

# Charakterisierung der pulmonalen Pharmakokinetik von Salmeterol und Insulin-like Growth Factor-1



## Dissertation

zur Erlangung  
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
**Frederic Vollmers**  
aus Tübingen

Würzburg 2015

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am:

.....

Gutachter der schriftlichen Arbeit:

1. Gutachter:.....

2. Gutachter: .....

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüfer: .....

2. Prüfer: .....

3. Prüfer: .....

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums:

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:

.....

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anregung und Anleitung von

**Frau Prof. Dr. Petra Högger**

am Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie  
des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie  
der Julius-Maximilians-Universität angefertigt.

Meiner Frau Christina



Aus der Dissertation bereits hervorgegangene Publikationen:

**Originalpublikation:**

I. Schultz, F. Vollmers, T. Lühmann, J.-C. Rybak, R. Wittmann, K. Stank, H. Steckel, B. Kardziej, M. Schmidt, P. Högger, L. Meinel, Pulmonary insulin-like growth factor I delivery from trehalose and silk-fibroin microparticles, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **1**: 119-129; 2015.



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die zur Entstehung und zur erfolgreichen Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran danke ich Frau Prof. Dr. Petra Högger für die Aufnahme in ihren Arbeitskreis und für die Möglichkeit an diesem spannenden Thema zu arbeiten. Außerdem danke ich für die anregenden Diskussionen, die guten Ratschläge und die gute Arbeitsatmosphäre. Auch für das entgegengebrachte Vertrauen im Rahmen der Lehrtätigkeit und der Praktikumsleitung im Fach Biochemie und klinische Chemie bedanke ich mich herzlich.

Im Besonderen danke ich Prof. Dr. Dr. Lorenz Meinel für die Möglichkeit der Kooperation an dem spannenden Thema der pulmonalen Applikation von IGF-1 und für die Bereitstellung der IGF-1 Stammlösung, der Mikropartikel, und weiterer benötigter Materialien und für die Möglichkeit, an dem Fluoreszenzmikroskop zu arbeiten.

Dr. Tessa Lühmann danke ich für die Hilfe bei der Fluoreszenzmikroskopie und die Ratschläge im Bereich der Zellkultur.

Großer Dank gilt auch Isabel Schultz für die Herstellung der eingesetzten Mikropartikel.

Ich möchte auch Herrn Dr. med Boris Kardziew, Chefarzt der Thoraxchirurgie im Thoraxzentrum Bezirk Unterfranken in Münnerstadt, für sein Engagement, die Unterstützung durch Patientenrekrutierung und die Bereitstellung von Räumlichkeiten zur Durchführung des Lungenperfusionsmodells danken.

Natürlich danke ich dem OP-Team der Thoraxchirurgie in Münnerstadt, dem technischen Betrieb und der Verwaltung, die mich durch ihren Einsatz unterstützt haben.

Prof. Dr. Carsten Erhardt danke ich für die Überlassung der Calu-3 Zellen.

Außerdem gilt großer Dank Prof. Dr. med. Michael Schmidt, Oberarzt der Medizinischen Klinik und Polyklinik I und Leiter der Abteilung Pneumologie der Universität Würzburg, für die Bereitstellung der humanen bronchioalveolären Lavage.

GlaxoSmithKline danke ich für die Überlassung des Salmeterols.

Für die Bereitschaft, mich bei der Durchführung der Lungenperfusionen zu unterstützen, möchte ich im Besonderen Lisa Schaaf danken und allen anderen Mitgliedern des AK Högger, die ihre Zeit für mich zur Verfügung gestellt haben, um mich bei den Perfusionen zu begleiten.

Für die Unterstützung im Rahmen der Zellkultur danke ich Dr. Klaus Uhlenhut.

Dr. Petra Kapkova und Melanie Mulek danke ich für die Hilfestellung im Bereich der Massenspektrometrie.

Für die Unterstützung im Rahmen von Labortätigkeiten möchte ich Roswitha Scheblein danken.

Dr. Beatrice Trammer danke ich für die Einführung in das Lungenperfuisionsmodell.

Den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern, Dr. Daniel Baumann, Hui Cao, Martin Haas, Dr. Max Kurlbaum, Steffen Jeßberger, Melanie Mulek, Andreas Pospiech, Lisa Schaaf, Roswitha Scheblein, Maike Scherf-Clavel, Stoyan Dirimanov, Nora Thiele, Dr. Beatrice Trammern, Dr. Klaus Uhlenhut, Dr. Jianbo Xiao danke ich für die angenehme Aufnahme in den Arbeitskreis sowie die freundschaftliche Atmosphäre. Die gegenseitige Unterstützung und die anregenden Diskussionen waren sowohl fachlich als auch privat eine Bereicherung.

Den Assistenten, die mit mir zusammen das Praktikum des 5. Semesters betreut haben, danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Für die Anfertigung und die Reparaturen von Bestandteilen des Lungenperfuisionsmodells und der Zellkultur danke ich den Mitgliedern der institutseigenen Werkstatt, Matthias Völker, Karl Volkmuth, Georg Walter, und den Auszubildenden.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für Unterstützung, die sie mir in vielerlei Hinsicht entgegengebracht haben.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Frau Christina danken für ihre Liebe und für die Geduld, die sie für mich aufgebracht hat.



*„Suche nicht andere, sondern dich selbst zu übertreffen.“*

Marcus Tullius Cicero



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>A</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>23</b>
<b>1</b>	<b>Die menschliche Lunge</b> .....	<b>25</b>
1.1	Anatomie der menschlichen Lunge.....	25
1.2	Bronchioalveoläre Flüssigkeit.....	25
1.3	Erkrankungen der Lunge.....	26
1.3.1	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung.....	26
1.3.2	Asthma bronchiale.....	29
1.4	Die Lunge als Eintrittsort in den systemischen Kreislauf.....	30
1.5	Wege über das Lungenepithel.....	31
1.5.1	Vesikulärer Transport.....	32
1.5.1.1	Clathrin-abhängige Endozytose.....	32
1.5.1.2	Caveolae-abhängige Transzytose.....	35
1.5.1.3	RhoA-GTPase-abhängige Endozytose.....	36
1.5.1.4	Dynamin-unabhängige Endozytose.....	36
1.5.1.5	Makropinozytose und Phagozytose.....	36
1.5.2	Transport über Transportproteine.....	37
<b>2</b>	<b>Methoden zur Untersuchung der Pharmakokinetik von pulmonal applizierten Substanzen</b> .....	<b>39</b>
2.1	In vitro Modelle.....	39
2.2	Ex vivo Lungenperfuisionsmodell.....	40
2.3	In vivo Modelle.....	41
2.4	Zusammenfassung.....	42
<b>3</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>43</b>
<b>B</b>	<b>Allgemeiner Teil</b> .....	<b>47</b>
<b>1</b>	<b>Untersuchung der pulmonalen Pharmakokinetik von Salmeterol mithilfe des humanen Lungenperfuisionsmodells</b> .....	<b>49</b>
1.1	Hintergrund.....	49
1.2	Charakteristika des Salmeterols.....	52
1.3	Zielsetzung.....	53

1.4	Durchführung der Lungenperfusionsversuche .....	53
1.5	Durchführung der Stabilitätsuntersuchungen von Salmeterol in Perfusionsflüssigkeit.....	54
1.6	Ergebnisse .....	54
1.6.1	Pulmonale Absorption von Salmeterol im Lungenperfusionsmodell	54
1.6.2	Stabilität von Salmeterol in der Perfusionsflüssigkeit.....	56
1.7	Diskussion.....	56
1.8	Zusammenfassung.....	60
<b>2</b>	<b>Untersuchung der pulmonalen Pharmakokinetik von IGF-1 in vitro .....</b>	<b>62</b>
2.1	Hintergrund .....	62
2.2	Bronchialepithelzelllinie Calu-3.....	63
2.3	Qualifikation der Zellmonolayer .....	64
2.3.1	Hintergrund .....	64
2.3.2	Überprüfung der Monolayerqualität durch Messen des TEER.....	65
2.3.2.1	Durchführung .....	65
2.3.2.2	Ergebnisse .....	65
2.3.3	Überprüfung der Monolayerqualität durch Messung der Fluoreszeinpermeation .....	66
2.3.3.1	Durchführung .....	66
2.3.3.2	Ergebnisse .....	67
2.3.4	Überprüfung der Monolayerqualität durch Markierung der Tight Junctions.....	67
2.3.4.1	Durchführung .....	67
2.3.4.2	Ergebnis.....	68
2.3.5	Diskussion .....	68
2.3.5.1	Transepithelialer Widerstand.....	68
2.3.5.2	Permeationversuche mit Fluoreszein .....	70
2.3.5.3	Ausbildung der Tight Junctions .....	70
2.3.6	Zusammenfassung .....	71

2.4	In vitro Transportversuche auf porösen Filtersystemen .....	71
2.4.1	Prinzip der Bestimmung .....	71
2.5	Transportversuche mit IGF-1 und Insulin in Vollmedium .....	72
2.5.1	Hintergrund.....	72
2.5.2	Zielsetzung .....	72
2.5.3	Durchführung.....	72
2.5.4	Ergebnisse .....	73
2.5.4.1	Stabilität der Proteine während der Permeationsversuche .....	73
2.5.4.2	Permeationseigenschaften von Insulin und IGF-1 .....	73
2.5.4.3	Einfluss der Proteine auf die Tight Junctions .....	74
2.6	Transportversuche mit Hemmstoffen der Transzytose/Endozytose.....	75
2.6.1	Hintergrund.....	75
2.6.2	Zielsetzung .....	75
2.6.3	Durchführung.....	76
2.6.4	Ergebnisse .....	77
2.7	Diskussion der in Vollmedium durchgeführten in vitro Studien .....	78
2.7.1	Permeationseigenschaften von IGF-1 im Vergleich zu Insulin .....	78
2.7.2	Transportwege des IGF-1 durch Calu-3 Zellen .....	79
2.7.3	Mechanismus der endozytotischen Aufnahme von IGF-1 in Calu-3 Zellen .....	80
2.7.4	Mögliche Rezeptorbeteiligung an der zellulären Aufnahme des IGF-1 in Calu-3 Zellen .....	81
2.8	Transportversuche in bronchioalveolärer Lavage .....	82
2.8.1	Hintergrund.....	82
2.8.2	Zielsetzung .....	83
2.8.3	Durchführung der Transportversuche in bronchioalveolärer Lavage .....	83
2.8.4	Ergebnisse .....	84

2.8.4.1	Stabilität von IGF-1 in der Donorlösung .....	84
2.8.4.2	Permeation von IGF-1 in bronchioalveolärer Lavage .....	84
2.8.4.3	Einfluss der bronchioalveolären Lavage auf die Tight Junctions	86
2.8.5	Diskussion .....	86
2.9	Zusammenfassung der in vitro Studien .....	88
<b>3</b>	<b>Untersuchungen der pulmonalen Pharmakokinetik von IGF-1 mithilfe des humanen Lungenperfusionsmodells .....</b>	<b>90</b>
3.1	Hintergrund .....	90
3.2	Zielsetzung .....	91
3.3	Durchführung der Lungenperfusionsversuche mit IGF-1 .....	91
3.4	Durchführung der Stabilitätsuntersuchung von IGF-1 in Perfusionsflüssigkeit .....	92
3.5	Ergebnisse .....	92
3.5.1	Pulmonale Absorption von IGF-1 im Lungenperfusionsmodell .....	92
3.5.2	Stabilität von IGF-1 in der Perfusionsflüssigkeit .....	94
3.6	Freisetzung von IGF-1 aus Fibroinpartikeln in humaner bronchioalveolärer Lavage .....	94
3.6.1	Hintergrund .....	94
3.6.2	Zielsetzung .....	95
3.6.3	Durchführung der Freisetzungsversuche von IGF-1 aus Fibroinpartikeln in bronchioalveolärer Lavage .....	95
3.6.4	Ergebnisse .....	95
3.7	Diskussion .....	96
3.8	Zusammenfassung .....	99
<b>C</b>	<b>Experimenteller Teil .....</b>	<b>101</b>
<b>1</b>	<b>Untersuchung der pulmonalen Pharmakokinetik von Salmeterol und IGF-1 mithilfe des humanen Lungenperfusionsmodells .....</b>	<b>103</b>
1.1	Reagenzien, Geräte und Materialien .....	103
1.1.1	Substanzen .....	103
1.1.2	Perfusionspuffer .....	104

1.1.3	Humanes Gewebe.....	104
1.1.4	Sonstige Geräte und Materialien.....	105
1.1.5	Aufbau des Lungenperfusionsmodells.....	107
1.2	Systemvorbereitungen und Präparation des Lungenlappens .....	109
1.3	Durchführung der Perfusionsversuche mit Salmeterol.....	110
1.3.1	Charakteristika der verwendeten Lungenlappen und Lungenflügel	110
1.3.2	Beatmung und Perfusion .....	111
1.3.3	Substanzlösungen von Salmeterol und L-Carnitin.....	112
1.3.4	Applikation von Salmeterol und L-Carnitin.....	112
1.3.4.1	Applikation von Salmeterol .....	112
1.3.4.2	Applikation von L-Carnitin und anschließende Applikation von Salmeterol.....	113
1.3.5	Probengewinnung .....	113
1.3.6	Bestimmung der tatsächlich applizierten Dosis von Salmeterol .....	114
1.3.6.1	Bestimmung der Konzentration der Applikationslösung.....	114
1.3.6.2	Bestimmung der Restdosis im Vernebler.....	115
1.3.6.3	Bestimmung der an Spacer und Verbindungsstücken haftenden Menge Salmeterol .....	115
1.3.7	Stabilität von Salmeterol in Perfusionsflüssigkeit .....	115
1.4	Quantitative Analyse der Perfusionsversuche mit Salmeterol.....	116
1.4.1	Kalibrierstandards.....	116
1.4.1.1	Kalibrierstandards aus Perfusionsflüssigkeit.....	116
1.4.1.2	Kalibrierstandards aus 50 % Wasser/Methanol .....	116
1.4.2	Probenaufarbeitung aus Perfusionsflüssigkeit.....	116
1.4.3	LC MS/MS System .....	117
1.4.4	Quantifizierung .....	118
1.5	Validierung der Methode zur quantitativen Analyse von Salmeterol .....	119
1.5.1	Linearität.....	119

1.5.2	Präzision und Richtigkeit.....	119
1.5.3	Bestimmungsgrenze (LLOQ) .....	120
1.5.4	Wiederfindung.....	121
1.6	Durchführung der Lungenperfusionen mit IGF-1 .....	121
1.6.1	Charakteristika der verwendeten Lungenlappen und Lungenflügel	121
1.6.2	Beatmung und Perfusion .....	122
1.6.3	IGF-1-Partikel .....	123
1.6.4	Applikation der Partikel .....	123
1.6.5	Probengewinnung.....	124
1.6.6	Bestimmung der tatsächlich applizierten Dosis von IGF-1 .....	124
1.6.6.1	Bestimmung der in den Applikator gegebenen Menge IGF-1...	125
1.6.6.2	Bestimmung der in der Applikationsvorrichtung haftenden Menge IGF-1 .....	125
1.6.6.3	Bestimmung der an den Verbindungstücken haftenden Menge IGF-1 .....	125
1.6.7	Stabilität von IGF-1 in der Perfusionsflüssigkeit.....	126
1.7	Freisetzung von IGF-1 aus Fibroinpartikeln in bronchioalveolärer Lavage.....	126
1.7.1	Bronchioalveoläre Lavage .....	126
1.7.2	Konzentrierung der bronchioalveolären Lavage .....	126
1.7.3	Durchführung der Freisetzungsversuche .....	127
<b>2</b>	<b>Untersuchen der pulmonalen Pharmakokinetik von IGF-1 in vitro .....</b>	<b>128</b>
2.1	Materialien.....	128
2.1.1	Reagenzien.....	128
2.1.2	Sonstige Geräte und Materialien .....	128
2.1.3	Zellkultur .....	130
2.2	Routinearbeiten in der Zellkultur.....	130
2.2.1	Kultivierung .....	130



2.2.2	Passagieren .....	130
2.2.3	Einfrieren und Auftauen.....	131
2.2.4	Zellzählung .....	131
2.3	Kultivierung der Calu-3 Zellen auf porösen Filtern .....	132
2.3.1	Aufbau des Permeationsmodells.....	132
2.3.2	Aussaat der Zellen auf poröse Filter.....	133
2.4	Qualifizierung der Monolayer .....	134
2.4.1	Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes .....	134
2.4.2	Permeation mit Fluoreszein.....	135
2.4.3	Berechnung des Permeationskoeffizienten .....	136
2.4.4	Markierung der Tight Junctions .....	136
2.4.5	Zusammenfassung der Qualitätsuntersuchungen und Vorbehandlung der Monolayer für Transportversuche.....	137
2.5	Transportversuche mit IGF-1 in Vollmedium.....	137
2.5.1	Lösungen.....	137
2.5.2	Durchführung der Versuche .....	138
2.5.3	Einfluss von IGF-1 in Vollmedium auf die Tight Junctions.....	138
2.5.4	Stabilität von IGF-1 während der Transportversuche .....	139
2.6	Transportversuche mit IGF-1 und Hemmsubstanzen der Transzytose. 139	
2.6.1	Hemmstoffe .....	139
2.6.2	Lösungen.....	139
2.6.3	Durchführung.....	140
2.7	Transportversuche mit IGF-1 in bronchioalveolärer Lavage .....	140
2.7.1	Bronchioalveoläre Lavage .....	140
2.7.2	Konzentrierung der bronchioalveolären Lavage .....	141
2.7.3	Lösungen.....	142
2.7.4	Durchführung der Transportversuche.....	142
2.7.5	Einfluss der bronchioalveolären Lavage auf die Tight Junctions ....	143

2.7.6	Stabilität von IGF-1 während der Transportversuche .....	143
2.8	Transportversuche mit Insulin in Vollmedium .....	143
2.8.1	Lösungen .....	143
2.8.2	Durchführung der Versuche .....	143
2.8.3	Einfluss von Insulin in Vollmedium auf die Tight Junctions .....	144
2.8.4	Stabilität von Insulin während der Transportversuche .....	144
<b>3</b>	<b>Analytik von IGF-1, Insulin und Fluoreszein .....</b>	<b>145</b>
3.1	Quantitative Bestimmung von IGF-1 .....	145
3.1.1	Proben aus den in vitro Versuchen .....	145
3.1.2	Proben aus den Lungenperfusions- und Freisetzungsversuchen ..	145
3.1.3	Durchführung des Elisa zur Bestimmung des IGF-1 .....	145
3.2	Quantitative Bestimmung von Insulin .....	146
3.2.1	Proben aus den in vitro Versuchen .....	146
3.2.2	Durchführung des Elisa zur Bestimmung des Insulin .....	146
3.2.3	Auswertung der Elisas .....	147
3.3	Quantitative Bestimmung von Fluoreszein .....	149
<b>D</b>	<b>Tabellarischer Anhang .....</b>	<b>151</b>
<b>1</b>	<b>Untersuchung der pulmonalen Pharmakokinetik von Salmeterol mithilfe des Lungenperfusionsmodells .....</b>	<b>153</b>
1.1	Tatsächlich applizierte Dosis von Salmeterol in den Lungenperfusionsversuchen .....	153
1.2	Ergebnisse der Lungenperfusionsversuche mit alleiniger Salmeterol Applikation .....	154
1.3	Ergebnisse der Lungenperfusionsversuche mit L-Carnitin/Salmeterol Applikation .....	156
1.4	Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung von Salmeterol in der Perfusionsflüssigkeit .....	157
<b>2</b>	<b>Untersuchung der pulmonalen Pharmakokinetik von IGF-1 in vitro ...</b>	<b>158</b>
2.1	Ergebnisse der Qualitätsüberprüfungen .....	158
2.1.1	TEER Werte der 21 tägigen Messung .....	158

2.1.2	Fluoreszeinpermeationen .....	159
2.1.3	Markierung der Tight Junctions .....	160
2.2	Ergebnisse der Permeationen durch Calu-3 Zellen in Vollmedium .....	161
2.2.1	Permeationen mit IGF-1 in Vollmedium.....	161
2.2.2	Einfluss von IGF-1 in Vollmedium auf die Tight Junctions.....	163
2.2.3	Permeationen von Insulin in Vollmedium.....	164
2.2.4	Einfluss von Insulin in Vollmedium auf die Tight Junctions.....	166
2.2.5	Stabilität von IGF-1 und Insulin im Permeationsmedium .....	166
2.3	Ergebnisse der Permeation von IGF-1 in Vollmedium mit Hemmstoffen der Transzytose/Endozytose.....	167
2.3.1	Permeation mit Inhibitor Nocodazol.....	167
2.3.2	Permeation mit Inhibitor Dynasore .....	168
2.3.3	Permeation mit Inhibitor Phenylarsinoxid .....	169
2.3.4	Permeation mit Inhibitor Amilorid.....	170
2.3.5	Permeation mit Inhibitor Amantadin .....	171
2.3.6	Permeation mit Inhibitor Indometacin .....	172
2.3.7	Mittelwert der Konzentrationen von IGF-1 in den Donorlösungen mit Vollmedium.....	173
2.4	Ergebnisse der Permeationen in BAL .....	174
2.4.1	Permeation von IGF-1 in BAL als Donorlösung.....	174
2.4.2	Permeation von IGF-1 in Vollmedium (Kontrolle) als Donorlösung	175
2.4.3	Permeation von IGF-1 in BAL mit Hemmstoffen der Transzytose/Endozytose .....	176
2.4.3.1	Permeation mit Hemmstoff Nocodazol.....	176
2.4.3.2	Permeation mit Hemmstoff Dynasore .....	178
2.4.3.3	Mittelwert der Konzentrationen von IGF-1 in Donorlösungen mit BAL .....	179
2.4.4	Einfluss von IGF-1 in BAL auf die Tight Junctions.....	180

2.4.4.1	TEER Werte vor und nach der Permeation .....	180
2.4.4.2	Fluoreszeinpermeation nach der Permeation von IGF-1/BAL..	182
2.4.4.3	Fluoreszeinpermeation nach der Permeation von IGF-1/Vollmedium .....	182
2.4.5	Stabilität von IGF-1 in BAL-Donorlösung .....	183
<b>3</b>	<b>Untersuchung der pulmonalen Pharmakokinetik von IGF-1 mithilfe des Lungenperfusionsmodells .....</b>	<b>184</b>
3.1	Tatsächlich applizierte Dosis von IGF-1 in den Lungenperfusionsversuchen.....	184
3.2	Ergebnisse der Lungenperfusionsversuche mit IGF-1/Trehalose Applikation .....	185
3.3	Ergebnisse der Lungenperfusionsversuche mit IGF-1/Fibroin Applikation .....	186
3.4	Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen von IGF-1 in Perfusionsflüssigkeit.....	187
3.5	Ergebnisse der Freisetzungversuche von IGF-1/Fibroin-Partikeln .....	188
<b>E</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>191</b>
1	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>193</b>
2	<b>Summary.....</b>	<b>196</b>
<b>F</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>199</b>
<b>G</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>201</b>





## **A Einleitung**

---





# 1 Die menschliche Lunge

## 1.1 Anatomie der menschlichen Lunge

Die menschliche Lunge kann eingeteilt werden in einen luftleitenden Bereich und einen Bereich für den Gasaustausch. Zu dem luftleitenden Bereich werden die Trachea, der Bronchus und die Bronchiolen gezählt, der Gasaustausch von Sauerstoff gegen Kohlenstoffdioxid findet in den Bronchioli respiratorii, den Alveolargängen und in den Lungenbläschen statt [1]. Die Luftröhre mündet in die Bronchialäste, und nach den Hauptbronchien kommt es zu weiteren Aufteilungen in die Lappenbronchien, Segmentbronchien und die Subsegmentbronchien, wobei nach mehreren Teilungsgenerationen der luftführende Teil endet und in den gasaustauschenden Abschnitt übergeht. Dieser beginnt mit den Bronchioli respiratorii und mündet anschließend in die Alveolen, mit einer geschätzten Anzahl von ca. 400 Mio Lungenbläschen [2]. Insgesamt kommt es zu ca. 23 Aufteilungen [2]. Die Fläche der Lungenbereiche nimmt mit zunehmendem Verzweigungsgrad zu, mit einer Oberfläche der Alveolen von ca. 100 m<sup>2</sup> [1]. Es existieren über 60 verschiedene Zelltypen in der Lunge, wobei die Luftwege vier Hauptgruppen von Zellarten besitzen, die Basalzellen, die Becherzellen, die Flimmerepithelzellen und die sekretorischen Zellen [1]. Die Alveolen hingegen bestehen aus nur zwei Hauptgruppen von Zellarten, den sehr breiten und dünnen Typ 1 Alveolarzellen und den kleinen kompakten Typ 2 Alveolarzellen [1].

## 1.2 Bronchioalveoläre Flüssigkeit

Die bronchioalveoläre Flüssigkeit bedeckt die Luftwege und die Alveolen [3]. Die Flüssigkeit beinhaltet viele verschiedene Zellen und lösliche Bestandteile der Lunge, die eine wichtige Rolle zum Schutz der Lunge und zum Aufrechterhalten des Gasaustausches innehaben [3]. Die bronchioalveoläre Flüssigkeit ist außerdem ein Reservoir für das Surfactant und enthält im Bereich der Luftwege Mucus [1]. Surfactant ist ein Lipoprotein-Komplex und beinhaltet ca. 90 % Lipide und ca. 10 % Proteine, wobei 80 – 90 % der Lipide aus Phospholipiden bestehen [4]. Bisher wurden 4 Surfactantproteine gefunden, Surfactantprotein A, B, C und D [4]. Das Surfactant

setzt die Oberflächenspannung in der Lunge herab und ermöglicht so den Gasaustausch und verhindert ein Kollabieren der Alveolen [4].

Um die löslichen und zellulären Bestandteile der Flüssigkeit zu erhalten kann eine Lavage durchgeführt werden [5]. Hierbei wird während einer Bronchoskopie eine Spülflüssigkeit in die Lunge eingebracht und wieder aspiriert, wobei man die bronchioalveoläre Lavage erhält [6]. Zelluläre Bestandteile einer Lavage sind Makrophagen, welche 80 – 95 % der zellulären Fraktion ausmachen, Lymphozyten, eosinophile und neutrophile Granulozyten, in manchen Fällen Plasmazellen [5]. Außerdem wurden Plattenepithelzellen, Bronchialepithelzellen, Typ 2 Alveolarzellen, basophile Granulozyten und Mastzellen in bronchioalveolärer Lavage gefunden [5]. Die löslichen Bestandteile beinhalten Proteine, Fette und Nukleinsäuren [3]. Proteine sind in hoher Bandbreite vorhanden mit einem großen Anteil an Plasmaproteinen, die womöglich aus dem Blut stammen und mittels Diffusion über die Blut/Luft Schranke in die Lunge gelangen [3]. Manche dieser Proteinen werden auch in der Lunge selber gebildet, wie beispielsweise  $\alpha_1$ -Antitrypsin, Apolipoprotein A, Immunglobuline oder die Komplementfaktoren 3 und 4 [3]. Dies geschieht wahrscheinlich, um einen zusätzlichen Schutz vor eindringenden Mikroorganismen, oxidativen Schäden und Proteasen, die während Entzündungsvorgängen gebildet werden, zu gewährleisten [3]. Weitere Bestandteile sind antioxidative Proteine und Proteine des Zytoskeletts [3]. Außerdem sind Proteine vorhanden, die involviert sind in Reparatur- und Wachstumvorgänge von Gewebe, in immunologische und inflammatorische Prozesse sowie in den Lipidmetabolismus [3].

### **1.3 Erkrankungen der Lunge**

#### **1.3.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung**

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist eine häufig vorkommende Krankheit, mit einer Prävalenz weltweit von 11 – 26 % bei Menschen über 40 Jahren [2]. Die Erkrankung ist charakterisiert durch eine progressive und persistente Einschränkung der Atmung, assoziiert mit einer verstärkten chronischen Entzündungsreaktion in der Lunge durch noxische Partikel oder Gase [7]. Die COPD zählt zu den Volkskrankheiten unserer Gesellschaft und gehört zu den führenden

Ursachen für Mortalität (weltweit an 3. Stelle in der Todesursachenstatistik) und Morbidität [2]. Wichtigster Risikofaktor ist das Zigarettenrauchen, wobei andere Umstände die Entwicklung und den Verlauf beeinflussen können wie beispielsweise genetische Disposition, das Alter und bronchiale Hyperreagibilität [7]. Inhalierete Partikel führen zu einer Entzündungsreaktion, wodurch eine obstruktive Bronchitis entsteht und sich ein Remodeling der Atemwege anschließt [2]. Außerdem kommt es durch die chronische Entzündung zur Zerstörung des Parenchyms, was wiederum in Emphysemen resultiert [2]. Verstärkt werden die inflammatorischen Prozesse durch oxidativen Stress und ein Ungleichgewicht zwischen Proteasen und Protease-Inhibitoren [2]. Diese pathophysiologischen Vorgänge führen zum „Air Trapping“ und einer Atemflussbehinderung [7]. Letztere ist durch folgende Hauptmechanismen bedingt, eine Verdickung der Bronchialwände, eine Hypersekretion bzw. mukoziliäre Dysfunktion, und eine expiratorische Instabilität der Atemwege [2]. Die COPD ist häufig begleitet von Komorbiditäten wie kardiovaskulären Erkrankungen, Lungenkrebs, Abbau der Kondition, Muskelschwund, Abnahme der fettfreien Körpermasse oder Übergewicht, Osteoporose, Anämie, und Depressionen [8]. Die Diagnose der COPD erfolgt mittels Spirometrie, wobei 70 % des Verhältnisses zwischen der forcierten 1 sec Kapazität (FEV<sub>1</sub>) zu der forcierten Vitalkapazität (FVC) nach Inhalation eines Bronchodilatators häufig als Entscheidungsgrenze verwendet wird [7]. In die Einteilung des Schweregrades (A – D) gehen neben der Lungenfunktion die Exazerbationsrate und die Schwere der Symptome ein, wobei A die schwächste Form darstellt und D die schwerste [7].

