

Markierungsfreier, quantitativer Nachweis von Wirkstoffen und Nanocarriern in Zellen und in der Haut

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**eingereicht im
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Gregor Rudolf Karl Heinz Friedrich Germer
aus Berlin, Deutschland**

Berlin, Juli 2022

Selbstständigkeitserklärung

Die Arbeit wurde am Institut für Chemie und Biochemie der Freien Universität in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Eckart Rühl im Zeitraum vom November 2018 bis zum Juli 2022 angefertigt. Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Markierungsfreier, quantitativer Nachweis von Wirkstoffen und Nanocarriern in Zellen und in der Haut“ auf Grundlage der in der Arbeit angegebenen Literatur und Hilfsmitteln selbstständig verfasst habe. Die Arbeit wurde in keinem früheren Promotionsverfahren angenommen oder als ungenügend beurteilt.

Berlin, 20. Juli 2022

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. Eckart Rühl

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. Burkhard Kleuser

Tag der Disputation: 28.10.2022

Kurzfassung

In dieser Arbeit wurden Wirkstoffe mithilfe von labelfreien Methoden orts aufgelöst in biologischen Proben detektiert. Die Detektion erfolgte durch eine Simulation der gemessenen Spektren hyperspektraler Messungen im spektralen Bereich an der O 1s Kante (520 – 565 eV) und im mittleren Infrarotbereich (1190 – 1320 cm^{-1} und 1600 – 1850 cm^{-1}) von behandelten Proben mithilfe einer numerischen Singulärwertzerlegung auf Basis von einzeln gemessenen Reinsubstanzspektren und Spektren der unbehandelten biologischen Spezies.

Der erste Teil der Arbeit beinhaltet die labelfreie Detektion des Wirkstoffs Rapamycin und der redoxsensitiven Nanocarrier *ex vivo* topisch behandelter Humanhaut. Hierbei wurden in Epoxidharz eingebettete Proben mithilfe von Röntgenmikroskopie an der O 1s-Kante untersucht. Weitere Proben wurden mithilfe von photothermischer Expansionsspektroskopie (AFM-IR) untersucht. Es kann gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung mit der Serinprotease Trypsin die Membranen der Corneocyten öffnet und der Wirkstoff intrazellulär in das Stratum Corneum transportiert werden kann. Der Wirkstoffnachweis erfolgte für diese Proben quantitativ. Es lässt sich auch die transportverstärkende Wirkung der Vaseline mit hoher Ortsauflösung beobachten. Beide genutzten Nanocarrier zeigen einen Transport des Wirkstoffs Rapamycin in die Haut. Langzeitbehandlungen zeigen eine Anreicherung der lipophilen Nanocarrier in den Lipidmembranen der Zellkerne der viablen Epidermis. Die Messung einer Kryoprobe mittels AFM-IR zeigt vergleichbare Ergebnisse zu den fixierten und eingebetteten Proben. Dies zeigt, dass die umfangreiche Probenvorbereitung fixierter Haut für die Röntgenmikroskopie keinen Einfluss auf die lokale Wirkstoffverteilung hat.

Im zweiten Teil der Arbeit werden die Wirkstoffe Cetuximab und Docetaxel in SCC-25-Kollagen-Zellkulturen auf Basis von hyperspektralen AFM-IR-Messungen orts aufgelöst und labelfrei nachgewiesen. Die Auswertung erfolgt ebenfalls auf Basis einer numerischen Singulärwertzerlegung mit den jeweiligen Spektren der Reinsubstanzen im mittleren Infrarotbereich zur Bestimmung der lokalen Wirkstoffverteilung. Die Gabe des Wirkstoffs Cetuximab erfolgt bei einer Zellkultur topisch auf den Tumorzellen und bei der anderen über das Nährmedium an der Seite der Kollagene, um eine systemische Behandlung zu simulieren. Es soll untersucht werden, ob eine topische Behandlung als Ergänzung oder Alternative zu einer systemischen dienen kann. Der Wirkstoff Cetuximab kann bei beiden Ausgabemethoden detektiert werden. Messungen mit hoher räumlicher Auflösung deuten darauf hin, dass eine zelluläre Aufnahme des Wirkstoffs stattfindet. Docetaxel kann in zwei Zellkulturen, welche mit unterschiedlichen Konzen-

trationen topisch behandelt wurden, labelfrei nachgewiesen werden.

Abstract

In this thesis, drugs were detected spatially resolved in biological samples using label-free methods. The detection was performed by simulating the experimental spectra taken in hyperspectral measurements in the spectral regime of O 1s edge (520 – 565 eV) and in the mid-infrared regime (1190 – 1320 cm^{-1} and 1600 – 1850 cm^{-1}) using a numerical singular value decomposition based on individually measured reference spectra and spectra of the untreated biological species.

The first part of this work involves label-free detection of the drug rapamycin and the redoxsensitive nanocarriers in topically treated human skin *ex vivo*. Here, samples embedded in epoxy resin were examined using scanning X-ray microscopy at the O 1s edge. Additionally the samples were examined using photothermal expansion spectroscopy (AFM-IR). It is shown that pretreatment with the serine protease trypsin opens the membranes of the corneocytes and the drug can be transported intracellularly into the stratum corneum. Quantitative drug detection was accomplished for these samples. The transport enhancing effect of petrolatum was also investigated with high spatial resolution. Redoxsensitive core-multishell nanocarriers show enhanced rapamycin penetration into the top skin layers. Long-term treatments show an accumulation of the lipophilic nanocarriers in the lipid membranes of the cell nuclei in the viable epidermis. Studies on a cryosample by AFM-IR shows comparable results to fixed and embedded skin samples. This supports the validity of extensive sample preparation protocols used along with scanning X-ray microscopy indicating that there is no influence on the local drug distribution.

In the second part of this work, the drugs cetuximab and docetaxel are spatially resolved and label-free detected in SCC-25 collagen cell cultures based on hyperspectral AFM-IR measurements. Singular value decomposition is also used for determining the local drug distribution using reference spectra of the pure substances in the mid-infrared regime. The drug cetuximab is topically applied on a cellular tumor model to prove the efficacy of this approach. Alternatively, the drug is administered via the culture medium on the side of the collagen base of the model in the other to simulate a systemic treatment. The aim of this approach was to investigate whether topical treatment can serve as an adjunct or alternative to the established systemic treatment. The results indicate that drug cetuximab can be detected by both systemic and topical treatment. High spatial resolution measurements indicate that cellular uptake of the drug takes place. Label-free detection of docetaxel was also accomplished in cell cultures that were topically treated with different drug concentrations.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
Einleitung	1
Symbol- und Abkürzungsverzeichnis	4
1 Theoretische Grundlagen	7
1.1 Physikalische Grundlagen	7
1.1.1 Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit Materie	7
1.1.2 Röntgen-Nahkanten-Absorptionsspektroskopie	9
1.1.3 Synchrotronstrahlung	10
1.1.4 Rastertransmissionsröntgenmikroskopie (STXM)	12
1.1.5 Infrarot-Absorptions-Spektroskopie	13
1.1.6 Quantenkaskadenlaser	15
1.1.7 Rasterkraftmikroskopie	16
1.1.8 Photothermische Expansionsspektroskopie (AFM-IR)	17
1.2 Biologische Grundlagen	20
1.2.1 SCC-25-Kollagen-Zellkultur	20
1.2.2 Aufbau menschlicher Haut	20
1.2.3 Die Haut als Barriere gegen das Eindringen von Wirkstoffen . . .	23
1.3 (Bio)chemische und pharmazeutische Grundlagen	26
1.3.1 Wirkungsweise von Serinprotease auf die Haut	26
1.3.2 Grundlagen der genutzten redoxsensitiven Transportnanocarrier	26
1.3.3 Rapamycin	28
1.3.4 Cetuximab	30
1.3.5 Docetaxel	31
2 Experimentelle Methoden und Grundlagen der Datenverarbeitung	33
2.1 Präparation biologischer Proben	33
2.1.1 Präparation der Hautproben	33
2.1.2 Präparation der Tumorzellproben	37
2.2 Durchführung der Rastertransmissionsröntgenmikroskopie-Experimente	39
2.3 Durchführung der AFM-IR-Experimente	49

INHALTSVERZEICHNIS

3	Bestimmung des spektralen Anteils mithilfe einer erweiterten Singulärwertzerlegung	51
4	Untersuchungen von topisch-behandelter Haut	54
4.1	Referenz-Spektren	55
4.1.1	Rapamycin	55
4.1.2	rsCMS 1 Nanocarrier	58
4.1.3	osCMS 2b Nanocarrier	59
4.1.4	Epoxidharz Epon®	60
4.1.5	Paraffin	62
4.1.6	Menschliche Haut	63
4.2	Betrachtung von Rapamycin-unbehandelten Hautreferenzproben	65
4.2.1	Nachweis von Wirkstoffen mithilfe der Röntgenmikroskopie auf Basis des Lambert-Beer-Gesetzes	65
4.2.2	Betrachtung einer unbehandelten Referenzhaut (NEXAFS, O 1s Kante) mithilfe einer Singulärwertzerlegung und der Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz	67
4.2.3	Singulärwertzerlegung einer unbehandelten Referenzhaut (AFM-IR)	70
4.2.4	Unterscheidung auf Basis des Lambert-Beer-Gesetzes zwischen dem Wirkstoff Rapamycin und dem Kryomedium von Kryoproben (AFM-IR)	74
4.2.5	Auswirkung der Vorbehandlung auf AFM-IR- und NEXAFS-Spektren	76
4.3	Transport freier Rapamycinmoleküle	79
4.3.1	Wirkung von trypsin-ähnlicher Serinprotease auf die Wirkstoffaufnahme im Vergleich zu Proben ohne Vorbehandlung	79
4.3.2	Wirkstoffaufnahme mithilfe von Vaseline	88
4.4	Transport von Rapamycin mithilfe von Nanocarriern	95
4.4.1	Auswirkung der Vorbehandlung mit Serinprotease auf den Transport der Nanocarrier rsCMS 1 und osCMS 2b	95
4.4.2	Auswirkung der Vorbehandlung mit DBPO auf den Transport der Nanocarrier rsCMS 1 und osCMS 2b	103
4.5	Zusammenfassung und Ausblick	118
5	Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen	121
5.1	AFM-IR-Spektren der Referenzspektren	122

INHALTSVERZEICHNIS

5.2	Nachweis von Cetuximab	127
5.2.1	Verteilung der Referenzkomponenten in unbehandelten SCC-25-Referenzzellen	127
5.2.2	Referenzspektren der SCC-25-Referenzzellen im Bereich 900 bis 1300 cm ⁻¹ mithilfe einer Matrix-Singulärwertzerlegung	131
5.2.3	Wirkstoffverteilung von Cetuximab	136
5.3	Nachweis von Docetaxel	146
5.3.1	Referenzspektren der SSC-25-Referenzzellen im Bereich 1600 bis 1850 cm ⁻¹ mithilfe einer Matrix-Singulärwertzerlegung	146
5.3.2	Wirkstoffverteilung von Docetaxel	149
5.4	Zusammenfassung und Ausblick	154
6	Zusammenfassung	156
	Literaturverzeichnis	159
	Verwendete Programme	VIII
	Genutzte Messinstrumente	IX
	Verwendete Chemikalien	X
	Liste der Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge	XI
	Danksagung	XII
	Curriculum Vitae	XIV

Einleitung

Bei der Behandlung von Erkrankungen mithilfe von Wirkstoffen muss gesichert sein, dass diese ihren Zielort erreichen können. So erfolgt die Gabe der Wirkstoffe für Erkrankungen der Haut, z.B. von allergisches Kontaktekzem und allergisches Ekzem [1], topisch und muss die Barriere des Stratum Corneums überwinden [2]. Wirkstoffe zur Behandlung von Tumoren werden häufig systemisch verabreicht: Dies kann jedoch im Gegenzug Nebenwirkungen in Regionen des Organismus hervorrufen, die nicht von den Tumoren betroffen sind [3]. Die Wirkung der Wirkstoffe in die Zielregion kann über sekundäre Effekte, z.B. Interleukin-Spiegel [4], untersucht werden, ebenso kann der Wirkstoff orts aufgelöst in der Zielregion detektiert werden. Hierfür wird häufig eine Markierung mithilfe eines Farbstoffes verwendet, um den Wirkstoff von anderen biologischen Substanzen unterscheiden zu können [5]. Diese Markierungen führen jedoch zu einer Veränderung der Masse des Wirkstoffs, können dadurch die Verteilung beeinflussen oder durch ein Abspalten vom Wirkstoff zu einer falschen Verteilungsinformation führen [5].

Die Detektion von Bestandteilen und Wirkstoffen innerhalb biologischer Umgebungen kann durch die Nutzung moderner Methoden ohne die Verwendung von Markierungen erfolgen [6]. Zum markierungsfreien Nachweis von Wirkstoffen eignen sich neben fluoreszenzbasierter Methoden [7] und oberflächenverstärkter Raman-Streuung [6] auch Röntgen-Nahkanten-Absorptions-Spektroskopie (NEXAFS) [8] und AFM-basierte Infrarotabsorptionsspektroskopie (AFM-IR) [9, 10].

Ein für solche Untersuchungen prominentes System ist die menschliche Haut, welche mit der äußeren Schicht, dem Stratum Corneum, eine Barriere gegen äußere Einflüsse besitzt [11, 12]. So schützt das Stratum Corneum zwar vor dem Eindringen von Substanzen aus der Umwelt, stellt aber ebenfalls ein Hindernis für topisch aufgetragene Wirkstoffe dar – insbesondere für Wirkstoffe, deren Masse sich oberhalb von 500 Da befinden [2]. Durch physische Beschädigungen wie z.B. Tape-Stripping, die Nutzung von Mikronadeln, Druck oder Dehnung der Haut angewandt, kann die Barrierefunktion geschwächt werden [13, 14]. Ebenso wird ein verbessertes Eindringen von Wirkstoffen durch eine Variation des für den Wirkstoff verwendeten Lösungsmittels, welcher in Kombination mit Hilfsstoffen die Formulierung eines Wirkstoffs bildet, erreicht [15]. Ein weiterer Ansatz für Wirkstoffe, die durch eine penetrationsverstärkende Formulierung nicht in die Haut transportiert werden können, ist die Abschirmung der Wirkstoff-Haut-Wechselwirkung durch ein Einbringen des Wirkstoffs in Liposome, Lipidnanopartikel, Nanogele, polymerische Mizellen und Nanoemulsionen [16].

Einleitung

Ebenso ist bekannt, dass Entzündungen der Haut einen Einfluss auf die Barrierefunktion des Stratum Corneums haben, auch durch erhöhte Proteasespiegel [17, 18, 19]. Bei den in dieser Arbeit untersuchten SCC-25-Tumorzellen handelt es sich um Zellen des menschlichen Plattenepithelkarzinoms des Kopfes und Halses (HNSCC) [20, 21]. Das Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Halses gehört zu den sechsthäufigsten Tumorerkrankungen des Menschen und hat eine hohe Sterblichkeitsrate von 50% [22]. Ein Großteil dieser Karzinome zeigen eine erhöhte Expression des epidermalen Wachstumsfaktors.

Die hier vorliegende Arbeit ist in die zwei untersuchten Probensysteme aufgeteilt: Topisch behandelte Humanhaut und SCC-25-Kollagen-Modelle.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird die Verteilung des Wirkstoffs Rapamycin in der Haut untersucht, welcher mit einer Masse von 914.17 Da schwerer als die Grenze der 500-Da-Regel ist [23, 24, 25]. Er hat eine immunsuppressive Wirkung durch eine Wechselwirkung mit mTOR, welches auch bei entzündeter Haut einen erhöhten Spiegel zeigt [23, 1].

Die barrierestörende Wirkung der Serinprotease Trypsin ist aus der Literatur bekannt [17, 18, 19]. Es soll gezeigt werden, wie sich eine zeitabhängige Vorbehandlung der Haut mit Serinprotease auf den Transport und die Verteilung des Wirkstoffs Rapamycin auswirkt. Hierbei spielt auch die besondere Funktion des Stratum Granulosum am Übergang des Stratum Corneums zur viablen Epidermis eine entscheidende Rolle. Des Weiteren werden die aus der Literatur bekannten Okklusionseffekte von einer kohlenwasserstoffbasierten Formulierung im Hinblick auf die lokale Wirkstoffverteilung des Rapamycins untersucht [26].

Abschließend werden die Transporteigenschaften von zwei redoxsensitiven Nanocarriern untersucht [27, 28]. Die Haut wurde hierbei teilweise mit der Serinprotease Trypsin und dem Oxidationsmittel DBPO vorbehandelt, um oxidativen Stress zu simulieren. Es werden sowohl die lokale Verteilung des jeweils genutzten Nanocarriers als auch die Verteilung des Wirkstoffs Rapamycin untersucht. Es wird gezeigt, ob ein Freilassen der eingekapselten Wirkstoffmoleküle ermöglicht werden und ob es kontrolliert stattfinden kann.

Der labelfreie Nachweis des Wirkstoffs Rapamycin in der Haut erfolgt vorwiegend mithilfe von röntgenmikroskopischen Messungen an der O 1s-Kante und teilweise mit AFM-IR. Die Auswertung erfolgt auf Grundlage des Lambert-Beer-Gesetzes und auf Basis einer numerischen Singulärwertzerlegung.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird die Wirkstoffverteilung zweier Wirkstoffe in einer SCC-25-Kollagen-Zellkultur betrachtet. Ein hierbei genutzter Wirkstoff ist Cetuximab. Es handelt es sich um einen chimären (Mensch-Maus) monoklonalen Antikörper [29], welcher zur Behandlung des Plattenepithelkarzinoms des Kopfes und Halses Anwendung

Einleitung

findet [29].

Die Aufnahme des Wirkstoffs in das Modell ist aus Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie bekannt [7]. Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Nachweis des Wirkstoffs mittels AFM-IR-Messungen ermöglicht werden. Ein markierungsfreier, orts aufgelöster Nachweis von Substanzen mithilfe von hyperspektralen AFM-IR-Messungen ist in der Literatur bisher nicht bekannt.

In dieser Arbeit werden ein topisch und ein systemisch behandeltes Modell miteinander verglichen. Dies ist insbesondere von Interesse, da topische Behandlungen weniger Nebenwirkungen zeigen können, jedoch im Mundbereich deutlich schwieriger anzuwenden sind [30].

Der zweite genutzte Wirkstoff ist Docetaxel. Es handelt sich um einen Wirkstoff, welcher bei nicht-kleinzelligem Lungenkrebs und bei lokal fortgeschrittenen oder metastatischem Brustkrebs eingesetzt wird [31, 32, 33]. Auch in diesem Fall erfolgt der Nachweis über die Methode AFM-IR.

Bei beiden Wirkstoffen des zweiten Teils soll gezeigt werden, dass es für die Wahl der Referenzspektren für den biologischen Anteil der Proben zwei unterschiedliche Methoden gibt, die für hyperspektrale AFM-IR-Messungen geeignet sind: Die Messung bekannter Reinsubstanzen, welche während der Behandlung aufgetragen wurden, oder alternativ eine Singulärwertzerlegung der Messung einer unbehandelten Referenzprobe. Letzteres Verfahren hat den Vorteil, dass es für Proben nutzbar ist, bei denen nicht alle verwendeten (ggf. kommerziell-vertriebenen) Reinsubstanzen separat voneinander verfügbar sind.

Es soll gezeigt werden, dass sich beide Messmethoden, Röntgenmikroskopie und AFM-IR, eigenen, Wirkstoffe in einer biologischen Umgebung nachzuweisen, solange diese zu der Umgebung spektrale Unterschiede aufweisen. Ebenso soll gezeigt werden, dass sich eine numerische Singulärwertzerlegung auf Basis bekannter Referenzspektren nicht nur zur Analyse der Verteilung eines gesuchten Wirkstoffs eignet, sondern auch zur lokalen Detektion weiterer Substanzen oder zur Detektion einer Zu- oder Abnahme einzelner Signale.

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

Symbol	Bedeutung
A	Absorption
A_{Zone}	Fläche der Zone einer Zonenplatte
A_{PE}	Amplitude der photothermischen Expansion (AFM-IR)
a_i	Vorfaktor bei einer numerischen Singulärwertzerlegung
α	Thermischer Ausdehnungskoeffizient
α_{opt}	Optische Parameter und Konstanten
βc	Geschwindigkeit der Elektronen entlang der Flugrichtung im Undulator / Wiggler
C	Wärmekapazität
c	Konzentration
d	Schichtdicke
d_{max}	Maximale Ortsauflösung
$d_{\text{Z,P,P}}$	Abstand zwischen Zonenplatte und Probe
Δr	Breite der äußeren Fresnelzone
E	Energie
E_{lok}	Elektrisches Feld innerhalb der Probe
ε	Anpassungskoeffizienten
ε_0	Dielektrizitätskonstante
ε_λ	Wellenlängenabhängiger Extinktionskoeffizient
F	Fluoreszenz
$f_n \frac{\lambda}{\lambda_m}$	Universalfunktion des Absorptionsquerschnitts
H	Magnetfeldstärke
I	Intensität
I_0	Intensität vor Absorption bzw. zum Zeitpunkt $t = 0$
IC	Innere Umwandlung
Im	Imaginärteil
K	Undulator- bzw. Wigglerparameter
k	Wärmeleitfähigkeit
λ	Wellenlänge
λ_n	Kritische Wellenlänge
λ_u	Undulatorperiode
m	Masse

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

m_0	Masse des Elektrons
m_A	Atommasse
N_A	Avogadro-Konstante
NA	Numerische Apertur
$\frac{\nu}{\rho}$	Totaler Massenabsorptionsquerschnitt
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
P_{abs}	Absorbierte Leistung
OD	Optische Dichte
q	Halbwinkel der fokussierten Strahlung
r_{Z1}	Radius der ersten Fresnelzone
Re	Realteil
ρ	Dichte
σ	Standardabweichung
σ_K	Absorptionsquerschnitt der K-Schale
σ_{L+}	Absorptionsquerschnitt der L-Schale und Elektronen außerhalb der L-Schale
σ_q	Totaler Absorptionsquerschnitts
T	Temperatur
t	Zeit
τ	Relaxationszeit
V	Volumen
y_B	Durchschnittlicher Wert einer unbehandelten Blindprobe
y_{LOD}	Detektionsgrenze
y_{LOQ}	Quantifizierungsgrenze

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AFM	Rasterkraftmikroskop
AFM-IR	Rasterkraftmikroskopie-basierte Infrarotspektroskopie
ACD	Allergisches Kontaktekzem
AD	Allergisches Ekzem
CMS	Core-Multishell
D	Dermis
DBPO	Dibenzoylperoxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGFR	Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKBPs	FK506 Bindungsproteine
HEC	Hydroxyethylcellulose
HNSCC	Kopf- und Hals-Plattenepithelkarzinom
IR	Infrarot
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MTHPP	Meso-tetra(<i>m</i> -hydroxyphenyl)-Prophyrin
mTOR	Mammalian target of rapamycin
osCMS 2b	Oxidationssensitiver Core-Multishell-Nanocarrier
QCL	Quantenkaskadenlaser
rsCMS 1	Reduktionssensitiver Core-Multishell-Nanocarrier
SC	Stratum Corneum
SCC	Plattenepithelkarzinom
SRL	Sirolimus (Rapamycin)
UV	Ultraviolett
VE	Viable Epidermis

1 Theoretische Grundlagen

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit den wissenschaftlichen Grundlagen und dem aktuellen Stand der Technik, auf deren Basis diese Arbeit geschrieben wurde. Hierbei werden zu Beginn die beiden unterschiedlichen Messmethoden Röntgenmikroskopie und AFM-IR-Spektroskopie erläutert. Anschließend werden der Aufbau der genutzten biologischen Systeme und die verwendeten Wirkstoffe vorgestellt. Auf Basis der vorgestellten Grundlagen sollen anschließend in den Kapiteln 4 und 5 die Substanzverteilungen von Wirkstoffen innerhalb der biologischen Proben orts aufgelöst mithilfe labelfreier Spektroskopie gezeigt und die Ursachen dafür interpretiert werden.

1.1 Physikalische Grundlagen

1.1.1 Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit Materie

Elektromagnetische Strahlung umfasst verschiedene energetische Regionen, welche von der Wellenlänge abhängig sind [34]. Gamma-, Röntgen- und Ultraviolett-Strahlung sind Beispiele für hochenergetische Strahlung; Infrarot-, Terahertz-Strahlung und Mikrowellen sind Beispiele für niedrigenergetische Strahlung. Das für das menschliche Auge sichtbare Fenster der elektromagnetischen Strahlung wird Licht genannt und befindet sich im Bereich 400 nm bis 700 nm. Die kleinste Einheit der elektromagnetischen Strahlung sind die Lichtquanten, Photonen genannt [35, 36]. Bei der Wechselwirkung von Photonen mit Materie kann es zu einer Absorption des Photons bei gleichzeitiger Anregung der Materie kommen [37]. Dies wird Photoabsorption genannt. Die Anregung kann in einen stabilen oder einen instabilen Zustand erfolgen [37]. Ein instabiler Zustand führt zu einer Dissoziation einer Molekülbindung. Ebenso kann die Absorption eines Photons zu einer Ionisierung der Materie und einer Freigabe von Elektronen führen. Hierfür muss die Energie des absorbierten Photons größer sein als die Bindungsenergie des Elektrons. Die kinetische Energie des ausgesendeten Elektrons entspricht hierbei der Differenz der Photonenenergie und der Bindungsenergie des Elektrons. Dieses Verhalten wird Photoelektrischer Effekt genannt [36]. Wird durch Photoabsorption eines Elektrons aus einer inneren Schale herausgelöst, entsteht ein unbesetzter, niedrigenergetischer Zustand, ein sogenanntes Rumpfloch. Dieser unbesetzte Zustand löst nun einen von zwei möglichen Folgeprozessen aus: Bei leichten Elementen ($Z < 90$) ist der Auger-Zerfall und bei schweren Elementen die Röntgen-

1 Theoretische Grundlagen

fluoreszenz wahrscheinlicher, da die Auger-Lebenszeit für leichte Elemente deutlich kürzer als die Fluoreszenzlebenszeit ist. Bei beiden Effekten besetzt ein Elektron aus einem energetisch höheren Zustand das Rumpfloch. Die hierbei entstandene Energie, die der energetischen Differenz des Start- und Endzustandes des Elektrons entspricht, wird beim Auger-Zerfall genutzt, um ein anderes Elektron freizugeben. Die kinetische Energie des zweiten Elektrons entspricht der Differenz zwischen der Energie des Innerschalenübergangs und der Ionisierungsenergie des Elektrons aus einem einfachgeladenen Ion. Bei der Röntgenfluoreszenz wird hingegen die Energie als Photon abgegeben [38, 8]. Im Zeitraum, in dem das Rumpfloch vorhanden ist, führt es zu einer Änderung des Coulomb-Potential des Atoms von Z zu $Z+1$. Dies hat einen direkten Einfluss auf die nötige Ionisierungsenergie, die Lage der unbesetzten Molekülorbitale und daraus folgend die Lage der beobachteten Übergänge [8].

Für Übergänge, die zu keiner Ionisation der Moleküle führen, folgt aus dem Franck-Condon-Prinzip, dass die Wahrscheinlichkeit eines Übergangs und damit die Wahrscheinlichkeit der Absorption größer ist, je höher die Überlappung zwischen Ausgangs- und Zielwellenfunktion ist. Dies beruht auf der Annahme, dass sich die Elektronen aufgrund ihrer geringeren Masse (ca. 2000-fach geringer als der leichteste Atomkern) deutlich schneller als die Atomkerne bewegen [37].

Für verdünnte Lösungen wird die Extinktion mit dem Lambert-Beer-Gesetz [39, 40, 41] beschrieben:

$$\text{Optische Dichte} = \text{OD} = \text{Extinktion} = A_\lambda = \ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d \quad (1.1)$$

Hierbei ist I_0 die Intensität der Strahlung, d.h. die Anzahl der Photonen einer bestimmten Wellenlänge, vor der Abschwächung (oder in einem Referenzmedium ohne Absorber), I die Intensität nach der Absorption durch den zu untersuchenden Absorber, ε_λ der wellenlängenabhängige Extinktionskoeffizient, c die Konzentration und d die Weglänge der Strahlung durch das Absorbermedium. Das heißt, die Extinktion ist zum einen von der Fähigkeit des Absorbers abhängig, Photonen der entsprechenden Energie aufzunehmen, zu brechen, zu beugen und zu reflektieren (Extinktionskoeffizient), zum anderen aber auch von der absoluten Menge der vorhandenen Absorber (Konzentration und Weglänge). In dem Gültigkeitsraum des Lambert-Beer-Gesetzes dominiert der Effekt der Absorption gegenüber Streuung, Brechung und Reflexion.

1.1.2 Röntgen-Nahkanten-Absorptionsspektroskopie

Die Röntgen-Nahkanten-Absorptionsspektroskopie (kurz NEXAFS von engl. *near-edge x-ray absorption fine structure*) ist eine elementspezifische Methode der Röntgenabsorption, welche die Nahkanten-Feinstruktur abbildet [8]. Hierbei werden Elektronen aus den besetzten Atomorbitalen (z.B. 1s) in unbesetzte Orbitale (z.B. Molekülorbitale wie σ^* und π^*) oder in das Kontinuum angeregt. Der Übergang kann sich energetisch unterhalb oder im Bereich oberhalb des Ionisierungspotentials, im Spektrum als Kantensprung sichtbar, liegen. Durch bindungsabhängige Struktur der Orbitale, können zwischen unterschiedlichen Molekülen Signalverschiebungen beobachtet werden. Übergänge werden für gewöhnlich mit dem Start- und dem Zielorbital beschrieben (z.B. $1s \rightarrow \sigma^*$). Die Lebensdauer eines angeregten Zustandes liegt abhängig von der Anregungsenergie im Bereich 10^{-17} bis 10^{-14} s. Die Absorption ist vom vorliegenden Absorptionsquerschnitt σ_x abhängig, welcher als Anzahl der angeregten Elektronen gegen die Anzahl der Photonen pro Fläche definiert ist (Einheit: $1 \text{ cm}^2 = 10^{18} \text{ Mbarn}$). Der gesamte Absorptionsquerschnitt einer Probe verhält sich linear zur Summe aller vorliegenden Einzelabsorptionsquerschnitte [8].

Mithilfe der Formel

$$\frac{\mu}{\rho} = N_A \cdot \sum \frac{\sigma_q}{m_A} \quad (1.2)$$

lässt sich der totale Massenabsorptionsquerschnitt $\frac{\mu}{\rho}$ für die einzelnen Atome semiempirisch bestimmen. N_A ist die Avogadro-Konstante, m_A die Atommasse und σ_q der totale Absorptionsquerschnitt für das Element in der jeweils betrachteten Schale q. Der totale Absorptionsquerschnitt für die K-Schale kann mit

$$\sigma_K = \lambda f_K \frac{\lambda}{\lambda_1} \quad (1.3)$$

und für die L-Schale und diejenigen Elektronen außerhalb der L-Schale mit

$$\sigma_{L+} = \lambda f_{L+} \frac{\lambda}{\lambda_2} \quad (1.4)$$

bestimmt werden. Hierbei sind λ die Wellenlänge der betrachteten Strahlung, λ_1 und λ_2 die von der Ordnungszahl des Elements abhängige kritische Wellenzahl und $f_K \frac{\lambda}{\lambda_1}$ bzw. $f_{L+} \frac{\lambda}{\lambda_2}$ die Universalfunktionen der Atomschalenquerschnitte. Unter Berücksichtigung von

$$F_1 \cdot \left(\frac{\lambda}{\lambda_1} \right) = N_A \cdot f_K \frac{\lambda}{\lambda_1} \quad (1.5)$$

und

1 Theoretische Grundlagen

$$F_2 \cdot \left(\frac{\lambda}{\lambda_2} \right) = N_A \cdot f_{L+} \frac{\lambda}{\lambda_2} \quad (1.6)$$

ergibt sich für den totalen Massenabsorptionsquerschnitt [42]:

$$\frac{\mu}{\rho} = \frac{\lambda}{m_A} \left[F_1 \cdot \left(\frac{\lambda}{\lambda_1} \right) + F_2 \cdot \left(\frac{\lambda}{\lambda_2} \right) \right] \quad (1.7)$$

Die Analyse von NEXAFS-Spektren durch eine Entfaltung in die einzelnen Komponenten kann mithilfe Gauß-, Lorentz und Voigt-Funktionen durchgeführt werden, erfordert für den Sprung an der Kante jedoch eine asymmetrische Funktion, die auf Basis vieler Einzelfunktion konstruiert werden muss [8]. Eine Alternative zu der asymmetrischen Funktion stellt die Nutzung einer Fehler-Stufenfunktion dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wird eine Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz [43] und die Matrixfaktorisierung [44] (bzw. numerische Singulärwertzerlegung) verwendet. Die Betrachtung nach dem Lambert-Beer-Gesetz macht sich zu Nutze, dass die Differenz der optischen Dichten bei zwei Energien von zwei unterschiedlichen Substanzen unterschiedlich sein kann. Dies ermöglicht eine einfache und regionsaufgelöste Detektion von Substanzen in einem Substanzgemisch [43, 45]. Je komplexer ein Gemisch ist, desto schwieriger ist die Nutzung der Unterschiede zwischen optischen Dichten einzelner Energien: Banden mehrerer Substanzen können sich überlagern und nicht mehr eindeutig zugeordnet werden. Die für einen solchen Fall geeignete, eingesetzte, numerische Singulärwertzerlegung ist in Kapitel 3 detailliert beschrieben.

1.1.3 Synchrotronstrahlung

Bei der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Röntgenstrahlung handelt es sich um Synchrotronstrahlung. Dies ist Strahlung mit einem kleinen Öffnungswinkel, hoher Brillanz und einer breiten Durchstimmbareit [46]. In der evakuierten Synchrotron-Apparatur werden Elektronen zuerst mit einem Linearbeschleuniger (LINAC) beschleunigt (Abbildung 1.1 (a), ①), in einen Synchrotronring ((a), ②) geleitet und dort auf relativistische Geschwindigkeiten beschleunigt. Anschließend werden die Elektronen in einen Elektronenspeicherring ((a), ③) injiziert. In Synchrotron- und Speicherring werden die Elektronen durch das Ablenken mit Dipol-, das Fokussieren mit Quadrupol- und das Korrigieren mit Sextupol-Magneten auf der kreisförmigen Bahn gehalten. Im Elektronenspeicherring wird durch ein Ablenken der Elektronen Strahlung erzeugt und an die jeweiligen Strahlrohre gesendet. Hierbei kann die Emission von Photonen durch Dipolmagnete, Wiggler oder Undulatoren ausgelöst werden. Bei Wiggler und Undulatoren ist die Elektronenbahn ((b), ①) von zwei Bereichen umgeben, welche aus einer

1 Theoretische Grundlagen

periodischen Anordnung alternierender Magneten ((b), ②) aufgebaut sind. Die dadurch entstehende Lorentzkraft lenkt die Elektronen senkrecht zur Flugebene auf eine sinusförmige Bahn. Die Elektronen werden beschleunigt und es kommt zu einer spontanen Emission von Photonen ((b), ③): Bei einem Wiggler interferieren die ausgesandten Photonenpakete nicht miteinander, bei einem Undulator wird die Intensität der Photonenpakete durch positive Interferenz verstärkt. Dies wird durch den Undulator- bzw. Wigglerparameter K beschrieben:

$$K = \frac{e \cdot H \cdot \lambda_u}{2\pi \cdot m_0 \cdot \beta c} \quad (1.8)$$

Hierbei ist e die Elementarladung, H die Magnetfeldstärke, λ_u die Undulatorperiode (vgl. Abbildung 1.1 (b)), m_0 die Masse des Elektrons und βc die Geschwindigkeit der Elektronen entlang der Flugrichtung vor Eintritt in den Undulator bzw. Wiggler. Der Parameter liegt für einen Wiggler bei $K > 1$ und für einen Undulator bei $K \leq 1$.

Die emittierte Strahlung wird über die Strahlrohre zu den Experimenten geleitet und mithilfe eines Monochromators gefiltert [46].

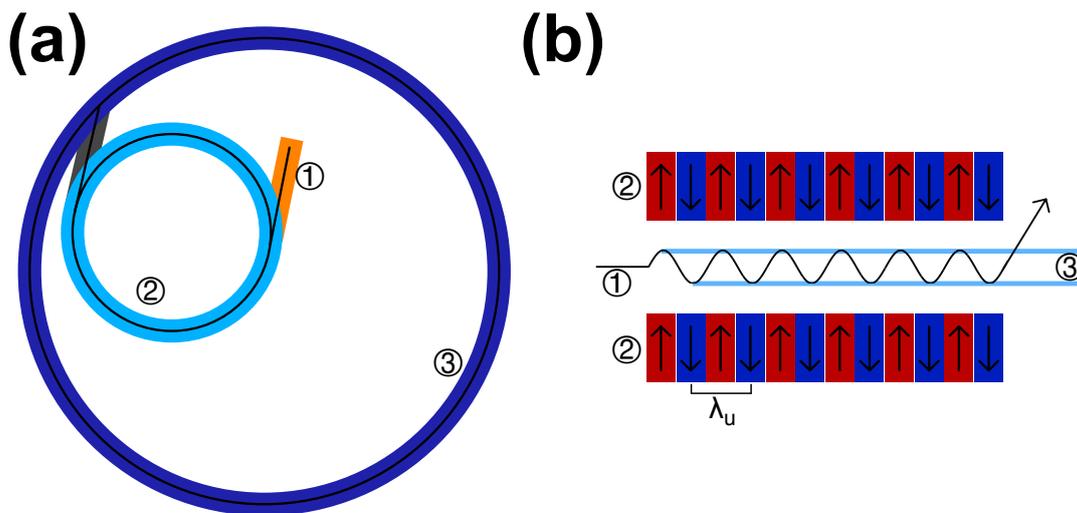


Abbildung 1.1: (a) Schematischer Aufbau eines Synchrotron (Draufsicht),
① Linearbeschleuniger, ② Synchrotronring, ③ Elektronenspeicherring,
(b) schematischer Aufbau eines Undulators / Wignlers: ① Elektronenstrahl,
② alternierender Magneten und ③ emittierte Strahlung, Abbildung analog zu [46].

1.1.4 Rastertransmissionsröntgenmikroskopie (STXM)

Ortsaufgelöste, Röntgen-Nahkanten-Absorptionsspektroskopische Messungen wurden mithilfe der Rastertransmissionsröntgenmikroskopie (kurz STXM von engl. *scanning transmission X-ray microscope*) [47, 48, 49, 50] durchgeführt. Um hohe Intensitäten der Röntgenstrahlung und eine hohe Ortsauflösung durch einen kleinen Öffnungswinkel der Strahlung zu gewährleisten, wird meist Synchrotronstrahlung verwendet [51]. Das Mikroskop ist während der Messung evakuiert (Ultra-Hochvakuum, $< 10^{-8}$ mbar) oder mit Helium gefüllt (20 mbar), um eine Absorption der Röntgenstrahlung durch die Luftmoleküle zu verhindern.

Wie in Abbildung 1.2 gezeigt, wird monochromatische Röntgenstrahlung mithilfe einer Fresnel-Zonenplatte auf die Probe fokussiert. Bei einer Fresnel-Zonenplatte handelt es sich um ein kreisförmiges Beugungsgitter, welches abwechselnd aus transparenten und strahlungsundurchlässigen Ringen gleicher Fläche besteht [52, 53]. Die Fläche A_{Zone} jeder Zone ist von der zu fokussierenden Wellenlänge λ und Abstand $d_{\text{ZP,P}}$ zwischen Zonenplatte und Probe abhängig:

$$A_{\text{Zone}} = \pi \cdot d_{\text{ZP,P}} \cdot \lambda \quad (1.9)$$

Die Brennweite der Zonenplatte f ist hierbei vom Radius der ersten Zone r_{Z1} zum Quadrat und der Wellenlänge der eingesetzten Strahlung λ abhängig:

$$f = r_{\text{Z1}}^2 \cdot \lambda \quad (1.10)$$

Die maximale Ortsauflösung d_{max} ist durch das Rayleigh-Kriterium gegeben als

$$d_{\text{max}} = \frac{1.22}{2} \cdot \frac{\lambda}{\text{NA}} = 1.22 \cdot \Delta r, \quad (1.11)$$

wobei NA der numerische Apertur und Δr der Breite der äußeren Zone entspricht. Die numerische Apertur ist über den Sinus mit dem Halbwinkel der fokussierten Strahlung q verknüpft:

$$\text{NA} = \sin(q) \quad (1.12)$$

Beim Fokussieren mit einer Fresnel-Zonenplatte geht ein Teil der Strahlung durch Absorption und ein anderer Teil der Strahlung durch Umwandlung in höhere Ordnungen verloren. Die hierbei ungewünschten Ordnungen werden bei einem Rastertransmissionsröntgenmikroskop durch eine Blende herausgefiltert.

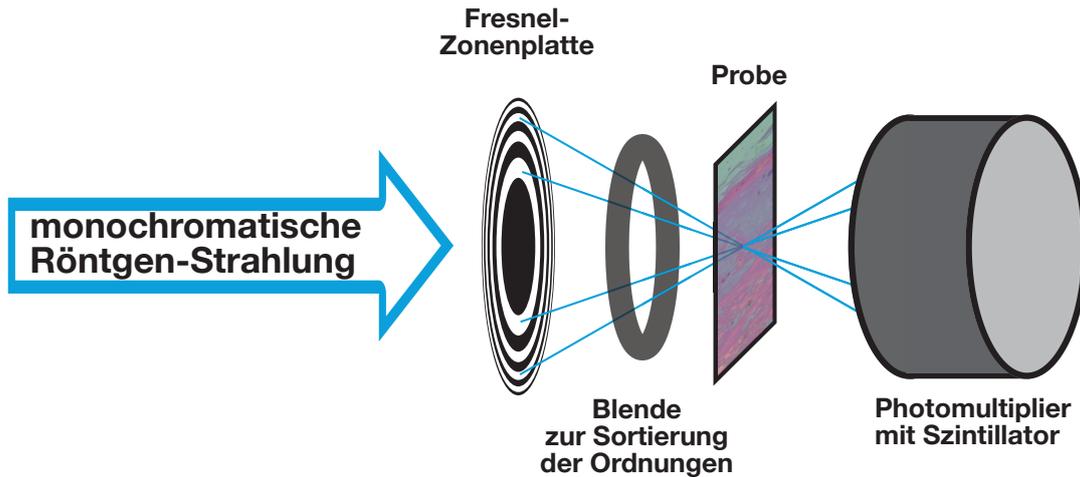


Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau des Röntgenmikroskops

Die Probe selbst befindet sich in einer Halterung, welche in alle drei Richtungen bewegt werden kann. Hierbei wird die Probe entlang des Strahls so verschoben, dass sich die Probe im Fokus der Strahlung befindet. Die Bewegung in die anderen beiden Raumrichtungen ermöglicht eine orts aufgelöste Messung; sie erfolgt mittels Schrittmotors und, für eine genauere Positionierung, mithilfe von Piezoelementen, mit denen eine elektrische Spannung in eine mechanische Verformung umgewandelt wird. Die Strahlung wird abschließend von einem Photomultiplier mit Szintillator detektiert. Hierbei schlägt ein einzelnes Photon ein Elektron im Szintillator heraus, welches im Photomultiplier einen kaskadierten Sekundäremissionsprozess auslöst [54]. Der dadurch messbare Anodenstrom verhält sich proportional zur Anzahl an absorbierten Photonen.

1.1.5 Infrarot-Absorptions-Spektroskopie

Unter Infrarot-Absorptions-Spektroskopie (kurz IR-Spektroskopie) [34, 55] wird eine Absorptionsspektroskopie im Bereich der infraroten Strahlung (780 nm bis 1 mm) verstanden. Absorption der elektromagnetischen Strahlung in diesem Energiebereich führt zu Schwingungen und Rotationen einzelner Moleküle und Molekülgruppen. Hierbei kann es zu Streckerschwingungen (symmetrische und antisymmetrische Valenzschwingungen) und Deformationsschwingungen kommen. Deformationsschwingungen unterteilen sich in Biege-, Schaukel-, Wipp-, und Drehschwingungen. Die Schwingungen eines Wassermoleküls und eines Kohlenstoffdioxidmoleküls sind beispielhaft in Abbildung 1.3 dargestellt: (a) zeigt die symmetrische und (b) die antisymmetrische Streckerschwingung. Unter (c) ist die Biegeschwingung dargestellt. Die blauen Pfeile entsprechen den hierbei auftretenden Bewegungsvektoren, wobei sich zur Erhaltung des Massenschwerpunktes jeweils alle Atome bewegen.

1 Theoretische Grundlagen

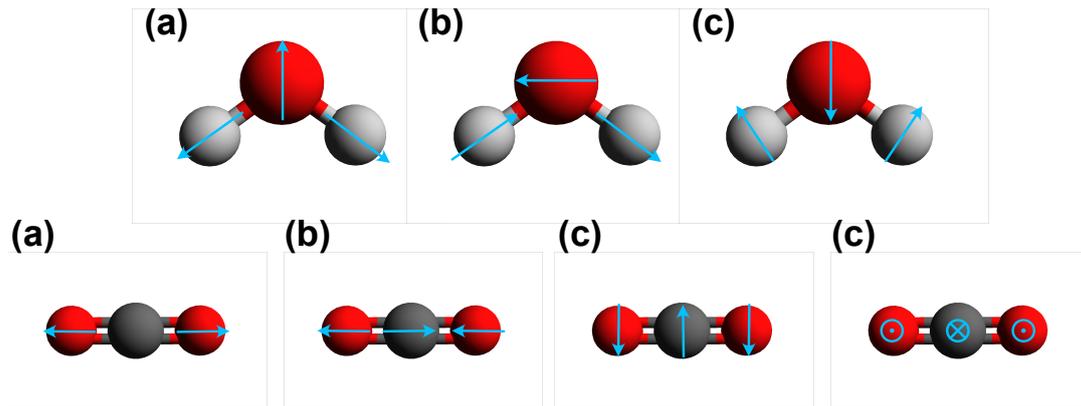


Abbildung 1.3: IR-Schwingungen am Beispiel von Wasser und Kohlenstoffdioxid: (a) symmetrische Streckschwingungen, (b) asymmetrische Streckschwingungen und (c) Biegeschwingungen, Bewegungsvektoren in blau [56, 57].

Die spektrale Position und Intensität einer Absorption im Spektrum ist hierbei von der Beschaffenheit der funktionellen Gruppe und deren lokale Umgebung abhängig. Die Voraussetzung für eine sichtbare Absorptionsbande in einem IR-Spektrum ist die Änderung des Dipolmoments beim Übergang zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand; der Grundzustand muss kein permanentes Dipolmoment besitzen.

Die Gesamtanzahl an Schwingungen ist hierbei von der Anzahl an Atomen innerhalb eines Moleküls und dessen geometrischer Beschaffenheit abhängig: Jede Bewegung innerhalb eines Moleküls kann durch eine Kombination an Bewegung der einzelnen Atome in eine der drei Raumrichtungen zusammengesetzt werden [34]. Diese möglichen Bewegungen eines Moleküls werden Freiheitsgrade genannt. Aufgrund der drei Raumrichtungen besitzt jedes Molekül drei Mal so viele Freiheitsgrade wie es Atome besitzt ($3N$). Bei den Translationen im Raum (drei) und auch bei den Rotationen des gesamten Moleküls (zwei für lineare und drei für nicht-lineare Moleküle) kommt es zu keinen relativen Abstandsänderung zwischen den Atomen des Moleküls. Bei Schwingungen handelt es sich um harmonische Bewegungen, bei denen die Atome relativ zueinander die Positionen ändern. Dies ist bei allen weiteren möglichen Bewegungen der Fall, sodass es für lineare Moleküle $3N-5$ und für nicht-lineare Moleküle $3N-6$ mögliche Schwingungen gibt.

So besitzt das Wassermolekül aus Abbildung 1.3 drei Atome und somit neun Freiheitsgrade. Es handelt sich hierbei um ein nicht-lineares Molekül, sodass hiervon sowohl drei Freiheitsgrade auf die Translation des gesamten Moleküls als auch auf die drei Rotationen entfallen ($3+3=6$). Damit ergeben sich drei mögliche Schwingungen für das Molekül ($9-6=3$). Das Kohlenstoffdioxidmolekül ist linear und besitzt somit eine Rotation weniger (2). Es ergeben sich vier Schwingungsfreiheitsgrade ($9-5=4$).

In der Darstellung als Transmissionsspektrum sind Absorptionsbanden Minima und als

Absorptionsspektrum sind die Absorptionsbanden Maxima. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten die Abbildungen als Absorptionsspektren oder als AFM-IR-Spektrum proportional zu diesen.

1.1.6 Quantenkaskadenlaser

Quantenkaskadenlaser (Halbleiter-Injektionslaser, kurz QCL von engl. *quantum cascade laser*) [58, 59, 60, 61] unterscheiden sich grundlegend von den Halbleiterlasern: Sie basieren auf Quantensprüngen zwischen zwei elektronischen Zuständen innerhalb des Leitungsbandes und nutzen keine gegensätzlichen Ladungsträger (Elektronen-Loch-Paare). Die Interbandstruktur des Leitungsbandes wird durch die Konstruktion von sich abwechselnden nanoskaligen Halbleiterschichten ermöglicht, welche als zweidimensionale Quantentöpfe agieren. Durch die gestapelte Struktur bewegen sich Elektronen entlang der Schichtgrenze quantisiert; der energetische Abstand der angeregten Zustände, zwischen denen die Emission stattfindet, ist durch die Dicke der Halbleiterschicht, die Höhe der trennenden Energiebarriere und die angelegte Spannung definiert. Die Variation dieser angelegten Spannung ermöglicht die Emission von durchstimmbarer Strahlung. Eine durch Temperaturschwankungen ermöglichte Änderung der Energiebarriere wird durch eine konstante Kühlung der Laserdioden verhindert. Beim Betrieb (vgl. Abbildung 1.4) werden Elektronen aus dem Grundzustand des einen Halbleiters (Injektor-Region) in den angeregten elektronischen Zustand 3 des benachbarten Materials (aktive Region), welche dem aktiven Medium eines klassischen Drei-Niveau-Lasers entspricht, durch Tunneln transportiert. Es entsteht hierbei eine Besetzungsumkehr zwischen Zustand 3 und Zustand 2. Der angeregte Zustand relaxiert durch stimulierte Emission unter Aussendung von Laserstrahlung zu Zustand 2. Die energetische Differenz zwischen den angeregten Zuständen 3 und 2 sind hierbei von der Beschaffenheit der Halbleiterdicke und der angelegten Spannung abhängig, wodurch unterschiedliche Übergänge erzeugt werden können. Nach dem nachfolgenden Übergang vom Zustand 2 in den Grundzustand 1 wird das Elektron für einen weiteren Prozess durch Transport in den Grundzustand des wiederum anliegenden Halbleitermaterials (Injektor-Region) zurückgewonnen (Kaskadeneffekt), da die Energie des Überganges zum erneuten Tunneln ausreicht.

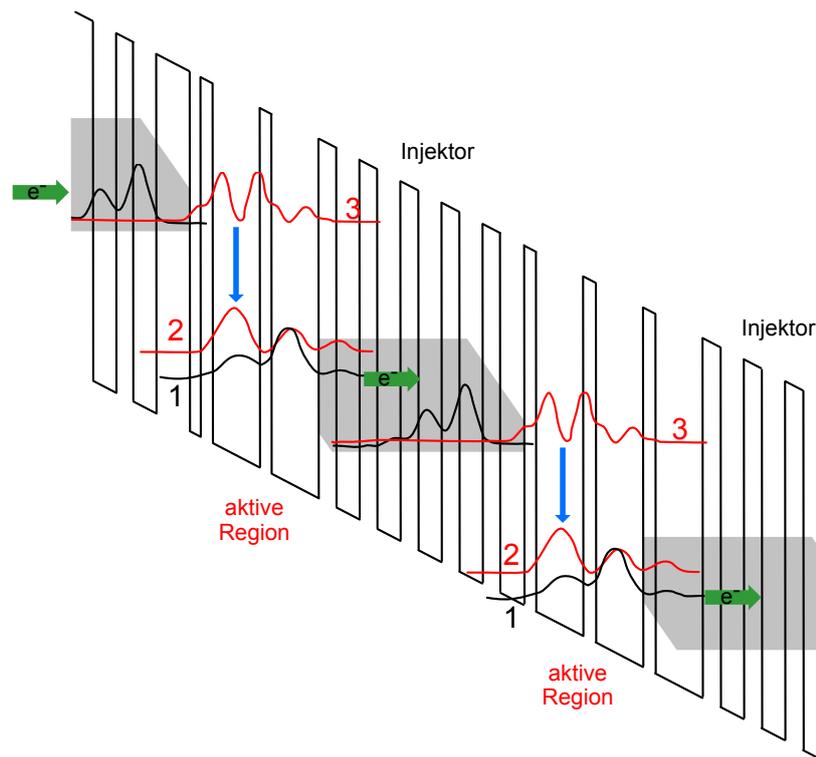


Abbildung 1.4: Übergänge und Funktionsweise eines Quantenkaskadenlasers [61].

Diese Struktur ermöglicht die Konstruktion von durchstimmbaren Lasern im mittleren Infrarot- und Terahertz-Bereich, welche bei Raumtemperatur betrieben werden können.

1.1.7 Rasterkraftmikroskopie

Bei Rasterkraftmikroskopie (kurz AFM von engl. *atomic force microscopy*) handelt es sich um ein Verfahren, mit dem das Kraftprofil von Oberflächen gemessen werden kann [62]. Ein Laser ist auf eine Blattfeder (den sogenannten Cantilever) gerichtet. Die Reflexion der Laserstrahlung wird von einer Photodiode detektiert und über das Maß der Auslenkung die Probendicke bestimmt. Am Cantilever befindet sich eine Spitze, welche zur Probe gerichtet ist. Diese Spitze wechselwirkt mit der Probe, führt so zu einer Verbiegung des Cantilevers und damit zu einer veränderten Reflexion des Laserstrahls. Diese Wechselwirkung kann mithilfe des Lennard-Jones-Potentials beschrieben werden: Bei einem geringen Abstand zwischen AFM-Spitze und Probe dominieren repulsive Kräfte, mit zunehmendem Abstand überwiegen die attraktiven Wechselwirkungen und bei einem sehr großen Abstand geht die Stärke der Wechselwirkungen gegen Null [63].

Es kommen verschiedene Betriebsmodi zum Einsatz: Bei dem in dieser Arbeit genutz-

ten Kontaktmodus befindet sich die Spitze in direktem Kontakt zur Probenoberfläche. Der Abstand zwischen Spitze und Probe ist in diesem Modus so gewählt, dass die repulsiven Kräfte dominieren. Durch Änderung der Wechselwirkungen der Probe, z.B. durch die Topographie, wird der Cantilever unterschiedlich stark ausgedehnt. Beim dynamischen Kontaktmodus, auch Tapping-Modus genannt, schwingt die Spitze nahe ihrer Eigenfrequenz, wodurch ein Anhaften an der Probe verhindert wird [64]. Das dritte Verfahren (nicht-Kontakt-Modus) ist ohne direkten Kontakt zur Probenoberfläche und misst die Auswirkungen der Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probenoberfläche auf die Schwingung der Spitze, welche bei geringem Abstand detektiert werden können [65].

1.1.8 Photothermische Expansionsspektroskopie (AFM-IR)

Bei photothermischer Expansionsspektroskopie handelt es sich um die Kombination aus Rasterkraftmikroskopie und IR-Absorptionsspektroskopie. Sie wird zum Unterschreiten der durch IR-Spektroskopie gegebenen Auflösungsgrenze ($\lambda/2$) genutzt [9, 10]. Die Spitze schwingt in ihrer Resonanzfrequenz. Ein durchstimmbarer, gepulster IR-Laser wird auf die Probe unterhalb der AFM-Spitze fokussiert. Wird ein Laserpuls von der Probe absorbiert und führt zu einer Schwingungsanregung, nimmt durch die Wechselwirkungen der vorliegenden Moleküle die lokale Temperatur der Probe zu. Die Erhöhung der Temperatur führt zu einer photothermischen Ausdehnung und stößt die Spitze an. Die Amplitude der gemessenen dynamischen Ausdehnung ist proportional zu der Menge der absorbierten Strahlung.

Die absorbierte Leistung [66] kann mithilfe der Formel

$$P_{\text{abs}} = \int_V \frac{\pi c \epsilon_0}{\lambda} \text{Im}(\tilde{\nu}) ||E_{\text{lok}}||^2 dV \quad (1.13)$$

bestimmt werden. Hierbei ist ϵ_0 die Dielektrizitätskonstante des Vakuums, E_{lok} das elektrische Feld innerhalb der Probe und V das untersuchte Volumen. Unter zwei Bedingungen lässt sich die Formel 1.13 vereinfachen: wenn die Absorption gering ist und damit der Realteil des Brechungsindex $\text{Re}(n)$ viel größer als der Imaginärteil $\text{Im}(n)$ ist und wenn sich das elektrische Feld der Probe nicht ändert. Dies ist gegeben, wenn der Radius der gemessenen Struktur deutlich kleiner als die Wellenlänge ist.

$$P_{\text{abs}} = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{9\text{Im}(n)\text{Re}(n)}{(\text{Re}(n)^2 + 2)^2} |E_{\text{einf}}|^2 V \quad (1.14)$$

1 Theoretische Grundlagen

Hierbei ist E_{einf} das einfallende elektrische Feld. Da der Realteil auch bei sich ändernder Wellenlänge nahezu konstant ist, ergibt sich:

$$P_{\text{abs}} = I_{\text{einf}} \alpha_{\text{opt}} \frac{\text{Im}(n)}{\lambda} V \quad (1.15)$$

I_{einf} ist die einfallende Intensität und α_{opt} fasst alle optischen Parameter und Konstanten zusammen. Aus dieser Gleichung ergibt sich folgende Proportionalität:

$$P_{\text{abs}} \propto \tilde{\nu} \text{Im}(\tilde{\nu}) \propto A \quad (1.16)$$

Es soll nun gezeigt werden, dass die Ausdehnung der Probe bei photothermischer Expansion proportional zur Absorption ist:

$$\rho_{\text{Sphäre}} C_{\text{Sphäre}} \frac{\delta T}{\delta t} = k_{\text{Sphäre}} \Delta T + \frac{\Pi(t_p) \cdot P_{\text{abs}}}{V} \quad (1.17)$$

Die Dichte ρ , die Wärmekapazität C und die Wärmeleitfähigkeit k beziehen sich auf die untersuchte Sphäre, T ist die Temperatur, t die Zeit und Π ist die Rechteckfunktion eines gepulsten Laserstrahls mit einer Pulslänge t_p . Für einen kurzen Puls, welcher viel kürzer als die Relaxationszeit der Probe τ_{relax} ist, ergibt sich für die maximale Temperatur T_{max} :

$$T_{\text{max}} = \frac{P_{\text{abs}} t_p}{\rho_{\text{Sphäre}} C_{\text{Sphäre}} V} \quad (1.18)$$

Aus der Formel

$$\frac{da(t)}{a} = \frac{\alpha_{\text{Sphäre}}}{3} T(t) \quad (1.19)$$

ergibt sich, dass die maximale Ausdehnung der Probe zum Zeitpunkt der maximalen Temperatur erreicht ist. Hierbei ist a der Radius und α der thermische Ausdehnungskoeffizient. Somit ergibt sich folgende Proportionalität:

$$\text{Photothermische Expansion der Probe} \propto P_{\text{abs}} \propto \tilde{\nu} \text{Im}(\tilde{\nu}) \propto A \quad (1.20)$$

Die Proportionalität der photothermischen Expansion und der Absorption zeigt einen von jedem Signal abhängigen Proportionalitätsfaktor, je nach dem wie stark eine angeregte Schwingung zu einer Erwärmung des Systems führt. Dadurch können Intensitätsabweichungen zwischen einem klassischem IR-Spektrum und AFM-IR-Spektrum auftreten.

Mithilfe der gemessenen Ausdehnung nach der Bestrahlung der Probe mit verschiedenen Wellenlängen und der bekannten energieabhängigen Leistung der Strahlungsquelle lässt sich ein AFM-IR-Absorptionsspektrum berechnen.

Ein Vorteil gegenüber der klassischen IR-Spektroskopie ist eine Verbesserung der

1 Theoretische Grundlagen

Ortsauflösung entlang der Probenoberfläche [9], da nur der Bereich, welcher sich unterhalb der AFM-Spitze befindet, untersucht wird. Die Ortsauflösung beträgt demnach von 100 nm bis zu 10 nm. Nur in Richtung der Probendicke ist die Ortsauflösung gegenüber klassischer IR-Experimente unverändert bei mehreren Mikrometern. Die Ortsauflösung entlang der Probendicke kann durch das Verwenden dünnerer Proben in Kombination mit schwach-absorbierenden Trägermaterialien verbessert werden.

Ein schematischer Aufbau des AFM-IR-Experiments ist in Abbildung 1.5 dargestellt. Mithilfe des Laser A, welcher auf die Blattfeder (Cantilever, B) gerichtet ist und dessen Reflexion von der Photodiode (D) gemessen wird, wird die Auslenkung der Spitze (C) gemessen. Diese befindet sich in Kontakt mit der Probe E, welche durch einen durchstimmbaren, gepulsten IR-Laser angeregt wird. Aus der Änderung der Auslenkung bei unterschiedlichen Energien kann ein lokales AFM-IR-Spektrum erzeugt werden.

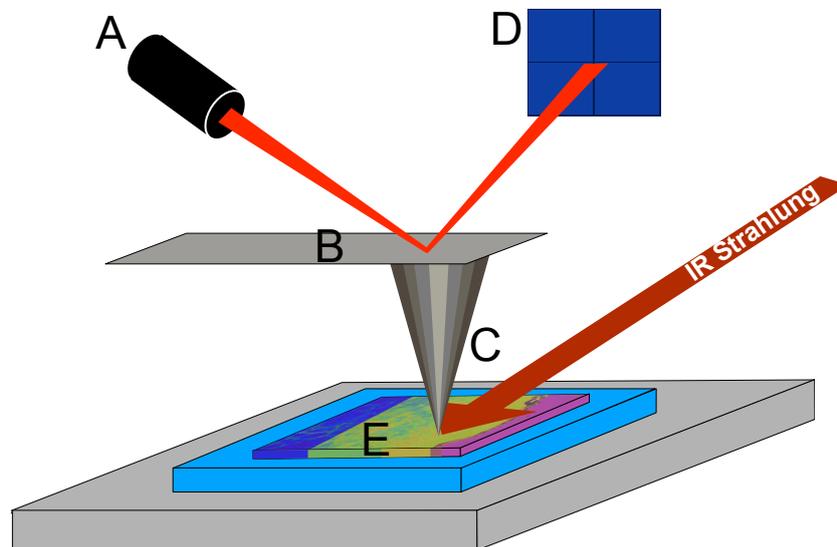


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des AFM-IR-Experiments
A: (Deflection-)Laser, B: Cantilever, C: AFM-Spitze, D: Photodiode, E: Probe auf einem Siliciumsubstrat (blau).

Durch die Bewegung der Probe können Absorptionsverteilungen von einzelnen Wellenzahlen erzeugt oder auch hyperspektrale Messungen (Punkt-für-Punkt) gemessen werden. In dieser Arbeit werden neben Einzelspektren vor allem hyperspektrale Messungen genutzt.

1.2 Biologische Grundlagen

1.2.1 SCC-25-Kollagen-Zellkultur

Bei der untersuchten drei-dimensionalen Zellkultur handelt es sich um eine Kombination aus einer SCC-25-Zellschicht auf der einen und Rinderkollagen auf der anderen Seite [67]. Bei den SCC-25-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie des menschlichen Plattenepithelkarzinoms des Kopfes und Halses (HNSCC) [20, 21]. HNSCC gehört zu den sechst häufigsten Tumorsorten und hat eine Sterblichkeitsrate von 50% [22]. Etwa 90% der HNSCCs zeigen eine Expression des epidermalen Wachstumsfaktors.

Bei Kollagenen handelt es sich um eine Proteinstruktur, die u.a. in Haut, Knochen und großen Blutgefäßen zu finden ist [68, 69]. Hierbei besteht eine Kollagenstruktur aus 600 bis 3000 verknüpften Aminosäuren, wobei Untereinheiten aus 50 bis 250 Aminosäuren bestehen. Kollagene bilden eine Triple-Helix aus und haben durch inter- und intramolekulare Vernetzungen eine hohe Stabilität.

Die genutzte Tumorzell-Kollagen-Zellkultur dient zur Simulation, um die Unterschiede an einem einfachen Modell zwischen einer systemischen und einer topischen Behandlung betrachten zu können. Der Kollagenbereich des Modells hat Kontakt zu einem Nährmedium [67]. Wirkstoff, welcher in des Nährmedium gegeben wird, verhält sich so wie eine systemische Behandlung: Dieser muss durch das Kollagen transportiert werden, um zu den Tumorzellen zu gelangen. Ein direktes Auftragen des Wirkstoffs auf die Zellen stellt dazu im Gegensatz eine topische Behandlung dar.

1.2.2 Aufbau menschlicher Haut

Das größte Organ, die menschliche Haut, hat eine Fläche von 1.8 bis 2 m² [70]. Neben der hauptsächlichen Barrierefunktion gegen äußere Einflüsse, welche in Kapitel 1.2.3 gesondert behandelt werden, soll die Haut den Wasserverlust des Organismus' regulieren und dient als physikalischer und mechanischer Schutz für die inneren Organe [70].

Die Haut besteht aus zwei Schichten, wie in Abbildung 1.6 ① zu sehen: die Dermis (Lederhaut, D) und die Epidermis (Oberhaut). Innerhalb der Dermis befinden sich zwei Arten [71] von kleinen Blutgefäßen, wovon eine an Organen und die andere für die Region der Dermis in der Nähe von Schweißdrüsen spezifisch sind.

1 Theoretische Grundlagen

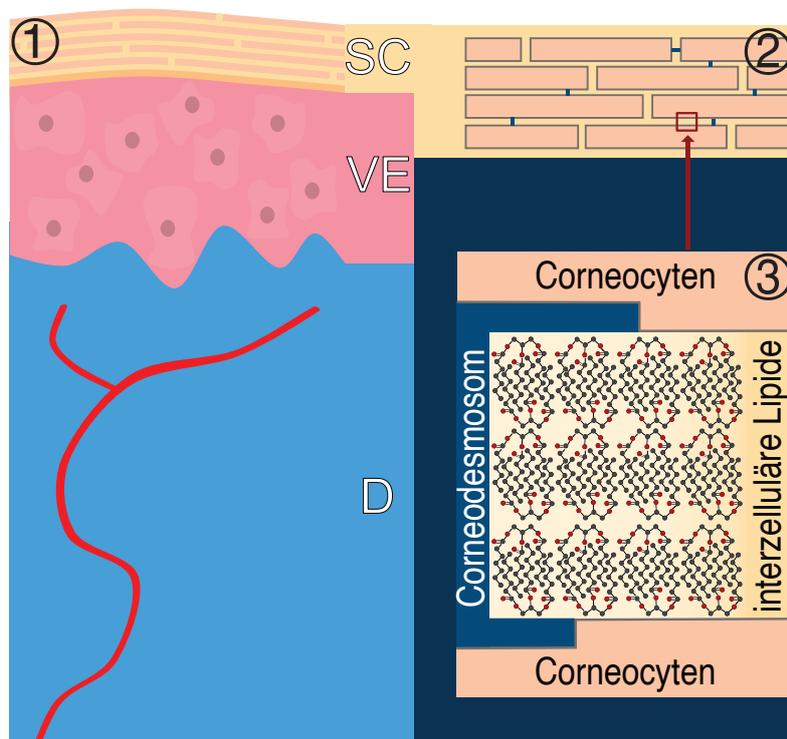


Abbildung 1.6: ① Schematischer Aufbau der Haut, D = Dermis, VE = viable Epidermis, SC = Stratum Corneum, ② Ziegelstein-Mörtelmodell [72] des Stratum Corneums mit Corneocyten als Ziegelsteine und Lipide als Mörtel, ③ Vergrößerung eines Lipidkanals.

1 Theoretische Grundlagen

Die Epidermis lässt sich in einen Bereich mit lebenden Zellen, der sogenannten viablen Epidermis (VE), und einen Bereich mit abgestorbenen Zellen, des sogenannten Stratum Corneums (Hornschicht, SC) aufteilen. Die viable Epidermis teilt sich wiederum in das Stratum Granulosum, das Stratum spinosum und das Stratum basale auf [73]. Das Stratum basale dient als Verankerung zwischen Dermis und Epidermis [74, 75]. Zellen im Inneren des Stratum spinosum weisen eine stärkere Faltung auf als Zellen am Übergang und im Stratum Granulosum. Das Stratum Granulosum enthält eine proteinreiche Struktur, die Zonula occludens (engl. Tight Junctions) [76]. Beim Übergang von Stratum Granulosum in das Stratum Corneum werden lebende Zellen zu toten Zellen, welche mit Keratin gefüllt sind, umgewandelt [73].

Der Aufbau des Stratum Corneums lässt sich durch das Ziegelstein-Mörtel-Modell [72] beschreiben (siehe Abbildung 1.6 ②): Die 15-20 abgestorbenen Zellschichten [77], bestehend aus lang gestreckten Zellen, den Corneocyten, sind wie Ziegelsteine angeordnet. Zwischen den Zellen befinden sich Lipide, welche im Modell dem Mörtel entsprechen. Als zusätzliche Stabilisatoren dienen Proteine (Corneodesmosomen), die die Corneocyten zusammenhalten (vgl. Abbildung 1.6 ③).

