lipid. *J. Disp. Sci. Technol.* 11, 31-47 (1990)
- Friberg, S. E., Zhu-Ning Ma, Curtis, H.** Stratum corneum lipids, petrolatum and white oils, *Cosmet. Toilet.* 108, 55-59 (1993)
- Friend, D., Catz, P., Heller, J., Reid, J., Baker, R.** Transdermal delivery of levonorgestrel: I. Alkanols as permeation enhancers in vitro. *J. Control. Release* 7, 243-250 (1988)
- Fritsch, P:** *Dermatologie*, Springer Verlag (1990)
- Froebe, C. L., Simion, F. A., Ohlmeyer, H., Rhein, L. D., Mattai, J., Cagan, R. H. Friberg, S. E.** Prevention of stratum corneum lipid phase transitions in vitro by glycerol- An alternative mechanism for skin moisturization. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 41, 51-65 (1990)
- Garson, J.-C., Doucet, J., Lévêque, J.-L., Tsoucaris, G.** Oriented structure in human stratum corneum revealed by X-ray diffraction. *J. Invest. Dermatol.* 96, 43-49 (1991)
- Gay, C. L., Guy, R. H., Golden, G. M., Mak, V. H. W., Francoeur, M. L.** Characterization of low temperature lipid transitions in human stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 103, 233-239 (1994)
- Ghyzy, M. Niemann, R.** Nattermann Phospholipid GmbH. Wissenschaftliche Publikation Nr. 1, Haut und Liposomen, (1992)
- Golden, G. M., Guzek, D. B., Harris, R. R., McKie, J. E., Potts, R. O.** Lipid thermotropic transitions in human stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 86, 255-259 (1986)
- Golden, G. M., McKie, J. E., Potts, R. O.** Role of stratum corneum fluidity in transdermal drug flux. *J. Pharm. Sci.* 76, 25-28 (1987)
- Grayson, S., Elias P. M.** Isolation and lipid biochemical characterization of stratum corneum membrane complexes: Implications for the cutaneous permeability barrier. *J. Invest. Dermatol.* 128-135 (1982)
- Gregoriades, G.** *Liposome technology*, Vol I-III, CRC Press, Boca Raton, (1993)
- Grimnes, S.** Pathways of ionic flow through human skin in vivo. *Acta derm. Venereol.* 64, 93-98 (1984)
- Hadgraft, J.** Structure activity relationships and percutaneous absorption. *J. of controlled. Rel.* 15, 221-226 (1991)
- Häusler, P.** Beeinflussung der Mikrostruktur einer flüssigkristallinen fenoprofenhaltigen Zubereitung durch ausgewählte Lipide des Stratum corneum. Dissertation Philipps-Universität Marburg (1994)