Für die Pharmakotherapie der COPD stellen inhalative  $\beta_2$ -Agonisten (kurz- und langwirksame) einen essentiellen Bestandteil der bronchodilatativen Therapie dar. Daneben werden inhalative Muskarinrezeptorantagonisten eingesetzt. Je nach Schweregrad werden Kombinationen von inhalativen Glukokortikoiden mit langwirksamen Bronchodilatoren angewendet [7]. In schweren Fällen können Kombinationen von langwirksamen  $\beta_2$ -Agonisten, Muskarinrezeptorantagonisten und Glukokortikoiden angezeigt sein [7]. Weitere therapeutische Optionen sind der Phosphodiesterase-4 Inhibitor Roflumilast oder das Xanthinderivat Theophyllin [7]. Eine Übersicht über die inhalativen Arzneimittel zur Behandlung der COPD befindet sich in Tab. 1.

Tab. 1: Inhalative Arzneimittel zur Behandlung der COPD.

Substanz	Klasse	Wirkdauer der Bronchodilatoren
Salbutamol	$\beta_2$ -Agonist	Kurzwirksam 3-4 h [9]
Fenoterol	$\beta_2$ -Agonist	Kurzwirksam 3-5 h [10]
Salmeterol	$\beta_2$ -Agonist	Langwirksam 12 h [11]
Formoterol	$\beta_2$ -Agonist	Langwirksam 12 h [12]
Terbutalin	$\beta_2$ -Agonist	Kurzwirksam 4-6 h [13]
Indacaterol	$\beta_2$ -Agonist	Langwirksam >24 h* [14]
Glycopyrronium	Muskarin- rezeptorantagonist	Langwirksam >24 h** [14]
Ipratropium	Muskarin- rezeptorantagonist	Kurzwirksam 4-6 h [15]
Tiotropium	Muskarin- rezeptorantagonist	Langwirksam > 24 h [16]
Aclidinium	Muskarin- rezeptorantagonist	Langwirksam 12 h [17]
Budesonid	Glukokortikoid	
Beclomethasondipropionat	Glukokortikoid	
Fluticasonpropionat	Glukokortikoid	

\* In Verbindung mit Glycopyrronium; \*\* In Verbindung mit Indacaterol

### 1.3.2 Asthma bronchiale

Asthma bronchiale ist eine chronisch entzündliche Atemwegserkrankung. Die chronische Entzündung geht mit einer bronchialen Hyperreagibilität einher, die zu rezidivierenden Episoden von Giemen, Kurzatmigkeit, Brustenge und Husten führt, die am stärksten in der Nacht und morgens auftreten [2, 18]. Mit den Episoden ist in der Regel eine Atemflussbehinderung assoziiert, die variabel und reversibel ist [2, 18]. Asthma bronchiale zählt zu den häufigsten chronischen Erkrankungen, an der weltweit ca. 300 Mio Menschen leiden, mit einer relativ stabilen Prävalenz in den westlichen Ländern von 10 % bei Kindern und 5 % im Erwachsenenalter [2]. Die Ausbildung eines Asthma bronchiale ist vor allem genetisch bedingt, wobei hier auch das Zusammenspiel mit äußeren Einflüssen eine Rolle spielt, wie beispielsweise eine virale Infektion der Atemwege [18]. Faktoren, die asthmatische Beschwerden auslösen können, sind zum Beispiel Atemwegsinfektionen, körperliche Betätigung, Rauch und Kälte [2]. Für die Diagnose des Asthma bronchiale wird in der Regel die Spirometrie angewendet, eventuell in Kombination mit einer Bodyplethysmographie, wobei mittels Inhalation eines Bronchodilatators die Reversibilität einer nachgewiesenen Obstruktion überprüft wird [2]. Eine Obstruktion gilt als reversibel, falls eine Besserung des FEV<sub>1</sub> von > 12 % und mindestens 200 mL erzielt wird [18]. Kann eine primäre Obstruktion nicht nachgewiesen werden, so bietet der Provokationstest mit beispielsweise inhalativ verabreichtem Methacholin eine weitere Möglichkeit Asthma bronchiale zu diagnostizieren [2, 18]. Die Einteilung der Erkrankung nach dem Schweregrad bezieht den Grad der Symptome, der Atemflusslimitierung und der Variabilität der Lungenfunktion mit ein und hat vier Stufen, wobei Stufe 1 die mildeste Form darstellt, und Stufe 4 die schwerste [18]. Die Therapie des Asthma bronchiale richtet sich allerdings hauptsächlich nach der Beurteilung der Asthmakontrolle, das kontrollierte Asthma, das teilkontrollierte Asthma, und das unkontrollierte Asthma [18]. Inhalativ verabreichte kurzwirksame  $\beta_2$ -Agonisten werden als Reliever zur kurzzeitigen Bronchodilatation (siehe Tab.1) eingesetzt, als Controller zur langfristigen Entzündungshemmung dienen in der Regel inhalative Glukokortikoide (siehe Tab. 1). Neben den für die Therapie der COPD verwendeten Glukokortikoiden (siehe Tab. 1) werden für die Behandlung des Asthma bronchiale zusätzlich Mometasonfuorat und Ciclesonid als inhalative

Glukokortikoide angewendet. Pulmonal applizierte langwirksame  $\beta_2$ -Agonisten (siehe Tab. 1) werden im Normalfall in Kombination mit Glukokortikoiden eingesetzt. Weitere Therapieoptionen stellen die Leukotrienantagonisten wie Montelukast, Mastzellenstabilisatoren wie Cromoglicinsäure, das Xanthinderivat Theophyllin, und in schweren Fällen Anti-IGE Antikörper wie Omalizumab, dar [18].

### **1.4 Die Lunge als Eintrittsort in den systemischen Kreislauf**

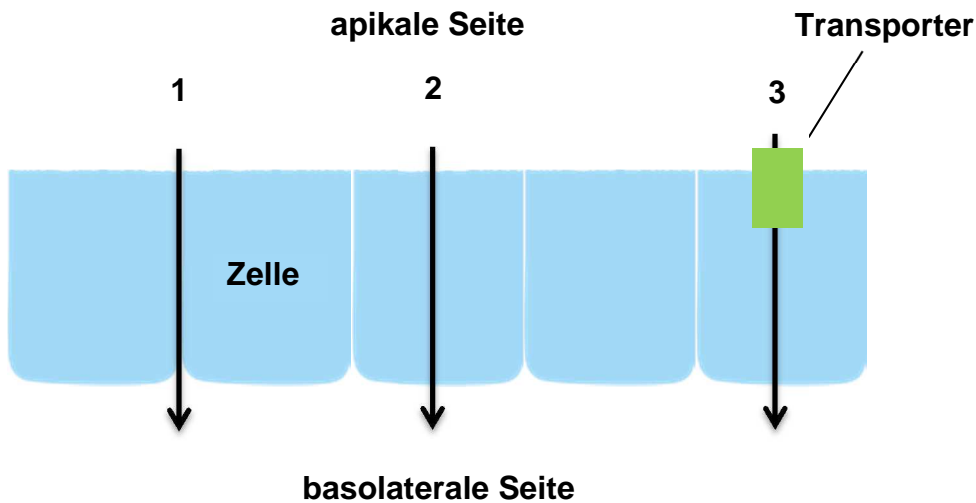
Für die Therapie der unter 1.3 beschriebenen Erkrankungen COPD und Asthma bronchiale ist eine topische Wirkung von inhalativen Arzneimitteln gewünscht, was bedeutet, dass die Lunge Applikations- und gleichzeitig Wirkort ist. Zusätzlich ist das Interesse an der Lunge als Applikations- und Eintrittsort in den systemischen Kreislauf für Arzneimittel stark gewachsen [19]. Eine mögliche pulmonale Applikation für eine systemische Wirkung wurde sowohl für niedermolekulare Substanzen untersucht wie beispielsweise Fentanyl [20] oder Epinephrin [21] als auch für hochmolekulare Substanzen wie exemplarisch Glucagon-like Peptide-1 [22], Insulin [23], Heparin [24] und viele andere [21]. Für das Insulin existierte bereits unter dem Namen Exubera<sup>®</sup> (Pfizer Inc., New York City, NY, USA) ein zugelassenes Arzneimittel, das nach Inhalation systemisch verfügbar war [25], aber 2007 hauptsächlich aus kommerziellen Gründen vom Markt genommen wurde [26]. Ein weiteres inhalatives Insulin unter dem Namen Afrezza<sup>®</sup> (MannKind Corp., Valencia, CA, USA) wurde im Jahr 2014 von der amerikanischen Arzneimittelbehörde, der Food and Drug Administration, zugelassen [27]. Die Lunge eignet sich als Eintrittsort in den systemischen Kreislauf besonders aufgrund der erwähnten großen Oberfläche, der guten Durchblutung, einem extrem dünnen alveolaren Epithel und einer kurzen Distanz zwischen dem Oberflächenepithel und dem Blut der Alveolarregion [28]. Zusätzlich befindet sich eine geringe Anzahl an Proteasen oder Peptidasen in der Lunge und der hepatische First Pass Effekt wird umgangen [28]. Folglich kann nach Deposition in der Alveolarregion ein inhaliertes Arzneimittel schnell absorbiert werden, ohne, wie nach Resorption aus dem Darm, im hepatischen First Pass Metabolismus verstoffwechselt zu werden [28]. Hinzu kommt, dass hochmolekulare Substanzen aus dem Darm nicht absorbiert werden können und daher nicht über perorale Applikation in den systemischen Kreislauf gelangen. Die Bioverfügbarkeit

von Peptiden und Proteinen über die Lunge ist somit im Vergleich mit anderen nicht invasiven Routen 10 – 200fach größer [29]. Demzufolge stellt die Lunge als Eintrittsort in den systemischen Kreislauf eine sehr interessante Alternative zur Injektion dar.

### **1.5 Wege über das Lungenepithel**

Die größte Barriere für die Absorption von inhalierten Substanzen in der Lunge stellt das Lungenepithel dar [29]. Die Dicke und die Zusammensetzung des Epithels variieren von Trachea (50 – 60  $\mu\text{m}$ ) bis zu den Alveolen (0,5  $\mu\text{m}$ ) [29]. Passiver Transport über das Lungenepithel kann transzellulär, also durch die Zellen, oder parazellulär, also zwischen den Zellen, ablaufen [29, 30], wobei lipophile Moleküle aufgrund der Wechselwirkung mit der Lipiddoppelschicht in der Zellmembran transzellulär und hydrophile durch Poren in den Tight Junctions parazellulär transportiert werden [29]. Außerdem wichtig für den Übertritt über das Lungenepithel sind Transportproteine [30]. Diese befinden sich in der Zellmembran und werden zahlreich in der Lunge ausgebildet [31, 32]. Der aktive Weg über Transporter ist in der Regel sättigbar, hemmbar und energieabhängig [29]. Eine weitere Möglichkeit, das Lungenepithel durch die Zellen zu passieren, ist der vesikuläre Transport, die Transzytose. Hierbei involviert sind die Endozytose, Eintritt in die Zelle, und die Exozytose, Austritt aus der Zelle [30].

Eine schematische Darstellung der Transportwege über das Lungenepithel ist in Abb.1 dargestellt.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der Transportwege über das Lungenepithel; 1: parazellulärer Transport; 2: transzellulärer Transport; 3: Transport mithilfe eines Transportproteins; Pfeile geben die Transportrichtung an.

### 1.5.1 Vesikulärer Transport

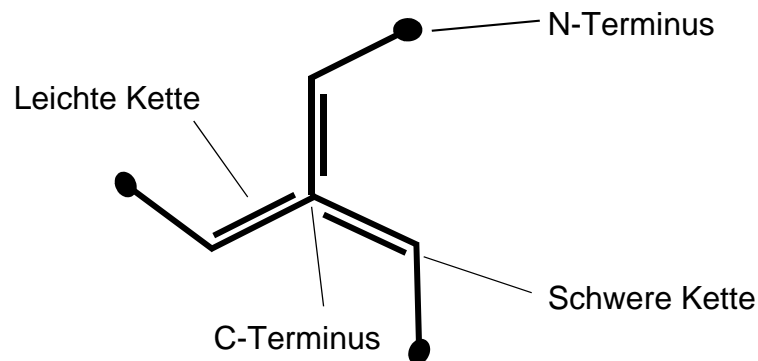
Für den Transport von Makromolekülen über das Lungenepithel scheinen sowohl der passive parazelluläre Transport sowie transzytotische/endozytotische Mechanismen in Frage zu kommen [1, 33, 34]. Eine große Anzahl an Makromolekülen sowie auch Peptide und Proteine werden in der Lunge über vesikulären Transport zellulär aufgenommen [30]. Unter anderen konnten endozytotische Aufnahmewege in Lungenepithelzellen beobachtet werden für Makromoleküle wie beispielsweise FITC-Albumin [35, 36], und FITC-Insulin [37, 38]. Außerdem wurden für Insulin und FITC-Insulin auch Hinweise für eine Transzytose durch Lungenepithelzellen gefunden [39-41]. Die zelluläre Aufnahme über Vesikel kann in zwei große Gruppen eingeteilt werden, zum einen die Clathrin-abhängige und zum anderen die Clathrin-unabhängige Endozytose [42]. Neben diesen Mechanismen existieren noch die Phagozytose und die Makropinozytose [43, 44].

#### 1.5.1.1 Clathrin-abhängige Endozytose

Das Protein Clathrin besteht aus drei leichten (ca. 25 kDa) und drei schweren (ca. 190 kDa) Ketten und ist wie eine Triskele angeordnet [45]. Im Zentrum dieses



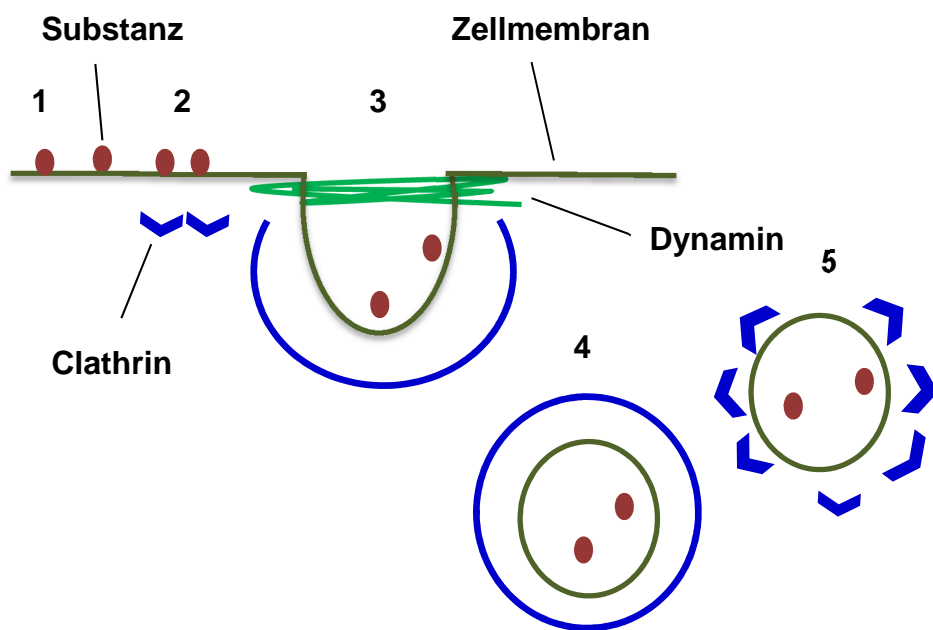
Hexamers befinden sich die C-Termina der schweren Ketten, dieser Bereich bildet den proximalen Teil des Moleküls [46]. Im äußeren Bereich befinden sich der distale Teil und die N-Termina [46] (siehe Abb. 2).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung von Clathrin. Nach Muosavi et al. [47].

Der N-Terminus besitzt eine Bindestelle, die mit einer Reihe von endozytotischen Proteinen wechselwirkt [47]. Clathrinmoleküle können aneinander lagern und bilden so Vesikel, die aus Hexagonen und Pentagonen bestehen [46, 48]. Für den Prozess der Vesikelbildung und der Bindung der zu transportierenden Substanz spielen Adaptorproteine und akzessorische Proteine eine entscheidende Rolle, da die Clathrinmoleküle selber weder mit der Plasmamembran noch mit der zu transportierenden Substanz wechselwirken [49]. Zu den vier Adaptorproteinen (AP) gehört das AP-2, ein großer Proteinkomplex, der wichtig für den Vorgang der Vesikelbildung ist und als Bindemolekül für Substanzen fungiert und wahrscheinlich den wichtigsten Vertreter der Adaptorproteine darstellt [49, 50]. Die Clathrin-abhängige Endozytose läuft an speziellen Membranabschnitten, sogenannten „clathrin coated pits“, ab [47]. Diese Abschnitte bilden eine Einbuchtung und binden Clathrin über Adaptorproteine und akzessorische Proteine [47]. Nachdem eine Substanz gebunden hat, lagern sich vermehrt Clathrinmoleküle an, die polymerisieren, wodurch die Ausbuchtung des Membranabschnittes begünstigt wird [49]. Die Abtrennung des Vesikels von der Membran wird durch die große GTPase Dynamin gesteuert [43]. Diese formt ein Polymer um die Membran und trennt durch GTP-Hydrolyse den Vesikel von der Membran [43]. Anschließend wird die Clathrinhülle durch ATPasen entfernt und die wiedergewonnenen Clathrinmoleküle

können somit erneut verwendet werden [49]. Die Vesikel bringen ihren Inhalt anschließend zu den frühen Endosomen, die als Recycling-Endosomen die zu transportierende Substanz zu der Zellmembran an der Eintrittseite oder eine andere Stelle (Transzytose) bringen können und dort den Inhalt aus der Zelle schleusen [51]. Außerdem können sich multivesikuläre Körper bilden, die sich zu den späten Endosomen in der Zelle bewegen und mit diesen verschmelzen. Von dort aus kann der Inhalt entweder zu dem trans-Golgi-Netzwerk bzw. zur Plasmamembran transportiert oder durch Bildung von Lysosomen abgebaut werden [51]. Die Clathrin-abhängige Endozytose ist als Beispiel für den vesikulären Transport schematisch in Abb. 3 dargestellt.

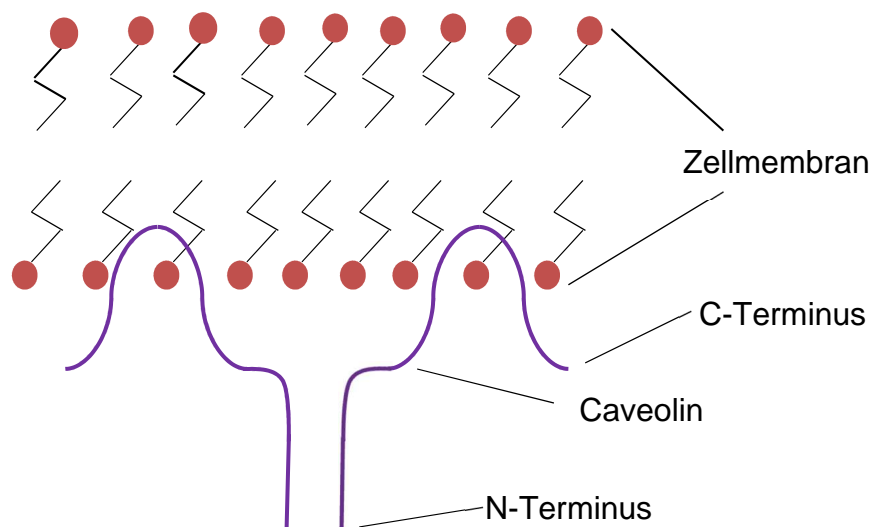


**Abb. 3:** Schematische Darstellung des vesikulären Transportes am Beispiel der Clathrin-abhängigen Endozytose; 1: Andockung der Substanz; 2: Anlagerung von Clathrinmolekülen; 3 Einbuchtung der Membran, Polymerisierung von Clathrin und Abtrennung des Vesikels durch Dynamin; 4: abgetrennter Vesikel; 5: Ablösung der Clathrinhülle. Nach Chen et al. [50].

Ein Beispiel für die Clathrin-abhängige Endozytose ist die Beteiligung an der zellulären Aufnahme von FITC-Albumin in Alveolarzellen [35, 36].

### 1.5.1.2 Caveolae-abhängige Transzytose

Caveolae sind Einbuchtungen in Zellmembranen, die in Bereichen mit hohem Anteil an Caveolin-Proteinen, Cholesterol, Sphingolipiden und Glycosylphosphatidylverankerten Proteinen (Lipid Rafts) vorkommen [44]. Caveolin ist in der Zellmembran wie eine Haarnadel angeordnet, so dass das N- und C-Ende in das Zytoplasma ragen und sich die zentrale hydrophobe Domäne in der Zellmembran befindet [52] (siehe Abb. 4).



**Abb. 4:** Schematische Darstellung des Caveolins in der Zellmembran. Nach Parton et al. [52].

Nach Polymerisation des Caveolins werden Einbuchtungen in der Plasmamembran gebildet [52]. Das Abtrennen der Vesikel von der Plasmamembran wird durch Dynamin gesteuert, wobei die Vesikel anschließend mit Caveosomen oder den frühen Endosomen verschmelzen können, oder direkt durch Fusionieren mit der Plasmamembran recycelt werden können [52]. Caveosomen können den Inhalt zum Golgiapparat oder endoplasmatischen Retikulum bringen [53]. Ein Beispiel für eine Beteiligung der Caveolae-abhängigen Endozytose ist die zelluläre Aufnahme des Simian-Virus 40, das über die Caveolae in die Zellen eintritt [54, 55].

### **1.5.1.3 RhoA-GTPase-abhängige Endozytose**

Ein weiterer Clathrin-unabhängiger, aber Dynamin-abhängiger Mechanismus ist gesteuert von der kleinen GTPase RhoA, wahrscheinlich durch Einfluss auf die Regulation des Actinzytoskeletts [44]. Die Vesikelbildung scheint hierbei abhängig von den Lipid Rafts zu sein [56].

Die Vesikel bilden wahrscheinlich wie im Falle der Clathrin-abhängigen Endozytose frühe und anschließend späte Endosomen bzw. Lysosomen [57]. Ein RhoA-abhängiger Mechanismus ist beispielsweise verantwortlich für die zelluläre Aufnahme des Interleukin-2 Rezeptors [58].

### **1.5.1.4 Dynamin-unabhängige Endozytose**

Dynamin-unabhängige Endozytose-Wege werden gesteuert durch die kleinen GTPasen ARF6 oder CDC42 [56]. CDC42 spielt eine Rolle in der Stimulation der Actin-Polymerisation [59]. Der CDC42-abhängige Weg ist zum Beispiel verantwortlich für die Endozytose von Glycosylphosphatidyl-verankerten Proteinen [60]. ARF6 hat unter anderem Einfluss auf das Actinzytoskelett an der Plasmamembran [61]. Die durch die GTPase ARF6 gesteuerte Endozytose ist in der Regel unabhängig von Dynamin [56], wie beispielsweise die zelluläre Aufnahme der  $\alpha$ -Untereinheit des Interleukin-2 Rezeptors [62].

Zu nennen sind noch die Membran-Proteine Flotillin 1 und 2, die eine wichtige Rolle für sowohl die Dynamin-unabhängige sowie die Dynamin-abhängige Endozytose zu spielen scheinen [56]. Ein Beispiel für eine Dynamin-unabhängige zelluläre Aufnahme, beeinflusst durch Flotillin, wäre die Endozytose des Cholera-Toxin-B [63].

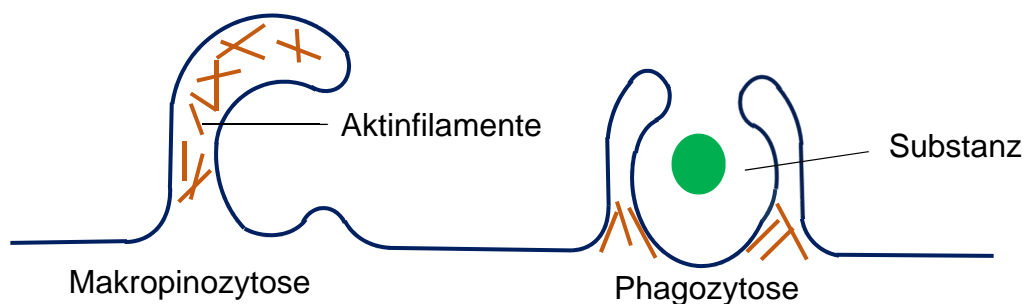
### **1.5.1.5 Makropinozytose und Phagozytose**

Ein weitere Möglichkeit in die Zelle zu gelangen ist die Makropinozytose [43, 44]. Hierbei wird durch Bildung von großen Vesikeln extrazelluläre Flüssigkeit internalisiert [43, 44].

Die Makropinozytose ist abhängig von Actin [44, 62], und findet in gefalteten Membranregionen statt [43]. Die Vesikel (Makropinosomen) können zwischen 0,2 - 5  $\mu\text{m}$  groß sein [64]. Somit ist die Makropinozytose verantwortlich für die zelluläre Aufnahme von gelösten Substanzen, die auf Grund ihrer Größe für keine anderen

endozytotischen Mechanismen in Frage kommen [64]. Als Beispiele für eine Makropinozytose sind die zelluläre Aufnahme von Fluid-Phase Markern und der Rezeptor-Tyrosinkinase zu nennen [43].

Daneben existiert noch die Phagozytose, ein schrittweiser endozytotischer Prozess, wobei die Partikel durch tassenförmige Einbuchtungen der Zellmembran eingeschlossen werden, um dann Phagosomen zu bilden [62] (siehe Abb. 5). Der Prozess der Phagozytose ist abhängig von Actin [44, 62], allerdings im Gegensatz zur Makropinozytose gesteuert von Rezeptoren [64]. Die Phagozytose ist beispielsweise wichtig für die Aufnahme von Pathogenen [43]. Die Makropinozytose und die Phagozytose sind in Abb. 5 schematisch dargestellt.



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Makropinozytose und Phagozytose. Nach Mayor et al. [44].

## 1.5.2 Transport über Transportproteine

Das Lungenepithel kann auch mithilfe von Transportern überwunden werden, die zahlreich in der Lunge ausgebildet werden [31, 32]. Daher muss bei der Untersuchung der Pharmakokinetik von pulmonal applizierten Stoffen eine mögliche Beteiligung von Transportproteinen in Betracht gezogen werden.

In der vorliegenden Studie spielen die „solute carrier transporter“ (SLC22) eine wichtige Rolle. Der Aufbau der SLC22 Transporter ist gekennzeichnet durch 12  $\alpha$ -helicale transmembrane Domänen (TMD), einer großen glycosylierten extrazellulären Schleife zwischen TMD 1 und 2 und einer großen intrazellulären glycosylierten Schleife zwischen TMD 6 und 7 mit Bereichen für Phosphorylierung [65]. Die SLC22 Transporter werden eingeteilt in drei Subtypen, OCT1, 2, 3, abhängig von transmembraner Potentialdifferenz, und die pH-abhängigen organischen

Kationen und Carnitin Transporter OCTN1, 2, und OCT6 [66, 67]. Zu den Substraten der organischen Kationen Transporter gehören neben ungeladenen Substanzen zahlreiche bei physiologischem pH-Wert positiv geladene Kationen [67] (siehe Tab. 2).