Die Lipidschichten bestehen zu einem überwiegenden Anteil aus neutralen Lipiden, wie z.B. freie Sterole, freie Fettsäuren, Triglyceride, Sterolester und Squalen [78]. Zusätzlich beinhalten die Lipide auch Sphingolipide, polare Lipide und Cholesterolsulfate. Die Haut setzt sich aus den Elementen Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff zusammen; die drei Hautproben aus dem Übersichtsartikel von H. Q. Woodard *et al.* haben durchschnittlich eine Zusammensetzung von $C_{31}H_{50}N_5O_8$ [79]. Es gibt von Organismus zu Organismus Schwankungen in der absoluten Zusammensetzung. In geringeren Mengen können Natrium, Phosphor, Schwefel, Chlor und Kalium nachgewiesen werden. Das Konzentrationsprofil über die Tiefe der Haut wurde mithilfe von Elektronensondenanalyse bestimmt [80]: Hierbei lassen sich die maximalen Konzentrationen von Natrium im oberen Stratum Corneum, von Phosphor in der viablen Epidermis, von Schwefel, von Chlor und Kalium im Stratum Corneum finden. Kalium zeigt ein Minimum im unteren Stratum Corneum und eine Zunahme im Stratum Granulosum und der viablen Epidermis.

1.2.3 Die Haut als Barriere gegen das Eindringen von Wirkstoffen

Die Haut wirkt als Barriere gegen physikalische Partikel, biochemische Substanzen aus der Umwelt, Mikroorganismen und UV-Licht und stellt dadurch gleichzeitig beim Auftrag von Wirkstoffen, die durch die Haut transportiert werden sollen, ein Hindernis dar [11, 12]. J. Bos und M. Meinardi [2] haben als Faustformel die 500-Da-Regel eingeführt, welche besagt, dass Substanzen mit einer molekularen Masse von maximal 500 Da die Haut bei einer topischen Therapie durchdringen können. Hierbei stehen den Wirkstoffen verschiedene Wege des Transports zur Verfügung: Transepidermal, über Schweißdrüsen und über Haarfollikel [81]. Vergangene Untersuchungen zeigten, dass Haarfollikel neben einem besseren Transport von Wirkstoffen und Nanopartikeln gegenüber dem transepidermalen Weg auch eine Funktion als Reservoir übernehmen können [82, 83, 84].

Schweißdrüsen haben aufgrund ihres kleinen Anteils zur Hautoberfläche einen geringen Einfluss auf den Wirkstofftransport durch die Haut [85, 86].

Der transepidermale Weg teilt sich in den interzellulären und den transzellulären Weg auf (vgl. Abbildung 1.7) [77]. Der transzelluläre Weg ist hierbei sehr unwahrscheinlich, da die Membranen der Corneocyten überwunden werden muss. Das Eindringen einer Substanz über den interzellulären Weg erfordert hingegen nur eine Veränderung der Struktur der Lipiddoppelschicht und ist somit leichter zugänglich [87]. Hierbei gilt allgemein: Je größer der Lipidanteil am Stratum Corneum und je lipophiler der Wirkstoff (große $\log P$), desto besser der Transport [78, 88]. Am Übergang zwischen Stratum Corneum und viabler Epidermis befindet sich das Stratum Granulosum. Die darin enthaltenen Keratinozyten enthalten an den Zellgrenzen eine Proteinstruktur (Zonula occludens bzw. engl. Tight Junctions), welche die parazellulären Permeabilität der Region reduziert und dadurch als Barriere wirkt [76].

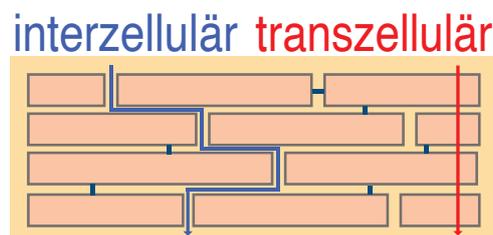


Abbildung 1.7: Transdermale Transportwege von Wirkstoffen, Nanocarriern und anderen Substanzen durch das Stratum Corneum.

Um Wirkstoffe, die die 500 Da Grenze überschreiten, effektiv durch die Haut transportieren zu können, kann die Transporteigenschaft der Haut durch physikalische Beschädigungen [13] (z.B. Tape-Stripping) oder die Formulierung [15], also die Darreichungsform aus Wirkstoff und Trägermedium, verbessert werden: Durch den Einsatz von Wasser kann der Wassergehalt des Stratum Corneums um 400% erhöht werden,

1 Theoretische Grundlagen

wodurch der Transport von Wirkstoffen verbessert werden kann. Das Wasser liegt hierbei größtenteils als frei verfügbares, ungebundenes Lösungsmittel für den Wirkstoff vor. Ein ähnlicher Effekt wird erzielt, wenn die Haut von einem wasserundurchlässigen Film bedeckt ist (z.B. durch Fette, polymere Öle, Klebeband, Handschuhe etc.): Der durch Diffusion hervorgerufene Wasserverlust wird blockiert und es kommt ebenfalls zu einer Anreicherung von Wasser im Stratum Corneum (sogenannte Okklusion) [26]. Neben diesem Effekt lässt sich bei der Nutzung von Vaseline zusätzlich beobachten, dass sie in das Stratum Corneum transportiert, dort mit den Lipidschichten in direkte Wechselwirkung tritt und den transdermalen Transport verstärkt [89, 90]. Sulfoxide wie DMSO ermöglichen eine Veränderung der Keratinstruktur der Haut und ermöglichen damit einen verbesserten Wirkstofftransport [91]. Durch das Eindringen in die Lipidstruktur und durch die Störung dieser wird der Transport von Wirkstoffen durch Laurocapram verbessert [15, 92]. Häufig werden Alkohole (u.a. Ethanol) zur Verbesserung des Wirkstofftransports durch die Haut eingesetzt. Er erhöht die Löslichkeit des Wirkstoffs in der Formulierung [93]. Verdunstet der Alkohol, wird die aufgetragene Lösung hochkonzentriert und begünstigt die Diffusion in die Haut [15]. Gleichzeitig erhöht in die Haut eingedrungenes Ethanol die Löslichkeit des Wirkstoffs im Gewebe [94]. Hydrogele auf Celluloseether-Basis verändern die Viskosität der vorliegenden Formulierung, die Auswirkung auf den Transport wird durch mehrere Faktoren beeinflusst: Die Erhöhung der Viskosität hat zum einen eine langsamere Freigabe des Wirkstoffs an die Haut zur Folge, zum anderen wird das Abfließen der Formulierung verhindert, damit die Aufnahmedauer des Wirkstoffs erhöht und der Transport des Wirkstoffs in die Haut im Vergleich zu flüssigen Formulierungen verbessert [95]. Eine Korrelation zwischen dynamischer Viskosität einer HEC-Gel-Formulierung und der aufgenommenen Menge wurde nicht beobachtet.

Im Rahmen dieser Arbeit finden Proben Einsatz, welche mit Formulierungen auf Basis von Vaseline, Wasser, Ethanol und HEC Gel behandelt wurden. Bei dem verwendeten HEC Gel handelt es sich um Ethanol, welches mithilfe von Hydroxyethylcellulose eingedickt wurde, um ein kontrolliertes Auftragen des Wirkstoffs zu ermöglichen.

Die Barrierefunktion der Haut kann auch durch Erkrankungen verändert werden: So können Wirkstoffe und Nanopartikel das Stratum Corneum von Haut, welche mit Schuppenflechte erkrankt ist, verbessert durchdringen im Vergleich zu intakter Haut [96, 97]. Ursache hierfür ist eine veränderter Lipidzusammensetzung, die einen Einfluss auf die Barrierefunktion des Stratum Corneums hat [98]. Atopische Dermatitis zeigt ebenfalls eine Schwächung der Barrierefunktion, was auf den Einfluss von Serinprotease zurückzuführen ist, welche bei einer Entzündung gebildet werden (vgl. Kapitel 1.3.1) [99]. Für atopische Dermatitis liegt die Grenze für den Transport von Wirkstoffen in das Stratum Corneum nach J. Bos und M. Meinardi aufgrund dessen

1 Theoretische Grundlagen

nicht bei 500 Da, sondern bei 700 Da [2].

1.3 (Bio)chemische und pharmazeutische Grundlagen

1.3.1 Wirkungsweise von Serinprotease auf die Haut

Serinproteasen gehören zu den proteinspaltenden Enzymen, welche nicht nur bei Prozessen wie Blutgerinnung und Apoptose, sondern auch bei Entzündungen eine Rolle spielen [100]. Hierbei besitzt der gesunde Organismus Mechanismen, um einen erhöhten Proteasespiegel zu senken. Zu hohe Mengen von Serinprotease können Krankheiten wie Asthma, Metastasenbildung von Tumoren und Autoimmunerkrankungen zur Folge haben; zu niedrige Werte machen den Organismus anfällig gegenüber viralen Infektionen und kann bei Tumorerkrankungen zu Auswüchsen führen [100].

Auch durch äußere Einflüsse [101] wie z.B. UV-Strahlung, in durch Duftstoffe gereizte Haut oder bei entzündeter Haut wurde eine Anreicherung einer trypsin-ähnlichen Protease beobachtet [18, 19]. Hierbei stimuliert ein erhöhte pH-Wert die Serinprotease-Produktion [102, 103]. Beobachtungen haben bei längerer Einwirkung eine Beeinträchtigung der Permeabilitätsfunktion gezeigt. Durch eine starke Verbreitung der atopischen Dermatitis (15-30% der Kinder und 2-10% der Erwachsenen in Industrienationen) spielen Entzündungen und folglich auch der Einfluss von Serinprotease eine nicht zu vernachlässigende Rolle im Zusammenhang mit der Permeabilität der Haut [99].

1.3.2 Grundlagen der genutzten redoxsensitiven Transportnanocarrier

Neben der Möglichkeit den Transport eines Wirkstoffs durch eine Formulierung zu verbessern, gibt es die Möglichkeit die Wirkstoffe in polymere Strukturen einzubinden, welche den Wirkstoff transportieren können, ihn aber auch anschließend wieder freisetzen. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden hierfür Kern-Mehrschalen-Nanocarrier (kurz CMS-Nanocarrier von engl. *Core-Multishell*) von Frau Dr. Keerthana Rajes [27, 28] genutzt. Sie bestehen aus einem dendritischen Kern, der mit linearen Funktionen substituiert ist. Als Kern kam hoch-beladenes Polyglycerol (Abbildung 1.8: hPG) nach S. Roller et al. [104] zum Einsatz.

1 Theoretische Grundlagen

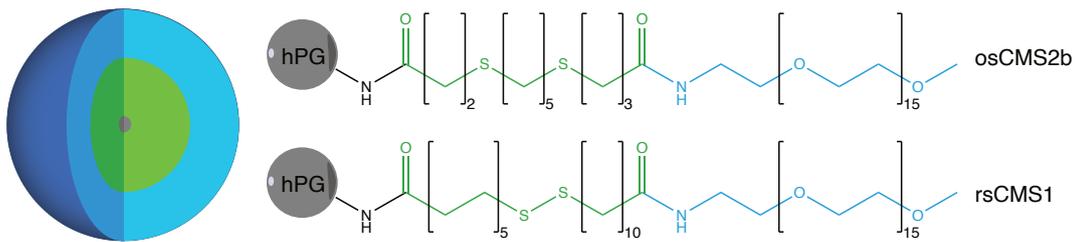


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der Core-Multishell-Nanocarrier (links) mit Farbcodes bezüglich der chemischen Struktur der Einzelketten (rechts) [27, 28].

Die Seitenketten sind in Abbildung 1.8 für beide genutzten Nanocarrier dargestellt. Der oxidationsempfindliche Nanocarrier osCMS 2b [27] wurde entwickelt, um Wirkstoffe in entzündeten Regionen der Haut freizusetzen. Der Nanocarrier hat eine Masse von 54 kDa (NMR) und einen Durchmesser von 8.6 nm (Bestimmung mittels DLS) [27]. Mithilfe des Farbstoffes meso-tetra(*m*-hydroxyphenyl)-Prophyrin (*m*THPP) konnte gezeigt werden, dass eine kontrollierte Freisetzung in Haut mit Vorbehandlung durch Serinprotease oder Dibenzoylperoxid (DBPO) möglich ist und in unbehandelter Haut keine Freisetzung erfolgte [27]. *In vitro*-Untersuchungen einer Reaktion der Nanocarrier mit Wasserstoffperoxid in Kombination mit quantenmechanischen Rechnungen konnten zeigen, dass die Zersetzung durch die Abspaltung von Schwefeldioxid durch einen Bindungsbruch bei den Sulfonen oder bei den Peptiden stattfinden kann [27]. Hierbei zeigte sich, dass das Produkt der Peptidspaltung die höchste Langzeitstabilität zeigen konnte.

Der reduktionssensitive Nanocarrier rsCMS 1 [28] soll den Wirkstoff in reduktiv wirkenden Regionen freisetzen; ermöglicht wird dies durch den Einsatz von Disulfidbrücken. Die experimentell bestimmte Masse (NMR) beträgt 106 kDa, der Durchmesser beträgt 9.3 nm (DLS) [28]. Eine Aufnahme der Nanocarrier in die Haut konnte mithilfe des kovalenten Labels Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und mit einer Beladung *m*THPP beobachtet werden [28].

Bisher sind keine toxikologischen Daten beider Nanocarrier bekannt. Ein vergleichbarer, esterbasierter CMS-Nanocarrier hat beim Vergleich mit Nanocarrier behandelter und unbehandelter OKG4 Zellen keine Zytotoxizität gezeigt [105].

1.3.3 Rapamycin

Rapamycin (Sirolimus bzw. SRL) ist ein lipophiles Makrolid [106] (Struktur [23, 24] vgl. Abbildung 1.9) mit der Summenformel $C_{51}H_{79}N_1O_{13}$ (ca. 914.17 Da) und einem Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient $\log P = 4.3$ [107]. Es besitzt Kohlenstoff-Kohlenstoff-Einfach- und Doppelbindungen, sowie als funktionelle Gruppen Hydroxy-, Ether-, Carbonyl-, eine Carbonsäureester-Gruppe und ein tertiäres Amin.

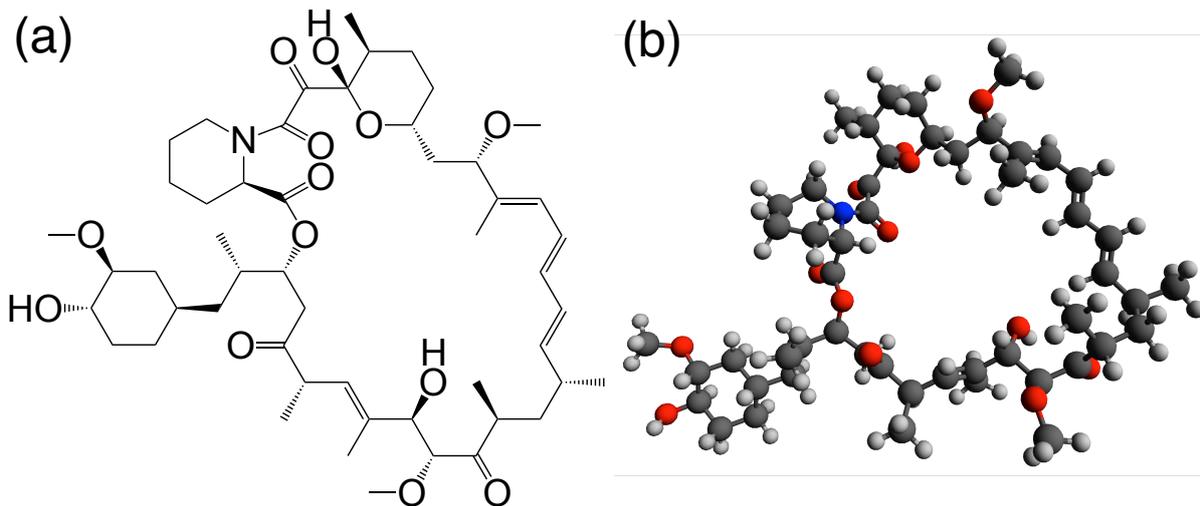


Abbildung 1.9: (a) Chemische Struktur des Wirkstoffs Rapamycin [23, 24], (b) 3-dim. geometrische Optimierung der Struktur (HF TZVP) [56, 57].

Zuerst wurde es aus der Bakterienart *Streptomyces hygroscopicus* isoliert, welche in Erdproben von der Osterinsel vorgefunden wurde [106]. Es liegt als weißer, kristalliner Feststoff [108] mit einem Schmelzpunkt von 183 – 185 °C vor. Es lässt sich unter anderem leicht in Ethanol und Methanol, aber nur schwer in Wasser lösen. Der Wirkstoff hat starke immunsuppressive Wirkungen [23] durch Interaktion mit den FK506 Bindungsproteinen (FKBPs). Funktionell lässt sich das Molekül in zwei Regionen [23, 109] einteilen: Die erste Region begünstigt die Bildung des Komplexes mit FKBP12 [110], die zweite Region kann nach erfolgreicher Komplexierung mit dem mTOR (mammalian target of rapamycin) wechselwirken. Durch die Interaktion mit mTOR wird die Zelle in einen molekularen Hungerzustand versetzt, in welchem die Translation von mRNA zu Proteinen verhindert wird. Rapamycin blockiert die 70-kDa S6-Kinase (p70sk6) und verringert damit die Translationsinitialisierung der mRNA. Zusätzlich beeinflusst der Wirkstoff Zellwachstumsregulatoren und weitere Translationsinitiatoren. Durch diese Interaktionen [111, 112, 110] wird der Übergang von der G1- in die S-Phase im Zellzyklus der Interleukin-2 stimulierten T-Lymphozyten (T-Zellen) blockiert. Damit unterscheidet sich Rapamycin von anderen Immunsuppressiva [23], welche den Übergang zwischen G0 und G1 blockieren. Rapamycin hemmt ebenfalls die mRNA Genexpression 40 des Tumornekrosefaktors- α , Interleukins-8 und Interleukins-6.

1 Theoretische Grundlagen

Es wurde ein verlangsamender Einfluss [113] von Rapamycin auf die Wirkung der B-Lymphozyten, welcher zur Zellteilung führt, dokumentiert. Jedoch wurde kein untersuchter Weg vollständig gehemmt und Rapamycin führt nicht zum Zelltod.

Aufgrund der immunsuppressiven Wirkung wird Rapamycin zur Unterdrückung der Immunantwort bei Transplantationen [23, 114, 115] eingesetzt. In der Krebstherapie [116] hat Rapamycin bei Tumoren der Milchdrüse und des Colons eine Wirkung. Ebenso wurde das Potenzial durch den Einfluss auf Calcineurin erforscht [110]. Die anti-viralen Eigenschaften, die Rapamycin im Zusammenhang mit Hepatitis C [117] gezeigt hat, könnten auch auf andere Viren, z.B. SARS-CoV-2 [118], übertragbar sein. Es sind antibiotische und antifungale Wirkungen [106, 108, 119] bekannt, ebenso zeigt Rapamycin verlangsamenden Einfluss auf die Alterung der Haut [120].

Rapamycin wurde pharmakokinetisch untersucht [121, 122]. Es zeigte eine Bioverfügbarkeit von 15%, welche sich bei Tierversuchen nicht linear zur eingesetzten Dosis verhielt: Kleinere Konzentrationen zeigten relativ zur eingesetzten Masse einer höhere Bioverfügbarkeit. Die terminale Halbwertszeit betrug bis 16.2 Stunden, ein Unterschied zwischen beiden Geschlechtern konnte hierbei nicht festgestellt werden. Der Abbau des Wirkstoffs erfolgt mithilfe des Cytochroms P450 3A. Als Wirkung konnten eine Reduzierung der Abstoßungsepisoden bei transplantierten Organen beobachtet werden, damit einhergehend wurden Thrombozytopenie (verringerte Anzahl an Blutplättchen), Leukozytopenie (verringerte Anzahl an weißen Blutkörperchen) und Hyperlipoproteinämie (erhöhter Cholesterinwert) als Nebenwirkungen beobachtet. Die Nebenwirkungen verschwanden zwei Wochen nach Absetzen des Medikaments. Für eine Organtransplantation werden typischerweise 5 – 10 g/L (Blut) Rapamycin eingesetzt, jedoch nicht mehr als 60 g/L, um die körpereigene Abwehr gegen Infektionen nicht zu verhindern.

In Rahmen dieser Arbeit ist besonders die Wirkung von Rapamycin auf erkrankte Haut von Interesse: So zeigen durch Psoriasis (Schuppenflechte) erkrankte viable Epidermen eine Aktivierung des mTOR [123, 124]. Ebenso zeigen die Hautkrankheiten allergisches Kontaktekzem (ACD) und allergisches Ekzem (AD) einen erhöhten mTOR Spiegel [1]. Eine Behandlung von Psoriasis mithilfe von Rapamycin [96] zeigte hierbei therapeutische Erfolge, welche jedoch stark von der Zugänglichkeit des Wirkungsortes für den Wirkstoff abhängig sind.

1.3.4 Cetuximab

Cetuximab ist ein chimärer (Mensch-Maus) monoklonaler Antikörper [29], der in der Krebsimmuntherapie zum Einsatz kommt. Der Antikörper bindet an die extrazelluläre Domäne des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR von engl. *epidermal growth factor receptor*, Dissoziationskonstante 0.39 nmol/L) [29, 125, 126] und hemmt die Bindung von Liganden an das EGFR und dessen Dimerisierung vollständig. Ebenso sind hemmende Wirkungen an TFG-alpha bekannt [127].

Cetuximab wird in Zellkulturen von Säugetieren gewonnen [128]. Eine mit dem SWISS-Model [129, 130, 131, 132, 133] erzeugte Struktur des Wirkstoffs ist in Abbildung 1.10 dargestellt.

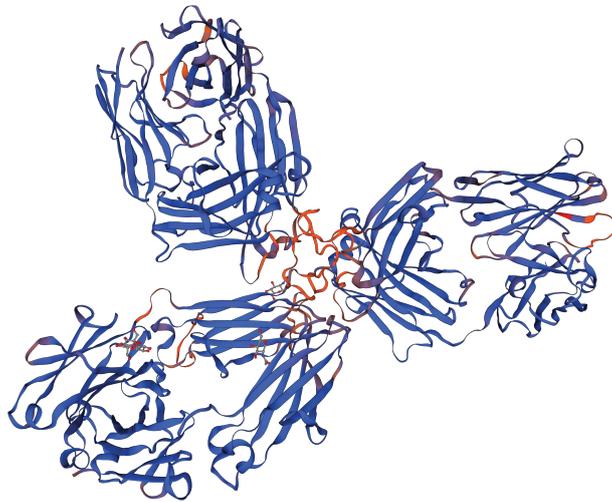


Abbildung 1.10: Swiss-Modell [129, 130, 131, 132, 133] der Struktur des Wirkstoffs Cetuximab.

Es handelt sich hierbei um ein Peptid aus kanonischen Aminosäuren [134] mit einer molekularen Masse von etwa 152 kDa [128]. Der Antikörper findet Anwendung zur Behandlung des Plattenepithelkarzinoms des Kopfes und Halses [29] und zeigt auch eine Verbesserung der Überlebenschancen bei Dickdarmkrebs [135].

Bei der Untersuchung der Toxizität von Cetuximab waren die beiden häufigsten Nebenwirkungen Ausschlag und Kopfschmerzen [29, 136]. Ein Patient zeigte eine Überempfindlichkeitsreaktion dritten Grades, ebenso ist der Herz-Lungen-Stillstand als seltene Nebenwirkung bekannt. In seltenen Fällen wurden Antikörper gegen den Wirkstoff Cetuximab gebildet. Pharmakokinetische Untersuchungen der gleichen Studie zeigten ein Maximum an Wirkstoffkonzentration 3 Stunden nach Wirkstoffgabe. Bei einer Wirkstoffkonzentration von 50 mg/m² betrug die terminale Halbwertszeit (27.6 ± 8.4) Stunden, bei einer Gabe von 500 mg/m² (132 ± 94) Stunden [136]. Cetuximab konnte nach 3 – 4 Tagen bei einer Gabe von 50 mg/m² nicht mehr nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich für Dosen bis 100 mg/m² ein linearer Abbau des

Wirkstoffs, bei Dosen oberhalb dieses Wertes zeigte sich eine schnelle Abbaurrate, welche von einer langsameren Michaelis-Menten-Kinetik gefolgt wurde. Die Verarbeitung des Wirkstoffs durch die Nieren (Clearance) erfolgt nach aktuellem Wissensstand über eine Internalisierung des Antikörper-Rezeptor-Komplexes [29].

1.3.5 Docetaxel

Der Wirkstoff Docetaxel gehört in die Klasse der antineoplastischen Wirkstoffe [31, 32, 33]. Das Vorläufermolekül wird aus der Europäischen Eibe gewonnen und zu Docetaxel umgesetzt. Die Struktur ist in Abbildung 1.11 dargestellt. Die Masse beträgt 807.9 Da. Das Molekül zeichnet sich durch folgende funktionelle Gruppen aus: Ester-, Carbonyl-, Hydroxy-Gruppen, ebenso sind ein zyklischer Ether und eine Peptidbindung enthalten.

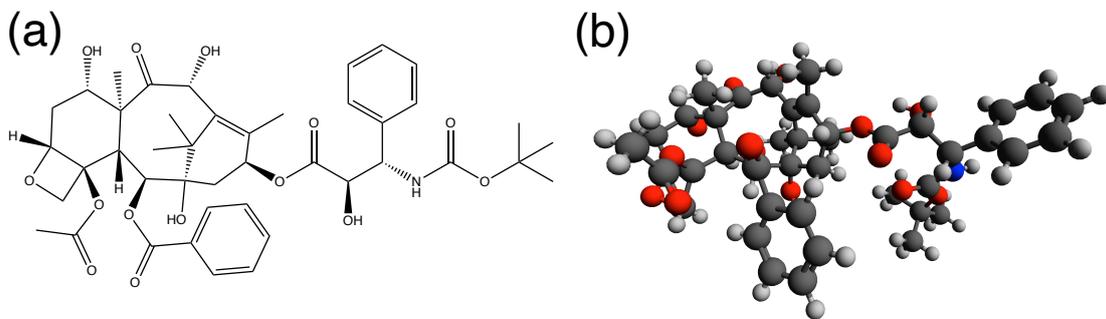


Abbildung 1.11: (a) Struktur des Wirkstoffs Docetaxel [31, 32, 33],
(b) 3-dimensionale geometrische Optimierung der Struktur (HF TZVP) [56, 57].

Er findet bei nicht-kleinzelligem Lungenkrebs und bei lokal fortgeschrittenem oder metastasierendem Brustkrebs in der Behandlung einzeln oder in Kombination (z.B. mit Doxorubicin) mit anderen Wirkstoffen Anwendung. Hierbei führt Docetaxel zu mehreren Effekten: Es verhindert die Zellteilung und kann zum Zelltod durch Apoptose (einer Art Selbstzerstörung) und Zellyse (Zerfall der Zellmembran) führen. Ebenso phosphoryliert der Wirkstoff das Apoptose-blockierende Onkoprotein bcl-2 und er hat antiangiogene Eigenschaften. Der Hauptmechanismus bei Docetaxel ist eine Unterbrechung des mikrotubulären Netzwerkes. Hierbei fördert und stabilisiert Docetaxel den Zusammenbau der Mikrotubuli, behindert dann jedoch die Depolymerisation. Es verhindert das Bilden der normalen mitotischen Spindel und kann zum Bruch von Chromosomen führen. Hierbei kommt es zur Unterbrechung der Zellreplikation und -migration [137] und der Zellzyklus wird am G2/M-Übergang gestoppt [138].

Die Empfohlene Dosis beträgt 100 mg/m², wovon 93 bis 94% an Proteinen gebunden wird. Der Wirkstoff wird durch Cytochrom P450 3A4 Isoenzym zu 4 inaktiven Metaboliten metabolisiert und anschließend über den Gallenweg ausgeschieden. Die Le-

1 Theoretische Grundlagen

berfunktion hat dennoch ebenfalls einen Einfluss auf die Ausscheidung des Wirkstoffs. 3.5 bis 4% des aufgenommenen Wirkstoffs wurde unverändert ausgeschieden. Die terminale Eliminierungshalbwertszeit beträgt 11.4 bis 18.5 Stunden und die Plasmaausscheidung (Clearance) 17.0 bis 22.4 L/(h · m²).

Typische Nebenwirkungen einer Docetaxel-Behandlung sind neben Haarausfall, Durchfall und Fieber auch die Abnahme der neutrophilen Granulozyten im Blut (Neutropenie).

2 Experimentelle Methoden und Grundlagen der Datenverarbeitung

In dieser Arbeit wurden zum orts aufgelösten Nachweis des Wirkstoffs Rapamycin in Proben menschlicher Haut zwei unterschiedliche Messmethoden genutzt: zum einen die Rastertransmissionsröntgenmikroskopie (STXM von engl. *scanning transmission X-ray microscopy*) auf Basis des NEXAFS-Absorptionsspektrums an der O-1s Kante mit einer Ortsauflösung bis minimal 50 nm, zum anderen die infrarotspektroskopie-basierte Rasterkraftmikroskopie (AFM) mit einer minimalen Auflösung von ca. 10 nm (entspricht dem Durchmesser der AFM-Spitze).

Auf Basis der aufgenommenen Daten sollen die relativen Verteilungen und ggf. die absoluten Mengen der Substanzen identifiziert werden. Hierbei ist jede Substanz durch ihre spektralen Eigenschaften ihr eigener Marker - Fremdmoleküle, welche die räumliche Verteilung beeinflussen können, kommen nicht zum Einsatz.

Im Rahmen dieses Kapitels werden neben den experimentellen Methoden auch die Schritte dargestellt, welche zur Datenverarbeitung notwendig sind und welche von externen Quellen zur Probenvorbereitung durchgeführt wurden. Die eigentliche Interpretation dieser Daten erfolgt in den folgenden Kapitel 4 und 5.

2.1 Präparation biologischer Proben

2.1.1 Präparation der Hautproben

Für die verwendeten Proben wurde Haut des Bauches, der Brust und des Oberschenkels von verschiedenen anonymen Spendern genutzt. Diese hatten der Spende vorher zugestimmt. Die Studien wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Deklaration von Helsinki durchgeführt und von der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin (Deutschland) genehmigt (Genehmigung EA1/135/06, erneuert im Januar 2019).

Die Probenbehandlung, das Fixieren, Einbetten und Schneiden wurde von der Charité Berlin durchgeführt. Wenige Stunden nach Entnahme der Haut wurde diese für die Experimente verwendet. Das subkutane Fett wurde entfernt und die Haut anschließend in 2.25 cm² große Quadrate geschnitten.

Proben, welche mit Serinprotease behandelt werden sollten, wurden mit 50 µL CHCl₃/CH₃OH gereinigt. Die Lösung wurde auf eine Finnenkammer-Papierscheibe gelegt

2 Experimentelle Methoden und Grundlagen der Datenverarbeitung

und für 1 min auf die Probenoberfläche gelegt. Anschließend wurde 20 μL Lösung von Serinprotease (Schweinepankreastrypsin, Biochrom, Berlin, Deutschland) für den entsprechenden Zeitraum einwirken gelassen. Die überschüssige Lösung wurde mit einem Wattestäbchen entfernt.

Auf alle Proben, welche keine Referenzproben sind, wurde eine Formulierung aus Wirkstoff, Trägermedium und ggf. Nanocarrier für eine definierte Zeit aufgetragen. Als Trägermedium kamen Vaseline, Ethanol (30%) in Wasser, ethanolisches HEC-Gel und HEC-Gel auf Wasserbasis zum Einsatz. Nach der Einwirkzeit wurde die Formulierung mit einem Wattestäbchen entfernt.

Die Referenzproben wurden anstatt mit dem Wirkstoff und/oder Serinprotease mit 20 μL einer 0.9%-igen Kochsalzlösung (steril) behandelt.

Die Haut-Kryoproben wurden in einem auf PEG-basierendem Kryomedium gefroren, geschnitten und auf den Silicium-Träger zur AFM-IR-Messung aufgetragen.

Alle Proben für die Röntgenmikroskopie wurden zur Fixierung mit 2.5% Glutaraldehyd und 1% Natrium Cacodylat Pufferlösung zweimal für 10 Minuten gespült. Anschließend fanden für 90 Minuten eine Postfixierung mit 1% Osmiumtetroxid und 0.8% Kaliumhexacyanidoferrat(II) und Cacodylat Pufferlösung statt. Abschließend wurde erneut zweimal für 10 Minuten mit 2.5% Glutaraldehyd und 1% Natrium Cacodylat Pufferlösung gespült.

Die Proben wurden für jeweils zweimal 10 – 12 Minuten mit 50%igen, 70%igen, 80%igen und 95%igen Ethanol entwässert, anschließend dreimal 15 Minuten mit abs. Ethanol. Die Proben wurden zweimal 15 Minuten mit Propylenoxid behandelt, danach je eine Stunde mit Propylenoxid-Epon-Mischungen (2:1, 1:1 und 1:2) und schließlich in reinem Epon[®] über Nacht. Abschließend wurden sie nun in Einbettungskapseln platziert, die Kapseln mit frischem Epon[®] aufgefüllt und für 48 Stunden bei 60°C polymerisiert.

Die eingebetteten Proben wurden aus den Einbettungskapseln entfernt und getrimmt. Zuerst wurden jeweils Semidünnschnitte mit dem Mikrotom RM 2065 (Leica) angefertigt und mit Richardson-Färbelösung (Methylenblau/Azur) angefärbt, um den Bereich der Hautprobe im Eponblock zu identifizieren. Das überflüssige Epon[®] wurde entfernt und der Probenblock in 200 – 300 nm dicke Scheiben geschnitten und auf das Trägermaterial aufgebracht. Für die Röntgenmikroskopie waren dies Siliciumnitrid (Si_3N_4)-Fenster (Dicke: 100 nm, Silson, GB), für AFM-IR Messungen Silicium-Träger (Dicke: $450 \pm 35 \mu\text{m}$, P-Typ, ohne SiO_2 -Deckbeschichtung, Ted Pella Inc.).

Vor den eigentlichen Messungen wurden die Proben mithilfe optischer Mikroskopie charakterisiert. Bei UVSOR III (Okazaki, Japan) kam das Mikroskop MM-400/LU (Nikon) zum Einsatz, in Berlin das Mikroskop, das Teil des AFM-IR-Messgeräts ist (nanoIR-2s, Anasys). Eine beispielhafte optische Mikroskopaufnahme befindet sich in

2 Experimentelle Methoden und Grundlagen der Datenverarbeitung

Abbildung 2.1. Das Silicium des Trägers ist als großer blauer Bereich zu erkennen, das Siliciumnitrid-Fenster als beiger Bereich. Bei den schwarzen Punkten auf dem Fenster oben handelt es sich um Verschmutzungen. Die Probe selbst liegt größtenteils auf dem Fenster, teilweise auch auf dem Silicium. Aufgrund der Dünne der Probe und des Fensters lassen sich die einzelnen Regionen durch Doppelbrechung identifizieren: Violett ist das reine Epoxidharz, die dunkle Schicht entspricht dem Stratum Corneum, die orange-gelbe Region der viablen Epidermis und die Dermis ist als Mischregion aus blau, grünen und orangen Strukturen zu erkennen.

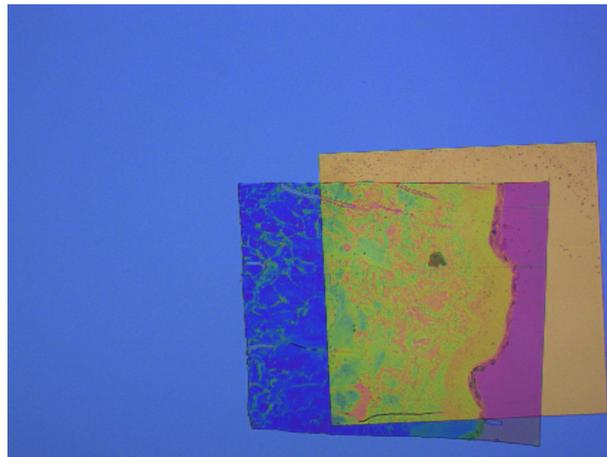


Abbildung 2.1: Optische Mikroskopie einer beispielhaften Probe, beiges Siliciumnitrid-Fenster innerhalb eines Siliciumwafers (mittelblau), Probe (farbig) liegt größtenteils auf dem Fensterbereich, teilweise auch auf den Silicium.

Die in Epon[®] eingebetteten Proben sind in Tabelle 2.1 aufgelistet, die Haut-Kryoproben in Tabelle 2.2. Die Proben wurden an unterschiedlichen Experiment-Daten (Exp. Datum) an der Charité (Dr. F. Rancan / P. Schrade) hergestellt. Es kam hierbei Haut von Brust, Bauch und dem Oberschenkel von männlichen und weiblichen Spendern zum Einsatz. Neben der Art- und Beschaffenheit der verwendeten Formulierung, der Dauer der Wirkstoffeinwirkung und der durchschnittliche aufgetragene Wirkstoffmasse sind ggf. die Art und die Dauer der Vorbehandlung angegeben.

2 Experimentelle Methoden und Grundlagen der Datenverarbeitung

Tabelle 2.1: Auflistung der in Epoxidharz eingebetteter Hautproben

Exp. Datum	Hauttyp	Spender	Vorbehandlung	Wirkstoff	$m_{\text{Rapamycin}}$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Formulierung	Dauer der Ein- wirkung
20.06.2020	Bauch	weiblich	-	-	0	HEC-Gel (EtOH)	100 min
06.02.2019	Obersch.	weiblich	-	Rapamycin	100	30% EtOH/H ₂ O	10 min
06.02.2019	Obersch.	weiblich	-	Rapamycin	100	30% EtOH/H ₂ O	100 min
06.02.2019	Obersch.	weiblich	-	Rapamycin	100	30% EtOH/H ₂ O	1000 min
06.02.2019	Obersch.	weiblich	-	Rapamycin	40	Vaseline	10 min
06.02.2019	Obersch.	weiblich	-	Rapamycin	40	Vaseline	100 min
06.02.2019	Obersch.	weiblich	-	Rapamycin	40	Vaseline	1000 min
06.08.2019	Bauch	männlich	-	Rapamycin	50	Vaseline	24 h
06.08.2019	Bauch	männlich	Trypsin (16 h)	Rapamycin	50	Vaseline	24 h
06.08.2019	Bauch	männlich	Trypsin (2 h)	Rapamycin	425	HEC-Gel (EtOH)	24 h
06.08.2019	Bauch	männlich	Trypsin (4 h)	Rapamycin	425	HEC-Gel (EtOH)	24 h
06.08.2019	Bauch	männlich	Trypsin (8 h)	Rapamycin	425	HEC-Gel (EtOH)	24 h
06.08.2019	Bauch	männlich	Trypsin (16 h)	Rapamycin	425	HEC-Gel (EtOH)	24 h
20.11.2019	Brust	weiblich	-	osCMS 2b ^a	72.5	HEC-Gel (H ₂ O)	10 min
20.11.2019	Brust	weiblich	-	osCMS 2b ^a	72.5	HEC-Gel (H ₂ O)	100 min
20.11.2019	Brust	weiblich	-	osCMS 2b ^a	72.5	HEC-Gel (H ₂ O)	1000 min
20.11.2019	Brust	weiblich	Trypsin (16 h)	osCMS 2b ^a	72.5	HEC-Gel (H ₂ O)	10 min
20.11.2019	Brust	weiblich	Trypsin (16 h)	osCMS 2b ^a	72.5	HEC-Gel (H ₂ O)	100 min
20.11.2019	Brust	weiblich	Trypsin (16 h)	osCMS 2b ^a	72.5	HEC-Gel (H ₂ O)	1000 min
20.11.2019	Brust	weiblich	-	rsCMS 1 ^b	65	HEC-Gel (H ₂ O)	10 min
20.11.2019	Brust	weiblich	-	rsCMS 1 ^b	65	HEC-Gel (H ₂ O)	100 min
20.11.2019	Brust	weiblich	-	rsCMS 1 ^b	65	HEC-Gel (H ₂ O)	1000 min
20.11.2019	Brust	weiblich	Trypsin (16 h)	rsCMS 1 ^b	65	HEC-Gel (H ₂ O)	10 min
20.11.2019	Brust	weiblich	Trypsin (16 h)	rsCMS 1 ^b	65	HEC-Gel (H ₂ O)	100 min
20.11.2019	Brust	weiblich	Trypsin (16 h)	rsCMS 1 ^b	65	HEC-Gel (H ₂ O)	1000 min
20.06.2020	Bauch	weiblich	-	osCMS 2b ^c	1	HEC-Gel (H ₂ O)	10 min
20.06.2020	Bauch	weiblich	-	osCMS 2b ^c	1	HEC-Gel (H ₂ O)	100 min
20.06.2020	Bauch	weiblich	-	osCMS 2b ^c	1	HEC-Gel (H ₂ O)	1000 min
20.06.2020	Bauch	weiblich	DBPO (16 h)	osCMS 2b ^c	1	HEC-Gel (H ₂ O)	10 min
20.06.2020	Bauch	weiblich	DBPO (16 h)	osCMS 2b ^c	1	HEC-Gel (H ₂ O)	100 min
20.06.2020	Bauch	weiblich	DBPO (16 h)	osCMS 2b ^c	1	HEC-Gel (H ₂ O)	1000 min
20.06.2020	Bauch	weiblich	-	rsCMS 1 ^d	5.4	HEC-Gel (H ₂ O)	10 min
20.06.2020	Bauch	weiblich	-	rsCMS 1 ^d	5.4	HEC-Gel (H ₂ O)	100 min
20.06.2020	Bauch	weiblich	-	rsCMS 1 ^d	5.4	HEC-Gel (H ₂ O)	1000 min
20.06.2020	Bauch	weiblich	DBPO (16 h)	rsCMS 1 ^d	5.4	HEC-Gel (H ₂ O)	10 min
20.06.2020	Bauch	weiblich	DBPO (16 h)	rsCMS 1 ^d	5.4	HEC-Gel (H ₂ O)	100 min
20.06.2020	Bauch	weiblich	DBPO (16 h)	rsCMS 1 ^d	5.4	HEC-Gel (H ₂ O)	1000 min

Beladung der Nanocarrier mit Rapamycin für ^a 29 Gew%, ^b 26 Gew%, ^c 0.5 Gew% und ^d 2.7 Gew%.

2 Experimentelle Methoden und Grundlagen der Datenverarbeitung

Exp. Datum	Hauttyp	Spender	Vorbehandlung	Wirkstoff	$m_{\text{Rapamycin}}$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Formulierung	Dauer der Ein- wirkung
05.05.2021	Bauch	weiblich	-	osCMS 2b ^e	4	HEC-Gel (H ₂ O)	10 min
05.05.2021	Bauch	weiblich	-	osCMS 2b ^e	4	HEC-Gel (H ₂ O)	100 min
05.05.2021	Bauch	weiblich	-	osCMS 2b ^e	4	HEC-Gel (H ₂ O)	1000 min
05.05.2021	Bauch	weiblich	DBPO (16 h)	osCMS 2b ^e	4	HEC-Gel (H ₂ O)	10 min
05.05.2021	Bauch	weiblich	DBPO (16 h)	osCMS 2b ^e	4	HEC-Gel (H ₂ O)	100 min
05.05.2021	Bauch	weiblich	DBPO (16 h)	osCMS 2b ^e	4	HEC-Gel (H ₂ O)	1000 min
05.05.2021	Bauch	weiblich	DBPO (16 h)	osCMS 2b ^f	8	HEC-Gel (H ₂ O)	5 Tage
05.05.2021	Bauch	weiblich	-	rsCMS 1 ^e	4	HEC-Gel (H ₂ O)	10 min
05.05.2021	Bauch	weiblich	-	rsCMS 1 ^e	4	HEC-Gel (H ₂ O)	100 min
05.05.2021	Bauch	weiblich	-	rsCMS 1 ^e	4	HEC-Gel (H ₂ O)	1000 min
05.05.2021	Bauch	weiblich	DBPO (16 h)	rsCMS 1 ^e	4	HEC-Gel (H ₂ O)	10 min
05.05.2021	Bauch	weiblich	DBPO (16 h)	rsCMS 1 ^e	4	HEC-Gel (H ₂ O)	100 min
05.05.2021	Bauch	weiblich	DBPO (16 h)	rsCMS 1 ^e	4	HEC-Gel (H ₂ O)	1000 min
05.05.2021	Bauch	weiblich	DBPO (16 h)	rsCMS 1 ^f	8	HEC-Gel (H ₂ O)	5 Tage
05.05.2021	Bauch	weiblich	DBPO (16 h)	Rapamycin	8	HEC-Gel (EtOH)	5 Tage
22.11.2021	Bauch	weiblich	H ₂ O (16 h)	-	0	HEC-Gel (EtOH)	100 min
22.11.2021	Bauch	weiblich	TCEP (16 h)	-	0	HEC-Gel (EtOH)	100 min
22.11.2021	Bauch	weiblich	DBPO (16 h)	Rapamycin	2	HEC-Gel (EtOH)	5 Tage

Beladung der Nanocarrier mit Rapamycin für ^e 2 Gew% und ^f 1 Gew%.

Tabelle 2.2: Auflistung der Haut-Kryoproben

Exp. Datum	Hauttyp	Spender	Vorbehandlung	Wirkstoff	$m_{\text{Rapamycin}}$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Formulierung	Dauer der Ein- wirkung
01.11.2021	Bauch	weiblich	Trypsin (16 h)	-	0	Vaseline	24 h
01.11.2021	Bauch	weiblich	Trypsin (16 h)	Rapamycin	100	Vaseline	24 h

2.1.2 Präparation der Tumorzellproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Tumorzell-Modelle aus SCC-25-Zellen und Kollagen untersucht. Diese Modelle wurden von Frau Dr. Leonie Gronbach [67] im Rahmen ihrer Doktorarbeit hergestellt und anschließend mit dem Wirkstoff Cetuximab bzw. Docetaxel behandelt. Das Modell besteht aus Rinderkollagen und Tumorzellen des Hals- und Nackenkarzinoms der Zelllinie SCC-25. Hierbei hatte die Nährlösung Kontakt zu der Kollagenseite des Modells, der Wirkstoff wurde in einer PBS-gepufferten, wässrigen Lösung (Cetuximab) bzw. in einer wässrigen DMSO-Lösung (Docetaxel) bei einigen

2 Experimentelle Methoden und Grundlagen der Datenverarbeitung

Proben auf der Kollagensseite (systemisch) und bei anderen Proben auf der Oberfläche der Tumorzellen fünf Mal in einem Abstand von 48 Stunden aufgetragen (topisch). Nach der Behandlung wurden die Modelle gefroren und mit einem Mikrotom in 3 μm dicke Scheiben geschnitten. Diese wurden auf einem Silicium-Wafer (Dicke: $450 \pm 35 \mu\text{m}$, P-Typ, ohne SiO_2 -Deckbeschichtung, Ted Pella Inc.) aufgebracht und anschließend bei $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ langsam getrocknet. Die wasserfreie Probe wurde anschließend mit dem AFM-IR-System optisch mikroskopiert (vgl. Abbildung 2.2) und gemessen.

Tabelle 2.3: Auflistung der untersuchten Zellkulturen

Tumortyp	Wirkstoff	Masse [μg]	Formulierung	Dauer der Einwirkung	Behandlung
SCC-25	-	0	PBS/ H_2O	10 Tage	systemisch
SCC-25	Cetuximab	2250	PBS/ H_2O	10 Tage	systemisch
SCC-25	-	0	PBS/ H_2O	10 Tage	topisch
SCC-25	Cetuximab	20	PBS/ H_2O	10 Tage	topisch
SCC-25	-	0	DMSO/ H_2O	10 Tage	topisch
SCC-25	Docetaxel	0.03	DMSO/ H_2O	10 Tage	topisch
SCC-25	Docetaxel	0.3	DMSO/ H_2O	10 Tage	topisch

Ein Übersichtsbild der optischen Mikroskopie eines SCC-25-Modell-Schnitts ist in Abbildung 2.2 zu sehen. Der Übergang von Kollagenregion und SCC-25-Tumorzell-Region ist als gelbe Linie dargestellt. Die in der Zellregion sichtbare Risse sind Folge des Trocknungsprozesses. Der Auftragungsort für eine systemische Behandlung befindet sich auf der linken Oberfläche der Kollagenschicht, während die topische Auftragung auf der rechten Oberfläche der SCC-25-Zellen erfolgte. Das Kryomedium ist rechts dargestellt.

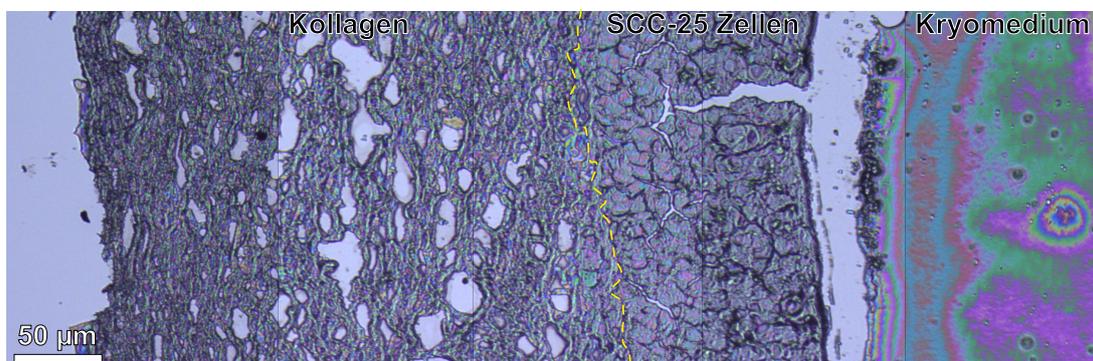


Abbildung 2.2: Aus mehreren Bildern zusammengesetzte optische Mikroskopie einer beispielhaften SCC-25-Modell-Probe.

2.2 Durchführung der Rastertransmissionsröntgenmikroskopie- Experimente

Die Proben werden auf einem Probenhalter, wie in Abbildung 2.3 gezeigt, aufgeklebt. Bei UVSOR III wurde vom Strahlrohr-Assistenten doppelseitiges Klebeband genutzt, bei Bessy II wurde flüssiges Polymethylmethacrylat (PMMA) zur Verfügung gestellt, welches unter Vakuum ausgetrocknet wurde. Die Proben wurden auf einem Probenhalter (Abbildung 2.3) befestigt. Dieser Probenhalter wird innerhalb des Strahlenganges montiert (Abbildung 2.4) und das System anschließend evakuiert. Bei UVSOR III wurde die Messungen am Strahlrohr BL4U, bei Bessy II sowohl am MAXYMUS als auch an MYTIIC und an PoILUX der SLS durchgeführt. Das Röntgenmikroskop stammt in allen Fällen von der Firma Bruker.



Abbildung 2.3: Beispielhafter Probenhalter mit fünf Proben und einem freien Fenster (unten mittig).

In Abbildung 2.4 ist schematisch gezeigt, wie während der Messung monochromatische Synchrotronstrahlung (Top-up-Modus) mithilfe einer Fresnel-Zonenplatte (Nickel, Applied Nanotools, Edmonton, Kanada) fokussiert (Fokusgröße etwa < 75 nm) und ungewollte Ordnungen mit einer Blende (OSA von engl. *order sorting aperture*) aussortiert wird. Die Strahlung trifft auf die Probe und wird ggf. absorbiert. Die Probe wird mit Piezoelementen in x- und y-Richtung bewegt. Die Messung erfolgt im Linieunidirektional Modus (auch on-fly-Modus genannt), d.h. die Messung fasst während der Bewegung in einer Richtung ein Zeitintervall als einen Messpunkt zusammen. Die Bewegung in die andere Richtung erfolgte in diskreten Schritten. Der Anteil der Strah-

2 Experimentelle Methoden und Grundlagen der Datenverarbeitung

lung, der beim Durchlaufen des Probenträgers nicht absorbiert wurde, wird von einem Photomultiplier mit Szintillator in elektronische Signale umgewandelt und detektiert. Messungen der gesamten transmittierten Strahlung ohne Probe (I_0 -Spektrien) erfolgten an einem leeren Loch des Probenträgers (Abbildung 2.3, mittig unten). Je nach Stabilität der Elektronen im Speicherring erfolgten Messungen mehrfach am Tag, mindestens jedoch einmal. Alle Messungen erfolgten Energie-für-Energie, da die zeitaufwendigste Operation das Ändern der Energie der Synchrotronstrahlung ist. Die Messungen werden hierbei als Stapel (Stack) gespeichert.

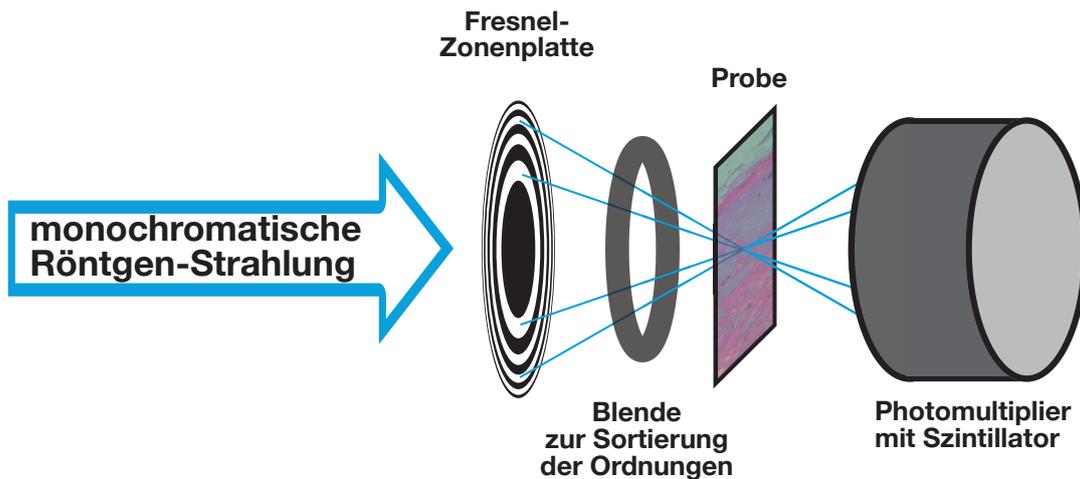


Abbildung 2.4: Schematischer Aufbau des Röntgenmikroskops

Die Energieauflösung der Strahlung liegt bei der typischen Nutzung der Spalten des Monochromators von $50\ \mu\text{m}$ bei $60\ \text{meV}$ an der $O\ 1s$ Kante (Messbereich: $520\ \text{eV}$ bis $565\ \text{eV}$). Die Messung erfolgte zur Reduzierung der Messzeit in unregelmäßigen Energieabständen: von 520 bis $529\ \text{eV}$ in $0.5\ \text{eV}$ -Schritten, von 529.25 bis $536\ \text{eV}$ in $0.099\ \text{eV}$ -Schritten, von 536.6 bis $546\ \text{eV}$ in $0.588\ \text{eV}$ -Schritten und von 547 bis $564\ \text{eV}$ in $0.607\ \text{eV}$ -Schritten. Hierbei wurde für den Bereich $O\ 1s \rightarrow \pi^*$ die höchste Punktdichte gewählt.

Durch die Nutzung des Linie-unidirektional Modus liegt die Ortsauflösung für Übersichtsmessungen bei $250\ \text{nm}$, für detailliertere Messungen des Stratum Corneums bei $100\ \text{nm}$ und für hochauflösende Scans bei $30\ \text{nm}$. Die Integrationszeit lag bei den meisten Messungen bei $4\ \text{ms}$. Für jede Messung werden zwei Dateiformate angelegt: Im Header werden die Messparameter wie Ringstrom, Integrationszeit, Energien und Positionen abgelegt, in den XIM-Dateien werden die ortsabhängigen Intensitäten gespeichert. Für jede gemessene Energie gibt es eine eigene XIM-Datei, die mithilfe des Headers zugeordnet werden kann.

Der Datenimport von MYSTIIC und der SLS erfolgte aus den HDF5-Files.

Vor dem Import der Daten in Igor Pro werden die Messungen mit aXiS2000 geöffnet und der laterale Drift mit der Funktion ZIMBA bestimmt. Die berechneten lateralen

2 Experimentelle Methoden und Grundlagen der Datenverarbeitung

Drifts werden in eine ALN-Datei geschrieben. Alternativ wurde die laterale Driftkorrektur innerhalb des Programmes MANTiS genutzt und als CSV-File gespeichert.

Für den Import der Daten als 3D-Wave nach Igor Pro wird eine modifizierte Funktion von Herrn Weigand (Bessy) genutzt:

Aus dem Header-File (.hdr) wird die Anzahl an Messpunkten in x- und y-Richtung und die Anzahl an gemessenen Energien in z-Richtung ausgelesen und eine 3D-Matrix mit den entsprechenden Dimensionen erstellt. Die entsprechenden Messdaten bei unterschiedlichen Energien sind im gleichen Ordner als XIM-File gespeichert. Die XIM-Dateien aus dem Ordner werden als 2D-Matrix importiert und anschließend in die 3D-Matrix geschrieben. Die Positionsdaten in x- und y-Richtung werden als absolute Werte aus dem Header-File ausgelesen und als relative Werte mit dem Befehl *setscale* in die Matrix als Startwert und Abstand zwischen den Positionen (Delta) eingetragen. Die Energieskala, welche die ungleichmäßigen Energieabstände der z-Achse enthält, wird separat abgespeichert.

Befindet sich im Ordner des Header-Files ein ALN-File, welches die durch ZIMBA errechneten lateralen Verschiebungen enthält, wird dieses als Wave eingelesen. Um die laterale Drift zu korrigieren, extrapoliert Igor den Intensitätswert zwischen den gemessenen Punkten bilinear gemäß Formel 2.1. Hierbei ist die *temp_matrix* die Matrix mit den Rohdaten, die Variablen *r_korr* und *c_korr* sind die korrigierten Positionen der Datenpunkte, welche in die korrigierte Matrix (*shifted_matrix*) an der Position $[r_index][c_index][l_index]$ eingetragen werden:

$$corr_matrix[r_index][c_index][l_index] = \text{Interp2D}(matrix, r_korr, c_korr) \quad (2.1)$$

Es werden die Integrationszeiten und der Ringstrom ausgelesen und direkt normiert (vgl. Formel 2.2):

$$\text{Spektrum}(E) = \frac{\text{Rohspektrum}(E)}{\text{Ringstrom}(E) \cdot \text{Integrationszeit}(E)} \quad (2.2)$$

Dies führt zu einer von den Messparametern unabhängigen Berechnung der optischen Dichte, da das I-Spektrum und das I_0 -Spektrum mit unterschiedlichen Integrationszeiten gemessen werden können. Die korrigierte Prozedur kann mit XIM-Datensätzen umgehen, deren Ausgangsmessung nicht komplett abgeschlossen wurden, da beim Import nun die Menge der XIM-Dateien direkt aus dem Ordner und nicht mehr aus dem HDR-File entnommen wird. Es werden alle Rohdaten ebenfalls als Wave abgespeichert, um Fehler bei der Driftkorrektur nachträglich korrigieren zu können.

Alle weiteren Prozeduren wurden im Rahmen dieser Arbeit neu geschrieben und basieren auf keinen fremden Quellcode.

Für die Driftkorrektur wurden drei weitere Funktionen geschrieben, die eine solche

Korrektur auch unabhängig von ZIMBA durchführen:

- Bei der ersten Funktion wird die mittlere Ebene (Ebenen entsprechen Energien) der 3D-Matrix als Referenzpunkt gewählt. Jede andere Ebene wird pixelweise um ± 5 Datenpunkte in x- und y-Richtung verschoben und die Standardabweichung der Differenz zwischen Referenzebene und Ebene bestimmt. Ausgehend von der Position des Minimums der Standardabweichung wird der Vorgang durch Verschiebung im Subpixelbereich zweimal wiederholt (0.2 Pixel- und 0.04-Pixel-Schritte). Abschließend wird die entsprechende Ebene um die errechnete Drift verschoben und in einer neuen Matrix abgespeichert. Bei der Nutzung dieses iterativen Verfahrens kann ein Bereich festgelegt werden, der für die Berechnung der Standardabweichung betrachtet wird. Ansonsten wird die gesamte Fläche betrachtet, ausgenommen des Randes mit einer Breite von 5 Pixeln.

In Abbildung 2.5 ist das verwendete Prinzip vereinfacht dargestellt. Unter (a) sind zwei Strukturen (rot, blau) dargestellt, die sich nur in ihrer Intensität unterscheiden. Eine der beiden Strukturen wird nun pixelweise verschoben und die Differenz zwischen der Referenzstruktur und der verschobenen Struktur gebildet (c). Unter (b) ist diese Differenz dargestellt und es ist zu sehen, dass die Streuung der Punkte um den Nullpunkt größer wird, je stärker die Verschiebung sich vom Optimum entfernt. Für jede berechnete Differenz bei unterschiedlicher Verschiebung wird die Standardabweichung berechnet, welche von der Streuung der Datenpunkte abhängig ist (vgl. Abbildung 2.5, d). Am Minimum liegen die Strukturen am besten übereinander.

Abbildung 2.5 (d) zeigt eine Simulation einer 2D-Verschiebung, welche ein globales Minimum bei (50,50) zeigt. Um bei der Berechnung der Differenz keine Fehler durch fehlende Punkte zu erhalten, wird im 2D-Verfahren ein Rand, welcher der maximalen Verschiebung der Punkte entspricht, für die Berechnung der Standardabweichung nicht betrachtet.

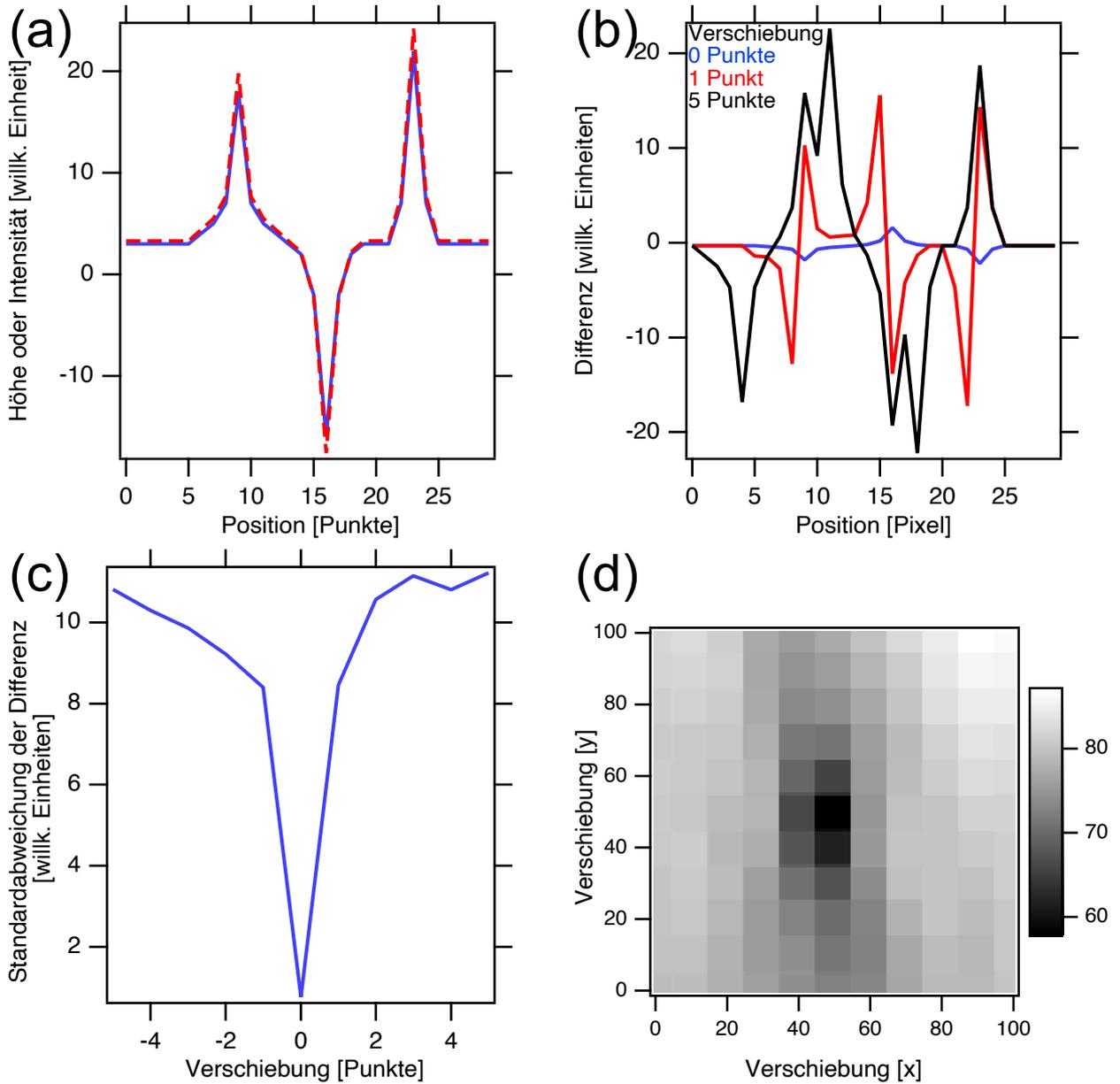


Abbildung 2.5: (a) Zweidimensionales Profil mit gleicher Struktur, aber unterschiedlicher Intensität, (b) Differenz der Strukturen, wobei bei der roten und schwarzen Linie eine laterale Verschiebung vor der Berechnung der Differenz simuliert wurde, (c) Standardabweichung der Differenzen bei unterschiedlichen lateralen Drifts, (d) Profil der Standardabweichungen für x- und y-Drifts einer dreidimensionalen Probe, Minimum in beiden Fällen an der Position ohne Drift.

2 Experimentelle Methoden und Grundlagen der Datenverarbeitung

- Ein zusätzliches Verfahren, um die Driften zu berechnen, basiert auf einem MD-FuncFit. Bei MDFuncFits (MD = multiple dimensions) handelt es sich um Fit-Funktionen in Igor Pro, die mit mehr als einer Variable (= Dimension) durchgeführt werden. Die Ebene der Matrix, welche sich (gerundet) im Mittelpunkt der Messungen befindet, wird als Referenz genutzt, um alle anderen Messungen nacheinander iterativ auf Basis des Levenberg-Marquardt-Algorithmus' mit folgender Gleichung anzupassen

$$\text{versch. Ebene}(E) = w[2] \cdot (\text{Referenzebene} [x + w[0]] [y + w[1]]) + w[3] \quad (2.3)$$

Hierbei ist $w[2]$ der Vorfaktor, $w[3]$ eine absolute Verschiebung der Intensität, $w[0]$ die räumliche Verschiebung in x-Richtung und $w[1]$ die räumliche Verschiebung in y-Richtung. Die Faktoren $w[2]$ und $w[3]$ sind notwendig, damit die unterschiedlichen Absorptionen bei verschiedenen Energien kompensiert werden können und keinen Einfluss auf den errechneten Verschiebungswert haben. Die laterale Verschiebung wird hier genau entgegengesetzt zu den Werten $w[0]$ und $w[1]$ durchgeführt, da diese errechneten Faktoren die Verschiebung beschreiben, um die die Referenzebene verschoben werden muss. Der Fit findet ausschließlich für den Bereich statt, welcher mit den Cursors in Igor Pro markiert wurde. Hierfür eignen sich besonders topografisch strukturierte Bereiche. Im Normalfall wird der Bereich des Stratum Corneums genutzt, da diese Region deutlich strukturiert ist.

- Ebenso kann in Igor Pro eine Kreuzkorrelation mit dem Befehl *correlate* berechnet werden, um die Verschiebung zu korrigieren.

Um Einzelspektren aus den Spektrumsmatrizen zu erhalten, werden die Spektren Punkt-für-Punkt extrahiert. Alle Spektren, die keine NaN-Werte und keine inf-Werte enthalten, werden addiert und durch ihre Anzahl geteilt, um für diesen Bereich ein Durchschnittsspektrum zu erhalten.

Während der Messungen kann es zu Verschiebungen der Energieskala der Röntgenmikroskopie kommen, sodass alle Spektren in ihrer Energie angepasst werden müssen. Die Energie wurde durch die Messung von Dexamethason an der O 1s-Kante kalibriert [43]. Die Ursache der Energieverschiebungen liegt in Schwankungen der Magnetabstände des Undulators. Zur Korrektur der einzelnen Messungen untereinander wird eine Grafik erstellt, in der das durchschnittliche Referenzeinzelspektrum und das dazu verschobene Einzelspektrum aus der Spektrumsmatrix dargestellt werden. In Igor Pro können Graphen in einer Grafik frei verschoben werden. Hierbei wird dann die Verschiebung als Δx (entspricht ΔE) und Δy angegeben. Das verschobene Spektrum (Abbildung 2.6, rot) wird so positioniert, dass es im Übergangsbereich von

2 Experimentelle Methoden und Grundlagen der Datenverarbeitung

π^* zu σ^* und im Bereich des Maximums von σ^* mit dem Referenzspektrum (schwarz) deckungsgleich ist.

Die ermittelte Abweichung Δx (entspricht ΔE) wird genutzt, um die komplette Datenmatrix zu verschieben. Hierbei wird aus der ursprünglichen Energieskala eine weitere Energieskala erstellt, welche um den entsprechenden Wert verschoben ist. Der verschobene Wert der neuen Skala wird in der alten Energieskala gesucht (Befehl: *find-level/P*) und dessen Position (Variable *V_level/X*) in eine weitere Wave geschrieben. Für jedes Spektrum der Matrix wird nun ein neues Spektrum auf Basis der ermittelten Positionen in eine neue Matrix geschrieben. Der Name der neuen Matrix enthält neben dem Namen der Ausgangsmatrix auch den Wert der Energieverschiebung in meV.