- Hansen, H. S., Jensen, B.** Essential function of linoleic acid esterified in acylglucosylceramide and acylceramide in maintaining the epidermal permeability barrier. Evidence from feeding studies with oleate, linoleate, arachidonate, colombine and α -linoleate. *Biochim. Biophys. Acta*, 834, 357-363 (1985)
- Harada, K. Murakami, T., Yata, N., Yamamoto, S.** Role of intercellular lipids in stratum corneum in the percutaneous permeation of drugs. *J. Invest. Dermatol.* 99, 278-282 (1992)
- Hedberg, C. L., Wertz, P. W., Downing D. T.** The time course of lipid biosynthesis in pig epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 91, 169-174 (1988)
- Heering, W.** Die Struktur des Gelgerüsts der Wasserhaltigen Hydrophilen Salbe DAB 8 - Anwendung der Gefrierbruchätztechnik und TEM auf kolloide pharmazeutische Zubereitungen, Dissertation, TU Braunschweig 1985
- Hiltrop, K.** Lyotrope Flüssigkristallphasen mizellarer Tensidlösungen. In: Stegemeyer, H. (Hrsg.), *Lyotrope Flüssigkristalle: Grundlagen, Entwicklung Anwendung*. Steinkopff Verlag, Darmstadt, 25-58 (1999)
- Hotschkiss, S. A. M.** Dermal metabolism. In: Roberts, M., Walters, K. A. (Hrsg.), *Dermal absorption and toxicity assessment*. Marcel Dekker, Inc., New York, 43-101 (1998)
- Hou, S. Y. E., Mitra, A. K., White S. H., Menon, G. K., Ghadially, R., Elias, P. M.** Membrane structures in normal and essential fatty acid-deficient stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 96, 215-223 (1991)
- Israelachvili, J. N., Mitchel, D. J., Ninham, B. W.** Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 470, 185-201 (1977)
- Jacobsohn, M. K., Bazillian, L. S., Hardiman J, Jacobsohn, G. M.** Effect of pH on the affinity of phospholipids for cholesterol. *Lipids* 24, 375-382 (1989)
- Jäckle, E.** Stratum corneum analoge Lipidmischungen als Diffusionsmedien, ihre Eigenschaften und deren Beeinflussung durch Salbengrundlagen. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität des Saarlandes, Saarbrücken (1996)
- Junqueira, L. C., Carneiro, J.** *Histologie*, Springer-Verlag, Berlin (1991)
- Kalbitz, J., Neubert, R., Wohrab, W.** Modulation der Wirkstoffpenetration in die Haut. *Pharmazie* 51, 619-637 (1996)
- Kastings G. B., Filloon, T. G., Francis, W. R., Meredith, M. P.** Improving the sensitivity of in-vitro skin penetration experiments. *Pharm. Res.* 11, 1747-1754 (1994)
- Kékicheff, P., Grabielle-Madelmont, C., Ollivan, M.** Phase diagram of sodium dodecyl sulfate-water system. *J. Colloid. Interface Sci.* 131, 112-131 (1989)
- Kitson, N., Thewalt, J., Lafleur, M., Bloom, M.** A model membrane approach to the epidermal permeability barrier. *Biochemistry* 3, 6707-6715 (1994)

- Kligman, A. M., Christophers, E.** Preparation of isolated sheets of human stratum corneum. Arch. Dermatol. 88, 702-705 (1964)
- Klimisch, H. M.** Personal care applications, in: The analytical chemistry of silicones, Smith, A. L. (Hrsg.), Wiley-Interscience, New York, 117-132 (1991)
- Konjer, U., Helmholtz, F.** Permeationsverhalten unterschiedlich silikonisierter Dialysemembranen, Seminararbeit WS 1998/1999, TU Braunschweig
- Kriwet, K., Müller-Goymann, C. C.** Diclofenac release from phospholipid drug systems and permeation through excised human stratum corneum. Int. J. Pharm. 125, 231-242 (1995)
- Kriwet, K.** Diclofenac-Diethylamin und seine Assoziante mit Phospholipiden: Charakterisierung der Systeme und Einfluß auf Struktur und Permeabilität humanen Stratum corneums, Dissertation, TU Braunschweig (1994)
- Ladbrooke, B. D., Chapman, D.** Thermal analysis of lipids, proteins and biological membranes. A review and summary of some recent studies. Chem. Phys. Lipids 3, 304-367 (1969)
- Lampe, M. A., Williams, M. L., Elias, P. M.** Human epidermal lipids: characterization and modulations during differentiation. J. Lip. Res. 24, 131-140 (1983)
- Lampe, M. A., Williams, M. L., Elias, P. M.**
Human stratum corneum lipids characterization and regional variations. J. Lip. Res. 24, 120-130 (1983)
- Landmann, L.** Epidermal permeability barrier: transformation of lamellar granule-disks into intercellular sheets by a freeze fracture study. J. Invest. Dermatol. 87, 202-209 (1986)
- Landmann, L.** Die Permeabilitätsbarriere der Haut, Pharmazie in unserer Zeit 4, 155-163 (1991)
- Leaver, M., Holmes, M.** A small angle neutron scattering study of the lamellar and nematic phases of cesium pentadecafluoro-octanoate. J. Phys. II France 3, 105-120 (1993)
- Levine B., Caplan Y. H.** Simultaneous liquid-chromatography of five nonsteroidal anti-inflammatory drugs in plasma or blood. Clin. Chemistry 31 (2), 346 (1985)
- Lieckfeldt, R., Lee, G.** Measuring the diffusional pathlength and area within membranes of excised human stratum corneum. J. Pharm. Pharmacol. 47, 26-29 (1994)
- Lieckfeldt, R.** Bedeutung von Lipidzusammensetzung und interner Morphologie des Stratum corneums für seine Barriereigenschaften, Dissertation Heidelberg (1993)
- Lindblom, G., Rilfors, L.** Cubic phase and isotropic structures formed by membrane lipids-possible biological relevance. Biochim. Biophys. Acta 988, 221-256 (1989)
- Loomis, C. R., Shipley, G. G., Small, D. M.** The phase behaviour of hydrated cholesterol. J. Lipid Res. 20, 525-535 (1979)