**Tab. 2: Auswahl bekannter Substrate und Hemmstoffe der OCT/N [67].**

	<b>Substrate</b>	<b>Hemmstoffe</b>
<b>OCT1</b>	Aciclovir	Ranitidin
<b>OCT2</b>	Cimetidin	Memantin
<b>OCT3</b>	Histamin	Corticosteron
<b>OCTN1</b>	Ergothionein	Verapamil
<b>OCTN2</b>	L-Carnitin	Chinidin
<b>OCT6</b>	Doxorubicin	Lidocain

Der Transport mithilfe der OCT ist charakterisiert durch drei wichtige Eigenschaften, Elektrogenität, Unabhängigkeit von Natriumionen und Reversibilität in der Transportrichtung [65]. Der Transport wird hierbei von dem elektrochemischen Gradienten des transportierten Kations angetrieben [65]. Der organische Kation/Carnitin Transporter OCTN1 fungiert möglicherweise als Protonen/Kationen Austauscher und OCTN2 als Natriumion/Carnitin Cotransporter [67]. OCTN2 kann allerdings auch unabhängig von Natriumionen als Transporter für organische Kationen operieren [67]. Neben zahlreichen anderen Organen und Geweben werden die OCT/N im Menschen in der Lunge gebildet [66, 67]. OCT1 – 3 sowie OCTN1, 2 werden im Tracheal- und Bronchialepithel exprimiert und befinden sich in Bronchialepithelzellen in der apikalen Membran [66, 68]. Außerdem werden OCTN1, 2 und OCT1 – 3 zusätzlich in Alveolarepithelzellen ausgebildet [66, 69].

## **2 Methoden zur Untersuchung der Pharmakokinetik von pulmonal applizierten Substanzen**

### **2.1 In vitro Modelle**

Die Vorteile von auf Zellkulturen basierenden in vitro Versuchen gegenüber in vivo Versuchen liegen in der Einfachheit, der Robustheit, und der besseren Kontrolle der Datengenerierung [70]. Außerdem können durch in vitro Versuche Kosten minimiert werden [70]. Sowohl primäre Zellkulturen als auch immortalisierte Zelllinien stehen als Modell für Permeationsstudien zur Verfügung, wobei vor allem die Zelllinien auf ihren Nutzen und ihre Validität getestet wurden [70]. Die durch Virus transformierte Zelllinie 16HBE14o- wurde von den Bronchialzellen eines einjährigen Herzlungentransplantationspatienten gewonnen [19, 71] und Calu-3 Zellen stammen von einem Bronchialadenokarzinom eines 25 Jahre alten männlichen Kaukasiers [72]. Beide Zelllinien bilden konfluente Monolayer mit Tight Junctions und sind morphologisch vergleichbar mit dem nativen Bronchialepithel [19]. Für die Alveolarregion steht die Zelllinie A549 (gewonnen aus einem Lungenadenokarzinom) neben isolierten Alveolarzellen als primäre Zellkultur zur Verfügung [71]. A549 Zellkulturen sind allerdings für Transportstudien von nachrangigem Interesse, da sie keine dichten Monolayer ausbilden [71]. Eine weitere alveolare Zelllinie stellen die NCI-H441 Zellen (gewonnen aus der perikardialen Flüssigkeit eines Patienten mit papillärem Adonokarzinom der Lunge) dar [73]. NCI-H441 bilden Monolayer mit ausgeprägter Barrierefunktion aus und deren Expression und Aktivität von Transportern stimmt mit denen, die für Alveolarzellen berichtet wurden, überein [73]. Zu Monolayern gewachsene Zellkulturen stellen im allgemeinen ein System dar, mit dem die Kinetik und die Mechanismen von transepithelialen Transportvorgängen studiert werden können [70]. Beispielsweise konnte für die häufig verwendete und gut untersuchte Calu-3 Zelllinie in Transportstudien Korrelationen zu in vivo Versuchen beobachtet werden [74]. Trotz alledem gibt es Limitierungen der in vitro Zellkulturmodelle, vor allem wenn sie mit der Komplexität intakter Organe verglichen werden. In der Lunge existieren über 60 verschiedene Zellarten [1], wobei mit in vitro Zellkulturen nur die Permeation an einer Zellart untersucht werden kann [70]. Außerdem kann in Zellkulturen keine mukoziliäre Clearance imitiert werden [70].

Auch die Phagozytose findet ursprünglich nicht in der Zellkultur statt, wobei allerdings versucht wird, diese durch den Einsatz von Co-Kulturmodellen, in denen beispielsweise Makrophagen zu den Zellen hinzugefügt werden, zu ergänzen [70]. Zusammengefasst stellen Transportstudien mit Monolayern aus Bronchialzelllinien eine günstige, einfach durchzuführende, auf Validität überprüfte und gut kontrollierte Methode dar, pulmonale Permeationseigenschaften von Substanzen zu untersuchen [70, 71].

### **2.2 Ex vivo Lungenperfuptionsmodell**

Das Lungenperfuptionsmodell ist den in vitro Zellkulturmodellen gegenüber dadurch im Vorteil, dass hierbei die Funktionalität und Architektur bzw. strukturelle Integrität des Organes erhalten bleibt [70, 71, 75]. Neben zahlreichen eingesetzten Tiermodellen [76-81] wurde durch Linder et al. [82] ein Modell mit dem Einsatz von isolierten humanen Lungen entwickelt und von Freiwald et al. [83] und Gnadt et al. [84] modifiziert und angepasst. Das humane Lungenperfuptionsmodell konnte schon erfolgreich für die Untersuchung der pulmonalen Absorption des Glukokortikoids Beclomethason-17,21-dipropionat aus zwei verschiedenen Dosieraerosolen eingesetzt werden [83]. Darüber hinaus konnten pharmakokinetische und pharmakodynamische Untersuchungen über den kurzwirksamen  $\beta_2$ -Agonisten Salbutamol und den langwirksamen  $\beta_2$ -Agonisten GW597901 durchgeführt werden [84, 85]. Im Rahmen von pharmakodynamischen Untersuchungen konnten außerdem nach Gabe von Methacholin erfolgreich Bronchokonstriktionen der Lungenlappen induziert werden [85]. Die Möglichkeit mit dem humanen Lungenperfuptionsmodell Substanzen an einem isolierten Organ zu untersuchen, in Verbindung mit der erhaltenen Komplexität und Funktionalität des Organes, erlaubt eine sehr gute Annäherung an physiologische Zustände. Als Limitierung zu nennen ist allerdings die relativ kurze Zeitdauer von ca. 60 – 80 min, in der die verwendeten humanen Lungenlappen verwendet werden können, so dass hauptsächlich initiale pulmonale Verteilungsvorgänge untersucht werden können.



## 2.3 In vivo Modelle

In Tierversuchen können sowohl kleine wie auch große Tiere, die anästhesiert oder bei Bewusstsein sind, verwendet werden [19]. Die zu untersuchende Substanz kann entweder durch intratracheale Instillation verabreicht bzw. durch Verwendung bestimmter Applikationsvorrichtungen als Flüssigkeit oder als Pulver in die Lungen vernebelt werden [19]. Eine weitere Möglichkeit ist die passive Inhalation eines Aerosols, welches in eine Kammer geleitet wird, in der sich das ganze Tier bzw. der Kopf oder die Nase befindet [19]. Als kleine Tiere werden Ratten oder Mäuse verwendet [19]. Mäuse wurden eher für die Untersuchung von lokal wirksamen Substanzen eingesetzt, da sich Mäuse schlecht für pharmakokinetische Untersuchungen eignen [71]. Aufgrund Ihrer Größe erhält man von einer Maus nur zu einem Zeitpunkt eine Blutprobe, wohingegen Ratten zu allen Zeitpunkten Blutproben liefern können, die daher häufiger für Untersuchungen von systemisch wirkenden Substanzen verwendet wurden [71]. Auch große Tiere wie Meerschweinchen, Hunde, Hasen, Schafe und Affen wurden für in vivo Studien verwendet, obwohl die Anwendung aufgrund hoher Kosten limitiert ist [19]. Generell lassen sich Ergebnisse aus in vivo Tierversuche nicht vollständig auf den Menschen transferieren [21, 71]. Beispielsweise gibt es Unterschiede in der Anatomie der Lunge zwischen Tieren und Menschen, außerdem weichen Depositionsmuster und Atemverhalten von Tieren im Vergleich zum Menschen ab [21, 71, 86]. Darüber hinaus existieren Verschiedenheiten in der mukoziliären Clearance zwischen Tieren und Menschen [71, 86]. Auch die Größe und Anzahl der vorhandenen Makrophagen von Tieren im Vergleich zu Menschen unterscheiden sich [87].

Pharmakokinetische Studien, die am Menschen durchgeführt werden, sind den tierischen Studien darin überlegen, dass sie an der Zielspezies durchgeführt werden. Allerdings ist die Deutung von Plasmaspiegeln der pulmonal applizierten Substanz schwierig. Nach Inhalation erreicht nur ein kleiner Teil die Lunge (10 – 40 %), der Großteil (60 – 90 %) wird im Mund- und Rachenraum deponiert und anschließend verschluckt [88]. Somit werden Plasmaspiegel durch die in der Lunge deponierten sowie der verschluckten Dosis und auch durch Metabolismus beeinflusst [88]. Das Schlucken einer wässrigen Kohlesuspension („charcoal block“ Methode) vor und nach der Inhalation ist eine Methode, um die Resorption des verschluckten Anteils

aus dem Gastrointestinaltrakt zu verhindern [89]. Hier gilt es allerdings zu beachten, dass die Effektivität dieser Methode individuellen Schwankungen unterliegen kann [90]. Somit ist es in humanen in vivo Studien nicht möglich pharmakokinetische Daten isoliert am Organ zu untersuchen.

### **2.4 Zusammenfassung**

Zusammengefasst hat jede der vorgestellten Methoden Vor- und Nachteile. In vitro Zellkulturversuche sind charakterisiert durch Einfachheit, geringe Kosten und Validität. Allerdings sind in vitro Systeme nicht in der Lage die Komplexität der Lunge zu imitieren. Das humane ex vivo Lungenperfuisionsmodell hat den Vorteil, dass man pharmakokinetische Untersuchungen direkt am Organ durchführen kann, wobei dessen Komplexität erhalten bleibt, wodurch eine sehr gute Annäherung an physiologische Zustände erreicht werden kann. Allerdings ist die Versuchsdauer begrenzt. Pharmakokinetische Daten aus in vivo Tierversuchen haben den Vorteil, dass sie physiologische Zustände repräsentieren, allerdings lassen sich Tierversuche nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen. Am Menschen durchgeführte Versuche sind daher Tierversuchen überlegen, bringen aber auch wieder Nachteile mit, wie die Beeinflussung der Plasmaspiegel durch den verschluckten Dosisanteil nach Inhalation.

Folglich ist es wichtig, die verschiedenen Methoden anhand ihrer Stärken und der wissenschaftlichen Anforderung auszuwählen bzw. anzuwenden und die Ergebnisse dementsprechend zu interpretieren.

### 3 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Studie war es pharmakokinetische Eigenschaften von pulmonal applizierten Substanzen zu untersuchen. Als niedermolekulare Substanz wurde der  $\beta_2$ -Agonist Salmeterol gewählt, als höhermolekulare Substanz das Peptidhormon Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1).

Die pulmonale Pharmakokinetik des Salmeterols wurde mithilfe des humanen Lungenperfusionsmodells untersucht, wobei die Beteiligung von Transportproteinen für die Überwindung des Bronchialepithels studiert werden sollte. In vorausgegangenen, von Gnadt et al. durchgeführten Lungenperfusionsversuchen wurden Hinweise für eine Beteiligung der organischen Kation/Carnitin (OCT/N) Transporter für die pulmonale Absorption der  $\beta_2$ -Agonisten Salbutamol und GW597901 gefunden. In bisherigen Studien wurde Salmeterol nur als Hemmstoff für organische Kationen/Carnitin Transporter in vitro untersucht, aber nicht direkt als Substrat. Somit sollte in der vorliegenden Studie zum ersten Mal die Beteiligung der organischen Kationen/Carnitin Transporter für die pulmonale Absorption von Salmeterol als Substrat der Transporter und ex vivo am Lungenperfusionsmodell untersucht werden. Dafür wurde L-Carnitin eingesetzt, das selber Substrat OCT/N ist, und somit als Inhibitor fungieren sollte. Das L-Carnitin wurde hierbei vor dem Salmeterol pulmonal appliziert, um anschließend zu untersuchen, ob die Höhe der pulmonalen Absorption von Salmeterol durch L-Carnitin beeinflusst wird.

Für IGF-1 sollte erstmals eine mögliche systemische Verfügbarkeit nach pulmonaler Applikation eines Pulvers von IGF-1, gebunden an verschiedene Trägersubstanzen, mithilfe des Lungenperfusionsmodells überprüft werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob Unterschiede in der pulmonalen Absorption von IGF-1 zwischen den verschiedenen Pulverformulierungen bestehen. In diesem Zusammenhang sollte außerdem studiert werden, ob das Lungenperfusionsmodell eine geeignete Methode darstellt, um aussagekräftige pharmakokinetische Studien über pulmonal verabreichte Peptide und Pulverapplikationen durchzuführen. Des Weiteren sollten Erkenntnisse über die Mechanismen des Transportes von IGF-1 über das Lungenepithel und der zellulären Aufnahme mithilfe eines in vitro Zellkulturmodells gesammelt werden. Als Zellkultur wurde die Bronchialkarzinomzelllinie Calu-3 verwendet, die auf porösen Filtern ausgesät wurde, um zu Monolayern zu wachsen.

Hierbei sollte die Permeation von IGF-1 durch die Calu-3 Monolayer im Vergleich zu Insulin und der Einfluss einer bronchioalveolären Lavage auf die Permeationseigenschaften von IGF-1 untersucht werden. Darüber hinaus sollten die zellulären Aufnahmewege von IGF-1 in Lungenepithelzellen durch den Einsatz von gezielten Hemmstoffen aufgeklärt werden.





## **B Allgemeiner Teil**

---



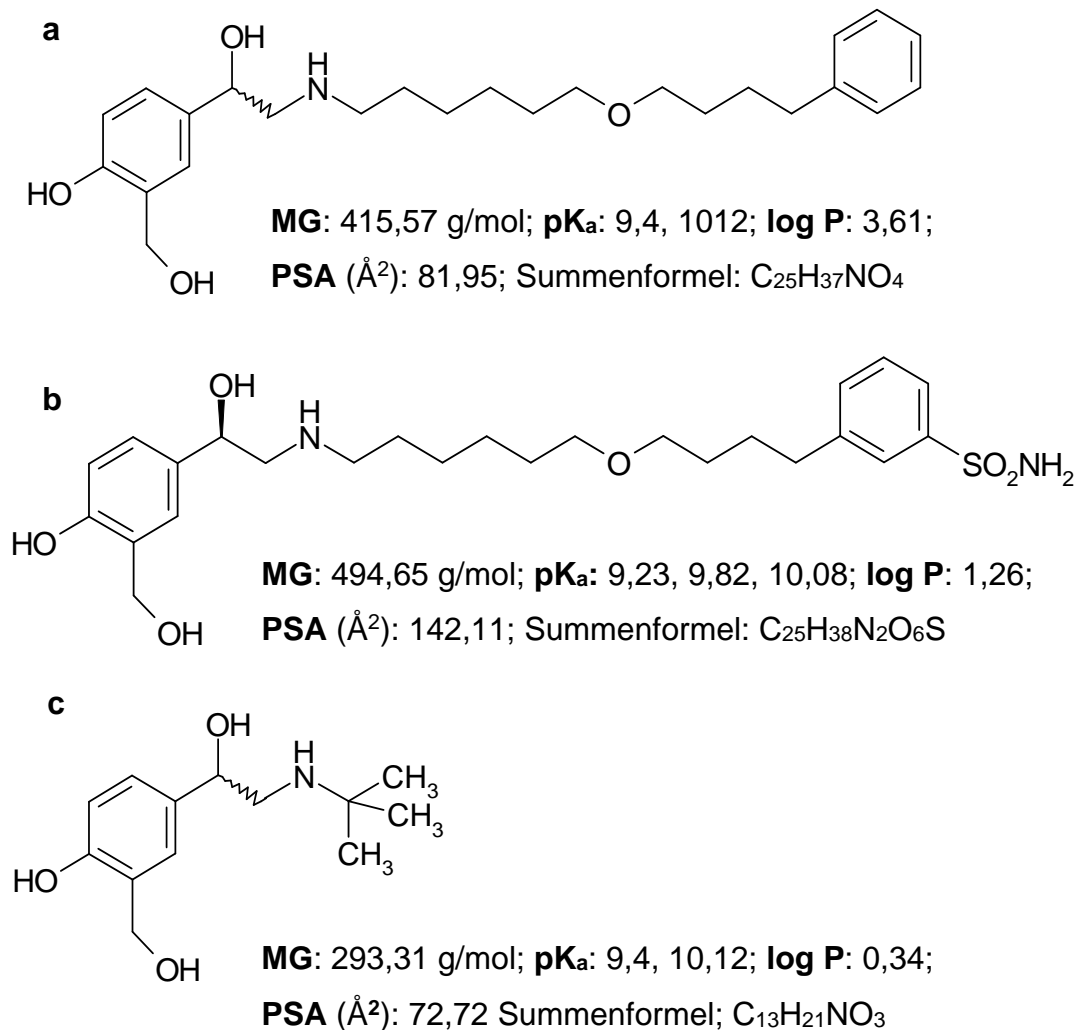


# 1 Untersuchung der pulmonalen Pharmakokinetik von Salmeterol mithilfe des humanen Lungenperusionsmodells

## 1.1 Hintergrund

Für die Behandlung der Lungenerkrankungen Asthma und der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) nehmen die  $\beta_2$ -Agonisten eine bedeutende Rolle ein [7, 18]. Kurzwirksame  $\beta_2$ -Agonisten wie Salbutamol werden inhalativ für die akute Bronchodilatation („reliever“) eingesetzt, wobei langwirksame  $\beta_2$ -Agonisten wie Salmeterol in der Regel in Kombination mit inhalativen Glucokortikoiden verwendet werden („controller“).

Neben pharmakodynamischen Untersuchungen stellen Untersuchungen der pharmakokinetischen Eigenschaften, wie die Absorption, Verteilung und Elimination der  $\beta_2$ -Agonisten, einen wichtigen Beitrag zur Beurteilung der Sicherheit und Effektivität dar. In klinischen Studien werden häufig zur Beurteilung der pharmakokinetischen Eigenschaften Plasmaspiegel nach Inhalation von  $\beta_2$ -Agonisten bestimmt. Hierbei muss beachtet werden, dass schon nach kürzester Zeit die Plasmaspiegel sowohl durch Metabolisierung als auch durch Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt nach Verschlucken beeinflusst werden können [88]. Eine Methode, die Resorption des verschluckten Anteils aus dem Gastrointestinaltrakt zu verhindern, ist das Schlucken einer Kohlesuspension („charcoal block“ Methode) vor und nach der Inhalation [89]. Die Effektivität dieser Methode kann allerdings individuellen Schwankungen unterliegen [90]. Im Falle des Salmeterols (Abb. 6a) stellt sich das zusätzliche Problem, dass vor allem nach einmaliger Gabe therapeutischer Standard Dosen (50  $\mu\text{g}$ ) Plasmaspiegel-konzentrationen nach Inhalation eventuell zu niedrig für eine Bestimmung sind, bzw. hohe technische Anforderungen an analytische Verfahren nötig sind [91, 92].



**Abb. 6:** Strukturformeln und molekulare Daten von a: Salmeterol [93]; b: GW597901 [94]; c: Salbutamol [95]; pK<sub>a</sub>: logarithmische Säurekonstante; log P: logarithmischer Octanol Wasser Koeffizient; PSA (Å<sup>2</sup>): Polare Oberfläche (Ångström).

Durch Anwendung des Lungenperfusionsmodells kann die Höhe der Umverteilung der pulmonal applizierten Substanzen ohne Beeinflussung durch Resorptionen im Gastrointestinaltrakt oder durch Metabolisierungsvorgänge in der Leber studiert werden, hinzu kommt ein kleineres Verteilungsvolumen verglichen mit dem menschlichen Körper. Außerdem wird durch die Untersuchung von Substanzen am isolierten Organ mit erhaltener Funktionalität und Komplexität eine sehr gute Annäherung an physiologische Zustände ermöglicht. Daher war das humane

Lungenperfuisionsmodell eine geeignete Methode um pharmakokinetische Studien über Salmeterol nach Inhalation durchzuführen.

In Zellkulturmodellen wurden Hinweise gefunden, dass die organischen Kationen/Carnitin Transporter (OCT/N) eine wichtige Rolle bei dem pulmonalen Transport der  $\beta_2$ -Agonisten Salbutamol (Abb. 6c) [96-99] und Formoterol spielen [66]. Auch für die Anticholinergika Ipratropium und Tiotropium [100] und das Antibiotikum Ciprofloxacin [101] wurden Hinweise für eine Beteiligung der OCT/N gefunden. In ex vivo Versuchen in unserer Arbeitsgruppe am Lungenperfuisionsmodell (LPM) wurde die Beeinflussung einer Bronchokonstriktion auf die pulmonale Absorption von Salbutamol (Abb. 6c) und GW597901 (Abb. 6b, einem Sulfonamid-Analogon von Salmeterol [102, 103]) untersucht [84]. Dabei wurde zum Herbeiführen einer Bronchokonstriktion Methacholin vor den  $\beta_2$ -Agonisten pulmonal appliziert. Es wurde eine deutlich verringerte pulmonale Absorption für Salbutamol und GW597901 nach Applikation von Methacholin beobachtet, allerdings trat die Verringerung unabhängig von der Ausbildung einer Bronchokonstriktion auf [84]. Da Methacholin als Hemmstoff für OCTN2 bekannt ist [104], wurde ein Konkurrenzmechanismus zwischen Methacholin und den  $\beta_2$ -Agonisten an den OCT/N postuliert. Um sicherzustellen, dass die oben genannte verringerte Absorption von Salbutamol nach vorheriger Applikation von Methacholin tatsächlich einen Konkurrenzmechanismus an den OCT/N darstellte, wurde die Absorption von Salbutamol am LPM mit vorheriger Applikation von L-Carnitin untersucht [84]. Bei L-Carnitin handelt es sich um ein Substrat bzw. einen Hemmstoff für den OCTN2 mit niedriger Michaelis-Menten-Konstante [67, 105, 106], und außerdem ist L-Carnitin Substrat/Hemmstoff für OCTN1 [67]. Auch in diesem Fall konnte eine verringerte Absorption des Salbutamols beobachtet werden [84].

Da eine Verringerung des pulmonalen Transportes von GW597901 (Abb. 6b) und Salbutamol (Abb. 6c) durch vorherige Verabreichung von Methacholin, und für Salbutamol auch mit vorheriger Applikation von L-Carnitin beobachtet werden konnte, wurde eine Beteiligung der OCT/N, vermutlich OCTN2, für den Transport des GW597901 und Salbutamols über das Lungenepithel angenommen [84].

## 1.2 Charakteristika des Salmeterols

Der lipophile  $\beta_2$ -Agonist Salmeterol (Abb. 6a), häufig eingesetzt als Salz in Kombination mit Xinafoat, zeichnet sich durch eine atypische Wirkweise an der glatten Muskulatur der Atemwege aus, wie einen langsamen Wirkbeginn und eine verlängerte, auswaschresistente Wirkung [92]. Eine weitere besondere Eigenschaft ist, dass die Bindung des Salmeterols am Rezeptor nicht reversibel bzw. nicht kompetitiv zu sein scheint, die Wirkung allerdings durchaus kompetitiv und reversibel ist und sich nach vorübergehender Blockierung durch einen wasserlöslichen  $\beta_2$ -Agonisten wieder erneut entwickeln kann [107, 108]. Um diese Phänomene zu erklären existieren zwei Theorien. Die erste Theorie basiert darauf, dass die Seitenkette des Salmeterols an eine Domäne des  $\beta_2$ -Rezeptors mit hydrophoben Aminosäuren (exo – Seite) bindet. Dadurch ist das Salmeterol vor Dissoziation vom Rezeptor geschützt und der Salegenin-Kopf kann frei an die aktive Seite des Rezeptors andocken und sich wieder entfernen [107]. Die zweite Theorie basiert auf einem Diffusionsmikrokinetik-Modell, in dem das Salmeterol ein Depot in der phospholipiden Doppelschicht der Plasmalemma nahe dem Rezeptor bildet. Das Salmeterol erreicht das aktive Zentrum des  $\beta_2$ -Rezeptors vorwiegend über laterale Diffusion durch die phospholipiden Doppelschichten und nicht direkt aus der extrazellulären wässrigen Phase [108, 109].

Aufgrund der hohen Lipophilie wurde postuliert, dass der Transport von Salmeterol über das Lungenepithel nicht durch organische Kationentransporter sondern durch passive Diffusion erfolgt, was durch in vitro Versuche unterstützt wurde [66]. Andere in vitro Untersuchungen deuten allerdings wiederum auf eine Beteiligung der OCT/N hin [99, 110]. Diese Untersuchungen gehen mit ex vivo Beobachtungen in unserer Arbeitsgruppe am LPM mit dem langwirksamen  $\beta_2$ -Agonisten GW597901 konform, bei denen die pulmonale Absorption durch vorherige Applikation des OCTN2 Hemmstoffes Methacholin [104] unabhängig von der Ausbildung einer Bronchokonstriktion verringert wurde [84]. Eine Beteiligung der OCT/N auch beim Transport von Salmeterol durch das Lungenepithel ist aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum GW597901 (Abb. 6b) daher naheliegend.

### 1.3 Zielsetzung

Das Ziel in dieser Studie war es, die Beteiligung der OCT/N [99] bei dem Transport von Salmeterol durch das Lungenepithel, wie es schon für das strukturell sehr ähnliche GW597901 und das hydrophile Salbutamol beobachtet wurde [84], zu überprüfen. Dafür wurde die Beeinflussung der pulmonalen Absorption des Salmeterols durch L-Carnitin mithilfe des LPMs untersucht.

### 1.4 Durchführung der Lungenperfusionsversuche

Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt. In der ersten Versuchsreihe wurde Salmeterol alleine in den Lungenlappen verabreicht. In der zweiten Versuchsreihe wurde vor Applikation von Salmeterol L-Carnitin in den Lungenlappen vernebelt.

Für die Perfusionen wurden Lungenlappen oder Lungenflügel von menschlichen Spendern nach einer Bi-, Lobektomie, oder Pneumonektomie verwendet (siehe C1.1.3).

Die Tröpfchen des Aerosols waren charakterisiert durch einen mittleren Massendurchmesser (MMD) von 2,2 µm und einen Massenanteil von 89 % mit einer Partikelgröße unter 5 µm [111]. Die Tröpfchen des Aerosols von L-Carnitin waren gekennzeichnet durch einen MMD von 2,9 µm und einen Massenanteil von 75 % mit einer Größe unter 5 µm [84] (siehe C1.3.4). Der inhalierbare Bereich von 2 – 5 µm Teilchendurchmesser wurde somit eingehalten [112].

In der Versuchsreihe mit alleiniger Salmeterol Applikation wurde nur Salmeterol über 12 min appliziert, in der Versuchsreihe mit vorheriger L-Carnitin Applikation wurde zuerst 10 min das L-Carnitin und anschließend das Salmeterol 12 min appliziert. Die Zieldosis lag für das Salmeterol bei 200 µg (Base). Von L-Carnitin wurden 62,7 mg verabreicht (siehe C1.3.4.2). In beiden Versuchsreihen wurden Proben aus dem venösen Ausgang bereits während der Applikation des Salmeterols gewonnen (-10, -7, -2 min). Nach Beendigung der Applikation wurden über die Dauer der Experimente zwischen 0 und 60 min venöse Proben gesammelt. Das entnommene Volumen wurde durch frischen Perfusionspuffer direkt nach Entnahme ersetzt (siehe C1.3.5). Die tatsächlich applizierte Dosis konnte berechnet werden, indem die Konzentration der Salmeterol-Applikationslösung und die durch Auswaschen an dem Spacer und

allen Verbindungsstücken haftende Menge Salmeterol, sowie die Restmenge im Vernebler bestimmt wurden (siehe C1.3.6).

## **1.5 Durchführung der Stabilitätsuntersuchungen von Salmeterol in Perfusionsflüssigkeit**

Die Stabilität von Salmeterol über die Dauer der Versuche in Perfusionsflüssigkeit wurde untersucht, indem mit Salmeterol versetzte Leerproben aus den Perfusionsversuchen (n= 3) über 120 min bei 37 °C inkubiert (siehe C1.3.7) wurden. Die Konzentration von Salmeterol in den Proben mit Inkubation wurden mit der Konzentration einer Kontrolle verglichen, die nicht inkubiert wurde.