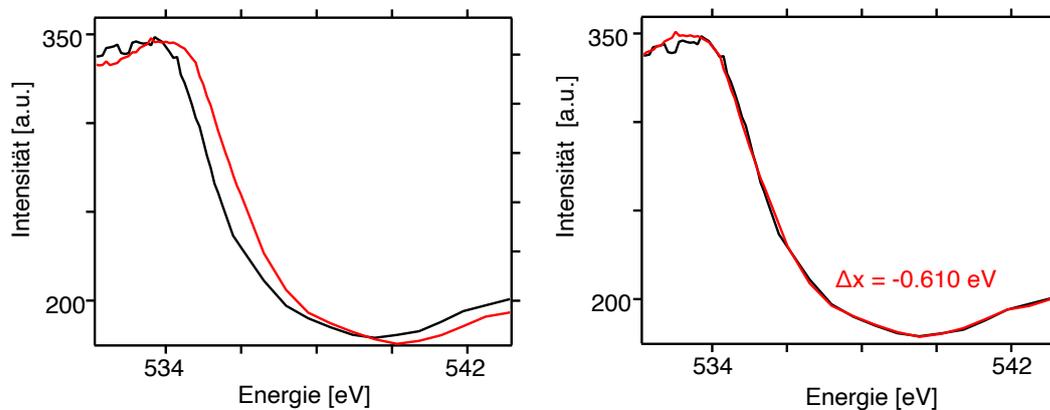


Abbildung 2.6: Beispiel für die Energiekorrektur zweier Einzelspektren, (links) unverschoben, (rechts) um Δx korrigiert.

Nachdem für alle Röntgenabsorptionsspektren eine Energiekorrektur erfolgt ist, werden die Matrizen in eine optische Dichte nach dem Lambert-Beer-Gesetz [41, 139] umgerechnet (Abbildung 2.7).

$$OD(E) = \ln \left(\frac{I_0(E)}{I(E)} \right) \quad (2.4)$$

Mithilfe des Befehls *interp* werden die fehlenden Datenpunkte der energetisch-unregelmäßigen Messung für eine Skala mit regelmäßigen Abständen (50 meV Schrittgröße) linear interpoliert. Die Spektren mit einem regelmäßigen Punktabstand werden in eine neue Matrix geschrieben. Die Matrix wird in x- und y-Richtung entsprechend der Ursprungsmatrix skaliert, zusätzlich in z-Richtung auf Basis der neuen Energie-skalierung.

2 Experimentelle Methoden und Grundlagen der Datenverarbeitung

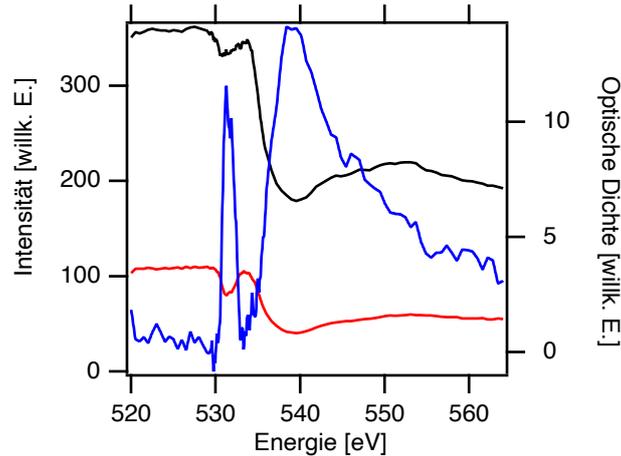


Abbildung 2.7: Beispielhafte Darstellung des I_0 - (schwarz), I -Spektrums (rot) und der daraus resultierenden optischen Dichte (blau) eines Rapamycin-Spektrums an der O 1s-Kante.

Für den Wirkstoff Rapamycin wurden die Massenabsorptionskoeffizienten mithilfe tabellierter Daten aus dem Programm Optical Constants Grapher (SF.exe) [140] berechnet. Der Wert im Kontinuum wird aus dem Datensatz ausgelesen, während der Wert an der selben Energie, der ohne molekularen Absorptionsprozess des betrachteten Elements erreicht werden würde, mit einer Exponentialfunktion auf Basis des Vorkantenbereichs extrapoliert wird. Der extrapolierte Wert wird vom realen Wert des Kontinuums abgezogen.

$$\mu_a(E) = \frac{M}{N_A} \cdot \mu(E) \quad (2.5)$$

Hierbei ist μ_a der Absorptionsquerschnitt, M die molare Masse des Moleküls, N_A die Avogadro-Konstante und μ der Massenabsorptionskoeffizient. Für die C 1s-Kante wurden die Werte bei 305 eV und für die O 1s bei 560 eV betrachtet:

$$\mu_{a,Rapa}(305 \text{ eV}) = \frac{914.17 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{6.022 \cdot 10^{23} \frac{1}{\text{mol}}} \cdot 28801.9 \frac{\text{cm}^2}{\text{g}} \cdot 10^{18} \frac{\text{Mbarn}}{\text{cm}^2} = 43.7 \text{ Mbarn} \quad (2.6)$$

$$\mu_{a,Rapa}(560 \text{ eV}) = \frac{914.17 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{6.022 \cdot 10^{23} \frac{1}{\text{mol}}} \cdot 2983.97 \frac{\text{cm}^2}{\text{g}} \cdot 10^{18} \frac{\text{Mbarn}}{\text{cm}^2} = 4.5 \text{ Mbarn} \quad (2.7)$$

Aus dem Bereich der Messung der Referenzhaut, in der sich nur Einbettungsmedium befindet, wird das Epoxidharz-Referenzspektrum extrahiert.

Für das Stratum Corneum der Referenzhaut werden die Röntgenabsorptionsspektren des Stratum Corneums auf Basis der Intensitätsunterschiede an der Sauerstoffkante bei 532.0 eV und an der Kohlenstoffkante bei 288.3 eV in Lipide und Corneocyten eingeteilt. Der Durchschnitt beider Spektren wird als Ausgangsspektrum für die Hautreferenz genutzt. Von dieser Hautreferenz wird das Epoxidharzspektrum durch Subtrakti-

2 Experimentelle Methoden und Grundlagen der Datenverarbeitung

on herausgerechnet. Die Differenz der Durchschnittsspektren beider SC-Komponenten wird in den π^* - und den σ^* -Anteil aufgeteilt, wobei der Wendepunkt (O 1s) bzw. das Minimum (C 1s) zwischen Minimum und Maximum zur Aufteilung dient (vgl. Abbildung 4.10 in Kapitel 4.1.6). Beide Teilspektren (Absolutwert) dienen als Ausgleich der lokalen Schwankungen des biologischen Mediums. Dies ist notwendig, um die Referenzspektren über größere Bereiche der Haut nutzen zu können (Corneocyten, Lipide und die viable Epidermis).

Die Auswertung erfolgt auf Basis des Lambert-Beer-Gesetzes und auf Basis der numerischen Singulärwertzerlegung aus Kapitel 3. Die berechnete Wirkstoffverteilung aus der numerischen Singulärwertzerlegung für STXM-Messungen zeigt eine qualitative Verteilung des Wirkstoffs mit einem Einfluss einer schwankenden Proben- dicke. Um aus den hierbei errechneten Vorfaktoren des Wirkstoffs die Konzentration quantitativ für jedes Pixel zu berechnen, erfolgt eine Näherung der Probendicke auf Basis der Probendickenabhängigkeit des Lambert-Beer-Gesetzes: Die Höhe des durch Rasterkraftmikroskopie gemessenen Sprungs vom Siliciumnitrid-Fensters auf das Epoxidharz-Einbettungsmedium wird als durchschnittliche Höhe der Messung angenommen. Für jedes Pixel wird das Integral des O 1s-Absorptionsspektrums von 563.45 eV bis 563.95 eV in eine Matrix geschrieben und der Durchschnittswert der Matrix ermittelt. Es wird angenommen, dass dieser Durchschnittswert der Dicke aus der AFM-Messung entspricht. Durch Vergleich des lokalen Integrals mit dem durchschnittlichen Integral kann so die lokale Probendicke angenähert werden:

$$\text{Dicke (x,y)} = \frac{\text{Integral der OD (x,y)}}{\text{Durchschnitt des Integrals}} \cdot \text{Dicke (AFM)} \quad (2.8)$$

Da die gemessene optische Dichte dimensionslos ist und das Referenzspektrum des Rapamycins die Einheit des Absorptionsquerschnittes in Mbarn aufweist, folgt daraus, dass der Vorfaktor die Einheit Mbarn⁻¹ besitzen muss:

$$\text{Spektrum} = w_0[\text{Mbarn}^{-1}] \cdot \sigma_{\text{Rapamycin-Molekül}}[\text{Mbarn}] + \dots \quad (2.9)$$

Aus dem Lambert-Beer-Gesetz [41, 139] folgt daher:

$$\ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = c \cdot d \cdot \sigma_\lambda = c \cdot d \cdot N_A \cdot \sigma_{\lambda, \text{Molekül}} = w_0 \cdot \sigma_{\lambda, \text{Molekül}} \quad (2.10)$$

mit

$$N_A = 6.022 \cdot 10^{23} \frac{1}{\text{mol}} \cdot 10^{-9} \frac{\text{m}}{\text{nm}} \cdot 10^{-22} \frac{\text{m}^2}{\text{Mbarn}} = 6.022 \cdot 10^{-8} \frac{\text{m}^3}{\text{mol} \cdot \text{Mbarn} \cdot \text{nm}} \quad (2.11)$$

2 Experimentelle Methoden und Grundlagen der Datenverarbeitung

ergibt sich die Einheit von w_0

$$w_0[\text{Mbarn}^{-1}] = c \left[\frac{\text{mol}}{\text{m}^3} \right] \cdot d[\text{nm}] \cdot N_A \left[\frac{\text{m}^3}{\text{mol} \cdot \text{Mbarn} \cdot \text{nm}} \right] \quad (2.12)$$

und daraus folgt für die Konzentration:

$$\Leftrightarrow c \left[\frac{\text{mol}}{\text{m}^3} \right] = \frac{w_0[\text{Mbarn}^{-1}]}{d[\text{nm}]} \cdot \frac{1}{N_A} \left[\frac{\text{mol} \cdot \text{Mbarn} \cdot \text{nm}}{\text{m}^3} \right] \quad (2.13)$$

Aus den Gleichungen 2.10 bis 2.13 lässt sich die Konzentration als Teilchen pro Volumen bestimmen. Mithilfe der molaren Masse des Wirkstoffs (z.B. Rapamycin) lässt sich diese Konzentration in eine mit der Auftragsmenge vergleichbare Einheit umrechnen:

$$c \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^2 \cdot \mu\text{m}} \right] = c \left[\frac{\text{mol}}{\text{m}^3} \right] \cdot M \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right] \cdot 10^6 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \cdot 10^{-2} \frac{\text{m}}{\text{cm}} \cdot 10^{-2} \frac{\text{m}}{\text{cm}} \cdot 10^{-6} \frac{\text{m}}{\mu\text{m}} \quad (2.14)$$

Für Rapamycin beträgt diese molare Masse $M = 914.17 \text{ g/mol}$ [23, 24, 25]. Unter Berücksichtigung der pixelabhängigen Probendicken wird so für jeden Punkt die detektierte Masse pro Volumen berechnet und in einer neuen Matrix gespeichert. Für diese Matrix wird entlang der Eindringtiefe der Durchschnittswert berechnet (proportional zum Tiefenintegral) und als Tiefenintegralswave abgespeichert. Für das Tiefenintegral wird der Nullpunkt durch Subtraktion des Versatzes im Bereich der viablen Epidermis korrigiert. Dieser Versatz entspricht dem systemischen Fehler der Linearkombination und hat eine Überbewertung des Rauschens des Spektrums als Ursache. Für den Bereich des Tiefenintegrals, welcher den Wirkstoff enthält, wird der Durchschnittswert gebildet und mithilfe der bekannten Tiefe dieses Bereichs eine detektierte Menge Rapamycin pro Auftragsfläche berechnet:

$$m_{\text{detektiert}} \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^2} \right] = c_{\text{durchschnittlich}} \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^2 \cdot \mu\text{m}} \right] \cdot d [\mu\text{m}] \quad (2.15)$$

Auf Basis dieses Wertes und der bekannten aufgetragenen Menge lässt sich der Anteil des nachgewiesenen Wirkstoffs berechnen. Die Fehlergrenzen des Wirkstoffs basieren auf der durch Igor Pro berechneten Standardabweichung relativ zum absoluten Vorfaktor. Diese relative Standardabweichung wird um Artefakte bereinigt, indem Ausreißer ($> 400\%$ Fehler) nicht in die Rechnung einfließen indem sie maskiert wurden.

2.3 Durchführung der AFM-IR-Experimente

Die Messungen wurden mit dem Gerät nanoIR-2s von Anasys Instruments im Kontaktmodus durchgeführt. Mithilfe des verbauten optischen Mikroskops wurden die Positionen gewählt. Anschließend wurde der reflektierende Laser optimiert, die Spitze an die Probe angenähert und für einen größeren Bereich (quadratisch ca. $30\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m}$ bzw. rechteckig ca. $60\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$) in der gewünschten Region eine AFM-Messung durchgeführt. Nach der Optimierung des Laserstrahlengangs relativ zur AFM-Spitze, der Abstimmung der Resonanzfrequenz (pulse tune) und der Messung eines Hintergrundspektrums (Laserleistung pro Wellenzahl) wurden Test- und ggf. Einzelspektren im Bereich 903 bis $1312\ \text{cm}^{-1}$ bzw. 1302 bis $1889\ \text{cm}^{-1}$ aufgenommen. Hyperspektral wurde gemessen, indem auf der Höhenverteilung eine Region und die Schrittweiten (x- und y-Richtung) ausgewählt wurden. Es wurde ein AFM-IR-Spektrum pro Position gemessen. Die Integrationszeit lag bei $100\ \frac{\text{cm}^{-1}}{\text{s}}$, die spektrale Auflösung bei $1\ \text{cm}^{-1}$. Die meisten genutzten Daten liegen als hyperspektrale Messung vor, d.h. für eine rechteckige Fläche wurde in äquidistanten Abständen AFM-IR-Spektren aufgenommen. Die Intensitäten der AFM-IR-Spektren entspricht der gemessenen Amplitude und ist für die vorliegenden Proben proportional zur Absorption (vgl. Kapitel 1.1.8). Da sich der Proportionalitätsfaktor von Signal zu Signal unterscheiden kann, erfolgt die Auswertung auf Basis von AFM-IR-Referenzspektren.

Einzelspektren werden über den normalen Igor-Importdialog geladen und anschließend gemäß den zugehörigen Wellenzahlen skaliert. Hyperspektrale Messungen werden über einen gesonderten Importdialog als Matrix importiert und anschließend gemäß Position und Wellenzahl in eine dreidimensionale Wave einsortiert. Diese Wave wird direkt auf Basis der Importdaten skaliert. Für die Referenzspektren können Bereiche und komplette Matrizen zu einem durchschnittlichen Einzelspektrum umgerechnet werden. Es besteht die Möglichkeit, mit einer Prozedur Artefakte, sogenannte Spikes, durch den Vergleich der Nachbarwerte aussortieren zu lassen. Hierbei wird jeder Messpunkt mit beiden Nachbarmesspunkten verglichen. Zeigt ein Messpunkt jeweils gegenüber beiden Nachbar ein um 20% höhere Intensität, wird der Messpunkt durch den Mittelwert beider Nachbarmesspunkte ersetzt. Für Spektren, welche scharfe Signale zeigen (z.B. Paraffin, vgl. Abbildung 4.8 in Kapitel 4.1.5), kann zum einen der Bereich dieser Signale mithilfe einer Maske ignoriert werden, zum anderen besteht die Möglichkeit, die Nachbarmesspunkte der Nachbarn zu vergleichen: Zeigt sich von beiden Seiten aus eine kontinuierliche Zunahme der Intensität in Richtung des Messpunkts, bleibt das Signal erhalten.

Zur Berechnung von Referenzspektren auf Basis einer Singulärwertzerlegung ohne Vorgabe von definierten Referenzen wird im Rahmen dieser Arbeit die Funktion *ma-*

2 Experimentelle Methoden und Grundlagen der Datenverarbeitung

trixSVD aus Igor Pro genutzt. Diese basiert auf einem einfachen Algorithmus nach *J. Nash und S. Shlien* [141].

Die Auswertung der behandelten Proben erfolgt mit einer numerischen Singulärwertzerlegung nach Kapitel 3.

3 Bestimmung des spektralen Anteils mithilfe einer erweiterten Singulärwertzerlegung

In der vorliegenden Arbeit soll die lokale Verteilung von Wirkstoffen und Nanocarriern in biologischen Systemen untersucht werden. Grundlage bilden hierfür zum einen die Messung bekannter Rein- und Referenzproben, zum anderen hyperspektrale Messungen mit dem Wirkstoff behandelte Proben. Zur Bestimmung der anteiligen Zusammensetzung eines gemessenen Mischspektrums kann eine Singulärwertzerlegung analog nach *X. Zhang et al.* [44] zum Einsatz kommen. Sie eignet sich hierbei zur Analyse komplexer Probleme, bei denen ein Substanzgemisch nicht durch die spektralen Unterschiede bei einzelnen Energien wiedergegeben werden kann (Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz [142]). Spektrale Problemstellungen, welche sich durch die Verschiebung und Intensitätsänderung einzelner Signale eines Spektrums auszeichnen (z.B. pH-induzierte Effekte bei Methylrot [143] oder solvatochrome Änderungen z.B. von IR-Spektren des [6,6]-Phenyl-C₆₁Buttersäuremethylester [144]), können nur begrenzt mit einer Singulärwertzerlegung wiedergegeben werden - es werden in diesem Fall Referenzspektren aller auftretenden Spezies benötigt.

In Gleichung 3.1 zeigt die Problemstellung einer Singulärwertzerlegung, welche durch einen Algorithmus numerisch gelöst wird:

$$\text{Spektrum}(E) = \sum_i a_i \cdot \text{Referenzspektrum}(E) \quad (3.1)$$

Hierbei wird das Spektrum durch eine Summe von Referenzspektren, welche jeweils mit einem Vorfaktor a_i angepasst werden, wiedergegeben. Unter einer Singulärwertzerlegung versteht man die Lösung dieser Gleichung ohne den Einsatz von Grenzen für die Vorfaktoren a_i . Diese können sowohl positive als auch negative Werte annehmen. Ortsaufgelöst kann eine solche Singulärwertzerlegung z.B. mit dem Programm MANTiS [145] für Röntgenmikroskopiedaten durchgeführt werden. Zur Lösung des vorliegenden Problems, einen Wirkstoff innerhalb der Haut lokal zu detektieren, eignet sich dieses Verfahren nur bedingt, da ermittelte negative Vorfaktoren für Substanzspektren a_i das Ergebnis beeinflussen können. Negative Werte würden in diesem Fall bedeuten, dass eine Substanz weniger als nicht-vorhanden ist. Als Alternative existiert hierfür die nicht-negative Matrix-Approximation [146, 147], bei der keine Werte unter-

3 Bestimmung des spektralen Anteils mithilfe einer erweiterten Singulärwertzerlegung

halb des Grenzwertes Null für die Vorfaktoren a_i ermittelt werden. Dies eignet sich, um die lokale Verteilung auf Basis der Spektren aller eingesetzten Reinsubstanzen zu bestimmen. Dieses Verfahren kommt bei einigen Proben zum Einsatz, eignet sich jedoch ebenfalls nicht zur Auswertung von Systemen, bei denen Differenzspektren zur Abbildung biologischer Schwankungen genutzt werden. Biologische Schwankungen können Zu- und Abnahmen von Signalen bedeuten, d.h. a_i muss positive und negative Werte annehmen können. Ein Abbau einer Substanz kann nur durch negative Werte abgebildet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird eine Mischung aus einer Singulärwertzerlegung und nicht-negative Matrix-Approximation eingesetzt, d.h. a_i hat für Reinsubstanzspektren eine Untergrenze bei Null und für Differenzspektren können positive und negative Vorfaktoren ermittelt werden. Für die Auswertung wurde eine Prozedur für Igor Pro programmiert, welche die Datenmatrix auf Basis von Referenzspektren Spektrum-für-Spektrum, unabhängig voneinander, nach Gleichung 3.2 iterativ löst und die Ergebnisse ortsabhängig speichert.

$$\text{Spektrum}(E) = \sum_i a_i \cdot \text{Referenzspektrum}(E) + n \quad (3.2)$$

Der Absolutwert n dient hierbei zur Korrektur eines unter Umständen auftretenden Versatzes, z.B. durch Änderungen der Elementzusammensetzung leichterer Elemente bei NEXAFS-Spektren, des vorliegenden Spektrums. Hierbei können für jedes Referenzspektrum separat der Startwert und die Grenzwerte festgelegt werden. Als Startwert von a_i wurde willkürlich zu $1 \cdot 10^{-6}$ gewählt, d.h. die Lösung erfolgte von kleinen zu großen Werten. Ebenso kann der energetische Bereich, welcher betrachtet wird, festgelegt und spektrale Regionen, die Artefakte, z.B. Ausreißer oder Intensitätsschwankungen von Lasern, enthalten, maskiert und damit nicht beachtet werden. Igor Pro löst hierbei die Aufgabenstellung mithilfe des Levenberg-Marquardt-Algorithmus' [148], welcher intern FuncFit genannt wird. Hierbei handelt es sich um eine iterative Lösung, d.h. das Ergebnis wird durch systematisches Ausprobieren erhalten. Jeder Vorfaktor (in Igor Pro als $w[n]$ angegeben) einer Funktion oder eines Datensatzes wird solange optimiert bis die Ableitung des Anpassungskoeffizienten ξ minimal wird, welcher als

$$\xi^2 = \sum_i \left(\frac{y - y_i}{\sigma_i} \right)^2 \quad (3.3)$$

definiert ist. Dies ist der Fall, wenn sich möglichst viele errechnete Werte des Fits y unterhalb der genäherten Standardabweichung σ_i befinden. Der Wert y_i ist der Wert des zu fittenden Datensatzes, in Igor Pro „Wave“ genannt, an der Stelle des Werts y . Die Summe bezieht sich im Normalfall auf alle Datenpunkte des Mischspektrums, kann jedoch durch eine Maske und die Festlegung eines Start- und eines Enddatenpunktes

3 Bestimmung des spektralen Anteils mithilfe einer erweiterten Singulärwertzerlegung

eingeschränkt werden.

Ebenso kann für jedes Referenzspektrum oder eine Teilmenge der Referenzspektren einzeln nach Gleichung 3.4 eine Verschiebung b bestimmt werden. Dies findet in Kapitel 5.2.3 Anwendung.

$$\text{Spektrum}(E) = \sum_i a_i \cdot \text{Referenzspektrum}(E + b_i) + n \quad (3.4)$$

Als Startwert wurde für diesen Fall willkürlich 0.5 gewählt, da mit kleinen a_i (z.B. $a_i = 1 \cdot 10^{-6}$) die Lösung von b_i aufgrund nur geringer Änderungen nicht erfolgen kann. Es besteht ebenfalls die Möglichkeit für alle Referenzspektren ein gemeinsames b berechnen zu lassen. Die Verschiebungen b und b_i haben die Einheit der x-Achse der betrachteten Spektren, z.B. eV bei NEXFAS- und cm^{-1} bei IR-Spektren. Anschließend wird auf Basis der errechneten Faktoren a und ggf. b in Kombination mit den Referenzspektren das durch den Fit angenäherte Mischspektrum Messpunkt-für-Messpunkt berechnet. Im Rahmen dieser Arbeit wird das Verfahren vereinfacht als numerische Singulärwertzerlegung bezeichnet, der Name könnte ebenfalls Linearkombinationsmodellierung (kurz LCM von engl. linear combination modeling) lauten. Diese Methode findet im Folgenden sowohl bei der Auswertung von Röntgenmikroskopiedaten als auch bei der Auswertung von hyperspektralen AFM-IR-Daten Anwendung. Sie kann auch für andere Spektroskopiemethoden angewendet werden, solange die Mischung von Substanzen sich spektral gesehen linear verhält (beispielsweise klassische Infrarotspektroskopie oder Kernspinresonanzspektroskopie).

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

Rapamycin ist ein Wirkstoff mit einer Masse von 914.14 Da [23, 24, 25]. Damit überschreitet es die 500-Da-Regel, wodurch ein Transport durch das Stratum Corneum hindurch erheblich gehemmt ist [2]. Es ist bekannt, dass der Transport für schwerere Moleküle mithilfe von einer mechanischen, chemischen oder physiologischen Beschädigung der Haut [13] und/oder die Wahl einer penetrationsfördernden Formulierung ermöglicht werden kann [15]. Im Rahmen dieses Kapitels werden zum einen der Einfluss der Beschädigung der Haut durch die Serinprotease Trypsin in Konzentrationen, die für Entzündungen typisch sind, auf die Aufnahme und Verteilung des Wirkstoffs untersucht [18, 19]. Zusätzlich wird der Einfluss des Oxidationsmittels DBPO auf die Verteilung von Rapamycin untersucht.

Es ist bekannt, dass Wirkstoffe mithilfe von lipophilen Nanocarriern und Mizellen in die Haut transportiert werden können [149, 4, 150, 28]. Um diese Beobachtungen für Rapamycin zu überprüfen, werden Untersuchungen mit zwei Nanocarriertypen von Frau Dr. Keerthana Rajes [27, 28] gezeigt.

Untersucht werden im Rahmen dieses Kapitels zwei unterschiedliche Arten von Hautproben: zum einen in das Harz Epon[®] eingebettete Proben, welche mit Röntgenmikroskopie an der O 1s-Kante untersucht wurden, zum anderen getrocknete Kryoproben zur Untersuchung mithilfe von photothermischer Expansionsspektroskopie (AFM-IR). In beiden Fällen wurde die frische Haut *ex-vivo* mit der Formulierung behandelt und nach einem Fixierungs- bzw. Gefrierungsprozess in Scheiben mit einer Dicke von ca. 300 nm geschnitten auf ein Trägermaterial aufgebracht. Röntgenmikroskopiemessungen erfolgten als eine Messung einer Region Energie-für-Energie, während die AFM-IR-Messungen Punkt-für-Punkt Spektrum-für-Spektrum gemessen wurden. Die Auswertung erfolgte in beiden Fällen mithilfe einer numerischen Singulärwertzerlegung auf Basis von Referenzspektren [44]. Die vordefinierten Spektren für den Hautanteil stammen hierbei für die Röntgenmikroskopie von unterschiedlichen Orten aus dem Stratum Corneum einer unbehandelten Referenzprobe, für die AFM-IR-Messung dient eine Singulärwertzerlegung einer unbehandelten Referenzprobe als Grundlage [151]. Für Wirkstoff und Nanocarrier wurden Referenzspektren der Reinsubstanzen verwendet.

4.1 Referenz-Spektren

Zur Auswertung der lokalen Verteilungen von Substanzen in hyperspektralen Messungen ist es notwendig die zugehörigen Spektren der Reinsubstanzen zu kennen. Im Folgenden werden die NEXFAS-Spektren an der C 1s- und O 1s-Kante gezeigt und mithilfe aus der Literatur bekannten Referenzsubstanzen einzelnen Übergängen zugeordnet. Eine Zuordnung mithilfe eines quantenmechanischen Modells erfolgt nicht, da dies nicht den Fokus der vorliegenden Arbeit darstellt. Zusätzlich werden einige AFM-IR-Spektren gezeigt, deren Zuordnung zum einen auf Basis der Literatur zum anderen auf einer quantenmechanischen Ab initio Rechnung eines vereinfachten Moleküls beruht.

4.1.1 Rapamycin

Der absolute Absorptionsquerschnitt wurde mithilfe tabellierter Daten [140] berechnet (vgl. Formel 2.6 und Formel 2.7 aus Kapitel 2.2):

An der C 1s-Kante ① in Abbildung 4.1 zeigt Rapamycin das Maximum des C $1s \rightarrow \pi^*$ -Übergangs bei 285.0 eV, im Bereich des C $1s \rightarrow \sigma^*$ zwei Signale bei 286.6 eV und 288.4 eV. Die Signale können hierbei auf Basis der Literatur [152, 153] bei 285.0 eV den Kohlenstoff-Doppelbindungen, bei 286.6 eV dem Kohlenstoff der Carbonylgruppen und bei 288.4 eV den Kohlenstoffen in der Nähe von Alkoholgruppen und an Alkylketten zugeordnet werden (vgl. die Struktur von Rapamycin in Abbildung 1.9 in Kapitel 1.3.3). Das Spektrum an der O 1s-Kante ② zeigt ein Signal im O $1s \rightarrow \pi^*$ -Bereich bei 531.35 eV, welches sich in zwei Gaußfunktionen bei 531.15 eV und 532.2 eV entfalten lässt (vgl. (a)). Beide Signale entsprechen Carbonylgruppen, wobei das Signal bei höherer Energie dem doppelgebundenen Sauerstoff der Estergruppe entspricht. Im O $1s \rightarrow \sigma^*$ Bereich befindet sich eine Schulter bei 535.05 eV (Ethergruppe) und das Maximum bei 538.4 eV (Alkohol- und Aldehydgruppen).

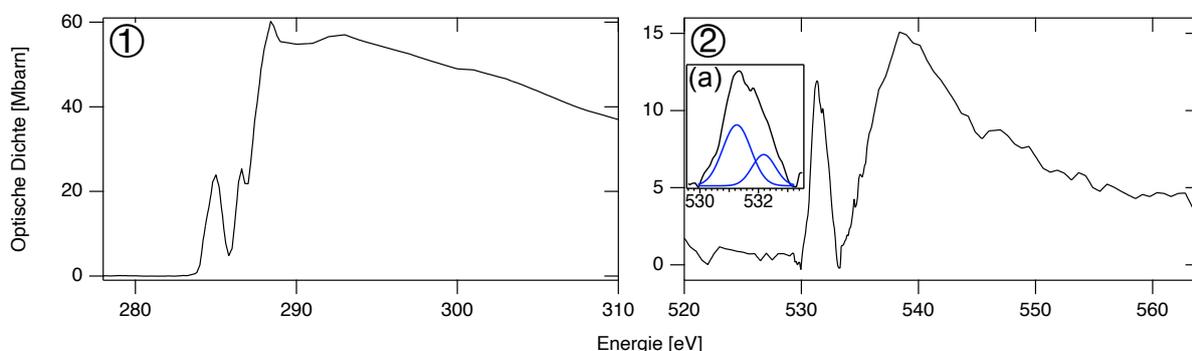


Abbildung 4.1: NEXAFS-Spektren des Wirkstoffs Rapamycin, ① an der C 1s-Kante und ② an der O 1s-Kante, (a) Gaußentfaltung des O $1s \rightarrow \pi^*$ -Übergangs.

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

In Abbildung 4.2 ist das AFM-IR-Spektrum des Wirkstoffs Rapamycin dargestellt. Auf Basis der Reaktionsprodukte des Rapamycins in der Literatur [154] können die Übergänge bei 1732 und 1647 cm^{-1} den Carbonylschwingungen und der Übergang bei 1098 cm^{-1} der C-O-C-Schwingung zugeordnet werden. Auf Basis des im Vergleich zu Rapamycin vereinfachten Moleküls ((2S,3S,4R,6S)-4-((S)-2-((cyclohepta-1,4,6-trien-1-ylmethyl)(methyl)carbamoyl)but-3-enoyl)-3-hydroxy-6-methoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)methylacetat, welches als HF TZVP Optimierung mithilfe Orca [57, 56] berechnet wurde, können weitere Banden zugeordnet werden:

Die Bande bei 1764 cm^{-1} entspricht der C=O Doppelbindung, die Bande bei 1627 cm^{-1} einer Überlagerung aus der Amid-I-Bande und C-C-Gerüstschwingungen der kohlenstoffdoppelbindungsreichen Region des Rapamycins. Die Signale bei 1422 cm^{-1} und 1342 cm^{-1} sind CH_x - und C-C-Gerüstschwingungen. Bei 1189 cm^{-1} sind Überlagerungen von C-C-Biegeschwingungen und bei 1018 cm^{-1} C-C- und C-O-C-Gerüstschwingungen sichtbar.

In Abbildung 4.3 ist neben dem AFM-IR-Spektrum auch das ATR-IR-Spektrum von Rapamycin dargestellt. Für den gemeinsamen spektralen Bereich zeigen beide Spektren vergleichbare Absorptionsbanden. Abweichungen ergeben sich durch den je Signal unterschiedlichen Proportionalitätsfaktor des AFM-IR-Spektrums gegenüber dem ATR-IR-Spektrum (vgl. Kapitel 1.1.8).

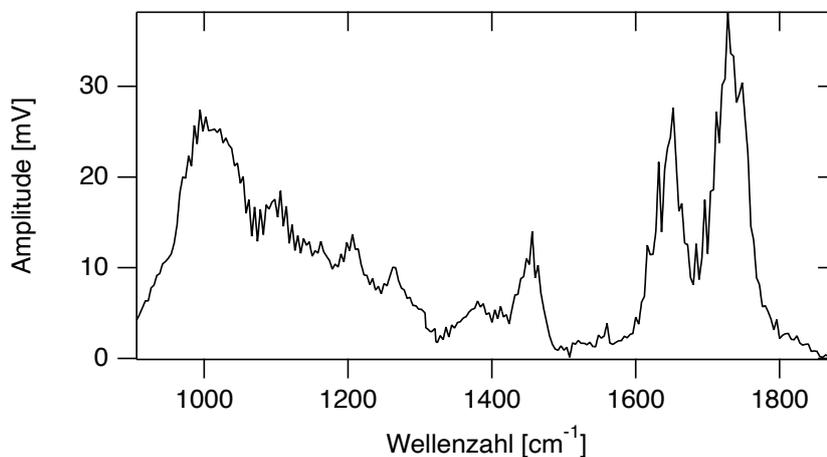


Abbildung 4.2: AFM-IR-Spektrums des reinen Rapamycins von 906 cm^{-1} bis 1880 cm^{-1} .

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

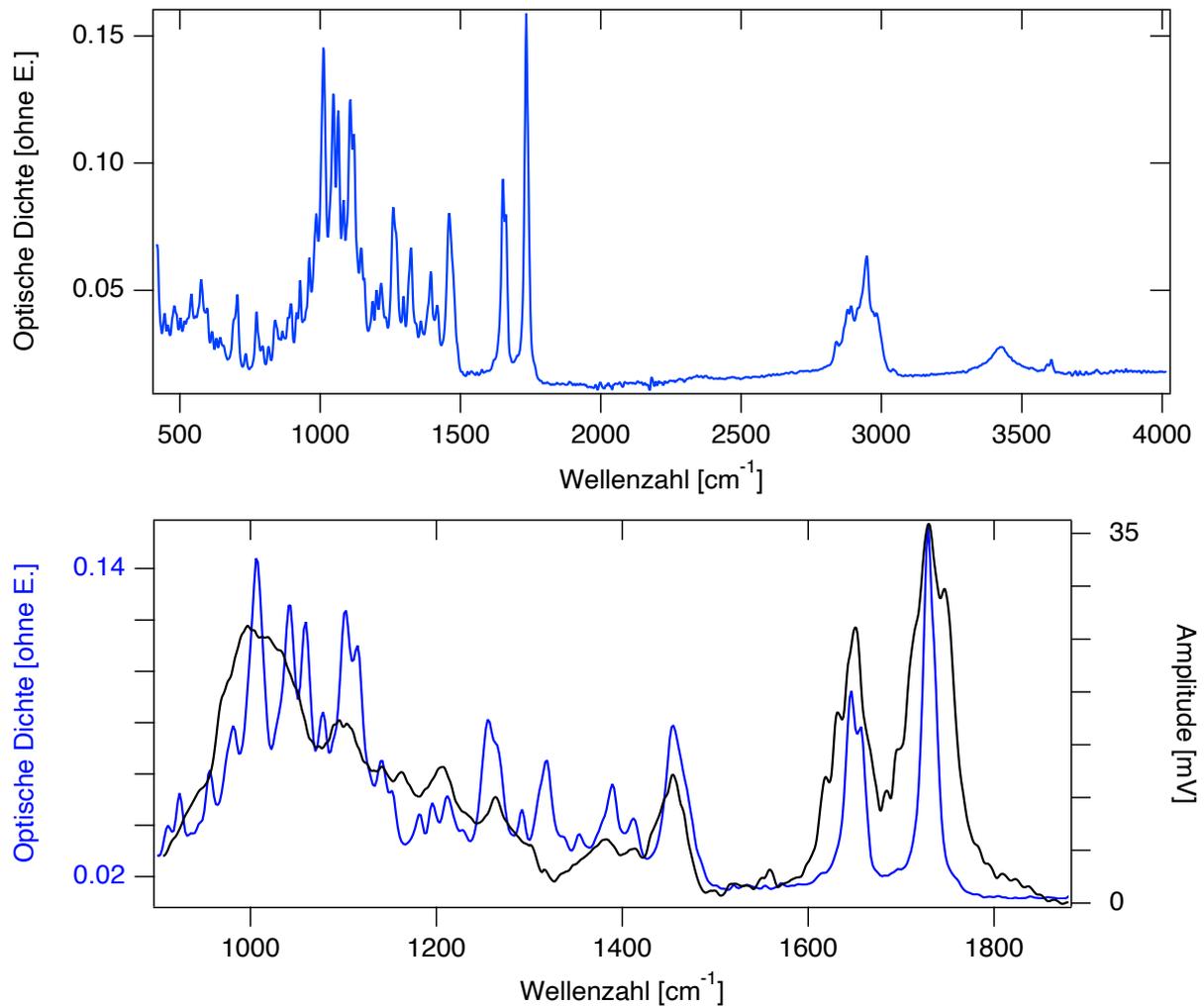


Abbildung 4.3: (oben) ATR-IR-Spektrum des reinen, kristallinen Rapamycins von 417 cm⁻¹ bis 4015 cm⁻¹, (unten) Vergleich des ATR-IR-Spektrums (blau) mit dem AFM-IR-Spektrum (schwarz) im Bereich von 906 cm⁻¹ bis 1880 cm⁻¹, AFM-IR-Spektrum wurde mithilfe des Savitzky-Golay-Algorithmus zweiter Ordnung auf Basis von 15 Punkten geglättet. ATR-IR-Energieskala zum Vergleich um +12.7 cm⁻¹ korrigiert.

4.1.2 rsCMS 1 Nanocarrier

Die NEXAFS-Spektren des reduktionssensitiven Nanocarrier rsCMS 1 sind für die C 1s-Kante unter ① und für die O 1s-Kante unter ② in Abbildung 4.4 dargestellt. An der Kohlenstoffkante ist im C 1s→ π^* -Bereich keine intensive Absorption zu erkennen, da diese Verbindung keine C=C-Doppelbindungen enthält (vgl. Abbildung 1.8 in Kapitel 1.3.2). Die Signale haben den Ursprung im vorhandenen Carbonylkohlenstoff. Mithilfe von Literaturspektren [152, 153] können die Signale im C 1s→ σ^* -Bereich bei 288.4 eV den Alkylgruppen und bei 293.0 eV dem Carbonyl-Kohlenstoff zugeordnet werden. Das Signal bei 531.45 eV (O 1s→ π^*) entspricht dem Carbonyl-Sauerstoff und bei 537.8 eV (O 1s→ σ^* , Maximum) den Ethergruppen.

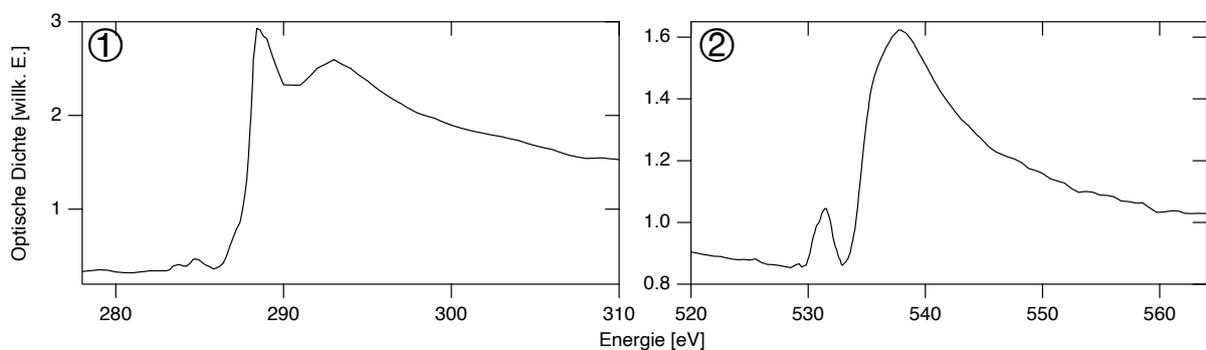


Abbildung 4.4: NEXAFS-Spektren der rsCMS 1 Nanocarrier, ① an der C 1s-Kante und ② an der O 1s-Kante.

4.1.3 osCMS 2b Nanocarrier

Der oxidationssensitive Nanocarrier osCMS 2b zeigt an der C 1s-Kante (Abbildung 4.5, ①) das Signal des Carbonylkohlenstoffs mit geringer Intensität im C 1s→ π^* - und zwei Signale im C 1s→ σ^* -Bereich. Das Signal bei 288.6 eV kann den Kohlenwasserstoffketten und das Signal bei 293.1 eV dem Kohlenstoff an den Carbonylgruppen zugeordnet werden [152, 153] (vgl. Abbildung 1.8 in Kapitel 1.3.2). In der gleichen Abbildung unter ② ist das NEXAFS-Spektrum an der O 1s-Kante dargestellt. Der Übergang O 1s→ π^* bei 532.25 eV lässt sich dem Carbonylsauerstoff und der O 1s→ σ^* -Übergang bei 537.75 eV dem Ethersauerstoff des Nanocarriers zuordnen.

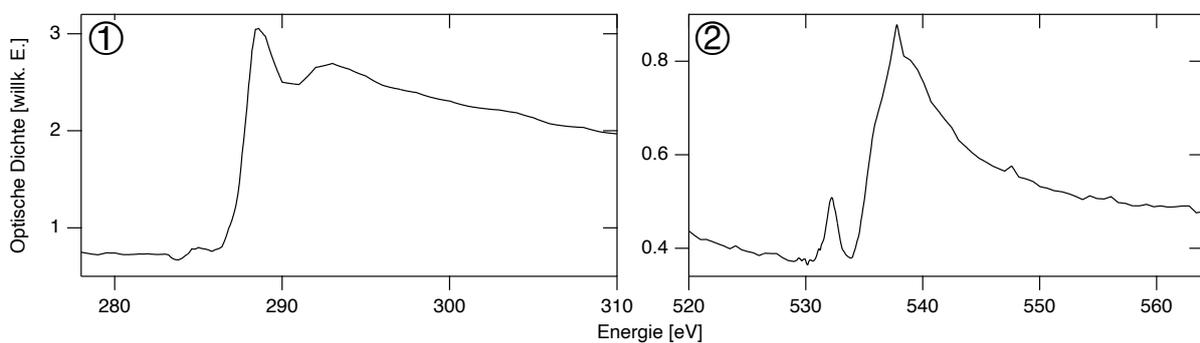


Abbildung 4.5: NEXAFS-Spektren der osCMS 2b-Nanocarrier, ① an der C 1s-Kante und ② an der O 1s-Kante.

4.1.4 Epoxidharz Epon[®]

Für die Röntgenmikroskopie sind die Hautproben in ein Epoxidharz, Epon[®], eingebettet. Hierbei handelte es sich laut Rücksprache mit Frau Schrade (Elektronenmikroskopie, Charité) um ein Polymer, welches aus 1.3 g 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol, 28 g MNA (Methylnadicanhydrid), 24 g 2-Dodecanbernsteinsäureanhydrid und 47 g Glycidether 100 (2,2',2''-((Propan-1,2,3-triyltris(oxy))tris(methylen))tris(oxiran)) hergestellt wird. Es beinhaltet folglich Kohlenstoffeinfach- und -doppelbindungen, Hydroxygruppen, Carbonylgruppen, Ethergruppen, Estergruppen und tertiäre Amine. Die zugehörigen NEXAFS-Spektren sind in Abbildung 4.6 gezeigt: unter ① die C 1s-Kante und unter ② die O 1s-Kante. Mithilfe bekannter Referenzsubstanzen [152, 153] können die Signale bei 284.8 eV den Kohlenstoff-Doppelbindungen und sowohl bei 288.2 eV als auch 293.0 eV den Kohlenstoffeinfachbindungen und Kohlenstoffen in Alkoholen zugeordnet werden. An der O 1s-Kante ist der Carbonylsauerstoff bei 532.0 eV, Sauerstoff einer Ethergruppe bei 535.2 eV als Schulter und einer Hydroxygruppe bei 538.95 eV. Die vorliegenden Spektren zeigen hierbei eine Ähnlichkeit zu den aus der Literatur bekannten Spektren des Epoxidharzes Agar 100 [155].

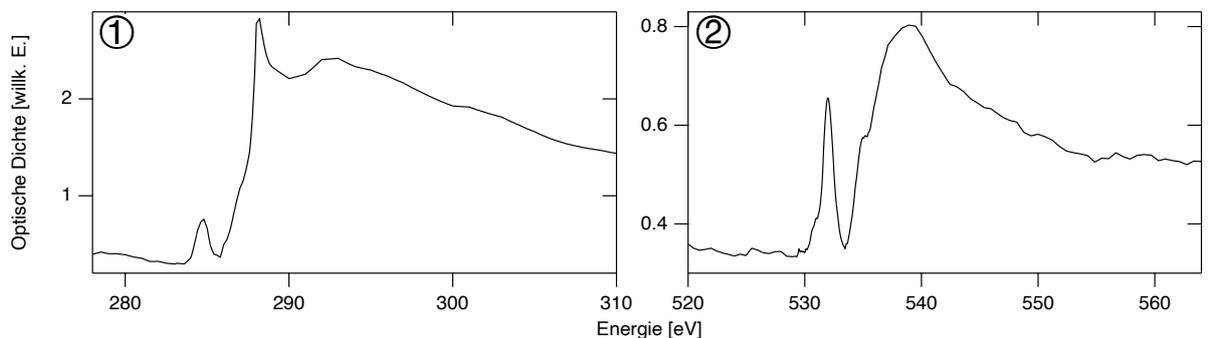


Abbildung 4.6: NEXAFS-Spektren des Einbettungsmediums Epon[®], ① an der C 1s-Kante und ② an der O 1s-Kante.

Das zugehörige AFM-IR-Spektrum ist in Abbildung 4.7 dargestellt. Die hierbei intensivsten Signale befinden sich im Bereich 1700 bis 1800 cm^{-1} . Hierbei handelt es sich um den Bereich der Aldehyd-Schwingungen [156]. Bei 1460 cm^{-1} sind die $\nu(\text{C-C}_{\text{arom.}})$, bei 1270 cm^{-1} die $\delta(\text{CH}_2_{\text{asym.}})$, bei 1210 cm^{-1} die $\nu(\text{C-O}_{\text{arom., asym.}})$ und bei 1050 cm^{-1} die $\nu(\text{C-O}_{\text{arom., sym.}})$ [156, 157].

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

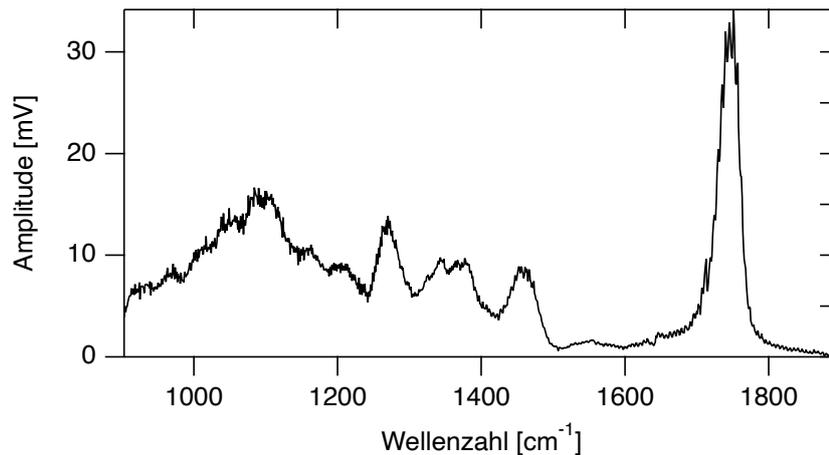


Abbildung 4.7: AFM-IR-Spektrum des Epon[®] von 906 cm⁻¹ bis 1880 cm⁻¹.

Die hohe Intensität der Carbonylbande lässt sich durch den hohen Anteil an Sauerstoff im Molekül erklären: Die auf Basis einer Elementaranalyse (Tabelle 4.1) ermittelte Summenformel ist C₅₀H₉₈S₁O₁₈. Sie weicht von der theoretischen Summenformel aus den Reinsubstanzen (C₅₁H₇₇O₁₈) von der Anzahl an Wasserstoff- und Schwefelatomen ab. Eine Ursache hierfür kann nicht geklärt werden, es handelt sich möglicherweise um Verunreinigungen der Ausgangssubstanzen. Die für die Messungen an den Innerschalenabsorptionskanten betrachteten Elemente Kohlenstoff und Sauerstoff entsprechen den Erwartungen, welche sich aus den eingesetzten Chemikalien ergeben.

Tabelle 4.1: Elementaranalyse des Epoxidharzes (Epon[®], Polymer).

	C	N	H	S	O (berechnet)
Messung 1	59.41	0.029	9.821	1.869	28.871
Messung 2	59.77	0.017	9.948	1.811	28.454
Messung 3	59.85	0.024	9.899	1.874	28.559
Durchschnitt	59.69	0.02	9.89	1.85	28.56

4.1.5 Paraffin

In Abbildung 4.8 ist das Spektrum von Paraffin (Wachs) dargestellt. Das gezeigte Spektrum besitzt zwei Regionen mit deutlich identifizierbaren Maxima. Hierbei handelt es sich um die CH_3 -Biegeschwingung bei 1380 cm^{-1} und um die CH-Deformationsschwingung bei 1460 cm^{-1} [158].

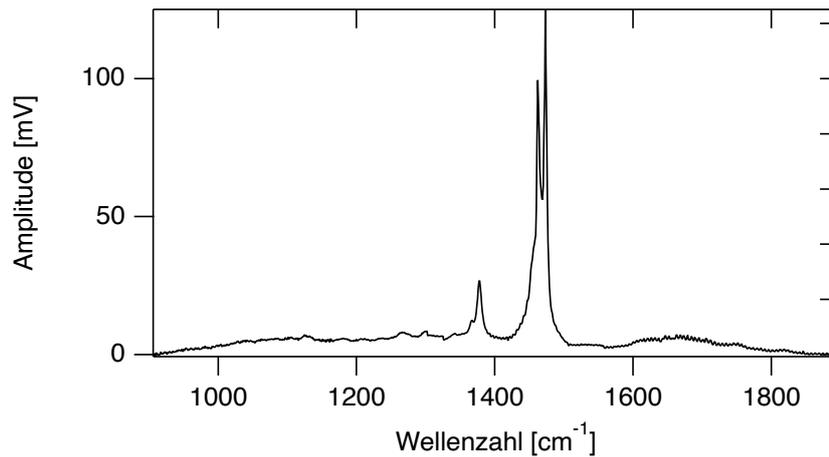


Abbildung 4.8: AFM-IR-Spektrum des reinen Paraffins von 906 cm^{-1} bis 1880 cm^{-1} .

4.1.6 Menschliche Haut

Im Rahmen dieser Arbeit wurden NEXAFS-Messungen des Stratum Corneums, welche in das Epoxidharz Epon[®] eingebettet wurde, gemessen. Die entsprechenden Messungen sind nach Abzug des Epon[®]-NEXAFS-Spektrums in Abbildung 4.9 dargestellt. Das Spektrum von nicht-eingebetteter Haut an der C 1s-Kante ist hierbei aus der Literatur [159] bekannt: Die Region im C 1s→ π^* -Bereich ① kann Keton- und Carbonylfunktionen zugeordnet werden. Im C 1s→ σ^* -Bereich befinden sich bei 288.3 eV Carbonyle und bei 292.15 eV Carbonate. Beide Energien können auf Basis vereinfachter Verbindungen [152, 153] auch Alkylgruppen zugeordnet werden. Die O 1s Kante ② zeigt ein Signal bei 532.05 eV (Carbonyle und Ketone) und bei 543.35 eV (Sauerstoffeinfachbindungen). Für die Haut an der O 1s Kante sind Spektren von in Epon[®]-eingebetteter, entzündete Maushaut aus der Literatur bekannt [150], welche zu den vorliegenden Spektren vergleichbar sind.

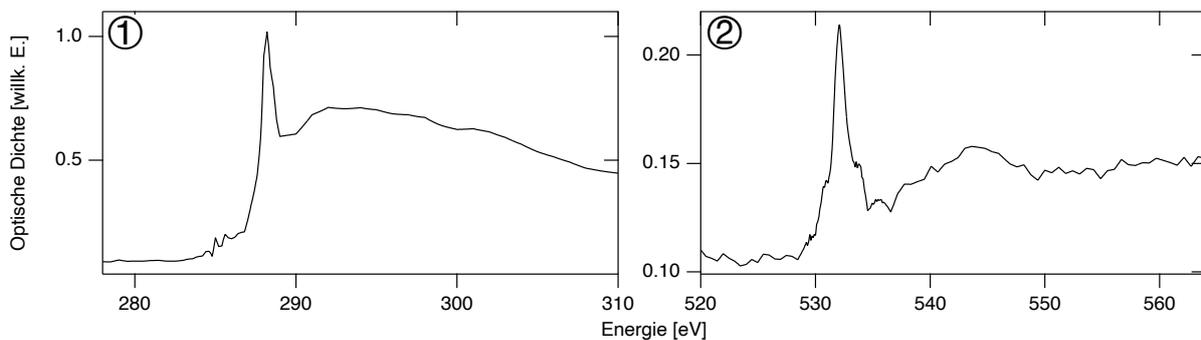


Abbildung 4.9: NEXAFS-Spektren der Differenz aus eingebettetem Stratum Corneums und Einbettungsmedium Epon[®], ① an der C 1s-Kante und ② an der O 1s-Kante.

Innerhalb des fixierten Stratum Corneums unterscheiden sich die gemessenen Spektren zwischen den Regionen der Corneocyten und der Lipidkanäle. Die Differenzspektren beider Regionen sind in Abbildung 4.10 dargestellt. Hierbei wurden der 1s→ π^* - (schwarz) und der 1s→ σ^* -Bereich (blau) als Einzelspektren aufgetrennt, da diese Anteile unabhängig voneinander innerhalb der Hautschichten variieren können (vgl. für die O 1s-Kante Abbildung 4.13 aus Kapitel 4.2.2). An der C 1s-Kante sind die Maxima der Differenzen bei 285.2 eV (aromatische und allylische Kohlenwasserstoffe) und 288.2 eV (Säurefunktionen, Alkohole, Alkylgruppen), an der O 1s-Kante bei 532.0 eV (Carbonyle und Ketone) und 538.35 eV (Hydroxy- und Ethergruppen) [152, 153].

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

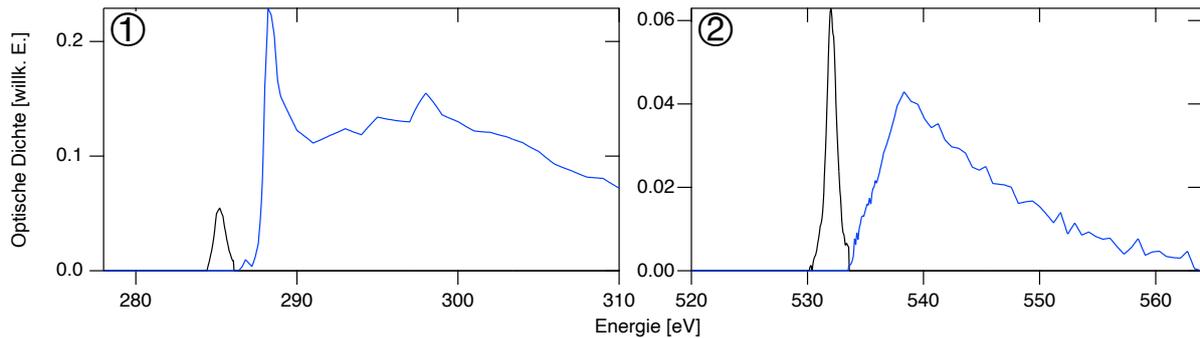


Abbildung 4.10: NEXAFS-Differenzspektren zwischen Corneocytes und Lipiden des menschlichen Stratum Corneums, ① an der C 1s-Kante und ② an der O 1s-Kante, Schwarz: $1s \rightarrow \pi^*$ -Anteil, Blau: $1s \rightarrow \sigma^*$ -Anteil.

Das Spektrum von menschlicher Haut, welche für 100 Minuten mit Serinprotease behandelt und anschließend getrocknet wurde, ist in Abbildung 4.11 dargestellt. Vom Spektrum im Bereich 903 cm^{-1} bis 1312 cm^{-1} wurde das Spektrum des Trägers (Glas) abgezogen, bei höheren Wellenzahlen zeigt das Trägermedium keine Absorption. Das Signal bei 1700 cm^{-1} entspricht einer C-O Streckschwingung (Amid I), bei 1550 cm^{-1} einer C-N-Streck-/N-H-Biegeschwingung (Amid II), bei 1400 cm^{-1} C-H₃ einer sym. Biegeschwingung, bei 1250 cm^{-1} der Methyl-C-H-Streckschwingung (Amid III) und 1150 cm^{-1} einer C-O asym. Streckschwingung (Ester) [160].

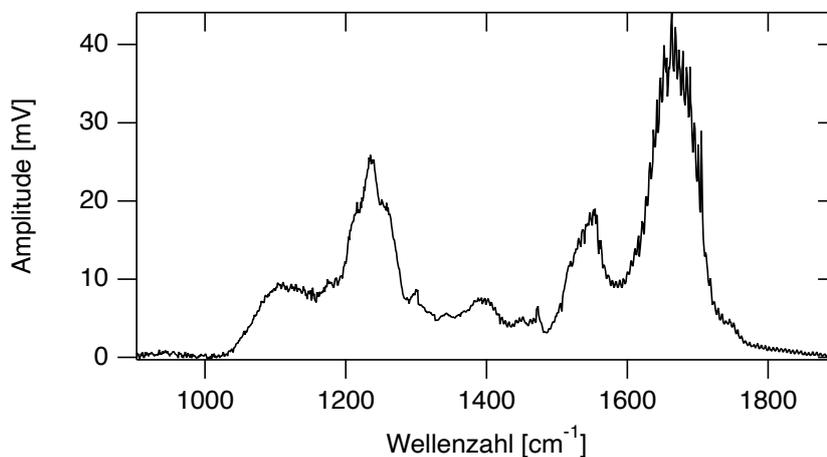


Abbildung 4.11: AFM-IR-Spektrums getrockneter Haut nach 100 Minuten Vorbehandlung mit der Serinprotease Trypsin im spektralen Bereich von 903 cm^{-1} bis 1898 cm^{-1} .

4.2 Betrachtung von Rapamycin-unbehandelten Hautreferenzproben

4.2.1 Nachweis von Wirkstoffen mithilfe der Röntgenmikroskopie auf Basis des Lambert-Beer-Gesetzes

Die einfachste Methode zum Nachweis einer Substanz in einem Substanzgemisch ist die Betrachtung einer Energie, bei der die Substanz absorbiert, die anderen Substanzen jedoch nicht [142]. Für Rapamycin gibt es jedoch aufgrund der starken Überlagerung der $O\ 1s \rightarrow \pi^*$ -Banden keine solch leicht zugängliche Energie an der $O\ 1s$ Kante. Eine andere Methode zum Nachweis von Spurensubstanzen ist die Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz unter Nutzung mehrerer Energien. Für den Wirkstoff Dexamethason kam dieses Verfahren im vorherigen Projekt bereits zum Einsatz [43]. Zur Detektion des Wirkstoffs Rapamycin kann der in Abbildung 4.12 dargestellte Unterschied der optischen Dichte bei 530.73 eV und 531.13 eV ausgenutzt werden, welche auch schon in der Literatur für den Nachweis von Rapamycin Anwendung gefunden hat [161]. Hierbei zeigt das Spektrum des Wirkstoffs Rapamycin in Abbildung 4.12 ① einen Anstieg der optischen Dichte, während das Einbettungsmedium Epon[®] ② und die eingebettete Haut ③ bei diesen Energien nahezu keinen Anstieg aufweisen. Die Betrachtung einer unbehandelten Referenzprobe mithilfe der Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz ist in Abbildung 4.13 (e) (Kapitel 4.2.2) in Blau gezeigt.

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

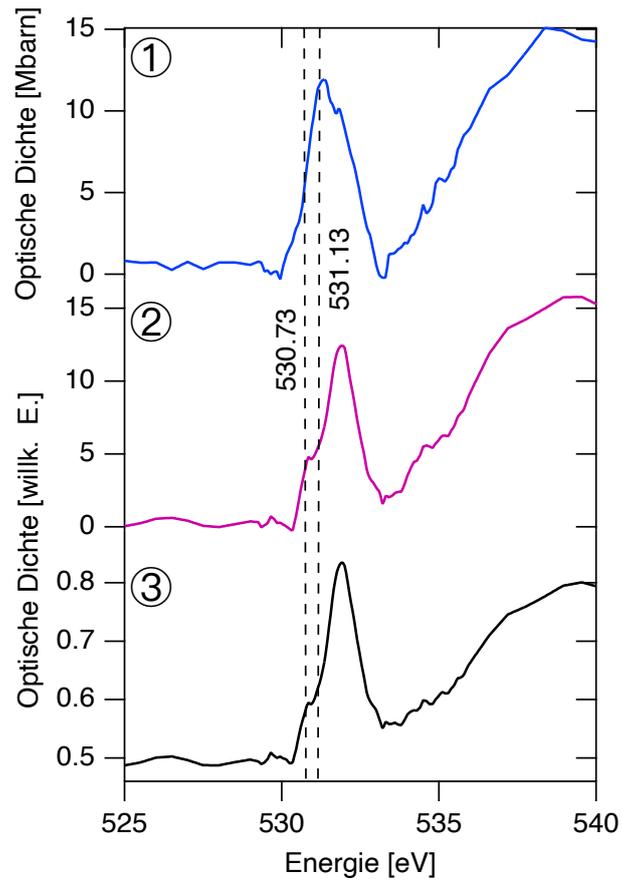


Abbildung 4.12: Vergleich des $O\ 1s \rightarrow \pi^*$ -Bereiches zwischen ① Rapamycin, ② Epoxidharz Epon[®] zur Einbettung der Proben und ③ in Epon[®] eingebetteter Haut. Daraus resultierendes Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz unter Nutzung der Energien 530.73 eV und 531.13 eV.

4.2.2 Betrachtung einer unbehandelten Referenzhaut (NEXAFS, O 1s Kante) mithilfe einer Singulärwertzerlegung und der Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz

In diesem Kapitel wird eine unbehandelte Referenzhaut mithilfe einer Singulärwertzerlegung und der Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz betrachtet. Die ortsaufgelösten Verteilungen der Referenzsubstanzen sind in Abbildung 4.13 dargestellt. Unter ① ist die Transmissionsintensität bei 532.03 eV dargestellt, welche einen sichtbaren Kontrast zwischen Lipiden und Corneocyten ermöglicht. Beim Harzanteil (Einbettungsmedium Epon[®]) (a) ist ein deutlicher Einbruch im Stratum Corneum vorhanden, während beim Hautanteil (b) ein Maximum zu erkennen ist. Die Verteilung des Hautanteils entspricht hierbei der Literatur, da das Stratum Corneum wasserärmer ist und folglich mehr biologisches Material enthält als die viable Epidermis [162, 163]. Im tiefen Stratum Corneum zeigen sich unter (c) starke O 1s \rightarrow π^* -Anteile als im oberen Stratum Corneum. Dies deutet auf einen Abbau der Sauerstoffdoppelbindungen von inneren zu äußeren Corneocyten hin. Der O 1s \rightarrow σ^* -Anteil unter (d) zeigt im Stratum Corneum gegenüber der viable Epidermis ein Minimum. Das Integral des Wirkstoffs Rapamycin (schwarz) und das Integral der Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz unter Nutzung der Energien 531.13 eV und 530.73 eV (blau) zeigen unter (e) neben der Sensitivität zum Wirkstoff eine leichte Querempfindlichkeit zu den Strukturen des Stratum Corneums, welche bei der Wahl des Nullpunktes der behandelten Proben beachtet wird. Am Probendefekt (vgl. helle Region in der Transmissionsintensität unter ①) zeigen beide Methoden einen Einbruch im Integral, in der lokalen Verteilung des Wirkstoffs aus der Singulärwertzerlegung sind zusätzlich einige Messpunkte als Ausreißer in dem positiven Bereich sichtbar.

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

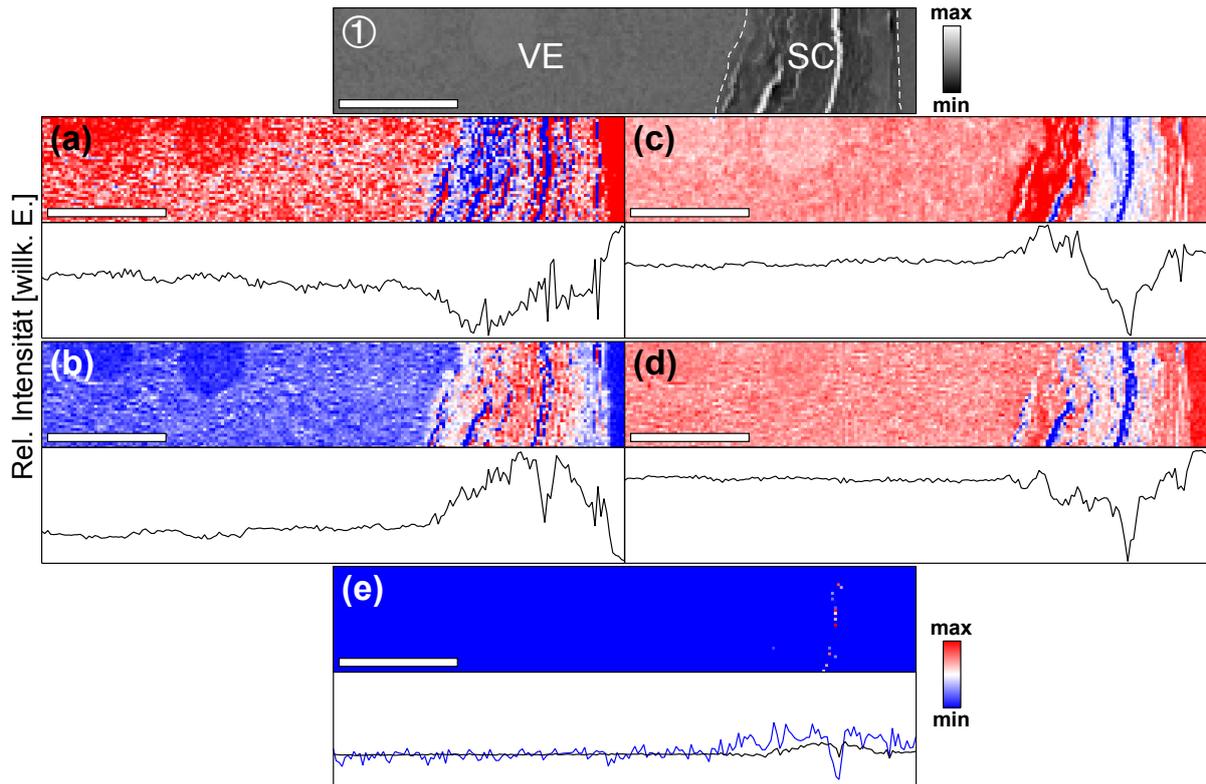


Abbildung 4.13: Ergebnisse der Singulärwertzerlegung einer unbehandelten Referenzhaut, ① Transmissionsintensität bei 532.03 eV, Verteilungen des (a) Harzes mit Tiefenintegral, (b) Hautanteils mit Tiefenintegral, (c) O $1s \rightarrow \pi^*$ -Anteils mit Tiefenintegral und (d) O $1s \rightarrow \sigma^*$ -Anteils mit Tiefenintegral, (e) des Rapamycins mit Tiefenintegral in Schwarz aus einer Singulärwertzerlegung und das Integral der Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz unter Nutzung der Energien 531.13 eV und 530.73 eV in Blau.

Die Quantifizierungsgrenze (Bestimmungsgrenze) y_{LOQ} wird auf Basis des durchschnittlichen Wertes der unbehandelten Blindprobe y_B und der berechneten Standardabweichung σ bestimmt:

$$y_{LOQ} = y_B + 10 \cdot \sigma \quad (4.1)$$

Die Detektionsgrenze y_{LOD} ergibt sich aus [164, 165]:

$$y_{LOD} = y_B + 3 \cdot \sigma \quad (4.2)$$

Auf Basis dieser Referenzspektren liegt die Quantifizierungsgrenze pro einzeln betrachtetem Messpunkt für die Detektion des Wirkstoffs Rapamycin mithilfe einer Singulärwertzerlegung und den vorliegenden Referenzspektren bei 1.06 fg (entspricht $7.0 \cdot 10^5$ Molekülen oder $1.2 \cdot 10^{-18}$ mol). Die Detektionsgrenze pro einzeln betrachtetem Messpunkt liegt bei 0.2 fg (entspricht $1.3 \cdot 10^5$ Molekülen). Für STXM-Messungen liegt die Detektionsgrenze typischerweise bei 1‰, relativ zur Anzahl der Absor-

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

ber [166]. Für das vorliegende Messvolumen von $(0.25)^3 \mu\text{m}^3 (= 0.0156 \mu\text{m}^3)$ und einer Dichte von Haut von 1.02 g/cm^3 [167], ergibt sich näherungsweise für eine Substanz mit der selben Dichte des betrachteten Absorbers eine erreichbare Detektionsgrenze von 0.02 fg .

Da in der vorliegenden Probe durch die Fixierung das Wasser der Haut durch ein Epoxidharz ausgetauscht wurde, kann es Abweichungen bei der vorliegenden Dichte geben. Ebenso ist aus der Literatur bekannt, dass die Quantifizierungsgrenzen von STXM-Messungen von den Referenzspektren und dem Überlapp der spektralen Signale der Einzelsubstanzen beeinflusst werden [168]. Dies kann auch auf die Detektionsgrenzen übertragen werden.