- Loth, H** Grundlagen des intra- und transdermalen Transports von Arzneistoffen, *Acta Pharm. Technol.* 32, 109-114 (1986)
- Lowe, N. J., Stoughton, R. B.**, Essential fatty acid deficient hairless mouse: a model of chronic epidermal hyperproliferation. *Br. J. Dermatol.* 96, 155-162, (1977)
- Luzatti, V., Mustacchi, H., Skoulios, A., Husson, F.** La structure des colloides d'association. I. Les phases liquide-cristallines des systèmes amphiphile-eau. *Acta Cryst.* 13, 660-667 (1960)
- Luzatti, V.** X-ray diffraction of lipid-water systems. In: Chapman D. (Hrsg.), *Biological membranes*, Academic press, London und New York, 71-123 (1968)
- Mackenzie, I. C.** An examination of cellular organization within the stratum corneum by a silver staining method. *J. Invest. Dermatol.* 61, 245-250 (1973)
- Madison K. C., Swartzendruber, D. C. Wertz, P. W.** Presence of intact intercellular lamellae in the upper layer of the stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 88, 714-718 (1987)
- Maibach, H. I., Feldmann, R. J., Milby, T. H., Serat, W. F.** Regional variations in percutaneous absorption in man. *Arch. Env. Health* 23, 208-211 (1971)
- Mak, V. H. W., Potts, R. O., Guy, R. H.** Does hydration affect intercellular lipid organization in the stratum corneum? *Pharm. Res.* 8, 1064-1065 (1991)
- Maltotsy, A.G., Downes, A. ., Sweeney T. M.** Studies of the epidermal water barrier. Part II. Investigation of the chemical nature of the water barrier. *J. Invest. Dermatol.* 50, 19-26 (1968)
- Marsh, D., Seddon, J. M.** Gel-to-inverted hexagonal phase transitions in phosphatidylethanolamines and fatty acid-phosphatidylcholine mixtures, demonstrated by ³¹P-NMR spectroscopy and X-ray diffraction. *Biochim. Biophys. Acta* 690, 117-123 (1982)
- Matsuzaki, K., Imaoka, T., Asano, M., Miyajima, K.** Development of a model membrane system using stratum corneum lipids for estimation of drug skin permeability. *Chem. Pharm. Bull.* 41, 575-579 (1993)
- Mattai, J., Froebe, C. L., Rhein, L. D., Simion, F. A., Ohlmeyer, H., Su, S. T., Friberg, S. E.** Prevention of model stratum corneum lipid phase transitions in vitro by cosmetic additives-differential scanning calorimetry, optical microscopy, and water evaporation studies. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 44, 89-100 (1993)
- McElhaney, R. N.** The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* 30, 229-259 (1982)
- McIntosh; T. J., Stewart, M.E., Downing, D. T.** X-ray diffraction analysis of isolated skin lipids: reconstitution of intercellular lipid domains. *Biochemistry* 35, 3649-3653 (1996)
- Merck Index** Merck & Co., Inc. Rahway, N.J., USA, 10. Auflage 1983