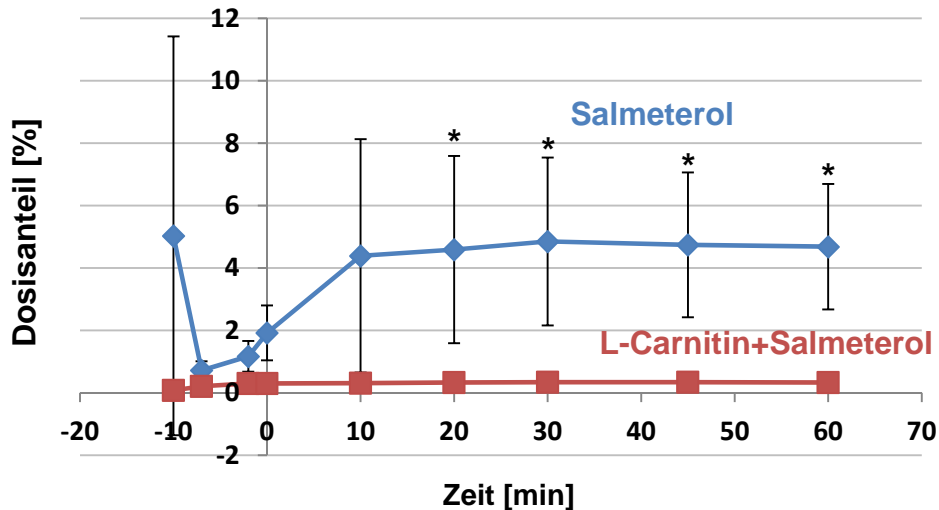
## **1.6 Ergebnisse**

### **1.6.1 Pulmonale Absorption von Salmeterol im Lungenperfusionsmodell**

Die Zieldosis von 200 µg Salmeterol wurde basierend auf der Dosis des GW597901 (150 µg) [84] gewählt, um Vergleichbarkeit zu erreichen. Um analytisch nicht mehr bestimmbare Ergebnisse zu vermeiden, wurde die Dosis allerdings etwas höher angesetzt. Die mit Formel 2 (siehe C1.3.6) errechnete tatsächlich applizierte Dosis betrug im Durchschnitt  $208 \pm 35$  µg (Mittelwert mit Standardabweichung von n= 6) (siehe D1.1) und lag somit nahe an der Zieldosis. Der Anteil an der gesamten vernebelten Dosis von der an dem Glasspacer und den Verbindungsstücken haftenden Menge belief sich auf  $21 \pm 7$  % (siehe D1.1). Somit wurde eine Depositionsrate von  $79 \pm 7$  % erreicht.

Nach alleiniger Salmeterol Gabe sahen wir 2 min nach Beginn der Verabreichung eine starke initiale pulmonale Absorption von  $5,03 \pm 6,39$  % der applizierten Dosis (Mittelwert mit mittlerer Abweichung vom Mittelwert von n= 3), wobei sich die Menge des Salmeterols dann bereits 5 min nach Dosierungsbeginn in der Perfusionsflüssigkeit verteilt hatte und auf  $0,72 \pm 0,29$  % gesunken war. Dann folgte ein rascher Anstieg sowohl während der Applikation als auch bis 10 min nach Ende der Verabreichung mit  $1,92 \pm 0,88$  % nach 0 min und  $4,39 \pm 3,74$  % nach 10 min, und einer anschließenden Abflachung der Kurve mit einem Plateau und einem

Höchstwert bei 30 min mit  $4,85 \pm 2,69$  % und einer pulmonal absorbierten Menge von  $4,68 \pm 2,01$  % nach 60 min (siehe Abb. 7) (siehe D1.2).



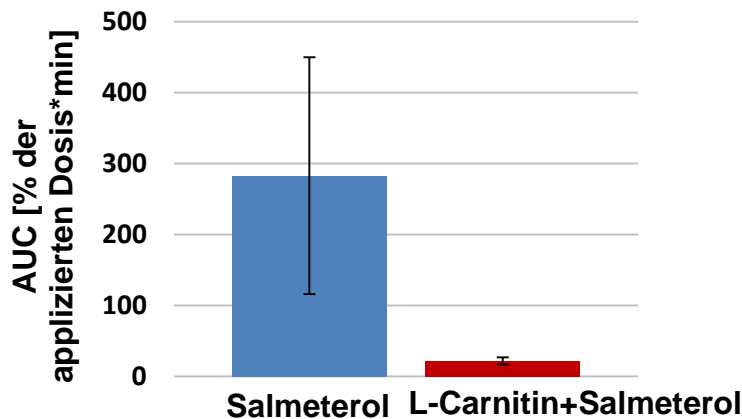
**Abb. 7:** Verteilungskurven von Salmeterol in die Perfusionsflüssigkeit mit und ohne vorherige Applikation von L-Carnitin; dargestellt als Mittelwert mit mittlerer Abweichung vom Mittelwert des verteilten Dosisanteils von je  $n = 3$ ;

\* Unterschied statistisch signifikant bezogen auf die Werte zwischen 0 – 60 min,  $p < 0,05$ .

In der Versuchsreihe mit vorheriger L-Carnitin Applikation wurde das Salmeterol in sichtbar verringertem Ausmaß pulmonal absorbiert, so dass die Verteilungskurve mit L-Carnitin Vernebelung zu jedem Zeitpunkt unterhalb der ohne L-Carnitin verlief. Beginnend 2 min nach Start der Dosierung mit  $0,08 \pm 0,03$  % verteiltem Dosisanteil folgte ein rascher Anstieg bis 2 min vor Ende der Dosierung mit  $0,3 \pm 0,14$  % und eine anschließende Plateauphase mit relativ stabilen Werten. 60 min nach Ende der Dosierung war eine Menge von  $0,33 \pm 0,04$  % in die Perfusionsflüssigkeit verteilt (siehe Abb. 7) (siehe D1.3). Die Verabreichung von L-Carnitin bewirkte somit nach 60 min Versuchsdauer eine Verringerung der pulmonalen Absorption um 93 % (im Vergleich zu Salmeterol ohne L-Carnitin).

Betrachtet man die Zeitpunkte 0 – 60 (siehe Abb. 7) der Verteilungskurven, erhält man einen statistisch signifikanten Unterschied (Anova, mit post hoc Fisher's Least Significant Difference Test,  $p < 0,05$ ) zwischen den Mittelwerten von 20 – 60 min Versuchsdauer der Versuchsreihen ohne L-Carnitin im Vergleich zu denen mit L-Carnitin Applikation.

Die Verteilungskurven ergaben Flächen unterhalb der Kurven (AUC der Verteilungskurve von -10 – 60 min) von  $283 \pm 229 \text{ \%} \cdot \text{min}$  (Mittelwert mit mittlerer Abweichung vom Mittelwert von  $n= 3$ ) für Salmeterol ohne L-Carnitin und  $22 \pm 5 \text{ \%} \cdot \text{min}$  ( $n= 3$ ) mit L-Carnitin Applikation (siehe Abb. 8) (siehe D1.2, D1.3).



**Abb. 8:** AUC der Verteilungskurven von Salmeterol in die Perfusionsflüssigkeit mit und ohne vorherige Applikation von L-Carnitin; dargestellt als Mittelwert mit mittlerer Abweichung vom Mittelwert von je  $n= 3$ .

Der Vergleich der AUCs zeigte ein ähnliches Bild wie die Verteilungskurven, eine Verringerung der AUC durch die Gabe von L-Carnitin um 92 % (siehe Abb. 8).

Der Unterschied zwischen den AUCs (-10 – 60 min) hingegen war nicht signifikant (ungepaarter Student T-Test,  $p > 0,05$ ), wahrscheinlich aufgrund der ausgeprägten Variabilität der Lungenpräparate.

### 1.6.2 Stabilität von Salmeterol in der Perfusionsflüssigkeit

Es konnte kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ , ungepaarter Student T-Test) zwischen den Konzentrationen von Salmeterol der Proben mit Inkubation zu denen ohne Inkubation festgestellt werden (siehe D1.4). Demnach wurde Salmeterol in der Perfusionsflüssigkeit als stabil während der Versuchsdauer angesehen.

## 1.7 Diskussion

Die Verringerung der pulmonalen Absorption von Salmeterol durch vorherige L-Carnitin Applikation ( $> 90 \text{ \%}$  Verringerung) (Abb. 7, 8) ist ein Hinweis für eine



Beteiligung der OCT/N beim Transport von Salmeterol über das Lungenepithel. In unserem Arbeitskreis wurden von Gnadt et al. am LPM ähnliche Effekte für GW597901 und für Salbutamol beobachtet. Nach vorheriger pulmonaler Verabreichung von Methacholin wurde ohne Entstehung einer Bronchokonstriktion die pulmonale Absorption um 88 % (gemessen an der AUC nach 60 min) beim GW597901 und um 83 % beim Salbutamol verringert [84]. Untersuchungen am gleichen Modell in einer Kontrollstudie mit Salbutamol und L-Carnitin Verabreichung (Ausschluss einer Bronchokonstriktion) ergaben eine verringerte pulmonale Verteilung in die Perfusionsflüssigkeit des Salbutamol durch vorherige pulmonale Applikation von L-Carnitin um 91 % (gemessen an der AUC nach 60 min) [84]. Somit steht der verringerte pulmonale Transport von Salmeterol durch L-Carnitin im Einklang mit den Untersuchungen für Salbutamol und GW597901 am LPM. Außerdem gehen die Ergebnisse konform mit in vitro Untersuchungen von Salomon et al., bei denen eine verringerte Aufnahme des kationischen Fluoreszenzmarkers 4-(4-(dimethylamini)styryl)-N-methylpyridinium iodide (ASP<sup>+</sup>) in die humane alveolare Zelllinie A549 durch gleichzeitige Inkubation mit Salmeterol, Formoterol und Salbutamol beobachtet wurde, wobei die stärkste Verringerung durch Salmeterol und dann analog der sinkenden Lipophilie erfolgte [110]. Verantwortlich für den Transport von ASP<sup>+</sup> wurde von Salomon et al. OCT2, möglicherweise OCT3 gemacht [110]. In einer weiteren Studie von Salomon et al. konnte eine Hemmung der zellulären Aufnahme in die Lungenepithelzellen A549, NCI-H441 und Calu-3 des OCT/N Substrates Triethylamin (TEA) durch die  $\beta_2$ -Agonisten Salbutamol, Formoterol und Salmeterol beobachtet werden [99]. Auch der Eintritt des OCTN2 Substrats Acetylcarnitin [67] in die NCI-H441 Zellen wurde durch den Einsatz von Formoterol und Salmeterol verringert [99]. Der Transport des Acetylcarnitins in die Bronchialzelllinie Calu-3 wurde durch jeden der drei genannten  $\beta_2$ -Agonisten gehemmt [99]. Da die zelluläre Aufnahme von Substraten der OCT/N durch den Einsatz der genannten  $\beta_2$ -Agonisten, einschließlich Salmeterol, in den beschriebenen in vitro Versuchen verringert wurde, ergeben sich zusammengenommen daraus Hinweise, dass die  $\beta_2$ -Agonisten, einschließlich das Salmeterol, als Hemmstoffe der OCT/N fungieren, und somit möglicherweise auch als Substrate. Im Kontext mit den LPM Versuchen, in denen die pulmonale Absorption von Salmeterol durch L-Carnitin (Substrat/Inhibitor von OCTN1 und 2)

vermindert wurde, ist somit eine Beteiligung der OCT/N bei dem Transport von Salmeterol durch das Lungenepithel wahrscheinlich. Die Annahme, dass das Salmeterol Substrat der OCT/N ist, wird dadurch unterstützt, dass da die verringerte Absorption, die in den LPM Versuchen für das Salmeterol durch eine vorherige Applikation von L-Carnitin hervorgerufen wurde, im Ausmaß vergleichbar ist mit der, die für Salbutamol am LPM beobachtet wurde [84]. Für das Salbutamol gibt es neben den ex vivo zahlreiche in vitro Belege für eine Transporter-Beteiligung bei der pulmonalen Absorption. Ehrhardt et al. beobachteten an den humanen bronchialen epithelialen Zelllinien Calu-3 und 16HBE14o- für Salbutamol einen temperaturabhängigen, sättigbaren, und hemmbaren aktiven Transport, weshalb auf eine Beteiligung von OCT/N geschlossen wurde [96]. Auch Mamlouk et al. beobachteten für den Transport von Salbutamol durch Calu-3 Zellen einen richtungsabhängigen, sättigbaren und hemmbaren Transport [98]. Haghi et al. konnten eine Hemmung des Transportes von Salbutamol durch Calu-3 Zellen mithilfe des OCT/N Hemmstoffs TEA bewirken [97]. Salomon et al. zeigten, dass der Transport von Salbutamol durch mit hOCT1 transfizierte HEK-293 Zellen sowohl zeit- und konzentrationsabhängig als auch hemmbar war [99].

Man kann also von einer OCT/N Beteiligung sowohl für den Transport von Salbutamol als auch für den des lipophilen Salmeterols durch das Lungenepithel ausgehen. Insofern widersprechen die Ergebnisse in dieser Studie den Beobachtungen von Horvarth et al., in denen auch der Transport von ASP<sup>+</sup> an humanen Lungenepithelien untersucht und eine verringerte Aufnahme von ASP<sup>+</sup> in die Zellen durch vorherige Inkubation von Salbutamol und Formoterol, allerdings nicht Salmeterol, festgestellt wurde, was dadurch begründet wurde, dass Salmeterol aufgrund der hohen Lipophilie nicht über Transporter über das Lungenepithel gelangt [66].

Zu beachten ist, dass in der vorliegenden Studie eine relativ hohe Dosis L-Carnitin (62,7 mg) eingesetzt und nicht geklärt wurde, ob die Hemmung des Transportes auch bei niedrigeren Dosen zustande kommt. Darüber hinaus wurde mit 208 µg (tatsächlich applizierte Dosis) eine höhere Dosis als eine therapeutische Einzeldosis (50 – 100 µg) an Salmeterol eingesetzt. Berücksichtigt man eine Depositionsrate, beispielsweise eines Hydrofluoralkan 134a Dosieraerosols mit einer Fluticason-Salmeterol Kombination, von 16 % [113], fielen der Unterschied zwischen den Dosierungen noch größer aus. Da für Salbutamol in einer in vitro Studie eine

Sättigung des Transportes durch sich selber festgestellt wurde [96], besteht die Möglichkeit, dass auch der Transport von Salmeterol durch höher eingesetzte Konzentrationen durch sich selber beeinflusst wird. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, müssten Untersuchungen am LPM mit steigenden Dosen an Salmeterol durchgeführt werden, wodurch eine Sättigung des Transportes untersucht werden könnte.

Die Gründe dafür, dass der Unterschied zwischen den AUCs der Verteilungskurven von Salmeterol mit und ohne vorherige L-Carnitin Applikation (-10 – 60 min) zwar deutlich war, allerdings statistisch nicht signifikant, waren wahrscheinlich die großen interindividuellen Unterschiede der einzelnen Lungenpräparate und der kleine Probenumfang (n= 3). Auch wenn die Unterschiede der AUCs statistisch nicht signifikant waren, kann man trotzdem im Mittel von einer deutlichen Verringerung der pulmonalen Absorption von Salmeterol durch die vorherige pulmonale Gabe von L-Carnitin ausgehen.

Eine weitere Limitierung des LPM ist die relativ kurze Versuchsdauer, die sich aufgrund der kurzen Überlebenszeit des Präparates ergibt. Allerdings konnten in der Vergangenheit trotz der kurzen Versuchsdauer erfolgreich initiale pulmonale Absorptionvorgänge mithilfe des LPM untersucht werden [83, 84]. Weiterhin kann eine Beeinflussung der Transportproteine und des Gewebes durch eine langjährige Erkrankung wie Asthma oder COPD nicht ausgeschlossen werden [114]. Da allerdings die Spender der Lungenlappen in der Regel Raucher waren, kann man davon ausgehen, dass auch die meisten Spender an Krankheiten wie COPD oder Asthma litten und somit die Spender innerhalb der Studie vergleichbar wären. Außerdem litten die Spender in der Regel alle an einem Bronchialkarzinom, was auch wiederum Vergleichbarkeit innerhalb des Kollektivs gewährleistete. Zum anderen kann natürlich durch den Tumor selbst die Funktionalität des Gewebes beeinflusst sein. Da bei den Versuchen mit alleiniger Salmeterol Vernebelung im Voraus kein Wasser ohne Substanz in den Lungenlappen vernebelt wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Beeinflussung der pulmonalen Absorption durch das Wasser als Lösungsmittel für das L-Carnitin und nicht durch das L-Carnitin selbst zustande kam [84]. Allerdings zeigten Gnadt et al., dass das vernebelte Volumen der Methacholin-Lösung und somit die Wassermenge keinen Einfluss auf den Grad der pulmonalen Absorption der  $\beta_2$ -Agonisten hatte [84]. Außerdem würde in die Lunge

verabreichtes Wasser wahrscheinlich eine schnelleres Lösen des Salmeterols in der Lunge bewirken, und somit eine schnellere Absorption und nicht eine verringerte, die durch L-Carnitin beobachtet wurde. Daher ist es unwahrscheinlich, dass der verringerte pulmonale Transport des Salmeterols durch das vernebelte Wasser und nicht durch das L-Carnitin zustande kam.

### **1.8 Zusammenfassung**

In dieser Studie konnten erfolgreich pharmakokinetische Eigenschaften des Salmeterols mithilfe des LPM untersucht werden.

Es konnten Hinweise für die Beteiligung von organischen Kationen/Carnitin Transportern bei dem Transport von Salmeterol durch das Lungenepithel gefunden werden, was für die  $\beta_2$ -Agonisten GW59701 und Salbutamol bereits mithilfe des LPM postuliert wurde [84]. Hierfür wurde vor der Applikation des Salmeterols der OCTN2 und OCTN1 Hemmstoff bzw. das Substrat L-Carnitin in den Lungenlappen verabreicht. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit in vitro Studien über das Salbutamol [96-99] und das Salmeterol [99, 110]. Die in vitro Studien von Salomon et al. [99, 110] allerdings zeigten Salmeterol nur als Hemmstoff der zellulären Aufnahme des vermutlichen Substrats der OCT/N ASP<sup>+</sup> bzw. TEA und somit als Hemmstoff der OCT/N und nicht direkt als Substrat. Durch die Versuche am LPM konnte somit zu ersten Mal direkt gezeigt werden, dass die Absorption des Salmeterols in der Lunge selbst durch die Anwendung eines Inhibitors bzw. eines Substrats der OCT/N verringert wurde und somit, dass Salmeterol wahrscheinlich als Substrat der OCT/N fungierte. Da die Hemmung des Transportes durch L-Carnitin (Substrat/Hemmstoff von OCTN2 und OCTN1 [67]) bewirkt wurde, ist eine Beteiligung des OCTN2, eventuell auch OCTN1, wahrscheinlich. Allerdings lässt sich aufgrund der hohen Dosen von L-Carnitin (62,7 mg) die Beeinflussung anderer Transporter nicht ausschließen, vor allem, wenn man die Ergebnisse von Salomon et al. betrachtet, wo die Wechselwirkung des Salmeterols für die zelluläre Aufnahme des ASP<sup>+</sup> oder des TEA vermutlich durch andere bzw. weitere Transporter als OCTN2 bzw. OCTN1 verursacht wurde [99, 110].

Zusammenfassend scheint es, dass beim Transport sowohl von lipophilen als auch hydrophilen  $\beta_2$ -Agonisten über das Lungenepithel die OCT/N eine wichtige Rolle spielen.

## **2 Untersuchung der pulmonalen Pharmakokinetik von IGF-1 in vitro**

### **2.1 Hintergrund**

Sarkopenie ist bekannt als fortschreitender Verlust an Muskelmasse und Muskelkraft, mit der erhöhten Gefahr von Stürzen und Verlust der körperlichen Beweglichkeit [115]. Sarkopenie tritt häufig bei älteren Menschen auf, wobei im Alter IGF-1 verringert ist [116], und der Verlust an Muskelmasse dann wiederum häufig mit verringerten IGF-1 Spiegeln einher geht [117]. Außerdem scheint auch Immobilität eine wichtige Rolle einzunehmen [116]. Es ist bekannt, dass IGF-1 wichtig ist für das Muskelwachstum, die Muskelregeneration, die Verringerung der Muskeldegeneration und für die Modifikation von Entzündungsreaktionen [118]. Eine Anwendung von IGF-1 zum Muskelaufbau bei Sarkopenie kann daher eine sinnvolle Alternative zu Bewegung und Muskeltraining sein, besonders bei älteren Patienten [116].

Unter Kachexie versteht man wiederum ein Syndrom mit starkem Verlust an Körpergewicht, Fett- und Muskelmasse, assoziiert mit einer anderen Grunderkrankung [116]. Patienten mit chronischen Krankheiten wie Herzinsuffizienz, COPD, Krebs, HIV, Nieren- und Leberversagen leiden häufig an Kachexie [116]. Die pathophysiologischen Ursachen sind oft starke Entzündungsreaktionen, die zur Erhöhung des Proteinkatabolismus führen [116, 119]. Daneben spielen die Folgen der assoziierten Grunderkrankung bzw. deren Behandlung eine Rolle [116]. Hierzu gehören unter anderem Schmerzen, gastrointestinale Probleme, und Depressionen, die wiederum durch den Verlust an Appetit den hyperkatabolischen Zustand verschlimmern [116]. Daher wäre auch im Fall der Kachexie ein Einsatz von IGF-1 zum Muskelaufbau denkbar.

IGF-1 ist ein einkettiges Polypeptid mit drei Disulfidbrücken, 70 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 7649 Da [120]. Die Aminosäuresequenz des IGF-1 besitzt eine 62 %ige Homologie mit Proinsulin [120] und eine 50 %ige mit Insulin [118]. IGF-1 wird hauptsächlich in der Leber, aber auch im Muskel- und Fettgewebe produziert [121]. IGF-1 ist möglicherweise der wichtigste Mediator für Muskel- und Knochenwachstum [122]. Transgene Mäuse, die IGF-1 überexprimierten, zeigten

eine signifikant höhere Muskelmasse im Vergleich zur Kontrolle [120, 123, 124]. Eine direkte lokale Infusion von IGF-1 in Ratten bewirkte Muskelwachstum [125]. Außerdem konnte in in vivo Studien in Mäusen neben Steigerung der Muskelmasse der Abbau der Muskelmasse, assoziiert mit dem Alter, durch Überexprimierung von IGF-1 verhindert werden [126]. Auch in in vitro Studien konnte die Proliferation von Myoblasten durch IGF-1 gesteigert werden [127] sowie die Hypertrophie von Myotuben [128]. Darüber hinaus ist IGF-1 einzigartig in der Fähigkeit, sowohl die Differenzierung als auch das Wachstum von Muskelvorläuferzellen zu stimulieren [128].

Rekombinantes IGF-1 (Mecasermin) existiert bereits als Arzneimittel zur Injektion (Increlex<sup>®</sup>, Ipsen Pharma GmbH, Ettlingen) mit einer Zulassung zur Langzeitbehandlung von Wachstumsstörungen bei Kindern und Jugendlichen (2-18 Jahre), die an einem schweren primären Mangel an IGF-1 leiden [129]. Der Einsatz des IGF-1 wäre also auch denkbar für andere Indikationsgebiete wie Sarkopenie oder Kachexie. Da es sich bei IGF-1 um ein Peptid handelt, das somit oral nicht bioverfügbar ist, müsste es wie das Increlex<sup>®</sup> parenteral appliziert werden. Wie aber bereits erfolgreich für Insulin (Exubera<sup>®</sup>) gezeigt werden konnte, dass eine inhalative Applikation zur systemischen Verfügbarkeit führen kann [23], so könnte auch für IGF-1 die Inhalation eine schmerzfreie Alternative zur Injektion darstellen.

Ziel dieser Studie war es, durch in vitro Versuche die pulmonalen Permeationseigenschaften von IGF-1 mit denen von Insulin zu vergleichen und die Transportwege durch das Lungenepithel zu untersuchen. Außerdem sollte die pulmonale Pharmakokinetik von IGF-1 mithilfe des Lungenperforationsmodells durch Applikation verschiedener Mikropartikel studiert werden.

## **2.2 Bronchialepithelzelllinie Calu-3**

Die Calu-3 Zelllinie stammte von einem Bronchialadenokarzinom eines 25 Jahre alten männlichen Kaukasiers [72]. Die Zelllinie bildet zum einen Monolayer mit einer Mischung aus sekretorischen Zellen und Flimmerzellen [130] und zum anderen Tight Junctions zwischen den Zellen aus [131]. Calu-3 Zellen wurden bereits angewendet für Untersuchungen über zystische Fibrose [132, 133], für Toxizitätsuntersuchungen [134], für Transportstudien [74, 96, 101, 135-137] und für Studien über den

Metabolismus [136, 138] von Substanzen. Außerdem konnten in Permeationsstudien von passiv und aktiv transportierten Substanzen Korrelationen mit in vivo Daten gefunden werden [74]. Darüber hinaus wurde die Zelllinie bereits erfolgreich für die Untersuchung der Permeationseigenschaften von Insulin eingesetzt [41, 74, 139, 140]. Auch für die Untersuchung der Permeation von anderen Makromolekülen wurden die Calu-3 Zellen verwendet, wie beispielsweise IgG, Dextrane, Erythropoietin und Dipeptide [140-144]. Somit stellen Calu-3 Zellen eine gut untersuchte und viel verwendete Zelllinie dar und waren daher für die Untersuchung der Permeationseigenschaften von IGF-1 geeignet.

### **2.3 Qualifikation der Zellmonolayer**

#### **2.3.1 Hintergrund**

Die Eignung der Calu-3 Zellen zur Anwendung in Permeationsstudien wurde hinreichend belegt (siehe 2.2). Allerdings musste die Qualität der Monolayer, bevor sie für Transportstudien verwendet wurden, sichergestellt werden. Dies diente dazu, die Fähigkeit der Monolayer zu überprüfen, eine funktionelle und dichte Barriere zu bilden. Hierfür wurden drei Eigenschaften untersucht. Als erstes wurde der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) überprüft. Dies stellt die häufigste Methode zur Überprüfung der Integrität und Dichtigkeit von Epithelzellmonolayern dar [138]. Zwischen dem TEER Wert und der Permeation von Markern für den parazellulären Transport durch Calu-3 Zellmonolayer scheint es eine inverse Korrelation zu geben [70, 136]. Somit ist ein hoher TEER Wert ( $> 1000 \Omega\text{cm}^2$  [74]) ein Indiz für eine gute Qualität eines Monolayers, bzw. ein Hinweis für die Fähigkeit eine dichte Barriere auszubilden.

Eine weitere Eigenschaft, die untersucht wurde, war die Fähigkeit des Zellmonolayers, eine Barriere für parazelluläre Marker darzustellen. Dabei handelte es sich um Substanzen, die einen dichten Monolayer über passiven parazellulären Transport überwinden, wie beispielsweise Natrium-Fluoreszein (Fluoreszein) [138]. Die Transportversuche mit Fluoreszein durch die Calu-3 Zellen wurden durchgeführt, nachdem hinreichend hohe TEER Werte erreicht wurden, wobei die



Permeationseigenschaften des Fluoreszeins als zusätzlicher Hinweis für die Qualität der Monolayer diene.

Die Ausbildung des Tight Junction Proteins Zona Occludin Protein-1 (ZO-1) ist die dritte Eigenschaft, die überprüft wurde. Das ZO-1 Protein ist ein Hauptbestandteil der Tight Junctions zwischen den Zellen [141] und somit ein Anhaltspunkt für deren Ausbildung. Die Fähigkeit der Calu-3 Zellen, das ZO-1 Protein auszubilden, wurde bereits gezeigt [131, 141, 143, 145, 146] und war somit ein naheliegend zu überprüfendes Qualitätsmerkmal.

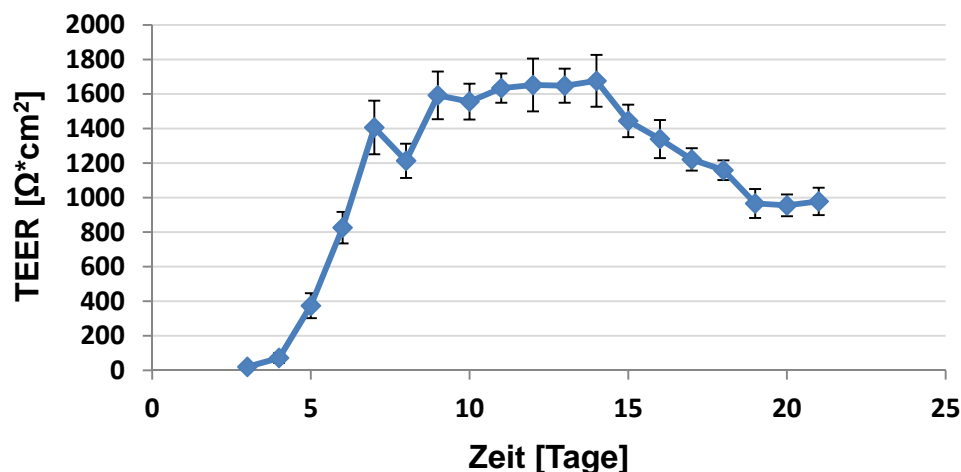
## **2.3.2 Überprüfung der Monolayerqualität durch Messen des TEER**

### **2.3.2.1 Durchführung**

Die Qualität und Dichtigkeit des Monolayers wurde durch die Messung des TEER überprüft. Hierfür wurde der Voltmeter Evohm 2 in Verbindung mit einer Doppelelektrode (Chopstick Elektrode STX-3) verwendet. Die Messung erfolgte nach Wechseln des Mediums und einer Inkubation von 15-30 min bei 37 °C (siehe C2.4.1). Die Berechnung der TEER Werte erfolgte analog der Formel 7 (siehe C2.4.1) durch Abzug des Widerstandwertes eines Filters ohne Zellen und Multiplikation mit der Wachstumsfläche des Filters. Neben der Messung am Tag der Permeationsversuche wurde eine Messreihe vor Beginn der Transportstudien mit IGF-1 täglich über einen Zeitraum von 21 Tagen nach Aussaat der Zellen auf die Filter durchgeführt (siehe C2.3). Dies diene der Bestimmung der Plateauphase, in der die Monolayer die beste Qualität aufwiesen. Die Grenze, ab der die Zellmonolayer für Permeationsversuche verwendet wurden, wurde auf 1000  $\Omega\text{cm}^2$  festgelegt.