Für die vorliegende Messung wird die Detektionsgrenze auch durch das Rauschen der Spektren beeinflusst. Beim Betrachten der Energien, welche in Kapitel 4.2.1 zur Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz genutzt wurden, und unter Vernachlässigung der Querempfindlichkeit des Hautspektrums im Stratum Corneum, kann ein Rapamycinsignal von größer als der dreifachen optischen Dichte des Rauschens ($3 \cdot \text{OD}_{\text{Rauschen, Vorkante}} \approx 0.006$) detektiert werden. Zur Detektion werden mindestens 0.46 fg Wirkstoff (entspricht $3.0 \cdot 10^5$ Molekülen) im Messvolumen benötigt (entspricht $3 \cdot \sigma$). Die Quantisierungsgrenze ($10 \cdot \sigma$) liegt bei 1.5 fg Wirkstoff (entspricht $1.0 \cdot 10^6$ Molekülen). Unter Betrachtung der Querempfindlichkeit des Stratum Corneums zu den betrachteten Energien ($y_B = 0.4 \text{ fg}$) erhöhen sich die Grenzwerte auf $y_{\text{LOD}} = 0.9 \text{ fg}$ ($5.8 \cdot 10^5$ Moleküle) und $y_{\text{LOQ}} = 1.9 \text{ fg}$ ($1.3 \cdot 10^6$ Moleküle).

Die berechneten Grenzen der numerischen Singulärwertzerlegung sind kleiner als die Grenzen der Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz. Dies ist auf die Nutzung mehrerer Datenpunkte bei einer Singulärwertzerlegung und eine Reduktion der Querempfindlichkeit des Stratum Corneums durch die Hautreferenzspektren zurückzuführen (vgl. Abbildung 4.13).

Es konnte eine Verteilung und die zugehörigen Tiefenintegrale der Referenzsubstanzen einer typischen Hautprobe gezeigt werden. Diese Verteilungen dienen bei allen numerischen Singulärwertzerlegungen der mit Röntgenmikroskopie gemessenen Hautproben als zusätzliche Kontrolle der Richtigkeit der Singulärwertzerlegung und der manuellen Energiekorrektur der STXM-Daten.

4.2.3 Singulärwertzerlegung einer unbehandelten Referenzhaut (AFM-IR)

Dieses Kapitel behandelt die Untersuchung einer für 16 Stunden mit der Serinprotease Trypsin behandelten Referenzhaut, welche ohne Wirkstoff behandelt wurde. Hierbei handelt es sich um eine Kryoprobe, welche von einem PEG-Kryomedium beim Einfrieren ummantelt wurde. Der Schnitt wurde anschließend getrocknet (siehe Kapitel 2.1.1, Tabelle 2.2).

In Abbildung 4.14 sind die Referenzspektren dargestellt, welche für eine Singulärwertzerlegung genutzt werden sollen. Der Wirkstoff Rapamycin ist unter (a), das genutzte Kryomedium unter (b) und ① bis ⑤ die ersten fünf Komponenten einer Singulärwertzerlegung der Referenzhautprobe dargestellt. Bei der Komponente ① handelt es sich um das Durchschnittsspektrum der Probe, alle weitere Komponenten sind Differenzspektren, die eine Zu- und Abnahme von einzelnen Banden repräsentieren.

Der Wirkstoff Rapamycin und das Kryomedium haben intensiv ausgeprägte C=O-Signale bei 1730 cm^{-1} , während die Hautspektren in diesem Bereich nur eine geringe Absorption zeigen. Das Kryomedium zeichnet sich des Weiteren durch ein intensives Signal bei 1334 cm^{-1} aus. Das durchschnittliche Hautspektrum hat die Amid-I (1662 cm^{-1}) und die Amid-II (1550 cm^{-1}) Banden als markante Signale. Die Änderung der Intensitäten beider Signale entspricht dem Großteil der Änderungen der weiteren Hauptkomponenten ② bis ⑤.

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

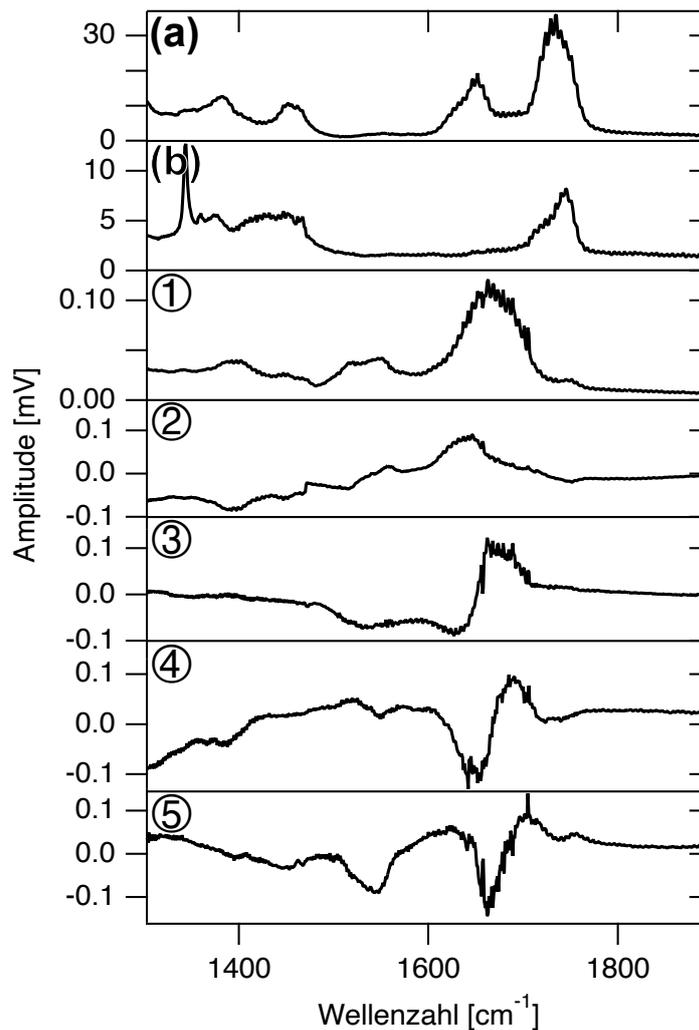


Abbildung 4.14: Referenzspektrum für die Singulärwertzerlegung von AFM-IR-Cryoproben, (a) Rapamycin, (b) Kryomedium und ① bis ⑤ Komponenten aus einer Singulärwertzerlegung einer unbehandelten Referenzhaut (Kryoschnitt).

Der Anteil der einzelnen Singulärwertkomponenten ist in Abbildung 4.15 als relativer Anteil dargestellt. Hierbei hat die Singulärwertkomponente ① einen Anteil von 47%, Komponente ② von 5% und Komponente ③ von 1.4%. Alle weiteren Singulärwertkomponenten haben einen Anteil von weniger als 1%.

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

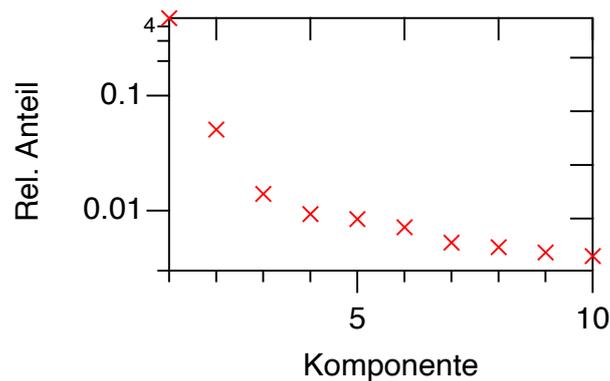


Abbildung 4.15: Relativer Anteil der Singulärwertkomponenten von un behandelter Haut (Kryoprobe), Komponenten 1 bis 5 entsprechen den in Abbildung 4.14 dargestellten Spektren ① bis ⑤.

Auf Basis der in Abbildung 4.14 gezeigten Spektren wurde eine Singulärwertzerlegung der Referenzhaut durchgeführt. In Abbildung 4.16 sind unter (a) die relative Höhenverteilung der Hautprobe und ab (b) die Verteilungen aus der Singulärwertzerlegung dargestellt. Die Verteilungen verhalten sich linear zur Konzentration. Der Wirkstoff Rapamycin ist als (b), das Kryomedium als (c) und die Komponente aus einer Singulärwertzerlegung mit ihrer jeweiligen Nummer dargestellt. Die Probenoberfläche befindet sich rechts und ist als gestrichelte Linie eingezeichnet. Bis auf einige Artefakte lässt sich, wie erwartet, in der unvorbehandelten Probe kein Wirkstoff nachweisen, d.h. es treten für die gezeigte Wahl der Referenzspektren keine Querempfindlichkeiten auf. Es ergibt sich für den einheitenlosen Faktor aus der Singulärwertzerlegung für den Wirkstoff Rapamycin eine Detektionsgrenze von 0.003 und eine Quantisierungsgrenze von 0.006 [164, 165]. Diese Werte verhalten sich relativ zum eingesetzten Rapamycinspektrum (vgl. Abbildung 4.15 (a)). Das Kryomedium ist nur in wenigen Regionen nachweisbar. Die Verteilung der Komponente ①, welche dem durchschnittlichen Spektrum der Referenzprobe entspricht, ist mit dem Höhenprofil der Probe vergleichbar. Oberhalb der Probenoberfläche befindet sich keine Haut, an dickeren und damit vor dem Trocknungsvorgang wasserärmeren Regionen lässt sich mehr Haut nachweisen als in dünneren Regionen. Dies entspricht den Erwartungen.

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

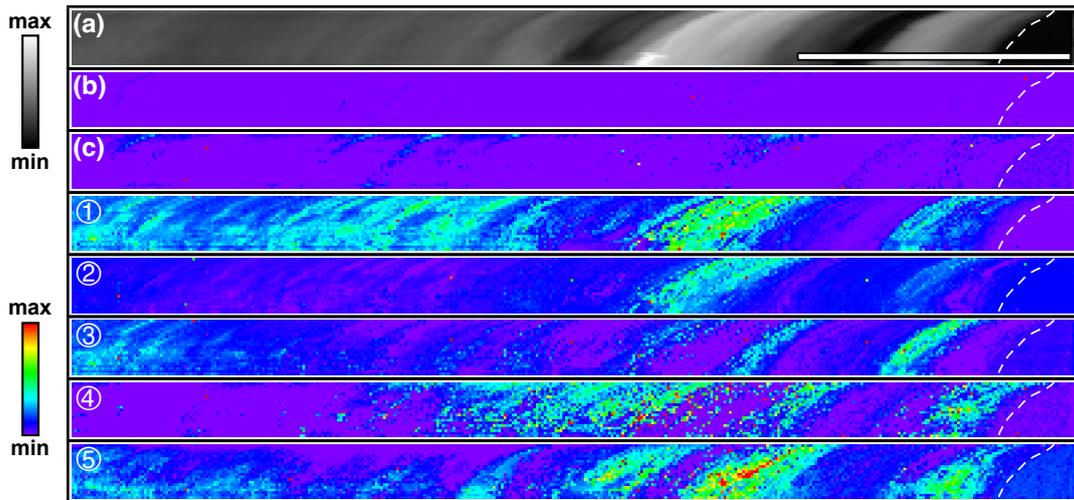


Abbildung 4.16: Wirkstoff-unbehandelte Referenzhautprobe (Cryoschnitt), (a) relative Höhenverteilung der Hautprobe, Verteilungen des Wirkstoffs Rapamycin (b), des Kryomediums (c) und der Komponenten ① bis ⑤ (vgl. Abbildung 4.14) aus einer Singulärwertzerlegung, die Länge des Maßstabes beträgt 10 μm .

Hauptkomponente ② entspricht Regionen, welche eine Zunahme des niedrig-energetischeren Anteils der Amid-I und der Amid-II-Banden zeigt. Es zeigt Signal im mittleren Stratum Corneum. Eine Zunahme der Amid-I und eine Abnahme der Amid-II-Bande zeigt Komponente ③. Sie ist vor allem in der viablen Epidermis und im oberen Stratum Corneum zu finden. Komponente ④ ist ausschließlich im Stratum Corneum detektiert worden. Sie zeigte eine spektrale Zunahme der Amid-I-Bande und eine Abnahme des Bereichs zwischen Amid-I und Amid-II. Die Komponente ⑤, welche sich im Bereich der Amid-Banden wie ④ verhält, bei niedrigeren Energien jedoch eine Intensitätszunahme gegenüber dem Durchschnittsspektrum zeigt, wird in der vollständigen Hautprobe gefunden.

Es konnte gezeigt werden, dass die ersten fünf Komponenten und die Berücksichtigung des Kryomediums eine ausreichend geeignete Referenzdatenlage für eine Singulärwertzerlegung des oberen Bereiches der Haut (Stratum Corneum und Teile der viablen Epidermis) ist, da in der unbehandelten Probe keine Querempfindlichkeit zum Wirkstoff gefunden werden konnte.

4.2.4 Unterscheidung auf Basis des Lambert-Beer-Gesetzes zwischen dem Wirkstoff Rapamycin und dem Kryomedium von Kryoproben (AFM-IR)

In Hautproben ohne Einbettungsmedium und ohne Kryomedium könnte der Wirkstoff Rapamycin auf Basis des Lambert-Beer-Gesetzes mit den Wellenzahlen 1734 cm^{-1} und 1800 cm^{-1} nachgewiesen werden, da die Haut bei der C=O-Bande kaum absorbiert. Da eine solche Probe technisch nicht realisiert werden konnte, soll im Folgenden gezeigt werden, wie mithilfe von vier Wellenzahlen der Einfluss des Kryomediums herausgerechnet werden kann:

Hierfür sind in Abbildung 4.17 die AFM-IR-Referenzspektren des reinen Rapamycins (a), des reinen Kryomediums (b) und des durchschnittlichen Spektrums einer unbehandelten Haut (c) dargestellt.

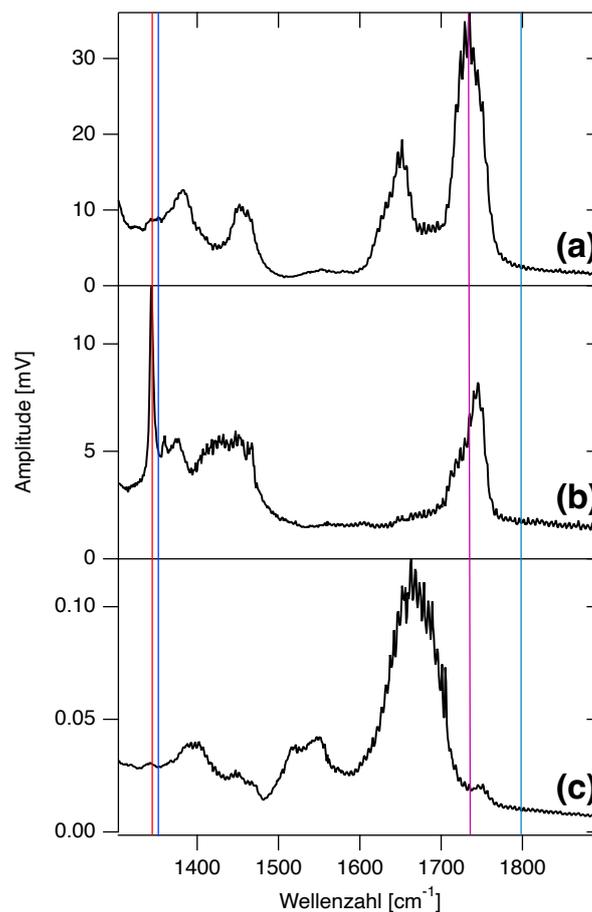


Abbildung 4.17: AFM-IR-Spektren einzelner Komponenten: (a) Rapamycin, (b) Kryomedium und (c) durchschnittliches Hautspektrum einer Kryoprobe.

Die Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz erfolgt auf Basis von Differenzen, da sich die Amplitude eines AFM-IR-Spektrums proportional zur Extinktion eines IR-

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

Spektrums, welches logarithmiert ist, verhält (vgl. Kapitel 1.1.8). Die Differenz der Amplituden bei 1734 cm^{-1} und 1800 cm^{-1} (violett minus türkis) ergibt für den Wirkstoff einen Wert von 33.4 und für die Haut den Wert 0.01. Das Kryomedium hat durch das ebenfalls hier vorhandene Signal einen Wert von 4.28. Um den Anteil des Kryomediums zu tilgen, wird die Differenz auf folgende Formel erweitert:

$$(a - b) - x \cdot (c - d) \quad (4.3)$$

mit

$$(a - b) = A_{\text{PE}, 1734\text{ cm}^{-1}} - A_{\text{PE}, 1800\text{ cm}^{-1}} \quad (4.4)$$

Hierbei ist A_{PE} die Amplitude der photothermischen Expansionsmessung (AFM-IR). Die größte Differenz für das Kryomedium ergibt sich für die Amplituden 1343 cm^{-1} und 1352 cm^{-1} (rot minus blau). Der Wert beträgt an dieser Stelle für das Kryomedium 7.41 und ist für Rapamycin (0.19) und für die Haut (0.002) verschwindend gering. Aus dem Unterschied zwischen a-b und c-d für die Amplituden des Kryomediums ergibt sich 0.64 für den Wert von x, sodass der Anteil des Kryomediums bei a-b durch $x \cdot c-d$ getilgt wird:

$$(a - b) - x \cdot (c - d) = (A_{\text{PE}, 1734\text{ cm}^{-1}} - A_{\text{PE}, 1800\text{ cm}^{-1}}) - 0.64 \cdot (A_{\text{PE}, 1343\text{ cm}^{-1}} - A_{\text{PE}, 1352\text{ cm}^{-1}}) \quad (4.5)$$

Mithilfe der gezeigten Gleichung wird für Kapitel 4.3.1 (Abbildung 4.23) als Kontrolle für die Singulärwertzerlegung die Verteilung des Wirkstoffs Rapamycin bestimmt.

4.2.5 Auswirkung der Vorbehandlung auf AFM-IR- und NEXAFS-Spektren

In dieser Arbeit wurden neben Hautproben ohne Vorbehandlung auch Hautproben untersucht, die vor der eigentlichen Behandlung mithilfe der Serinprotease Trypsin oder dem Oxidationsmittel DBPO vorbehandelt wurden. In Abbildung 4.18 sind die regionsspezifischen Referenzspektren des Stratum Corneums, also Corneocyten ① und Lipide ②, von drei Humanhautproben dargestellt. Die schwarze Kurve, die die O 1s Absorption von unbehandelter, eingebetteter Haut entspricht, wird jeweils mit dem blauen Spektrum (Serinprotease vorbehandelte Humanhaut) und dem roten Spektrum (DBPO vorbehandelte Humanhaut) verglichen. Nach beiden Behandlungsmethoden nimmt die Intensität der O 1s $\rightarrow\pi^*$ -Resonanz im Vergleich zu dem O 1s \rightarrow Kontinuum-Bereich) ab. Das bedeutet, dass die Menge an Sauerstoffdoppelbindungen relativ zu den Einzelbindungen nach beiden Vorbehandlungen zunimmt. Nach der Behandlung durch Serinprotease nimmt das O 1s $\rightarrow\pi^*$ -Signal innerhalb der Corneocyten weniger ab als in den Lipiden. Dies lässt sich zum einen dadurch erklären, dass der Transport von Trypsin aufgrund der hohen Masse (23.8 kDa [169]) gehindert ist. DBPO zeigt einen größeren Effekt innerhalb der Corneocyten, da es aufgrund der kleineren Masse (242.23 Da) besser eindringen kann. Da DBPO ein Oxidationsmittel ist, überrascht die Abnahme der Sauerstoffdoppelbindungen auf den ersten Blick, da eine Reaktion von den Alkoholen über die Carbonyle zu den Carbonsäuren [170, 171] erwartet wird, was eine Zunahme der Sauerstoffdoppelbindungen gegenüber den Sauerstoffeinzelnbindungen zur Folge hätte. Der beobachtete Effekt kann hierbei ein Folgeeffekt sein, welcher nach Oxidation des Kohlenstoffes durch DBPO und der Wechselwirkung von Trypsin mit den Lipiden auftritt. So könnten ungesättigte zu einfach ungesättigten Fettsäuren oxidiert werden. Diese können aufgrund geänderter Wechselwirkungen einen Einfluss auf die Corneocytenmembranen und die Transportfunktion der Lipidschicht haben. Eine Verbesserung des Transports von Wirkstoffen in die Haut durch das Einbringen von ungesättigten Fettsäuren mit Eigelblecithin aus ethanolischer Lösung in das Stratum Corneum ist aus der Literatur bekannt [172]. Die Auswirkungen beider Vorbehandlungen auf den Wirkstofftransport sind hierbei in Kapitel 4.3 und Kapitel 4.4 gezeigt.

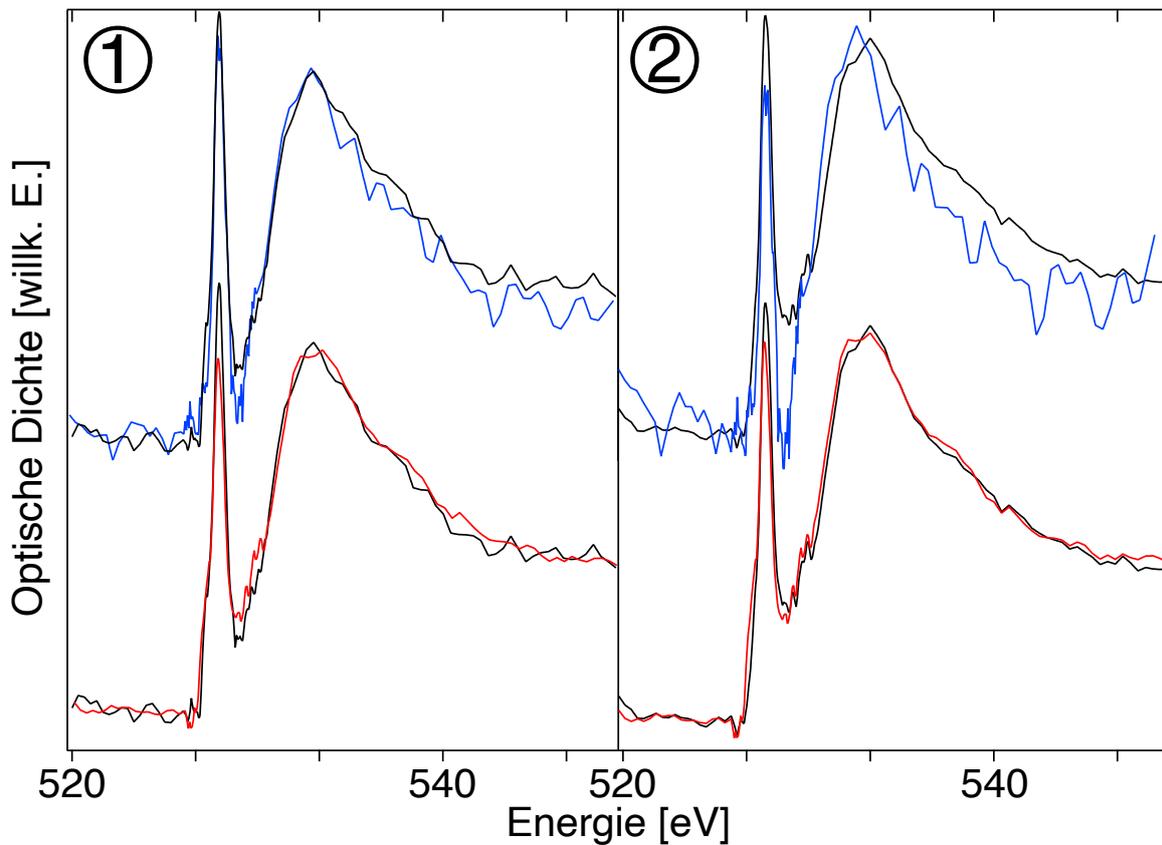


Abbildung 4.18: Spektren der Corneocyten ① und Lipide ② inkl. Epoxidharz der Proben, welche nicht mit Wirkstoff behandelt wurden, (schwarz) keine Vorbehandlung, (blau) mit der Serinprotease Trypsin und (rot) mit DBPO vorbehandelt.

Die Durchschnittsspektren zweier Strati Cornii, welche in Paraffin eingebettet sind, sind im mittleren Infrarot-Bereich in Abbildung 4.19 dargestellt. Von den Rohspektren wurde für den Bereich 1457 bis 1479 cm^{-1} eine Singulärwertzerlegung aus Paraffin und einem absoluten Versatz durchgeführt und der Anteil des Paraffins anschließend vom Rohspektrum abgezogen. Das dargestellte Rohspektrum wurde box-geglättet (15 Punkte). Das Spektrum der unbehandelten Haut (schwarz) zeigt das Maximum der Amid-I-Bande bei 1660 cm^{-1} und die Amid-II-Bande bei 1540 cm^{-1} . Bei 1530 cm^{-1} ist eine Schulter sichtbar. Die Amid-I-Bande hat eine 2.2-höhere Intensität als die Amid-II-Bande. Nach der Behandlung mit Serinprotease (blau) zeigt sich bei der Position der Amid-I-Bande keine Veränderung. Die Amid-II-Bande zeigte eine Verschiebung des Maximums zu höheren Wellenzahlen (1549 cm^{-1}) und der Schulter zu niedrigeren Wellenzahlen (1515 cm^{-1}). Dies ist ein Resultat der Veränderungen von C-N-Streck- und N-H-Biegeschwingungen [160]. Die Amid-I-Bande ist nach der Trypsin-Behandlung nur noch 1.7-fach so intensiv wie die Amid-II-Bande, zeigt also eine Abnahme von ca. 25%. Dies bedeutet eine Abnahme der C=O-Doppelbindungen, was konsistent mit der be-

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

obachteten Abnahme des $O\ 1s \rightarrow \pi^*$ -Signals ist.

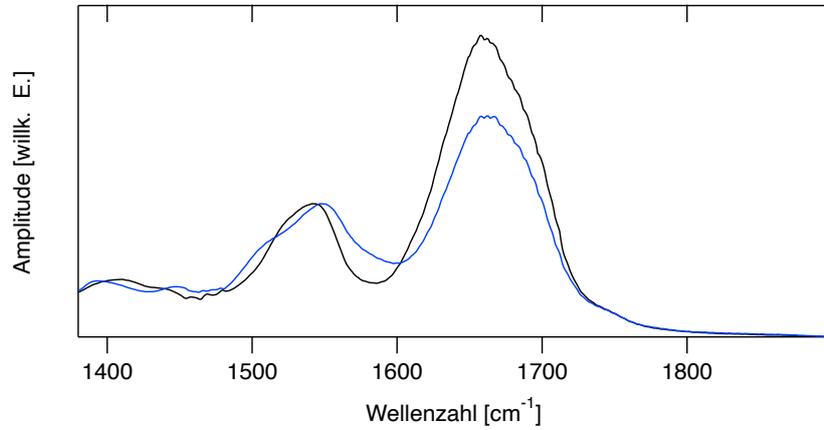


Abbildung 4.19: AFM-IR-Spektrum von in Paraffin eingebetteter Referenzhaut nach Abzug des Paraffinanteils, ohne Vorbehandlung (schwarz) und mit Serinproteasevorbehandlung (blau), normiert auf die Intensität der Amid-II-Bande.

4.3 Transport freier Rapamycinmoleküle

Der Wirkstoff Rapamycin liegt mit 914.17 Da [23, 24, 25] oberhalb der 500-Da-Regel [2]. Der Transport durch das Stratum Corneum ist daher behindert und kann nicht ohne Beschädigungen [13, 99] oder die Wahl einer geeigneten Formulierung [15] stattfinden. Im folgenden Kapitel wird der Einfluss der Formulierungen auf Basis von Ethanol und Vaseline untersucht, ebenso soll der Einfluss der Serinprotease Trypsin auf die Barrierefunktion des Stratum Corneums gegenüber dem Wirkstoff Rapamycin untersucht werden.

4.3.1 Wirkung von trypsin-ähnlicher Serinprotease auf die Wirkstoffaufnahme im Vergleich zu Proben ohne Vorbehandlung

Dieses Kapitel wird den Unterschied zwischen Proben aufzeigen, welche vor der eigentlichen Behandlung unbehandelt waren, und Proben, welche mit Chloroform entfettet und mit der Serinprotease Trypsin behandelt wurden. Damit die Proben vergleichbar sind und der Effekt nicht durch eine stark transportfördernde Formulierung überdeckt wird, ist die Grundlage für die Formulierungen Ethanol. Hierbei wird bei einem Teil als Basis für die Formulierung eine Ethanol-Wasser-Mischung und bei einem anderen Teil ein ethanolisches HEC-Gel genutzt. Die Proben bleiben dabei dennoch untereinander vergleichbar, da die Hydroxyethylcellulose des HEC-Gels dazu dient, die Formulierung an einer festen Position zu halten und die Verdunstung des Ethanols zu reduzieren.

Um die Auswirkung von Serinprotease auf den Transport nachvollziehen zu können, muss sich zuerst die Auswirkung des Ethanols auf den Transport mittels Röntgenmikroskopie angeschaut werden. Diese systematische Reihe ist in Abbildung 4.20 dargestellt: Hierbei wurde Probe (a) für 10 Minuten, Probe (b) für 100 Minuten und (c) 1000 Minuten behandelt. Im oberen Abschnitt ist die Transmissionsintensität bei 532.03 eV dargestellt. Proben (a) und (b) zeigen hier jeweils das Stratum Corneum, die Hautoberfläche befindet sich rechts (weiße, gestrichelte Linie). Probe (c) zeigt das Stratum Corneum (begrenzt von weißen, gestrichelten Linien) und Teile der viablen Epidermis. Das Stratum Corneum ist durch die lange Behandlung mit Ethanol deutlich dünner als bei Proben (a) und (b). Unter ① ist das Integral der Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz unter Nutzung der Energien 531.13 eV und 530.73 eV und unter ② die Tiefenverteilung des Wirkstoffs Rapamycin aus der Singulärwertzerlegung dargestellt. Keine der drei Proben zeigt eine Aufnahme von Rapamycin oberhalb der Nachweisgrenze. Der Einbruch bei 5 μm von ① und ② in Probe (b) ist dem Probenriss an dieser Stelle geschuldet (vgl. breite, weiße Struktur in der Transmissionsinten-

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

sitätsverteilung). Der nicht-vorhandene Transport deckt sich mit den Erwartungen im Hinblick auf die 500 Da-Regel [2]: Rapamycin hat für einen Transport selbst mit einem leicht transportfördernden Mittel wie Ethanol eine zu hohe Molekülmasse, um durch das Stratum Corneum transportiert zu werden.

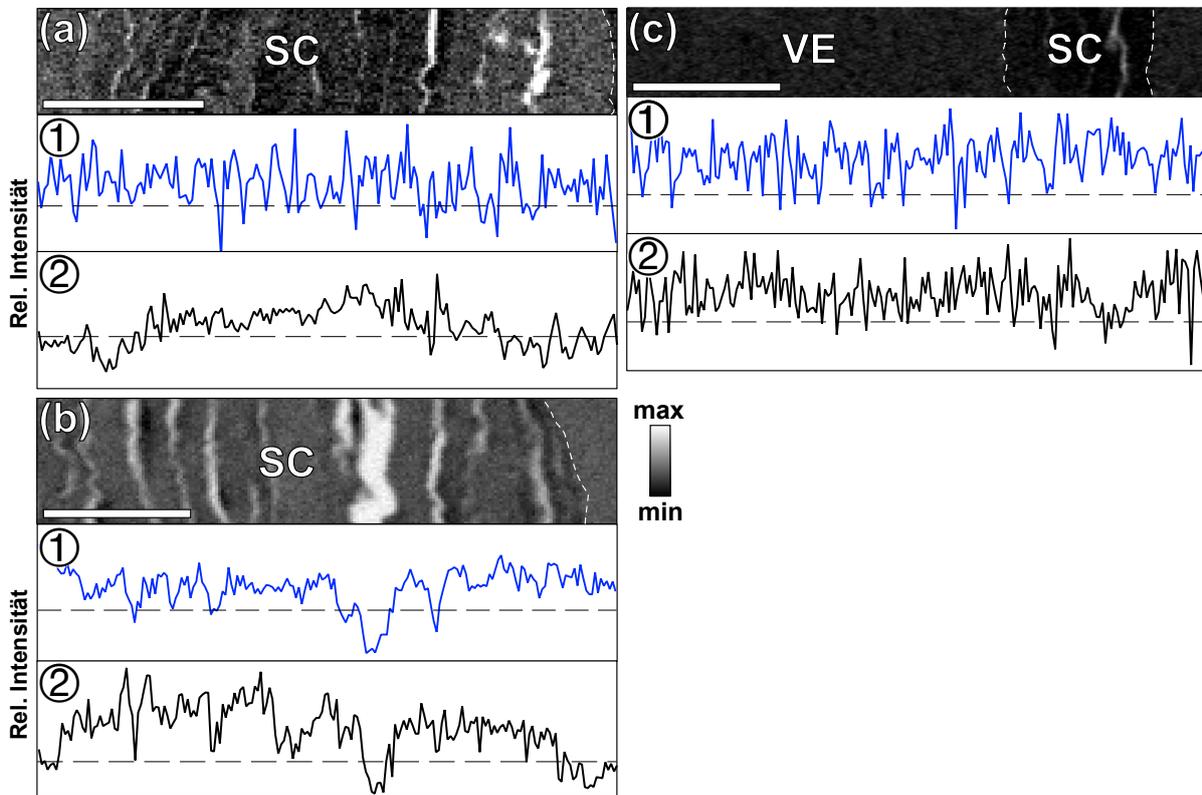


Abbildung 4.20: Proben, die für (a) 10 Minuten und (b) 100 Minuten und (c) 1000 Minuten mit Rapamycin in Ethanol ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) ohne Serinprotease behandelt wurden, (oben) je die Transmissionssintensität bei 532.03 eV, ① das Integral der Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz unter Nutzung der Energien 531.13 eV und 530.73 eV, ② die Tiefenverteilung des Wirkstoffs Rapamycin aus der Singulärwertzerlegung, die Länge des Maßstabes entspricht $5 \mu\text{m}$.

In Abbildung 4.21 ist eine hochaufgelöste Messung der Probe dargestellt, welche für 16 Stunden mit Trypsin und anschließend für 1000 Minuten ($16.\bar{6}$ Stunden) mit Rapamycin in Ethanol behandelt wurde. Bei der ortsaufgelösten Transmissionssintensität bei 532.03 eV in (a) handelt es sich um einen Abschnitt, der sich zwischen 7 und $11 \mu\text{m}$ unterhalb der Hautoberfläche befindet. Helle Bereiche entsprechen den Lipiden und sind mit einem L gekennzeichnet, dunkle Bereiche, den Corneocyten, mit einem C als Markierung. Unter ① ist die Verteilung des Wirkstoffs Rapamycin aus der Singulärwertzerlegung gezeigt. Das Integral der Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz unter Nutzung der Energien 531.13 eV und 530.73 eV (blau) und die Tiefenverteilung des Wirkstoffs Rapamycin aus der Singulärwertzerlegung (schwarz) sind unter ② darge-

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

stellt. Der Wirkstoff kann hierbei in den Corneocyten gefunden werden und zeigt eine geringere Konzentration in den Lipiden. Als Ursache kann hier die für eine bessere Trypsinbehandlung vorgenommene Entfettung mit Chloroform angenommen werden. Dieser Effekt wird in Kapitel 4.3.2 detaillierter diskutiert.

Diese Messung zeigt, dass die Serinprotease Trypsin zu einer Verbesserung des Transports in die Membranen führt, indem es die Membranen für den Wirkstoff durchlässig werden lässt. Der hier beobachtete Effekt der verbesserten Aufnahme eines Wirkstoffs in das Stratum Corneum deckt sich mit der Verbesserung des Transportes von FITC-Insulin durch die Haut einer Ratte nach Trypsin-Vorbehandlung [173]. Als Ursache kann hierbei eine Beschädigung der Corneocytenmembran auf molekularer Ebene angenommen werden, bei dem Trypsin die Proteine des Stratum Corneums spaltet [174]. Diese Beschädigung ermöglicht den Transport der Wirkstoffmoleküle in die Corneocyten und einen daraus resultierenden transzellulären Transport. Dieser Effekt scheint vergleichbar mit der Beeinträchtigung der Permeabilitätsfunktion der Haut durch die natürlich vorkommenden Serinproteasestimulation bei Entzündungen [102, 103].

Die gezeigte, hochaufgelöste Röntgenmikroskopiemessung ermöglicht gegenüber den Fluoreszenzmessungen aus der Literatur durch die höhere Ortsauflösung eine Aussage über die Wirkstoffverteilung zwischen Lipiden und Corneocyten.

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

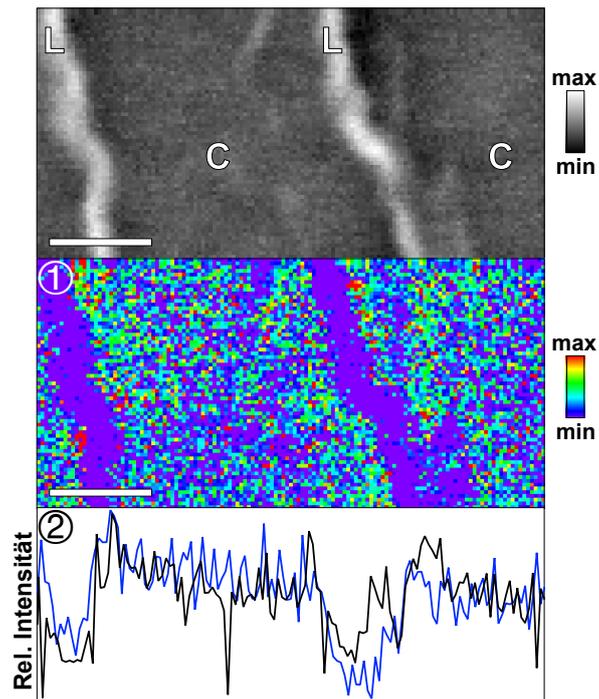


Abbildung 4.21: Hochaufgelöste Messung einer Probe, die für 16 Stunden mit Trypsin und anschließend für 1000 Minuten mit Rapamycin in Ethanol behandelt wurden, (oben) die Transmissionsintensität bei 532.03 eV, ① die Verteilung des Wirkstoffs Rapamycin aus der Singulärwertzerlegung, ② zeigt das Integral der Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz unter Nutzung der Energien 531.13 eV und 530.73 eV in Blau und die Tiefenverteilung des Wirkstoffs Rapamycin aus der Singulärwertzerlegung in Schwarz, die Länge des Maßstabes entspricht 800 nm, L symbolisiert die Lipide und C die Corneocyten.

Es konnte mit der hochaufgelösten Messung gezeigt werden, dass die Einwirkung von Serinprotease zu einer Verbesserung des Transports von Rapamycin führt [161]. auf Grundlage dieser Erkenntnis werden nun vier unterschiedlich lange Vorbehandlungszeiten mit Serinprotease miteinander verglichen. In Abbildung 4.22 ist (a) die Probe ohne vorherige Serinprotease-Behandlung dargestellt und in (b) die 2-stündige, (c) die 4-stündige, unter (d) die 8-stündige und (e) die 16-stündige Behandlung dargestellt. Die obere Abbildung zeigt jeweils die Transmissionsintensität bei 532.03 eV. Auf der rechten Seite befindet sich die Hautoberfläche, gefolgt von Stratum Corneum (markiert mit SC) und links die viable Epidermis. Die Verteilung des Rapamycins aus der Singulärwertzerlegung ist unter ① dargestellt, das zugehörige Tiefenintegral in Schwarz unter ②. Der blaue Graph zeigt das Integral der Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz unter Nutzung der Energien 531.13 eV und 530.73 eV. Während die Probe ohne Serinproteasebehandlung keinen Wirkstoff zeigt, zeigen die Proben (b) bis (d) Wirkstoff innerhalb des Stratum Corneums. Hierbei befindet sich im unteren Teil des Stratum Corneums weniger Wirkstoff als im oberen Teil. In Proben (b) und (e) sind in

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

den Lipidschichten teilweise höhere Konzentrationen als in den Corneocyten zu finden, in den anderen Proben ist dies nicht der Fall. Ein klarer Trend ist hierbei nicht sichtbar. Probe (e) zeigt als einzige einen Konzentrationsgradienten des Rapamycins, welcher sich auch teilweise in der viablen Epidermis befindet. Die geringen Unterschiede bei der Verteilung bei den Proben (b) bis (d) zeigen, dass die grundlegende Wirkung der Serinprotease sehr schnell erfolgt und im oberen Bereich des Stratum Corneums für den Wirkstofftransport eine längere Einwirkung keinen Unterschied zeigt. Die Barriere am Übergang zwischen Stratum Corneum und viabler Epidermis wird durch die proteinreichen Zonula occludens (engl. Tight Junctions) bestimmt, welche die Zellen des Stratum Granulosums als Barriere gegen das Eindringen von Substanzen umgeben [76]. Die Zonula occludens werden erst nach einer vergleichsweise lange Vorbehandlung mit Trypsin von 16 Stunden für den Wirkstoff durchlässig, sodass Rapamycin in die viable Epidermis transportiert werden kann.

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

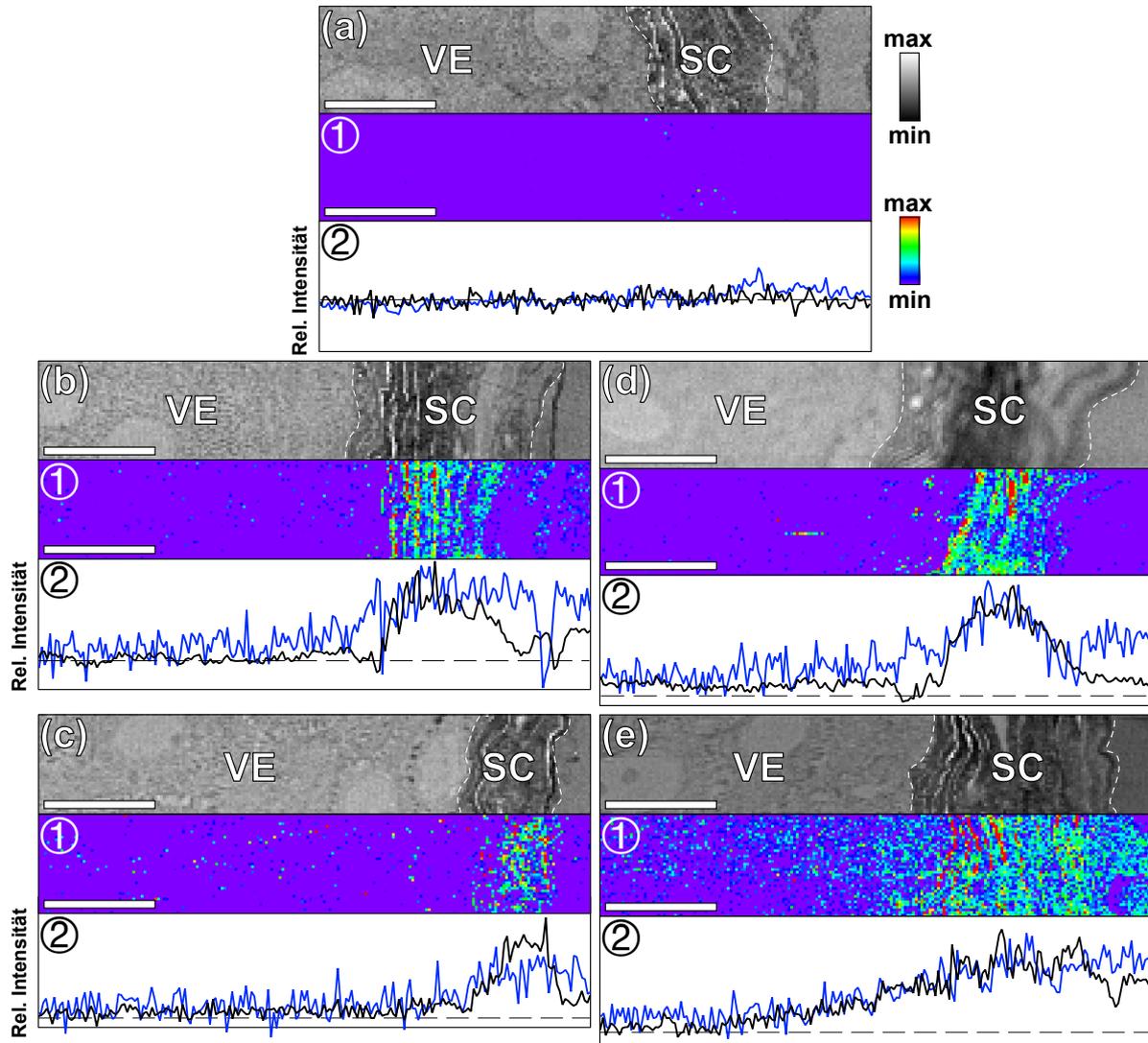


Abbildung 4.22: Proben die für (a) 0 Stunden, (b) 2 Stunden, (c) 4 Stunden, (d) 8 Stunden und (e) 16 Stunden mit Serinprotease und anschließend für 24 Stunden mit Rapamycin in ethanolischem HEC- Gel ($425 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) behandelt wurden. (oben) je die Transmissionsintensität bei 532.03 eV, ① die Verteilung des Rapamycins aus der Singulärwertzerlegung, ② zeigt das Integral der Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz unter Nutzung der Energien 531.13 eV und 530.73 eV in Blau und die Tiefenverteilung des Wirkstoffs Rapamycin aus der Singulärwertzerlegung in Schwarz, die Länge des Maßstabes entspricht $10 \mu\text{m}$.

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

Die nachgewiesene Masse des Wirkstoffs relativ zur topischen Auftragung ($425 \frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^2}$) ist in Tabelle 4.2 dargestellt. Beide unterschiedlichen Auswertungsmethoden zeigen jeweils untereinander für alle vier Proben vergleichbare Werte. Zwischen 2 Stunden und 8 Stunden Behandlung mit Serinprotease gibt es keinen Unterschied bei der Wirkstoffaufnahme, die Probe mit 4 Stunden Vorbehandlung zeigt etwa ein Drittel des Wertes. Dies kann mit der reduzierten Dicke des Stratum Corneums erklärt werden: Die Proben (b) und (d) haben eine durchschnittliche Dicke von rund $20 \mu\text{m}$, Probe (c) nur von zirka $7 \mu\text{m}$. Würde das Stratum Corneum der Probe (c) bei gleicher Wirkstoffkonzentration $20 \mu\text{m}$ dick sein, könnten bei gleichbleibender lokaler Konzentration an jedem Punkt des Stratum Corneums $(31 \pm 5)\%$ des aufgetragenen Wirkstoffs nachgewiesen werden. Ein deutlicher Wirkstoffanstieg kann nur bei Probe (e) nachgewiesen werden, was durch die Aufnahme von Wirkstoff in der viablen Epidermis erklärt werden kann. Insgesamt deutet die Wirkstoffaufnahme darauf hin, dass die Corneocyten in allen drei Proben die maximal mögliche Masse an Wirkstoff aufgenommen haben und erst durch einen Abtransport in die viable Epidermis weiteren Wirkstoff aufnehmen können. Folglich könnten höhere Wirkstoffaufnahmen in das Stratum Corneum nur durch eine Vergrößerung des Volumens der Corneocyten, z. B. durch Okklusion, oder durch eine Verbesserung der Löslichkeit des Wirkstoffs in den Corneocyten verbessert werden. Diese Erkenntnis unterstreicht die Wirksamkeit der Zonula occludens (engl. Tight Junctions) des Stratum Granulosum [76] als zusätzliche Barriere gegen das Eindringen von großen Wirkstoffen, selbst wenn das Stratum Corneum angegriffen und durchlässig wurde.

Tabelle 4.2: Detektierte Masse des Wirkstoffs relativ zur aufgetragenen Masse für die unterschiedlich lange mit Serinprotease behandelten Proben in HEC Gel ($425 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)

	nach dem Lambert-Beer-Gesetz	aus der Singulärwertzerlegung
(a) 0 h	0%	0%
(b) 2 h	$(31 \pm 5)\%$	$(43 \pm 6)\%$
(c) 4 h	$(11 \pm 5)\%$	$(11 \pm 2)\%$
(d) 8 h	$(32 \pm 5)\%$	$(44 \pm 7)\%$
(e) 16 h	$(42 \pm 5)\%$	$(58 \pm 2)\%$

Eine vergleichbare Verteilung des Wirkstoffs Rapamycin nach einer 16-stündigen Vorbehandlung mit der Serinprotease Trypsin kann bei einer Kryoprobe und einer Untersuchung einer hyperspektralen AFM-IR-Messung beobachtet werden, welche unter Nutzung der Singulärwertzerlegung in der Bachelorarbeit von Frau Petrick [175] ausgewertet und interpretiert wurde: Unter ① und ② in Abbildung 4.23 sind die relativen Höhenverteilungen des Hautschnittes dargestellt. Die Hautoberfläche befindet sich rechts

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

und ist mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet. Als Übergang zwischen Stratum Corneum und viable Epidermis wird auf Basis von optischer Mikroskopie die schwarze gestrichelte Linie angenommen. Die Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz unter Nutzung der Wellenzahlen $(1734\text{ cm}^{-1}-1800\text{ cm}^{-1})-0.64 \cdot (1343\text{ cm}^{-1}-1352\text{ cm}^{-1})$ aus Kapitel 4.2.4 ist unter ③ abgebildet. Die Verteilung des Wirkstoffs Rapamycin aus der Singulärwertzerlegung ist unter ④ dargestellt, das zugehörige Tiefenintegral unter ⑤.

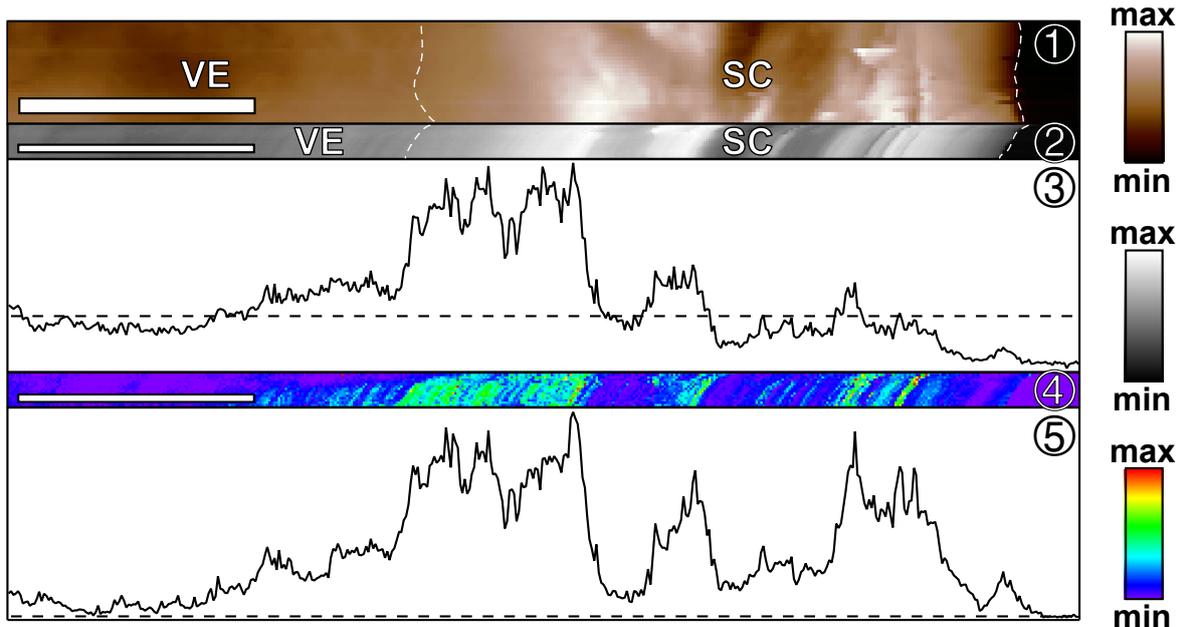


Abbildung 4.23: Kryohautprobe, 16 Stunden Trypsinvorbehandlung, 24 Stunden Behandlung mit Rapamycin in Vaseline ($100\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$), ① relative Höhenverteilung des Hautschnittes (Übersicht), ② relative Höhenverteilung des Hautschnittes (hyperspektrale Messung), ③ Integral der Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz unter Nutzung der Wellenzahlen $(1734\text{ cm}^{-1}-1800\text{ cm}^{-1})-0.64 \cdot (1343\text{ cm}^{-1}-1352\text{ cm}^{-1})$, ④ Verteilung des Rapamycins aus einer Singulärwertzerlegung mithilfe AFM-IR-Referenzen, ⑤ Integral der Verteilung des Rapamycins aus einer Singulärwertzerlegung, die Länge des Maßstabes beträgt $10\text{ }\mu\text{m}$.

Beide Auswertungsmethoden zeigen eine ähnliche Verteilung des Wirkstoffs. Der aus der Referenzprobe sich ergebene Nullpunkt ist als gestrichelte Linie im jeweiligen Integral dargestellt und zeigt, dass die Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz durch einen Nullpunkt aus der Auswertung einer Referenzprobe bei etwa 40% des maximalen Wertes über niedrigere Konzentrationen keine Aussage treffen kann. Ursache hierfür ist die Nutzung des PEG-Kryomediums, welche in die Referenzprobe eindringen konnte. Oberhalb der Hautoberfläche, also in Regionen des Siliciumwafers, wird kein Wirkstoff nachgewiesen. Im Stratum Corneum kann der Wirkstoff in den Corneocysten detektiert werden. Die Lipide sind bei dieser Messung aufgrund des Punktabstan-

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

des von 100 nm nicht aufgelöst; jeder Messpunkt hat eine Ortsauflösung zwischen 10 und 20 nm. Der Wirkstoff zeigt die höchsten Konzentrationen am Übergang des Stratum Corneums zur viablen Epidermis; er dringt in die viable Epidermis ein, da die Zonula occludens (engl. Tight Junctions) des Stratum Granulosums durch die 16-stündige Vorbehandlung mit Serinprotease durchlässig geworden ist (vgl. Auswertung zu Abbildung 4.22). In der viablen Epidermis nimmt die Wirkstoffmenge mit zunehmender Tiefe ab.

Die mit AFM-IR gemessenen Kryoproben wurden in ein PEG-Kryomedium eingebettet, gefroren, geschnitten und anschließend auf einem Siliciumwafer getrocknet. Die in Epoxidharz eingebetteten Proben wurden hingegen mit Glutaraldehyd und Natrium Cacodylat Pufferlösung gespült und anschließend mit Osmiumtetroxid, Kaliumhexacyanidoferrat(II) und Cacodylat Pufferlösung fixiert. Anschließend wurden die Proben mehrfach mit ethanolischen Lösungen entwässert, mit Propylenoxid und Epon[®] und abschließend in reinem Epon[®] behandelt. Das Epon[®] wurde polymerisiert und die Proben geschnitten. Die Substanzen umschließen bei allen Vorgängen die vollständige Hautprobe. Hierbei wäre es durchaus möglich, dass die Wirkstoffverteilung sich während des Fixierungs- und Einbettungsprozesses verändert. Da die gezeigte Messung qualitativ eine vergleichbare Verteilung des Wirkstoffs zu den Proben zeigt, welche für 16 Stunden mit Serinprotease vorbehandelt wurden (Kapitel 4.3.1 und 4.3.2), ist die Auswirkung des Einbettungsprozesses auf die Wirkstoffverteilung innerhalb der Haut zu vernachlässigen. Als mögliche Ursache ist hierbei ein schnellerer Transport der Fixierungs- und Einbettungssubstanzen von der Seite der Dermis als von der Seite des Stratum Corneums, welches auch gegenüber den Fixier- und Einbettungsmedien als Barriere wirkt. Ist der Fixierungsprozess beendet, ist anzunehmen, dass auch ein weiterer Transport des Wirkstoffs gehindert ist.

Über alle gezeigten Proben hinweg führt eine Vorbehandlung mit Serinprotease zu einem Öffnen der Membranen im Stratum Corneum menschlicher Haut und dem Ermöglichen eines transzellulären Transports des Wirkstoffs Rapamycin. Es konnte durch zeitaufgelöste Untersuchungen gezeigt werden, dass kurze Behandlungen mit der Serinprotease zu einer Öffnung der Corneocyten führen, jedoch erst lange Behandlungen (16 Stunden) zu einer für den Transport von Rapamycin ausreichend starken Schädigung der Zonula occludens im Stratum Granulosum führen.

4.3.2 Wirkstoffaufnahme mithilfe von Vaseline

Vaseline wirkt sich, wie andere Kohlenwasserstoffe, verstärkend auf den transdermalen Transport zum einen durch das Eindringen in das Stratum Corneum [89, 90] und zum anderen durch Okklusion aus [26]. In diesem Kapitel soll erstmalig die Verteilung von Wirkstoffen mit hoher Ortsauflösung bei der Nutzung von Vaseline als Formulierung gezeigt werden. Daher werden fünf unterschiedliche Proben verglichen, welche mit einer Rapamycin-Vaseline-Formulierung behandelt wurden und mit einer Ortsauflösung von 250 nm betrachtet werden. In der ersten Messreihe wird der zeitliche Aspekt durch die Variation der Einwirkzeit von 10 (a) über 100 (b) bis 1000 Minuten (c) betrachtet: Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.24 dargestellt. Die obere Zeile zeigt die Transmissionsintensität der untersuchten Hautproben bei 532.03 eV, welche einen hohen Kontrast zwischen Corneocyten und Lipiden zeigt. Die Hautoberfläche befindet sich rechts der rechten weiß gestrichelten Linie, das Stratum Corneum ist als SC zwischen den gestrichelten Linien und die viable Epidermis als VE gekennzeichnet. ① zeigt das Integral der Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz unter Nutzung der Energien 531.13 eV und 530.73 eV, welches sich proportional zur aufgenommenen Masse des Wirkstoffs verhält (vgl. Kapitel 4.2.1). ② zeigt die Verteilung des Wirkstoffs Rapamycin aus einer Singulärwertzerlegung. Das zugehörige Tiefenintegral des errechneten Parameters ist unter ③ dargestellt. Der Wirkstoff lagert sich nach 10-minütiger Behandlung in den Corneocyten des oberen Stratum Corneums an und lässt sich in den tieferen Regionen des Stratum Corneums nicht nachweisen. Bei den gezeigten Messungen mit einer Behandlungszeit von 100 Minuten (Abbildung 4.24, (b)) lässt sich Wirkstoff im gesamten Stratum Corneum bis auf die unteren vier bis fünf Corneocyten nachweisen. Die Aufnahme des Wirkstoffs lässt sich hierbei durch eine Kombination zweier Effekte erklären: Aus der Literatur [161] und dem Kapitel 4.3.1 ist bekannt, dass Rapamycin in einer ethanolischen Formulierung gelöst, nicht in die intakte Haut transportiert werden kann. Für die Aufnahme des Wirkstoffs nach 10 Minuten liegt die Ursache beim Transport der Formulierung (Vaseline und Wirkstoff Rapamycin) in die oberen Schichten des Stratum Corneums. Der Transport von Vaseline in das Stratum Corneum [89, 90, 176, 177, 178] und der dort vorliegenden Wechselwirkung zwischen Vaseline und der Corneocytenmembran ist bekannt. Ebenso ist ein Einfluss der Vaseline auf die Organisation der Lipidschichten bekannt[179]. Mit steigender Einwirkzeit der Vaseline entsteht der Effekt der Okklusion [26]. Hierbei reichert sich durch den nach außen blockierten Abtransport Wasser in die Corneocyten an und führt zu einer Volumenzunahme der oberen Hautschichten. Beschädigungen der Membranen sind hierbei die Folge[180]. Diese Beschädigungen können so erklärt werden, sodass die Menge an Membranlipiden während des Quellvorgangs unverändert bleibt, sodass diese für den Wirkstoff durch Abnahme an Lipiden pro Fläche der Membran oder durch

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

die Bildung von Mikrorissen durchlässig werden.

In der Literatur sind das Aufquellen und die Veränderungen der Membran in Folge von Hydratation bekannt [181, 182]. Es wurde ebenfalls die Okklusion der einzelnen Regionen des Stratum Corneums als Folge der Auftragung von Vaseline mithilfe optischer Mikroskopie untersucht, wobei eine Volumenzunahme der Corneocyten beobachtet wurde [183]. Bei diesen Untersuchungen haben die unteren Corneocyten am Übergang zur viablen Epidermis keine Aufnahme von freiem Wasser gezeigt. Es wird angenommen, dass das Wasser in tiefere Schichten der Haut abtransportiert wird. Ob dieser Abtransport *in vivo* ebenfalls stattfinden kann, konnte nicht geklärt werden. Der Großteil des restlichen Stratum Corneums zeigte bei *Caussin et al.* die Aufnahme von freiem Wasser aufgrund von Okklusion [183]. Die oberen Regionen haben in der Literatur nur eine geringe Zunahme an freiem Wasser gezeigt. Als Ursache für dieses Verhalten wird angenommen, dass die oberen Corneocyten weniger natürliche Feuchthaltefaktoren (NMF, engl. natural moisturizing factor) enthalten, um das Eindringen von Feuchtigkeit der Umgebung zu vermindern.

So ergibt sich für die Messungen aus Abbildung 4.24, dass der Transport in die oberen Corneocyten die Folge von direkter Wechselwirkung der Vaseline mit den Corneocytenmembranen ist und der Transport in die tieferen Regionen die Ursache in Okklusionseffekten hat.

Die Integrale unter ① und ③ zeigen für alle drei Proben eine ähnliche Verteilung, ausgenommen sind hierbei das tiefe Stratum Corneum am Übergang zur viablen Epidermis. Während unter (a) der Effekt durch den Einbruch überdeckt wird, zeigt die Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz unter (b) und (c) einen Abfall im Stratum Corneum, welcher sich aus der Singulärwertzerlegung nicht ergibt. Als Ursache für den Effekt wird angenommen, dass dies auf eine Querempfindlichkeit der gewählten Energien mit den biologischen Substanzen der Haut zurückzuführen ist (vgl. Abbildung 4.9 aus Kapitel 4.1.6). Ebenso zeigen sich zwischen beiden Methoden Unterschiede an den verbreiterten Lipidschichten: Die Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz zeigt hier Minima, während die Singulärwertzerlegung sowohl Minima als auch Maxima zeigt. Die Ursache hierfür ist, dass die Referenzspektren eine solche Verbreiterung nicht ideal abbilden können. Dies kann auch in der Auswertung der Referenzprobe aus Kapitel 4.2.2 (Abbildung 4.13) beobachtet werden.

Im Vergleich wurde nach einer Einwirkzeit von 100 Minuten die 1.5-fache Masse von Rapamycin gegenüber einer Einwirkzeit von 10 Minuten aufgenommen. Zwischen 100 und 1000 Minuten Behandlungszeit wird nur noch eine 1.1-fache Zunahme des Wirkstoffs beobachtet, woraus sich schlussfolgern lässt, dass der Transport bei 100 Minuten zum größten Teil abgeschlossen ist. Der relative, statistische Fehler der Messungen liegt bei $\pm 10\%$.

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

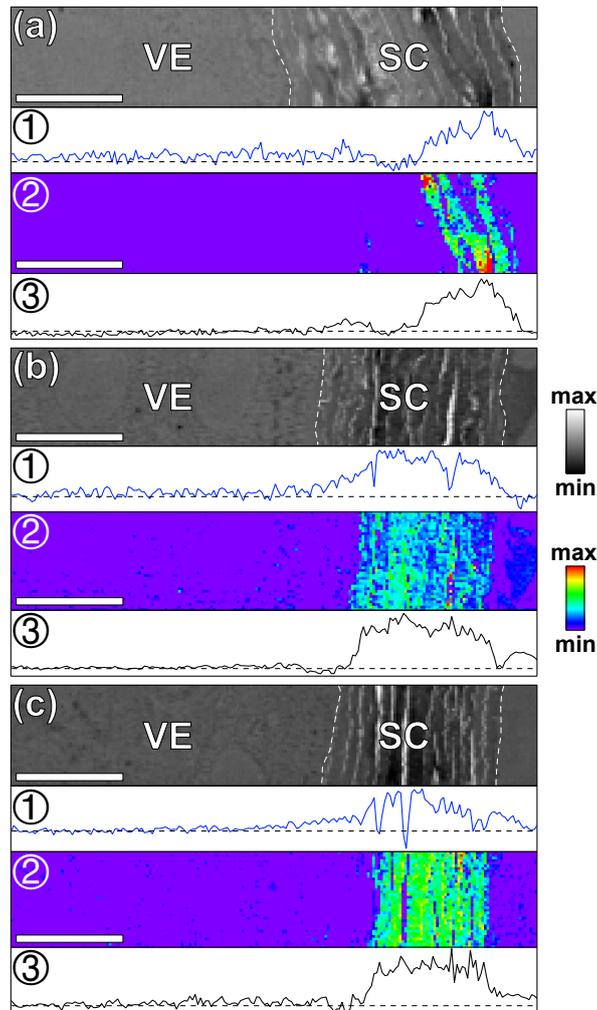


Abbildung 4.24: Haut vom Oberschenkel, die für (a) 10 Minuten, (b) 100 Minuten und (c) 1000 Minuten mit Rapamycin in Vaseline ($40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) behandelt wurde, (oben) je die Transmissionsintensität bei 532.03 eV, ① zeigt das Integral der Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz unter Nutzung der Energien 531.13 eV und 530.73 eV, ② zeigt die Verteilung des Wirkstoffs Rapamycin aus einer Singulärwertzerlegung und ③ das zugehörige Integral, der Maßstab entspricht jeweils $10 \mu\text{m}$.

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

Im Folgenden (vgl. Abbildung 4.25) soll der Unterschied der Wirkstoffaufnahme zwischen einer Probe (a) ohne Vorbehandlung und (b) mit einer 16-stündigen Vorbehandlung mit der Serinprotease Trypsin mit einer Ortsauflösung von 100 nm betrachtet werden. Beide Proben einer Bauchhaut wurden für 24 Stunden mit Rapamycin in Vaseline behandelt. In Abbildung 4.25 sind oben Transmissionsintensität bei 532.03 eV, unter ① die orts aufgelöste Verteilung des Wirkstoffs aus der Singulärwertzerlegung und unter ② das zugehörige Tiefenintegral dargestellt. Die Hautoberfläche befindet sich rechts (weiße, gestrichelte Linie) und die viable Epidermis (VE) links. Das Stratum Corneum ist mit SC gekennzeichnet. Die Probe ohne Trypsinvorbehandlung zeigt Wirkstoff im Stratum Corneum in den oberen vierten und bis zur sechsten Lipidschicht von insgesamt 19 Lipidschichten. Die weiter äußeren Lipidschichten sind von der Haut abgelöst. In den Lipiden sind höhere Intensitäten des Wirkstoffparameters als in den Corneocyten zu finden, der Wirkstoff dringt auch in die Corneocyten ein. Die im Vergleich zur Probe (c) aus Abbildung 4.24 niedrigere Aufnahme des Wirkstoffs und des weniger tiefen Eindringens kann durch die unterschiedliche Hautregion [184] zwischen den Proben aus Abbildung 4.24 und 4.25 bzw. den abweichenden Spender zwischen beiden Messreihen erklärt werden. Ursache ist hierbei die umgekehrte Proportionalität des Wirkstofftransports zur Lipidkonzentration innerhalb des Stratum Corneums und der unterschiedlichen Lipidkonzentrationen in verschiedenen Hautregionen [185]. Bei der Probe mit der Trypsin-Vorbehandlung (b) wird der Wirkstoff dagegen vorwiegend in den Corneocyten des Stratum Corneum gefunden. Dieser Effekt ist vergleichbar mit den zeitabhängigen Untersuchungen mit HEC-Gel (vgl. Kapitel 4.3.1): Trypsin beschädigt die Membranen der Corneocyten auf molekularer Ebene und öffnet dadurch den intrazellulären Transport für den Wirkstoff Rapamycin.

Der Wirkstoff zeigt im mittleren Stratum Corneum höhere Intensitäten in den Corneocyten als in den Lipiden. Ebenso zeigt die hochaufgelöste Messung aus Kapitel 4.3.1, dass sich der Wirkstoff in Haut, welche mit Serinprotease behandelt wurde, bevorzugt in den Corneocyten anreichert. In der Literatur ist bekannt, dass sich die Lipide im Stratum Corneum in zwei unterschiedlichen Aggregatzuständen vorfinden: fest und flüssig [182, 186, 187]. Wirkstoffe werden beim Eindringen in die Lipidschichten des Stratum Corneums von flüssigen Lipide umgeben. Diese ermöglichen den Transport der Wirkstoffe durch das Stratum Corneums. Feste Lipide liegen in einem statischen Verbund vor und ummanteln die Wirkstoffmoleküle nicht. Dieses Modell ermöglicht eine Erklärung der vorliegenden Verteilung des Wirkstoffs, da die flüssigen Lipide durch die Behandlung mit Serinprotease sich ebenfalls frei bewegen können und zusammen mit dem Wirkstoff in die Corneocyten transportiert werden können.

Bei den zeitlich variierten Trypsinbehandlungen unter anschließender Auftragung einer Rapamycin-HEC-Gel-Formulierung kann nicht beobachtet werden, dass der Wirkstoff

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

gänzlich aus den Lipidschichten in die Corneocyten transportiert wird, während bei der Vaselineprobe der Wirkstoff vollständig aus den Lipiden transportiert wird, wenn Wirkstoff von den Corneocyten aufgenommen werden kann. Dies ist dennoch kein Widerspruch bei den Beobachtungen beider Probensysteme: Ethanol erzeugt den penetrationsverstärkenden Effekt durch Eindringen in das Gewebe und einer Verbesserung der lokalen Löslichkeit des Wirkstoffs [94]. So kann Ethanol bei festen Lipiden als Lösungsmittel dienen und diese aus dem festen Verbund herauslösen. Die herausgelösten Lipide können dadurch wieder verbessert den Wirkstoff aufnehmen. Vaseline besitzt hierbei zwei Effekte: In die oberen Lipidschichten dringt sie ein und führt zu einer Stabilisierung der Lipide [177, 90]. In den tieferen Schichten des Stratum Corneums wirkt sie nur indirekt durch den Effekt der Okklusion und führt zu einer Anreicherung von polarem Wasser im Stratum Corneum [183]. Das polare Wasser kann schlechter als das Ethanol mit den unpolaren Lipiden wechselwirken, sodass der Lipidverband fester Lipide gestärkt werden kann. Diese beobachteten Unterschiede decken sich mit dem Löslichkeitsverhalten von Lipiden in beiden Lösungsmitteln: So ist eine im Vergleich zu Wasser um mehrere Größenordnungen erhöhte Löslichkeit des Lipids Cholesterol in Ethanol bekannt (Löslichkeit von Cholesterol in Wasser im Bereich 10^{-8} g/mL und in Ethanol im Bereich 10^{-2} g/mL) [188, 189]. Ebenso fällt das C2-Ceramid-Analog in wässrigen Lösungen aus, während es in ethanolischen Lösungen > 25 mg/mL löslich ist [190].