Moghimi H. R., Williams A. C., Barry B. W. A lamellar matrix model for stratum corneum intercellular lipids. I. Characterization and comparison with stratum corneum intercellular structure. *Int. J. Pharm.* 131, 103-115 (1996a)

Moghimi H. R., Williams A. C., Barry B. W. A lamellar matrix model for stratum corneum intercellular lipids. II. Effect of geometry of the stratum corneum on permeation of model drugs 5-fluorouracil and oestradiol. *Int. J. Pharm.* 131, 117-129 (1996b)

Moghimi H. R., Williams A. C., Barry B. W. A lamellar matrix model for stratum corneum intercellular lipids. III. Effects of terpene enhancers on the release of 5-fluorouracil and oestradiol from the matrix. *Int. J. Pharm.* 145, 37-47 (1996c)

Moghimi H. R., Williams A. C., Barry B. W. A lamellar matrix model for stratum corneum intercellular lipids. IV. Effects of terpene enhancers on the permeation of 5-fluorouracil and oestradiol through the matrix. *Int. J. Pharm.* 145, 49-59 (1996d)

Moghimi H. R., Williams A. C., Barry B. W. A lamellar matrix model for stratum corneum intercellular lipids. V. Effects of terpene enhancers on the structure and behaviour of the matrix. *Int. J. Pharm.* 146, 41-54 (1997)

Montes, L. F., Day, J. L., Wand, C. J., Kennedy, L. Ultrastructural changes in the horny layer following local application of DMSO on guinea pig skin. *J. Invest. Dermatol.* 48, 184-189 (1967)

Motta, S., Monti, M., Sesana, S., Melessi, L., Ghidoni, R., Caputo, R. Abnormality of water barrier function in psoriasis. *Arch. Dermatol.* 130, 452-456 (1994)

Müller-Goymann, C. C. Flüssigkristalline Strukturen in topischen Zubereitungen und ihre Wechselwirkungen mit Arzneistoffen. Habilitationsschrift, Technische Universität Braunschweig, 1989

Müller-Goymann, C. C. Anwendung lyotroper Flüssigkristalle in Pharmazie und Medizin. In: Stegemeyer, H. (Hrsg.), *Lyotrope Flüssigkristalle: Grundlagen, Entwicklung Anwendung.* Steinkopff Verlag, Darmstadt, 141-167 (1999)

Nastruzzi, C., Esposito, E., Pastesini, C., Gambari, R., Menegatti, E. Comparative study on the release kinetics of methyl nicotinate from topical formulations. *Int. J. Pharm.* 90, 43-50 (1993)

Neubert, R., Bendas, B., Wohlrab, W., Gienau, B., Fürst, W. A multilayer membrane system for modelling drug penetration into skin. *Int. J. Pharm.* 75, 89-94 (1991)

Neubert, R., Wohlrab, W., Bendas, B. Modelling of drug penetration into human skin using a multilayer membrane system. *Skin Pharmacol.* 8, 119-129 (1995)

Nicolaides, N., Fu, H. C., Rice G. R. The skin surface of man compared with those of eighteen species of animals. *J. Invest. Dermatol.* 51, 83-89 (1968)

Odland, G. F. A submicroscopic granular component in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 34, 11-15 (1960)