### **2.3.2.2 Ergebnisse**

Die tägliche Messung des TEER ergab eine Kurve mit einem Anstieg des Widerstandes bis Tag 9 mit  $1592 \pm 138 \Omega\text{cm}^2$  (Mittelwert mit Standardabweichung von  $n=6$ ) und einer darauffolgenden Plateauphase bis Tag 14 mit  $1676 \pm 150 \Omega\text{cm}^2$  (siehe Abb. 9) (siehe D2.1.1).



**Abb. 9:** Verlauf des TEER [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ] über die Zeit [Tage], dargestellt als Mittelwerte mit Standardabweichungen von  $n=6$  Monolayer.

Der Unterschied zwischen den Werten in der Plateauphase (Tag 9 – 14) war nicht signifikant ( $p > 0,05$ , Anova mit Post-Hoc Tukey's Test). Anschließend folgte eine Phase mit stetig sinkendem Widerstand. Die Permeationsversuche wurden fortan in dem Zeitraum der Plateauphase durchgeführt, da die Qualität der Monolayer dann als am höchsten angesehen wurde.

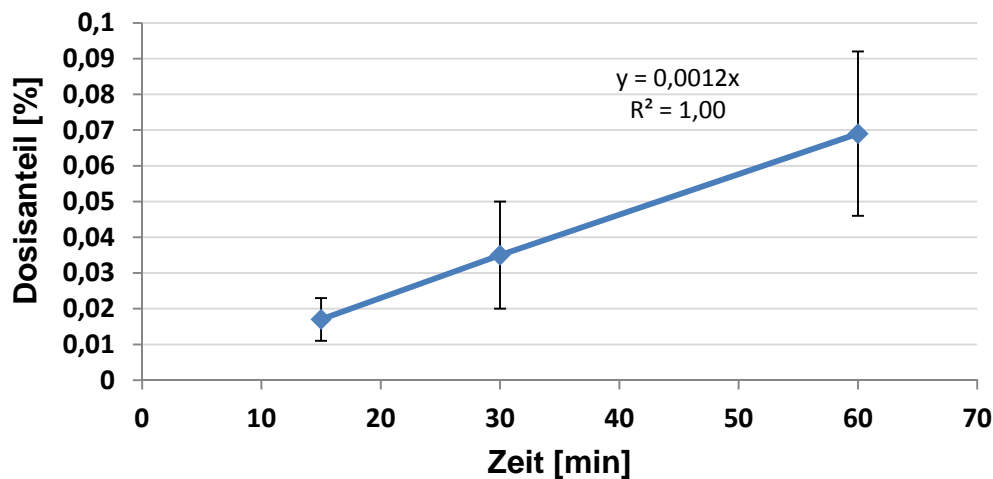
### 2.3.3 Überprüfung der Monolayerqualität durch Messung der Fluoreszeinpermeation

#### 2.3.3.1 Durchführung

Die Permeation von Fluoreszein durch Calu-3 Monolayer wurde jeweils mit Kontrollmonolayern durchgeführt (siehe C2.4.2). Diese wurden parallel zu denen kultiviert, die für die Permeationen von IGF-1 und Insulin jeweils in Vollmedium verwendet wurden (siehe C2.5, C2.8). An den Tagen der Insulin- und IGF-1-Permeationen wurde das Medium apikal und basolateral aspiriert, und die Monolayer wurden mit Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) gewaschen. Nach einer Inkubation in HBSS wurde der Puffer apikal durch die 20  $\mu\text{M}$  Fluoreszein-Donorlösung ersetzt und basolateral mit HBSS. Proben wurden basolateral nach 15 – 60 min gewonnen.

### 2.3.3.2 Ergebnisse

Das Fluoreszein permeierte linear ( $R^2 = 1,00$ ) mit einer Steigung der Regressionsgeraden von  $0,0012 \text{ \%/min}$  durch die Calu-3 Zellen apikal nach basolateral (siehe Abb. 10).



**Abb. 10:** Permeation von Fluoreszein durch Calu-3 Zellen; dargestellt als Mittelwerte mit Standardabweichungen des permeierten Dosisanteils von  $n = 9$ .

Nach 15 Minuten waren  $0,017 \pm 0,006 \text{ \%}$ , (Mittelwert mit Standardabweichung,  $n = 9$ ), nach 30 min  $0,034 \pm 0,015 \text{ \%}$  und nach 60 min  $0,069 \pm 0,023 \text{ \%}$  der applizierten Dosis in die basolaterale Kammer transportiert. Der Permeationskoeffizient belief sich auf  $8,07 \pm 2,67 \cdot 10^{-8} \text{ cm/sec}$  (siehe D2.1.2).

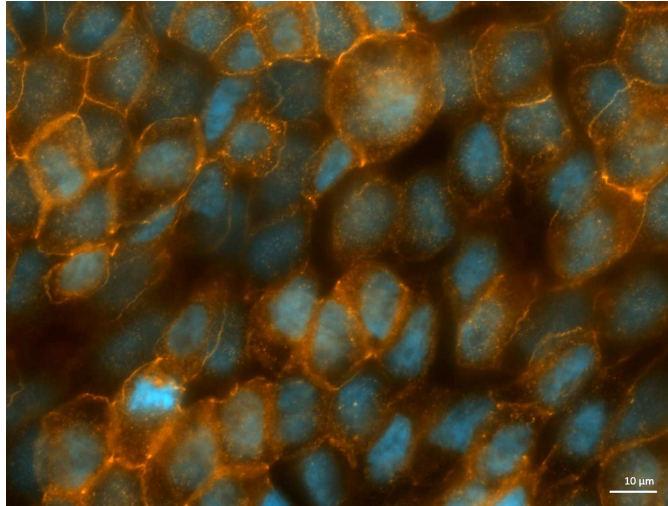
### 2.3.4 Überprüfung der Monolayerqualität durch Markierung der Tight Junctions

#### 2.3.4.1 Durchführung

Das Protein ZO-1, Teil der Tight Junctions [131]) wurde mithilfe eines primären und eines markierten sekundären Antikörpers markiert und unter Verwendung eines Epifluoreszenzmikroskops untersucht (siehe C2.4.4). Dafür wurden die Zellen auf Filtern ausgesät und, wie bereits beschrieben, bis Tag 11 in Kultur kultiviert (siehe C2.3).

### 2.3.4.2 Ergebnis

Das Protein ZO-1 (siehe Abb. 11; ZO-1, orange; Zellkern, blau) war stark ausgeprägt und gleichmäßig verteilt zwischen den Zellen (siehe D2.1.3). Somit waren die Tight Junctions in dieser Zellkultur zwischen den Calu-3 Zellen entwickelt, und die Zellen waren in der Lage einen dichten Monolayer zu bilden.



**Abb. 11:** Zellmonolayer mit markiertem ZO-1 (orange) und angefärbten Zellkernen (blau).

### 2.3.5 Diskussion

#### 2.3.5.1 Transepithelialer Widerstand

In dieser Studie konnte die Qualität der Calu-3 Zellen bzw. der Tight Junctions bewiesen werden. Die Monolayer erreichten hohe TEER Werte ( $> 1000 \Omega\text{cm}^2$ ) und konnten eine Plateauphase mit gleichbleibenden TEER Werten in einem Zeitraum von 5 Tagen bilden. Die Messung des TEER stellt die am häufigsten verwendete Methode zur Überprüfung der Integrität von Zellmonolayern dar [138]. Über eine inverse Korrelation zwischen den TEER Werten der Permeation von Markern für den parazellulären Transport wurde berichtet [70, 136]. Das wiederum bedeutete, dass die in der vorliegenden Studie gemessenen hohen TEER Werte für die Integrität bzw. Dichtigkeit des Monolayers sprachen. Unterstützt wurde diese Annahme dadurch, dass von Ehrhardt et al. für Fluoreszein als parazellulären Marker ab einem bestimmten TEER Wert ein gleichbleibendes Permeationsverhalten festgestellt

werden konnte [145]. Interessanterweise sind die TEER Werte für Calu-3 Monolayer, die in der Literatur mit vergleichbaren Kulturbedingungen (kultiviert mit Medium in der apikalen Kammer) beschrieben wurden, sehr heterogen. Shen et al. beobachteten mit  $100 \Omega\text{cm}^2$  [130] sehr niedrige TEER Werte. Auch in anderen Arbeitsgruppen wurden TEER Werte unter  $1000 \Omega\text{cm}^2$  gemessen, mit beispielsweise  $301 \Omega\text{cm}^2$  [72] bzw.  $359 \Omega\text{cm}^2$  [131] oder  $900 \Omega\text{cm}^2$  [137]. Daneben wurde über zahlreiche Werte, die  $1000 \Omega\text{cm}^2$  oder darüber betragen, berichtet, wie beispielsweise  $1000 \Omega\text{cm}^2$  [146] oder  $1185 \Omega\text{cm}^2$  [145]. Auch Werte größer als  $2000 \Omega\text{cm}^2$  wurden bereits gemessen ( $2500 \Omega\text{cm}^2$ ) [147]. Die Inhomogenität der TEER Werte entstammt wahrscheinlich Unterschieden in Messtechnik und Kulturbedingungen zwischen den Laboren. Die TEER Werte, die in der vorliegenden Studie gemessen wurden, lagen mit  $1676 \pm 151 \Omega\text{cm}^2$  ( $n=6$ , Beispielswert aus der Plateauphase, siehe 2.3.2.2) im eher höheren Bereich. Allerdings gibt es aufgrund der inhomogenen Werte in der Literatur keine einheitliche Entscheidungsgrenze für einen TEER Wert, ab der die Monolayer für die Transportstudien verwendet werden sollten. Ehrhardt et al. beispielsweise zeigten eine Grenze von  $450 \Omega\text{cm}^2$ , über der keine Unterschiede im Transport des parazellulären Markers Fluoreszein gefunden wurden [145]. Andere Grenzen für einen dichten Monolayer wurden beschrieben wie  $575$  [148],  $129$  [149], oder auch  $1200 \Omega\text{cm}^2$  [150] (allerdings gemessen auf Filtern mit Porengröße vom  $3 \mu\text{m}$ ). Die Entscheidungsgrenze in der vorliegenden Studie wurde auf  $1000 \Omega\text{cm}^2$  festgelegt, wie es auch schon anderweitig berichtet wurde [74]. Diese Entscheidung basierte vorwiegend auf den hohen TEER Werten, die in der Plateauphase erreicht wurden, und darauf, dass die Grenze oberhalb der meisten in der Literatur beschriebenen Werte lag. Obwohl diese Grenze für die Monolayer der kontinuierlichen TEER Messung (siehe C2.4.1) bereits ab Tag 7 in Kultur erreicht wurde, wurden die Permeationsversuche erst in der Plateauphase zwischen Tag 9 bis 14 in Kultur durchgeführt (siehe Abb. 9). In diesem Bereich waren die TEER Werte am höchsten und die Unterschiede zwischen den Werten nicht signifikant ( $p > 0,05$ , Anova mit Post-Hoc Tukey's Test). Daher wiesen in diesem Zeitraum die Monolayer wahrscheinlich die beste Qualität auf, und die Zellen konnten verlässliche Ergebnisse für Permeationsuntersuchungen liefern.

### 2.3.5.2 Permeationversuche mit Fluoreszein

Um zu bestätigen, dass die Monolayer in der Plateauphase tatsächlich eine dichte Barriere bildeten, wurden zusätzlich Permeationsversuche mit dem parazellulären Marker Fluoreszein durchgeführt. Die Permeationen fanden im Zeitraum der Plateauphase statt. Der Permeationskoeffizient, der für Fluoreszein in der Plateauphase gemessen wurde, sprach für die Fähigkeit der Monolayer, eine dichte Barriere bzw. Monolayer mit guter Qualität zu bilden. Wie bei den TEER Werten existieren auch für die Permeationen mit Fluoreszein Unterschiede in den Werten, die in der Literatur beschrieben wurden. Mathias et al. beobachteten Werte von  $1,47 \cdot 10^{-7}$  cm/sec für den Transport von Fluoreszein durch Calu-3 Zellen [74], wogegen Fiegel et al. einen höheren Wert erhielten ( $2,2 \cdot 10^{-7}$  cm/sec) [146]. Bei Ehrhardt et al. betrug der niedrigste Wert, gemessen auf dichten Monolayern von Calu-3 Zellen,  $1,05 \cdot 10^{-7}$  cm/sec [145]. Obwohl die Werte Unterschiede aufzeigten, lagen sie doch alle im ähnlichen Bereich und über  $1,0 \cdot 10^{-7}$  cm/sec, mit Ausnahme der Studie von Marusic et al., in der von einem Wert von  $8,5 \cdot 10^{-8}$  cm/sec berichtet wurde [140]. Die Werte, die in der vorliegenden Studie für die Permeation von Fluoreszein durch Calu-3 Monolayer gemessen wurden, lagen zwischen  $0,55 \cdot 10^{-7}$  und  $1,43 \cdot 10^{-7}$  mit einem Durchschnitt von  $0,81 \cdot 10^{-7}$  cm/sec (n= 9). Dieser Bereich war vergleichbar mit den oben genannten Werten und der Durchschnittswert lag darüber hinaus unterhalb der oben genannten, in der Literatur beschriebenen Werte. Dieser Sachverhalt zeigte, dass die Monolayer in der Plateauphase in der Lage waren, eine dichte Barriere für parazelluläre Marker zu bilden, woraus sich wiederum schließen ließ, dass die Monolayer geeignet waren, für Permeationsstudien eingesetzt zu werden und dabei verlässliche Ergebnisse zu liefern.

### 2.3.5.3 Ausbildung der Tight Junctions

Die Überprüfung der Ausbildung des Tight Junction Proteins ZO-1 bildete den dritten Teil der Qualitätsprüfung der Monolayer. Das ZO-1 Protein ist ein Hauptbestandteil der Tight Junctions zwischen den Zellen [141] und ist deshalb in der vorliegenden Studie als Merkmal für dessen Ausbildung verwendet worden. Darüber hinaus wurden von Grainger et al. Hinweise für einen Zusammenhang zwischen dem Grad der Ausbildung des ZO-1 Proteins und der Permeation eines parazellulären Markers

gefunden [141]. Daraus ergab sich, dass die Bildung des ZO-1 als Zeichen für die Ausbildung eines dichten Monolayers verwendet werden konnte. Außerdem wurde die Ausbildung des ZO-1 Proteins häufig als Merkmal für das Vorhandensein von Tight Junctions bei Calu-3 Zellen verwendet und dessen Ausbildung für die Zelllinie bewiesen [131, 141, 143, 145, 146]. Da in der vorliegenden Studie das ZO-1 Protein gleichmäßig und stark ausgeprägt war, ließ das darauf schließen, dass die Zellen Tight Junctions und einen dichten Monolayer bildeten.

### **2.3.6 Zusammenfassung**

Betrachtet man alle überprüften Qualitätsmerkmale, die hohen TEER Werte mit einer Plateauphase, die Paap für Fluoreszein, die im Bereich bzw. unterhalb derer lagen, die in der Literatur beschrieben wurden, und das stark ausgeprägte Tight Junction Protein ZO-1, dann bildeten die Calu-3 Zellen in der Plateauphase eine dichte Barriere bzw. Monolayer mit hoher Qualität. Somit konnten die Calu-3 Zellen für Transportstudien zur Untersuchung der Permeationseigenschaften von Substanzen über das Lungenepithel verwendet werden und dabei aussagekräftige Ergebnisse produzieren.

## **2.4 In vitro Transportversuche auf porösen Filtersystemen**

### **2.4.1 Prinzip der Bestimmung**

Die Untersuchung der Permeationseigenschaften von IGF-1 und Insulin durch das Lungenepithel wurde mit der Bronchialepithelzelllinie Calu-3 (siehe 2.2) durchgeführt. Hierfür wurden poröse Filtersysteme mit permeabler Membran verwendet. Nach Aussaat der Zellen auf die Filtersysteme wuchsen diese zu einem dichten Monolayer zusammen. Das Zwei-Kammersystem (siehe C2.3.1) erlaubte somit die Simulation eines Lungenepithels, das eine der Luft zugewandte (apikale) Seite und eine dem Blut zugewandte (basolaterale) Seite besaß. Wurden Substanzen nun apikal auf die Zellen gegeben, konnten basolateral Proben gewonnen werden, was die Charakterisierung der Permeationseigenschaften von Substanzen über das Lungenepithel in vitro erlaubte.

## **2.5 Transportversuche mit IGF-1 und Insulin in Vollmedium**

### **2.5.1 Hintergrund**

Die strukturelle Ähnlichkeit von Insulin und IGF-1 (50 % [118]) und die Fähigkeit von Insulin, nach pulmonaler Applikation in den systemischen Kreislauf zu gelangen [23], führten zu der Annahme, dass IGF-1 über das Lungenepithel permeieren kann und dabei möglicherweise ähnliche Transportwege nutzen könnte wie das Insulin. Daher wurden die Permeationseigenschaften von Insulin und IGF-1 durch Calu-3 Zellmonolayer miteinander verglichen.

### **2.5.2 Zielsetzung**

Das Ziel dieser Studie lag darin, Permeationseigenschaften von IGF-1 durch die Bronchialkarzinomzelllinie Calu-3 zu untersuchen und mit denen von Insulin zu vergleichen, bzw. Hinweise für ähnliche Eigenschaften zu finden. Dafür wurden Transportversuche von IGF-1 und Insulin durch Calu-3 Zellmonolayer parallel zueinander durchgeführt.

### **2.5.3 Durchführung**

Eine detaillierte Beschreibung der Permeationsversuche mit IGF-1 und Insulin ist unter C2.5, C2.8 zu finden. Nach Messen des TEER (siehe C2.4.1) wurde das Medium apikal und basolateral aspiriert und apikal durch 500  $\mu$ L der Donorlösung mit einer IGF-1 Konzentration von  $65 \pm 9$   $\mu$ g/mL (Mittelwert mit Standardabweichung von  $n= 13$ ) (siehe D2.2.1) und basolateral mit 1,5 mL Vollmedium ersetzt. Die Transportversuche fanden unter Schütteln (100 U/min) und Kulturbedingungen (siehe C2.3) statt. Proben wurden basolateral zwischen 60 und 150 min gewonnen. Der Permeationskoeffizient wurde mit Formel 8 berechnet (siehe C2.4.3). Das IGF-1 in Vollmedium wurde mithilfe eines Sandwich ELISA (siehe C3.1) quantifiziert.

Die Versuche mit Insulin erfolgten parallel und analog zu denen mit IGF-1. Die initiale Donorkonzentration des Insulins belief sich auf  $97 \pm 5$   $\mu$ g/mL ( $n= 10$ ) (siehe D2.2.3). Die Stabilität des IGF-1 und des Insulins während der Versuche wurde überprüft, indem aus der Donorlösung in der apikalen Kammer vor Versuchsbeginn und nach



Versuchsende eine Probe entnommen wurde (n= 5 für IGF-1, n= 4 für Insulin) (siehe C2.5.4, C2.8.4).

Der Einfluss des IGF-1 bzw. Insulins auf die Integrität der Tight Junctions wurde untersucht, indem nach Versuchsende nach Waschen der Monolayer der TEER gemessen wurde (siehe C2.5.3, C2.8.3).

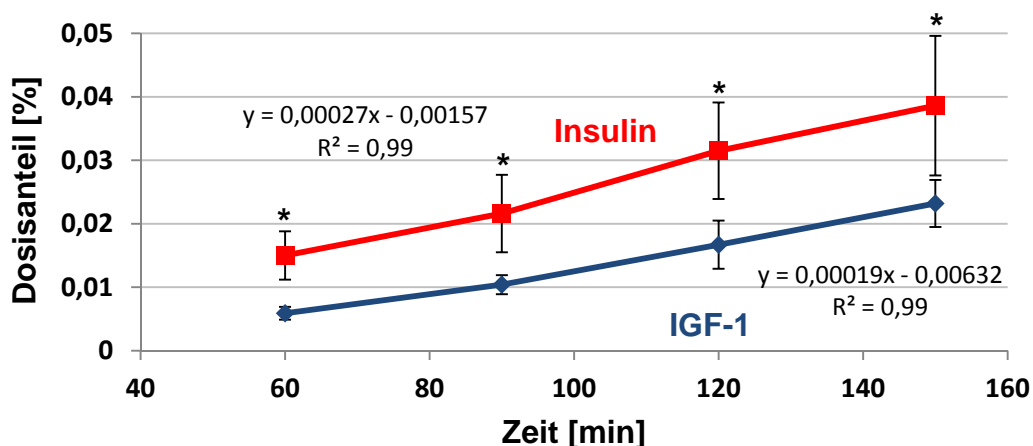
## 2.5.4 Ergebnisse

### 2.5.4.1 Stabilität der Proteine während der Permeationsversuche

Sowohl die Konzentrationen des IGF-1 als auch die des Insulins in der apikalen Kammer unterschieden sich vor und nach den Permeationen nicht signifikant ( $P > 0,05$ , gepaarter Student T-Test von n= 5 für IGF-1 und n= 4 für Insulin) (siehe D2.2.5). Daher wurden sowohl Insulin als auch IGF-1 als stabil während der Versuchsdauer im Transportmedium angesehen.

### 2.5.4.2 Permeationseigenschaften von Insulin und IGF-1

IGF-1 permeierte linear über die Calu-3 Monolayer mit einer Steigung von  $1,9 \cdot 10^{-4}$  %/min der linearen Regressionsgeraden ( $R^2 = 0,99$ ) mit  $0,006 \pm 0,001$  % (Mittelwert mit Standardabweichung von n= 13) Dosisanteil nach 60 min und  $0,023 \pm 0,004$  % (n= 10) nach 150 min (siehe Abb. 12) (siehe D2.2.1).

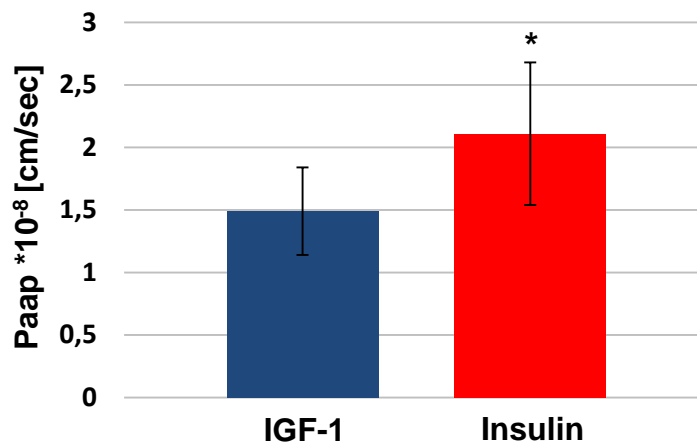


**Abb. 12:** Permeation von IGF-1 und Insulin durch Calu-3 Zellen; dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung des permeierten Dosisanteils von n= 13 (60 - 120 min) bzw. n= 10 (150 min) von IGF-1, und n= 10 (60-120 min) bzw. n= 7 (150 min) von Insulin.

\* statistisch signifikante Unterschiede der Werte von Insulin im Vergleich zu IGF-1,  $p < 0,05$ .

Der Transport des Insulins verlief ebenso linear mit einer Steigung von  $2,7 \cdot 10^{-4}$  %/min der linearen Regressionsgeraden ( $R^2= 0,99$ ). Nach 60 min waren  $0,015 \pm 0,004$  % ( $n= 10$ ) der Dosis in die basolaterale Kammer über den Monolayer permeiert, nach 150 min  $0,039 \pm 0,011$  % ( $n= 7$ ) (siehe Abb. 12) (siehe D2.2.3).

Aus den Permeationen ergaben sich Permeationskoeffizienten von  $1,49 \pm 0,35 \cdot 10^{-8}$  cm/sec ( $n= 13$ ) für IGF-1 (siehe D2.2.1) und  $2,11 \pm 0,57 \cdot 10^{-8}$  cm/sec ( $n= 10$ ) für Insulin (siehe D2.2.3) (siehe Abb. 13).



**Abb. 13:** Permeationskoeffizienten von IGF-1 und Insulin; dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung von  $n= 13$  von IGF-1 und  $n= 10$  von Insulin.

\* statistisch signifikanter Unterschied von Insulin im Vergleich zu IGF-1,  $p < 0,05$ .

Das Insulin permeierte zu jedem Zeitpunkt in höherem Ausmaß als das IGF-1 mit statistisch signifikanten Unterschieden zwischen der permeierten Menge von IGF-1 und Insulin zu den jeweiligen Zeitpunkten ( $p < 0,05$ ; Anova mit Post-Hoc Tukey's Test). Auch der Permeationskoeffizient von Insulin war statistisch signifikant höher als der von IGF-1 ( $p < 0,05$ ; ungepaarter Student T-Test). Das Verhältnis des Permeationskoeffizienten von IGF-1 zu dem von Insulin lag bei 71 %.

### 2.5.4.3 Einfluss der Proteine auf die Tight Junctions

Das IGF-1 in Vollmedium bewirkte über die Dauer der Permeationen ein Absinken des TEER von  $70 \pm 3$  % ( $n= 10$ , Mittelwert mit Standardabweichung) (siehe D2.2.2), und das Insulin in Vollmedium von  $68 \pm 4$  % ( $n= 7$ ) (siehe D2.2.4). Diese Werte

unterschieden sich nicht signifikant voneinander ( $p > 0,05$ , ungepaarter Student T-Test).

## **2.6 Transportversuche mit Hemmstoffen der Transzytose/Endozytose**

### **2.6.1 Hintergrund**

Zur Überprüfung einer Beteiligung einer Transzytose beim Transport von IGF-1 über das Lungenepithel wurden Transportstudien mithilfe von Substanzen durchgeführt, die entweder generell die Transzytose hemmen oder spezifische Arten der endozytotischen Aufnahme. Der transzytotische Transport wurde bereits für Insulin angenommen [39-41]. Auch die Endozytose von Insulin wurde untersucht und als Aufnahmeweg in Zellen vermutet [37, 38]. Ikehata et al. studierten die zelluläre Aufnahme von FITC-Insulin in Typ II und Typ I-like Rattenalveolarzellen. Hierbei wurde für Typ II Zellen ein Dynamin-abhängiger, Clathrin- und Caveolae-unabhängiger Transportweg vermutet, wobei für Typ I-like Zellen ein Dynamin-unabhängiger Mechanismus angenommen wurde [37]. Oda et al. untersuchten die zelluläre Aufnahme von FITC-Insulin in die Typ II Rattenalveolarzelllinie RLE-6TN, wobei hier eine Clathrin-abhängige Aufnahme erachtet wurde, diese aber nur schwach ausgeprägt sei, zum anderen wurde eine Dynamin-abhängige, Clathrin-, Caveolae-, und makropinozytotisch unabhängige Endozytose in Betracht gezogen, mit einer Beteiligung der RhoA GTPase [38]. Die Endozytose/Transzytose schien somit für den Transport von Insulin einen großen Stellenwert zu haben, weshalb diese Transportwege möglicherweise auch für IGF-1 eine bedeutende Rolle spielten.

### **2.6.2 Zielsetzung**

Das Ziel in der vorliegenden Studie war es den Transportweg von IGF-1 durch Lungenepithelzellen zu charakterisieren. Hierfür wurden Transportstudien mit Hemmstoffen der Transzytose/Endozytose durchgeführt (siehe Tab. 3), um die beteiligten Mechanismen des IGF-1 Transportes durch die Zellmonolayer zu bestimmen.