In den tieferen Regionen des Stratum Corneums befindet sich der Wirkstoff in den Lipiden, wird aber auch nach der Einwirkung von Trypsin in der viablen Epidermis nachgewiesen.

Die Hautprobe mit der Vorbehandlung mit der Serinprotease Trypsin (relativer, statistischer Fehler $\pm 20\%$) zeigt eine 5-fach höhere Aufnahme des Wirkstoffs gegenüber der Probe ohne Vorbehandlung (relativer, statistischer Fehler $\pm 20\%$ für den wirkstoffhaltigen Bereich). Dies lässt sich mit dem verbesserten transzellulären Transport und der Zugänglichkeit der Corneocyten als Speicherung des Wirkstoffs begründen.

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

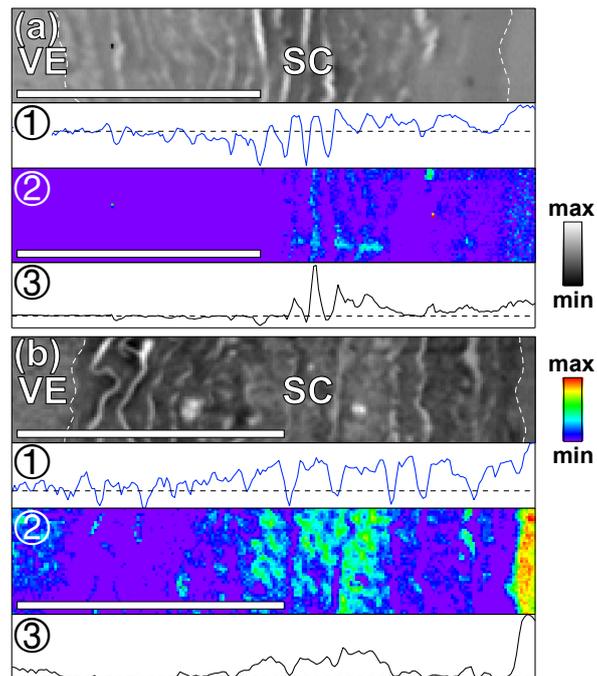


Abbildung 4.25: Haut vom Bauch, welche für 24 Stunden mit Vaseline ($50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) behandelt wurden. (a) ohne und (b) mit einer 16-stündigen Vorbehandlung mit der Serinprotease Trypsin, (oben) je die Transmissionsintensität bei 532.03 eV , ① zeigt das Integral der Auswertung nach dem Lambert-Beer-Gesetz unter Nutzung der Energien 531.13 eV und 530.73 eV , ② zeigt die Verteilung des Wirkstoffs Rapamycin aus einer Singulärwertzerlegung und ③ das zugehörige Integral, der Maßstab entspricht jeweils $10 \mu\text{m}$.

Mit der in dieser Arbeit durchgeführten Messungen konnte gezeigt werden, dass kurze Einwirkzeiten von Vaseline eine Wirkstoffaufnahme in die oberen Corneocyten ermöglicht. Ursache hierfür ist die aus der Literatur bekannte Aufnahme der Vaseline in die Haut [89, 90]. Bei einer Einwirkzeit von 100 und 1000 Minuten wirkt zusätzlich Okklusion im mittleren Stratum Corneums, sodass der Wirkstoff durch schwächere Membranen bis zur vierten bzw. fünften Corneocytenschicht transportiert werden kann. Eine längere Einwirkzeit von 1000 Minuten führte im Vergleich zu 100 Minuten zu keiner signifikanten Erhöhung der Wirkstoffaufnahme.

Beim Vergleich zweier Bauchhautproben, mit und ohne Vorbehandlung mit Trypsin, konnte gezeigt werden, dass Trypsin die Membranen der Corneocyten für den Wirkstoff durchlässig werden lässt. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen aus Kapitel 4.3.1. Die Wahl der Formulierung (Vaseline und HEC-Gel) zeigt einen Einfluss auf den Transport vorbehandelter Proben: Nach einer Vorbehandlung mit Serinprotease kann der Wirkstoff Rapamycin bei Proben, welche mit einer Formulierung auf Basis eines ethanolischen HEC-Gels behandelt wurden, sowohl in den Corneocyten als auch in den Lipiden gefunden werden; im Gegensatz dazu konnte der Wirkstoff nach einer Behand-

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

lung mit einer Formulierung auf Basis von Vaseline im mittleren Stratum Corneum in den Corneocyten und nicht in den Lipiden detektiert werden.

Der Fehler der Messung wird durch die statistischen Fehler der Singulärwertzerlegung wiedergegeben. Zusätzlich werden die Ergebnisse von einer ungleichmäßigen Auftragung beeinflusst, welche auf $\pm 25\%$ geschätzt wird.

4.4 Transport von Rapamycin mithilfe von Nanocarriern

Der Transport des Wirkstoffs durch das Stratum Corneum kann neben der Wahl der Formulierung [15] auch mithilfe von Nanocarriern [191, 192] verbessert werden. Im folgenden Kapitel werden die Verteilungen der reduktionssensitiven Nanocarrier rsCMS 1 und der oxidationssensitiven Nanocarrier osCMS 2b von Frau Dr. Keerthana Rajes [27, 28] und dem transportierten Wirkstoff Rapamycin in Hautproben untersucht. Hierbei werden Hautproben ohne Vorbehandlung und mit Vorbehandlung mit der Serinprotease Trypsin und dem Oxidationsmittel DBPO verglichen. Die Formulierungen basieren auf HEC-Gel (Wasserbasis), da die genutzten CMS-Nanocarrier in Ethanol stabil sind. Ebenso konnte in Kapitel 4.3.1 gezeigt werden, dass Ethanol als Lösungsmittel keine dermale Penetration des Wirkstoffs Rapamycins ermöglicht.

4.4.1 Auswirkung der Vorbehandlung mit Serinprotease auf den Transport der Nanocarrier rsCMS 1 und osCMS 2b

Im Rahmen dieses Kapitels wird der Einfluss der Serinprotease auf den Transport der Nanocarrier und des in den Nanocarriern eingebundenen Wirkstoffs Rapamycin untersucht. Für jeden der beiden Nanocarrier-Sorten rsCMS 1 und osCMS 2b werden sechs Messungen betrachtet: Drei Proben ohne Vorbehandlung und drei Proben mit einer Serinprotease-Vorbehandlung für 16 Stunden. Je eine Probe wurde für 10, 100 und 1000 Minuten mit einer Nanocarrier-HEC-Gel-Formulierung behandelt.

Die Messungen der rsCMS 1-HEC-Gel-Formulierung (aufgetragene Masse: $65 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, Nanocarrier beladen mit 26 Gew% Rapamycin) sind in Abbildung 4.26 dargestellt. Die Proben (a) bis (c) sind hierbei ohne Vorbehandlung, die Proben (d) bis (e) mit einer Trypsin-Vorbehandlung. (a) und (d) entsprechen 10, (b) und (e) 100 und (c) und (f) einer 1000 Minuten Behandlung mit der HEC-Gel-Nanocarrier-Formulierung. Die Transmissionsintensität bei 532.0 eV ist unter (a) bis (f) dargestellt. Die entsprechende Energie zeigt einen hohen Kontrast zwischen Lipiden und Corneocyten. Die Probenoberfläche befindet sich rechts, das Stratum Corneum (SC) ist mit weiß-gestrichelten Linien begrenzt, die viable Epidermis (VE) befindet sich links. Sie zeigt hellere Regionen, die einem Zellkern der Keratinozyten zugeordnet werden kann. Die im Zellkern unter (b) und (c) sichtbaren, dunkleren Regionen, können dem Nucleolus zugeordnet werden. Abbildung 4.26 ① zeigt die Verteilung des Rapamycins und ② die Verteilung der Nanocarrier aus einer Singulärwertzerlegung. Beide Verteilungen sind proportional zur lokalen Konzentration der jeweiligen Substanzen (vgl. Kapitel 3).

Bei den Proben ohne Serinproteasebehandlung kann bei einer Behandlungszeit von

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

10 und 100 Minuten kein Rapamycin (①) detektiert werden. Dies zeigt demnach ein vergleichbares Verhalten zu einer Behandlung der Haut mit einer Rapamycin-Ethanol-Formulierung [161]. Der Wirkstoff kann bei den Serinprotease-unbehandelten Proben nach 1000 Minuten und bei einer Vorbehandlung mit Serinprotease nach 10 Minuten im Stratum Corneum, hierbei auch in den Corneocyten, beobachtet werden. Da in den vorliegenden Proben die Menge an Nanocarriern unterhalb der Nachweisgrenze liegt, ist anzunehmen, dass der detektierte Wirkstoff Rapamycin aus den Nanocarriern rsCMS 1 freigesetzt wurde. Das Eindringen des Wirkstoffs in das Stratum Corneum und in die Corneocyten nach der Behandlung mit Serinprotease deckt sich mit den Erkenntnissen aus Kapitel 4.3.1: Die Membranen der Corneocyten werden durch die Serinprotease beschädigt und für Rapamycin durchlässig. Das aus den Nanocarriern freigesetzte Rapamycin kann dadurch in die Haut eindringen.

Für Probe (c), welche nicht mit Serinprotease behandelt wurde, liegt die Ursache wahrscheinlich in einer geringen Aufnahme der Nanocarrier unterhalb der Nachweisgrenze. Die geringen Mengen der Nanocarrier können so den Wirkstoff in das Stratum Corneum transportieren. Aus der Literatur ist bekannt, dass CMS-Nanocarrier über die Lipide durch das Stratum Corneum transportiert werden [191]. Beim Transport der Nanocarrier durch die Lipide, können diese mit den Membranen der Corneocyten wechselwirken und diese destabilisieren [149, 193]: Diese werden für Rapamycin, vergleichbar mit der Wirkung von Serinprotease, durchlässig und freigesetztes Rapamycin kann so ebenfalls in das Stratum Corneum eindringen.

Die Verteilung der Nanocarrier kann aus ② entnommen werden: Keine der gezeigten Proben zeigt eine ausreichende Aufnahme der verwendeten rsCMS 1-Nanocarrier, um diese nachweisen zu können. Nur bei Probe (f) sind die Nanocarrier in einer defekten Region detektierbar: Dies wird auf eine Folge einer lokalen Probenbeschädigung zurückgeführt. Dies steht nicht im Widerspruch zur Literatur, da ebenfalls bekannt ist, dass die Aufnahme von Nanocarriern abhängig von der chemischen und physikalischen Beschaffenheit der Nanocarrier ist [194], um durch die durchschnittliche 30 nm breiten Lipidkanäle [195] transportiert zu werden. Allgemein gilt: Je größer der Radius eines Nanocarriers ist, desto geringer ist das Eindringen des Nanocarriers in das Stratum Corneum [196]. Der Transport großer Nanocarrier sind durch eine nötige Verbreiterung der Lipidschichten gehemmt. Unter der Annahme, dass innerhalb mehrerer Synthesen der gleichen Route der vorliegenden CMS-Nanocarrier rsCMS 1 keine starken Größenschwankungen der zu erwartenden Durchmesser zu erwarten ist (9.3 nm [28]), ist in dem vorliegenden Fall unter Berücksichtigung der mittleren Lipidkanalbreite von 30 nm [195] eine Aggregation der Nanopartikel als mögliche Ursache für die fehlende Detektion der Nanocarrier anzunehmen.

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

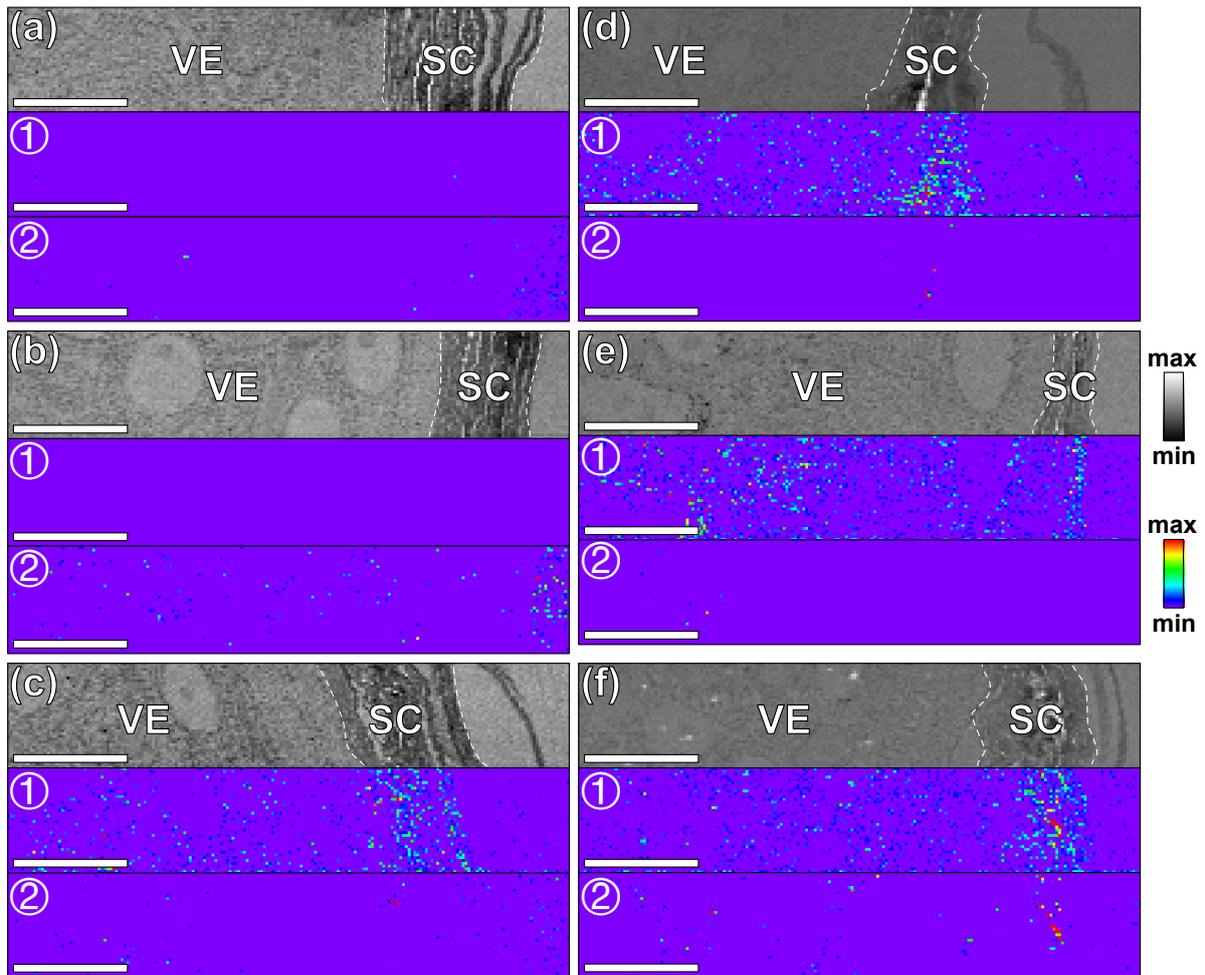


Abbildung 4.26: Mit Rapamycin beladener rsCMS 1-Nanocarrier HEC-Gel-Formulierung behandelte Haut, (a) bis (c) ohne Vorbehandlung, (d) bis (f) mit Vorbehandlung durch Serinprotease, die Transmissionsintensität bei 532.0 eV für (a) und (d) einer 10-minütigen, (b) und (e) einer 100-minütigen und (c) und (f) einer 1000-minütigen Behandlung, Verteilung des Rapamycins ① und der Nanocarrier ② aus einer Singulärwertzerlegung, die Länge des Maßstabes beträgt 10 µm.

Der hierbei relativ zur maximalen Detektion beobachtete Anteil an Rapamycin ist in Tabelle 4.3 dargestellt: Ohne Serinprotease-Vorbehandlung wird nur Wirkstoff nach 1000 Minuten Behandlung detektiert. Die Masse ist hierbei geringer als in der Serinprotease-behandelten Probe. Mit einer vorhergehenden Serinproteasebehandlung unterscheiden sich die detektierten Massen im Rahmen des statistischen Fehlers nicht voneinander.

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

Tabelle 4.3: Relativer Anteil des Rapamycins zur maximalen detektierten Masse für die mit Serinprotease behandelten Proben in HEC Gel

Rapamycin		ohne Vorbehandlung		mit Serinproteasebehandlung
10 Minuten	(a)	-	(d)	(89±13)%
100 Minuten	(b)	-	(e)	(88±13)%
1000 Minuten	(c)	(79±12)%	(f)	(100±15)%

In Abbildung 4.27 sind die Messungen und die Auswertung mit dem oxidationssensitiven Nanocarrier osCMS 2b dargestellt (aufgetragene Masse Rapamycin $72.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, Nanocarrier beladen mit 29 Gew% Rapamycin). Proben (a) und (d) wurden für 10, (b) und (c) für 100 und (c) und (f) für 1000 Minuten mit der Nanocarrier-HEC-Gel-Formulierung behandelt. Bei (a) bis (c) handelt es sich um nicht-vorbehandelte und bei (d) bis (f) um mit Trypsin vorbehandelte Proben. Unter (a) bis (f) ist die Transmissionsintensität bei 532.0 eV dargestellt. Das Stratum Corneum ist mit SC gekennzeichnet und wird visuell durch gestrichelte Markierungen begrenzt. Rechts davon befindet sich die Hautoberfläche und das reine Einbettungsmedium, links davon die viable Epidermis (VE). In der viablen Epidermis sind bis auf Probe (a) runde Strukturen zu erkennen, welche den Zellkernen der dort vorhandenen Keratinozyten zugeordnet werden können. Die dunklen Bereiche innerhalb der Zellkerne können den Kernkörperchen zugeordnet werden. Die zur Konzentration proportionale Verteilungen aus einer Singulärwertzerlegung sind für Rapamycin unter ① und für die osCMS 2b Nanocarrier unter ② dargestellt (vgl. die numerische Singulärwertzerlegung aus Kapitel 3).

Bei den unvorbehandelten Proben kann der Wirkstoff unter ① nach 10 Minuten nicht, nach 100 Minuten in den Lipiden und Corneocyten des oberen Stratum Corneums und nach 1000 Minuten im gesamten Stratum Corneum nachgewiesen werden. Die mit Serinprotease behandelten Proben zeigen nach 10 Minuten Rapamycin in den Lipidkanälen, nach 100 Minuten und 1000 Minuten sowohl in den Lipiden als auch in Corneocyten. Mit und ohne Vorbehandlung zeigen die Proben bei 1000 Minuten eine Aufnahme des Wirkstoffs in die Corneocyten und einen Transport in die viable Epidermis. In allen Proben, welche eine Aufnahme von Rapamycin zeigen, können die Nanocarrier osCMS 2b unter ② in den Lipiden des Stratum Corneums detektiert werden. Die Örtliche Trennung zwischen Nanocarriern und Wirkstoffmoleküle zeigt eine Freigabe des Wirkstoffs aus den Nanocarriern an die Umgebung.

Ursache für die Aufnahme des Wirkstoffs in die Corneocyten kann die Wechselwirkung der lipophilen Nanocarrier mit den Membranen der Corneocyten sein, welche ein Eindringen des Wirkstoffs auch ohne Serinprotease ermöglichen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Nanocarrier diese Membranen durch Adsorption, Destabilisierung und Agglomeration verändern können [149, 193]. Ebenso ist ein direktes Freisetzen

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

von Wirkstoff aus den Nanocarriern durch die Membran der Corneocyten denkbar. Der Transport des Wirkstoffs in die viable Epidermis kann gebunden an Nanocarriern oder durch eine Wechselwirkung der Nanocarrier mit der Zonula occludens (engl. Tight Junctions) des Stratum Granulosums, welche als Barriere wirkt [76, 197], erfolgen.

Das Eindringen des Wirkstoffs Rapamycin in die Corneocyten der Proben (d) bis (f) ist Folge des Öffnens der Corneocytenmembranen durch die Serinprotease Trypsin, welche in Kapitel 4.3.1 beobachtet wurden.

Aus Literaturmessungen mit Fluoreszenzlebensdauermessungen ist der Transport von CMS-Nanocarriern durch das Stratum Corneum bei menschlichen Hautproben und Hautproben der Maus bekannt [197, 198]. Es konnte jedoch aufgrund der geringeren Ortsauflösung nicht abschließend geklärt werden, ob der Transport über die Lipid- oder Proteinstrukturen des Stratum Corneums stattfindet [191]. Bei den in dieser Arbeit gezeigten Röntgenmikroskopiemessungen konnte jedoch auf die Nutzung eines Labels verzichtet werden. Eine Aufnahme der osCMS 2b Nanocarrier durch die Membranen in die Corneocyten findet aufgrund der Größe der Nanocarrier von 8.6 nm [27] nicht statt.

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

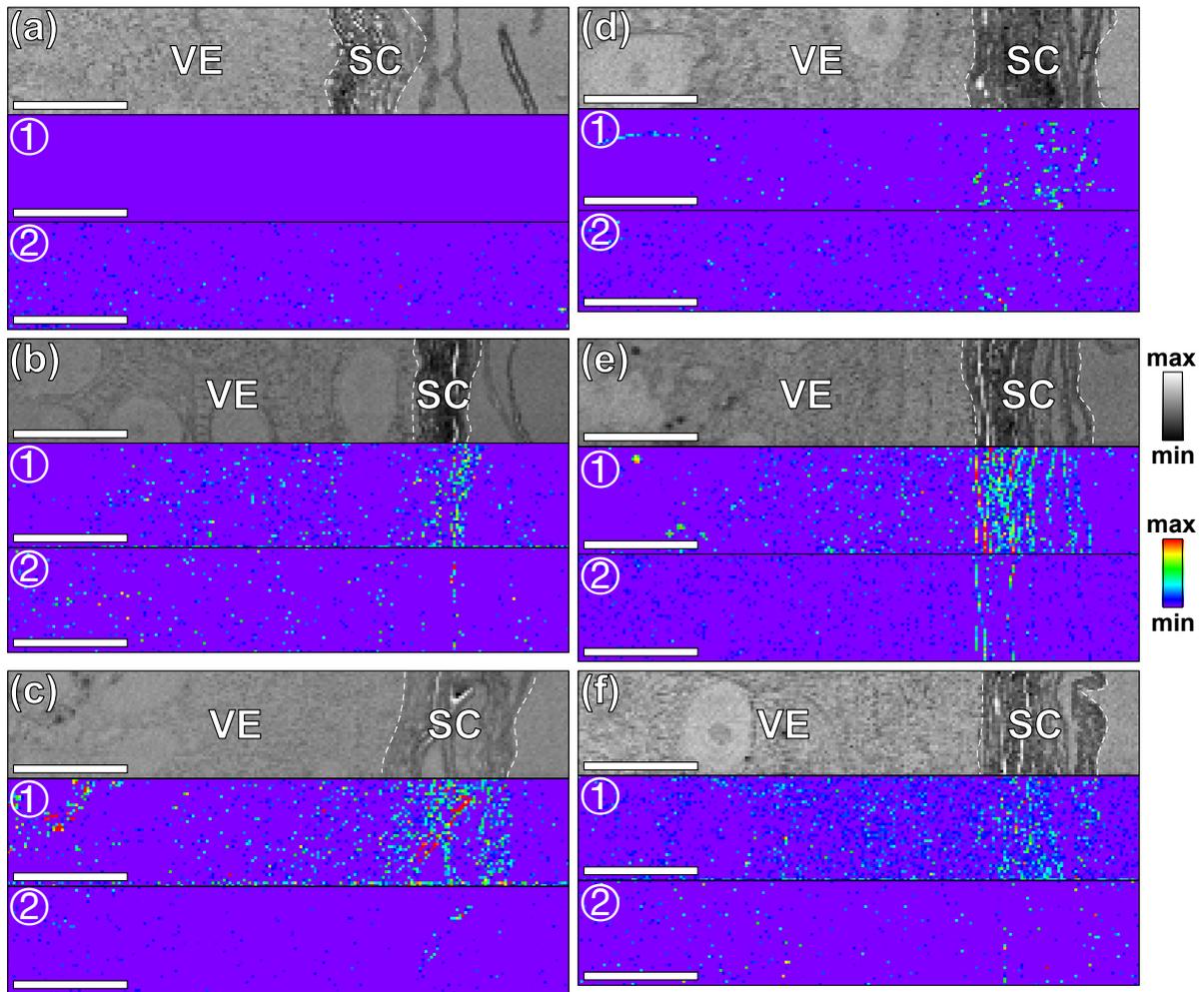


Abbildung 4.27: Mit Rapamycin beladener osCMS 2b-Nanocarrier HEC-Gel-Formulierung behandelte Haut, (a) bis (c) ohne Vorbehandlung, (d) bis (f) mit Vorbehandlung durch Serinprotease, die Transmissionsintensität bei 532.0 eV für (a) und (d) einer 10-minütigen, (b) und (e) einer 100-minütigen und (c) und (f) einer 1000-minütigen Behandlung, Verteilung des Rapamycins ① und der Nanocarrier ② aus einer Singulärwertzerlegung, die Länge des Maßstabes beträgt 10 µm.

Die zugehörigen detektierten Anteile des osCMS 2b Nanocarriers relativ zur maximalen detektierten Masse sind in Tabelle 4.4 dargestellt. Die Proben zeigen eine Aufnahme relativ zur Behandlungsdauer, wobei die Probe 1000 Minuten mit Serinproteasevorbehandlung eine Ausnahme bildet: Es konnte in Abbildung 4.27 (f) kein Nanocarrier detektiert werden. Diese Abnahme könnte die Ursache in einem Zerfall der Nanocarrier aufgrund des oxidativen Stresses [199] nach der Behandlung mit der Serinprotease Trypsin haben. Unter drastischen Bedingungen (Wasserstoffperoxid) konnte in der Literatur der Abbau der osCMS 2b Nanocarrier *ex vivo* gezeigt werden [27]. Die in Tabelle 4.5 (f) beobachtete Zunahme an Wirkstoff im Vergleich zu (e) deutet darauf hin, dass der Wirkstoff durch Nanocarrier in das Stratum Corneum transportiert und

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

diese den Wirkstoff nicht weiter transportiert haben. Ursache hierfür ist die Freigabe des Wirkstoffs aus den Nanocarriern im Stratum Corneum, welcher sich anschließend diffus verbreitet.

Tabelle 4.4: Relativer Anteil der osCMS 2b Nanocarrier zur maximalen detektierten Masse für die mit Serinprotease behandelten Proben in HEC Gel

osCMS 2b		ohne Vorbehandlung		mit Serinproteasebehandlung
10 Minuten	(a)	-	(d)	(45±7)%
100 Minuten	(b)	(35±5)%	(e)	(100±15)%
1000 Minuten	(c)	(75±12)%	(f)	(5±1)%

Der relative Anteil an detektiertem Rapamycin ist in Tabelle 4.5 dargestellt. Sowohl die unbehandelten als auch die mit Serinprotease behandelten Proben zeigen eine mit der Behandlungsdauer steigende Zunahme an detektiertem Wirkstoff. Von Probe (f) abgesehen, bei der ein Abbau der osCMS 2b Nanocarrier vermutet wird, ist die aufgenommene Masse des Wirkstoffs abhängig von der aufgenommenen Masse an Nanocarriern (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.5: Relativer Anteil des Rapamycins zur maximalen detektierten Masse für die mit Serinprotease behandelten Proben in HEC Gel

Rapamycin		ohne Vorbehandlung		mit Serinproteasebehandlung
10 Minuten	(a)	-	(d)	(50±10)%
100 Minuten	(b)	(16±2)%	(e)	(73±12)%
1000 Minuten	(c)	(100±15)%	(f)	(86±13)%

Im Gegensatz zu Beispielen aus der Literatur, welche mithilfe von Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie [191, 192] mit einem Farbstoff markierte Nanocarrier nachgewiesen haben, konnte mithilfe der Kombination aus hyperspektraler Röntgenmikroskopie und numerischer Singulärwertzerlegung CMS-Nanocarrier und Rapamycin in Hautproben orts aufgelöst und labelfrei nachgewiesen werden. Damit vergleichbar sind Ergebnisse aus der Röntgenmikroskopie, die den Absorptionskontrast im Bereich der O 1s-Anregung ausnutzte [149]. Die Vorbehandlung mit Serinprotease zeigte keine verstärkte Aufnahme der Nanocarrier in die Corneocyten, sie ermöglichte aber durch den erzeugten oxidativen Stress einen Abbau der Nanocarrier. Die Serinprotease zeigt für die Wirkstoffaufnahme bei Behandlungen bis 100 Minuten eine verbesserte Aufnahme des Wirkstoffs, auch in die Corneocyten. Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.3.1. Bei 1000 Minuten Behandlung kann ein solcher Unterschied nicht nachgewiesen werden. Ursache kann hierbei die Wechselwirkung der lipophilen Nanocarrier mit den lipophilen Corneocytenmembranen sein, welche die Membranen für

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

den Wirkstoff Rapamycin durchgängig werden lässt.

Mithilfe des reduktionssensitiven Nanocarriers rsCMS 1 und des oxidationssensitiven Nanocarriers osCMS 2b konnte Rapamycin in das Stratum Corneum der Haut transportiert werden. Die aufgenommenen Mengen des rsCMS 1 Nanocarriers lagen aufgrund von Aggregation unterhalb der Nachweisgrenze. Ein Einfluss der chemischen Umgebung der Haut auf den Abbau der Nanocarrier konnte daher nicht beobachtet werden. Der osCMS 2b Nanocarrier konnte in den Lipidlamellen des Stratum Corneums gefunden werden. In der Hautprobe, welche mit Serinprotease behandelt wurde, konnte nach 1000 Minuten Behandlungszeit ein Zerfall der osCMS 2b Nanocarrier aufgrund des oxidativen Stresses beobachtet werden.

4.4.2 Auswirkung der Vorbehandlung mit DBPO auf den Transport der Nanocarrier rsCMS 1 und osCMS 2b

Neben Serinprotease kann oxidativer Stress innerhalb der Haut auch durch andere Substanzen ausgelöst werden. Es soll der Einfluss des Oxidationsmittels Dibenzoylperoxid (DBPO) auf den Transport der CMS-Nanocarrier untersucht werden. DBPO kann in menschliche Haut eindringen und wird in Benzoesäure überführt [200]. Aus Cyclovoltametriemessungen in der Literatur liegen die durch eine Vorbehandlung möglichen oxidierten Zustände der Haut bei ca. 0.5 V/SCE und 0.75 V/SCE [201, 202]. Die genutzten reduktionssensitiven Nanocarrier rsCMS 1 haben das Reduktionspotential bei -0.51 V/SCE, das Oxidationspotential bei -0.26 V/SCE und das Redoxpotential bei -0.44 V/SCE [28]. Für den oxidationssensitiven Nanocarrier osCMS 2b ist das Reduktionspotential nicht bekannt.

DBPO kann durch die Bildung der Benzoylperoxidradikalen in der Haut mit Membranen, z.B. mit denen von Bakterien, reagieren [203]. Es kann daher in der Therapie gegen Akne eingesetzt werden [204]. Ebenso konnte beobachtet werden, dass die Einwirkung von DBPO zum Ablösen der Corneocyten aus dem Stratum Corneum führt (Keratolyse) [205]. Im Rahmen der Experimente soll durch eine 16-stündige Vorbehandlung der in der Haut vorhandene oxidative Stress erhöht werden. Ebenso soll untersucht werden, ob die keratolytische Wirkung von DBPO ebenfalls einen Einfluss auf die Barrierefunktion der Corneocytenmembranen hat.

In Abbildung 4.28 sind für jede Probe die Transmissionsintensität bei 532.0 eV mit einem Messpunkt Abstand von 250 nm unter (a) bis (f) und die Verteilung für die rsCMS 1-Nanocarrier unter ① aus einer Singulärwertzerlegung dargestellt. Aufgetragen wurde der Wirkstoff als eine rsCMS 1-HEC-Gel-Formulierung (aufgetragene Masse: $5.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Rapamycin, Nanocarrier beladen mit einem Massenanteil von 2.7 Gew% Rapamycin). Die Proben (a) bis (c) auf der linken Seite wurden nicht vorbehandelt, die Proben (d) bis (f) auf der rechten Seite wurden vor der Auftragung der Formulierung für 16 Stunden mit einer DBPO-Lösung ($20 \mu\text{L}$ einer $40 \text{ mg}/\text{mL}$ DBPO in Aceton/Isopropylmyristat Lösung) vorbehandelt. Die Proben (a) und (d) wurden für 10, (b) und (e) für 100 und (c) und (f) für 1000 Minuten mit einer rsCMS 1-HEC-Gel-Formulierung behandelt. In den orts aufgelösten Transmissionsintensitätsdaten ist die Hautoberfläche auf der rechten Seite zu erkennen, das Stratum Corneum ist mit zwei gestrichelten Linien markiert und die viable Epidermis befindet sich links davon. In der viablen Epidermis aller gezeigten Messungen sind runde Strukturen zu erkennen, welche den Zellkernen zugeordnet werden können. Schon nach 10 Minuten dringen die Nanocarrier in die Lipidregionen des Stratum Corneums ein. Ohne Vorbehandlung mit DBPO kommt es bei 100 und 1000 Minuten zu keiner signifikanten Verteilungsände-

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

zung der Nanocarrier. Bei den mit DBPO-vorbehandelten Proben zeigt sich zwischen 10 und 100 Minuten keine Änderung, bei 1000 Minuten nimmt das Signal der detektierten Nanocarrier im Stratum Corneum ab. In allen sechs Proben ist keine Anreicherung der Nanocarrier in der viablen Epidermis sichtbar.

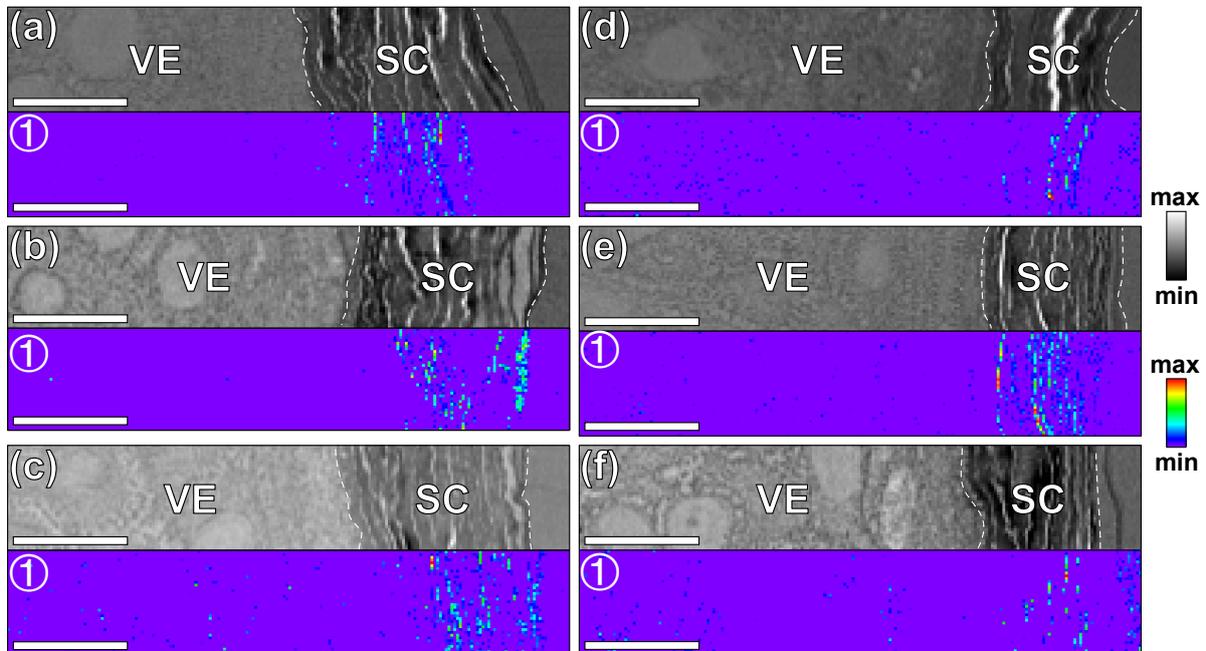


Abbildung 4.28: Mit rsCMS 1-Nanocarrier HEC-Gel-Formulierung behandelte Haut, (a) bis (c) ohne Vorbehandlung, (d) bis (f) mit DBPO Vorbehandlung (0.8 mg, 16 Stunden), die Transmissionsintensität bei 532.0 eV für (a) und (d) einer 10-minütigen, (b) und (e) einer 100-minütigen und (c) und (f) einer 1000-minütigen Behandlung, darunter die Verteilung für die Nanocarrier aus der Singulärwertzerlegung, die Länge des Maßstabes beträgt 10 μm .

Die hierbei detektierten Anteile sind in Tabelle 4.6 relativ zur maximal-detektierten Masse dargestellt. Hierbei zeigt sich qualitativ eine mit der Behandlungszeit steigende Zunahme an Nanocarriern für die DBPO-unbehandelte Probe. Für die mit DBPO-behandelten Probe ist eine Zunahme an Wirkstoff bis 100 Minuten zu beobachten. Die Abnahme bei 1000 Minuten hat die Ursache möglicherweise im Abtransport der Nanocarrier aus dem Stratum Corneum in tiefere Hautregionen. Ebenso könnten durch eine lokal unterschiedliche Beschaffenheit der Haut weniger Nanocarrier aufgenommen worden sein.

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

Tabelle 4.6: Relativer Anteil der rsCMS 1 Nanocarrier zur maximalen detektierten Masse für die mit DBPO behandelten Proben in HEC Gel

rsCMS 1		ohne Vorbehandlung		mit DBPO
10 Minuten	(a)	(46±7)%	(d)	(68±20)%
100 Minuten	(b)	(97±15)%	(e)	(87±13)%
1000 Minuten	(c)	(100±15)%	(f)	(25±4)%

Der Versuch wurde mit rsCMS 1 Nanocarriern an Haut eines anderen Spenders wiederholt. Hierbei wurde für die Proben 4 µg/cm² Rapamycin als Nanocarrier-HEC-Gel-Formulierung aufgetragen, die Probe mit 5-tägiger Behandlung wurde mit der doppelten Rapamycinmasse behandelt. Die hierbei genutzten Nanocarrier waren mit 1 Gew% beladen. Mit einer mehrfachen Anwendung der Formulierung soll die Wirkstoff- und Nanocarrierverteilung einer topischen Therapie untersucht werden, insbesondere, ob es zu veränderten Verteilungen im Vergleich zur einmaligen Anwendung kommt. Die Messungen erfolgten mit einem Messpunktabstand von 150 nm. Abbildung 4.29 zeigt ebenfalls unter (a) und (b) Proben, die nicht vorbehandelt wurden. Unter (c) bis (e) werden Messungen von Proben gezeigt, welche für 16 Stunden mit einer DBPO-Lösung (20 µL einer 40 mg/mL DBPO in Aceton/Isopropylmyristat Lösung) vorbehandelt wurden. Eine Behandlung mit der Nanocarrier-HEC-Gel-Formulierung für 100 Minuten ist unter (a) und (c) abgebildet, für 1000 Minuten unter (b) und (d) und für 5 Tage unter (e). Die aufgetragene Masse an Rapamycin bei der Behandlung für 5 Tage ist doppelt so groß wie bei den anderen Proben. Unter (a) bis (e) ist die Transmissionsintensität bei 532.0 eV abgebildet. Die Orientierung der Hautproben ist wie in den vorhergehenden Abschnitten: Die Hautoberfläche befindet sich rechts, das Stratum Corneum zwischen den beiden weiß-gestrichelten Linien und die viable Epidermis links. In der viablen Epidermis sind die Zellkerne der Keratinozyten als runde Strukturen zu erkennen, im Stratum Corneum sind die Lipide heller und die Corneocyten dunkler dargestellt. Die Verteilungen aus einer Singulärwertzerlegung, welche sich proportional zur lokalen Konzentration verhalten, sind unter ① für den Wirkstoff Rapamycin und unter ② für die rsCMS 1-Nanocarrier dargestellt. In den Messungen, Probe (b) angenommen, zeigen sich Nanocarrier auch oberhalb der Hautoberfläche. Hierbei handelt es sich vermutlich um Nanocarrier, welche beim Einbettungsprozess in das Epoxidharz transportiert werden oder auf der Hautoberfläche verblieben sind. In Probe (a) ist mittig eine Beschädigung zu erkennen, in der Wirkstoff und Nanocarrier gefunden werden können. Oberhalb der Beschädigung befinden sich die Nanocarrier am Übergang der aufgequollenen Lipide zu den Corneocyten, Wirkstoff befindet sich innerhalb der Corneocyten. Unterhalb der Beschädigungen (tiefere Hautregionen) lassen sich der Wirkstoff und die Nanocarrier nur in den Lipiden nachweisen. In Probe (b) finden

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

sich Rapamycin und Nanocarrier innerhalb der Lipide. In unbeschädigter Haut wird der Transport des Rapamycins durch die Nanocarrier ermöglicht, jedoch bleiben Membranen der Corneocyten selbst nach 1000 Minuten Einwirkzeit der Formulierung undurchlässig. Probe (c) (100 Minuten, mit vorheriger DBPO Behandlung) weist ein vollständig abgelöstes Stratum Corneum auf. Die Nanocarrier lagern sich aufgrund des Verlustes der Barriere an den Membranen der Zellkerne in der viablen Epidermis an, ohne in die Kerne einzudringen. Der hierbei beobachtete Transport von rsCMS 1-Nanocarriern in die Zellen der viablen Epidermis deckt sich mit dem Transport von CMS-Nanocarriern unter Endozytose oder Makropinozytose durch Zellmembranen [206, 207]. Die Anlagerung an die Membranen des Zellkerns lässt sich durch die Lipophilie der Nanocarrier und die Barriere der Nucleusmembran erklären: Diese kann nur von kleinen Partikeln (< 80 nm) mittels passiver Diffusion oder mithilfe von TAT-Peptiden (Transaktivator der Transkription) überwunden werden [208]. Die verwendeten Nanocarrier haben diese Eigenschaft nicht. Der Wirkstoff Rapamycin wird ebenfalls in die viable Epidermis detektiert. Er zeigt keine Anreicherung und befindet sich in anderen Regionen als die der CMS-Nanocarrier.

Rapamycin lässt sich in Probe (d) in den oberen Lipidschichten und unteren Corneocyten nachweisen; die Probe ohne DBPO-Vorbehandlung (b) zeigte nur eine Wirkstoffaufnahme in die Lipidschichten. Dies deutet auf eine Beschädigung der Membranen durch DBPO hin, die mit der Beschädigung der Corneocytenmembranen durch die Serinprotease Trypsin vergleichbar ist (vgl. Kapitel 4.4.1).

Die Nanocarrier lassen sich in den oberen Lipiden des Stratum Corneums und in der viablen Epidermis detektieren. Ein ähnliches Verhalten lässt sich in Probe (e), welche für 5 Tage behandelt wurde, beobachten: Der Wirkstoff lagert sich im oberen Teil des Stratum Corneums sowohl in den Lipiden als auch in den Corneocyten an. Dies deckt sich mit der bekannten Reservoir-Funktion des Stratum Corneums [209, 210]. Die rsCMS 1-Nanocarrier befinden sich in den Lipidschichten und an den Zellkernmembranen in der viablen Epidermis. Dies hat die Ursache in der hohen Lipophilie der Nanocarrier und den lipophilen Eigenschaften der Membranen. Da sich im Stratum Corneum eine Behandlung mit DBPO vergleichbar zu einer Behandlung mit der Serinprotease Trypsin verhalten hat, könnte der Transport der Nanocarrier ebenfalls durch eine Beschädigung der Zonula occludens (engl. Tight Junctions) des Stratum Granulosum [76] verbessert worden sein.

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

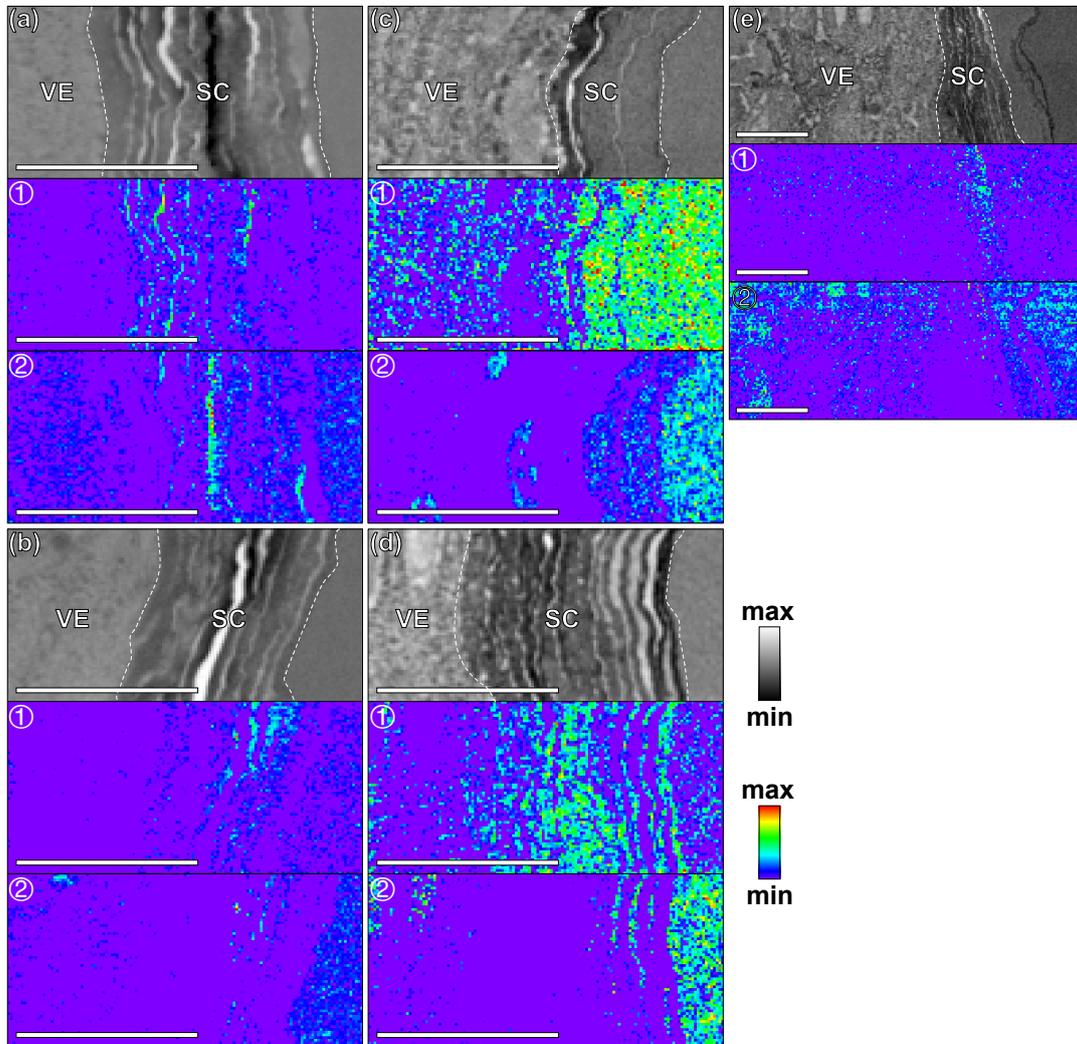


Abbildung 4.29: Mit Rapamycin beladener rsCMS 1-Nanocarrier HEC-Gel-Formulierung behandelte Haut, (a) und (b) ohne Vorbehandlung, (c) bis (e) mit DBPO Vorbehandlung (0.8 mg, 16 Stunden), die Transmissionsintensität bei 532.0 eV für (a) und (c) einer 100-minütigen, (b) und (d) einer 1000-minütigen und (e) einer 5-tägigen Mehrfach-Behandlung, Verteilungen aus einer Singulärwertzerlegung für Rapamycin unter ① und für die Nanocarrier unter ②, die Länge des Maßstabes beträgt 10 µm.

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

Es wird eine von der Behandlungszeit abhängige relative Aufnahme der Nanocarrier für die Behandlung ohne DBPO in Tabelle 4.7 gezeigt. Die Proben mit 5-tägiger Behandlung zeigen im Hinblick auf die vierfach aufgetragene Masse an Nanocarriern bei (e) um den Faktor 2 weniger Nanocarrier als die für 1000 Minuten behandelte Probe. Es wird angenommen, dass der Nanocarrier in tiefere Regionen transportiert wurde.

Tabelle 4.7: Relativer Anteil der rsCMS 1 Nanocarrier zur maximalen detektierten Masse für die mit DBPO behandelten Proben in HEC Gel

rsCMS 1		ohne Vorbehandlung		mit DBPO
100 Minuten	(a)	(25±4)%	(c)	(60±9)%
1000 Minuten	(b)	(65±10)%	(d)	(60±9)%
5 Tage			(e)	(100±15)%

Der detektierte relative Anteil des Rapamycins (Tabelle 4.8) zeigt ein von der Behandlungsdauer abhängige Veränderung bei der Aufnahme des Wirkstoffs Rapamycin ohne Vorbehandlung. Bei der Vorbehandlung mit DBPO nimmt der Anteil an Rapamycin zwischen 100 und 1000 Minuten zu. Die anschließende Abnahme nach 5 Tagen trotz doppelter Auftragsmenge lässt sich dadurch erklären, dass nur noch der Wirkstoff, welcher im Stratum Corneum verblieben ist, detektiert werden kann. Der größte Teil des Wirkstoffs wurde offenbar in tiefere Regionen der Haut transportiert. Dies deutet auf eine Eignung der genutzten rsCMS 1 Nanocarrier zur therapeutischen Anwendung hin: Der Wirkstoff Rapamycin, welcher in einer ethanolischen Formulierung nicht in die Haut eindringen konnte [161], kann mithilfe der Nanocarrier in einer wässrigen HEC-Gel-Formulierung sowohl in unbehandelte als auch in oxidierte Haut transportiert werden.

Tabelle 4.8: Relativer Anteil des Rapamycins zur maximalen detektierten Masse für die mit DBPO behandelten Proben in HEC Gel

Rapamycin		ohne Vorbehandlung		mit DBPO
100 Minuten	(a)	(100±15)%	(c)	(37±6)%
1000 Minuten	(b)	(40±6)%	(d)	(68±10)%
5 Tage			(e)	(13±2)%

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

Die Ergebnisse der Messungen der mit osCMS 2b-Nanocarriern behandelten Proben (aufgetragene Masse: $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Rapamycin, Nanocarrier beladen mit 0.5 Gew% Rapamycin) sind in Abbildung 4.30 mit einem Messpunktabstand von 250 nm dargestellt. Unter (a) bis (f) ist die Transmissionsintensität bei 532.0 eV, darunter die Verteilung der Nanocarrier aus einer Singulärwertzerlegung dargestellt. Sie ist proportional zur lokalen Konzentration der Nanocarrier osCMS 2b. In den Transmissionsintensitätsmessungen befindet sich die Probenoberfläche rechts, das Stratum Corneum ist als SC gekennzeichnet und befindet sich zwischen den gestrichelten Linien; die viable Epidermis (VE) befindet sich links vom Stratum Corneum. In der viable Epidermis sind helle, runde Regionen den Nuklei zuzuordnen, Probe (e) zeigt als dunkle Struktur oberhalb des Maßstabs einen Nucleolus. Die Proben (a) bis (c) wurden nicht vorbehandelt, die Proben (d) bis (f) wurden für 16 Stunden mit DBPO (20 μL einer 40 mg/mL DBPO in Aceton/Isopropylmyristat Lösung) vorbehandelt, um in der Haut oxidativen Stress zu erzeugen. Die Proben (a) und (d) wurden für 10 Minuten, (b) und (e) für 100 Minuten und die Proben (c) und (f) für 1000 Minuten mit osCMS 2b in HEC-Gel behandelt.

In allen Proben, in denen sich Nanocarrier im Stratum Corneum finden lassen, befinden sich diese wiederum in den Lipidschichten, die zwischen den Corneocyten liegen. Probe (a) (10 Minuten, ohne DBPO-Vorbehandlung der Haut) zeigt Nanocarrier, die in die Haut aufgenommen wurden, während Probe (d) (10 Minuten, mit DBPO-Vorbehandlung der Haut) keine Nanocarrier in der Haut zeigt. Die Ursache liegt teilweise in der Beschädigung der Probe links neben der Beschriftung SC, auf die im Folgenden näher eingegangen wird. In den Proben ohne DBPO-Vorbehandlung zeigt sich nach 100 Minuten eine Anreicherung in der defekten Region im mittleren Stratum Corneum. In anderen Regionen des Stratum Corneums und der viable Epidermis können keine Nanocarrier detektiert werden. Erst nach 1000 Minuten zeigt sich eine verstärkte Anreicherung der Nanocarrier in den Lipidschichten des mittleren Stratum Corneums. Die Proben mit DBPO-Vorbehandlung, welche das Ziel haben, Haut mit erhöhtem oxidativen Stress zu untersuchen, zeigen nach 100 bzw. 1000 Minuten Behandlung die osCMS 2b-Nanocarrier in den Lipidschichten des gesamten Stratum Corneums. Die Unterschiede der Verteilungen mit und ohne DBPO-Vorbehandlung lassen sich nicht auf diese Vorbehandlung zurückführen: So zeigt die 10-minütige Behandlung ohne Vorbehandlung eine sichtbare Aufnahme in die intakten Bereiche des Stratum Corneums. Dies kann auf den sichtbaren Riss in dieser Probe zurückzuführen sein, so dass aufgrund des mechanischen Defekts selbst nach 10 Minuten Einwirkzeit der Formulierung mehr Nanocarrier als nach längeren Einwirkzeiten aufgenommen werden. Dies belegt die Bedeutung von mechanischen Defekten der Hautbarriere bezüglich der Aufnahme von Wirkstoffen und Nanocarriern [13]. Die für 100 Minuten behandelten Proben zeigen nach DBPO-Vorbehandlung eine erhöhte Aufnahme und die 1000 Minuten un-

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

terscheiden auch in ihrer Verteilung innerhalb des Stratum Corneums. Eine Ursache hierfür können lokale Schwankungen der Zusammensetzung des Stratum Corneums sein [211, 212].

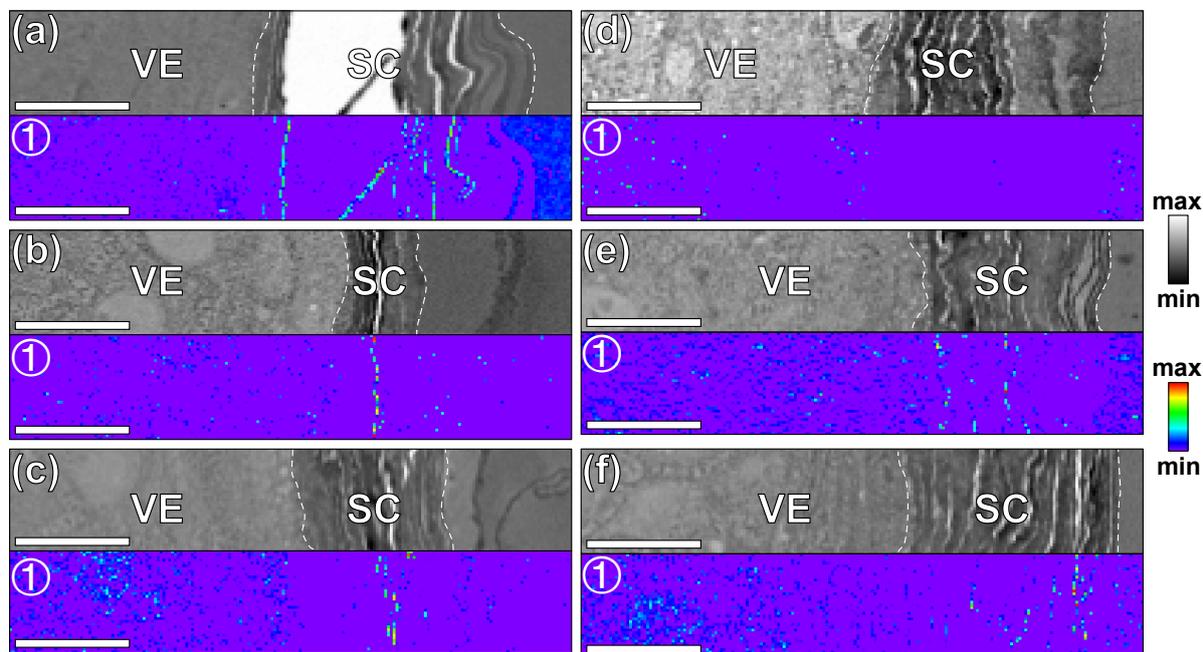


Abbildung 4.30: Mit osCMS 2b-Nanocarrier HEC-Gel-Formulierung behandelte Haut, (a) bis (c) ohne Vorbehandlung, (d) bis (f) mit DBPO Vorbehandlung (0.8 mg, 16 Stunden), die Transmissionsintensität bei 532.0 eV für (a) und (d) einer 10-minütigen, (b) und (e) einer 100-minütigen und (c) und (f) einer 1000-minütigen Behandlung, darunter die Verteilung für die Nanocarrier aus einer Singulärwertzerlegung, die Länge des Maßstabes beträgt 10 μm .

Der detektierte, relative Massenanteil der osCMS 2 Nanocarrier, die in die Haut aufgenommen wurden, ist in Tabelle 4.9 dargestellt: Nach 1000 Minuten wird in beiden Proben jeweils die maximale Masse an Nanocarriern in der Haut detektiert.

Tabelle 4.9: Relativer Anteil der osCMS 2 Nanocarrier zur maximalen detektierten Masse für die mit DBPO behandelten Proben in HEC Gel in der Haut

osCMS 2b		ohne Vorbehandlung		mit DBPO
10 Minuten	(a)	(33 \pm 5)%	(d)	-
100 Minuten	(b)	-	(e)	(31 \pm 5)%
1000 Minuten	(c)	(65 \pm 10)%	(f)	(100 \pm 15)%

Es wurden auch Messungen von Hautproben eines anderen Spenders, für die dieselbe topische Behandlung unter Nutzung der osCMS 2b Nanocarrier, jedoch mit variierenden Konzentrationen und Behandlungsdauern, durchgeführt. Dabei wurde auch eine

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

Langzeitbehandlung eingeschlossen, bei der die Nanocarrier zwischen der mehrfachen Auftragung in die Haut abtransportiert werden kann und somit eine reale topische Therapie simuliert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.31 mit einem Messpunktabstand von 150 nm dargestellt. Hierbei wurde $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Rapamycin über mit 2 Gew% beladenen Nanocarrier in HEC-Gel aufgetragen. Bei der Behandlungszeit für 5 Tage wurden $8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Wirkstoff bei halber Beladung der Nanocarrier aufgetragen. Unter (a) bis (g) ist die Transmissionsintensität bei 532.0 eV dargestellt, unter ① die Verteilung des Wirkstoffs Rapamycin aus der Singulärwertzerlegung und unter ② die Verteilung der Nanocarrier osCMS 2b. Beide Parameter verhalten sich proportional zur jeweiligen lokalen Konzentration. Die Proben wurden mit den osCMS 2b-Nanocarriern in HEC-Gel für (a) und (d) 10 Minuten, (b) und (e) 100 Minuten, (c) und (f) 1000 Minuten und für (g) 5 Tage behandelt. Die unvorbehandelten Proben sind auf der linken und die für 16 Stunden mit DBPO (20 μL einer 40 mg/mL DBPO in Aceton/Isopropylmyristat Lösung) vorbehandelten Proben auf der rechten Seite dargestellt. Die Proben mit einer Behandlung von 10 Minuten zeigen keine Aufnahme des Wirkstoffs und der Nanocarrier. Dies ist konsistent mit den oben genannten Proben, sofern keine mechanischen Defekte vorliegen (vgl. Abbildung 4.30 (a)). Das Signal unter (d) im unteren Bereich ist auf eine lokale Beschädigung der Probe, welche als helle Region in der Abbildung der Transmissionsintensität sichtbar ist, zurückzuführen. Bei 100 Minuten Behandlung ((b) und (e)) ist eine Aufnahme der Nanocarrier in die Lipidschichten zu beobachten. Der Wirkstoff Rapamycin wird ohne DBPO-Vorbehandlung eher in den Lipidschichten detektiert, mit DBPO-Vorbehandlung auch in den Corneocyten des oberen Stratum Corneums. Nach 1000 Minuten ist in Probe (c) und in Probe (f) Nanocarrier in den Lipidstrukturen des Stratum Corneums zu finden, der Wirkstoff befindet sich unabhängig von der DBPO-Vorbehandlung in den Corneocyten des Stratum Corneums. Es kann gezeigt werden, dass eine DBPO-Vorbehandlung vergleichbar zu der in Kapitel 4.3.1 gezeigten Behandlung mit der Serinprotease Trypsin zu einer Öffnung der Corneocytenmembranen für den Wirkstoff führt und dieser in die Corneocyten eindringen konnte. Die Nanocarrier konnten aufgrund ihrer Größe (8 nm [27, 28]) dagegen nicht in die Corneocyten eindringen. Bei 1000 Minuten Behandlung ohne vorherige DBPO-Behandlung zeigte sich ebenfalls der Wirkstoff in den Corneocyten. Die Ursache hierfür könnte sein, dass die Nanocarrier die Membranen so verändern, dass diese für den Wirkstoff durchlässig werden. Eine vergleichbare Beobachtung konnte im Kapitel 4.4.1 dokumentiert werden und ist auch aus der Literatur bekannt [149, 193]. Die 5-tägige Behandlung (g) zeigt die osCMS 2b-Nanocarrier in der viablen Epidermis. Bemerkenswert ist hierbei die Anlagerung der Nanocarrier an den Membranen der Nuclei. Es wurden keine Nanocarrier im Stratum Corneum detektiert. Diese Beobachtung deckt sich auch mit der Wirkstoffverteilung der 5-tägigen Behandlung mit den rsCMS 1-

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

Nanocarriern aus Abbildung 4.29. Der Transport der Nanocarrier durch ein intaktes Stratum Corneum in die viable Epidermis wurde bei keiner der einmalig behandelten Proben beobachtet. Für den Transport der Nanocarrier in die viable Epidermis muss die Zonula occludens (engl. Tight Junctions) des Stratum Granulosum [76], welche als Barriere fungiert, überwunden werden. Dies kann zum einen durch die Wechselwirkung des lipophilen CMS-Nanocarriers begünstigt werden, zum anderen kann auch durch eine Beschädigung dieser Strukturen durch das Oxidationsmittel DBPO erfolgt sein.

Der Wirkstoff reichert sich nach 5-tägiger Behandlung im mittleren Stratum Corneum an, welches eine aus der Literatur bekannte Reservoirfunktion einnehmen könnte [209, 210].

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

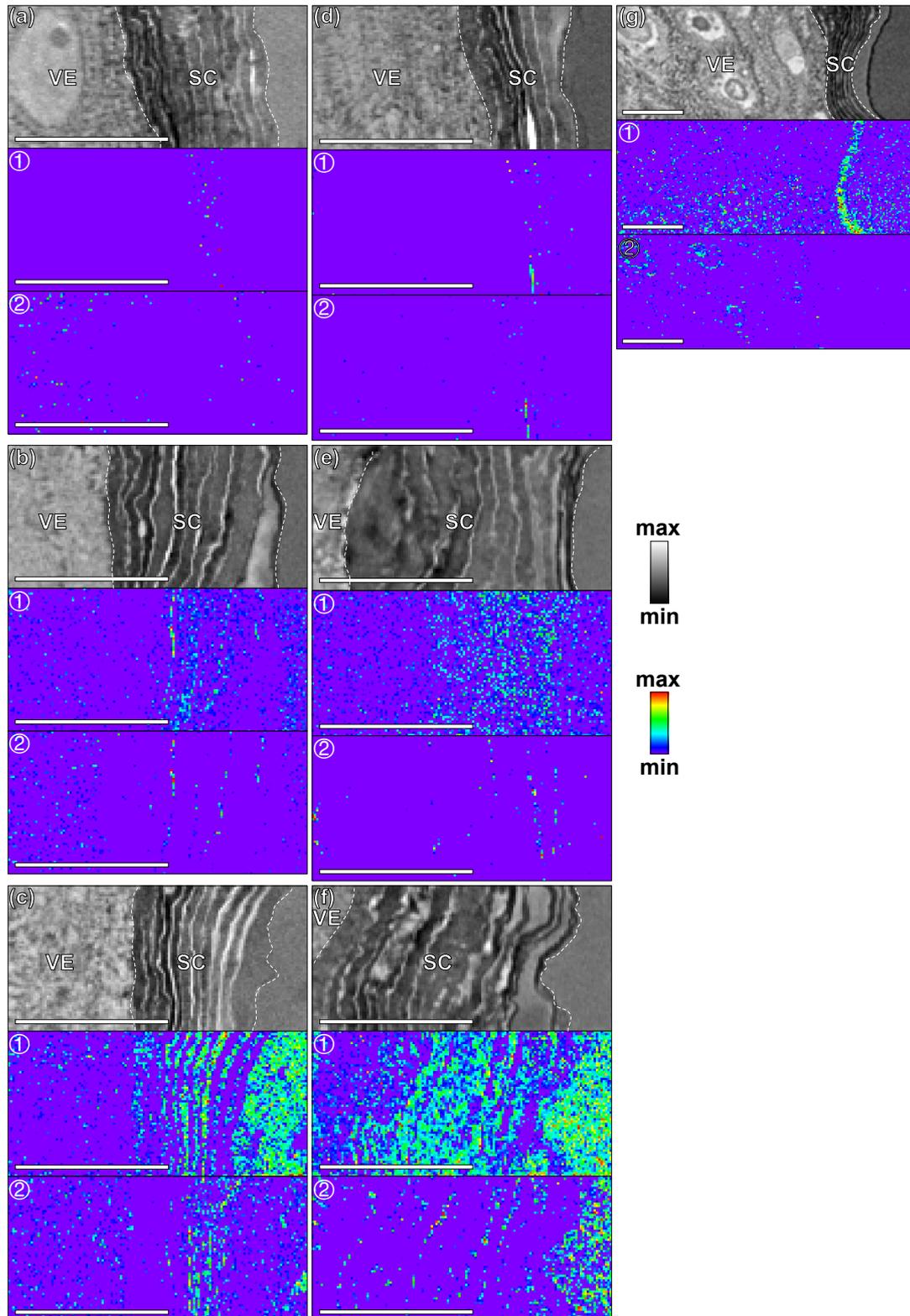


Abbildung 4.31: Mit Rapamycin beladener osCMS 2b-Nanocarrier HEC-Gel-Formulierung behandelte Haut, (a) bis (c) ohne Vorbehandlung, (c) bis (g) mit DBPO Vorbehandlung (0.8 mg, 16 Stunden), die Transmissionsintensität bei 532.0 eV für (a) und (d) einer 10-minütigen, (b) und (e) einer 100-minütigen, (c) und (f) einer 1000-minütigen und (g) einer 5-tägigen Behandlung, die Verteilungen aus einer Singulärwertzerlegung für Rapamycin unter ① und für die Nanocarrier unter ②, die Länge des Maßstabes beträgt 10 μm .

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

In Tabelle 4.10 sind die relativen detektierten Massen der osCMS 2b Nanocarrier dargestellt. Die 10-minütigen Behandlungen zeigen keine NanocARRIERaufnahme. 1000 Minuten Behandlung zeigt gegenüber 100 Minuten eine erhöhte Aufnahme an Nanocarriern. Mit und ohne DBPO-Vorbehandlung ergeben sich im Rahmen der statistischen Genauigkeit keine Unterschiede. Unter Berücksichtigung der vierfach-aufgetragenen Masse an Nanocarriern nach 5 Tagen ist zwischen dieser und nach 1000 Minuten eine Abnahme an aufgenommenen Nanocarriern zu erkennen. Es wird angenommen, dass die Nanocarrier in tiefere Regionen der Haut transportiert wurden. Im Hinblick auf den detektierten Anteil an Rapamycin (vgl. Tabelle 4.10) und den aufgetragenen Wirkstoff wird deutlich, dass diese in tiefere Regionen transportierten Nanocarrier den Wirkstoff in den oberen Regionen der Haut freigesetzt hatten. Dies deckt sich auch mit der Wirkstoffverteilung aus Abbildung 4.31 (Probe (c)), bei der sich der Wirkstoff fast vollständig in den Corneocyten und die Nanocarrier in den Lipiden zu finden sind.