- Öhman, H., Vahlquist, A.** In vivo studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper epidermis. *Acta Derm. Venereol.* 74, 375-379 (1994)
- Ongpipattanakul, B., Francoeur, M. L., Potts, R. P.** Polymorphism in stratum corneum lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1190, 115-122 (1994)
- Paige, D. G., Morse-Fisher, N., Harper, J. I.** Quantification of stratum corneum ceramides and lipid envelope ceramides in the hereditary ichthyosis. *Br. J. Dermatol.* 131, 23-27 (1994)
- Papantoniou, I., Müller-Goymann, C. C.** Influence of the phase transformation from reverse micellar solution into lamellar liquid crystal on sustained drug release. Part I: Physicochemical characterisation of systems containing either diclofenac acid or diclofenac sodium. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 5 (1), 28-31 (1995)
- Pascher I.** Molecular arrangements in sphingolipids. Conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. *Biochim. Biophys. Acta* 455, 433-451 (1976)
- Pellet, M. A., Watkinson, A. C., Hadgraft, J., Brain, K. R.** An ATR-FTIR investigation of the interactions between vehicles and a synthetic membrane. *Proc. 21. Int. Symp. Contr. Rel. Bioact. Mat.* 439-440 (1994)
- Plewig, G., Marples, R.** Regional differences of cell sizes in human stratum corneum. Part I, *J. Invest. Dermatol.* 34, 13-18 (1970)
- Ponec, M., Wauben-Penris P. J. J., Burger A., Kenpenaar, J., Boddè, H. E.** Nitroglycerin and sucrose permeability as quality marker for reconstructed human epidermis. *Skin Pharmacol.* 3, 126-135 (1990)
- Potts, R. O., Guy, R. H.** Predicting skin permeability. *Pharm. Res.* 9, 663-669 (1992)
- Potts, R. O., Guy, R. H.** The prediction of percutaneous penetration: a mechanistic model. In: Gurny, R., Teubner, A. (Hrsg.) *Dermal and transdermal drug delivery. New insights and perspectives.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 153-160 (1993)
- Prottey C. Hartop P. J., Press M.** Correction of cutaneous manifestations of essential fatty acid deficiency in man by application of sunflower seed oil to the skin. *J. Invest. Dermatol.* 64, 228-234 (1975)
- Pugh, W. J., Roberts, M. S., Hadgraft, J.** Epidermal permeability-penetrant structure relationships: 3. The effect of hydrogen bonding interactions and molecular size on diffusion across the stratum corneum. *Int. J. Pharm.* 138, 149-165 (1996)
- Pugh, W. J.** Relationship between H-bonding of penetrants to stratum corneum lipids and diffusion. In: Bronough, R. E., Maibach, H. I. (Hrsg.) *Percutaneous Absorption,* Marcel Dekker Inc, New York, 177-192 (1999)
- Raykar P. V., Fung, M-C., Anderson, B. D.** The role of protein and lipid domains in the uptake of solutes by human stratum corneum. *Pharm. Res.* 5, 140-150 (1988)

Refai, H. Mueller-Goymann, C. C. Larvated incompatibilities of hydrocortisone cream preparations upon dilution with different cream bases. *Pharmazie* 54, 754-758 (1999)

Refai, H. Unveröffentlichte Ergebnisse, Technische Universität Braunschweig, (1999)

Rieger M. Ceramides: Their promise in skin care. *Cosmetics and Toiletries* 111, 33-45 (1996)

Rosevear, F. B. The microscopy of the liquid crystalline neat and middle phase of soaps and synthetic detergents. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 31, 628-639 (1954)

Rougier, A., Lotte, C., Maibach, H. I. In vivo percutaneous penetration of some organic compounds related to anatomic size in humans: stripping method. *J. Pharm. Sci.* 76, 451-454 (1987)

Ruocco, M. J., Atkinson, D., Small, D. M., Skarjune, R. P., Oldfield, E., Shipley, G. G. X-ray diffraction and calorimetric study of anhydrous and hydrated N-Palmitoylgalactosylsphingosin (Cerebroside). *Biochemistry* 20, 5957-5966 (1981)

Saupe, A. Textures, deformations, and structural order of liquid crystals. *J. Coll. Interf. Sci.* 58, 583-592 (1977)

Scheuplein, R. J. Mechanism of percutaneous absorption II. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration. *J. Invest. Dermatol.* 48, 79-88 (1967)

Scheuplein, R. J., Blank, I. H. Permeability of the skin. *Physiol. Rev.* 51, 702-747 (1971)