**Tab. 3: Verwendete Hemmstoffe der Transzytose/Endozytose.**

<b>Gehemmter Transportweg</b>	<b>Substanz (Konzentration)</b>
Transzytose allgemein	Nocodazol [151, 152]
Clathrin-abhängige Endozytose	Phenylarsinoxid [38, 153], Amantadin [154]
Caveolae-abhängige Endozytose	Indometacin [38]
Makropinozytose	Amilorid [38]
Dynamin-abhängige Endozytose	Dynasore [38]

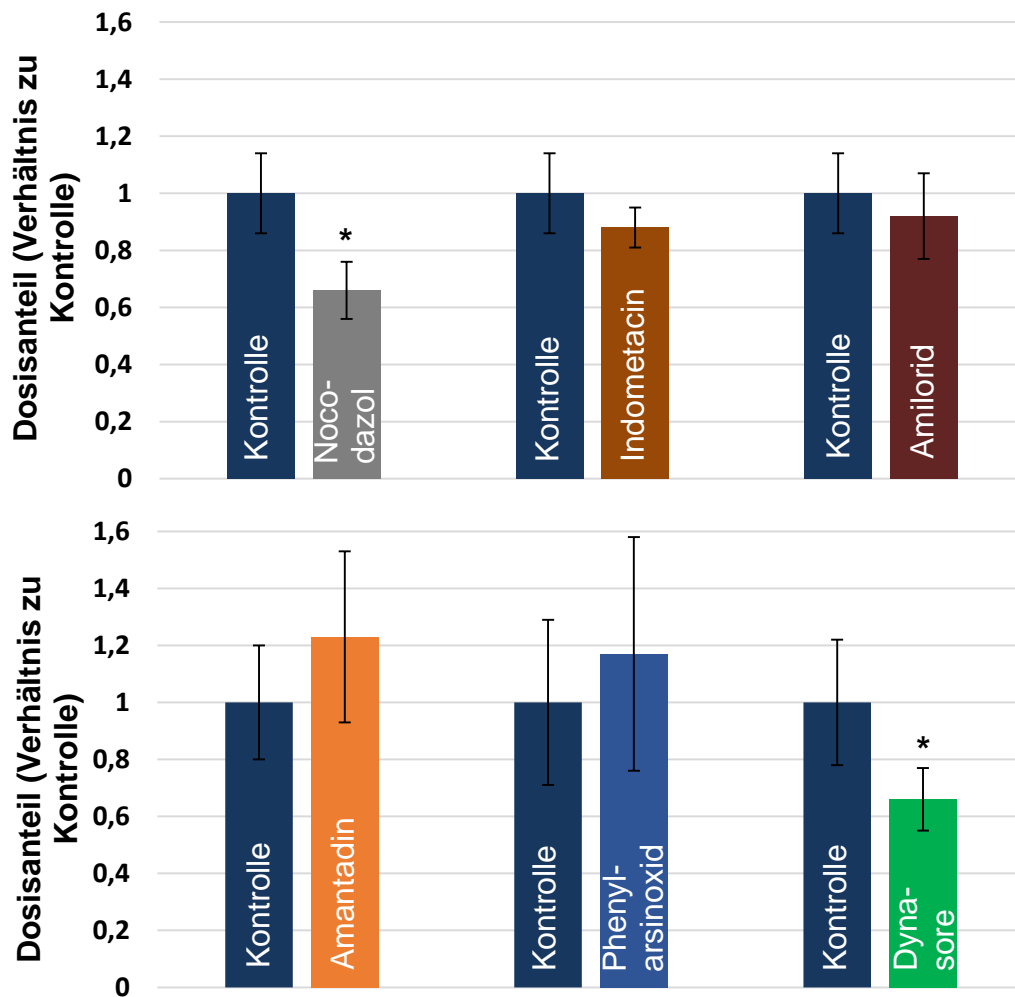
Parallel zu den Transportversuchen mit den jeweiligen Hemmstoffen wurden Kontrollversuche ohne Hemmstoff durchgeführt.

### **2.6.3 Durchführung**

Die genaue Versuchsdurchführung der Permeationen mit IGF-1 durch Calu-3 Zellmonolayer und Hemmstoffen der Transzytose/Endozytose ist unter C2.6 beschrieben. Die Calu-3 Zellen wurden auf poröse Filter gesät (siehe C2.3.2) und bis zum Erreichen der Plateauphase (siehe 2.3.2.2) kultiviert. Am Tag der Permeationen wurde der TEER gemessen (siehe C2.4.1), und nur Monolayer mit einem TEER über  $1000 \Omega\text{m}^2$  wurden in der Studie verwendet. Anschließend wurden die Monolayer in den jeweiligen Inkubationsmedien, die die jeweiligen Hemmsubstanzen bzw. nur 0,1 % DMSO als Kontrolle enthielten, über eine bestimmte Zeitspanne im Brutschrank vorinkubiert. Darauffolgend wurden Transportversuche durchgeführt. Die IGF-1-Donorlösungen enthielten neben IGF-1 die jeweiligen Hemmsubstanzen bzw. 0,1 % DMSO für die Versuche mit Amantadin und die Kontrolle ( $67 \pm 6 \mu\text{g/mL}$ , Mittelwert von IGF-1 in allen Donorlösungen mit Standardabweichung,  $n=10$ ) (siehe D2.3.7). Die Donorlösungen wurden apikal auf die Monolayer gegeben und nach 1 h Inkubation im Brutschrank unter Schütteln wurden basolateral die Proben gewonnen. Die basolateralen Kammern enthielten das jeweilige Inkubationsmedium mit dem Inhibitor bzw. Vollmedium mit 0,1 % DMSO für die Versuche mit Amantadin und die Kontrolle. Folgende Konzentrationen wurden verwendet: Nocodazol  $30 \mu\text{M}$ ; Phenylarsinoxid  $5 \mu\text{M}$ ; Amantadin  $1 \text{ mM}$ ; Indometacin  $300 \mu\text{M}$ ; Amilorid  $50 \mu\text{M}$ ; Dynasore  $60 \mu\text{M}$ .

## 2.6.4 Ergebnisse

Der permeierte Dosisanteil des IGF-1, im Verhältnis zur jeweiligen Kontrolle (Kontrolle hat den Wert 1), betrug für die Hemmung mit Amilorid  $0,92 \pm 0,15$  (Mittelwert mit Standardabweichung von  $n= 5$ ), Indometacin  $0,88 \pm 0,07$  ( $n= 5$ ), Phenylarsinoxid  $1,17 \pm 0,41$  ( $n= 5$ ) und für Amantadin  $1,23 \pm 0,30$  ( $n= 5$ ). Nocodazol bewirkte eine Verringerung des Transportes von IGF-1 auf  $0,66 \pm 0,10$  ( $n= 5$ ), und Dynasore auf  $0,66 \pm 0,11$  ( $n= 5$ ) (siehe Abb. 14) (siehe D2.3).



**Abb. 14:** Permeationen von IGF-1 mit Hemmsubstanzen der Transzytose/Endozytose; dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung des jeweiligen permeierten Dosisanteils im Verhältnis zu Kontrolle von  $n= 5$ .

\* Unterschied statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle,  $p < 0,05$ .

Der Transport von IGF-1 durch Calu-3 Zellen wurde durch die Hemmstoffe Amilorid (n= 5), Indometacin (n= 5), Phenylarsinoxid (n= 5), Amantadin (n= 5) im Vergleich zu der jeweiligen Kontrolle (ohne Hemmstoff, mit 0,1 % DMSO) statistisch nicht signifikant beeinflusst ( $p > 0,05$ , Student T-Test). Die Unterschiede sowohl für Dynasore als auch für Nocodazol waren statistisch signifikant verglichen mit der jeweiligen Kontrolle (n= 5) ( $p < 0,05$ , ungepaarter Student T-Test) (siehe Abb. 14).

## **2.7 Diskussion der in Vollmedium durchgeführten in vitro Studien**

### **2.7.1 Permeationseigenschaften von IGF-1 im Vergleich zu Insulin**

Die Ergebnisse der Permeationsversuche von IGF-1 und Insulin durch Calu-3 Monolayer ließen darauf schließen, dass für den Transport über das Lungenepithel ein ähnlicher Mechanismus für beide Substanzen wahrscheinlich war. Obwohl die Permeationskurve des Insulins oberhalb der von IGF-1 verlief (siehe Abb. 12), so verliefen beide Kurven doch nahezu identisch und linear ( $R^2 > 0,99$ ). Auch die Permeationskoeffizienten (siehe Abb. 13) lagen mit  $1,49 \cdot 10^{-8}$  cm/sec für IGF-1 und  $2,11 \cdot 10^{-8}$  cm/sec für Insulin in der gleichen Größenordnung. Der größere Permeationskoeffizient des Insulins in der vorliegenden Studie war möglicherweise auf die Unterschiede in molekularen Massen der beiden Substanzen zurückzuführen. Insulin lag mit 5,8 kDa unterhalb der Masse des IGF-1 mit 7,6 kDa und konnte daher eventuell schneller über die Monolayer permeieren. Über einen Zusammenhang zwischen der Größe einer Substanz und der Permeationsgeschwindigkeit durch Calu-3 Monolayer wurde bereits berichtet [74, 141]. Für hydrophile Substanzen wurde eine inverse Korrelation zwischen der Molekülgröße und der Permeationsgeschwindigkeit gefunden [74]. Grainger et al. beobachteten eine Verringerung der Permeationsgeschwindigkeit mit steigender Molekülgröße von FITC-Dextranen [141]. Da die Molekülgröße bei endozytotischen Transportvorgängen nicht unbedingt eine Rolle spielen muss und vorwiegend beim parazellulärem Transport wichtig ist [33], könnten die Unterschiede, die für Insulin und IGF-1 beim Transport durch die Calu-3 Zellen in der vorliegenden Studie gefunden wurden, auf eine parazelluläre Beteiligung zurückzuführen sein. Außerdem

unterschieden sich beide Substanzen nicht in dem Einfluss auf die TEER Werte. Somit bewirkten beide eine Auflockerung der Tight Junctions, was möglicherweise auf einen parazellulären Transport beider Substanzen hindeutete.

### **2.7.2 Transportwege des IGF-1 durch Calu-3 Zellen**

Der Transport von IGF-1 konnte durch Nocodazol statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) auf 66 % der Kontrolle reduziert werden. Nocodazol unterbindet die Mikrotubulopolymerisation und damit die Transzytose, da die Mikrotubuli für die Bewegung des Vesikels durch die Zellen benötigt werden [151, 152]. Dies ließ neben dem schon angenommenen parazellulären Transportweg (siehe 2.7.1) auf eine transzelluläre Beteiligung für die Permeation von IGF-1 durch die Calu-3 Zellen schließen. Ein sowohl parazellulärer als auch transzellulärer Transport über Bronchialepithelzellen wurde auch für Insulin von Hussain et al. vermutet [41]. Hierbei wurden die Zellen mit FITC markiertem Insulin inkubiert und das Insulin konnte anschließend durch Konfokale Laser Scanning Mikroskopie sowohl in den Bronchialepithelzellen 16HBE14o- als auch in Calu-3 Zellen nachgewiesen werden, weshalb neben einem Transportweg zwischen den Zellen ein Weg durch die Zellen angenommen wurde [41]. Auch Untersuchungen der Aufnahme von FITC-Insulin in Typ II und Typ I-like Rattenalveolarzellen lieferten Hinweise für eine endozytotische Aufnahme, wobei ein unterschiedlicher Mechanismus für die beiden Zellarten vermutet wurde [37]. Außerdem wurden für die zelluläre Aufnahme von Insulin in die Rattenalveolarzelllinie RLE-6TN Hinweise für eine Endozytose gefunden [38]. Pezron et al. dagegen vermuteten einen vorwiegend parazellulären Transport von Insulin durch Calu-3 Zellen [139]. Die Untersuchung des Transportes von Insulin durch Rattenalveolarepithelzellen von Bahhady et al. ergaben eine Erhöhung der Permeation, zum einen durch ein von den Zellen konditioniertes Medium und zum anderen durch die Anwendung einer bronchioalveolären Rattenlavage, was auf eine Erhöhung der Transzytose zurückgeführt wurde [39, 40]. Somit steht die Annahme eines transzytotischen Transportes bzw. einer endozytotischen Aufnahme für IGF-1 im Einklang mit den Annahmen über den Transport von Insulin in Lungenepithelzellen. Generell scheint für den Transport von Proteinen in der Lunge die Transzytose eine bedeutende Rolle einzunehmen [33, 34].

### 2.7.3 Mechanismus der endozytotischen Aufnahme von IGF-1 in Calu-3 Zellen

Da keine Hemmung des Transportes von IGF-1 durch Calu-3 Zellen mit Amilorid beobachtet werden konnte, wobei Amilorid die Makropinozytose durch Wechselwirkung mit dem Natrium/Protonen Austausch in der Membran hemmt [38], war die Makropinozytose an der zellulären Aufnahme von IGF-1 wahrscheinlich nicht involviert. Auch der Einsatz von Indometacin zeigte keine signifikante Änderung der Permeation von IGF-1. Indometacin gilt als Hemmstoff der Caveolae-abhängigen Endozytose, durch Blockieren der Caveolaeinternalisierung und deren Rückkehr an die Zelloberfläche [38]. Somit war eine Beteiligung der Caveolae an der zellulären Aufnahme von IGF-1 auch unwahrscheinlich. Phenylarsinoxid und Amantidin zeigten ebenso keinen Einfluss auf den Transport von IGF-1 durch Calu-3 Zellen, was wiederum ein Hinweis dafür war, dass die Clathrin-abhängige Endozytose auch nicht an der endozytotischen Aufnahme des IGF-1 mitverantwortlich war. Phenylarsinoxid hemmt die Clathrin-abhängige Endozytose durch Wechselwirkung mit vicinalen Thiolen [38, 153], und Amantidin durch Stabilisierung von Clathrin-ummantelten Vesikeln [154]. Der Einsatz von Dynasore, eines GTPase Inhibitors und dadurch Hemmstoff der Dynamin-abhängigen Endozytose, bewirkte eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Verringerung des Transportes von IGF-1 auf 66 % der Kontrolle durch Calu-3 Zellen. Dies ließ darauf schließen, dass eine Dynamin-abhängige Endozytose an der zellulären Aufnahme von IGF-1 beteiligt war. Somit wurde die Aufnahme von IGF-1 in die Calu-3 Zellen wahrscheinlich von einer Clathrin-, Caveolae-, Makropinozytose- unabhängigen und Dynamin-abhängigen Endozytose beeinflusst. Dieser Mechanismus für die endozytotische Aufnahme des IGF-1 in die Lungenepithelzellen geht ebenso mit Untersuchungen über das Insulin konform. Für die zelluläre Aufnahme von FITC-Insulin in Typ II Rattenalveolarzellen wurde ein Clathrin- und Caveolae- unabhängiger, und Dynamin-abhängiger Mechanismus vermutet, für Typ I-like Zellen ein Dynamin-unabhängiger [37]. Die zelluläre Aufnahme von FITC-Insulin in die Typ II Rattenalveolarzelllinie RLE-6TN wurde von Oda et al. untersucht, wobei eine Clathrin-abhängige, allerdings schwach ausgeprägt, Dynamin-abhängige und Caveolae-unabhängige Endozytose erachtet wurde, zum Teil allerdings wurde auch ein Clathrin-unabhängiger, Dynamin-



abhängiger Mechanismus angenommen [38]. Ein Dynamin-abhängiger und Clathrin- und Caveolae-unabhängiger Aufnahmeweg für IGF-1 in Calu-3 Zellen war möglicherweise gesteuert von der RhoA GTPase [44]. Diese nimmt eine wichtige Rolle in der dynamischen Actin-Zytoskelett-Regulation ein und beeinflusst somit möglicherweise die Endozytose [44].

#### **2.7.4 Mögliche Rezeptorbeteiligung an der zellulären Aufnahme des IGF-1 in Calu-3 Zellen**

Die Beteiligung eines speziellen Rezeptors für die zelluläre Aufnahme des IGF-1 in die Calu-3 Zellen wurde nicht im Detail untersucht, muss aber in Erwägung gezogen werden. Untersuchungen an der Rattenleberzelllinie BRL-3A2 ließen darauf schließen, dass IGF-1 durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen wurde, vermittelt durch den IGF-1 Rezeptor 1 [155]. Untersuchungen von IGF-1 mit Rattenchondrozyten zeigten, dass IGF-1 endozytotisch in die Zellen aufgenommen wurde, und dass der IGF-1 Rezeptor 2 hauptsächlich, aber möglicherweise nicht exklusiv, für die Bindung mit IGF-1 mit anschließender Internalisierung verantwortlich war [156]. Für die Aufnahme in die humane Osteosarkomzelllinie MG-63 wurden Hinweise für eine Rezeptor-vermittelte endozytotische Aufnahme von IGF-1 durch den IGF-1 Rezeptor 1 gefunden, wobei zum Teil ein anschließender Abbau des IGF-1 in den Zellen angenommen wurde [157]. Untersuchungen mit bovinen Aortenendothelzellen zeigten eine Aufnahme des IGF-1 über den IGF-1 Rezeptor, wobei allerdings auch eine Degradation des IGF-1 nach Internalisierung vermutet wurde [158].

Da Calu-3 Zellen den IGF-1 Rezeptor exprimieren [159], wäre eine Beteiligung dieses Rezeptors für den Transport von IGF-1 denkbar. Für Insulin konnte eine Hemmung der Aufnahme in die Rattenalveolarzelllinie RLE-6TN durch Anwendung einer siRNA des Insulinrezeptors bewirkt werden, was wiederum auf eine Beteiligung des Insulinrezeptors für die Endozytose hinwies [38].

Ein weiterer wichtiger Rezeptor für die Endozytose ist das Megalin [160]. Hierbei handelt es sich um ein ca. 600 kDa großes transmembranes Glycoprotein, das zu der Familie der LDL-Proteine gehört [160]. Megalin fungiert als endozytotischer Rezeptor mit einer Vielzahl an Liganden, unter anderem Insulin [160]. Der Rezeptor

wird sehr stark in den Endothelzellen des proximalen Tubulus exprimiert, aber auch in vielen anderen Zellarten wie auch in alveolaren Typ II Zellen [160]. IGF-1 wurde als Ligand für Megalin identifiziert und die Translokation von IGF-1 durch Rattenzellen des Plexus Choroideus war von Megalin abhängig [161], wobei die Wechselwirkung des IGF-1 Rezeptors mit Megalin eine wichtige Rolle für Transportprozesse durch Zellmonolayer einzunehmen schien [162]. Andererseits wurde die Aufnahme des FITC-Insulins in die Rattenalveolarzelllinie RLE-6TN nicht durch den siRNA-vermittelten Knock-down von Megalin beeinflusst, was eher dafür spricht, dass Megalin nicht an der zellulären Aufnahme beteiligt war [38]. Dies könnte ein Hinweis sein, dass das Megalin auch beim Transport von IGF-1 durch die Bronchialepithelzellen keine wichtige Rolle spielt.

Hingegen könnte  $\alpha_2$ -Makroglobulin bzw. dessen Rezeptor auch an der endozytotischen Aufnahme des IGF-1 in die Calu-3 Zellen involviert gewesen sein, was unter 2.8.5 ausführlich diskutiert wird.

Um die Beteiligung eines Rezeptors an dem Transport des IGF-1 durch die Calu-3 Zellen zu klären, wären weitere Untersuchungen notwendig. Es müsste zunächst die Expressierung des Rezeptors, mithilfe eines Westernblots bzw. auf der Ebene der mRNA mithilfe der Realtime PCR, in den Zellen geklärt werden. Anschließend müsste die Beeinflussung einer Hemmung der Rezeptoren auf den Transport von IGF-1 untersucht werden.

## **2.8 Transportversuche in bronchioalveolärer Lavage**

### **2.8.1 Hintergrund**

Der Transport von Insulin über Monolayer von Typ I- und II-like Rattenalveolarepithelzellen wurde von Bahhady et al. untersucht [39]. Hierbei wurde der Einfluss von konzentrierter bronchialer Rattenlavage auf die Permeation von Insulin durch Monolayer von Typ I- und II-like Rattenalveolarepithelzellen studiert, wobei eine Erhöhung des Transportes von Insulin beobachtet wurde [39]. Dieser Effekt wurde durch weitere Untersuchungen auf höhermolekulare Bestandteile in der Lavage (> 100 kDa) zurückgeführt [39]. Als Ursache für die verstärkte Permeation von Insulin wurde eine Erhöhung der Transzytose angenommen. Diese Annahme

basierte zum einen darauf, dass keine Beeinflussung der Lavage auf den Transport des Fluoreszeins (parazellulärer Marker) und FITC-Dextran (70 kDa, Fluid-Phase Endozytose-Marker) festgestellt werden konnte, und zum anderen, dass der Effekt bei 4 °C und durch den Einsatz von Monensin (Hemmstoff der Transzytose) gehemmt werden konnte [39]. Als Hauptbestandteile der hochmolekularen Fraktion wurden  $\alpha_1$ -Inhibitor-III Precursor, Murinoglobulin- $\gamma_2$  und Pregnancy-zone Protein identifiziert, die alle zur Familie der Makroglobuline gehören [39]. Bahhady et al. legten dabei besonderes Augenmerk auf den Proteinase Inhibitor  $\alpha_1$ -Inhibitor-III, der ein Homolog des  $\alpha_2$ -Makroglobulins ist, wobei auch eine Beteiligung von Rezeptoren, die mit dem  $\alpha_2$ -Makroglobulin Rezeptor verwandt sind, für den Transportprozess des Insulins erwogen wurde [39].

### **2.8.2 Zielsetzung**

Das Ziel in dieser Studie war es zu überprüfen, ob eine Erhöhung des Transportes auch von IGF-1 durch den Einsatz einer konzentrierten bronchioalveolären Lavage bewirkt werden konnte. Es wurden Transportstudien mit IGF-1 durch Calu-3 Zellmonolayer durchgeführt. Dabei wurde die Permeation von IGF-1 mit einer konzentrierten humanen Lavage in der Donorlösung verglichen mit einer Donorlösung, die fötales bovines Serum (FBS) enthielt (Vollmedium). Um gezielt die höher molekularen Bestandteile in der Lavage zu erhalten, erfolgte zuvor eine Konzentrierung über Filter mit einem Cut Off von 50 kDa (siehe C2.7.2).

### **2.8.3 Durchführung der Transportversuche in bronchioalveolärer Lavage**

Die detaillierte Versuchsbeschreibung ist unter C2.7 zu finden. Höhermolekulare Bestandteile der bronchioalveolären Lavage (BAL) wurden, wie unter C2.7.2 beschrieben, in Zellkulturmedium ohne FBS mit einem finalen Konzentrationsfaktor von 6,7 eingesetzt (6,7x BAL). Die von Tensiden befreite IGF-1-Stammlösung (siehe C2.5.1) wurde in 6,7x BAL ( $27 \pm 15 \mu\text{g/mL}$ , Mittelwert mit Standardabweichung von  $n= 12$ ) (siehe D2.4.1) bzw. Vollmedium ( $29 \pm 15$ ,  $n= 14$ ) (siehe D2.4.2) zur Donorlösung verdünnt.

Nach Messung des TEER (siehe C2.4.1) wurden das apikale und basolaterale Medium aspiriert und das apikale mit 500 µL Donorlösung und das basolaterale mit 1,5 mL Vollmedium ersetzt. Die Transportversuche wurden unter Kulturbedingungen und Schütteln durchgeführt. Basolateral wurden Proben zwischen 60 und 150 min gewonnen. Im Anschluss an die Versuche erfolgte die Messung des TEER und eine Fluoreszein Permeation (siehe C2.4.2). Die Stabilität des IGF-1 in 6,7x BAL während der Versuche wurde überprüft, indem aus der Donorlösung in der apikalen Kammer vor Versuchsbeginn und nach Versuchsende eine Probe entnommen wurde (n= 4). Zusätzlich wurden Permeationen mit den Hemmstoffen Nocodazol und Dynasore in 6,7x BAL ( $57 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ , Mittelwert mit Standardabweichung von n= 5) (siehe D2.4.3.3) durchgeführt. Die Durchführung entsprach der der Versuche mit Vollmedium (siehe C2.6.3).

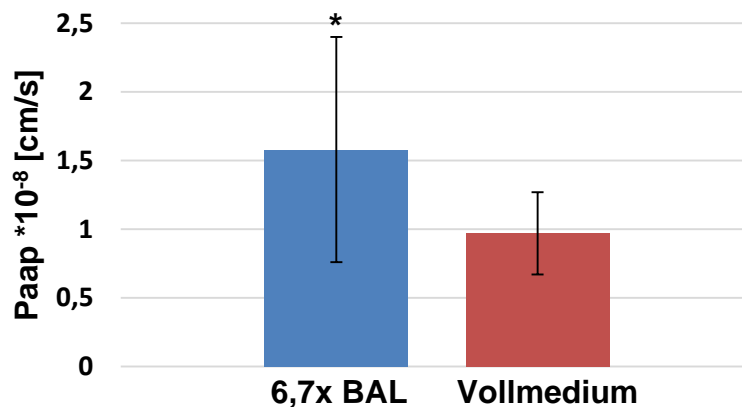
### **2.8.4 Ergebnisse**

#### **2.8.4.1 Stabilität von IGF-1 in der Donorlösung**

Die Konzentrationen von IGF-1 in der 6,7x BAL-Donorlösung vor und nach den Versuchen unterschieden sich nicht voneinander ( $p > 0.05$ , gepaarter Student T-Test, n= 4) (siehe D2.4.5). Somit war das IGF-1 über die Dauer der Versuche in 6,7x BAL stabil.

#### **2.8.4.2 Permeation von IGF-1 in bronchioalveolärer Lavage**

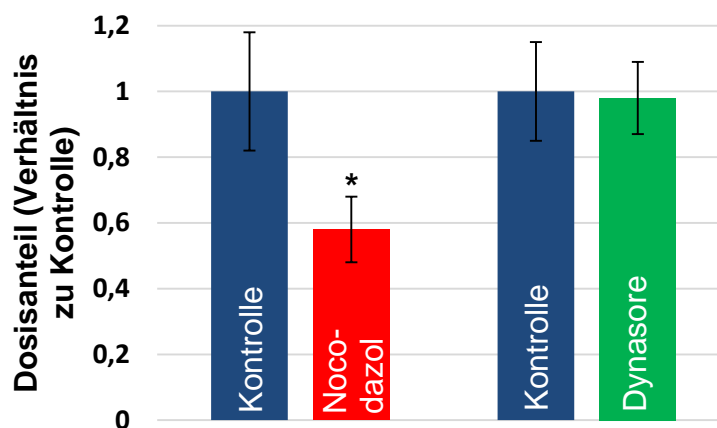
Der Einsatz der 6,7x BAL bewirkte eine 1,6fache Steigerung des Paap von IGF-1 im Vergleich zu IGF-1 im Vollmedium (siehe D2.4.1, D2.4.2) (siehe Abb. 15), und somit eine Erhöhung des Transportes von IGF-1 durch Calu-3 Zellen, mit signifikantem Unterschied zwischen den Paap ( $p < 0,05$ , ungepaarter Student T-Test).



**Abb. 15:** Permeationskoeffizienten von IGF-1 in 6,7x BAL als Donorlösung und IGF-1 in Vollmedium als Donorlösung; dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung von  $n=12$  von IGF-1 in 6,7x BAL und  $n=14$  von IGF-1 in Vollmedium.

\* Unterschied statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle (Vollmedium),  $p < 0,05$ .

Die Transportversuche in 6,7x BAL mit dem Hemmstoff Nocodazol ergaben eine statistisch signifikante ( $p < 0,05$ , ungepaarter Student T-Test) Reduktion des Transportes von IGF-1 mit einem permeierten Dosisanteil von  $0,58 \pm 0,1$  ( $n=10$ ) im Verhältnis zur Kontrolle, wenn die Kontrolle einen Wert von 1 hatte (siehe Abb.16) (siehe D2.4.3.1). Dynasore hatte keinen signifikanten Effekt auf den Transport von IGF-1 mit einem permeierten Dosisanteil von  $0,98 \pm 0,11$  ( $n=5$ ) (siehe Abb. 16) (siehe D2.4.3.2).



**Abb. 16:** Permeation von IGF-1 in 6,7x BAL durch Calu-3 Zellen mit Hemmsubstanzen der Transzytose/Endozytose; Dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung des jeweiligen permeierten Dosisanteils im Verhältnis zu Kontrolle von  $n=10$  für Nocodazol und  $n=5$  für Dynasore.

\* Unterschied statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle,  $p < 0,05$ .

### **2.8.4.3 Einfluss der bronchioalveolären Lavage auf die Tight Junctions**

Für die Monolayer der IGF-1 Permeation mit Vollmedium als Donormedium wurde eine Absenkung des TEER von  $73 \pm 8 \%$  (Mittelwert mit Standardabweichung von  $n= 14$ ) und für 6,7x BAL als Donormedium eine Verringerung von  $72 \pm 6 \%$  ( $n= 12$ ) (siehe D2.4.4.1), mit nicht signifikantem Unterschied zwischen den Werten ( $p > 0,05$ , ungepaarter Student T-Test), gemessen.

Das Fluoreszein permeierte im Anschluss an die Messung des TEER durch die Monolayer mit IGF-1 in Vollmedium als Donorlösung mit  $1,14 \pm 0,22 * 10^{-7} \text{ cm/sec}$  (Mittelwert mit Standardabweichung von  $n= 7$ ) (siehe D2.4.4.3) und durch die Monolayer mit IGF-1 in 6,7x BAL als Donormedium mit  $1,23 \pm 0,27 * 10^{-7} \text{ cm/sec}$  ( $n= 7$ ) (siehe D2.4.4.2). Die Werte unterschieden sich nicht signifikant voneinander ( $p > 0,05$ , ungepaarter Student T-Test).