Tabelle 4.10: Relativer Anteil der osCMS 2b Nanocarrier zur maximalen detektierten Masse für die mit DBPO behandelten Proben in HEC Gel

osCMS 2b		ohne Vorbehandlung		mit DBPO
10 Minuten	(a)	-	(d)	-
100 Minuten	(b)	(32±5)%	(e)	(33±7)%
1000 Minuten	(c)	(60±9)%	(f)	(58±9)%
5 Tage			(g)	(100±15)%

Die zugehörigen, relativ zum detektierten Maximum, normierten Massen des Wirkstoffs Rapamycin sind in Tabelle 4.11 dargestellt. Der Wirkstoff kann oberhalb einer Einwirkzeit von 100 Minuten in der Haut nachgewiesen werden. Die Zunahme des Wirkstoffs mit und ohne Vorbehandlung und jeweils zwischen 100 und 1000 Minuten zeigt im Rahmen der statistischen Signifikanz keine Zunahme. Relativ zur Auftragung, welche doppelt so groß ist wie bei den anderen Proben, zeigt die 5 Tage behandelte Probe eine geringe Abnahme an Rapamycin. Ursache hierfür kann ein Transport des Wirkstoffs in die tieferen, nicht-dargestellten Regionen der Haut sein, welches die therapeutische Wirksamkeit der vorliegenden wässrigen osCMS 2b-Nanocarrier-HEC-Gel-Formulierung über längere Zeiträume mit wiederholter topischer Applikation belegt. Dies deckt sich auch mit den Beobachtungen zu rsCMS 1-Nanocarriern. Dies zeigt, dass der durch die DBPO-Vorbehandlung erzeugte oxidative Stress in der Haut keine Auswirkung auf die oxidationssensitiven Nanocarrier (osCMS 2b) im Vergleich zu den reduktionssensitiven Nanocarriern (rsCMS 1) hat.

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

Tabelle 4.11: Relativer Anteil des Rapamycins zur maximalen detektierten Masse für die mit DBPO behandelten Proben in HEC Gel

Rapamycin		ohne Vorbehandlung		mit DBPO
10 Minuten	(a)	-	(d)	-
100 Minuten	(b)	(45±7)%	(e)	(55±8)%
1000 Minuten	(c)	(50±7)%	(f)	(68±10)%
5 Tage			(g)	(100±15)%

Ein Abbau der oxidationssensitiven osCMS 2b-Nanocarrier konnte unter den vorliegenden, durch DBPO verursachten oxidativen Bedingungen der Haut nicht beobachtet werden. Eine Freisetzung des Wirkstoffs aus den Nanocarriern konnte für beide Sorten (rsCMS 1 und osCMS 2b) unabhängig von den Umgebungsbedingungen beobachtet werden. Dies deutet auf eine rein diffusionsgetriebene Freisetzung des Wirkstoffs oder eine Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den CMS-Nanocarriern und den Lipiden des Stratum Corneums hin, nicht jedoch auf eine redoxbedingte Polaritätsänderung der Nanocarrier. Hierbei ist eine starke Wechselwirkung zwischen CMS-Nanocarriern und Lipiden, bei der sich Ketten des Nanocarrier ablösen, ein aus der Literatur angenommenes Szenario [193]. Ursachen für das nicht-vorhandene Auslösen des Triggers (vgl. Kapitel 1.3.2) können hierfür neben den zu schwachen Redoxzuständen innerhalb der Haut [201, 202], welche durch die Oxidation durch DBPO erreicht werden können, auch die nach außen mit über 50 Atomen je Kette abgeschirmten redoxsensitiven Gruppen der Nanocarrier sein [27, 28], welche aufgrund sterischer Hinderung möglicherweise gar nicht oder nur schwach mit der Umgebung wechselwirken können.

Die Übersichtsmessungen wurden mit einem Punktabstand von 250 nm bzw. von 150 nm gemessen. Um die Verteilung der Nanocarrier innerhalb der Lipidkanäle des Stratum Corneums genauer beurteilen zu können, wurden dort Messungen im Stratum Corneum mit einem Punktabstand von 75 nm wiederholt. Die Messungen nach einer Behandlung von 100 Minuten sind in Abbildung 4.32 gezeigt. Probe (a) wurde nicht mit DBPO vorbehandelt, Probe (b) wurde für 16 Stunden mit DBPO vorbehandelt. Im oberen Bereich der Abbildung ist jeweils die Transmissionsintensität bei 532.0 eV gezeigt, welche einen starken Kontrast zwischen Lipiden (hell) und Corneocyten (dunkel) ermöglicht. Das Stratum Corneum befindet sich innerhalb der gestrichelten Linien und ist mit SC gekennzeichnet. Die Probenoberfläche befindet sich rechts. Bei Probe (a) sind Teile des Stratum Corneums auf der rechten Seite der Abbildung durch die Behandlung aufgeschwemmt und abgelöst.

Aus der Literatur ist durch ortsaufgelöste Fluoreszenzlebensdauermessungen (FLIM) bekannt, dass der Transport entweder über die Lipid- oder Proteinstrukturen des Stra-

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

tum Corneums stattfindet [191]. Aus Verteilungen einer Singulärwertzerlegung für die Nanocarrier, welche unter ① auf die Transmissionsintensität gelegt dargestellt ist, kann in hoher Auflösung und ohne die Nutzung eines Labels gezeigt werden, dass sich die Nanocarrier in den aufgeschwemmten Regionen von (a) innerhalb der Lipidschichten befinden. In den intakten Regionen von (a) und der gesamten Probe von (b) lassen sich die Nanocarrier am Übergang von Lipiden zu Corneocyten detektieren. Diese Positionierung der Nanocarrier an den Membranen der Corneocyten erklärt auch das Eindringen des Wirkstoffs ohne DBPO-Vorbehandlung in Abbildung 4.31 (c), da durch die Anlagerung der Nanocarrier die Membranen offenbar geschwächt und für Rapamycin durchlässig werden können. Untersuchungen aus der Literatur haben im Gegensatz zu den vorliegenden Beobachtungen für andere CMS-Nanocarrier eine Anreicherung innerhalb der Lipidkanäle zwischen den Corneocyten gezeigt [149]. Aus den gezeigten Untersuchungen geht aber nicht hervor, ob die Öffnung der Membranen ein irreversibler Zustand ist oder durch den Abtransport die Nanocarrier die Membranen wieder geschlossen werden.

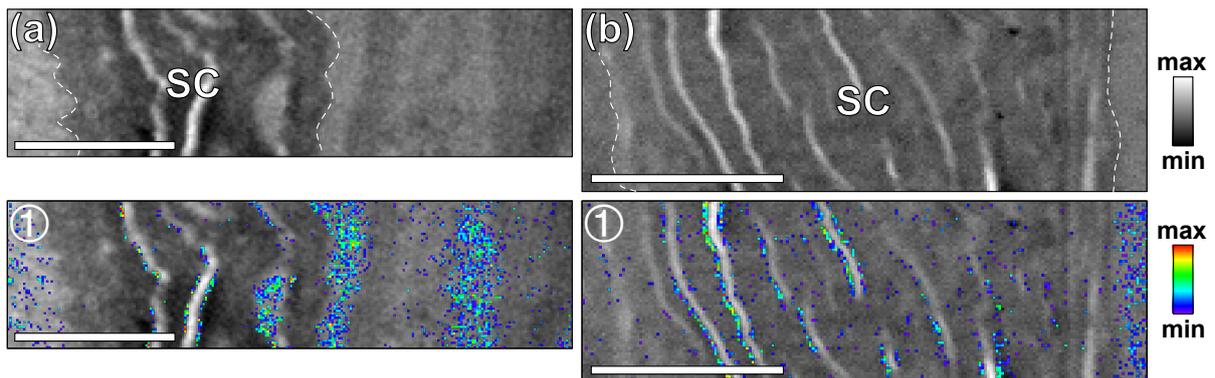


Abbildung 4.32: Mit Rapamycin beladener osCMS 2b-Nanocarrier HEC-Gel-Formulierung für 100 Minuten behandelte Haut, (a) ohne Vorbehandlung, (b) DBPO Vorbehandlung, oben die Transmissionsintensität bei 532.0 eV, ① die Verteilungen aus einer Singulärwertzerlegung für die Nanocarrier, die Länge des Maßstabes beträgt 5 µm.

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

Wie in Kapitel 4.4.1 konnten die Nanocarrier und der Wirkstoff unabhängig voneinander ohne Nutzung eines Labels orts aufgelöst mittels Röntgenmikroskopie unter Nutzung von durchstimmbarer weicher Röntgenstrahlung nach O 1s-Anregung nachgewiesen werden. Hierbei hatte die Vorbehandlung mit DBPO bei beiden Nanocarriern keinen Einfluss auf den Transport durch das Stratum Corneum. Die Nanocarrier werden vergleichbar zu den osCMS 2b Nanocarriern aus Kapitel 4.4.1 nur über die Lipide transportiert.

Die aus der Literatur bekannte Beschädigung des Stratum Corneums durch DBPO [205] ermöglicht eine Aufnahme des Wirkstoffs durch die Membranen in die Corneocyten, welcher vom Resultat mit den Effekten der Serinprotease Trypsin aus Kapitel 4.3.1 und Kapitel 4.4.1 vergleichbar ist. Diese Beschädigung reicht nicht aus, damit die Corneocytenmembranen für Teilchen im Nanometerbereich, wie z.B. die vorliegenden rsCMS 1- und osCMS 2b-Nanocarrier, durchlässig zu werden. Bei Behandlungen über 5 Tage konnte der Transport beider Nanocarrier in die viable Epidermis beobachtet werden. Ursache kann sowohl eine Schädigung der die Zonula occludens (engl. Tight Junctions) des Stratum Granulosums durch die Vorbehandlung mit DBPO als auch die Interaktion der lipophilen Nanocarrier jeweils einzeln oder zusammen sein. Der Transport der Nanopartikel in die viable Epidermis und die Bildung eines Rapamycin-Reservoirs im Stratum Corneum unterstützen beide die Annahme, dass die verwendeten CMS-Nanocarrier den Transport von Rapamycin in der Haut für therapeutische Anwendungen unterstützen.

Bei einigen mit DBPO-unbehandelten Proben ließ sich beobachten, dass die Membranen durch eine Wechselwirkung mit den Nanocarriern ebenfalls für den Wirkstoff durchlässig werden konnten. Ursache hierfür konnte in zwei hochaufgelösten Messungen gezeigt werden: Die Nanocarrier lagern sich am Übergang zwischen Lipiden und Corneocyten an und könnten so die Corneocytenmembranen durchlässig machen.

4.5 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel wurden die Ergebnisse von labelfreien Untersuchungen an mit dem Wirkstoff Rapamycin behandelter Humanhaut mithilfe von Röntgenmikroskopie an der O 1s-Kante und mithilfe von hyperspektralen AFM-IR-Messungen vorgestellt. Die Messungen wurden nach dem Lambert-Beer-Gesetz und mit einer numerischen Singulärwertzerlegung ausgewertet.

Bei der Untersuchung der unbehandelten Referenzprobe konnte gezeigt werden, dass tiefe Corneocyten sauerstoffdoppelbindungsreicher und -einzelbindungsärmer als äußere Corneocyten sind. Nach einer Vorbehandlung der Haut mit Serinprotease oder DBPO nimmt die relative Menge der Sauerstoff-Doppelbindungen im Verhältnis zu den Sauerstoff-Einzelbindungen ab.

Bei den Untersuchungen wurden Formulierungen mit Vaseline und Ethanol untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Vaseline zu einem Wirkstofftransport in das obere Stratum Corneum führt. Als mögliche Ursache wird die aus der Literatur bekannte Kombination aus Transport von Vaseline in das Stratum Corneum [89, 90, 176, 177] und eine Beschädigung der Corneozytmembranen beim Aufquellen durch Okklusion angenommen [26]. Das untere Stratum Corneum bleibt unzugänglich, da ein Aufquellen durch einen Abtransport des Wassers in die viable Epidermis verhindert wird. Die Behandlung mit Ethanol konnte den Wirkstoff nicht in die Haut transportieren: Ethanol kann die Löslichkeit der Wirkstoffe im Gewebe der Haut verbessern und erzeugt durch Verdampfung in die Umgebung einen Diffusionsdruck [94]. Die Corneocytenmembranen werden jedoch nicht beschädigt und damit wird kein transzellulärer Transport ermöglicht.

Wirkstoffaufnahme unter Nutzung einer HEC-Gel-Formulierung konnte erst nach einer Vorbehandlung durch die Serinprotease ermöglicht werden. Die Konzentrationen entsprachen hierbei Mengen, die bei Entzündungen in der Haut nachgewiesen werden konnten. Die zeitabhängigen Untersuchungen haben gezeigt, dass schon kurze Einwirkzeiten (2 Stunden) der Serinprotease Trypsin zu einer Aufnahme des Wirkstoffs ins Stratum Corneum führen und die abschließende Struktur zwischen Stratum Corneum und viable Epidermis, das Stratum Granulosum, erst nach 16 Stunden durchlässig wurde. Bei der Verteilung des Wirkstoffs scheint die Formulierung auch in diesem Fall eine Rolle zu spielen: Die Nutzung von HEC-Gel führt zu mehr Wirkstoff in den Corneocyten als in den Lipiden. Die Nutzung von Vaseline zeigte hierbei eine zeitabhängige Aufnahme des Wirkstoffs, welcher durch eine Kombination aus Okklusion und Transport der Vaseline in das Stratum Corneum erklärt werden kann.

Anhand einer Kryoprobe, welche ebenfalls mit Serinprotease vorbehandelt wurde, konnte gezeigt werden, dass der Nachweis des Wirkstoffs Rapamycin auch mit AFM-IR

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

möglich ist. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die für die Röntgenmikroskopie benötigte Fixierung und Einbettung keinen Einfluss auf die Verteilung des Wirkstoffs hat, da die Kryoprobe ebenfalls eine vergleichbare Verteilung und ein Eindringen des Wirkstoffs in die viable Epidermis zeigt.

Ein Transport des Wirkstoffs in die Corneocyten wurde nach der Vorbehandlung der Haut mit DBPO beobachtet: Die Membranen werden für den Wirkstoff durchlässig.

Untersuchungen von Proben, die mit den oxidationssensitiven Nanocarriern osCMS 2b behandelt wurden, konnten zeigen, dass die Nanocarrier das Rapamycin in das Stratum Corneum transportieren können.

Ebenso konnte bei einer Probe, welche mit den Nanocarriern osCMS 2b behandelt wurde, eine Aufnahme des Wirkstoffs in die Corneocyten beobachtet werden. Ursache könnte hierbei eine Wechselwirkung zwischen Nanocarrier und Membranen sein, worauf aufgrund der Beobachtung bei Messungen mit hoher Ortsauflösung zu schließen ist.

Die reduktionssensitiven Nanocarrier rsCMS 1 konnten in einigen Proben den Wirkstoff Rapamycin ebenfalls in das Stratum Corneum transportieren. In einem Proben-system konnten die Nanocarrier nur in Mengen in die Haut transportiert werden, welche sich unterhalb der Nachweisgrenze befindet. Als Ursache wird eine vorliegende Aggregation der Nanocarrier oder eine zu große Partikelgröße angenommen, die ein Eindringen aufgrund der vorliegenden Größe der Agglomerate verhindert hat. An zwei unterschiedlichen Proben konnte gezeigt werden, dass das Reduktionspotential der gesunden Haut nicht ausreicht, um die Nanocarrier abzubauen. Vorbehandlungen mit DBPO, die den oxidativen Stress der Haut erhöhen, wirken sich nicht auf die Beständigkeit der Nanocarrier rsCMS 1 aus.

Beide Nanocarrier wurden nach der Behandlung der Haut mit Serinprotease und DBPO nur in den Lipiden des Stratum Corneums vorgefunden. Dies bedeutet, dass die Beschädigung der Membranen durch Trypsin und DBPO nicht die Barrierefunktion gegenüber den Nanocarriern beeinträchtigt.

Beide untersuchten Arten von CMS-Nanocarrier haben sich im Stratum Corneum angereichert. Für andere Arten von CMS-Nanocarriern [149, 194, 197] ist dieses Verhalten ebenfalls bekannt. Erst nach einer sehr langen Einwirkzeit von 5 Tagen oder bei beschädigtem Stratum Corneum konnte eine Anreicherung beider untersuchter Nanocarrier in der viablen Epidermis beobachtet werden. Diese reicherten sich an den Membranen der Zellkerne der Keratinozyten an. Ursache hierfür könnte die starke Lipophilie beider Nanocarrier sein.

Hochaufgelöste Röntgenmikroskopie-Messungen haben gezeigt, dass die osCMS 2b-Nanocarrier sich in intakten Lipidlamellen am Übergang zu den Corneocytenmembranen angereichert haben.

4 Untersuchungen von topisch-behandelter Haut

Es konnte gezeigt werden, dass Wirkstoff und Nanocarrier orts aufgelöst jeweils einzeln in einer komplexen biologischen Probe ohne die Verwendung eines Labels mithilfe von STXM im weichen Röntgenbereich mit einer Ortsauflösung bis zu 75 nm nachgewiesen werden kann, auch wenn die spektroskopischen Unterschiede zwischen den spezifischen spektroskopischen Signaturen gering sind. Die gezeigten Ergebnisse können als Grundstein dienen, um in Zukunft zum einen die Behandlung durch einen kontrollierten Transport und eine zielgerichtete Freisetzung des Wirkstoffs zu verbessern und um zum anderen den betrachteten Wirkstoff oder die zu untersuchende biologische Probe zu variieren.

Die durchgeführten Untersuchungen stellen einen Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen mit anderen Wirkstoffen und anderen Vorbehandlungen dar. So können zukünftig die Regionen der viablen Epidermis und der Dermis von Proben untersucht werden, bei denen die Wirkstoffaufnahme nicht durch das Stratum Corneum blockiert wird (z.B. durch physische Beschädigung, Tape-Stripping, Unterspritzen oder die Nutzung von Mikronadeln). Hierbei könnten Aussagen über die Wirkstoff- und ggf. die Nanocarrierverteilung getroffen werden. Bei der Nutzung von Nanocarriern, welche durch Stimuli in der Haut sich zersetzen könnten, könnte auf Basis von Messungen des reinen Zerfallsprodukt auch eine Verteilung der Abbauprodukte in der Haut untersucht werden.

Die Detektionsmöglichkeit des Wirkstoffs Rapamycin mithilfe von AFM-IR in Kryohautproben kann zur Untersuchung des Einflusses weiterer Formulierungen (z.B. DMSO) auf intakte Haut und zeitabhängige bzw. auftragungsmengenabhängige Hautproben mit und ohne Vorbehandlung genutzt werden. Ebenso könnte die Verteilung der Nanocarrier innerhalb der Lipidschichten mit einer im Vergleich zur Röntgenmikroskopie höheren Auflösung im Nanoskopischen untersucht werden.

Die Ortsauflösung von AFM-IR-Messungen ist von der Fläche der AFM-Spitze abhängig. Durch die Wahl unterschiedlich breiter Spitzen könnten so in Zukunft Messungen mit unterschiedlicher Ortsauflösung für Übersichtsmessungen und Messungen kleiner Regionen gewählt werden. Dies würde zum einen ein effizientes Auffinden von wirkstoffhaltigen Regionen und zum anderen eine hohe Ortsauflösung in diesen Regionen ermöglichen.

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

Im Rahmen dieses Kapitels werden Schnitte eines Modells aus SCC-25-Tumorzellen und Rinderkollagenen untersucht. Das Ziel der Untersuchungen ist die ortsabhängige Detektion des jeweils aufgetragenen Wirkstoffs. Die Detektion basiert auf einer Singulärwertzerlegung der behandelten Probe auf Basis vorgegebener Referenzspektren. Hierfür werden die dafür benötigten AFM-IR-Spektren aus den Messungen der Einzelsubstanzen gewonnen. Als Alternative werden die benötigten Spektren mit einer Singulärwertzerlegung einer Zellreferenzmessung erzeugt. Beide Methoden werden in Rahmen dieses Kapitels miteinander verglichen.

Ein Wirkstoff ist Cetuximab, ein chimärer monoklonaler Antikörper [29] mit einer Molekülmasse von 152 kDa [128]. Hierbei werden zwei Proben verglichen, bei denen jeweils der Wirkstoff unterschiedlich appliziert wurde: topisch über die SCC-25-Zellen bzw. systemisch über das Nährmedium auf der Kollagenseite. Aus vergangenen Untersuchungen mittels Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie (FLIM) ist bekannt, dass sich der Wirkstoff mit beiden Applikationen in einem dreidimensionalen Modell nachweisen ließ [7]. In 2-dimensionalen Modellen hatte sich bei FLIM-Messungen eine Anreicherung an den Membranen gezeigt.

Der andere Wirkstoff, welcher betrachtet wird, ist Docetaxel. Es handelt sich um einen 808 Da antineoplastischen Wirkstoff, welcher in der Krebstherapie zum Einsatz kommt [31, 32, 33]. Der Einfluss des Wirkstoffs auf die dreidimensionalen Modelle ist sowohl durch den in der optischen Mikroskopie sichtbaren Zerfall der SCC-25-Zellen nachweisbar als auch durch die in Fluoreszenzmikroskopie beobachteten Zunahme des Laminin-V und Abnahme des HIF-1 α [7]. Die Verteilung des Wirkstoffs wird im Folgenden auf Basis der intensiven C=O-Doppelpbindungsschwingung betrachtet werden.

5.1 AFM-IR-Spektren der Referenzspektren

Im Folgenden werden die Spektren der verwendeten Reinsubstanzen gezeigt, welche als Grundlage zur Detektion der einzelnen Bestandteile dienen.

In Abbildung 5.1 ist unter (b) das Spektrum des Wirkstoffs Cetuximab dargestellt. Hierbei ist in Rot das gemessene Spektrum und in Blau die Fit-Funktion einer Gaußentfaltung gezeigt. Die einzelnen Gaußfunktionen sind unter (c) und die Differenz zwischen gemessenem Spektrum und Fitfunktion unter (a) dargestellt.

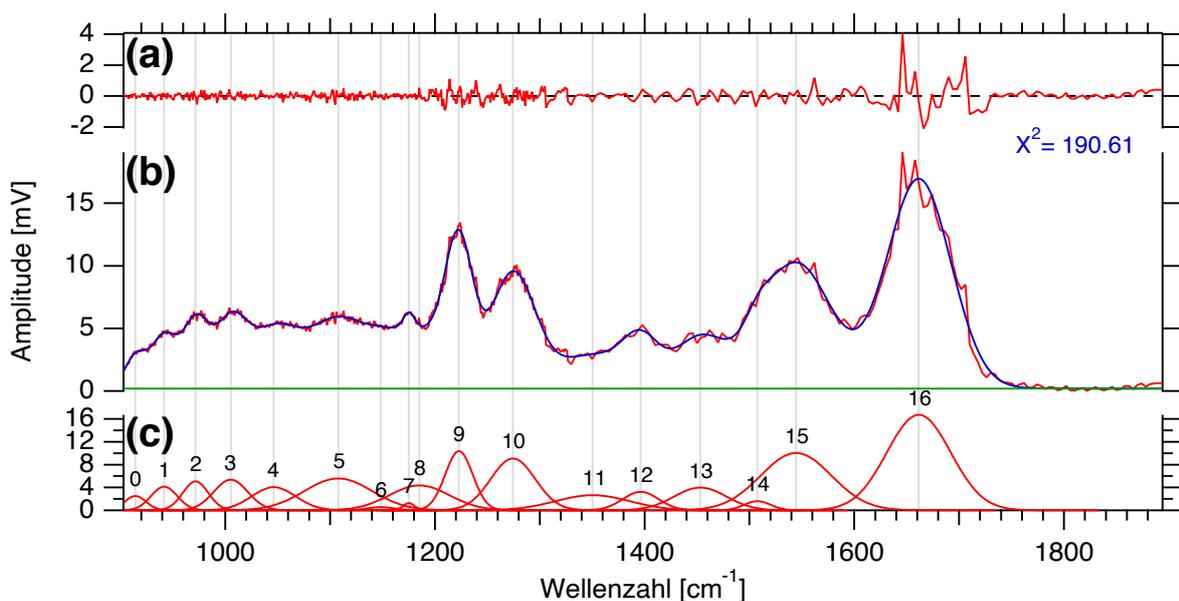


Abbildung 5.1: Entfaltung des AFM-IR-Spektrums des reinen Cetuximabs von 906 cm⁻¹ bis 1880 cm⁻¹, (a) Differenz aus Fit und Spektrum, (b) rot: experimentelles Spektrum, blau: Fit auf Basis der Gaußfunktionen aus (c).

Die durch den Multi-Peak-Fit berechneten Parameter sind in Tabelle 5.1 dargestellt. Im Bereich des hochenergetischen Lasers (1300 cm⁻¹ bis 1900 cm⁻¹) haben die Signale bei 1662 cm⁻¹ (Amid-I) und 1544 cm⁻¹ (Amid-II) die höchste Intensität. Im Bereich des niedrig-energetischen Lasers (900 cm⁻¹ bis 1300 cm⁻¹) sind die höchsten Intensitäten bei 1223 cm⁻¹ (Histidin, $\delta(\text{CH})$, $\nu(\text{C-N})$, $\delta(\text{NH})$) und 1274 cm⁻¹ (Tyrosin-OH $\nu(\text{C-O})$, $\nu(\text{C-C})$) zu finden. Diese beiden Signale werden im Folgenden zur Detektion des Wirkstoffs genutzt. Die Zuordnung erfolgte nach A. Barth [213, 214] unter Berücksichtigung der Resultate von Dubois et al. [215].

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

Tabelle 5.1: Informationen zu Signalen der Entfaltung des Cetuximab-Referenzspektrums

Signal	Position [cm ⁻¹]	Amplitude [willk. E.]	FWHM [cm ⁻¹]	Zuordnung Literatur [213, 214, 215]
0	914 ± 5	2.5 ± 0.8	24 ± 8	Thr, δ(COOH)
1	942 ± 3	4.1 ± 0.7	29 ± 14	Ser, ν(CO), δ(COOH)
2	972 ± 3	5.1 ± 1.6	28 ± 9	Ser, ν(CO), ν(CC)
3	1005 ± 4	5.4 ± 2.0	38 ± 14	Trp, ν(CC), δ(CH)
4	1046 ± 7	4.0 ± 3.8	49 ± 32	Thr, ν(C-O)
5	1108 ± 22	5.6 ± 2.0	75 ± 83	His, ν(CN), δ(CH)
6	1148 ± 28	0.5 ± 4.8	31 ± 81	Asp, Glu, ν(C-O)
7	1175 ± 1	1.3 ± 0.8	13 ± 6	Tyr-OH, δ(COH)
8	1185 ± 32	4.4 ± 2.8	67 ± 140	Tyr-OH, δ(COH)
9	1223 ± 1	10.4 ± 5.6	31 ± 5	His, δ(CH), ν(CC)
10	1274 ± 2	9.1 ± 1.4	50 ± 8	Trp, δ(NH), δ(CH), ν(CN)
11	1350 ± 17	2.6 ± 0.3	83 ± 74	Trp
12	1396 ± 2	3.2 ± 2.3	40 ± 10	Glu, ν(COO ⁻ , sym)
13	1453 ± 3	4.0 ± 0.4	59 ± 6	δ(CH), ν(CC), ν(CN)
14	1508 ± 2	1.6 ± 0.5	30 ± 7	δ(CH ₃ , asym.)
15	1544 ± 2	10.0 ± 0.1	79 ± 3	Glu, ν(COO ⁻ , asym)
16	1662 ± 1	16.7 ± 0.1	72 ± 1	Gln, ν(C=O)

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

Die Gaußentfaltung des AFM-IR-Spektrums des reinen Docetaxel ist in Abbildung 5.2 dargestellt und die zugehörigen Parameter in Tabelle 5.2 gezeigt. Die Banden von 1717 bis 1798 cm^{-1} können einer C=O-Doppelbindungsschwingung zugeordnet werden [216], die weiteren Banden sind auf Basis einer quantenmechanischen Simulation (HF TZVP) [56, 57] zugeordnet. Schwingungen unterhalb von 1300 cm^{-1} sind den unterschiedlichen Gerüstschwingungen zuzuordnen.

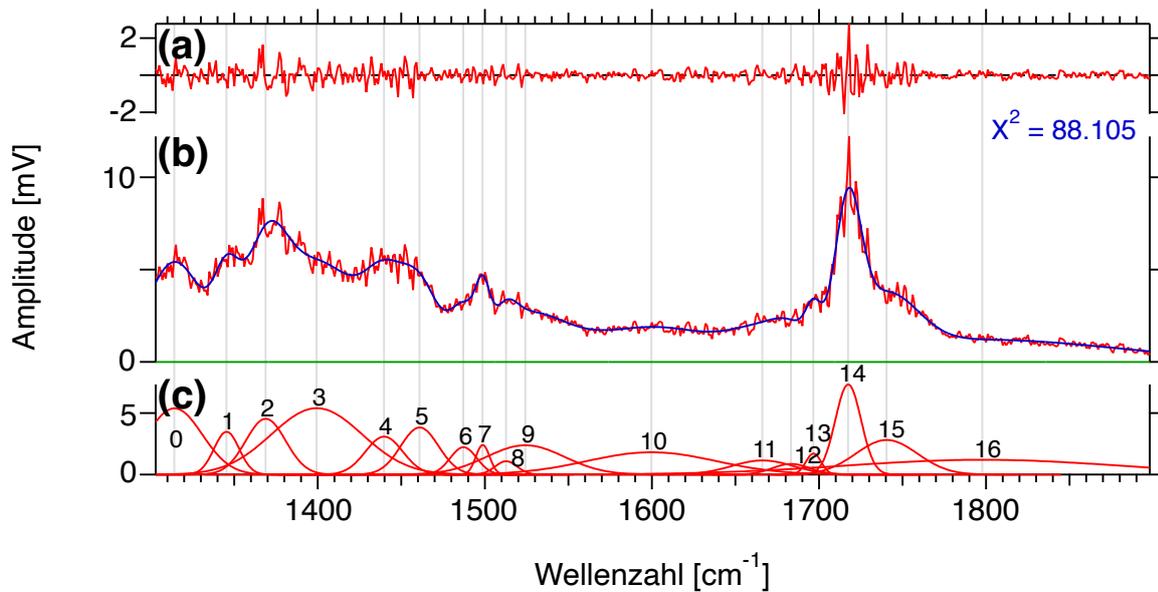


Abbildung 5.2: Entfaltung des AFM-IR-Spektrums des reinen Docetaxels von 1303 cm^{-1} bis 1880 cm^{-1} , (a) Differenz aus Fit und Spektrum, (b) rot: experimentelles Spektrum, blau: Fit auf Basis der Gaußfunktionen aus (c).

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

Tabelle 5.2: Informationen zu Signalen der Entfaltung des Spektrums des Docetaxels

Signal	Position [cm ⁻¹]	Amplitude [willk. E.]	FWHM [cm ⁻¹]	Zuordnung [56, 57]
0	1314 ± 4	5.4 ± 0.7	39 ± 10	δ(CH ₃), δ(CH ₂)
1	1345 ± 1	3 ± 2	18 ± 3	δ(C-O-H)
2	1369 ± 3	4 ± 9	28 ± 16	δ(CH ₃), δ(CH ₂)
3	1399 ± 21	5 ± 1	64 ± 113	δ(CH ₃), δ(CH ₂), δ(Phenyl-H)
4	1440 ± 19	3 ± 9	26 ± 31	δ(Phenyl), δ(CH ₃), δ(CH ₂)
5	1461 ± 16	4 ± 3	27 ± 27	δ(CH ₃)
6	1487 ± 4	2 ± 3	19 ± 17	δ(C ₂ N-H)
7	1499 ± 1	2 ± 2	10 ± 3	δ(C ₂ N-H)
8	1513 ± 5	1 ± 2	16 ± 14	v(Phenyl)
9	1524 ± 18	2 ± 2	55 ± 59	v(Phenyl)
10	1600 ± 12	1.8 ± 0.2	91 ± 130	v(Phenyl)
11	1666 ± 132	1 ± 7	43 ± 165	v(C=C)
12	1683 ± 11	1 ± 11	27 ± 96	Amid I
13	1697 ± 1	2 ± 1	11 ± 4	v(C=O) (Carbonyl)
14	1717 ± 1	7 ± 1	18 ± 1	v(C=O) (Carbonyl)
15	1740 ± 4	2.8 ± 0.5	43 ± 8	v(C=O) (Carbonyl)
16	1798 ± 31	1.2 ± 0.1	194 ± 67	v(C=O) (Ester)

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

Bei der verwendeten Phosphatpufferlösung handelt es sich um eine wässrige Lösung, welche NaCl (0.14 M), KCl (0.0027 M) und Phosphat (0.010 M) enthält [217]. Die einzelnen Banden aus Abbildung 5.3 des AFM-IR-Spektrums der getrockneten PBS-Lösung sind in Tabelle 5.3 zugeordnet.

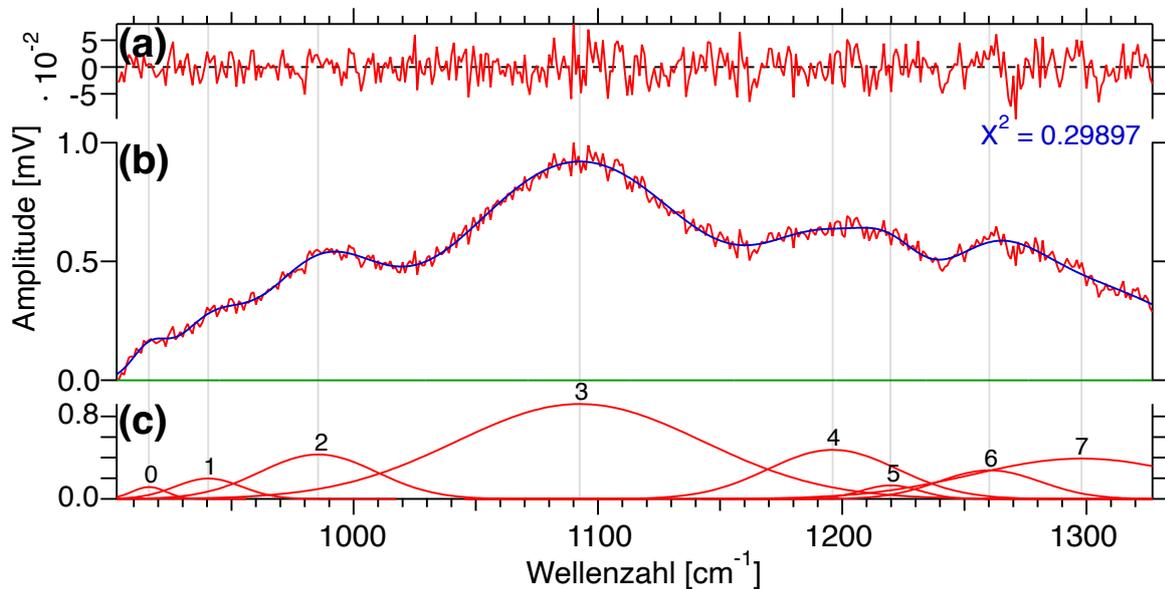


Abbildung 5.3: Entfaltung des AFM-IR-Spektrums des kristallinen Phosphat-Puffer-Systems (PBS) von 906 cm^{-1} bis 1327 cm^{-1} , (a) Differenz aus Fit und Spektrum, (b) rot: experimentelles Spektrum, blau: Fit auf Basis der Gaußfunktionen aus (c).

Tabelle 5.3: Informationen zu Signalen der Entfaltung des kristallinen PBS-Referenzspektrums aus Abbildung 5.3

Signal	Position [cm^{-1}]	Amplitude [willk. E.]	FWHM [cm^{-1}]	Zuordnung Literatur [218]
0	916 ± 1	0.10 ± 0.02	17 ± 3	$\text{Hal}_3^+\text{PO}_4^{3-}$
1	940 ± 1	0.20 ± 0.02	32 ± 5	$\text{Hal}_3^+\text{PO}_4^{3-}$
2	985 ± 1	0.40 ± 0.01	56 ± 3	$\text{Hal}_3^+\text{PO}_4^{3-}$
3	1093 ± 1	0.90 ± 0.01	118 ± 3	$\text{Hal}_3^+\text{PO}_4^{3-}$
4	1196 ± 18	0.5 ± 0.5	63 ± 16	$\text{Hal}_3^+\text{PO}_4^{3-}$
5	1220 ± 2	0.1 ± 0.1	28 ± 10	$\text{Hal}_3^+\text{PO}_4^{3-}$
6	1260 ± 13	0.3 ± 1.3	49 ± 57	NaCl
7	1298 ± 135	0.4 ± 0.4	105 ± 249	NaCl

5.2 Nachweis von Cetuximab

5.2.1 Verteilung der Referenzkomponenten in unbehandelten SCC-25-Referenzzellen

Die AFM-IR-Referenzspektren sind in Abbildung 5.4 als Amplitude gegen die Wellenzahl dargestellt. Spektrum (a) ist vom kristallinen Wirkstoff Cetuximab, (b) und (c) sind regionale Durchschnittsspektren der SCC-25-Referenzprobe, um die spektrale Variation innerhalb der Zellen abzubilden. Das Spektrum des PBS ist als (d), das polyethylenglycol-haltige Kryomedium als (e) und das des Siliciumträgermaterials als (f) dargestellt. Die Spektren (a) und (d) werden im Kapitel 5.1 genauer betrachtet, im Folgenden soll die örtliche Verteilung der einzelnen Referenzen auf der Referenzprobe betrachtet werden.

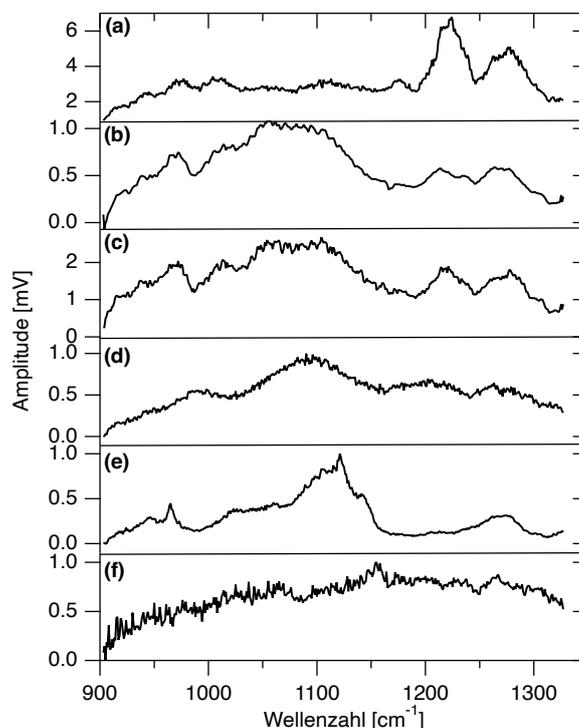


Abbildung 5.4: AFM-IR Referenzspektren: (a) reines Cetuximab, (b) und (c) Referenzspektren der SCC-25-Zellen, Spektren des PBS (d), des Kryomediums (e) und des Siliciumträgers (f).

Hierzu wurde von einer Referenzzelle eine Singulärwertzerlegung mit den gezeigten Referenzspektren durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.5 gezeigt: (a) zeigt die relative Höhenverteilung der Probe aus der AFM-Messung, welche zeitgleich zur hyperspektralen Messung durchgeführt wurde. Insgesamt sind Teilzellen zu erkennen: In der unteren Hälfte zwei, in der oberen Hälfte drei. Die schwarzen Bereiche sind Risse innerhalb der Probe, welche die Folge des Trocknungsprozesses sind. Unter (b)

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

und (c) sind die Verteilungen der beiden Referenzspektren der SCC-25-Probe, dem biologischen Medium, dargestellt. Sie zeigen Ähnlichkeiten mit der Höhenverteilung (a), denn in dickeren Regionen zeigt eine der beiden Verteilungen hohe Werte. Hierbei wird ein Großteil der gemessenen Fläche durch (b) wiedergegeben, hohe Werte bei (c) sind vor allem in der oberen rechten Zelle zu finden. Ursache hierfür ist die Änderung der chemischen Zusammensetzung innerhalb der Probe. PBS (d) zeigt eine diffuse Verteilung, d.h. es verteilt sich über den gesamten Zellbereich, und das Kryomedium (e) ist vor allem in Regionen am Rand der Zellstrukturen zu finden. In diesen Regionen zeigt meist auch (c) hohe Intensitäten. Silicium (f) zeigt hohe Intensitäten in dünnen Regionen und in die Regionen der Risse. Dies hat die Ursache, dass entlang der Probendicke die Volumenänderungen des gesamten Teils der angeregten Sphäre unterhalb der AFM-Spitze detektiert wird und so an dünnen Regionen auch die photothermische Expansion des Trägermaterials detektiert werden kann.

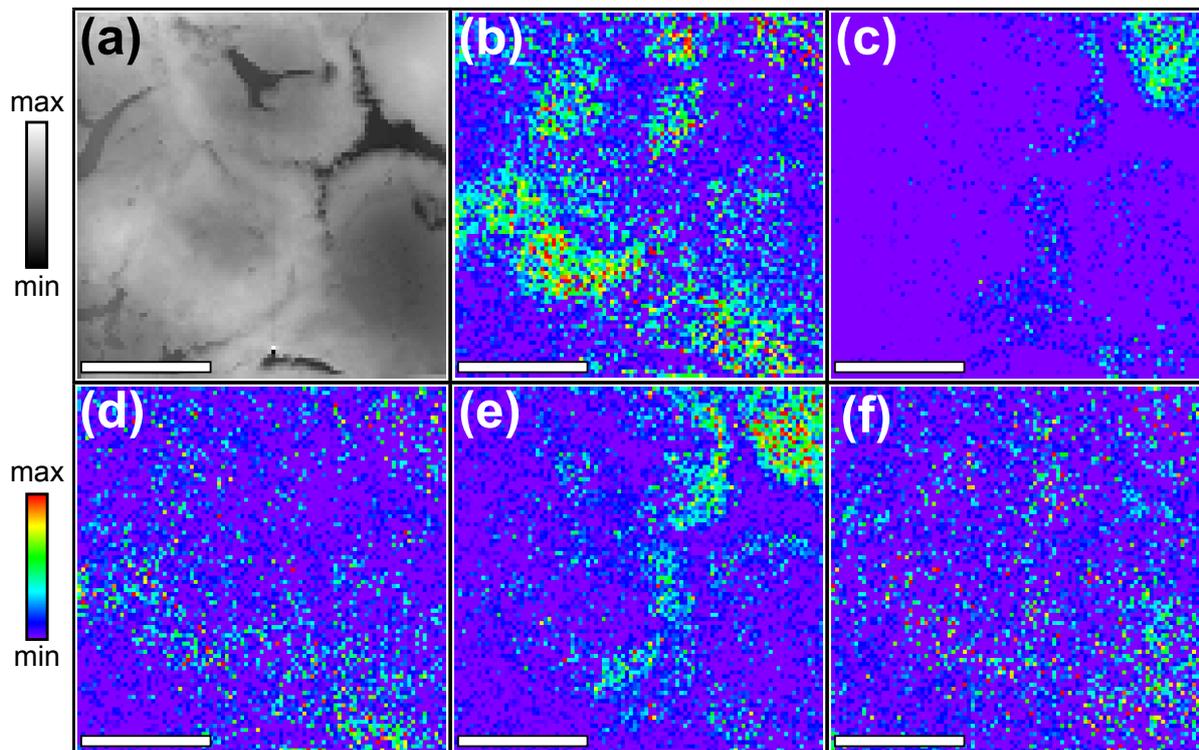


Abbildung 5.5: Ortsaufgelöste Anteile der Referenzspektren aus einer Singulärwertzerlegung im Wellenzahlbereich 1190 bis 1320 cm^{-1} einer beispielhaften Referenzregion, (a) zeigt die Probendicke auf einer relativen Skala, (b) und (c) die Anteile der SCC-25-Referenzspektren, (d) Verteilung des PBS, (e) des Kryomediums und (f) des Siliciumsubstrats, die Länge des Maßstabes beträgt $10\text{ }\mu\text{m}$.

Auf Basis der Spektren aus Abbildung 5.4 wurde eine Singulärwertzerlegung zweier unbehandelter Regionen für den spektralen Bereich 1190 bis 1310 cm^{-1} durchgeführt. In diesem Bereich unterscheidet sich das Spektrum von Cetuximab maximal von de-

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

nen der biologischen Referenz (vgl. Abbildung 5.4). Die Wirkstoffverteilung von Cetuximab ist in Abbildung 5.6 dargestellt. Für beide Referenzbereiche (a) und (b) wird kein Wirkstoff (①) durch Querempfindlichkeiten oberhalb des Grenzwertes 0.2 detektiert. Dieser dient im Folgenden bei der Darstellung der Wirkstoffverteilung von behandelten Proben als willkürlich gesetzter Nullpunkt.

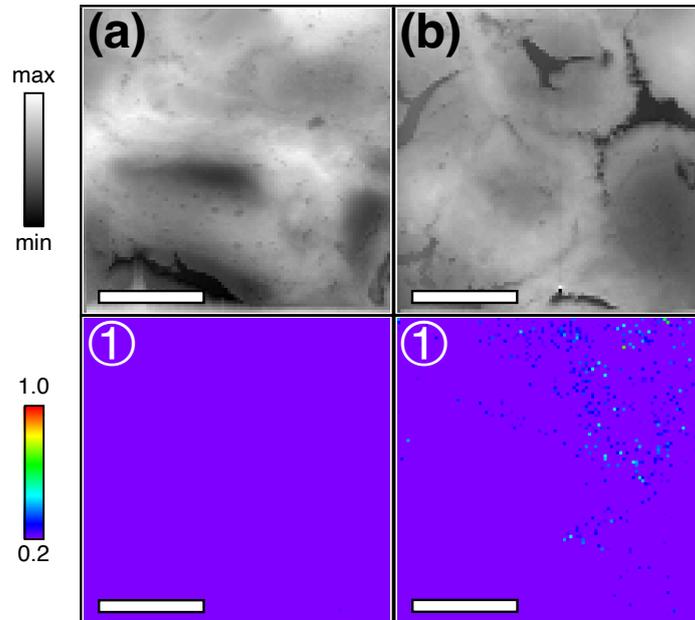


Abbildung 5.6: Singulärwertzerlegung von SCC-25-Referenzzellen, Zelle (a) und (b) mit relative Probendicke, unter ① die Verteilung des Wirkstoffs Cetuximab, die Länge des Maßstabes beträgt 10 μm .

Die für den Kollagenbereich genutzten Referenzen sind in Abbildung 5.7 dargestellt. Diese Region ist bei den systemisch behandelten Proben der Kontaktpunkt zum Wirkstoff. Sie unterscheiden sich von den Referenzspektren des SCC-25-Bereichs nur um die AFM-IR-Spektren der biologischen Referenz. Das AFM-IR-Spektrum (a) entspricht dem Durchschnittsspektrum des beispielhaft gemessenen Kollagenbereichs und Spektrum (b) entspricht einem durchschnittlichen Spektrum der Bereiche, welche bei einer numerischen Singulärwertzerlegung fälschlicherweise als wirkstoffhaltig interpretiert wurden (Grenzwertanalyse). Vergleichbar zu den Spektren der SCC-25-Zellen unterscheiden sich beide Spektren im Vergleich zum untersuchten Cetuximab im spektralen Bereich von 1190 bis 1310 cm^{-1} (vgl. Abbildung 5.4), da sich das Verhältnis der beiden vorliegenden Signale genau umgekehrt verhält. Dies ist die Grundlage, um mithilfe einer Singulärwertzerlegung den Wirkstoff nachweisen zu können.

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

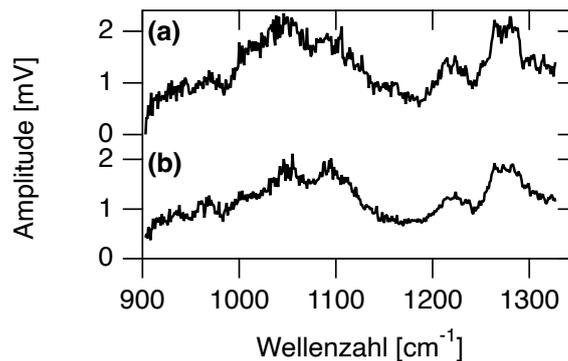


Abbildung 5.7: Referenzspektren: (a) durchschnittliches Spektrum der Probe aus Abbildung 5.5 und des durchschnittliches AFM-IR-Spektrums des oberen rechten Bereichs (vgl. Verteilung Abbildung 5.5 (c)).

In Abbildung 5.8 ist unter (a) die relative Höhenverteilung eines Kollagenbereichs der Referenzprobe dargestellt. Die Wirkstoffverteilung aus der numerischen Singulärwertzerlegung ist als ① gezeigt. Nach der vorliegenden Wahl der Referenzspektren kann, wie es bei einer Referenzprobe zu erwarten ist, nahezu kein Wirkstoff in der vorliegenden Referenzmessung detektiert werden. Bei Werten kleiner 0.2 kann auch für den Kollagenbereich nicht zwischen Querempfindlichkeit und Cetuximab unterschieden werden. Es zeigt sich somit, dass sich eine Singulärwertzerlegung auf Basis der vorliegenden Referenzspektren eignet, um den Wirkstoff Cetuximab im Kollagenbereich zu detektieren.

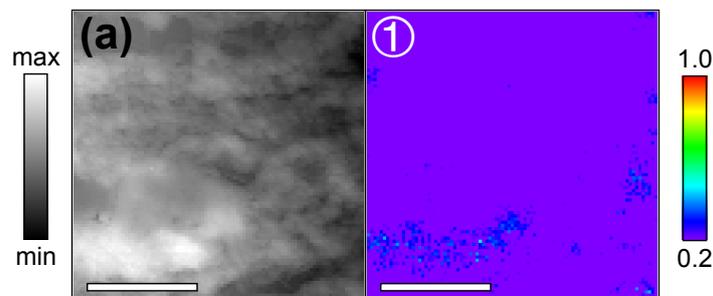


Abbildung 5.8: Singulärwertzerlegung des Kollagen-Referenzbereichs, relative Höhenverteilung (a) der hyperspektralen Messung, unter ① die Verteilung des Wirkstoffs Cetuximab, die Länge des Maßstabes beträgt 10 μm .

Die Quantifizierungsgrenze für die errechneten, einheitenlosen Faktoren aus der numerischen Singulärwertzerlegung des Wirkstoffs Cetuximab liegt im Bereich der SCC-25-Zellen für die in Abbildung 5.4 gezeigten Referenzspektren bei 0.2 und für den Kollagenbereich bei 0.37; die Detektionsgrenze liegt für die SCC-25-Zellen bei 0.07 und den Kollagenbereich bei 0.17 [164, 165]. Die Werte sind relativ von der Intensität des eingesetzten Cetuximab-Referenzspektrums abhängig.

5.2.2 Referenzspektren der SCC-25-Referenzzellen im Bereich 900 bis 1300 cm^{-1} mithilfe einer Matrix-Singulärwertzerlegung

Im Hinblick auf den Vergleich zwischen dem AFM-IR-Spektrum von Cetuximab ((a), Abbildung 5.9) und dem Differenzspektrum zwischen einer behandelten und unbehandelten Probe (b) zeigt sich, dass diese Differenz nicht nur dem reinen Cetuximab entspricht, sondern auch durch die unterschiedliche lokale Zusammensetzung biologischer Proben beeinflusst wird.

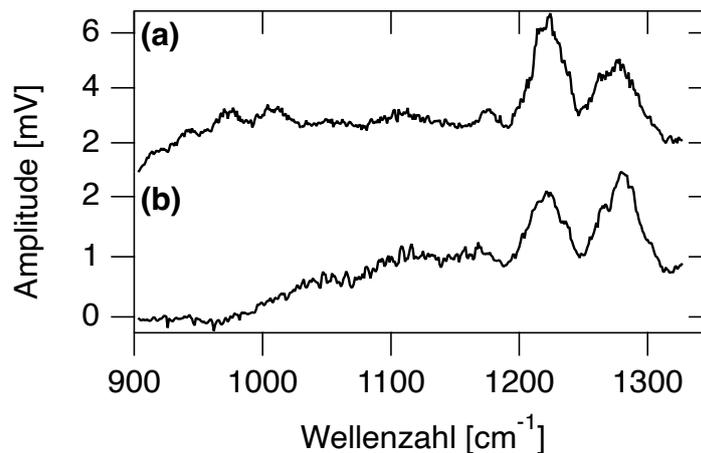


Abbildung 5.9: AFM-IR-Spektrum des (a) Cetuximabs und (b) der Differenz zwischen den AFM-IR-Spektren einer mit Cetuximab-behandelten Zelle und einer unbehandelten Referenzzelle.

Um diese Variation besser in den Spektren abbilden zu können, kann als Alternative zur Singulärwertzerlegung auf Basis bekannter Referenzspektren zum Nachweis des Wirkstoffs auch eine durch einen Algorithmus erzeugte Menge an Referenzspektren auf Basis einer hyperspektralen Messung einer unbehandelten Probe genutzt werden. Hierfür wurde eine Matrix-Singulärwertzerlegung aus Igor Pro auf eine Referenzzellmessung angewandt, d.h. aus einer Gruppe von n Spektren werden ein Durchschnittsspektrum und $n-1$ Differenzspektren gewonnen. Die gewonnenen Spektren werden von Igor Pro entsprechend ihres Anteils an den n Spektren sortiert. Die hierbei ermittelten Spektren sind in Abbildung 5.10 von (b) bis (l) dargestellt. Als Vergleich ist unter (a) das Spektrum des reinen Wirkstoffs Cetuximab gezeigt. Bei Spektrum (b) handelt es sich um das durchschnittliche Spektrum der Referenzprobe. Die Spektren (c) bis (f) entsprechen Differenzspektren, welche für die Variation der einzelnen Signale innerhalb der biologischen Probe stehen. Ab Spektrum (g) beginnt das Rauschen zu dominieren.

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

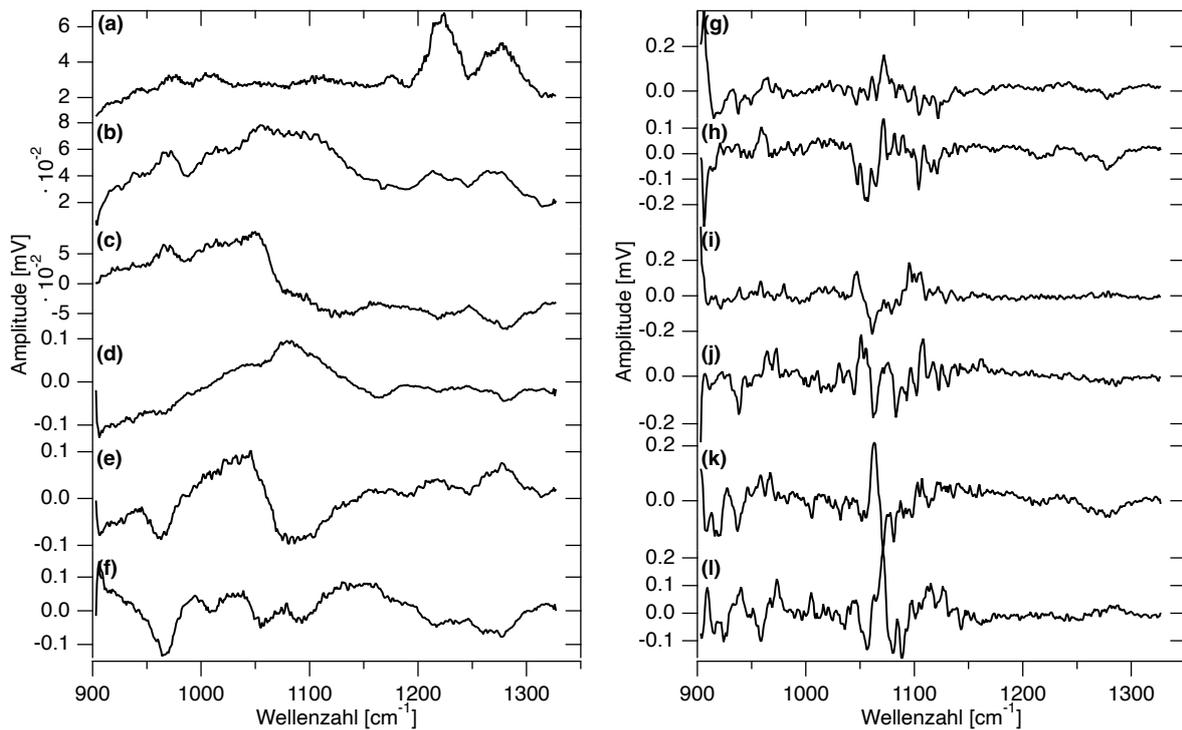


Abbildung 5.10: Referenzspektren: (a) reines Cetuximab, (b) bis (l) Komponenten aus der Singulärwertzerlegung einer mit PBS behandelten SCC-25-Referenzzelle in aufsteigender Reihenfolge (für den Anteil der Spektren vgl. Abbildung 5.11).

Zur Einschätzung des Anteils der einzelnen Komponenten ist in Abbildung 5.11 als relativer Anteil auf einer logarithmischen Skala dargestellt. Der relative Anteil entspricht dem Quotienten aus der durch Igor Pro ermittelten Eigenvektorenlänge des Spektrums und der Summe aller Eigenvektorenlängen. Die ersten drei Hauptkomponenten haben einen Anteil von über 1%, ab Komponente 6 sinkt der Anteil auf ein Minimum ($<5\%$).

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

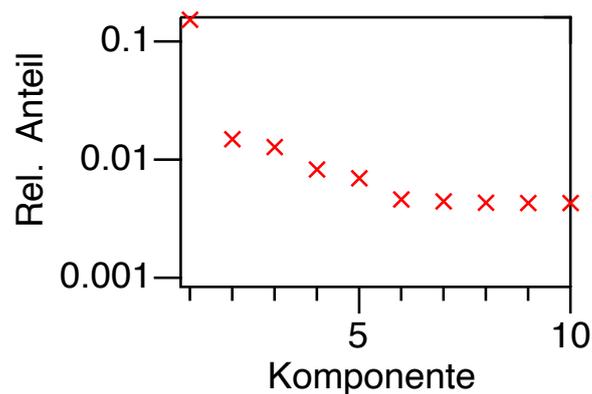


Abbildung 5.11: Anteil der Komponenten an den Spektren der Referenzspektren, Komponente 1 entspricht Abbildung 5.10 (b), Komponente 10 Spektrum (l).

Auf Basis dessen wurde eine Singulärwertzerlegung der Referenzhaut mit den ersten fünf Hauptkomponenten für den Spektralbereich 1190 bis 1320 cm^{-1} durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.12 gezeigt. Die relative Höhenverteilung ist unter (a) abgebildet, die Verteilung der Zellkomponenten von (b) bis (f). Die Komponente (b) zeigt eine Verteilung ähnlich zur Höhenverteilung der Probe und zeigt sich als Mischung zwischen beiden SCC-25-Referenzspektren aus Kapitel 5.2.1 (Abbildung 5.5). Die Komponenten (c), (e) und (f) zeigen jeweils eine inhomogene Verteilung. Probe (e) zeigt eine ähnliche Verteilung wie das Kryomedium. Komponente (d) zeigt hohe Intensitäten in dünnen Regionen und die höchste Intensität in den Rissen. Sie kompensiert die spektralen Anteile des Substrats.

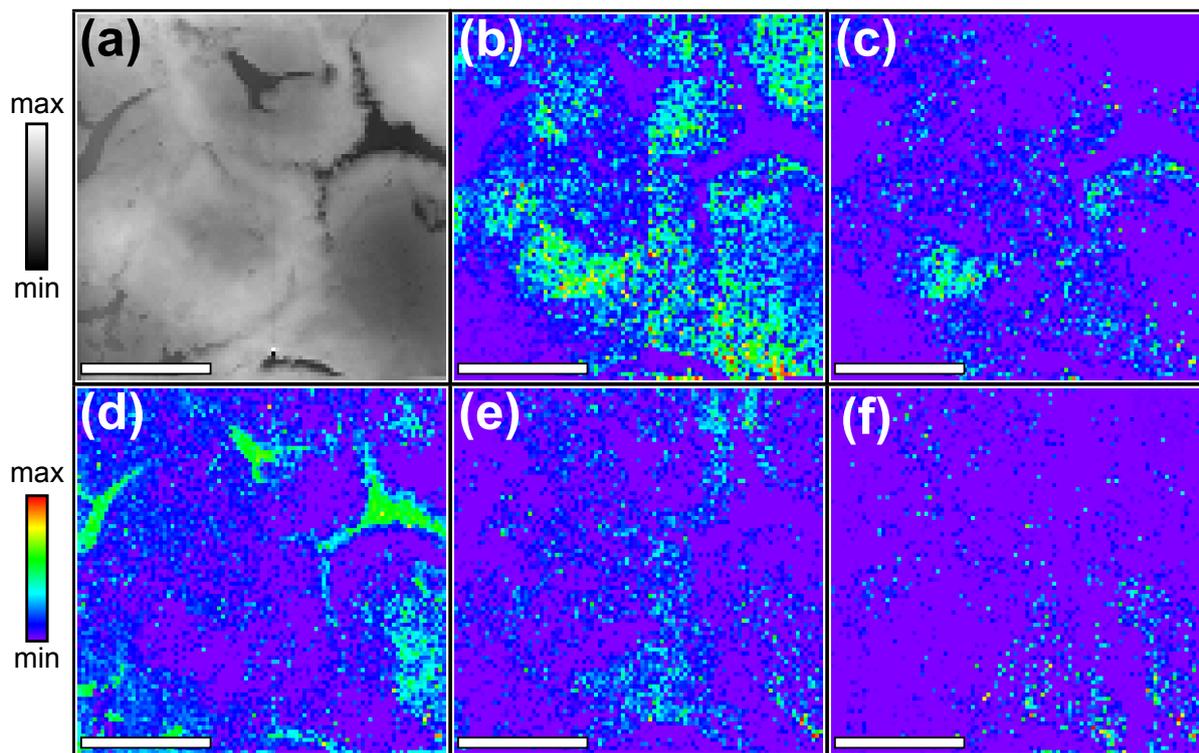


Abbildung 5.12: Verteilung der ermittelten Komponenten in der Referenzzellmessung, (a) zeigt die relative Höhenverteilung, (b) bis (f) die Verteilung der Komponenten 1 bis 5 (entspricht den Spektren aus Abbildung 5.10 (b) bis (f)), die Länge des Maßstabes beträgt $10\ \mu\text{m}$.

Die Verteilung des Wirkstoffs auf Basis einer Singulärwertzerlegung aus den Spektren aus Abbildung 5.10 (a) bis (f) in zwei Referenzregionen sind in Abbildung 5.13 ① dargestellt. In Zellen von (a) wurde kein Wirkstoff detektiert und in Zellen von (b) wird neben einigen Artefakten ebenfalls kein Cetuximab nachgewiesen. Das ermittelte Minimum, bei dem zwischen Cetuximab und der Querempfindlichkeit unterschieden werden kann, liegt bei 0.2. Es dient für die folgende Auswertung der mit Cetuximab behandelten Proben als willkürlich gesetztes Minimum.

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

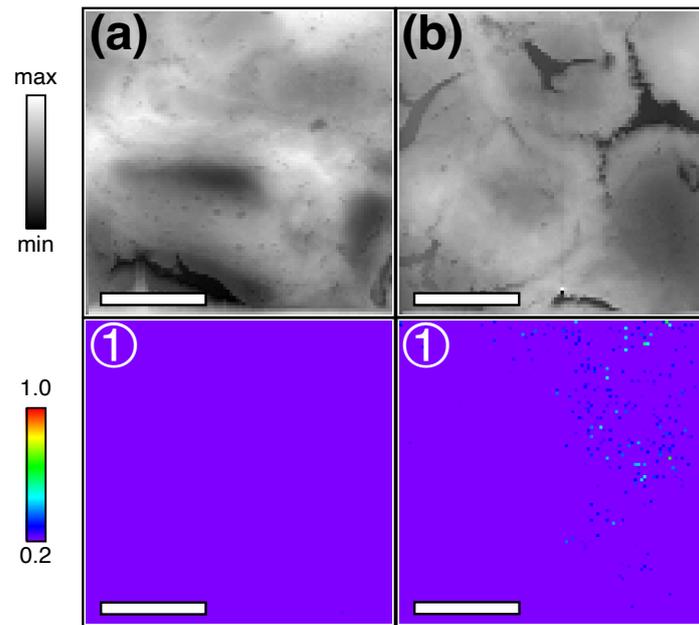


Abbildung 5.13: Singulärwertzerlegung von SCC-25-Referenzzellen, Zellen in (a) und (b) mit der relativen Höhenverteilung, unter ① die Verteilung des Wirkstoffs Cetuximab, die Länge des Maßstabes beträgt 10 μm .

Die Quantifizierungsgrenze der aus der numerischen Singulärwertzerlegung berechneten, einheitenlosen Faktoren des Wirkstoffs Cetuximab liegt für die in Abbildung 5.10 (a) gezeigten Referenzspektren bei 0.2, die Detektionsgrenze bei 0.07 [164, 165]. Die hierbei ermittelten Grenzen verhalten sich relativ zur Intensität des eingesetzten Cetuximab-Referenzspektrums.

5.2.3 Wirkstoffverteilung von Cetuximab

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Verteilung des Wirkstoffs Cetuximab in einem Tumorzellen-Kollagen-Modell, welches von Frau Leonie Gronbach im Rahmen ihrer Doktorarbeit entwickelt und hergestellt wurde [7]. Es besteht aus einem Bereich mit Tumorzellen und einem Bereich aus Rinderkollagen. Der Wirkstoff wurde bei einem Modell systemisch über das Nährmedium und in einem weiteren Modell topisch aufgebracht. Ziel ist es, mithilfe einer labelfreien Methode zu überprüfen, ob eine topische Auftragung das Potential hat, alleine oder als Ergänzung einer systemischen Behandlung zu dienen. Da es sich bei Cetuximab um eine Struktur auf Basis von Proteinen handelt, ist nicht zu erwarten, dass es substanzspezifische Signale innerhalb eines AFM-IR-Spektrums gibt, welche sich in spektralen Regionen befinden, in denen die Zellen und das Collagen keine Absorption zeigt. Daher ist es die Herausforderung anhand von unterschiedlichen Intensitäten von Banden einen biologischen Wirkstoff in einem biologischen System zu detektieren.

In Abbildung 5.14 ist beispielhaft die Wirkstoffverteilung einer topisch behandelten Probe dargestellt. Auf der optischen Mikroskopie-Aufnahme (a) ist die Zelle mit einem roten Rahmen markiert. Sie befindet sich am Übergang der Zellen zum Collagen (unten), der Ort der Wirkstoffauftragung befindet sich 100 μm oberhalb der Zelle. Der Höhenkanal der hyperspektralen Messung ist unter (b) dargestellt. Die Rissstrukturen (dunkel) lassen sich hierbei genauso wie in der optischen Mikroskopie erkennen. Zentral befindet sich eine Zelle, deren Membranen als dunkler Rand zu erkennen sind. Im oberen, rechten Bereich befindet sich eine helle, kreisförmige Struktur mit einem Durchmesser 5 μm . Diese Struktur kann einem Zellorganell zugeordnet werden.

Die Proben werden auf Basis eines Signalverhältnisses und numerischer Singulärwertzerlegung ausgewertet. Für die Singulärwertzerlegung werden unterschiedliche Ursprünge der Referenzspektren verglichen und die Auswirkung einer energetischen Verschiebung betrachtet. Zwischen allen Methoden wird die Vergleichbarkeit der Ergebnisse untersucht. Das Signalverhältnis wird auf Basis einer Gaußentfaltung der lokalen Spektren in zwei Gaußfunktionen und einem absoluten Versatz gebildet. Bei den Positionen der Maxima sind hierbei freie Parameter, sodass das Verhältnis von $(1225 \pm 10) \text{ cm}^{-1}$ gegen $(1275 \pm 10) \text{ cm}^{-1}$ gebildet wird. Wie in Abbildung 5.4 sichtbar, verhalten sich die Banden des Spektrums von Cetuximab gegenüber den Banden des Durchschnittsspektrums der Referenzzellen entgegengesetzt. Werte oberhalb des Maximums (1.0) sind ausschließlich in den Rissstrukturen zu erkennen. In diesen Strukturen zeigt sich ein sehr geringes Signal, welches durch Rauschen dominiert wird. Hierdurch ergeben sich Divisionen von sehr kleinen Zahlen durcheinander. Diese Regionen sind in der Abbildung maskiert. Es zeigt sich eine Wirkstoffanreicherung links-mittig, unten und oben-rechts der gemessenen Region. Beispielhaft ist für diese Me-

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

thode unter ④ das durchschnittliche Spektrum der Probe (schwarz) und der zugehörige Gaußdoppelfit (blau) dargestellt. Hier zeigt sich, dass der Gaußfit die Gesamtstruktur des Spektrums nicht ideal angleichen kann, da die Schultern bei 1240 und 1265 cm^{-1} nicht abgebildet werden.

Die Verteilungen des Cetuximabs aus einer numerischen Singulärwertzerlegung auf Basis der Reinsubstanzspektren aus Kapitel 5.2.1 sind unter (d) dargestellt. ① zeigt die Verteilung des Wirkstoffs. Es zeigt sich eine Anreicherung des Wirkstoffs über die ganze Zelle. Ausgenommen sind hierbei die Region der Risse und das runde Zellorganell. Bei ② ist zusätzlich eine Wellenzahlenverschiebung des Wirkstoffspektrums in den Grenzen $\pm 5\text{ cm}^{-1}$ Teil der Ausgleichsfunktion. Die Verteilung zeigt gegenüber ① keine deutlichen Unterschiede. Die hierbei berechnete Verschiebung ist unter ③ dargestellt. Im mittleren Bereich zeigt sich eine Verschiebung des Cetuximab-Spektrums zu negativen Wellenzahlen. Ursache hierfür ist die Wechselwirkung zwischen Cetuximab und dem biologischen Material der Zellen. Die durchschnittliche Ausgleichsfunktion ohne Verschiebung ist unter ④ in Blau und mit Verschiebung in Rot gezeigt. Der Unterschied zwischen beiden Ausgleichsfunktionen ist gering, sodass anzunehmen ist, dass der Einfluss durch die Wellenzahlenverschiebung vernachlässigbar ist. Die Verteilung aus einer Singulärwertzerlegung auf Basis von Referenzspektren des reinen Wirkstoffs und der Komponenten einer Singulärwertzerlegung der Referenzzellen (vgl. Kapitel 5.2.2) ist unter (e) abgebildet. ① ohne und ② mit einer Wellenzahlenverschiebung des Wirkstoffspektrums in den Grenzen $\pm 5\text{ cm}^{-1}$. Es zeigt sich ebenfalls eine Verteilung des Wirkstoffs über die gesamte Zelle. Das runde Zellorganell ist nicht so stark sichtbar, die maximale Anreicherung befindet sich unten rechts. Hier ist eine Anreicherung sichtbar, die unter (d) nicht sichtbar war. In der relativen Höhenverteilung (b) ist an dieser Stelle keine Struktur zu erkennen. Die berechnete Verschiebung ist unter ③ und das durchschnittliche Fit-Spektrum rot unter ④ dargestellt. Das Fitspektrum ohne Wellenzahlenverschiebung ist als blaue Kurve in ④ gezeigt. Für die Auswertungen unter (f) ist als Ersatzspektrum für den Wirkstoff das Differenzspektrum zwischen einer behandelten und einer unbehandelten Probe genutzt worden (vgl. Abbildung 5.9 aus Kapitel 5.2.2). Das Differenzspektrum enthält Informationen aus dem Wirkstoff und den spektralen Änderungen, die durch Wirkstoffbehandlung entstehen. Das Differenzspektrum dient neben der Betrachtung der Wirkstoffverteilung auch zur Darstellung der Änderungen innerhalb der Zellen durch die Behandlung mit dem Wirkstoff. Die weiteren Referenzspektren entsprechen den Komponenten einer Singulärwertzerlegung der Referenzzellen (vgl. Kapitel 5.2.2). Die Verteilungen sind vergleichbar mit denen unter (e). Die durchschnittlichen Fit-Spektren unter ④ (blau: ohne Energiedrift, rot: mit Energiedrift) sind im Vergleich zu den anderen Fit-Spektren deutlich ähnlicher zum Durchschnittsspektrum. Die Ursache hierfür ist auswertungsbedingt, da das Diffe-

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

renzspektrum direkte Anteile der vorliegenden Probe hat, und hat keine physikalische Grundlage.