Schneeweis, A., Müller-Goymann C. C. In vivo and in vitro diclofenac sodium evaluation after rectal application of soft gelatine capsules enabling application induced transformation (AIT) into a semisolid system of liquid crystals (SSLC) for controlled release. *Pharm. Res.* 1726-1729 (1997)

Schückler, F., Auswirkungen von Azone und DPL auf Struktur und Barriereigenschaften des menschlichen Stratum corneums. Dissertation Heidelberg (1992)

Schütze, W. Diffuse Röntgenkleinwinkelstreuung an kolloidalen Drug Delivery Systemen. Dissertation Technische Universität Braunschweig 1998

Scott, R. C., Walker, M., Dugard, P.H. A comparison of the in vitro permeability properties of human and some laboratory animal skins. *Int. J. Cosmet. Science* 8, 189-194 (1986)

Seddon, J. M. Structure of inverted hexagonal phase and non lamellar phase transition of lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1031, 1-69 (1990)

Shah, J., Atienza, J. M., Duclos, R. I., Rawlings, A. V., Dong, Z., Shipley G. G. Structural and thermotropic properties of synthetic C16:0 (palmitoyl) ceramide: effect of hydration. *J. Lipid. Res.* 36, 1936-1944 (1995a)

Shah, J., Atienza, J. M., Rawlings, A. V., Shipley G. G. Physical properties of ceramides: effect of fatty acid hydroxylation. *J. Lipid Res.* 36, 1945-1955 (1995b)

Silver, B. In: The Physical Chemistry of Membranes, Allen Unwin Inc. & Solomon Press, 33-56 (1985)

Simon M., Green H. Participation of membrane-associated proteins in the formation of the cross-linked envelope of the keratinocyte. *Cell* 36, 827-834 (1984)

Simonetti, O., Hoogstarte, A. J., Bialik, W., Kempenaar, J. A., Schrijvers, A. H., Boddé, H. E., Ponc, M. Visualization of diffusion pathways across the stratum corneum of native and in-vitro-reconstructed epidermis by confocal laser scanning microscopy. *Arch. Dermatol. Res.* 287, 465-473 (1995)

Skelly, J. P., Shah, V. P., Maibach, H. I. FDA and AAPS report of the workshop on principles and practices of in-vitro percutaneous penetration studies: relevance to bioavailability and bioequivalence. *Pharm. Res.* 4, 265-267 (1987)

Small, D. M. A classification of biologic lipids based upon their interaction in aqueous systems. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 95, 108-119 (1968)

Small, D. M. Liquid crystals in living and dying systems. *J. Coll. Interf. Sci.* 58, 581-602 (1977)

Small, D. M. In: The physical chemistry of lipids. Plenum Press, New York und London, 238-343 (1986)

Smith W. P., Christensen, M.S., Nacht, S., Gans, E.H. Effects of lipids on the aggregation and permeability of human stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 78, 7-11 (1982)

Southwell, J. D., Barry, B. W., Woodford, R. Variations in permeability of human skin within and in between specimens. *Int. J. Pharm.* 18, 299-309 (1984)

Specht, C., Stoye, I., Müller-Goymann, C. C. Comparative investigations to evaluate the use of organotypic cultures of transformed and native dermal and epidermal cells for permeation studies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 46, 273-278 (1998)

Specht, C. Entwicklung organotypischer Hautäquivalente und ihre Testung auf Eignung für Permeationsuntersuchungen von Arzneistoffen aus dermalen Zubereitungen
Dissertation Technische Universität Braunschweig (1999)

Stoye, I. Permeabilitätsveränderung von humanem Stratum corneum nach Applikation nicht-steroidaler Antirheumatika in verschiedenen kolloidalen Trägersystemen. Dissertation Technische Universität Braunschweig (1997)

Swartzendruber, D. C., Wertz P. W., Madison, K. C., Downing, D. T. Evidence that the corneocyte has a chemically bound envelope. *J. Invest. Dermatol.* 88, 709-713 (1987)