### **2.8.5 Diskussion**

Der Einsatz einer humanen bronchioalveolären Lavage bewirkte eine signifikante Erhöhung des IGF-1 Transportes durch den Zellmonolayer der humanen Bronchialzelllinie Calu-3 um das 1,6fache im Vergleich zu Vollmedium. Die Annahme, dass der Transport von IGF-1 durch Einsatz der Lavage durch eine Erhöhung des transzytotischen Transportes und nicht durch Beeinflussung der Tight Junctions und somit den parazellulären Transport zustande kam, wurde dadurch unterstützt, dass zum einen zwischen der Absenkung des TEER und zum anderen für die durchgeführten Fluoreszeinpermeationen (parazellulärer Marker [145]) im Anschluss an die Versuche kein signifikanter Unterschied zwischen den Monolayern mit IGF-1 und Serum im Donormedium und denen mit IGF-1 und 6,7x BAL gefunden wurde. Da also kein erhöhter Einfluss auf die Tight Junctions durch die Lavage im Vergleich zum Vollmedium festgestellt wurde, kann man davon ausgehen, dass die Erhöhung des Transportes von IGF-1 durch Lungenepithelzellen durch den Einsatz der Lavage wahrscheinlich über die Beeinflussung der Transzytose zustande kam. Die Beobachtung, dass die Verringerung des Transportes von IGF-1 durch den Einsatz von Nocodazol (Hemmung der Transzytose) während der Versuche, die in 6,7x BAL durchgeführt wurden, höher war als die, die während der Versuche in Vollmedium

bewirkt wurde (siehe 2.6.4), ließ zusätzlich darauf schließen, dass die Lavage eine Erhöhung der IGF-1 Permeation durch eine Vergrößerung der Transzytose bewirkte. Bahhady et al. zeigten bereits, dass bronchiale Rattenlavage den parazellulären Transport von Insulin durch Rattenlungenepithelzellen nicht beeinflusste [39], was somit im Einklang mit den Untersuchungen in der vorliegenden Studie steht. Außerdem beobachteten Bahhady et al. eine gesteigerte Permeation von Insulin durch Rattenepithelzellen bei Koinkubation mit einer bronchialen Rattenlavage und vermuteten eine Erhöhung des transzytotischen Transportes [39]. Dieser Sachverhalt kann als Hinweis gesehen werden, dass in der vorliegenden Studie durch Inkubation mit humaner Lavage die Transzytose für das IGF-1 verstärkt wurde. Neben Zellbestandteilen und Phospholipiden beinhaltet eine humane bronchioalveoläre Lavage Proteine in großer Bandbreite, mit einem hohen Anteil an Albumin, Transferrin,  $\alpha_1$ -Antitrypsin und Immunglobulin A und B [5]. Auch  $\alpha_2$ -Makroglobulin wurde in humaner bronchioalveolärer Lavage gefunden [163]. Das  $\alpha_2$ -Makroglobulin ist ein 720 kDa großes Tetramer-Glykoprotein, das zu der Familie der  $\alpha$ -Makroglobuline gehört. Zu diesen zählen auch das  $\alpha_1$ -Makroglobulin, das Pregnancy-zone-Protein und Bestandteile des Komplementsystems (C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>) [164]. Das  $\alpha_2$ -Makroglobulin fungiert hauptsächlich als Inhibitor von Proteasen, daneben bindet es eine Vielzahl von Proteinen und ist an Regulation und Transportprozessen beteiligt [164]. Westwood et al. beobachteten eine Wirkerhöhung von IGF-1 auf Fibroblasten durch  $\alpha_2$ -Makroglobulin [165]. Als Ursache wurde unter anderem eine erhöhte Aufnahme von IGF-1 (als Komplex mit Insulin-like Growth Factor Binding Protein-1, IGFBP-1) in die Zellen durch das  $\alpha_2$ -Makroglobulin diskutiert [165]. Es ist bekannt, dass Komplexe mit  $\alpha_2$ -Makroglobulin durch Rezeptorvermittelte Endozytose in Zellen aufgenommen werden können [166]. Wachstumshormone beispielsweise, die an  $\alpha_2$ -Makroglobulin gebunden sind, werden über den  $\alpha_2$ -Makroglobulin-Rezeptor aus der Blutbahn entfernt [164]. Es wurde bereits gezeigt, dass IGF-1 an  $\alpha_2$ -Makroglobulin, isoliert aus Akut-Phase Plasma von Ratten, bindet [167]. Insofern wäre eine Beteiligung des  $\alpha_2$ -Makroglobulins an einer Erhöhung des Transportes des IGF-1 durch Calu-3 Zellen möglich. Bahhady et al. diskutierten als mögliche Ursache für die verstärkte Permeation von Insulin durch den Einsatz einer Rattenlavage die Beteiligung des Proteinase Inhibitors  $\alpha_1$ -Inhibitor-III, der ein Homolog von  $\alpha_2$ -Makroglobulin ist, und dessen Rezeptor [39]. Daher wäre es

denkbar, dass die erhöhte Aufnahme des IGF-1 in die Calu-3 Zellen durch in der Lavage enthaltenes  $\alpha_2$ -Makroglobulin bewirkt wurde. Allerdings muss beachtet werden, dass in der vorliegenden Studie der Transport von IGF-1 in Vollmedium (enthält FBS) als Donorlösung mit dem Transport in Medium, welches die Lavage enthielt, als Donorlösung verglichen wurde, und dass  $\alpha_2$ -Makroglobulin auch in FBS enthalten ist [168]. Die Erhöhung des Transportes von IGF-1 durch die Calu-3 Zellen durch den Einsatz einer Lavage im Vergleich zu Vollmedium könnte durch eine höhere Konzentration von  $\alpha_2$ -Makroglobulin in der Lavage im Vergleich zum Vollmedium (bzw. FBS) bewirkt worden sein.

Die Beobachtung, dass keine Verringerung der IGF-1 Permeation für die Versuche in 6,7x BAL mit Dynasore erzielt wurde, in Vollmedium allerdings eine signifikante (siehe 2.6.4), ließ darauf schließen, dass möglicherweise ein Mechanismus verstärkt wurde, der nicht von der Dynamin GTPase abhängig war, und somit womöglich ein anderer endozytischer Aufnahmeweg für IGF-1 als für die Versuche in Vollmedium angenommen werden muss (siehe 2.7). Das könnte bedeuten, dass verschiedene Transzytose/Endozytose Wege für das IGF-1 durch die Calu-3 Zellen, abhängig von den äußeren Faktoren, in Frage kommen. Um diesen Sachverhalt abschließend aufzuklären, wären weitere Transportstudien mit dem Einsatz einer Lavage und beispielsweise weiteren Hemmstoffen von Endozytosewegen nötig.

### **2.9 Zusammenfassung der in vitro Studien**

In der vorliegenden Studie konnten erfolgreich erstmals die Permeations- bzw. Transporteigenschaften des IGF-1 an der Bronchialkarzinomzelllinie Calu-3 charakterisiert werden. Das Permeationsverhalten des IGF-1 durch Calu-3 Zellen war vergleichbar mit dem des Insulins, was auf einen ähnlichen Transportmechanismus hindeutete. Der Transport von IGF-1 durch Calu-3 Zellmonolayer konnte durch den Einsatz eines Hemmstoffes der Transzytose (Nocodazol) gehemmt werden, daher war eine transzytotische Beteiligung, neben einem parazellulären Weg, für die Permeation wahrscheinlich. Außerdem konnten durch den Einsatz von Hemmstoffen verschiedener Endozytosewege Erkenntnisse über die zelluläre Aufnahme des IGF-1 in Calu-3 Zellen gewonnen werden. Diese Untersuchungen deuteten auf einen Clathrin-, Caveolae-, Makropinozytose- unabhängigen, Dynamin-abhängigen



Mechanismus hin. Dieser Weg wurde auch für das FITC-Insulin in die Rattenalveolarzelllinie RLE-6TN bereits vermutet [38].

Allerdings schienen, abhängig von den äußeren Faktoren, wie in dieser Studie die Beschaffenheit der Donormediums in der apikalen Kammer, verschiedene Endozytosemechanismen für IGF-1 in die Calu-3 Zellen in Frage zu kommen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Bestandteile in humaner bronchioalveolärer Lavage in der Lage sind, den Transport von IGF-1 durch das Lungenepithel zu erhöhen.

Zusammenfassend konnte ein Transportverhalten von IGF-1 durch Bronchialzellen ähnlich dem des Insulins beobachtet werden, wobei IGF-1 wahrscheinlich parazellulär und auch transzytotisch durch die Zellen transportiert, bzw. endozytotisch in die Zellen aufgenommen wurde. Zusätzlich wurde gezeigt, dass noch näher zu charakterisierende Faktoren in der humanen bronchioalveolären Lavage den Transport des IGF-1 durch die Calu-3 Zellen erhöhen.

### **3 Untersuchungen der pulmonalen Pharmakokinetik von IGF-1 mithilfe des humanen Lungenperfusionsmodells**

#### **3.1 Hintergrund**

Die pulmonale Applikation von IGF-1 als Arzneimittel könnte eine Alternative zur Injektion darstellen. IGF-1 existiert bereits als Arzneimittel zur Injektion in Form des rekombinanten IGF-1 (Mecasermin, Increlex<sup>®</sup>, Ipsen Pharma GmbH, Ettlingen), zugelassen für die Langzeitbehandlung von Wachstumsstörungen von Kindern und Jugendlichen (2-18 Jahre), die an einem schweren primären Mangel an IGF-1 leiden [129]. Die strukturelle Ähnlichkeit von IGF-1 und Insulin (50 %) [118] und die Möglichkeit für Insulin nach Inhalation eine systemische Verfügbarkeit zu erreichen, wie es für das Exubera<sup>®</sup> (Pfizer Inc., New York City, USA) [23] und für das Afrezza<sup>®</sup> (MannKind Corp., Valencia, USA) [27] belegt wurde, führten zu der Annahme, dass auch IGF-1 nach pulmonaler Applikation über das Lungenepithel in den systemischen Kreislauf gelangen kann. Für die vorliegende Studie wurde eine pulverförmige Formulierung des IGF-1 gewählt. Hierfür wurden zwei Substanzen als Trägerstoffe verwendet, zum einen das wasserlösliche Disaccharid Trehalose für eine sofortige Freisetzung des IGF-1, zum anderen wurde das Seidenprotein Fibroin als Trägersubstanz gewählt. In der Formulierung mit Fibroin wurden eine erhöhte Stabilität und ein verbesserter Schutz des IGF-1 ermöglicht. Außerdem sollte die Möglichkeit einer verzögerten Freisetzung von IGF-1 aus Fibroin nach pulmonaler Applikation untersucht werden. Fibroin wird in der Regel durch Extraktion aus Seide vom Seidenspinner (wie in der vorliegenden Studie) oder auch von der goldenen Seidenspinne gewonnen [169]. Neben der Fähigkeit von Formulierungen mit Fibroin Proteine zu stabilisieren bzw. zu schützen [170, 171], ist das Fibroin biologisch verträglich [172, 173] und langfristig biologisch abbaubar [174]. Stabilisierende Eigenschaften von Formulierungen mit Fibroin konnten belegt werden für exemplarisch den Mumps Masern Röteln Lebendimpfstoff [175], Horseradish Peroxidase [176], Glucoseoxidase [177] und für viele andere Substanzen [171]. Fibroin wurde bereits in unterschiedlichen Darreichungsformen, wie zum Beispiel als Film, Mikropartikel, Tablette, Sphäre, Matrix und Hydrogel formuliert [169, 178]. Kontrollierte Freisetzungen konnten beispielsweise für kleine Moleküle wie

Salicylsäure, Propranolol [179], Theophyllin [180], Naproxen [181], und für große Moleküle wie exemplarisch der Nervenwachstumsfaktor [182] und auch IGF-1 [179, 183] erreicht werden. Die kontrollierte Abgabe von IGF-1 aus den für die pulmonale Applikation in den ex vivo Versuchen verwendeten Fibroinpartikeln konnte in vorausgegangenen in vitro Versuchen mit einem Maximum nach 3 h belegt werden [184].

### **3.2 Zielsetzung**

Das Ziel der durchgeführten Versuche mit dem Lungenperfusionsmodell war es, das pulmonale Absorptionsverhalten von IGF-1, gebunden an Trehalose oder Fibroin, zu studieren, bzw. sollte überprüft werden, ob das IGF-1 nach pulmonaler Applikation systemisch verfügbar sein könnte. Die wasserlösliche Trehalose diene als schnell freisetzender Trägerstoff für das IGF-1, das Fibroin wurde als Trägerstoff für eine verzögerte Abgabe genutzt. Außerdem sollte untersucht werden, ob entsprechend der Freisetzungskinetik in vitro [184] das IGF-1 auch im Lungenperfusionsmodell kontrolliert aus Fibroinpartikeln freigesetzt wird, bzw. ob ein Unterschied in der pulmonalen Absorptionskinetik von IGF-1, gebunden an Fibroin, im Vergleich zu IGF-1, gebunden an Trehalose, beobachtet werden konnte.

Insgesamt wurden sechs Perfusionen durchgeführt. In drei Perfusionen wurden IGF-1/Trehalose-Partikel verabreicht, und in den anderen drei Versuchen wurden IGF-1/Fibroin-Partikel appliziert.

### **3.3 Durchführung der Lungenperfusionsversuche mit IGF-1**

Für die Versuche wurden Lungenlappen oder Lungenflügel von humanen Spendern, die sich einer Lobektomie, Bilobektomie, oder Pneumonektomie unterziehen mussten, eingesetzt (siehe C1.1.3, C1.6.1).

Die IGF-1/Trehalose Mikropartikel waren charakterisiert durch einen medianen Massendurchmesser (MMD) von 3,1  $\mu\text{m}$  und einen Massenanteil unter einem Durchmesser von 5  $\mu\text{m}$  von 64,1 % [184]. Die mit IGF-1 beladenen Fibroinpartikel hatten einen MMD von 3,4  $\mu\text{m}$  und einen Massenanteil unter einem Durchmesser von 5  $\mu\text{m}$  von 41,3 % inne [184]. Der inhalierbare Bereich von 2 – 5  $\mu\text{m}$  Teilchendurchmesser wurde somit eingehalten [112]. Die Applikation der

Mikropartikel erfolgte mithilfe des Dry Powder Insufflator™ Model DP-4M in Kombination mit der Air Pump Model AP-1 (Penn-Century. Inc. Wyndmoor, PA, USA). Proben wurden während der Applikation und anschließend zwischen 0 – 80 min aus dem venösen Ausgang entnommen und mit frischem Puffer ersetzt (siehe C1.6.5). Die tatsächlich applizierte Dosis konnte durch Bestimmen der an den Verbindungsstücken und in dem Dry Powder Insufflator™ haftenden Menge IGF-1 berechnet werden (siehe C1.6.6).

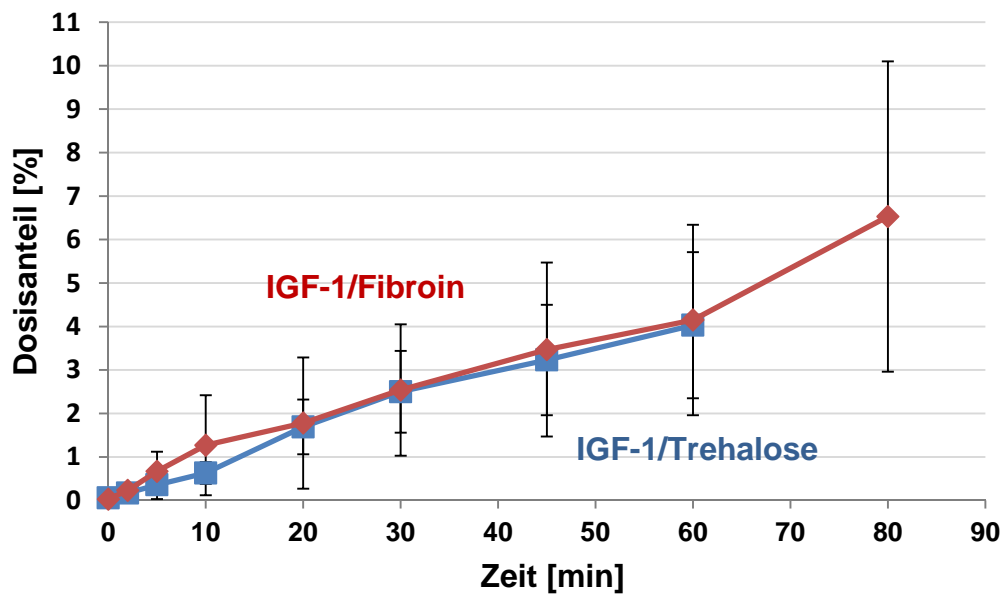
### **3.4 Durchführung der Stabilitätsuntersuchung von IGF-1 in Perfusionsflüssigkeit**

Die Stabilität von IGF-1 über die Dauer der Versuche in Perfusionsflüssigkeit wurde untersucht, indem mit IGF-1 versetzte Leerproben aus den Perfusionsversuchen (n= 4) über 90 min bei 37 °C inkubiert und die Konzentration von IGF-1 anschließend mit einer Kontrolle verglichen wurde, die nicht inkubiert wurde (siehe C1.6.7).

### **3.5 Ergebnisse**

#### **3.5.1 Pulmonale Absorption von IGF-1 im Lungenperfusionsmodell**

In den Versuchen mit IGF-1/Trehalose-Partikeln wurde eine Dosis von  $541 \pm 137 \mu\text{g}$  (Mittelwert mit mittlerer Abweichung vom Mittelwert von n= 3) des IGF-1 in die Lungenlappen verabreicht, mit einer Depositionsrate von  $96 \pm 2 \%$  (Mittelwert mit mittlerer Abweichung vom Mittelwert) (siehe D3.1). Somit wurden  $4 \pm 3 \%$  des IGF-1 an den Verbindungsstücken zwischen dem Bronchus und dem Beatmungsgerät adsorbiert. Das IGF-1 wurde im Mittel bereits während der Applikation (53 sec, Mittelwert von n= 3) pulmonal absorbiert mit  $0,02 \pm 0,02 \%$  der applizierten Dosis (Mittelwert mit mittlerer Abweichung vom Mittelwert von n= 3). Anschließend verlief die Verteilungskurve nahezu linear in den folgenden 60 min, mit  $4,03 \pm 1,68 \%$  nach 60 min (siehe Abb. 17) (siehe D3.2).



**Abb. 17:** Verteilungskurven von IGF-1 in die Perfusionsflüssigkeit nach pulmonaler Applikation von IGF-1, gebunden an Trehalose und Fibroin; dargestellt als Mittelwert mit mittlerer Abweichung vom Mittelwert des pulmonal absorbierten Dosisanteils von  $n=3$ .

Basierend auf einer linearen Regression wurde das IGF-1 mit einer Steigung von  $0,07 \text{ \%/min}$  ( $R^2=0,99$ ) pulmonal absorbiert.

In den Versuchen mit IGF-1/Fibroin-Partikeln wurde eine Dosis von  $191 \pm 4 \mu\text{g}$  (Mittelwert mit mittlerer Abweichung vom Mittelwert von  $n=3$ ) mit einer Depositionsrate von  $99 \pm 1 \%$  (Mittelwert mit mittlerer Abweichung vom Mittelwert) appliziert (siehe D3.1). Daraus ergibt sich, dass  $1 \pm 1 \%$  des IGF-1 an den Verbindungsstücken zwischen dem Bronchus und dem Beatmungsgerät haften blieb. Es wurden bereits während der Verabreichung (44 sec, Mittelwert von  $n=3$ ) im Mittel  $0,02 \pm 0,03 \%$  (Mittelwert mit mittlerer Abweichung von  $n=3$ ) des IGF-1 pulmonal absorbiert. Anschließend verlief die Verteilungskurve nahezu linear, mit  $4,15 \pm 2,19 \%$  nach 60 min und  $6,53 \pm 3,57 \%$  nach 80 min (siehe Abb. 17) (siehe D3.3), und einer Steigung, basierend auf einer linearen Regression ( $R^2=0,99$ ) zwischen dem Zeitpunkt der Applikation und 60 min, von  $0,08 \text{ \%/min}$ .

Der Dosisanteil von IGF-1, der nach Applikation von IGF-1/Trehalose-Partikeln pulmonal absorbiert wurde, unterschied sich zu keinem Zeitpunkt (Applikation – 60 min) signifikant von dem nach Applikation von IGF-1/Fibroin-Partikeln ( $p > 0,05$ , Anova mit Post-Hoc Tukey's Test).

### **3.5.2 Stabilität von IGF-1 in der Perfusionsflüssigkeit**

Der Mittelwert der Konzentration von IGF-1 in der Perfusionsflüssigkeit nach Inkubation von 90 min (n= 4) bei 37 °C unterschied sich nicht signifikant ( $p > 0,05$ , Student T-Test) vom Mittelwert der Konzentration der Kontrolle ohne Inkubation (n= 4) (siehe D3.4). Somit war das IGF-1 stabil über die Dauer der Perfusionsversuche.

## **3.6 Freisetzung von IGF-1 aus Fibroinpartikeln in humaner bronchioalveolärer Lavage**

### **3.6.1 Hintergrund**

Die Untersuchung der pulmonalen Absorption von IGF-1, gebunden an Fibroin bzw. gebunden an Trehalose, mithilfe des Lungenperfusionmodells ergab einen nahezu deckungsgleichen Verlauf der Verteilungskurven von IGF-1/Trehalose im Vergleich zu IGF-1/Fibroin (siehe Abb. 17). Aufgrund der verzögerten Freisetzung des IGF-1 aus Fibroinpartikeln in vorausgegangenen in vitro Versuchen, in denen das IGF-1 innerhalb von 3 h aus den Fibroinpartikeln abgegeben wurde [184], wurde eine entsprechende Freisetzungskinetik des IGF-1 aus Fibroin auch im Lungenperfusionmodell im Vergleich zu Trehalose als Trägerstoff erwartet. Daher sollte untersucht werden, ob die komplexe Zusammensetzung der Bronchialflüssigkeit bzw. einer bronchioalveolären Lavage eventuell die Abgabe des IGF-1 aus Fibroinpartikeln beeinflussen konnte. Neben Zellbestandteilen (in dieser Studie im Voraus von der Lavage getrennt), wie beispielsweise Makrophagen, Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, in manchen Fällen auch Plasmazellen, enthält eine bronchioalveoläre Lavage Phospholipide, die den Hauptbestandteil des Surfactants bilden, und eine weite Bandbreite an Proteinen [5]. Es wurde bereits gezeigt, dass das Surfactant einen positiven Effekt auf die Löslichkeit und das Auflösungsverhalten von Substanzen haben kann [185, 186]. Insofern wäre es denkbar, dass auch in der vorliegenden Studie das Surfactant der Lungenlappen die Löslichkeit der Trägermaterialien bzw. die Freisetzung des IGF-1 beeinflusst hat.

### **3.6.2 Zielsetzung**

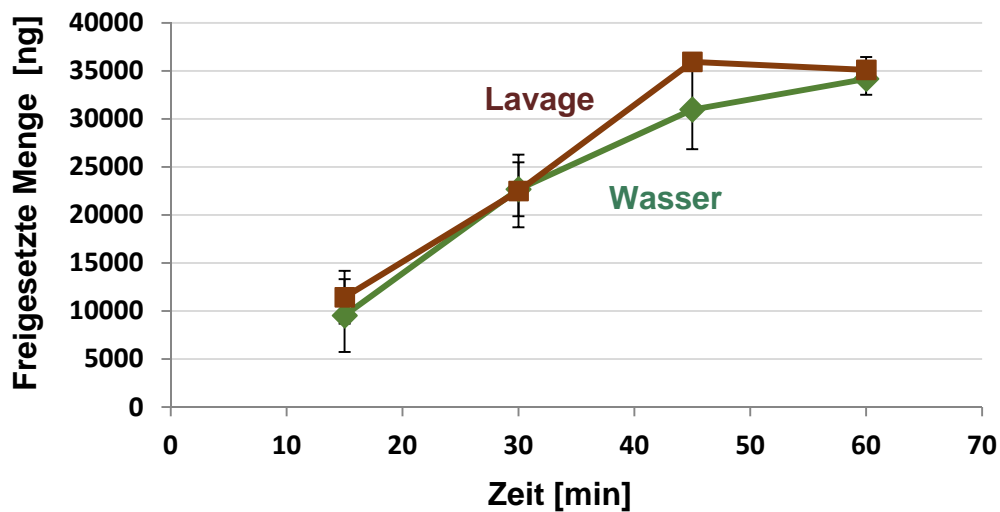
Das Ziel war es die Freisetzung von IGF-1, gebunden an Fibroin, in bronchioalveolärer Lavage im Vergleich zu Wasser zu untersuchen. Es sollte hierbei überprüft werden, ob die Lavage eine beschleunigte Abgabe des IGF-1 im Vergleich zu Wasser bewirken konnte. Hierfür wurden drei Freisetzungsversuche in Wasser und drei in bronchioalveolärer Lavage durchgeführt.

### **3.6.3 Durchführung der Freisetzungsversuche von IGF-1 aus Fibroinpartikeln in bronchioalveolärer Lavage**

Die detaillierte Versuchsdurchführung ist unter C1.7 beschrieben. Es wurden jeweils drei Freisetzungen in Millipore® Wasser und in bronchioalveolärer Lavage durchgeführt. Dafür wurden IGF-1/Fibroin-Partikel in dem jeweiligen Freisetzungsmedium für 1 h inkubiert. In dieser Zeit wurden pro Ansatz zu vier Zeitpunkten Proben gewonnen.

### **3.6.4 Ergebnisse**

Aus den Fibroinpartikeln wurden innerhalb von 15 min  $11433 \pm 2745$  ng (Mittelwert mit mittlerer Abweichung vom Mittelwert von  $n=3$ , normiert auf eine Einwaage von 1 mg Pulver) IGF-1 in die Lavage und  $9528 \pm 3789$  ng ( $n=3$ ) IGF-1 in das Wasser abgegeben. Anschließend verliefen beide Freisetzungskurven nahezu deckungsgleich mit nachlassender Steigung ab 45 min bis 60 min mit  $32103 \pm 1348$  ng in Lavage und  $34176 \pm 1654$  ng in Wasser (siehe Abb. 18) (siehe D3.5).



**Abb. 18:** Freigesetzte Menge an IGF-1 aus Fibroinpartikeln in Wasser bzw. bronchioalveolären Lavage über die Zeit; dargestellt als Mittelwert mit mittlerer Abweichung vom Mittelwert von  $n=3$ , normiert auf eine Einwaage von 1 mg Pulver.

Die Menge an IGF-1, die über die Zeit (15 – 60 min) aus den Fibroinpartikeln in bronchioalveoläre Lavage abgegeben wurde, unterschied sich zu keinem Zeitpunkt signifikant ( $p > 0,05$ , Anova mit Post-Hoc Tukey's Test) von der Menge, die in Wasser freigesetzt wurde.

### 3.7 Diskussion

Die Perfusionsversuche, durchgeführt am Lungenperfusionsmodell, in denen IGF-1/Trehalose-Partikel appliziert wurden, zeigten, dass eine systemische Verfügbarkeit nach pulmonaler Verabreichung von IGF-1 möglich sein könnte. Im Mittel war bereits während der Applikation IGF-1 messbar in die Perfusionsflüssigkeit verteilt und wurde anschließend nahezu linear pulmonal absorbiert. Humane Studien, die mit inhalativem Insulin durchgeführt wurden, zeigten einen ähnlichen linearen Verlauf der Verteilungskurven nach Inhalation bis zum Erreichen des jeweiligen  $T_{\max}$  [23, 27, 187]. Somit war das lineare Absorptionsverhalten des IGF-1 im Lungenperfusionsmodell vergleichbar mit dem von inhalativem Insulin in humanen Studien. In den mit Calu-3 Zellen durchgeführten Transportstudien konnte ebenso ein vergleichbares Permeationsverhalten von IGF-1 und Insulin beobachtet werden (siehe 2.5). Zum einen lässt sich aus dem ähnlichen Absorptionsverhalten von IGF-1 in den ex vivo Versuchen verglichen mit den humanen Studien von Insulin und dem



vergleichbaren in vitro Permeationsverhalten von Insulin und IGF-1 schließen, dass IGF-1 nicht nur in vitro (siehe 2.5), sondern auch am komplexen Organ eine ähnliche pulmonale Kinetik wie das Insulin besitzt und daher wahrscheinlich auch über einen vergleichbaren Transportmechanismus aufgenommen wird (detaillierte Diskussion des Mechanismus siehe 2.7, 2.8.5). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass IGF-1 nach pulmonaler Applikation (IGF-1/Trehalose) ebenso wie Insulin systemisch verfügbar ist. Das bedeutet, dass die Inhalation von IGF-1 eine vielversprechende und schmerzfreie Alternative zu einer Injektion darstellen könnte. Außerdem scheint die Formulierung von IGF-1, gebunden an Trehalose, für eine pulmonale Applikation von IGF-1 geeignet zu sein.