Qualitativ zeigen alle Auswertungsmethoden den Wirkstoff in ähnlichen Regionen. Zwischen den Singulärwertzerlegungen mit und ohne Wellenzahlenverschiebung ist kein Unterschied in der Wirkstoffverteilung zu beobachten. Die durchschnittliche spektrale Verschiebung beträgt -0.3 cm^{-1} . Die Auswertung auf Basis der Gaußnäherung zeigt höhere Intensitäten in den unteren Regionen und keine Intensitäten in den linken Regionen. Diese Unterschiede lassen sich durch den Einfluss relativer Mengen an Cetuximab und der Zellmaterialmenge erklären: Würde man jeweils die gleiche Menge Cetuximab in unterschiedlich dicken Proben vorfinden, wäre das Verhältnis der Gaußfunktionen zueinander unterschiedlich, da die Menge an Zellmaterial das Verhältnis der Absorptionsbanden ebenfalls beeinflusst. Zwischen den Singulärwertzerlegungen mit unterschiedlichen Referenzspektren (d) ist der größte sichtbare Unterschied bei der runden Struktur im rechten unteren Bereich. Ursache hierfür ist eine Überbewertung der Komponente (f) aus Abbildung 5.10 für die Auswertung (e). Diese Komponente verhält sich invers zum Cetuximabspektrum. Die Verteilung in den anderen Regionen dieser Messung ist zwischen beiden Referenzbasissätzen vergleichbar. Die Auswertung mit dem genutzten Differenzspektrum zwischen behandelter und unbehandelter Zelle (f) zeigt eine vergleichbare Verteilung. Der unter (f) bewusst gesetzte Nullpunkt bei 0.75 wurde analog der Verteilung von (e) gewählt. Das gewählte Differenzspektrum enthält zum einen den Anteil des Wirkstoffs, aber auch zum anderen Anteile der biologischen Unterschiede zwischen den Zellen. Da die Zelle keinen bekannten Bereich enthält, welcher zur Kalibrierung des Nullpunktes für den Wirkstoff dienen kann, eignet sich die Wahl des Differenzspektrums nicht zu einer absoluten Bestimmung der Wirkstoffverteilung. Die Nutzung eines solchen Differenzspektrums kann als Kontrolle für Auswertungen auf Basis des bekannten Wirkstoffspektrums dienen.

Es kann mit allen vier Methoden der Wirkstoff Cetuximab ortsaufgelöst nachgewiesen werden. In den Regionen der Risse, an denen sich kein Material befindet, ist kein Wirkstoff nachweisbar. Es ist eine Anreicherung des Wirkstoffs in Regionen der Zelle sichtbar, welche weder eine Abhängigkeit zur Probendicke noch zum Auftragungsort zeigen. Da AFM-IR-Messungen ein Volumen unterhalb der AFM-Spitze betrachten, kann entlang der Probendicke keine Ortsauflösung erfolgen. So kann nicht unterschieden werden, ob sich ein Wirkstoff in einer Zelle befindet oder sich an eine Membran angelagert hat, welche sich innerhalb des Schnittes befindet.

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

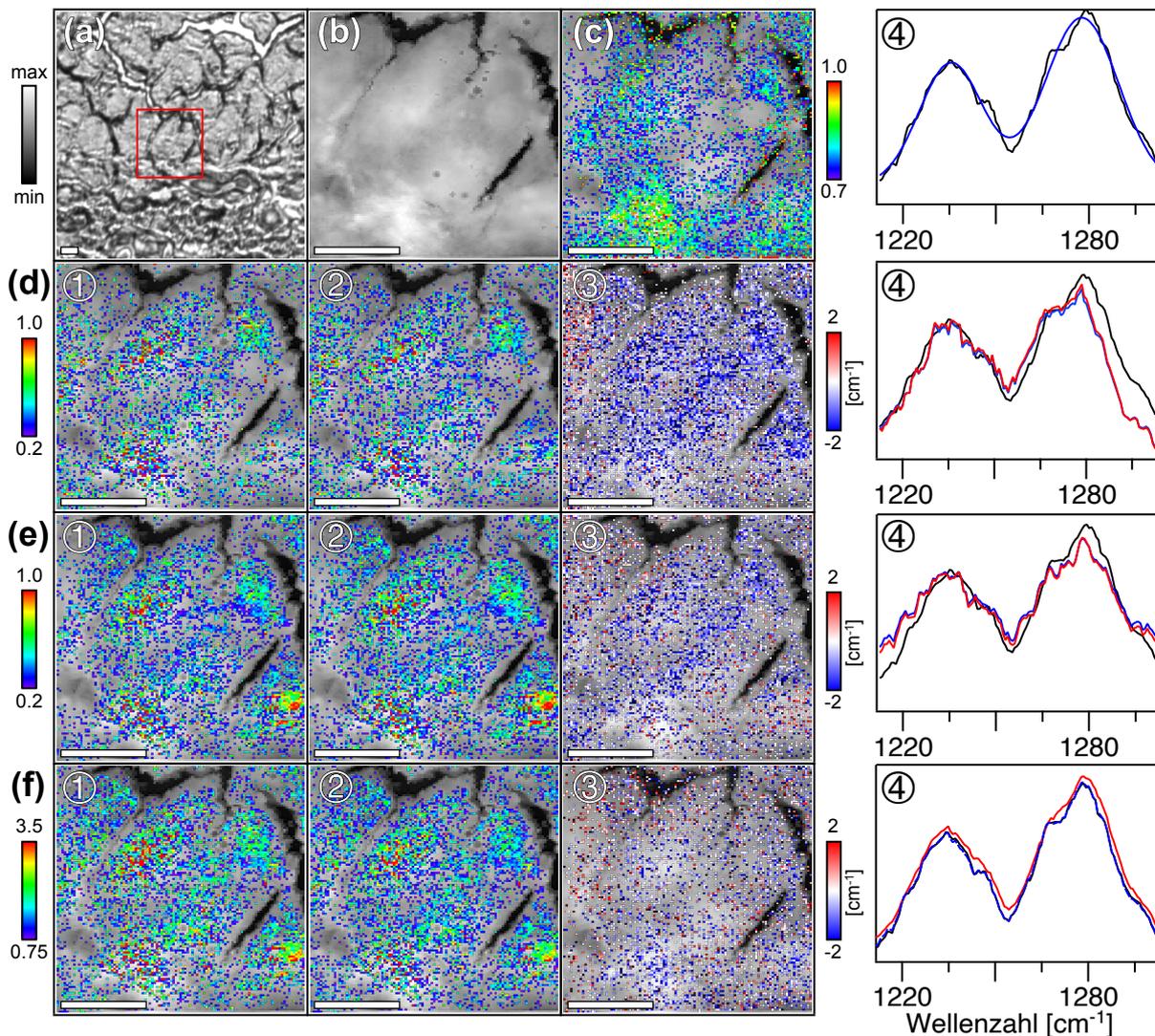


Abbildung 5.14: Beispielhafte Auswertung einer Messung einer Zelle einer mit Cetuximab in PBS behandelten 3-dim. Zellkulturen: (a) zeigt eine optische Mikroskopie-Aufnahme der Probe, (b) die relative Höhenverteilung der in (a) markierten Region (diese befindet sich auch im Hintergrund aller folgenden Verteilungen) (c) das auf Basis zweier Gaußfunktionen ermittelte Verhältnis von $1225/1275 \text{ cm}^{-1}$ (Werte > 1 maskiert). (d) zeigt die Auswertung einer numerischen Singulärwertzerlegung auf Basis der Spektren der bekannten Einzelkomponenten, (e) auf Basis des Cetuximab-Referenzspektrums und mithilfe der ersten fünf Komponenten einer Singulärwertzerlegung der Referenzprobe, (f) auf Basis des Differenzspektrums zwischen behandelter und unbehandelter Probe und der ersten fünf Komponenten einer Singulärwertzerlegung der Referenzprobe, die lokale Verteilung des Wirkstoffspektrums ist unter ① ohne und unter ② mit berechnetem Energiedrift des Wirkstoffspektrums dargestellt, ③ zeigt den jeweils bestimmten Energiedrift und unter ④ sind das Durchschnittsspektrum der Messung in Schwarz als Amplitude [mV] gegen Wellenzahl [cm^{-1}], jeweils zugehörige Fitfunktionen ohne Energiedrift in Blau und mit gefittetem Energiedrift in Rot dargestellt, die Länge des Maßstabes beträgt $10 \text{ }\mu\text{m}$.

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

Zur besseren Erklärung dieses Problems ist in Abbildung 5.15 eine Zelle vereinfacht als Kugel abgebildet. Hierbei ist das Zellinnere als grauer Bereich, der Zellkern mit einer Membranen in Violett, ein Mitochondrium in Grün und die Zellmembran als blauer Bereich dargestellt. Zwei Schnitte sind als rot-gestrichelte Linie gekennzeichnet. Auf der rechten Seite sind die jeweiligen Schnitte als Draufsicht ohne das Zellinnere abgebildet. Bei den Schnitten ① und ③ befindet sich Zellmembran (blau) innerhalb der Schnittebene, während bei ② sich die Membran nur am Rand befindet. Die Membranstrukturen ② sind in den Messungen nicht zu sehen, da die Kryoproben beim Trocknungsvorgang der vorliegenden Proben an diesen Membranen gerissen sind. Die Membranen innerhalb der Schnittebene sind Teil der Wirkstoffverteilung und können größtenteils nicht von den oberhalb und unterhalb liegenden Strukturen unterschieden werden; die Membranen der Zellorganellen (violett, grün) überlagern sich innerhalb eines Schnittes mit der Zellmembran.

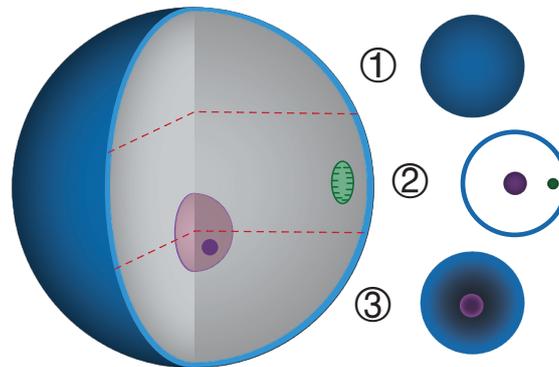


Abbildung 5.15: Schematische Darstellung zweier Schnitte (rot) an einem vereinfachtem Modell einer Zelle mit einer Membran (blau), einem Zellinneren (grau), einem Mitochondrium (grün) und einem Zellkern (violett), ①, ② und ③ ist jeweils die Draufsicht auf den Schnitt ohne das Zellinnere.

Einen weiteren Einfluss haben die Abstände der Messpunkte. AFM-IR-Spektren entsprechen nur dem Verhalten des Volumens unterhalb der Kontaktfläche der Spitze mit der Probe. Messungen sehen aufgrund des hohen Zeitaufwandes dadurch meistens so aus, wie in Abbildung 5.16 schematisch dargestellt: Zwischen den einzelnen Messpunkten befindet sich eine große Fläche, welche nicht betrachtet wird und deren Zusammensetzung unbekannt ist. Bei einem Messpunktabstand von 300 nm wird ca. 0.9% der Fläche durch AFM-IR-Messungen erfasst.

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

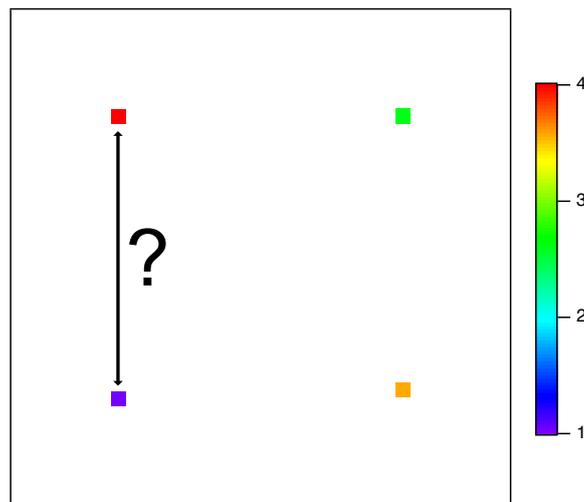


Abbildung 5.16: Beispielhafte Darstellung der Verteilung von Messpunkten einer niedrigaufgelösten hyperspektralen AFM-IR-Messung, Messpunkte sind farbig dargestellt, die ungemessene Region in weiß.

Im Folgenden wird nun eine Probe aus dem Bereich der Zelle aus Abbildung 5.14 gezeigt:

Die AFM-Messung der vollständigen Zelle ist in Abbildung 5.17 (a) dargestellt. Die hochaufgelöste Messung ist als relative Höhenverteilung (b) und als Verteilung des Wirkstoffs Cetuximab aus einer Singulärwertzerlegung (c) dargestellt. Der Abstand der Messpunkte zueinander beträgt 10 nm. Aufgrund der langen Messdauer zeigt sich ein lateraler Drift, welcher manuell korrigiert wurde. Die bei (b) helle Struktur entspricht hierbei einer Membran eines Zellbestandteils, wahrscheinlich dem Zellkern (vgl. Gesamtstruktur in (a)). Bei der Wirkstoffverteilung ist sichtbar, dass diese von der Position der Membran abhängig ist: Der Wirkstoff befindet sich nur außerhalb der Struktur und nicht innerhalb. Daher ist anzunehmen, dass sich der Wirkstoff in diesem Fall tatsächlich innerhalb einer Zelle befindet und sich nicht nur, wie bei FLIM-Experimenten an 2-dimensionalen Zellsystemen beobachtet [7], an den Membranen außerhalb der Zelle befinden. Ebenfalls lässt sich erkennen, dass sich der Wirkstoff größtenteils geschlossen angereichert hat und es in wirkstoffreichen Regionen nur kleinere Mengenschwankungen gibt.

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

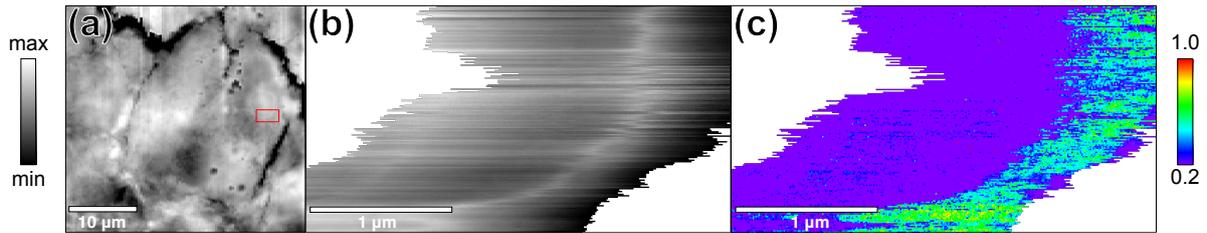


Abbildung 5.17: Hochaufgelöste Messung an einer Zellkernstruktur, (a) AFM-Darstellung der gesamten Zelle, (b) relative Höhenverteilung der driftkorrigierten Hyperspektralmessung, (c) Verteilung des Cetuximabs aus einer numerischen Singulärwertzerlegung.

Die relativ lange Messzeit von ca. 8 Sekunden pro Spektrum (entspricht einem Pixel) und den sich damit ergebenden 91.6 Stunden für den gezeigten Bereich verhindert ein großflächigeres Abrastern der Probe mit einer hohen Auflösung von 10 nm. Daher wird in Abbildung 5.18 eine Übersicht über mehrere Messungen mit einem Messpunktabstand von 300 nm gezeigt. Hierbei ist auf den jeweiligen Höhenkanal (Grauskala) der Wirkstoff (Regenbogenskala) dargestellt. Wirkstoffmengen unterhalb des Detektionslimit (0.2) sind transparent.

Unter (a) ist der Schnitt eines topisch behandelten und unter (b) der Schnitt eines systemisch behandelten Modells gezeigt. Hierbei dient eine optische Mikroskopie-Aufnahme in Schwarz/Weiß als Ortszuordnung der einzelnen Messungen. Auf der rechten Seite befindet sich außen das Kryomedium, gefolgt wird es von den SCC-25-Zellen. Hier befindet sich an der Oberfläche zum Kryomedium der Auftragungsort der topisch behandelten Probe (a). Der Übergang zwischen Zellen und Kollagen ist mit einer gelb gestrichelten Linie gekennzeichnet. Auf der linken Seite befindet sich das Ende des Tumormodells, an dem die systemisch behandelte Probe (b) Kontakt zur Wirkstofflösung hatte. Bei beiden Proben wurden exemplarisch Bereiche im Kollagen und mehrere Zellen gemessen. Die Messungen im Kollagen, auf denen die vorliegende Auswertung beruht, wurden von Frau Isabel Rühl durchgeführt [219].

In der optischen Mikroskopie sind Unterschiede zwischen der systemisch- und topisch-behandelten Probe zu beobachten: Die topisch behandelte Probe zeigt deutlich strukturierter die einzelnen Zellen und hat eine um 1.5- bis 2-fach dickere Zellschicht. Der Wirkstoff hat bei der systemischen Behandlung eine größere Auswirkung auf die SCC-25-Zellen, welche größtenteils nicht mehr klar in der optischen Mikroskopie voneinander unterschieden werden können. Ursache kann hier aber vor allem die um den Faktor 100 größere Auftragungsmenge der systemischen gegenüber der topischen Behandlung sein.

In den Zellen zeigen beide Proben eine inhomogene Wirkstoffverteilung:

Bereiche 1 bis 9 zeigen Messungen in der SCC-25-Zellregion der topisch-behandelten

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

Probe (a). Die Bereiche 1 bis 3 liegen an der Oberfläche des Modellschnittes, dem Auftragungsort des Wirkstoffs. Bereich 1 zeigt auf der linken Seite die Modelloberfläche, gefolgt von dem tiefen Bereich des Siliciumträgers und auf der rechten Seite den Bereich des Kryomediums. Wirkstoff wird nur im Zellbereich detektiert. Zelle 2 enthält keinen Wirkstoff, während Zelle 3 Cetuximab enthält. Ausgenommen sind die Risse und die beiden oberen Regionen, welche durch tiefe Regionen von der wirkstoffhaltigen Region getrennt sind. Die Regionen 4 bis 6 befinden sich nahe der Probenoberfläche, wobei Region 4 keinen Wirkstoff enthält. Wirkstoff in Region 5 befindet sich im rechten Bereich, in Region 6 oben in einer von Membranen umgebenen Region und an dem Bereich des Risses links. Zellbereich 7 zeigt auf der rechten Seite bis zu einer membranartigen Struktur keinen Wirkstoff und innerhalb des wirkstoffhaltigen Bereichs zwei runde Strukturen, die keinen Wirkstoff enthalten. Hierbei könnte es sich um Organellen mit Membranen, z.B. Zellkerne oder Mitochondrien, handeln, die den Wirkstoff nicht aufnehmen.

Bereiche 8 und 9 zeigen Zellen, welche sich an der Grenzfläche zum Kollagenbereich befinden. Bereich 8 ist in Abbildung 5.14 detaillierter dargestellt. Der Wirkstoff kann über den gesamten Bereich 9 detektiert werden. Ausgenommen sind hiervon die Risse und die schmale Struktur im unteren Drittel. Eine membranähnliche Abgrenzung ist für die wirkstoffreiche Zone nicht zu sehen.

Vier Messungen im Kollagenbereich sind in den Abschnitten 10 bis 13 gezeigt. Der Wirkstoff zeigt eine inhomogene Verteilung, so enthält Region 11 gar keinen Wirkstoff. Der Wirkstoff Cetuximab wurde durch das Modell bis Region 13 transportiert.

Die Bereiche 14 bis 18 entsprechen den Messungen in der SCC-25-Zellregion der systemisch-behandelten Probe (b). Bereiche 14 und 15 befinden sich an der Probenoberfläche, d.h. auf der zum Auftragungsort abgewandten Seite. Wirkstoff kann nur in Bereich 15 (links) detektiert werden. 16 bis 18 zeigen Zellbereiche nahe des Kollagenbereichs. Bereich 16 zeigt, dass der Wirkstoff in den vorliegenden Zellen in jeweils unterschiedlicher Menge aufgenommen wurde. Die Risse an den Zellmembranen dienen hierbei als Abgrenzung. Unter 17 befindet sich der Wirkstoff im unteren Teil. Der Wirkstoff befindet sich rechts im Bereich von Zelle 18. In den Bereichen 17 und 18 sind keine strukturellen, trennenden Merkmale zwischen wirkstoffhaltigen und -freien Regionen zu erkennen.

Der Kollagenbereich ist in den Bereichen 19 bis 22 gezeigt. Wie in der topisch-behandelten Probe ist der Wirkstoff inhomogen verteilt.

Die Wirkstoffverteilung steht im Einklang mit Fluoreszenzmessungen bei Gliom-Tumoren von Ratten, bei denen die Aufnahme von Cetuximab nach systemischer Behandlung beobachtet werden konnte [220] und mit der Verteilung von doppelt-gelabeltem Cetuximab aus Fluoreszenzmikroskopiemessungen [5]. Ebenso decken

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

sich die Beobachtungen mit der Verteilung der EGFR-Rezeptoren aus einer Laser-rastermikroskopmessung nach einer 1.5-stündigen Behandlung von Cetuximab [221] und Messungen von NIR-Cetuximab und ⁹⁰Y-Cetuximab [222]. Aus der Literatur ist bekannt, dass lange Einwirkzeiten eine Verteilung des Wirkstoffs Cetuximab ausgehend von den Blutvesikeln über den ganzen Tumor als Folge haben [223]. Ebenso konnte der Einfluss von Cetuximab z.B. über Immunfluoreszenz in Verteilungen über einen Tumor nachgewiesen werden [224].

Ob sich der Wirkstoff wie bei den FLIM-Messungen aus der Literatur [7] größtenteils auf Membranen der Tumorzellen befindet, welche sich parallel zur Schnittebene befinden oder in die Zelle, wie in Abbildung 5.16 gezeigt, eindringen, kann mit diesen Messungen nicht abschließend geklärt werden. Hierfür wären weitere Messungen an eingebetteten Zellkulturen, bestehend aus einer einzelnen Zelle, nötig. Bei dem in dieser Arbeit beobachteten Transport ist auffällig, dass kleine Bereiche, welche den Organellen zugeordnet werden könnten, in mehreren Zellen keine Wirkstoffaufnahme gezeigt haben. Dies deutet auf einen Transport des Wirkstoffs in Zellen hin, wobei der Weitertransport in die Organellen verhindert wird und sich der Wirkstoff um diese herum verteilt. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von doppelt-markiertem Cetuximab, welches nach 8 Stunden ein Eindringen in die Zellen gezeigt hat [5]. Die vorliegenden Messungen behandeln eine im Gegensatz zur Literatur längere Behandlungszeit von 10 Tagen und zeigen hierbei eine über das untersuchte Modell inhomogene Verteilung des Wirkstoffs Cetuximab.

Mithilfe der Kombination aus hyperspektralen AFM-IR-Messungen und numerischer Singulärwertzerlegung konnte in dieser Arbeit die lokale Verteilung des biologischen Wirkstoffs Cetuximab in einem biologischen Zellmedium labelfrei nachgewiesen werden. Ein Signalverlust durch Wechselwirkung eines Labels mit der Umgebung, wie es z.B. bei DDAO (Ionen der 6-(1,3-dichloro-7-hydroxy-9-methyl-2-oxo-2,9-dihydroacridin-9-yl)hexansäure) durch Änderung des pH-Wertes [5] beobachtet wurde, kann bei einer labelfreien Methode ausgeschlossen werden. Es konnte gezeigt werden, dass der Wirkstoff sowohl bei einer systemischen als auch bei einer topischen Auftragung durch das Modell bestehend aus SCC-25-Zellen und Rinderkollagen transportiert werden kann und der Übergang zwischen Kollagen und Zellen nicht als Barriere wirkt. Eine topische Auftragung zeigt sich in diesem Fall als ergänzende, vielleicht sogar als alternative, Methode zu einer systemischen Behandlung der SCC-25-Zellen.

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

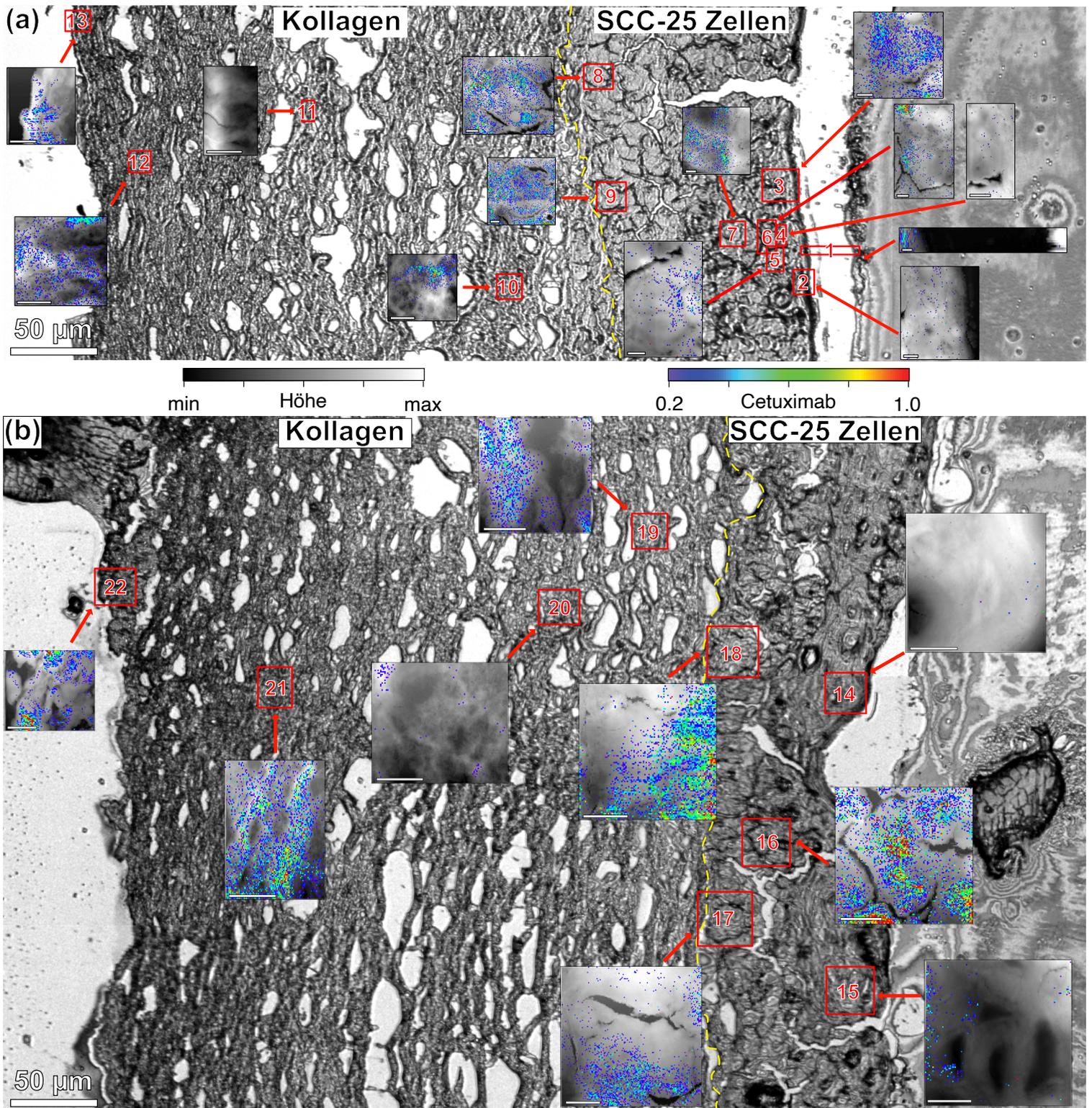


Abbildung 5.18: Optische Mikroskopie des mit Cetuximab (a) topisch und (b) systemisch behandelten Modells bestehend aus SCC-25-Zellen und Kollagen, Verteilung des Wirkstoffs aus Singulärwertzerlegung innerhalb der optischen Mikroskopie-Aufnahme auf jeweils einer Höhenverteilung, Grenze zwischen den Regionen SCC-25-Zellen und Kollagen gelb markiert, die Länge des Maßstabes in den Unterabbildungen 10 µm.

5.3 Nachweis von Docetaxel

5.3.1 Referenzspektren der SSC-25-Referenzzellen im Bereich 1600 bis 1850 cm^{-1} mithilfe einer Matrix-Singulärwertzerlegung

Um den Wirkstoff Docetaxel nachweisen zu können, muss ein anderer Wellenzahlbereich als bei Cetuximab betrachtet werden. Aus Kapitel 5.1 ist bekannt, dass dieser Wirkstoff sich nur durch eine intensive C=O-Bande auszeichnet, welche sich bei und oberhalb von 1717 cm^{-1} befindet. Ein Ausschnitt des Spektrums ist in Abbildung 5.19 (a) dargestellt. Verglichen mit dem ersten Spektrum einer Singulärwertzerlegung der unbehandelten Probe, welche dem Durchschnittsspektrum entspricht, befindet sich die markante Bande des Docetaxels bei höheren Energien und ist somit leicht zu unterscheiden.

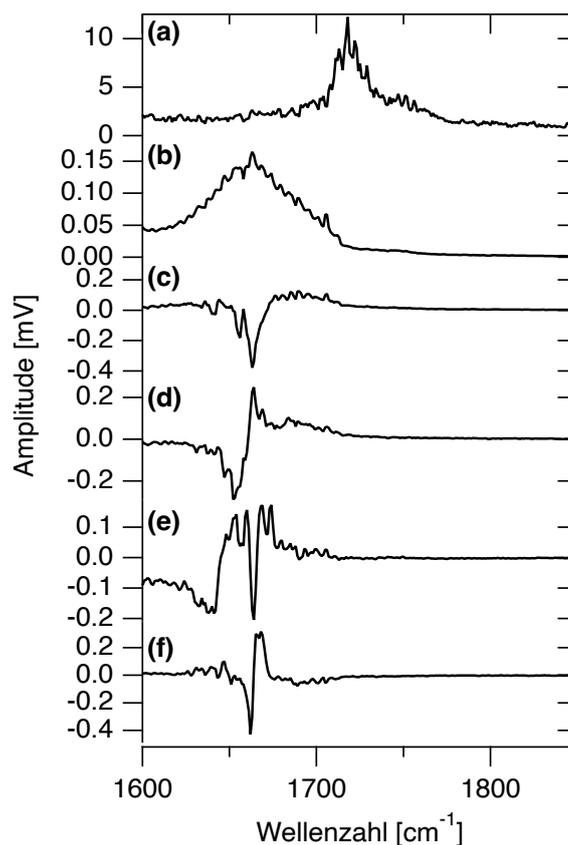


Abbildung 5.19: AFM-IR-Spektren des (a) Docetaxels und (b) bis (f) der Komponenten einer Singulärwertzerlegung einer Referenz-SCC-25-Zellprobe.

Bei den weiteren Komponenten (c) bis (f) handelt es sich um Differenzspektren zu (b), welche für Variationen in den vorhandenen Intensitäten stehen. Keine dieser Variationen hat eine Überschneidung mit den Signalen des Docetaxel.

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

Die Verteilung der einzelnen Komponenten in einer Referenzzelle ist in Abbildung 5.20 dargestellt. Unter (a) ist die relative Höhenverteilung sichtbar, (b) bis (f) die Verteilung der Komponenten (b) bis (f) aus Abbildung 5.19. Das durchschnittliche Spektrum der Referenz (b) verhält sich vergleichbar mit der Höhe aus (a). Die Komponente (e) ist ebenfalls in dicken Regionen zu finden. Die weiteren Komponenten haben eine diffuse Verteilung.

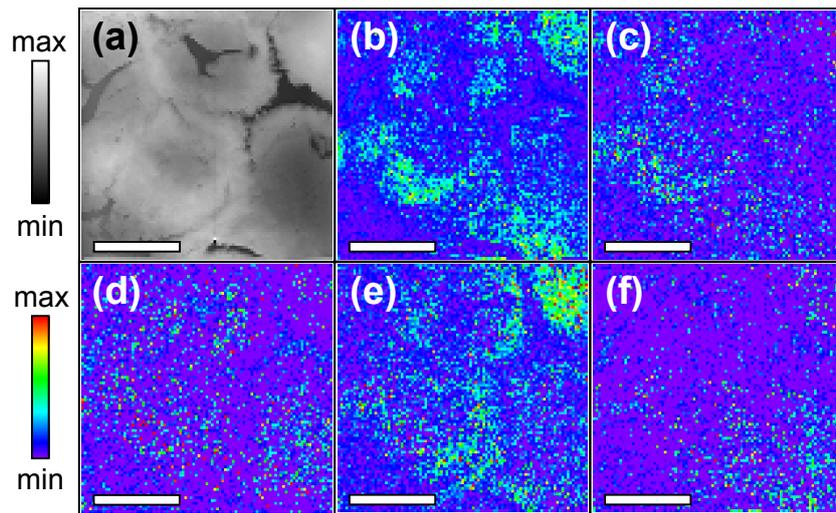


Abbildung 5.20: (a) relative Höhenverteilung der Referenzprobe, (b) bis (f) Verteilung der Singulärwertkomponenten (b) bis (f) aus Abbildung 5.19.

In Abbildung 5.21 ist neben dem Spektrum des reinen, kristallinen Docetaxels (a) und dem durchschnittlichen Spektrum der unbehandelten Referenzzelle (c) das Differenzspektrum der behandelten gegenüber der unbehandelten Zelle dargestellt (b). Dieses Spektrum weicht von dem Reinspektrum des Docetaxels ab. Ursache hierfür kann zum einen eine Wirkung des Docetaxels auf die Amid I Bande ($< 1700 \text{ cm}^{-1}$) sein, ebenso kann es sein, dass sich das AFM-IR-Spektrum von kristallinem gegenüber amorphen Docetaxel unterscheidet. Für andere Wirkstoffe ist dieses Verhalten aus der Literatur bekannt [225] und ist auf den Verlust von Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen.

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

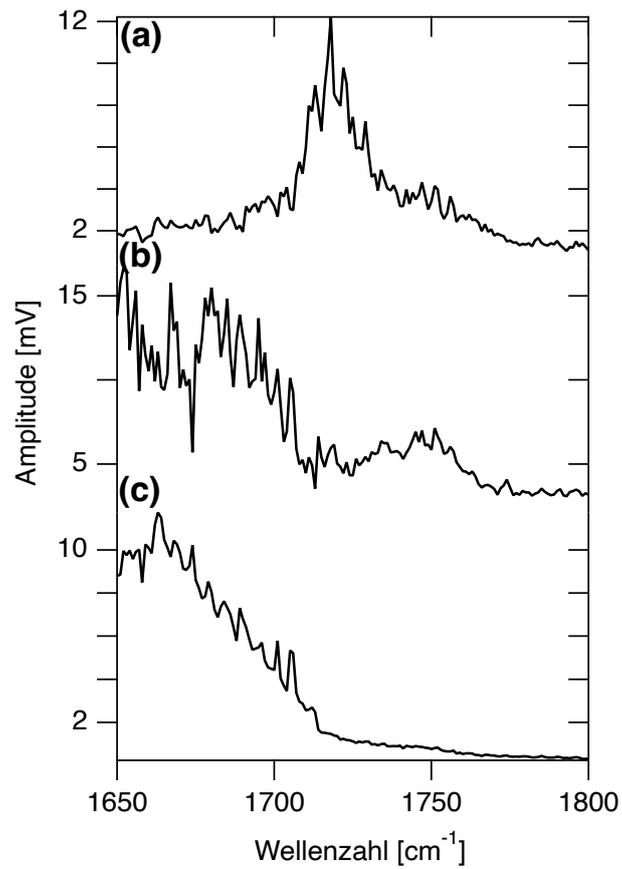


Abbildung 5.21: AFM-IR-Spektren des kristallinen Docetaxels (a), der Differenz einer mit Docetaxel behandelten zu einer unbehandelten Zelle (b) und der durchschnittlichen (unbehandelten) Referenzzelle (c).

5.3.2 Wirkstoffverteilung von Docetaxel

Auf Basis der Referenzspektren aus dem vorherigen Kapitel soll nun der Wirkstoff Docetaxel mithilfe einer numerischen Singulärwertzerlegung nachgewiesen werden. Hierfür wurden drei unterschiedliche Probenotypen, eine unbehandelte Referenz und zwei behandelte Zellkulturen, mit AFM-IR-Messungen hyperspektral untersucht. Die Messungen der unbehandelten Referenz sind in Abbildung 5.22 dargestellt:

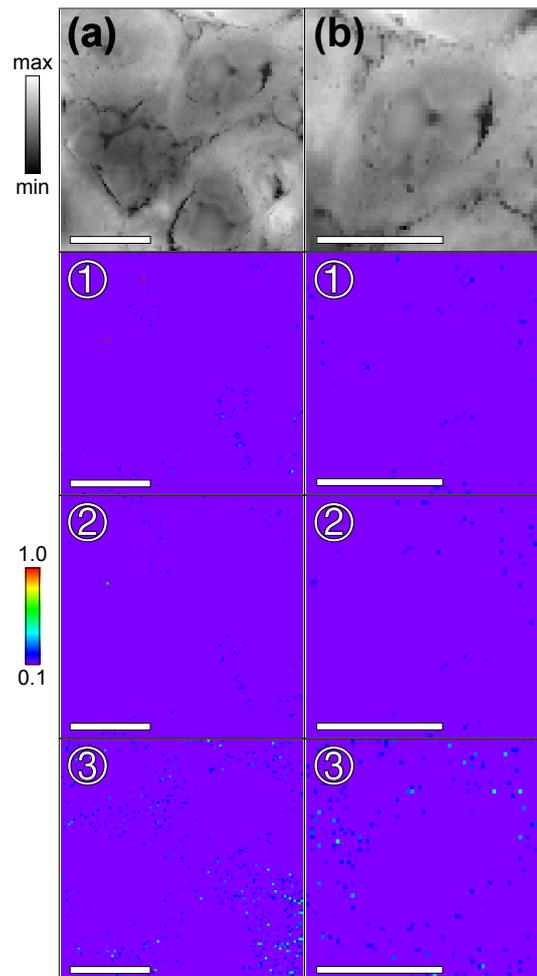


Abbildung 5.22: (a) und (b) die relative Höhenverteilung eines unbehandelten Referenz-SCC-25-Modellschnitts, ① die lokale Verteilung des Docetaxels einer Singulärwertzerlegung auf Basis der Spektren Abbildung 5.19 (a) und (b), ② die Verteilung auf Basis aller Spektren aus Abbildung 5.19, ③ die Verteilung der Differenz einer mit Docetaxel behandelten und einer unbehandelten Zelle auf Basis aller Spektren aus Abbildung 5.19, die Länge des Maßstabes beträgt 10 μm .

(a) und (b) zeigen die relative Höhenverteilungen der untersuchten Regionen. ① zeigt den über eine Singulärwertzerlegung berechnete Wirkstoffverteilung auf Basis des Wirkstoffspektrums Docetaxel und des durchschnittlichen Spektrums einer Referenzzelle (Abbildung 5.19 (a) und (b)). Die Verteilung auf Basis des Docetaxelspektrums

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

und der ersten fünf Komponenten aus einer Singulärwertzerlegung (Abbildung 5.19 (a) bis (f)) ist unter ② dargestellt, unter ③ ist die Verteilung des Differenzspektrums zwischen behandelten und unbehandelten Zellen auf Basis der ersten fünf Komponenten aus einer Singulärwertzerlegung (Abbildung 5.19 (a) bis (f)) dargestellt. Für die Referenzprobe ergibt sich für alle drei Referenzspektren kein detektierter Wirkstoff. Aus den Referenzproben ergibt sich für die einheitenlosen Faktoren aus der numerischen Singulärwertzerlegung unter ① eine Quantifizierungsgrenze von 0.3 und eine Detektionsgrenze von 0.1 - für die Faktoren unter ② von 0.06 und eine Detektionsgrenze von 0.02 [164, 165]. Die ermittelten Werte verhalten sich relativ zur Intensität des eingesetzten Docetaxel-Referenzspektrums. Ursache für die deutlichen Unterschiede bei den Quantifizierungs- und Detektionsgrenzen zwischen ① und ② ist, dass ② durch eine größere Anzahl an Referenzspektren den spektralen Anteil der biologischen Zellen genauer abbilden kann, während die Singulärwertzerlegung für ① auf Basis des Wirkstoffspektrums und eines einzelnen durchschnittlichen Spektrums einer unbehandelten Zelle durchgeführt wurde. Dies zeigt, dass die Quantisierungsgrenze von hyperspektralen AFM-IR-Messungen von den Referenzspektren beeinflusst und von ihnen maßgeblich abhängig ist. Ein vergleichbares Verhalten ist für STXM-Messungen bekannt [168].

Die Proben, welche mit Docetaxel behandelt wurden, sind in Abbildung 5.23 dargestellt. Die Probe der relative Höhenverteilung (a) wurde mit $0.03 \mu\text{g}$ und die Proben der relative Höhenverteilungen (b) bis (d) mit $0.3 \mu\text{g}$ Docetaxel behandelt. Die mit einer Singulärwertzerlegung berechnete Verteilung des Wirkstoffs Docetaxel ist unter ① und ② dargestellt. Beide Verteilungen basieren auf dem Referenzspektrum des reinen Docetaxels. Für die Zellreferenz nutzt ① nur das Durchschnittsspektrum einer Referenz, ② nutzt die Singulärwertkomponenten aus Kapitel 5.3.1. Zwischen beiden Methoden sind keine drastischen Unterschiede zu erkennen, ① zeigt etwas höhere Konzentrationen als ②. Unter ③ ist die Verteilung des Differenzspektrums zwischen behandelte und unbehandelte Zellregion dargestellt. Im Zellbereich (a) lässt sich der Wirkstoff über einen großen Teil der Messregion finden, ausgenommen sind hiervon die Risse (dunkle Regionen), die Zelle unten rechts und die helle Region neben dem Buchstaben (a). Bereich (b) zeigt ebenfalls Wirkstoff in der zentralen Region, die Zelle links unten und rechts oben enthalten kein Docetaxel. Zonen (c) und (d) enthalten relativ zur untersuchten Fläche weniger Bereiche mit einer Docetaxelanreicherung: In (c) findet sich kein Wirkstoff in der runden Struktur oben und um die Membranen herum. In (d) befindet sich Docetaxel im oberen Bereich der Probe. Unter ③ lassen sich Anteile des Differenzspektrums im gesamten Bereich um die Zellstruktur erkennen. Da das Differenzspektrum neben dem Anteil für den Wirkstoff auch Änderungen der Amid I Bande beinhaltet, ist anzunehmen, dass die Verteilung auch durch Änderungen der

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

biologischen Umgebung beeinflusst wird, welche nach Abtransport oder Abbau des Wirkstoffs Docetaxel verbleiben. Für alle drei Verteilungen ist anzunehmen, dass die im Höhenbild helle Membran als Barriere gewirkt hat und diese sich schräg innerhalb der Probe befindet, sodass der Wirkstoff verschoben erscheint.

Der Wirkstoff wird von den Zellen aufgenommen und ist direkt und labelfrei nachweisbar. Dies bestätigt die in der Literatur beobachtete Abnahme an SCC-25-Zellen nach der Behandlung mit Docetaxel und eine Zunahme des Laminin-V und Abnahme des HIF-1 α [7, 226]. Ebenso deckt es sich mit dem Wirkmechanismus des Docetaxel, welcher die Tubulin-Heterodimere (Teil der Mikrotubuli) innerhalb der Zelle stabilisiert [227]. Eine klare Anreicherung des Wirkstoffs in definierten Regionen ist jedoch nicht sichtbar.

Die AFM-IR-Spektren sind, normiert auf die Amid I-Bande, in ④ dargestellt. Beim schwarzen Spektrum handelt es sich um den Durchschnitt der Referenzmessung aus Abbildung 5.19 (b). Die mit Wirkstoff behandelten Regionen sind für Abbildung 5.23 (a) in Blau und (c) in Rot dargestellt. Auffällig ist hierbei primär die Zunahme der Signale im Bereich der C=O-Doppelschwingungen oberhalb von 1700 cm^{-1} , welche dem Wirkstoff zugeordnet werden können (vgl. Kapitel 5.3.1). Wie das Differenzspektrum in Abbildung 5.21 ist die Intensität des Signals 1718 cm^{-1} relativ zu der Intensität bei 1747 cm^{-1} reduziert. Ursache kann hierbei der spektrale Unterschied zwischen kristallinem Docetaxel in reiner Form und amorphen Docetaxel innerhalb der biologischen Probe sein. Aus der Literatur ist für andere organische Wirkstoffe (z.B. Nifedipin) bekannt, dass amorphe und kristalline Strukturen unterschiedliche IR-Spektren zeigen [225]. Die beobachtete Signalveränderung des Docetaxelspektrums verhält sich hierbei ähnlich zu den Änderung des Spektrums von Nifedipin aus der Literatur. Diese Änderung wurde auf den Verlust von Wasserstoffbrückenbindungen an Esterbindungen zurückgeführt.

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

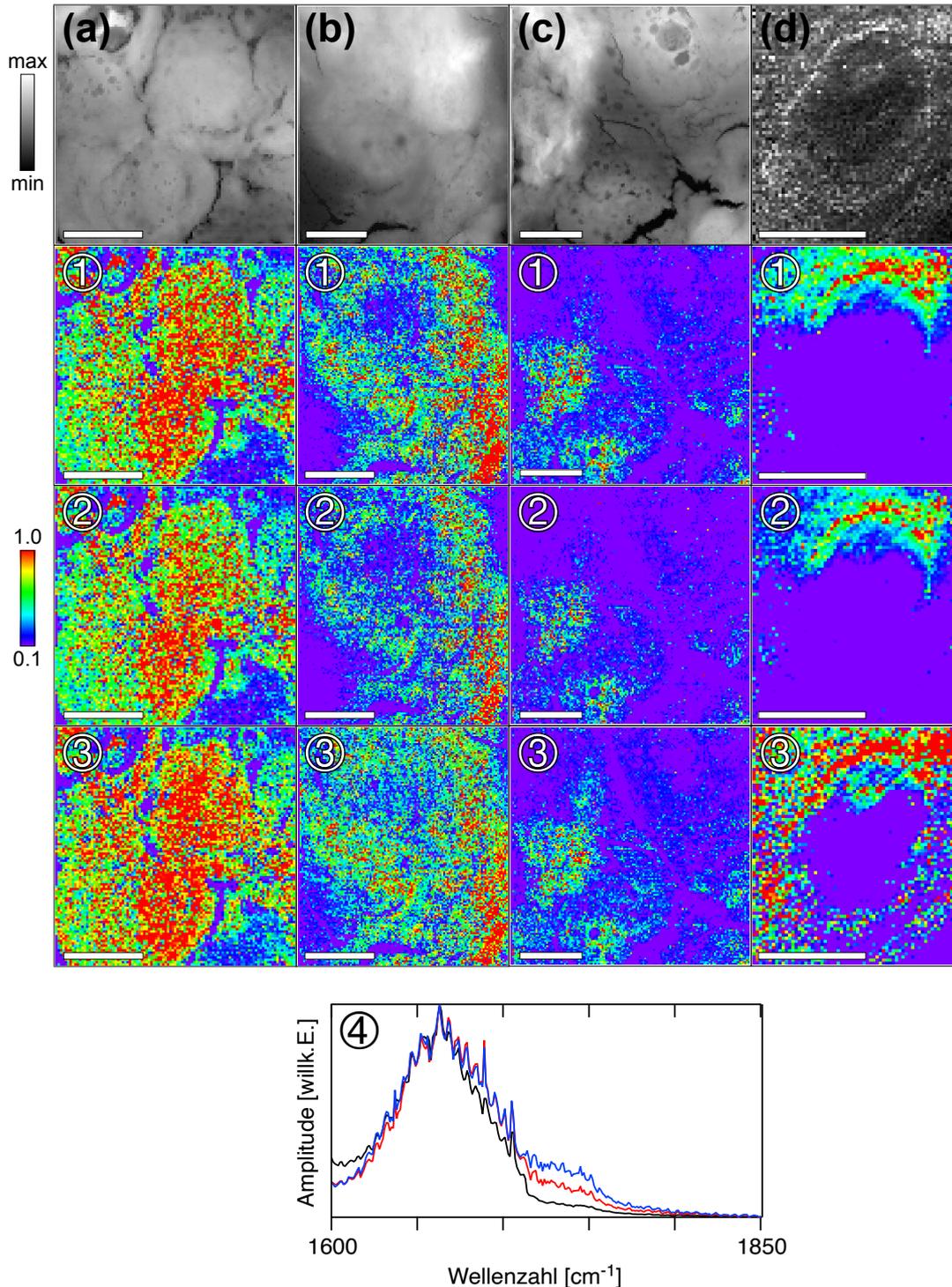


Abbildung 5.23: (a) der relativen Höhenverteilung eines mit 0.03 μg Docetaxel behandelten SCC-25-Tumormodellschnitts, (b) bis (d) die Höhenkanäle einer mit 0.3 μg Docetaxel behandelten Probe, ① die lokale Verteilung des Wirkstoffparameters einer Singulärwertzerlegung auf Basis des Wirkstoffreferenzspektrums und eines durchschnittlichen SCC-25-Referenzzellspektrums, ② die Verteilung auf Basis des Docetaxelspektrums und der fünf Singulärwertkomponenten aus Abbildung 5.19, ③ die Verteilung des Differenzspektrums einer behandelten und einer unbehandelten Zelle auf Basis der fünf Singulärwertkomponenten aus Abbildung 5.19, ④ das Durchschnittsspektrum einer Referenzzelle in Schwarz, von (a) in Blau und von (c) in Rot, die Länge des Maßstabes beträgt 10 μm .

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

Es konnte gezeigt werden, dass der Wirkstoff Docetaxel mithilfe von hyperspektralen AFM-IR-Messungen orts aufgelöst detektiert werden kann. Der Wirkstoff drang bei drei untersuchten Regionen in die Zellen ein, bei einer untersuchten Zelle wirkte die Membran als Barriere für den Wirkstoff. Anhand der AFM-IR-Spektren der behandelten und unbehandelten Zellen wird ersichtlich, dass Docetaxel in der biologischen Probe amorph vorliegt und durch eine geringere Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen eine Abnahme der Esterbande gegenüber der kristallinen Form zeigt. Für eine genauere Detektion mithilfe einer numerischen Singulärwertzerlegung ist es daher für zukünftige Messungen empfehlenswert, die zu detektierenden Wirkstoffe in ein Medium einzubetten, welches die Ausbildung einer kristallinen Struktur verhindert, aber gleichzeitig einen geringen Einfluss oder einen eindeutig herausrechenbaren Einfluss auf das resultierende AFM-IR-Spektrum zeigt. Hierfür könnte das Einbettungsmedium Paraffin genutzt werden, welches im AFM-IR-Spektrum in Abbildung 4.8 (Kapitel 4.1.5) für den untersuchten Bereich wenige Signale zeigt und durch das typische Doppelsignal bei 1462 und 1473 cm^{-1} eindeutig identifizierbar ist.

5.4 Zusammenfassung und Ausblick

Es wurden getrocknete SCC-25-Zellkulturen auf einem Silicium-Träger mit photothermischer Expansion untersucht. Aus den Referenzproben-Messungen wurden mithilfe einer manuellen Methode und einer automatisierten Singulärwertzerlegung Referenzspektren gewonnen, mit denen zusammen mit dem Wirkstoffspektrum zwei Wirkstoffe in verschiedenen Proben mithilfe einer numerischen Singulärwertzerlegung detektiert werden sollten: Hierbei wurde der Wirkstoff Cetuximab im spektralen Bereich 1190 bis 1320 cm^{-1} und der Wirkstoff Docetaxel im Bereich 1600 bis 1850 cm^{-1} untersucht und orts aufgelöst detektiert. Es konnte gezeigt werden, dass der Wirkstoff Cetuximab sowohl bei einer systemischen als auch bei einer topischen Behandlung aufgenommen werden konnte. Die beobachtete Verteilung des Wirkstoffs ist dabei inhomogen. In Messungen aus der Literatur konnte der Wirkstoff in zweidimensionalen Proben in den Zellmembranen [7] gefunden werden. Ursache hierfür ist die Wechselwirkung zwischen Cetuximab und dem Epidermalen Wachstumsfaktor [228, 229]. In anderen Messungen ist ein Eindringen des Wirkstoffs Cetuximab in die Zellen bekannt [5]. Dies deckt sich mit einer labelfreien, hoch aufgelösten Messung (Messpunktabstand 10 nm), anhand der eine Anreicherung des Wirkstoffs innerhalb einer Zelle um die Struktur eines Zellkerns herum sichtbar wurde. Es kann jedoch bei den meisten untersuchten Zellen nicht ausgeschlossen werden, dass die Verteilung durch Membranen parallel zur Schnittebene verursacht werden, da die photothermische Expansionspektroskopie nur das Volumen unterhalb der AFM-Spitze ohne Tiefeninformationen untersuchen kann.

Für den Wirkstoff Cetuximab konnte beispielhaft an einer Zelle gezeigt werden, dass beide Methoden zur Erzeugung der Referenzspektren vergleichbare Ergebnisse in der Wirkstoffverteilung zeigen. Die Nutzung einer Gauß-Doppelkurve zur Reduktion des spektralen Rauschens zeigt ebenfalls eine ähnliche Verteilung, hat allerdings seine Grenzen darin, dass die dickenabhängig variierende Menge der Zellbestandteile das Verhältnis der Maxima der Gaußfunktionen beeinflussen und so zu Fehlinterpretationen führen kann.

Untersuchungen einer Zellkultur, welche mit dem Wirkstoff Docetaxel behandelt wurde, konnten den Wirkstoff in einigen Zellen nachweisen. Hierbei führten sowohl die Nutzung eines einzelnen Durchschnittsspektrums einer Referenzzelle als auch die Nutzung von Singulärwertkomponenten zu vergleichbaren Ergebnissen. Ursächlich hierfür ist das Signal der C=O-Doppelbindungsschwingung des Docetaxels, welches sich in einem spektralen Bereich befindet, in dem es keine intensiven Absorptionen der Zellen gibt.

Die Untersuchungen konnten zeigen, dass AFM-IR-Messungen durch die hohe Sen-

5 Untersuchungen von topisch und systemisch behandelten Zellkulturen

sitivität für unterschiedliche Gruppen geeignet sind, um biologische Substanzen in einem biologischen Medium ohne den Einsatz eines Labels nachzuweisen. Zusätzlich wird gegenüber anderen Methoden eine hohe Ortsauflösung, welche dem Durchmesser der AFM-Spitze entspricht (etwa 10 nm), erreicht. Mit dieser Auflösung konnte die Wirkstoffverteilung von Cetuximab an einer Zellkernmembran betrachtet werden.

Zukünftig besteht neben der Möglichkeit, in anderen Probensystemen die Verteilung von Wirkstoffen und deren Abbauprodukte zu untersuchen, eine große Herausforderung in der Realisierung, zeitsparender zu messen: So könnten Compressed-Sensing-Ansätze [230], welche bereits bei ortsabhängigen IR-Messungen (Optische Rasternahfeldmikroskopie) über einen Algorithmus und eine zufällige Wahl der Messorte und Wellenzahlen schnellere Messungen ohne Verlust ermöglichen, in Zukunft auch für AFM-IR-Messungen Anwendung finden, um den Einfluss z.B. durch Wasserverlust, Schwankungen der Laserintensität und andere dynamische Effekte auf die Messung zu reduzieren.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden menschliche Hautproben untersucht, welche *ex vivo* mit dem Wirkstoff Rapamycin behandelt wurden. Der Wirkstoff wurde in verschiedenen Formulierungen und mithilfe von Redox-Nanocarriern topisch auf die Hautoberfläche aufgetragen. Hautproben, welche fixiert und in dem Epoxidharz Epon® eingebettet wurden, sind mithilfe von Röntgenmikroskopie an der O 1s-Kante hyperspektral untersucht worden. Die Auswertung erfolgte nach dem Lambert-Beer-Gesetz und unter der Nutzung einer numerischen Singulärwertzerlegung auf Basis des Levenberg-Marquart-Algorithmus qualitativ und quantitativ ohne die Verwendung eines Labels. Hierbei zeigten Proben, welche ohne zusätzliche Vorbehandlung mit einer ethanolischen Rapamycin-Formulierung behandelt wurden, keine Aufnahme des Wirkstoffs. Ursache hierfür ist die hohe Masse des Wirkstoffs (914.17 Da) [2]. Die Formulierung auf Basis von Vaseline zeigte bei einer Probe zeitabhängig eine Aufnahme des Wirkstoffs in das Stratum Corneum. Dies beruht zum einen auf dem Effekt der Okklusion [26], zum anderen aber auch auf dem Transport in die Lipide und der Wechselwirkung der Vaseline mit den Lipidschichten [177, 90].

Mithilfe einer Vorbehandlung der Haut durch die Serinprotease Trypsin konnte der Wirkstoff bei Formulierungen auf Basis von Ethanol und von Vaseline in die Haut transportiert werden. Hierbei werden die Membranen der Corneocyten durchlässig und der Wirkstoff kann sich in den Corneocyten anreichern. Bei einer zeitabhängigen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass nach einer kurzen Einwirkzeit von 2 Stunden das vollständige Stratum Corneum für den Wirkstoff zugänglich wird, aber erst nach einer vergleichsweise langen Einwirkzeit und einer daraus resultierenden Beschädigung der Zonula occludens (engl. Tight Junctions) von 16 Stunden der Wirkstoff durch das Stratum Granulosum in die viable Epidermis transportiert werden kann.

Es wurden zwei unterschiedliche Nanocarrier untersucht: Die reduktionssensitiven Nanocarrier rsCMS 1 und die oxidationssensitiven Nanocarrier osCMS 2b [27, 28]. Der Transport der Wirkstoffmoleküle soll durch die lipophile Oberfläche der mit Rapamycin-beladenen Nanocarrier ermöglicht werden.

Es konnte eine Aufnahme beider Nanocarrier in das Stratum Corneum beobachtet werden. Ausgenommen war hierbei ein Probensystem, bei dem kein Nanocarrier aufgenommen werden konnte. Als Ursache wird die Bildung von Agglomeraten oder ein zu großer Durchmesser der Nanocarrier angenommen, wodurch ein Transport in das Stratum Corneum nicht möglich ist.

Es konnte gezeigt werden, dass Rapamycin mithilfe beider Nanocarrier in das Stratum

6 Zusammenfassung

Corneum aufgenommen werden konnte. Hierbei wurde die Freisetzung des Wirkstoffs beobachtet. Nach einer Behandlung der Hautproben für 5 Tage zeigte sich eine Anreicherung des Nanocarrier an den Membranen von Zellkernen der Keratinozyten. Ursächlich ist hierfür die hohe Lipophilie der Nanocarrier sein.

Bei den 5-tägigen Behandlungen wurde ebenfalls eine Anreicherung des Wirkstoffs Rapamycin in Schichten des Stratum Corneums gefunden, welche als Reservoir fungieren können.

Hochaufgelöste Messungen zeigten eine Anlagerung des osCMS 2b Nanocarriers am Übergang der Lipidschichten zu den Corneocyten. Diese Wechselwirkung mit den Corneocytenmembranen wird als Ursache für den Transport des Wirkstoffs in die Corneocyten bei unvorbehandelten Proben angenommen.

Die Verteilung des Wirkstoffs Rapamycin wurde mithilfe von AFM-IR-Messungen an einer Kryoprobe, welche mit Serinprotease vorbehandelt und mit einer Rapamycin-Vaseline-Formulierung behandelt wurde, qualitativ untersucht. Hier konnte eine zur Röntgenmikroskopie vergleichbare Verteilung beobachtet werden. Dies unterstützt nicht nur die Aussagekraft beider Methoden an sich, sondern zeigt auch, dass die Wirkstoffverteilung durch den Fixierungs- und Einbettungsvorgang nicht wesentlich verändert wird.

Es wurden auch Untersuchungen an unbehandelten Referenzproben durchgeführt, welche mit der Serinprotease Trypsin bzw. DBPO vorbehandelt wurden. Ebenso wurden Referenzproben ohne Vorbehandlung gemessen. Hierbei wurde eine Abnahme des $O\ 1s \rightarrow \pi^*$ -Übergangs nach einer Behandlung durch die Serinprotease Trypsin bzw. DBPO beobachtet. Ebenso wurden spektrale Unterschiede in unterschiedlichen Tiefen des Stratum Corneums beobachtet.

In dieser Arbeit wurden ebenfalls SCC-25-Kollagen-Zellkulturen untersucht [7]. In mit dem Wirkstoff Cetuximab systemisch- und topisch-behandelten Proben konnte der Wirkstoff qualitativ mithilfe von AFM-IR-Messungen in Kombination mit numerischen Singulärwertzerlegungen labelfrei nachgewiesen werden. Sowohl die numerischen Singulärwertzerlegungen auf Basis von Referenzreinsubstanzen als auch auf Basis einer Singulärwertzerlegung einer unbehandelten Referenzprobe zeigten am Beispiel einer Probe eine vergleichbare Wirkstoffverteilung. Die damit verglichene Auswertung der spezifischen Signale auf Basis einer Doppel-Gauß-Entfaltung zur Reduktion des Rauschens nach dem Lambert-Beer-Gesetz zeigte ebenfalls eine ähnliche Verteilung, ist jedoch durch eine direkte Auswirkung der vorhandenen Menge an Zellmaterial stärkeren Schwankungen unterworfen als eine numerische Singulärwertzerlegung, welche die biologische Menge durch die Referenzspektren kompensieren kann. Qualitativ konnte auch gezeigt werden, dass das Wirkstoffspektrum durch ein Differenzspektrum von behandelter und un behandelter Probe ersetzt werden kann, ohne Abweichungen

6 Zusammenfassung

bei der räumlichen Verteilung zu beobachten. Dies ermöglicht auch die Bestimmung einer Verteilung unbekannter Substanzen bei hyperspektralen AFM-IR-Messungen.

Eine genaue Zuordnung, ob sich der Wirkstoff innerhalb oder außerhalb der Zellen befindet, kann für die meisten Messregionen nicht getroffen werden, da eine AFM-IR-Messung zwar entlang der Spitzenfläche eine hohe Auflösung hat, jedoch das Volumen unterhalb der Spitze gemessen wird. So kann nicht unterschieden werden, ob sich der Wirkstoff in der Zelle befindet oder sich eine Membran parallel zur Schnittebene befindet. Dass Wirkstoff in die Zellen transportiert werden kann, konnte mithilfe einer hochaufgelösten Messung an einem Zellkern beobachtet werden: Der Wirkstoff reichte sich um die Membran des Zellkerns an. Eine zufällig identisch geformte Membran innerhalb der Schnittebene erscheint hier als unwahrscheinlich.

Vergleichbare Messungen wurden auch mit SCC-25-Kollagen-Zellkulturen durchgeführt, welche topisch mit dem Wirkstoff Docetaxel behandelt wurden. Der Nachweis des Wirkstoffs erfolgte auf Basis des C=O-Doppelbindungssignals des Wirkstoffs bei 1717 cm^{-1} . Bei mehreren Zellen konnte die Aufnahme des Wirkstoffs beobachtet werden.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich Röntgenmikroskopie und AFM-IR in einer Kombination mit einer numerischen Singulärwertzerlegung auf Basis definierter Referenzspektren dazu eignen, Wirkstoffe und andere Substanzen gleichzeitig in einem biologischen System labelfrei, mithilfe hyperspektraler Daten orts aufgelöst nachzuweisen. Hierbei wurde eine Mischung einer nicht-negativen Matrix-Approximation mit einem unteren Schwellenwert bei Null für den Vorfaktor der Spektren der Reinsubstanzen und eine klassische Singulärwertzerlegung ohne Grenzen für den Vorfaktor der genutzten Differenzspektren eingesetzt, um die komplexen biologischen Proben optimal abbilden zu können. Ebenfalls können spektrale Verschiebungen von Einzelsubstanzen berücksichtigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die vorherrschende Heterogenität der lokalen Zusammensetzung von biologischen Proben sowohl über die Kenntnis aller eingesetzten Referenzsubstanzen und mehrerer lokaler Spektren einer Referenzprobe als auch über die Nutzung mit einer Singulärwertzerlegung erzeugten Spektren einer Referenzprobe dargestellt werden kann.

Literaturverzeichnis

- [1] Balato, A., Caprio, R. D., Lembo, S., Mattii, M., Megna, M., Schiattarella, M., Tarantino, G., Balato, N., Ayala, F. & Monfrecola, G. Mammalian Target of Rapamycin in Inflammatory Skin Conditions. *Eur. J. Inflamm.* **12**, 341–350 (2014).
<https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1721727X1401200213>.
- [2] Bos, J. D. & Meinardi, M. M. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp. Dermatol.* **9**, 165–169 (2000).
<http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-0625.2000.009003165.x>.
- [3] Hearnden, V., Sankar, V., Hull, K., Juras, D. V., Greenberg, M., Kerr, A. R., Lockhart, P. B., Patton, L. L., Porter, S. & Thornhill, M. H. New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 16–28 (2012).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X11000433>.
- [4] Döge, N., Hönzke, S., Schumacher, F., Balzus, B., Colombo, M., Hadam, S., Rancan, F., Blume-Peytavi, U., Schäfer-Korting, M., Schindler, A., Rühl, E., Skov, P. S., Church, M. K., Hedtrich, S., Kleuser, B., Bodmeier, R. & Vogt, A. Ethyl cellulose nanocarriers and nanocrystals differentially deliver dexamethasone into intact, tape-stripped or sodium lauryl sulfate-exposed ex vivo human skin - assessment by intradermal microdialysis and extraction from the different skin layers. *J. Control. Release* **242**, 25–34 (2016).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365916304345>.
- [5] Nessler, I., Cilliers & Thurber, G. Practical Guide for Quantification of In Vivo Degradation Rates for Therapeutic Proteins with Single-Cell Resolution Using Fluorescence Ratio Imaging. *Pharmaceutics* **12**, 132 (2020).
<https://www.mdpi.com/1999-4923/12/2/132>.
- [6] Zheng, X.-S., Jahn, I. J., Weber, K., Cialla-May, D. & Popp, J. Label-free SERS in biological and biomedical applications: Recent progress, current challenges and opportunities. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **197**, 56–77 (2018).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386142518300878>.
- [7] Gronbach, L., Wolff, C., Klinghammer, K., Stellmacher, J., Jurmeister, P., Alexiev, U., Schäfer-Korting, M., Tinhofer, I., Keilholz, U. & Zoschke, C. A multilayered epithelial mucosa model of head neck squamous cell carcinoma for analysis of

LITERATURVERZEICHNIS

- tumor-microenvironment interactions and drug development. *Biomaterials* **258**, 120277 (2020).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961220305238>.
- [8] Stöhr, J. *NEXAFS spectroscopy*. No. 25 in Springer series in surface sciences (Springer, Berlin ; New York, 1996), 1st ed. corr. print edn.
- [9] Dazzi, A., Prater, C. B., Hu, Q., Chase, D. B., Rabolt, J. F. & Marcott, C. AFM–IR: Combining Atomic Force Microscopy and Infrared Spectroscopy for Nanoscale Chemical Characterization. *Appl. Spectrosc.* **66**, 1365–1384 (2012).
<https://journals.sagepub.com/doi/10.1366/12-06804>.
- [10] Dazzi, A. & Prater, C. B. AFM-IR: Technology and Applications in Nanoscale Infrared Spectroscopy and Chemical Imaging. *Chem. Rev.* **117**, 5146–5173 (2017).
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.6b00448>.
- [11] Meglio, P. D., Perera, G. K. & Nestle, F. O. The Multitasking Organ: Recent Insights into Skin Immune Function. *Immunity* **35**, 857–869 (2011).
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761311005127>.
- [12] Ovaere, P., Lippens, S., Vandenabeele, P. & Declercq, W. The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 453–463 (2009).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0968000409001364?via%3Dihub>.
- [13] Elias, P. M., Holleran, W. M., Feingold, K. R., Tsai, J. & Menon, G. K. The Potential of Metabolic Interventions to Enhance Transdermal Drug Delivery. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **7**, 79–85 (2002).
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X1552928X>.
- [14] Brown, M. B., Traynor, M. J., Martin, G. P. & Akomeah, F. K. Transdermal Drug Delivery Systems: Skin Perturbation Devices. In Walker, J. & Jain, K. K. (eds.) *Drug Delivery Systems*, vol. 437, 119–139 (Humana Press, Totowa, NJ, 2008).
http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-210-6_5.
- [15] Williams, A. C. & Barry, B. W. Penetration enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 603–618 (2004).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0169409X03002412?via%3Dihub>.