Swartzendruber, D. C., Wertz P. W., Kitko, D. J., Madison, K. C., Downing, D. C. Molecular models of the intercellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 92, 251-257 (1989)

Swartzendruber, D. C. Studies of epidermal lipids using electron microscopy. *Semin. Dermatol.* 157-161 (1992)

Sweeney, T. M., Downing D. T. The role of lipids in the epidermal barrier to diffusion. *J. Invest. Dermatol.* 55, 135-140 (1970)

Tanojo, H., Bouwstra, J. A., Junginger H. E., Boddé, H. E. Subzero thermal analysis of human stratum corneum. *Pharm. Res.* 11, 1610-1616 (1994)

Tardieu, A., Luzatti, V. A novel cubic phase-a-cage-like network of rods with enclosed spherical micells. *Biochim. Biophys. Acta* 219, 11-17 (1970)

Tiemessen, H. L. G. M.; Boddé, H. E., van Mourik, C., Junginger H. E. In vitro drug release from liquid crystalline creams, cream structure dependence. *Progress in Colloid and Polymer Science* 77, 131-135 (1988)

Turner, N. G., Cullander, C., Guy, R. H. Determination of pH gradient across the stratum corneum. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 3 (2), 110-113 (1998)

Usselman, B. Beitrag zur Strukturaufklärung topischer Zubereitungen mit Fettalkoholpolyethylenglycolethern und Cholesterol als Tensiden. Dissertation, Technische Universität Braunschweig (1986)

Van Hal, D. A., Jeremiasse, E., Spies, F., Junginger, J. E., Bouwstra J. A. Structure of fully hydrated stratum corneum: a freeze-fracture electron microscopy study. *J. Invest. Dermatol.* 106, 89-95 (1996)

Van Venentie, R., Verkleij A. J. Analysis of the hexagonal II phase and its relations to lipidic particles and the lamellar phase. *Biochim. Biophys. Acta* 645, 262-269 (1981)

Verkleij, A. J. Lipidic intramembranous particles. *Biochim. Biophys. Acta* 779, 43-63 (1984)

Walker, R. B., Smith, F. W. The role of percutaneous penetration enhancers. *Adv. Drug Delivery Rev.* 18, 295-301 (1996)

Warner R. R., Myers M. C., Taylor, D. A. Electrone probe analysis of human skin: determination of the water concentration profile. *J. Invest. Dermatol.* 90, 218-229 (1988)

Washitake, M., Takashima, Y., Tanaka, S., Anmo, T., Tanaka, I. Drug permeation through egg shell membranes. *Chem. Pharm. Bull.* 28, 2855-2861 (1980)

Way, S. E., Hadgraft, J. In vitro investigation of the permeation and metabolism of hydrocortisone and hydrocortison-21-esters, in: Scott, R.C., Guy, R.H., Hadgraft, J., Boddé, H.E. (Hrsg.), *Prediction of percutaneous penetration*, Vol. 2, BC Technical Services, London (1991)

Wester, R. C., Maibach, H. I. Animal models for transdermal delivery. In: Kydonieus, A.F., Berner, B., (Hrsg.), *Transdermal delivery of drugs*, Vol. 2, CRC Press, Boca Raton, 61-70 (1987)

Wertz, P. W., Downing D. T. Glycolipids in mammalian epidermis: Structure and function in the water barrier. *Science* 217, 1261-1262 (1982)

- Wertz, P. W., Abraham, W., Landmann, L., Downing D. T.** Preparation of liposomes from stratum corneum lipids. *J. Invest. Dermatol.* 87, 582-584 (1986)
- Wertz, P. W., Downing D. T.** Covalently bound ω -hydroxyacylsphingosine in the stratum corneum. *Biochim. Biophys. Acta* 917, 108-111 (1987a)
- Wertz, P. W., Swartzendruber, D. C., Madison, K. C., Downing D. T.** Composition and morphology of epidermal cyst lipids. *J. Invest. Dermatol.* 89, 419-425 (1987b)
- Wertz, P. W., Madison, K.C., Downing D. T.** Covalently bound lipids of human stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 91, 109-111 (1989a)
- Wertz, P. W., Swartzendruber, D. C., Kitko, D., J.** The role of the corneocyte envelope in cohesion of the stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 93, 169-172 (1989b)
- Wertz, P. W., Downing D. T.** Stratum corneum: Biological and biochemical considerations, in: Hadgraft, J Guy, R.H. (Hrsg.), *Transdermal drug delivery* Vol. 35 Kap. 1, Marcel Dekker Inc., New York und Basel, 1-17 (1989c)
- Wertz P. W.** Epidermal lipids. *Semin. Dermatol.* 11 (2), 145-156 (1992)
- Wertz, P. W.** The nature of the epidermal barrier: biochemical aspects. *Adv. Drug Delivery Rev.* 18, 283-294 (1996)
- White, S. H., Mirejovsky, D., King, G. I.** Structure of lamellar lipid domains and corneocyte envelopes of murine stratum corneum. An X-ray diffraction study *Biochemistry* 27, 3725-3732 (1988)
- Wiechers, J. W.** Percutaneous absorption and elimination of the penetration enhancer Azone in humans. *Pharmazeutisch Weekblad Scientific Edition* 11, 185-198 (1989)
- Wilisch, I. L.** Veränderung der kolloidalen Struktur von Lecithinassoziaten bzw. Stratum corneum durch unterschiedliche Ölkomponenten und Fenoprofen im Hinblick auf Arzneistofffreigabe- und permeation durch exzidierte Humanhaut. Dissertation Technische Universität Braunschweig (1993)
- Wilisch, I. L., Mueller-Goymann, C. C.** Correlation of microstructure, drug release and permeation through excised human skin. *Int. J. Pharm. Sci.* 96, 79-84 (1993)
- Wilkes, G. L., Nguyen, A.-L., Wildhauer, R.** Structure property relations of human and neonatal rat stratum corneum of human and neonatal rat stratum corneum. *Biochim. Biophys. Acta* 304, 276-275 (1973)
- Williams, M. L.** Epidermal lipids and scaling diseases of the skin. *Semin. Dermatol.* 11 (2), 169-175 (1992)
- Winter, R.** Struktur und Dynamik von Biomembranen. *Chemie in unserer Zeit* 24 (2), 71-81 (1990)
- Yardley, H. J., Summerly R.** Lipid composition and metabolism in normal and diseases epidermis. *Pharmacol. Ther.* 13, 357-383 (1981)

Zatz, J. L. Drug release from semisolids: effect of membrane permeability on sensitivity to product parameters. *Pharm. Res.* 12, 787-789 (1995)

Ziegenmeyer, J. Haut - Vehikel - Pharmakon, die entscheidenden Kriterien für die percutane Resorption. *Pharmazie in unserer Zeit* 15, 129-143 (1986)

Lebenslauf

Name: Bettina Glombitza
Geburtsdatum: 30. Juli 1969
Geburtsort: Northeim

Ausbildung:

08/76 - 07/80 Grundschohle in Northeim
08/80 - 07/82 Orientierungsstufe in Northeim
08/82 - 05/89 Gymnasium Corvinianum in Northeim;
Abschluß: allgemeine Hochschulreife

10/89 - 05/94 Studium der Pharmazie an der
Technischen Universität Braunschweig;
Abschluß: 2. Staatsexamen
06/94 - 05/95 Praktisches Jahr in der Apotheke am
Saarplatz in Braunschweig
06/95 3. Staatsexamen und Approbation als Apothekerin

Berufliche Tätigkeit:

08/95 - 10/95 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für
Pharmazeutische Technologie der TU Braunschweig
10/95 - 04/00 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut
für Pharmazeutische Technologie der TU Braunschweig
seit 05/00 Beschäftigung bei der Tropon GmbH in Köln