LITERATURVERZEICHNIS

- [16] Gupta, M., Agrawal, U. & Vyas, S. P. Nanocarrier-based topical drug delivery for the treatment of skin diseases. *Expert Opin. Drug Deliv.* **9**, 783–804 (2012).
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425247.2012.686490>.
- [17] Levin, J., Friedlander, S. F. & Del Rosso, J. Q. Atopic dermatitis and the stratum corneum: part 2: other structural and functional characteristics of the stratum corneum barrier in atopic skin. *J Clin Aesthet Dermatol* **6**, 49–54 (2013).
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24307926/>.
- [18] Voegeli, R., Rawlings, A. V., Breternitz, M., Doppler, S., Schreier, T. & Fluhr, J. W. Increased stratum corneum serine protease activity in acute eczematous atopic skin. *Br. J. Dermatol.* **161**, 70–77 (2009).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2133.2009.09142.x>.
- [19] Voegeli, R., Doppler, S., Joller, P., Breternitz, M., Fluhr, J. W. & Rawlings, A. V. Increased mass levels of certain serine proteases in the stratum corneum in acute eczematous atopic skin. *Int. J. Cosmet. Sci.* **33**, 560–565 (2011).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1468-2494.2011.00671.x>.
- [20] Rheinwald, J. G. & Beckett, M. A. Tumorigenic Keratinocyte Lines Requiring Anchorage and Fibroblast Support Cultured from Human Squamous Cell Carcinomas. *Cancer Res.* **41**, 1657–1663 (1981).
<https://cancerres.aacrjournals.org/content/41/5/1657>.
- [21] Wang, H., Wu, B. & Wang, H. Alpha-hederin induces the apoptosis of oral cancer SCC-25 cells by regulating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Electron. J. Biotechnol.* **38**, 27–31 (2019).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0717345819300016>.
- [22] Küçükgüven, M. B. & Çelebi Saltik, B. Different Aspects of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Cancer Stem Cells, their Niche and Targeted Therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* **16**, 286–306 (2021).
<https://www.eurekaselect.com/186160/article>.
- [23] Abraham, R. T. & Wiederrecht, G. J. Immunopharmacology of rapamycin. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 483–510 (1996).
<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.14.1.483>.
- [24] Smith, A. B., Condon, S. M., McCauley, J. A., Leazer, J. L., Leahy, J. W. & Malczka, R. E. Total Synthesis of Rapamycin and Demethoxyrapamycin. *J. Am.*

LITERATURVERZEICHNIS

- Chem. Soc.* **117**, 5407–5408 (1995).
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00124a043>.
- [25] Nicolaou, K. C., Chakraborty, T. K., Piscopio, A. D., Minowa, N. & Bertinato, P. Total synthesis of rapamycin. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 4419–4420 (1993).
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00063a093>.
- [26] Zhai, H. & Maibach, H. I. Occlusion vs. skin barrier function. *Skin Res. Technol.* **8**, 1–6 (2002).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.0909-752x.2001.10311.x>.
- [27] Rajes, K., Walker, K. A., Hadam, S., Zabihi, F., Ibrahim-Bacha, J., Germer, G., Patoka, P., Wassermann, B., Rancan, F., Rühl, E., Vogt, A. & Haag, R. Oxidation-Sensitive Core–Multishell Nanocarriers for the Controlled Delivery of Hydrophobic Drugs. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **7**, 2485–2495 (2021).
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsbiomaterials.0c01771>.
- [28] Rajes, K., Walker, K. A., Hadam, S., Zabihi, F., Rancan, F., Vogt, A. & Haag, R. Redox-Responsive Nanocarrier for Controlled Release of Drugs in Inflammatory Skin Diseases. *Pharmaceutics* **13**, 37 (2021).
<https://www.mdpi.com/1999-4923/13/1/37>.
- [29] Blick, S. K. A. & Scott, L. J. Cetuximab. *Drugs* **67**, 2585–2607 (2007).
<https://link.springer.com/article/10.2165/00003495-200767170-00008>.
- [30] Lozada-Nur, F. & Miranda, C. Oral lichen planus: Topical and systemic therapy. *Semin Cutan Med Surg* **16**, 295–300 (1997).
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1085562997800193>.
- [31] Cortes, J. E. & Pazdur, R. Docetaxel. *J. Clin. Oncol.* **13**, 2643–2655 (1995).
<https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.1995.13.10.2643>.
- [32] Lyseng-Williamson, K. A. & Fenton, C. Docetaxel. *Drugs* **65**, 2513–2531 (2005).
<https://link.springer.com/article/10.2165/00003495-200565170-00007>.
- [33] Figgitt, D. P. & Wiseman, L. R. Docetaxel. *Drugs* **59**, 621–651 (2000).
<https://link.springer.com/article/10.2165/00003495-200059030-00015>.
- [34] Hollas, J. M. *Modern Spectroscopy* (Wiley, Chichester, England, 2013).
- [35] Kragh, H. Photon: New light on an old name. *ArXiv.org* (2014).
<https://arxiv.org/abs/1401.0293>.

LITERATURVERZEICHNIS

- [36] Einstein, A. Über einen die Erzeugung und Verwandlung des Lichtes betreffenden heuristischen Gesichtspunkt. *Ann. Phys. (Berl.)* **322**, 132–148 (1905).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/andp.19053220607>.
- [37] Valeur, B. & Berberan-Santos, M. N. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2012).
<http://doi.wiley.com/10.1002/9783527650002>.
- [38] Bambynek, W., Crasemann, B., Fink, R. W., Freund, H. U., Mark, H., Swift, C. D., Price, R. E. & Rao, P. V. X-Ray Fluorescence Yields, Auger, and Coster-Kronig Transition Probabilities. *Rev. Mod. Phys.* **44**, 716–813 (1972).
<https://link.aps.org/doi/10.1103/RevModPhys.44.716>.
- [39] Bouguer, M. *Essai d'optique, sur la gradation de la lumière*. (A Paris : chez Claude Jombert, Paris, Frankreich, 1729).
https://archive.org/details/UFIE003101_T00324_PNI-2703_000000.
- [40] Lambert, I. H. *Photometria sive de mensura et gradibus luminis, colorum et umbrae* (Aumptibus viduae Eberhardi Klett, Paris, Frankreich, 1760).
https://archive.org/details/T00E039861_T00324_PNI-2733_000000.
- [41] Beer, A. Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten. *Ann. Phys.* **162**, 78–88 (1852).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/andp.18521620505>.
- [42] Henke, B. L., White, R. & Lundberg, B. Semiempirical Determination of Mass Absorption Coefficients for the 5 to 50 Angstrom X-Ray Region. *J. Appl. Phys.* **28**, 98–105 (1957).
<https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1722580>.
- [43] Yamamoto, K., Flesch, R., Ohigashi, T., Hedtrich, S., Klossek, A., Patoka, P., Ulrich, G., Ahlberg, S., Rancan, F., Vogt, A., Blume-Peytavi, U., Schrade, P., Bachmann, S., Schäfer-Korting, M., Kosugi, N. & Rühl, E. Selective Probing of the Penetration of Dexamethasone into Human Skin by Soft X-ray Spectromicroscopy. *Anal. Chem.* **87**, 6173–6179 (2015).
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.5b00800>.
- [44] Zhang, X., Balhorn, R., Mazrimas, J. & Kirz, J. Mapping and Measuring DNA to Protein Ratios in Mammalian Sperm Head by XANES Imaging. *J. Struct. Biol.* **116**, 335–344 (1996).
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1047847796900519>.

LITERATURVERZEICHNIS

- [45] Lehmann, J., Liang, B., Solomon, D., Lerotic, M., Luizão, F., Kinyangi, J., Schäfer, T., Wirick, S. & Jacobsen, C. Near-edge X-ray absorption fine structure (NEXAFS) spectroscopy for mapping nano-scale distribution of organic carbon forms in soil: Application to black carbon particles. *Global Biogeochem Cycles* **19**, GB1013 (2005).
<https://agupubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1029/2004GB002435>.
- [46] Wille, K. Synchrotron radiation sources. *Rep. Prog. Phys.* **54**, 1005–1067 (1991).
https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-81297-2_1.
- [47] Hitchcock, A. P., Dynes, J. J., Johansson, G., Wang, J. & Botton, G. Comparison of NEXAFS microscopy and TEM-EELS for studies of soft matter. *Micron* **39**, 741–748 (2008).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968432808001443>.
- [48] Warwick, T., Franck, K., Kortright, J. B., Meigs, G., Moronne, M., Myneni, S., Rotenberg, E., Seal, S., Steele, W. F., Ade, H., Garcia, A., Cerasari, S., Denlinger, J., Hayakawa, S., Hitchcock, A. P., Tyliszczak, T., Kikuma, J., Rightor, E. G., Shin, H.-J. & Tonner, B. P. A scanning transmission x-ray microscope for materials science spectromicroscopy at the advanced light source. *Rev. Sci. Instrum.* **69**, 2964–2973 (1998).
<https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1149041>.
- [49] Kilcoyne, A. L. D., Tyliszczak, T., Steele, W. F., Fakra, S., Hitchcock, P., Franck, K., Anderson, E., Harteneck, B., Rightor, E. G., Mitchell, G. E., Hitchcock, A. P., Yang, L., Warwick, T. & Ade, H. Interferometer-controlled scanning transmission X-ray microscopes at the Advanced Light Source. *J. Synchrotron Radiat.* **10**, 125–136 (2003).
<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0909049502017739>.
- [50] de Smit, E., Swart, I., Creemer, J. F., Hoveling, G. H., Gilles, M. K., Tyliszczak, T., Kooyman, P. J., Zandbergen, H. W., Morin, C., Weckhuysen, B. M. & de Groot, F. M. F. Nanoscale chemical imaging of a working catalyst by scanning transmission X-ray microscopy. *Nature* **456**, 222–225 (2008).
<http://www.nature.com/articles/nature07516>.
- [51] McMillan, E. M. The Synchrotron—A Proposed High Energy Particle Accelerator. *Phys. Rev.* **68**, 143–144 (1945).
<https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRev.68.143>.

LITERATURVERZEICHNIS

- [52] Webb, G. W., Minin, I. V. & Minin, O. V. Variable Reference Phase in Diffractive Antennas: Review, Applications, New Results. *IEEE Antennas Propag Mag* **53**, 77–94 (2011).
<https://ieeexplore.ieee.org/document/5949329>.
- [53] Thompson, A., Attwood, D., Gullikson, E., Howells, M., Kim, K.-J., Kirz, J., Kortright, J., Lindau, I., Liu, Y., Pianetta, P., Robinson, A., Scofield, J., Underwood, J., Williams, G. & Winick, H. *X-ray data booklet* (Lawrence Berkeley National Laboratory, 2009).
<https://xdb.lbl.gov>.
- [54] Foord, R., Jones, R., Oliver, C. J. & Pike, E. R. The Use of Photomultiplier Tubes for Photon Counting. *Appl. Opt.* **8**, 1975–1989 (1969).
<http://opg.optica.org/ao/abstract.cfm?URI=ao-8-10-1975>.
- [55] Skrabal, P. M. *Spektroskopie: eine methodenübergreifende Darstellung vom UV-bis zum NMR-Bereich*. No. 8355 in UTB Chemie, Naturwissenschaften, Medizin (vdf Hochschulverlag, Zürich, 2009).
- [56] Weigend, F. & Ahlrichs, R. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **7**, 3297–3305 (2005).
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2005/CP/b508541a>.
- [57] Neese, F. The ORCA program system. *WIREs Comput Mol Sci* **2**, 73–78 (2012).
<https://wires.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/wcms.81>.
- [58] Faist, J., Capasso, F., Sivco, D. L., Sirtori, C., Hutchinson, A. L. & Cho, A. Y. Quantum Cascade Laser. *Science* **264**, 553–556 (1994).
<https://science.sciencemag.org/content/264/5158/553>.
- [59] Belkin, M. A. & Capasso, F. New frontiers in quantum cascade lasers: high performance room temperature terahertz sources. *Phys. Scr.* **90**, 118002 (2015).
<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0031-8949/90/11/118002>.
- [60] Gmachl, C., Capasso, F., Sivco, D. L. & Cho, A. Y. Recent progress in quantum cascade lasers and applications. *Rep. Prog. Phys.* **64**, 1533–1601 (2001).
<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0034-4885/64/11/204>.
- [61] Curl, R. F., Capasso, F., Gmachl, C., Kosterev, A. A., McManus, B., Lewicki, R., Pusharsky, M., Wysocki, G. & Tittel, F. K. Quantum cascade lasers in chemical physics. *Chem. Phys. Lett.* **487**, 1–18 (2010).
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009261409016200>.

LITERATURVERZEICHNIS

- [62] Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930–933 (1986).
<https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.56.930>.
- [63] Mason, E. A. Transport Properties of Gases Obeying a Modified Buckingham (Exp-Six) Potential. *J. Chem. Phys.* **22**, 169–186 (1954).
<https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1740026>.
- [64] Zhong, Q., Inniss, D., Kjoller, K. & Elings, V. Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy. *Surf. Sci.* **290**, L688–L692 (1993).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016725849390906Y>.
- [65] Gross, L., Mohn, F., Moll, N., Liljeroth, P. & Meyer, G. The Chemical Structure of a Molecule Resolved by Atomic Force Microscopy. *Science* **325**, 1110–1114 (2009).
<https://science.sciencemag.org/content/325/5944/1110>.
- [66] Jahng, J., Potma, E. O. & Lee, E. S. Tip-Enhanced Thermal Expansion Force for Nanoscale Chemical Imaging and Spectroscopy in Photoinduced Force Microscopy. *Anal. Chem.* **90**, 11054–11061 (2018).
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.8b02871>.
- [67] Gronbach, L., Jurmeister, P., Schäfer-Korting, M., Keilholz, U., Tinhofer, I. & Zoschke, C. Primary Extracellular Matrix Enables Long-Term Cultivation of Human Tumor Oral Mucosa Models. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 1379 (2020).
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2020.579896>.
- [68] Brown, J. C. & Timpl, R. The Collagen Superfamily. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **107**, 484–490 (1995).
<https://www.karger.com/Article/FullText/237090>.
- [69] Grumezescu, A. M. *Nanoarchitectonics in Biomedicine*. 437-472 (William Andrew Publishing, New York, USA, 2019).
- [70] Forslind, B., Engström, S., Engblom, J. & Norlén, L. A novel approach to the understanding of human skin barrier function. *J. Dermatol. Sci.* **14**, 115–125 (1997).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923181196005592?via%3Dihub>.

LITERATURVERZEICHNIS

- [71] Hibbs, R. G., Burch, G. E. & Phillips, J. H. The fine structure of the small blood vessels of normal human dermis and subcutis. *Am. Heart J.* **56**, 662–670 (1958).
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0002870358902096>.
- [72] Elias, P. M. & Friend, D. S. The permeability barrier in mammalian epidermis. *J. Cell Biol.* **65**, 180–191 (1975).
<https://rupress.org/jcb/article/65/1/180/48192/The-permeability-barrier-in-mammalian-epidermis>.
- [73] Bouwstra, J. A. & Honeywell-Nguyen, P. L. Skin structure and mode of action of vesicles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, S41–S55 (2002).
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X0200114X>.
- [74] Odland, G. F. The Fine Structure of the Interrelationship of Cells in the Human Epidermis. *J. biophys. biochem. cytol.* **4**, 529–538 (1958).
<https://rupress.org/jcb/article/4/5/529/15739/The-Fine-Structure-of-the-Interrelationship-of>.
- [75] Odland, G. F. The morphology of the attachment between the dermis and the epidermis. *Anat. Rec.* **108**, 399–413 (1950).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.1091080305>.
- [76] Kirschner, N. & Brandner, J. M. Barriers and more: functions of tight junction proteins in the skin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1257**, 158–166 (2012).
<https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1749-6632.2012.06554.x>.
- [77] Neubert, R. & Wepf, R. Stratum corneum: Struktur und Morphologie einer Barriere. *Pharm. Ztg.* **152**, 14–21 (2007).
<https://www.pharmazeutische-zeitung.de/ausgabe-172007/stratum-corneum-struktur-und-morphologie-einer-barriere/>.
- [78] Lampe, M. A., Burlingame, A. L., Whitney, J., Williams, M. L., Brown, B. E., Roitman, E. & Elias, P. M. Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *J. Lipid Res.* **24**, 120–130 (1983).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022227520380056>.
- [79] Woodard, H. Q. & White, D. R. The composition of body tissues. *Br. J. Radiol.* **59**, 1209–1218 (1986).
<https://www.birpublications.org/doi/10.1259/0007-1285-59-708-1209>.
- [80] Warner, R. R., Myers, M. C. & Taylor, D. A. Electron probe analysis of human skin: Element concentration profiles. *J. Invest. Dermatol.* **90**, 78–85 (1988).

LITERATURVERZEICHNIS

- [https://www.jidonline.org/article/0022-202X\(88\)92128-8/abstract](https://www.jidonline.org/article/0022-202X(88)92128-8/abstract). Publisher: Elsevier.
- [81] Barry, B. W. Drug delivery routes in skin: a novel approach. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, S31–S40 (2002).
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X02001138>.
- [82] Lademann, J., Richter, H., Meinke, M., Lange-Asschenfeldt, B., Antoniou, C., Mak, W., Renneberg, R., Sterry, W. & Patzelt, A. Drug Delivery with Topically Applied Nanoparticles: Science Fiction or Reality. *Skin Pharmacol. Physiol.* **26**, 227–233 (2013).
<https://www.karger.com/DOI/10.1159/000351940>.
- [83] Lademann, J., Knorr, F., Richter, H., Jung, S., Meinke, M., Rühl, E., Alexiev, U., Calderon, M. & Patzelt, A. Hair follicles as a target structure for nanoparticles. *J Innov Opt Health Sci* **8**, 1530004 (2014).
<https://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S1793545815300049>.
- [84] Asmani, F., Khan, J., Nur, J. S., Al-Dhalli, S., Budiasih, S., Akram, J., Kaleemullah, M., Suliman, R., G, M., Abdullah, I., Todo, H., Sugibayashi, K. & Yusuf, E. Determination of permeation pathway of gentamicin into pigs ear skin. *Int. Res. J. Pharm.* **6**, 183–190 (2015).
http://www.irjponline.com/admin/php/uploads/2322_pdf.pdf.
- [85] Wiechers, J. W. The barrier function of the skin in relation to percutaneous absorption of drugs. *Pharm. Weekbl.* **11**, 185–198 (1989).
<https://link.springer.com/article/10.1007/BF01959410>.
- [86] Michaels, A. S., Chandrasekaran, S. K. & Shaw, J. E. Drug permeation through human skin: Theory and invitro experimental measurement. *AIChE Journal* **21**, 985–996 (1975).
<https://aiche.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/aic.690210522>.
- [87] Michaels, A. S., Chandrasekaran, S. K. & Shaw, J. E. Drug permeation through human skin: Theory and invitro experimental measurement. *AIChE Journal* **21**, 985–996 (1975).
<https://aiche.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/aic.690210522>.
- [88] Abraham, M. H., Chadha, H. S. & Mitchell, R. C. The Factors that Influence Skin Penetration of Solutes. *J. Pharm. Pharmacol.* **47**, 8–16 (2011).
<https://academic.oup.com/jpp/article-abstract/47/1/8/6152220?redirectedFrom=fulltext>.

LITERATURVERZEICHNIS

- [89] Patzelt, A., Lademann, J., Richter, H., Darvin, M. E., Schanzer, S., Thiede, G., Sterry, W., Vergou, T. & Hauser, M. In vivo investigations on the penetration of various oils and their influence on the skin barrier. *Skin Res Technol* **18**, 364–369 (2012).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0846.2011.00578.x>.
- [90] Choe, C.-S., Lademann, J. & Darvin, M. E. Gaussian-function-based deconvolution method to determine the penetration ability of petrolatum oil into in vivo human skin using confocal Raman microscopy. *Laser Phys.* **24**, 105601 (2014).
<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1054-660X/24/10/105601>.
- [91] Oertel, R. P. Protein conformational changes induced in human stratum corneum by organic sulfoxides: An infrared spectroscopic investigation. *Biopolymers* **16**, 2329–2345 (1977).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bip.1977.360161017>.
- [92] Hoogstraate, A. J., Verhoef, J., Brussee, J., IJzerman, A. P., Spies, F. & Boddé, H. E. Kinetics, ultrastructural aspects and molecular modelling of transdermal peptide flux enhancement by N-alkylazacycloheptanones. *Int. J. Pharm.* **76**, 37–47 (1991).
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037851739190341K>.
- [93] Pershing, L. K., Lambert, L. D. & Knutson, K. Mechanism of Ethanol-Enhanced Estradiol Permeation Across Human Skin in Vivo. *Pharm. Res.* **7**, 170–175 (1990).
<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1015832903398>.
- [94] Megrab, N. A., Williams, A. C. & Barry, B. W. Oestradiol permeation through human skin and silastic membrane: effects of propylene glycol and supersaturation. *J. Control. Release* **36**, 277–294 (1995).
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016836599500062D>.
- [95] Binder, L., Mazál, J., Petz, R., Klang, V. & Valenta, C. The role of viscosity on skin penetration from cellulose ether-based hydrogels. *Skin Res Technol* **25**, 725–734 (2019).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/srt.12709>.
- [96] Ormerod, A. D., Shah, S. A. A., Copeland, P., Omar, G. & Winfield, A. Treatment of psoriasis with topical sirolimus: preclinical development and a randomized, double-blind trial. *Br. J. Dermatol.* **152**, 758–764 (2005).

LITERATURVERZEICHNIS

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2133.2005.06438.x>.

x.

- [97] Sun, L., Liu, Z., Lin, Z., Cun, D., Tong, H., Yan, R., Wang, R. & Zheng, Y. Comparison of normal versus imiquimod-induced psoriatic skin in mice for penetration of drugs and nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **13**, 5625–5635 (2018).
<https://www.dovepress.com/comparison-of-normal-versus-imiquimod-induced-psoriatic-skin-in-mice-f-peer-reviewed-fulltext-article-IJN>.
- [98] Ghadially, R., Reed, J. T. & Elias, P. M. Stratum Corneum Structure and Function Correlates with Phenotype in Psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* **107**, 558–564 (1996).
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15427046>.
- [99] Bieber, T. Atopic dermatitis. *Ann Dermatol* **22**, 125–137 (2010).
- [100] Heutinck, K. M., ten Berge, I. J., Hack, C. E., Hamann, J. & Rowshani, A. T. Serine proteases of the human immune system in health and disease. *Mol. Immunol.* **47**, 1943–1955 (2010).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589010001598>.
- [101] Soualmia, F. & Amri, C. E. Serine protease inhibitors to treat inflammation: a patent review (2011-2016). *Expert Opin. Ther. Pat.* **28**, 93–110 (2018).
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13543776.2018.1406478>.
- [102] Hachem, J.-P., Crumrine, D., Fluhr, J., Brown, B. E., Feingold, K. R. & Elias, P. M. pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis, and stratum corneum integrity/cohesion. *J. Invest. Dermatol.* **121**, 345–353 (2003).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15303675?via%3Dihub>.
- [103] Hachem, J.-P., Man, M.-Q., Crumrine, D., Uchida, Y., Brown, B. E., Rogiers, V., Roseeuw, D., Feingold, K. R. & Elias, P. M. Sustained Serine Proteases Activity by Prolonged Increase in pH Leads to Degradation of Lipid Processing Enzymes and Profound Alterations of Barrier Function and Stratum Corneum Integrity. *J. Invest. Dermatol.* **125**, 510–520 (2005).
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15324271>.
- [104] Roller, S., Zhou, H. & Haag, R. High-loading polyglycerol supported reagents for Mitsunobu- and acylation-reactions and other useful polyglycerol derivatives.

LITERATURVERZEICHNIS

- Mol. Divers.* **9**, 305–316 (2005).
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11030-005-8117-y>.
- [105] Dommisch, H., Stolte, K., Jager, J., Vogel, K., Müller, R., Hedtrich, S., Unbehauen, M., Haag, R. & Danker, K. Characterization of an ester-based core-multishell (CMS) nanocarrier for the topical application at the oral mucosa. *Clin Oral Investig* **25**, 5795–5805 (2021).
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00784-021-03884-x>.
- [106] Vézina, C., Kudelski, A. & Sehgal, S. N. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot.* **28**, 721–726 (1975).
<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/antibiotics1968/28.721?from=CrossRef>.
- [107] Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Guo, A. C., Lo, E. J., Marcu, A., Grant, J. R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Sayeeda, Z., Assempour, N., Iynkkaran, I., Liu, Y., Maciejewski, A., Gale, N., Wilson, A., Chin, L., Cummings, R., Le, D., Pon, A., Knox, C. & Wilson, M. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* **46**, D1074–D1082 (2018).
<http://academic.oup.com/nar/article/46/D1/D1074/4602867>.
- [108] Sehgal, S. N., Baker, H. & Vézina, C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot.* **28**, 727–732 (1975).
<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/antibiotics1968/28.727?from=CrossRef>.
- [109] Yeh, W. C., Bierer, B. E. & McKnight, S. L. Rapamycin inhibits clonal expansion and adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 11086–11090 (1995).
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.92.24.11086>.
- [110] Weischer, M., Röcken, M. & Berneburg, M. Calcineurin inhibitors and rapamycin: cancer protection or promotion? *Exp. Dermatol.* **16**, 385–393 (2007).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0625.2007.00555.x>.
- [111] Siekierka, J. J. Probing T-cell signal transduction pathways with the immunosuppressive drugs, FK-506 and rapamycin. *Immunol. Res.* **13**, 110–116 (1994).
<http://link.springer.com/10.1007/BF02918272>.

LITERATURVERZEICHNIS

- [112] Albers, M. W., Williams, R. T., Brown, E. J., Tanaka, A., Hall, F. L. & Schreiber, S. L. FKBP-rapamycin inhibits a cyclin-dependent kinase activity and a cyclin D1-Cdk association in early G1 of an osteosarcoma cell line. *J. Biol. Chem.* **268**, 22825–22829 (1993).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002192581841602X?via%3Dihub>.
- [113] Wicker, L. S., Boltz, R. C. J., Matt, V., Nichols, E. A., Peterson, L. B. & Sigal, N. H. Suppression of B cell activation by cyclosporin A, FK506 and rapamycin. *Eur. J. Immunol.* **20**, 2277–2283 (1990).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.1830201017>.
- [114] Calne, R. Y., Lim, S., Samaan, A., Collier, D. S. J., Pollard, S. G., White, D. J. G. & Thiru, S. Rapamycin for immunosuppression in organ allografting. *Lancet* **334**, 227 (1989).
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673689904170>.
- [115] Euvrard, S., Ulrich, C. & Lefrancois, N. Immunosuppressants and Skin Cancer in Transplant Patients: Focus on Rapamycin. *Dermatol. Surg.* **30**, 628–633 (2004).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1524-4725.2004.30148.x>.
- [116] Douros, J. & Suffness, M. New antitumor substances of natural origin. *Cancer Treat. Rev.* **8**, 63–87 (1981).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305737281800060?via%3Dihub>.
- [117] Takeshita, S., Ichikawa, T., Taura, N., Miyaaki, H., Matsuzaki, T., Otani, M., Muraoka, T., Akiyama, M., Miuma, S., Ozawa, E., Ikeda, M., Kato, N., Isomoto, H., Takeshima, F. & Nakao, K. Geranylgeranylacetone has anti-hepatitis C virus activity via activation of mTOR in human hepatoma cells. *J. Gastroenterol.* **47**, 195–202 (2012).
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00535-011-0481-z>.
- [118] Maiese, K. The Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR): Novel Considerations as an Antiviral Treatment. *Curr. Neurovasc. Res.* **17**, 332–337 (2020).
<https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cnr/2020/00000017/00000003/art00016>.

LITERATURVERZEICHNIS

- [119] Sehgal, S. N., Molnar-Kimber, K., Ocain, T. D. & Weichman, B. M. Rapamycin: a novel immunosuppressive macrolide. *Med. Res. Rev.* **14**, 1–22 (1994).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/med.2610140102>.
- [120] Chung, C. L., Lawrence, I., Hoffman, M., Elgindi, D., Nadhan, K., Potnis, M., Jin, A., Sershon, C., Binnebose, R., Lorenzini, A. & Sell, C. Topical rapamycin reduces markers of senescence and aging in human skin: an exploratory, prospective, randomized trial. *GeroScience* **41**, 861–869 (2019).
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11357-019-00113-y>.
- [121] Trepanier, D. J., Gallant, H., Legatt, D. F. & Yatscoff, R. W. Rapamycin: distribution, pharmacokinetics and therapeutic range investigations: an update. *Clin. Biochem.* **31**, 345–351 (1998).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912098000484>.
- [122] Yatscoff, R. W., Wang, P., Chan, K., Hicks, D. & Zimmerman, J. Rapamycin: Distribution, Pharmacokinetics, and Therapeutic Range Investigations. *Ther Drug Monit* **17**, 666–671 (1995).
https://journals.lww.com/drug-monitoring/Fulltext/1995/12000/Rapamycin__Distribution,_Pharmacokinetics,_and.20.aspx.
- [123] Buerger, C., Malisiewicz, B., Eiser, A., Hardt, K. & Boehncke, W. Mammalian target of rapamycin and its downstream signalling components are activated in psoriatic skin. *Br. J. Dermatol.* **169**, 156–159 (2013).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/bjd.12271>.
- [124] Young, C. N., Koepke, J. I., Terlecky, L. J., Borkin, M. S., Boyd, S. L. & Terlecky, S. R. Reactive oxygen species in tumor necrosis factor-alpha-activated primary human keratinocytes: implications for psoriasis and inflammatory skin disease. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 2606–2614 (2008).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15336563?via%3Dihub>.
- [125] Vincenzi, B., Zoccoli, A., Pantano, F., Venditti, O. & Galluzzo, S. Cetuximab: From Bench to Bedside. *Curr. Cancer Drug Targets* **10**, 80–95 (2010).
<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-0096&volume=10&issue=1&spage=80>.
- [126] Li, S., Schmitz, K. R., Jeffrey, P. D., Wiltzius, J. J., Kussie, P. & Ferguson, K. M. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* **7**, 301–311 (2005).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535610805000905>.

LITERATURVERZEICHNIS

- [127] Goldstein, N. I., Prewett, M., Zuklys, K., Rockwell, P. & Mendelsohn, J. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin. Cancer Res.* **1**, 1311–1318 (1995).
<https://aacrjournals.org/clincancerres/article/1/11/1311/94613/Biological-efficacy-of-a-chimeric-antibody-to-the>.
- [128] Humblet, Y. Cetuximab: an IgG1 monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor-expressing tumours. *Expert Opin. Pharmacother.* **5**, 1621–1633 (2004).
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/14656566.5.7.1621>.
- [129] Bienert, S., Waterhouse, A., de Beer, T., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L. & Schwede, T. The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. *Nucleic Acids Res.* **45**, D313–D319 (2016).
<https://academic.oup.com/nar/article/45/D1/D313/2605750>.
- [130] Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R. & Schwede, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* **46**, W296–W303 (2018).
<https://academic.oup.com/nar/article/46/W1/W296/5000024>.
- [131] Guex, N., Peitsch, M. C. & Schwede, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis* **30**, S162–S173 (2009).
<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/elps.200900140>.
- [132] Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A. M., Gumienny, R., Haas, J. & Schwede, T. QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics* **36**, 1765–1771 (2019).
<https://academic.oup.com/bioinformatics/article/36/6/1765/5614424>.
- [133] Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L. & Schwede, T. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Sci Rep* **7**, 10480 (2017).
<https://www.nature.com/articles/s41598-017-09654-8>.
- [134] Ayoub, D., Jabs, W., Resemann, A., Evers, W., Evans, C., Main, L., Baessmann, C., Wagner-Rousset, E., Suckau, D. & Beck, A. Correct primary structure assessment and extensive glyco-profiling of cetuximab by a combination of intact,

LITERATURVERZEICHNIS

- middle-up, middle-down and bottom-up ESI and MALDI mass spectrometry techniques. *MAbs* **5**, 699–710 (2013).
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/mabs.25423>.
- [135] Jonker, D. J., O’Callaghan, C. J., Karapetis, C. S., Zalcborg, J. R., Tu, D., Au, H.-J., Berry, S. R., Krahn, M., Price, T., Simes, R. J., Tebbutt, N. C., van Hazel, G., Wierzbicki, R., Langer, C. & Moore, M. J. Cetuximab for the Treatment of Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **357**, 2040–2048 (2007).
<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa071834>.
- [136] Tan, A. R., Moore, D. F., Hidalgo, M., Doroshow, J. H., Poplin, E. A., Goodin, S., Mauro, D. & Rubin, E. H. Pharmacokinetics of Cetuximab After Administration of Escalating Single Dosing and Weekly Fixed Dosing in Patients with Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* **12**, 6517–6522 (2006).
<https://clincancerres.aacrjournals.org/content/12/21/6517>.
- [137] Fulton, B. & Spencer, C. M. Docetaxel. *Drugs* **51**, 1075–1092 (1996).
<https://link.springer.com/article/10.2165/00003495-199651060-00011>.
- [138] Posner, M. R. & Lefebvre, J. L. Docetaxel induction therapy in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br. J. Canc* **88**, 11–17 (2003).
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12556952>.
- [139] Bouguer, P. *Essai d’optique sur la gradation de la lumière* (Jombert, Paris, 1729).
<https://www.e-rara.ch/zut/doi/10.3931/e-rara-9165>.
- [140] Henke, B., Gullikson, E. & Davis, J. X-Ray Interactions: Photoabsorption, Scattering, Transmission, and Reflection at $E = 50\text{--}30,000$ eV, $Z = 1\text{--}92$. *At. Data Nucl. Data Tab.* **54**, 181–342 (1993).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092640X83710132>.
- [141] Nash, J. C. & Shlien, S. Simple Algorithms for the Partial Singular Value Decomposition. *Comput. J.* **30**, 268–275 (1987).
<https://academic.oup.com/comjnl/article/30/3/268/364791>.
- [142] Yamamoto, K., Klossek, A., Flesch, R., Rancan, F., Weigand, M., Bykova, I., Bechtel, M., Ahlberg, S., Vogt, A., Blume-Peytavi, U., Schrade, P., Bachmann, S., Hedtrich, S., Schäfer-Korting, M. & Rühl, E. Influence of the skin barrier on the penetration of topically-applied dexamethasone probed by soft X-ray spectromicroscopy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **118**, 30–37 (2017).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641116309663>.

LITERATURVERZEICHNIS

- [143] Foglietti, V., D'Amico, A., Natale, C., Petrocco, S. & Mengali, S. *Optical Sensors and Microsystems*, 115–128 (2002).
http://link.springer.com/10.1007/0-306-47099-3_10.
- [144] Pensack, R., Banyas, K. & Asbury, J. Vibrational solvatochromism in organic photovoltaic materials: Method to distinguish molecules at donor/acceptor interfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 14144–52 (2010).
<http://xlink.rsc.org/?DOI=c0cp00971g>.
- [145] Lerotic, M., Mak, R., Wirick, S., Meirer, F. & Jacobsen, C. MANTiS: a program for the analysis of X-ray spectromicroscopy data. *J. Synchrotron Radiat.* **21**, 1206–1212 (2014).
<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S1600577514013964>.
- [146] Dhillon, I. S. & Sra, S. Generalized Nonnegative Matrix Approximations with Bregman Divergences. In *Proceedings of the 18th International Conference on Neural Information Processing Systems, NIPS'05*, 283–290 (MIT Press, Cambridge, MA, USA, 2005).
- [147] Tanimoto, H., Hongkun, X., Mizumaki, M., Seno, Y., Uchiwada, J., Yamagami, R., Kumazoe, H., Iwamitsu, K., Kimura, Y., Amezawa, K., Akai, I. & Aonishi, T. Non-negative matrix factorization for 2D-XAS images of lithium ion batteries. *J. Phys. Commun.* **5**, 115005 (2021).
<https://doi.org/10.1088/2399-6528/ac3268>.
- [148] WaveMetrics (ed.) *IGOR Pro Handbook Version 8* (WaveMetrics, Inc., Lake Oswego, USA, 2019), 8.03 edn.
- [149] Yamamoto, K., Klossek, A., Flesch, R., Ohigashi, T., Fleige, E., Rancan, F., Frombach, J., Vogt, A., Blume-Peytavi, U., Schrade, P., Bachmann, S., Haag, R., Hedtrich, S., Schäfer-Korting, M., Kosugi, N. & Rühl, E. Core-multishell nano-carriers: Transport and release of dexamethasone probed by soft X-ray spectromicroscopy. *J. Control. Release* **242**, 64–70 (2016).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365916305806>.
- [150] Yamamoto, K., Klossek, A., Fuchs, K., Watts, B., Raabe, J., Flesch, R., Rancan, F., Pischon, H., Radbruch, M., Gruber, A., Mundhenk, L., Vogt, A., Blume-Peytavi, U., Schrade, P., Bachmann, S., Gurny, R. & Rühl, E. Soft X-ray microscopy for probing of topical tacrolimus delivery via micelles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **139**, 68–75 (2019).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641118311998>.

LITERATURVERZEICHNIS

- [151] Samuel, A. Z., Horii, S., Ando, M. & Takeyama, H. Deconstruction of Obscure Features in SVD-Decomposed Raman Images from *P. chrysogenum* Reveals Complex Mixing of Spectra from Five Cellular Constituents. *Anal. Chem.* **93**, 12139–12146 (2021).
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.1c02942>.
- [152] Hitchcock, A. & Mancini, D. Bibliography and database of inner shell excitation spectra of gas phase atoms and molecules. *J Electron Spectros Relat Phenomena* **67**, 1–12 (1994).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0368204894870012>.
- [153] Hitchcock, A. Bibliography of atomic and molecular inner-shell excitation studies. *J Electron Spectros Relat Phenomena* **67**, 13–131 (1994).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0368204821800018>.
- [154] Cao, S., Zhou, X.-B., Yang, Y., Zhong, W. & Sun, T. Selective Substitution of 31/42-OH in Rapamycin Guided by an in Situ IR Technique. *Molecules* **19**, 7770–7784 (2014).
<http://www.mdpi.com/1420-3049/19/6/7770>.
- [155] Müller, M., Schellhorn, M. & Mann, K. Laboratory-scale near-edge X-ray absorption fine structure spectroscopy with a laser-induced plasma source. *J Anal At Spectrom* **34**, 1779–1785 (2019).
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/JA/C9JA00140A>.
- [156] Sahmetlioglu, E., Mart, H., Yuruk, H. & Surme, Y. Synthesis and characterization of oligosalicylaldehyde-based epoxy resins. *Chem. Pap.* **60**, 65–68 (2006).
<https://www.degruyter.com/document/doi/10.2478/s11696-006-0012-1/html>.
- [157] Maity, P., Kasisomayajula, S. V., Parameswaran, V., Basu, S. & Gupta, N. Improvement in surface degradation properties of polymer composites due to pre-processed nanometric alumina fillers. *IEEE Trans Dielectr Electr Insul* **15**, 63–72 (2008).
<https://ieeexplore.ieee.org/document/4446737>.
- [158] Varshney, D., Ahmadi, M., Guinel, M. J.-F., Weiner, B. R. & Morell, G. Single-step route to diamond-nanotube composite. *Nanoscale Res. Lett.* **7**, 535 (2012).
<https://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-7-535>.

LITERATURVERZEICHNIS

- [159] Barbi, M., Bell, P. R., Fanti, F., Dynes, J. J., Kolaceke, A., Buttigieg, J., Coulson, I. M. & Currie, P. J. Integumentary structure and composition in an exceptionally well-preserved hadrosaur (Dinosauria: Ornithischia). *PeerJ* **7**, e7875 (2019).
<https://peerj.com/articles/7875/>.
- [160] Kong, R. & Bhargava, R. Characterization of porcine skin as a model for human skin studies using infrared spectroscopic imaging. *Analyst* **136**, 2359 (2011).
<http://xlink.rsc.org/?DOI=c1an15111h>.
- [161] Germer, G., Ohigashi, T., Yuzawa, H., Kosugi, N., Flesch, R., Rancan, F., Vogt, A. & Rühl, E. Improved Skin Permeability after Topical Treatment with Serine Protease: Probing the Penetration of Rapamycin by Scanning Transmission X-ray Microscopy. *ACS Omega* **6**, 12213–12222 (2021).
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.1c01058>.
- [162] Egawa, M. & Tagami, H. Comparison of the depth profiles of water and water-binding substances in the stratum corneum determined in vivo by Raman spectroscopy between the cheek and volar forearm skin: effects of age, seasonal changes and artificial forced hydration. *Br. J. Dermatol.* **158**, 251–260 (2008).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2133.2007.08311.x>.
- [163] Egawa, M. & Kajikawa, T. Changes in the depth profile of water in the stratum corneum treated with water. *Skin Res Technol.* **15**, 242–249 (2009).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0846.2009.00362.x>.
- [164] Long, G. L. & Winefordner, J. D. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.* **55**, 712A–724A (1983).
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00258a001>.
- [165] Armbruster, D. A., Tillman, M. D. & Hubbs, L. M. Limit of detection (LQD)/limit of quantitation (LOQ): comparison of the empirical and the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs. *Clin. Chem.* **40**, 1233–1238 (1994).
<https://academic.oup.com/clinchem/article-abstract/40/7/1233/5647851?redirectedFrom=PDF>.
- [166] Hitchcock, A., Tyliczszak, T., Obst, M., Swerhone, G. & Lawrence, J. Improving Sensitivity in Soft X-ray STXM Using Low Energy X-ray Fluorescence. *Microsc. Microanal.* **16**, 924–925 (2010).
<https://www.cambridge.org/core/journals/microscopy-and->

LITERATURVERZEICHNIS

- microanalysis/article/improving-sensitivity-in-soft-xray-stxm-using-low-energy-xray-fluorescence/1952EB3C7B3456F40274B4A9C29D2A7D.
- [167] Xing Liang & Boppart, S. Biomechanical Properties of *In Vivo* Human Skin From Dynamic Optical Coherence Elastography. *IEEE. Trans. Biomed. Eng.* **57**, 953–959 (2010).
<http://ieeexplore.ieee.org/document/5282637/>.
- [168] Lawrence, J. R., Swerhone, G. D. W., Leppard, G. G., Araki, T., Zhang, X., West, M. M. & Hitchcock, A. P. Scanning Transmission X-Ray, Laser Scanning, and Transmission Electron Microscopy Mapping of the Exopolymeric Matrix of Microbial Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5543–5554 (2003).
- [169] Trypsin aus Schweinepankreas (Produktübersicht). *Sigma-Aldrich* (06.07.2022).
<https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sigma/t0303>.
- [170] Sato, K., Aoki, M., Takagi, J. & Noyori, R. Organic Solvent- and Halide-Free Oxidation of Alcohols with Aqueous Hydrogen Peroxide. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 12386–12387 (1997).
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja973412p>.
- [171] Shul'pin, G. B., Kozlov, Y. N., Shul'pina, L. S. & Petrovskiy, P. V. Oxidation of alkanes and alcohols with hydrogen peroxide catalyzed by complex Os₃(CO)₁₀(μ -H)₂. *Appl. Organomet. Chem.* **24**, 464–472 (2010).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/aoc.1641>.
- [172] Kirjavainen, M., Urtti, A., Valjakka-Koskela, R., Kiesvaara, J. & Mönkkönen, J. Liposome–skin interactions and their effects on the skin permeation of drugs. *Eur J Pharm Sci* **7**, 279–286 (1999).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098798000372>.
- [173] Li, Y.-z., Quan, Y.-s., Zang, L., Jin, M.-n., Kamiyama, F., Katsumi, H., Tsutsumi, S. & Yamamoto, A. Trypsin as a novel potential absorption enhancer for improving the transdermal delivery of macromolecules. *J. Pharm. Pharmacol.* **61**, 1005–1012 (2010).
<https://academic.oup.com/jpp/article/61/8/1005/6135801>.
- [174] zhe Li, Y., shu Quan, Y., Zang, L., na Jin, M., Kamiyama, F., Katsumi, H., Yamamoto, A. & Tsutsumi, S. Transdermal Delivery of Insulin Using Trypsin as a Biochemical Enhancer. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 1574–1579 (2008).
http://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/31/8/31_8_1574/_article.

LITERATURVERZEICHNIS

- [175] Petrick, A. *Untersuchungen zum Transport und zur Wirkstofffreisetzung aus Redox-Nanocarriern in Humanhaut* (2022).
- [176] Ghadially, R., Halkier-Sorensen, L. & Elias, P. M. Effects of petrolatum on stratum corneum structure and function. *J. Am. Acad. Dermatol.* **26**, 387–396 (1992).
[https://www.jaad.org/article/0190-9622\(92\)70060-S/pdf](https://www.jaad.org/article/0190-9622(92)70060-S/pdf). Publisher: Elsevier.
- [177] Grubauer, G., Feingold, K. R. & Elias, P. M. Relationship of epidermal lipogenesis to cutaneous barrier function. *J. Lipid Res.* **28** 6, 746–52 (1987).
[https://www.jlr.org/article/S0022-2275\(20\)38670-3/pdf](https://www.jlr.org/article/S0022-2275(20)38670-3/pdf).
- [178] Menon, G. & Ghadially, R. Morphology of lipid alterations in the epidermis: A review. *Microsc. Res. Tech.* **37**, 180–192 (1997).
<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291097-0029%2819970501%2937%3A3%3C180%3A%3AAID-JEMT3%3E3.0.CO%3B2-S>.
- [179] Choe, C., Schleusener, J., Choe, S., Ri, J., Lademann, J. & Darvin, M. E. Stratum corneum occlusion induces water transformation towards lower bonding state: a molecular level in vivo study by confocal Raman microspectroscopy. *Int J Cosmet Sci* **42**, 482–493 (2020).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ics.12653>.
- [180] Fluhr, J., Lazzerini, S., Distante, F., Gloor, M. & Berardesca, E. Effects of Prolonged Occlusion on Stratum corneum Barrier Function and Water Holding Capacity. *Skin Pharmacol. Physiol.* **12**, 193–198 (1999).
<https://www.karger.com/DOI/10.1159/000066243>.
- [181] Kiselev, M. A., Ryabova, N. Y., Balagurov, A. M., Dante, S., Hauss, T., Zbytovska, J., Wartewig, S. & Neubert, R. H. H. New insights into the structure and hydration of a stratum corneum lipid model membrane by neutron diffraction. *Eur. Biophys. J.* **34**, 1030–1040 (2005).
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00249-005-0488-6>.
- [182] Silva, C., Topgaard, D., Kocherbitov, V., Sousa, J., Pais, A. & Sparr, E. Stratum corneum hydration: Phase transformations and mobility in stratum corneum, extracted lipids and isolated corneocytes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1768**, 2647–2659 (2007).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273607002015>.

LITERATURVERZEICHNIS

- [183] Caussin, J., Groenink, H. W. W., Graaff, A. M. d., Gooris, G. S., Wiechers, J. W., Van Aelst, A. C. & Bouwstra, J. A. Lipophilic and hydrophilic moisturizers show different actions on human skin as revealed by cryo scanning electron microscopy. *Exp. Dermatol.* **16**, 891–898 (2007).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0625.2007.00596.x>.
- [184] Qiao, G., Chang, S. & Riviere, J. Effects of Anatomical Site and Occlusion on the Percutaneous Absorption and Residue Pattern of 2,6-(ring-14C)Parathion in Vivo in Pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **122**, 131–138 (1993).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X83711804>.
- [185] Elias, P. M., Cooper, E. R., Korc, A. & Brown, B. E. Percutaneous Transport in Relation to Stratum Corneum Structure and Lipid Composition. *J. Invest. Dermatol.* **76**, 297–301 (1981).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15460683>.
- [186] 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).
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00410a031>.
- [187] Bouwstra, J., Gooris, G., Dubbelaar, F. & Ponc, M. Phase behavior of lipid mixtures based on human ceramides: coexistence of crystalline and liquid phases. *J. Lipid Res.* **42**, 1759–1770 (2001).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022227520315029>.
- [188] Saad, H. Y. & Higuchi, W. I. Water Solubility of Cholesterol. *J. Pharm. Sci.* **54**, 1205–1206 (1965).
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915350243>.
- [189] Flynn, G., Shah, Y., Prakongpan, S., Kwan, K., Higuchi, W. & Hofmann, A. Cholesterol Solubility in Organic Solvents. *J. Pharm. Sci.* **68**, 1090–1097 (1979).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022354915428333>.
- [190] C2 Ceramide, Cell-permeable ceramide analog. *Enzo Life Sciences GmbH* (06.05.2022).
<https://www.enzolifesciences.com/BML-SL100/c2-ceramide/>.
- [191] Alexiev, U., Volz, P., Boreham, A. & Brodewolf, R. Time-resolved fluorescence microscopy (FLIM) as an analytical tool in skin nanomedicine. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **116**, 111–124 (2017).

LITERATURVERZEICHNIS

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641117300954>.
Nanocarriers: Architecture, Transport, and Topical Application of Drugs for Therapeutic Use.
- [192] Alnasif, N., Zoschke, C., Fleige, E., Brodewolf, R., Boreham, A., Rühl, E., Eckl, K.-M., Merk, H.-F., Hennies, H. C., Alexiev, U., Haag, R., Kuchler, S. & Schäfer-Korting, M. Penetration of normal, damaged and diseased skin — An in vitro study on dendritic core-multishell nanotransporters. *J. Control. Release* **185**, 45–50 (2014).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365914002107>.
- [193] Rancan, F., Blume-Peytavi, U. & Vogt, A. Utilization of biodegradable polymeric materials as delivery agents in dermatology. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **7**, 23–34 (2014).
<https://www.dovepress.com/utilization-of-biodegradable-polymeric-materials-as-delivery-agents-in-peer-reviewed-fulltext-article-CCID>.
- [194] Radbruch, M., Pischon, H., Ostrowski, A., Volz, P., Brodewolf, R., Neumann, F., Unbehauen, M., Kleuser, B., Haag, R., Ma, N., Alexiev, U., Mundhenk, L. & Gruber, A. D. Dendritic Core-Multishell Nanocarriers in Murine Models of Healthy and Atopic Skin. *Nanoscale Res. Lett.* **12**, 64 (2017).
<https://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/s11671-017-1835-0>.
- [195] Landmann, L. The epidermal permeability barrier. *Anat. embryol.* **178**, 1–13 (1988).
<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00305008>.
- [196] Kuchler, S., Abdel-Mottaleb, M., Lamprecht, A., Radowski, M. R., Haag, R. & Schäfer-Korting, M. Influence of nanocarrier type and size on skin delivery of hydrophilic agents. *Int. J. Pharm.* **377**, 169–172 (2009).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517309002701>.
- [197] Pischon, H., Radbruch, M., Ostrowski, A., Volz, P., Gerecke, C., Unbehauen, M., Hönzke, S., Hedtrich, S., Fluhr, J. W., Haag, R., Kleuser, B., Alexiev, U., Gruber, A. D. & Mundhenk, L. Stratum corneum targeting by dendritic core-multishell-nanocarriers in a mouse model of psoriasis. *Nanomedicine* **13**, 317–327 (2017).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S154996341630154X>.
- [198] Frombach, J., Unbehauen, M., Kurniasih, I. N., Schumacher, F., Volz, P., Hadam, S., Rancan, F., Blume-Peytavi, U., Kleuser, B., Haag, R., Alexiev, U. & Vogt, A. Core-multishell nanocarriers enhance drug penetration and reach keratinocytes

LITERATURVERZEICHNIS

- and antigen-presenting cells in intact human skin. *J. Control. Release* **299**, 138–148 (2019).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365919301099>.
- [199] Aoshiba, K., Yasuda, K., Yasui, S., Tamaoki, J. & Nagai, A. Serine proteases increase oxidative stress in lung cells. *Am. J. Physiol.* **281**, L556–L564 (2001).
<https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajplung.2001.281.3.L556>.
- [200] Dibenzoylperoxid. *GESTIS-Stoffdatenbank* (19.11.2021).
<https://gestis.dguv.de/data?name=021630>.
- [201] Ruffien-Ciszak, A., Gros, P., Comtat, M., Schmitt, A.-M., Questel, E., Casas, C. & Redoules, D. Exploration of the global antioxidant capacity of the stratum corneum by cyclic voltammetry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40**, 162–167 (2006).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708505004401>.
- [202] Pabst, O., Anwar, A., Nieweglowski, A. A., Lindland, C. R., Rahman, H., Siljedal, H., Thorkildsen, H., Camara, I., Mirarkolaei, K. N., Massé, L., Hoen, M. S., Mustafa, M. N., Berg, O. J., Kristiansen, P. A., Iguenad, R., Pedersen, R. A. T., Waisi, S. & Nielsen, T. E. The non-linear electrical properties of silver/silver chloride electrodes in sodium chloride solution. *J. Electr. Bioimpedance.* **10**, 113–123 (2019).
<https://www.sciendo.com/article/10.2478/joeb-2019-0017>.
- [203] Fulton, J. E., Farzad-Bakshandeh, A. & Bradley, S. Studies on the Mechanism of Action of Topical Benzoyl Peroxide and Vitamin A Acid in Acne Vulgaris. *J. Cutan. Pathol.* **1**, 191–200 (1974).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0560.1974.tb00628.x>.
- [204] Tanghetti, E. A. & Popp, K. F. A Current Review of Topical Benzoyl Peroxide: New Perspectives on Formulation and Utilization. *Dermatol. Clin.* **27**, 17–24 (2009).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733863508000673>.
- [205] Craig G., B. & Noah S., S. Benzoyl Peroxide Skin Washes: Basis, Logic, Effectiveness, and Tolerance. *Skinmed* **4**, 370–396 (2005).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1540-9740.2005.04348.x>.
- [206] KÜchler, S., Radowski, M. R., Blaschke, T., Dathe, M., Plendl, J., Haag, R., Schäfer-Korting, M. & Kramer, K. D. Nanoparticles for skin penetration enhancement – A comparison of a dendritic core-multishell-nanotransporter and solid

LITERATURVERZEICHNIS

- lipid nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **71**, 243–250 (2009).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641108003226>.
- [207] Silva, E., Barreiros, L., Segundo, M. A., Costa Lima, S. A. & Reis, S. Cellular interactions of a lipid-based nanocarrier model with human keratinocytes: Unravelling transport mechanisms. *Acta Biomater.* **53**, 439–449 (2017).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706117300673>.
- [208] Pan, L., Liu, J. & Shi, J. Cancer cell nucleus-targeting nanocomposites for advanced tumor therapeutics. *Chem. Soc. Rev.* **47**, 6930–6946 (2018).
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/CS/C8CS00081F>.
- [209] Rougier, A., Dupuis, D., Schaefer, H., Lotte, C. & Roguet, R. In Vivo Correlation Between Stratum Corneum Reservoir Function and Percutaneous Absorption. *J. Invest. Dermatol.* **81**, 275–278 (1983).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15431835>.
- [210] Teichmann, A., Jacobi, U., Weigmann, H.-J., Sterry, W. & Lademann, J. Reservoir Function of the Stratum corneum: Development of an in vivo Method to Quantitatively Determine the Stratum corneum Reservoir for Topically Applied Substances. *Skin Pharmacol. Physiol.* **18**, 75–80 (2005).
<https://www.karger.com/Article/FullText/83707>.
- [211] Pilgram, Van Pelt, Spies, Bouwstra & Koerten. Cryo-electron diffraction as a tool to study local variations in the lipid organization of human stratum corneum. *J. Microsc.* **189**, 71–78 (1998).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2818.1998.00280.x>.
- [212] Fleischli, F. D., Morf, F. & Adlhart, C. Skin Concentrations of Topically Applied Substances in Reconstructed Human Epidermis (RHE) Compared with Human Skin Using in vivo Confocal Raman Microscopy: FH - HES. *Chimia* **69**, 147 (2015).
<https://ojs.chimia.ch/chimia/article/view/5719>.
- [213] Barth, A. & Zscherp, C. What vibrations tell about proteins. *Q. Rev. Biophys.* **35**, 369–430 (2002).
<https://www.cambridge.org/core/journals/quarterly-reviews-of-biophysics/article/what-vibrations-tell-about-proteins/F16333B39A8E96B4941966314BD890CC>.

LITERATURVERZEICHNIS

- [214] Barth, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1767**, 1073–1101 (2007).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272807001375>.
- [215] Dubois, M., Fenaille, F., Clement, G., Lechmann, M., Tabet, J.-C., Ezan, E. & Becher, F. Immunopurification and Mass Spectrometric Quantification of the Active Form of a Chimeric Therapeutic Antibody in Human Serum. *Anal. Chem.* **80**, 1737–1745 (2008).
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac7021234>.
- [216] Jain, A., Thakur, K., Kush, P. & Jain, U. K. Docetaxel loaded chitosan nanoparticles: Formulation, characterization and cytotoxicity studies. *Int. J. Biol. Macromol.* **69**, 546–553 (2014).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813014004127>.
- [217] AB, M. *Phosphate Buffered Saline (PBS)* (2010).
http://www.medicago.se/sites/default/files/pdf/productsheets/PBS_Buffer_v._01.pdf.
- [218] Siderius, D. NIST Standard Reference Simulation Website - SRD 173 (2017).
<https://data.nist.gov/od/id/FF429BC178798B3EE0431A570681E858232>.
- [219] Rühl, I. *Labelfreier Nachweis von Wirkstoffen in biologischen Proben unter Nutzung der photothermischen Expansion (AFM-IR)* (2022).
- [220] Sexton, K., Tichauer, K., Samkoe, K. S., Gunn, J., Hoopes, P. J. & Pogue, B. W. Fluorescent Affibody Peptide Penetration in Glioma Margin Is Superior to Full Antibody. *PLoS One* **8**, 1–9 (2013).
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0060390>.
- [221] Fan, J., Zhuang, X., Yang, X., Xu, Y., Zhou, Z., Pan, L. & Chen, S. A multivalent biparatopic EGFR-targeting nanobody drug conjugate displays potent anticancer activity in solid tumor models. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, 320 (2021).
<https://www.nature.com/articles/s41392-021-00666-5>.
- [222] Dietrich, A., Andreeff, M., Koi, L., Bergmann, R., Schubert, M., Schreiner, L., Löck, S., Sihver, W., Freudenberg, R., Hering, S., Pietzsch, H.-J., Steinbach, J., Kotzerke, J., Baumann, M. & Krause, M. Radiotherapy enhances uptake and efficacy of 90Y-cetuximab: A preclinical trial. *Radiother. Oncol.* **155**, 285–292 (2021).

LITERATURVERZEICHNIS

- [https://www.thegreenjournal.com/article/S0167-8140\(20\)31178-6/fulltext](https://www.thegreenjournal.com/article/S0167-8140(20)31178-6/fulltext). Publisher: Elsevier.
- [223] Lee, C. M. & Tannock, I. F. The distribution of the therapeutic monoclonal antibodies cetuximab and trastuzumab within solid tumors. *BMC Cancer* **10**, 255 (2010).
<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-10-255>.
- [224] Zhang, Y., Yang, J., Ding, M., Li, L., Lu, Z., Zhang, Q. & Zheng, J. Tumor-penetration and antitumor efficacy of cetuximab are enhanced by co-administered iRGD in a murine model of human NSCLC. *Oncol. Lett.* **12**, 3241–3249 (2016).
<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2016.5081>.
- [225] Martínez, L. M., Videa, M., Sosa, N. G., Ramírez, J. H. & Castro, S. Long-Term Stability of New Co-Amorphous Drug Binary Systems: Study of Glass Transitions as a Function of Composition and Shelf Time. *Molecules* **21**, 1712 (2016).
<https://www.mdpi.com/1420-3049/21/12/1712>.
- [226] Xiao, H. & Wang, L. Effects of X-shaped reduction-sensitive amphiphilic block copolymer on drug delivery. *Int. J. Nanomed.* 5309 (2015).
<http://www.dovepress.com/effects-of-x-shaped-reduction-sensitive-amphiphilic-block-copolymer-on-peer-reviewed-article-IJN>.
- [227] Imran, M., Saleem, S., Chaudhuri, A., Ali, J. & Baboota, S. Docetaxel: An update on its molecular mechanisms, therapeutic trajectory and nanotechnology in the treatment of breast, lung and prostate cancer. *J Drug Deliv Sci Technol* **60**, 101959 (2020).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S177322472031248X>.
- [228] Lansiaux. Mechanisms underlying resistance to cetuximab in the HNSCC cell line: Role of AKT inhibition in bypassing this resistance. *Int. J. Oncol.* **38**, 189–200 (2010).
<http://www.spandidos-publications.com/ijo/38/1/189>.
- [229] Valverde, A., Peñarando, J., Canas, A., López-Sánchez, L. M., Conde, F., Guill-Luna, S., Hernández, V., Villar, C., Morales-Estévez, C., Rodríguez, J., Aranda, E. & Rodríguez-Ariza, A. The addition of celecoxib improves the antitumor effect of cetuximab in colorectal cancer: Role of EGFR-RAS-FOXM1- β -catenin signaling axis. *Oncotarget* **8**, 21754–21769 (2017).
<https://www.oncotarget.com/article/15567/text/>.

LITERATURVERZEICHNIS

- [230] Marschall, M., Hornemann, A., Wübbeler, G., Hoehl, A., Rühl, E., Kästner, B. & Elster, C. Compressed FTIR spectroscopy using low-rank matrix reconstruction. *Opt. Express* **28**, 38762–38772 (2020).
<http://www.opticsexpress.org/abstract.cfm?URI=oe-28-26-38762>.

Verwendete Programme

Tabelle 6.1: Im Rahmen dieser Arbeit genutzte Programme

Programm	Version	Hersteller / Autor
Igor Pro	8.00 - 9.00	Wavemetrics Inc.
AFMIR_STXM.ipf	0.1.0 - 5.2.12	G. Germer
Graph Tools.ipf	1.60	Prof. Dr. S. Thuermer (chozo)
Affinity Designer	1.10.5	Serif
Analysis Studio	3.15.7289	Anasys Instruments (Bruker)
Avogadro	1.2.0	Avogadro Chemistry
AXiS 2000	26. Juni 2019	A.P. Hitchcock / McMaster University
ChemDraw Professional	16.0.1.4	PerkinElmer Informatics Inc.
Chemcraft	1.8 (Demo)	Grigoriy A. Andrienko
Gwyddion	2.58	Petr Klapetek, David Nečas und Christopher Anderson
IDL Virtual Machine	8.5	Harris Geospatial Solutions
MANTiS	2.3.02	2nd Look
Optical Constants Grapher (SF.exe)	2.0	Mark Thomas, Center for X-ray Optics, Lawrence Berkeley Laboratory
ORCA	5.0.1 (x86) & 5.0.2 (ARM)	Max-Planck-Institut für Kohlenforschung
Texpad	1.9.9	Valletta Ventures

Genutzte Messinstrumente

Tabelle 6.1: Verwendete Messinstrumente

Messinstrument	Hersteller
Röntgentransmissionsmikroskop (STXM)	Research Instruments, Bruker, USA
Opt. Mikroskop MM-400/LU	Nikon, Japan
Opt. Mikroskop LV150NL	Nikon, Japan
AFM-IR nanoIR-2s	Anasys Instruments, Bruker, USA
Lock-in Amplifier MFLI	Zurich Instruments AG, Schweiz

Verwendete Chemikalien

Tabelle 6.1: Verwendete Chemikalien

Substanz	Hersteller	Reinheit
Cetuximab in PBS _{aq.}	Selleckchem (Houston, TX, USA)	>98% (5.2 mg/mL)
Dexamethason	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)	≥98% (HPLC)
75% Dibenzoylperoxid _{aq.}	ThermoFisher GmbH (Kandel, Deutschland)	97% (trocken)
Docetaxel	Selleckchem (Houston, TX, USA)	>97.5%
Ethanol, vergällt mit 1% Petrolether	Berkel AHK (Berlin, Deutschland)	>98.2%
Phosphat-Pufferlösung (PBS)	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)	pH = 7.4
Rapamycin	LC Laboratories (Woburn, MA, USA)	>99%
Trypsin (vom Schwein)	Bio&SELL (Feucht / Nürnberg, Deutschland)	

Liste der Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Publikationen:

- Germer, G., Ohigashi, T., Yuzawa, H., Kosugi, N., Flesch, R., Rancan, F., Vogt, A., & Rühl, E. Improved Skin Permeability after Topical Treatment with Serine Protease: Probing the Penetration of Rapamycin by Scanning Transmission X-ray Microscopy. *ACS Omega* **6**, 12213-12222 (2021).
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.1c01058#>
- Rajes, K., Walker, K. A., Hadam, S., Zabihi, F., Ibrahim-Bacha, J., Germer, G., Patoka, P., Wassermann, B., Rancan, F., Rühl, E., Vogt, A. & Haag, R. Oxidationsensitive Core-Multishell Nanocarriers for the Controlled Delivery of Hydrophobic Drugs. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **7**, 2485-2495 (2021).
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsbiomaterials.0c01771>.

Tagungsbeiträge (Poster):

- Germer, G., Ji, C., Faisst, S., Patoka, P., Rancan, F., Konashuk, A., Pavlychev, A., Ohigashi, T., Yuzawa, H., Vogt, A. & Rühl, E. High-Resolution Spectromicroscopy: Investigations on Dermal Drug Penetration and Biological Samples, 10 Years of G-RISC and Beyond, 2019, Berlin
- Germer, G., Flesch, R., Ohigashi, T., Yuzawa, H., Rancan, F., Rajes, K., Zabihi, F., Haag, R., Vogt, A. & Rühl, E. Label-free detection of rapamycin in human skin, Bunsentagung 2021, Regensburg (virtuell)
- Germer, G., Gronbach, L., Garcia-Miller, J., Rühl, I., Patoka, P., Zoschke, C. & Rühl, E. Label-free drug detection in 3D cancer models by atomic force microscopy-based infrared-spectroscopy, Bunsentagung 2021, Regensburg (virtuell)

Danksagung

Zum Abschluss dieser Arbeit möchte ich allen hilfsbereiten Menschen danken, mit denen ich in der Zeit dieser Arbeit zusammenarbeiten durfte.

Zu aller erst möchte ich Herrn Prof. Dr. Eckart Rühl für die Vergabe des Themas und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe danken. Ich möchte mich insbesondere für die vielen wissenschaftlichen Gespräche und Diskussionen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Burkhard Kleuser danke ich für die Übernahme des zeitaufwendigen Zweitgutachtens.

An dieser Stelle möchte ich vor allen anderen, die Teil der Arbeitsgruppe sind oder waren, Herrn Dr. Burkhard Langer hervorheben, ohne dessen Ratschläge und Einführung in die Programmierung mit Igor Pro die Auswertung auf dem gegebenen Stand nicht möglich gewesen wäre. Vielen Dank!

Bei Herrn Dr. Piotr Patoka, Frau Dipl.-Ing. Anke Schindler, Herrn Dr. Flesch, Herrn Dr. Wassermann und allen weiteren Mitgliedern der AG Rühl möchte ich für die Unterstützung und Motivation danken.

Für die Bereitstellung der Proben und den wissenschaftlichen Austausch möchte ich mich bei allen drei Kooperationspartnern bedanken, hierbei insbesondere bei Frau Prof. Vogt, Herrn Prof. Haag, Frau Dr. Rancan, Frau Schrade, Frau Dr. Rajes, Herrn Dr. Zoschke, Frau Dr. Gronbach und Frau Miller. Hervorheben möchte ich die Probenpräparation von Frau Schrade, welche erst Messungen mit dem Röntgenmikroskop ermöglicht haben. Ebenfalls möchte ich der Histologie der Charité für die Präparation der paraffineingebetteten Proben danken.

Mein Dank gilt dem Institut für molekulare Wissenschaften aus Okazaki, hierbei insbesondere Herrn Prof. Dr. Ohigashi und Herrn Dr. Yuzawa, die Messungen am Synchrotronring UVSOR III ermöglicht haben. Dank Ihnen konnten die Strahlzeiten auch während der Reiseverbots der Freien Universität in der Covid-19-Pandemie ohne persönliche Anwesenheit ermöglicht werden. Ebenso danke ich für die Messungen an Bessy II dem Helmholtz-Zentrum, hierbei insbesondere Herrn Dr. Weigand für den Igor-Importfilter für STXM-Daten und die Realisierung der Messungen bei MYSTIIC. Mein Dank gilt für die Ermöglichung der Messungen an der Swiss Light Source und der Unterstützung vor Ort durch Herrn Dr. Watts.

Danke an das BioSupraMol für die Ermöglichung von ATR-IR-Messung und die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Eigler für die Möglichkeit, zu mikroskopieren.

Ebenso möchte ich allen Studenten danken, die während meiner Promotionszeit ihre Bachelor-, Masterarbeiten oder Forschungspraktika am AFM-IR durchgeführt ha-

Danksagung

ben und damit unfreiwillig Beta-Tester meiner Igor Prozedur wurden: Yuxin Liu, Sven Faisst, Zhaotian Zhang, Tong He, Chingching Ji, Eva-Luisa Parrino, Vinisha Kalevaru, Stephan Verstegen, Lucie Groth, Laura Elsholz, Jumana Imbrahim-Bacha, Isabel Rühl, Asya Polat, Björn Schwabe, Christian Adam, Roufan Dou, Anja Petrick, Henrik Wiedenhaupt und Elena Petersen.

Mein Dank gilt auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft, ohne deren finanzielle Unterstützung die Durchführung dieses Projekts nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke den Nutzern tony, chozo, jjweimer, oleytken, KZarzana, KurtB, johnweeks (WM) und aclight (WM) des Wavemetrics Forums für Tipps zu Funktionen in Igor Pro.

Abschließend möchte ich meinen Freunden und meiner Familie für die Unterstützung während der Zeit dieser Arbeit danken, insbesondere Frau Marleen Hußmann für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Curriculum Vitae

Das CV ist in der veröffentlichten Version nicht enthalten.