Interessanterweise wurde das IGF-1, gebunden an Trehalose, nahezu identisch im Vergleich zu IGF-1, gebunden an Fibroin, pulmonal absorbiert. Die Unterschiede des in die Perfusionsflüssigkeit verteilten Dosisanteils von IGF-1 zwischen beiden Pulvern war zu keinem Zeitpunkt (Applikation – 60 min) statistisch signifikant verschieden, bzw. waren die Verläufe der Verteilungskurven nahezu deckungsgleich. In mit den Fibroinpartikeln durchgeführten in vitro Versuchen konnte eine kontrollierte Freisetzung des IGF-1 aus Fibroin beobachtet werden [184], daher wurde eine entsprechende verzögerte pulmonale Absorption von IGF-1, gebunden an Fibroin, auch ex vivo am Lungenperfusionsmodell erwartet. Es wurde spekuliert, dass für eine Beschleunigung der Abgabe von IGF-1 aus Fibroinpartikeln eventuell Komponenten der Bronchialflüssigkeit verantwortlich waren. Die bronchioalveoläre Lavage ist durch eine komplexe Zusammensetzung charakterisiert, mit Zellbestandteilen und einer großen Bandbreite an Proteinen und Phospholipiden (Hauptbestandteil des Surfactant) [5]. Beispielsweise beobachteten Wiedmann et al. einen positiven Einfluss von Surfactant auf die Löslichkeit von Glukokortikoiden [186]. Pham et al. zeigten, dass Surfactant die Auflösungsrate von Budesonid-Aerosolpartikeln verstärken konnte [185]. Daher wurde das Surfactant als mögliche Ursache für eine beschleunigte Freisetzung von IGF-1 aus Fibroinpartikeln in der vorliegenden ex vivo Studie in Betracht gezogen. Diese Annahme konnte allerdings in in vitro Versuchen nicht bestätigt werden, in denen kein signifikanter Unterschied im Freisetzungsverhalten von IGF-1 aus Fibroinpartikeln in bronchioalveolärer Lavage im Vergleich zu Wasser beobachtet wurde (siehe 3.6). Trotzdem kann die Bronchialflüssigkeit bzw. das Surfactant nicht vollständig als Ursache für das gleiche

pulmonale Absorptionsverhalten des IGF-1/Fibroins im Vergleich zu IGF-1/Trehalose ausgeschlossen werden, da eine bronchioalveoläre Lavage bis zu 130fach verdünnt im Vergleich zur Bronchialflüssigkeit sein kann [188]. Obwohl in der vorliegenden Studie die Lavage vor Verwendung konzentriert wurde (siehe C1.7.2), können Konzentrationsunterschiede der enthaltenen Bestandteile in der Lavage im Vergleich zur Bronchialflüssigkeit vorhanden gewesen sein. Außerdem könnten auch Zellbestandteile in der Bronchialflüssigkeit, die in der Lavage in der vorliegenden Studie nicht mehr enthalten waren, eine Rolle gespielt haben. Auch die große Oberfläche der Lunge (Alveolarregion ca. 100 m<sup>2</sup> [1]) bzw. der verwendeten Lungenlappen in Verbindung mit einem sehr kleinen Flüssigkeitsvolumen (10 - 20 mL, [29]) war möglicherweise Grund dafür, dass das unterschiedliche Auflösungs- und Freisetzungsverhalten in vitro von Trehalose im Vergleich zu Fibroin für die Höhe der pulmonalen Absorption von IGF-1 ex vivo keinen entscheidenden Faktor mehr darstellte.

Neben der Möglichkeit Substanzen kontrolliert freizusetzen, besitzt Fibroin weitere Eigenschaften, beispielsweise die, Substanzen, einschließlich Proteine und Peptide, zu stabilisieren [170, 171]. Bereits während der Herstellung und Lagerung von Partikeln können Peptide und Proteine denaturieren, außerdem droht nach pulmonaler Applikation ein rascher enzymatischer Abbau [189], wodurch ein Wirkverlust entstehen würde. Daher ist die Stabilisierung von peptidischen Arzneistoffen von besonderem Interesse und eine wichtige Eigenschaft des Fibroins. Somit stellt Fibroin ein biologisch verträgliches, abbaubares und ein für die pulmonale Applikation von IGF-1 geeignetes Trägermaterial dar, mit der Möglichkeit, das IGF-1 zu schützen und gleichzeitig eine vergleichbare pulmonale Absorptionskinetik wie schnell auflösende Substanzen zu besitzen.

Die pharmakokinetische Untersuchung des pulmonal applizierten IGF-1 mithilfe des Lungenperforationsmodells war limitiert durch die relativ kurze Versuchsdauer (60 - 80 min), wodurch nur der lineare Bereich der Verteilungskurven studiert werden konnte. Allerdings konnten trotz der relativen kurzen Versuchsdauer erfolgreich initiale pulmonale Absorptionsvorgänge des IGF-1 untersucht werden.

### 3.8 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine systemische Verfügbarkeit von IGF-1 nach pulmonaler Applikation von IGF-1, gebunden an unterschiedliche Trägermaterialien, zu erwarten ist. Somit wäre es denkbar IGF-1 als Arzneimittel für Krankheiten wie Sarkopenie und Kachexie pulmonal anstatt als Injektion zu verabreichen. Als Trägermaterial wären sowohl die Trehalose sowie das Fibroin für eine pulmonale Applikation des IGF-1 geeignet. Interessanterweise wirkte sich das verzögerte Freisetzungsverhalten in vitro der Trägersubstanz Fibroin nicht auf das Ausmaß der pulmonalen Absorption ex vivo von IGF-1 im Vergleich zu der Formulierung von IGF-1/Trehalose aus. Das betont die Wichtigkeit, die Pharmakokinetik von pulmonal applizierten Substanzen am intakten Organ mit erhaltener Komplexität und Funktionalität zu untersuchen, wobei sich das humane Lungenperusionsmodell als eine geeignete Methode anbietet. Darüber hinaus konnte erfolgreich erstmals gezeigt werden, dass das humane Lungenperusionsmodell für ex vivo Untersuchungen der pulmonalen Absorption von höhermolekularen Substanzen und Pulverformulierungen geeignet ist. In unserem Arbeitskreis wurden in vorangegangenen Studien ausschließlich kleine Moleküle wie Glukokortikoide und Sympathomimetika untersucht, die als vernebelte Lösung bzw. als Aerosol appliziert wurden [83, 84]. Somit kann das humane Lungenperusionsmodell verwendet werden um pharmakokinetische Daten über niedermolekulare sowie höhermolekulare Substanzen zu sammeln, die in unterschiedlichen Formulierungen, einschließlich als Pulver, appliziert werden können.



## **C Experimenteller Teil**

---



# **1 Untersuchung der pulmonalen Pharmakokinetik von Salmeterol und IGF-1 mithilfe des humanen Lungenperfusionsmodells**

## **1.1 Reagenzien, Geräte und Materialien**

### **1.1.1 Substanzen**

Salmeterolxinafoat wurde von GlaxoSmithKline (Greenford, England) zur Verfügung gestellt. Formoterolfumarat Dihydrat (interner Standard), L-Carnitinchlorid, Ameisensäure 50 %, und Acetonitril (Chromasolv<sup>®</sup> gradient grade, für HPLC) wurde von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) erworben. Bovines Serum Albumin (BSA, Type H1) wurde von GERBU Biotechnim GmbH (Heidelberg, Deutschland) und Heparin-Natrium-5000-ratiopharm<sup>®</sup> (Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) von einer lokalen Apotheke bezogen. Die Lösung mit Penicillin G (10000 IU/mL) und Streptomycin (10000 µg/mL) in isotoner Kochsalzlösung (Pen/Strep) wurde von Biochrom AG (Berlin, Germany) bezogen. Von der hauseigenen Demineralisierungsanlage Milli-Q<sup>®</sup>-Synthesis von Millipore (Schwalbach, Deutschland) wurde das Wasser zur Herstellung des Perfusionspuffers und der Applikationslösungen entnommen. Methanol (Baker, Mallinckrodt, LC-MS analyzed), Diethylether und Wasser (für HPLC, LC – MS grade), verwendet für analytische Vorgänge, wurde von VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland) erworben. Alle weiteren Chemikalien (p.a. Qualität) wurden aus der institutseigenen Chemikalienausgabe bezogen.

### 1.1.2 Perfusionspuffer

Die Zusammensetzung des Perfusionspuffers ist angelehnt an Gnadt et al. [84] mit den folgenden Bestandteilen:

BSA	5 % (m/V)
Calciumchlorid	3,5 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	2,5 mM
Magnesiumsulfat	1,18 mM
Natriumchlorid	85 mM
Glucose	5,5 mM
Pen/Strep	10000 IU/10000 µg/L
Heparin-Na	2500 IE/L
Natriumhydrogencarbonat	20 mM

50 g BSA und die Salze wurden in 800 mL Millipore® Wasser unter Rühren gelöst. Anschließend wurden Pen/Strep und das Heparin dazugegeben, der pH-Wert mithilfe einer 10 % (m/v) Natriumhydrogencarbonatlösung auf 7,4 eingestellt und der Puffer mit Millipore® Wasser auf 1000 mL aufgefüllt. Die Herstellung erfolgte bis zu drei Tage vor Versuchsdurchführung mit anschließender Lagerung bei 2 – 8 °C.

### 1.1.3 Humanes Gewebe

Die Perfusionsversuche wurden mit Lungenlappen oder Lungenflügeln durchgeführt wie zuvor beschrieben [84]. Das Spendermaterial stammte von Patienten, die sich einer Lobektomie, Bilobektomie oder Pneumonektomie, meist aufgrund eines Bronchialkarzinoms, unterziehen mussten. In der Studie, in der Salmeterol untersucht wurde, erhielt keiner der Patienten oral oder pulmonal applizierte  $\beta_2$ -Agonisten eine Woche vor der Operation. Patienten mit systemischen oder pulmonalen Infektionen wurden aus der Studie ausgeschlossen und ausschließlich Patienten ohne vorherige neoadjuvante Therapie eingeschlossen. Nach Beendigung der Versuche wurde das Material in die Pathologie zur Routineuntersuchung gegeben. Die Operationen wurden im Thoraxzentrum Bezirk Unterfranken, MÜNCHEN, Deutschland, durchgeführt. Die Patienten wurden aufgeklärt gemäß der



„Declaration of Helsinki“ [144] und die Einverständniserklärungen der Patienten lagen vor. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg, Deutschland, genehmigt.

### 1.1.4 Sonstige Geräte und Materialien

Analysenwaage	Mettler Toledo AB204 – S/PH (Mettler Toledo GmbH, Gießen)
Präzisionswaage	Mettler P1200, 0,1 – 1200, 10 mg minimale Wägedifferenz (Mettler Toledo GmbH)
pH-Meter	Mettler Toledo FiveGo™ (Mettler Toledo GmbH)
Pumpen	MCP Pumpsystem mit MCP/MVP Pro-280 Pumpenkopf (Ismatec, IDEX Health & Science GmbH, Wertheim) Ecoline VC-280 II (Ismatec, IDEX Health & Science GmbH)
Beatmungsgerät	Evita 4 (Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck,)
Oxygenator	Jostra Quadrox® Adult (Maquet Cardiopulmonary AG, Hirrlingen)
Bronchus – Schlauch	Silikon-Schlauch, Innendurchmesser 8 mm, Wanddicke 2 mm (WITEG Labortechnik GmbH, Wertheim) Schlauchleitungen Tygon® St Standard Typ C; Innendurchmesser 6,4 mm, Wanddicke 1,6 mm (Ismatec, IDEX Health & Science GmbH)
Schlauchverbinder	Schlauchverbinder für Schlauch mit Innendurchmesser 6 – 8 mm, beidseitig; Lur/Lock Kopplung für Innendurchmesser 6 mm (neoLab Migge Laborbedarfs-Vertriebs GmbH, Heidelberg)

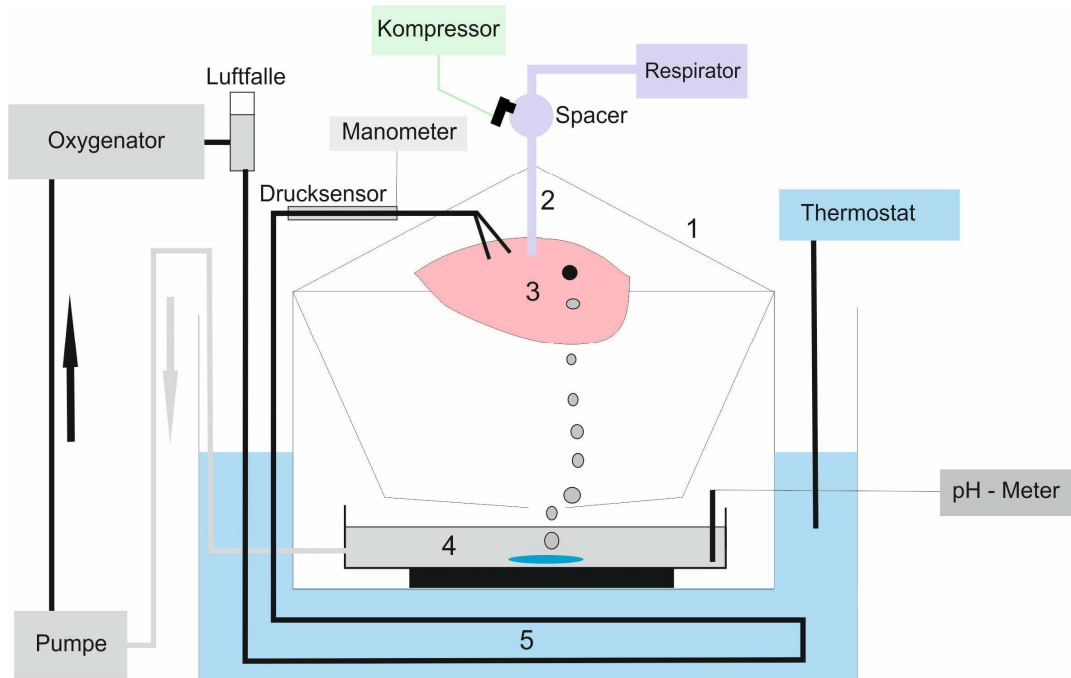
Drucksensor	Druckmesswandler zur invasiven Blutdruckmessung (Codan pvb Medical GmbH, Lehnsan)
Manometer	Multiparameter Monitor, Siemens SC 9000, Software Version VE3 (Siemens AG, München)
Vernebler	Pari Boy <sup>®</sup> SX Kompressor, Pari LC <sup>®</sup> Unterbrecher, Pari LC Sprint Star <sup>®</sup> Vernebler, Pari LC Sprint <sup>®</sup> Vernebler (Pari GmbH, Starnberg)
Nahtmaterial	Prolene <sup>®</sup> Nahtmaterial (Ethicon GmbH & Co. KG, Norderstedt)
Katheter	Typ Nelaton (B. Braun Melsungen AG, Melsungen)
Magnetrührer	Variomag Electronic Rührer Mono (H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim)
Magnetrührstäbchen	zylindrisch, PTFE ummantelter Magnetkern, 60 mm Länge, 10 mm Durchmesser (A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Serologische Pipette	Einmal-Pipette 10 ml, wattiert, einzeln steril verpackt, (Sarstedt AG & Co., Nürnberg)
Mikroliterpipette 20 – 100 µL	Eppendorf Research <sup>®</sup> , 20 – 200 µL, variabel (Eppendorf AG, Hamburg)
Mikroliterpipette 100 – 1000 µL	Eppendorf Research <sup>®</sup> 100 – 1000 µL, variabel (Eppendorf AG)
Transferpipette 500 – 5000 µL	Transferpipette <sup>®</sup> electronic (Brand GmbH + CO KG), Wertheim)
Röhre 15 mL	Schraubröhre 15 mL, Spitzboden, aus Polypropylen, mit Schraubverschluss, steril 120 x 17 mm (Sarstedt AG & Co.)
Röhre 50 mL	Schraubröhre 50 ml, aus Polypropylen, mit Schraubverschluss, steril, 115 x 28 mm (Sarstedt AG & Co.)
Skalpell	Einmal-Skalpell, mit Kunststoffgriff, steril (A. Hartenstein GmbH)

LS-Verbinder	LS 4 Verbindungsstück für die Simultaninfusion, steril (Sarstedt AG & Co.)
Spitzkolben	Spitzkolben mit Normschliff NS 14/23, 5 ml, (Witeg Labortechnik GmbH)
Thermostat	Model Fiscons DC3 (Thermohaake GmbH, Karlsruhe)
Zentrifugen	Centrifuge 5702 max. 2750 x g (4400 Upm), Winkelarbeitskopf 30 x 15 mL (Eppendorf AG) Microfuge 22R Centrifuge (Beckman Coulter GmbH, Krefeld)
Reagiergefäße	1,5 mL, mit konischem Boden und anhängendem Deckel; 2 mL, Safeseal Reagiergefäß mit anhängendem Deckel (Sarstedt AG & Co.)
Mikro – Schraubröhre 2 mL	2 mL, aus Polypropylen, steril (Sarstedt AG & Co.)
Mischrad	Ø 360 mm, Antrieb Heidolph, Typ 5011 RZR1 (Eigenkonstruktion Institutswerkstatt und Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach)

---

### 1.1.5 Aufbau des Lungenperfusionsmodells

Der Aufbau des Lungenperfusionsmodells war abgeleitet von Gnadet et al. [84], und ist schematisch für die Applikation von flüssigen Darreichungsformen in Abb. 19 dargestellt.



**Abb. 19:** Schematische Darstellung des Lungenperfusionsmodells; 1: Metallkasten mit Plexiglasdeckel; 2: Silikonschlauch vernäht mit dem Bronchus; 3: Lungenlappen mit katheterisierten Arterien und geöffnetem venösen Ausgang, aus dem die Perfusionsflüssigkeit fließt; 4: Reservoir mit Perfusionsflüssigkeit und Rührstäbchen auf einem Magnetrührer gelagert; 5: Wasserbad auf 37 °C temperiert, mit Glasspirale. Nach Gnadt [94].

Der Lungenlappen wurde mithilfe eines halb offenen Systems reperfundiert. Die arteriellen Gefäße wurden mit einer Pumpe verbunden, über die der Perfusionspuffer in den Lungenlappen gepumpt wurde und am venösen Ausgang wieder austrat. Der Puffer tropfte anschließend in ein Reservoir, wurde dort mithilfe eines Magnetrührers gerührt und weiter in den Oxygenator gepumpt. Anschließend gelangte der Puffer über eine Luftfalle in eine Glasspirale, die sich in einem auf 37 °C temperierten Wasserbad befand. Der Puffer passierte anschließend einen Drucksensor und erreichte wieder die kanalisierten arteriellen Gefäße.

Der Lungenlappen wurde in einem Metallkasten untergebracht, der, um den Lungenlappen vor Austrocknung zu schützen, mit einem Plexiglasdeckel verschlossen werden konnte. Der Perfusionsfluss an der Pumpe wurde so gewählt, dass ein physiologischer Druck von idealerweise 20 – 40 mmHg gewährleistet war. Der pH-Wert der Perfusionsflüssigkeit konnte mithilfe eines pH-Meters gemessen werden und wurde entweder mit Kohlendioxid über den Oxygenator, einer 0,5

molaren Salzsäurelösung oder mit einer 10 % (m/v) Natriumhydrogencarbonatlösung, die in das Reservoir getropft wurden, angepasst. Für den Fall der Verneblung einer flüssigen Applikationslösung (siehe 1.3.4) wurde der Bronchus des Lungenlappens über einen Glasspacer (Nettovolumen von 100 mL [84]) mit einem handelsüblichen Beatmungsgerät verbunden (Evita 4). Für die Applikation von Pulvern (siehe 1.6.4) wurde kein Glasspacer verwendet, sondern der Bronchus über einen Silikonschlauch direkt mit dem Beatmungsgerät verbunden. Als Beatmungsmodus wurde Biphasic Positive Airway Pressure (BIPAP) gewählt. Hiermit konnten ein konstanter maximaler Inspirationsdruck und, abhängig von der Größe des Lappens, unterschiedliche Beatmungsvolumina gewährleistet werden, wodurch wiederum Schäden durch Überblähung an dem Lungenlappen vermieden werden konnten. Die flüssigen Wirkstofflösungen wurden mithilfe eines Pari Boy® Verneblers, der über einen Adapter mit dem Glasspacer verbunden war, vernebelt und so mit der Beatmungsluft in den Lungenlappen appliziert. Pulver konnten mithilfe des Dry Powder Insufflators™ (siehe 1.6.4) durch eine Öffnung im Silikonschlauch als Aerosol eingebracht und somit mit der Beatmungsluft in den Lungenlappen appliziert werden. Alle Lungenfunktionsparameter sowie der Perfusionsdruck konnten während der Versuche in Echtzeit kontrolliert werden.

## **1.2 Systemvorbereitungen und Präparation des Lungenlappens**

Die Lungenperfusionsversuche wurden im Thoraxzentrum Bezirk Unterfranken, MÜNNERSTADT, Deutschland, durchgeführt.

Das System wurde im Vorfeld funktionsfähig aufgebaut, um die Zeit zwischen Resektion und Versuchsdurchführung zu minimieren. Hierfür wurden alle Verbindungen im System geschlossen, das Wasserbad auf 37 °C erhitzt, 1,5 L Perfusionspuffer wurden in das Reservoir gefüllt und mit dem Magnetrührer gerührt. Anschließend wurde die Pumpe gestartet, so dass der Puffer durch das ganze System zirkulieren und auf 37 °C temperiert werden konnte. Für die Versuche, in denen Lösungen appliziert wurden, (siehe 1.3.4) wurde das Beatmungsgerät mit dem Spacer verbunden, und der Vernebler mit Zubehör wurde vorbereitet. Im Falle der Pulverapplikationen (siehe 1.6.4) wurde das Beatmungsgerät mit einem Silikonschlauch verbunden, und der Dry Powder Insufflator™ wurde vorbereitet. Das

pH-Meter wurde in das System eingebracht. Unverzöglich nach Erhalt des Lungenlappens wurde an den Bronchus ein Silikonschlauch luftdicht genäht, die arteriellen und venösen Gefäße wurden geöffnet, wobei die arteriellen Gefäße mit Kathetern vernäht wurden. Aufgrund interindividueller Beschaffenheit variierte die Anzahl der kanalisierten arteriellen Gefäße (1 – 4) zwischen den Lungenpräparaten. Bevor das Präparat in das System eingebracht wurde, wurde es mit 350 – 500 mL Perfusionspuffer mithilfe einer separaten Pumpe gespült, wobei die Spülflüssigkeit verworfen wurde. Anschließend wurde das Präparat gewogen und mit dem Beatmungsgerät und der Pumpe verbunden. Das Präparat wurde mit einem Verbindungsstück am Deckel des Metallkastens verbunden, so dass es nicht auf dem Boden des Kastens auflag. Die Beatmung erfolgte im BIPAP Modus (siehe 1.3.2, 1.6.2), und der Perfusionsfluss wurde so gewählt, dass idealerweise ein Druck von 20 – 40 mmHg herrschte. Das Lungenpräparat wurde ca. 5 min äquilibriert, um stabile Lungenfunktionsparameter (Minutenvolumen, Perfusionsdruck) zu erhalten. Vor der Applikation der Substanzen wurde eine Leerwertprobe gezogen, auf Eis gelagert, und mithilfe einer serologischen Pipette durch frischen Puffer ersetzt. Um das Entstehen eines Ödems beurteilen zu können, wurde nach Beendigung der Versuche das Lungenpräparat erneut gewogen.

### **1.3 Durchführung der Perfusionsversuche mit Salmeterol**

#### **1.3.1 Charakteristika der verwendeten Lungenlappen und Lungenflügel**

Für die Versuche, in denen nur Salmeterol appliziert wurde, wurde in zwei Fällen Oberlappen und in einem Fall ein Mittellappen perfundiert. Das durchschnittliche Alter der Spender betrug 70 Jahre. Im Mittel wurde eine Arterie für die Perfusionen katheterisiert.

Für die Versuche mit L-Carnitin und anschließender Salmeterol Applikation wurden in allen Perfusionen ganze Lungenflügel verwendet, wobei das durchschnittliche Alter der Spender 54 Jahre betrug. Im Durchschnitt wurden drei Arterien für die Perfusionen katheterisiert. Die einzelnen Charakteristika sind in Tab. 4 dargestellt.

**Tab. 4: Spendercharakteristika der durchgeführten Lungenperfusionen.**

<b>Applikation von Salmeterol</b>				
<b>Nr.</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>katheterisierte Arterien</b>	<b>Art des Gewebes</b>
1	64	M	2	OL (l)
2	74	M	1	ML (r)
3	71	M	1	OL (l)
<b>Applikation von L-Carnitin und Salmeterol</b>				
<b>Nr.</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>katheterisierte Arterien</b>	<b>Art des Gewebes</b>
1	45	M	3	Fl (r)
2	65	M	3	Fl (r)
3	51	W	4	Fl (l)

M: männlich; W: weiblich; OL: Oberlappen; ML: Mittellappen; FL: Lungenflügel; r: rechte Seite; l: linke Seite

### 1.3.2 Beatmung und Perfusion

Der Lungenlappen wurde im BIPAP Modus mit einer Atemfrequenz von 15/min beatmet, die Dauer einer Inspirationsphase betrug 1,7 sec, und die der Expirationsphase 2,5 sec. Der maximale Beatmungsdruck  $P_{\max}$  wurde auf 20 mbar gesetzt und der Positive End Expiratory Pressure (PEEP) betrug 1 oder 5 mbar. Der Perfusionsfluss wurde bei jeder Perfusion individuell so eingestellt, dass idealerweise ein Druck von 20 – 40 mmHg herrschte. Die Durchschnittswerte der insgesamt sechs Perfusionen sind in Tab. 5 dargestellt.

**Tab. 5: Ventilations- und Perfusionsparameter.**

<b>Perfusionsparameter</b>	<b>Parameter</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Bereich</b>
	Druck [mm Hg]	24	16 – 38
	Flussrate [mL/min]	93	39 – 125
<b>Ventilationsparameter</b>	Atemfrequenz [1/min]	15	
	$P_{\max}$ [mbar]	21	20 – 26
	PEEP [mbar]	1,6	0 – 6

### 1.3.3 Substanzlösungen von Salmeterol und L-Carnitin

Für die Herstellung einer Stammlösung von 1 mg/mL (Base) wurde Salmeterolxinafoat in Methanol gelöst und bei -25 °C gelagert. Die Applikationslösung mit der Endkonzentration von 200 µg/mL (Base) wurde durch Verdünnung der Stammlösung mit einer 50 % Wasser/Methanol-Lösung (V/V) hergestellt und bei -25 °C aufbewahrt, bzw. in der Nacht vor den Versuchen bei 2 – 8 °C gelagert.

Die Applikationslösung des L-Carnitinchlorids, mit einer Konzentration von 25 mg/mL (Base), wurde frisch am Tag vor der Versuchsdurchführung hergestellt. Dazu wurde das L-Carnitinchlorid in Millipore® Wasser gelöst und über Nacht bei 2 – 8 °C gelagert.

### 1.3.4 Applikation von Salmeterol und L-Carnitin

#### 1.3.4.1 Applikation von Salmeterol

Die Applikationslösung von Salmeterol (siehe 1.3.3) wurde bis zum Vortag des Versuches bei -20 °C und dann über Nacht bei 2 – 8 °C gelagert. Die Lösung wurde auf Eis transportiert. Appliziert wurde entweder direkt nach der Äquilibrationsphase (siehe 1.2) des Lungenpräparates (n= 3), bzw. nach Applikation des L-Carnitins (n= 3) (siehe 1.3.4.2). Dazu wurde in einen Pari Boy® SX Kompressor in Verbindung mit einem PARI LC® Unterbrecher und einem Pari LC® Sprint Star Vernebler (roter Düsenaufsatz, Ausstoßrate 450 mg/min [111]) 2,5 mL Substanzlösung gegeben. Die Tröpfchen des erzeugten Aerosols hatten einen MMD (mittleren Massendurchmesser) von 2,2 µm, und ein Massenanteil von 89 % hatte eine Partikelgröße unter 5 µm [111]. Der Unterbrecher wurde so betätigt, dass die Lösung während der Inspirationsphase vernebelt und während der Expirationsphase nicht vernebelt wurde. Um eine Deposition in den peripheren Luftwegen zu gewährleisten, wurde während der Verneblung der  $P_{max}$  auf 25 mmHg erhöht. Die Verneblung dauerte 12 min und die Zieldosis lag bei 200 µg. Nach Beendigung der Applikation wurde der Spacer verschlossen und der  $P_{max}$  auf den Normalwert zurückgesetzt. Der Vernebler mit der Restdosis wurde mit Parafilm® verschlossen und auf Eis für die Bestimmung der tatsächlich applizierten Dosis (siehe 1.3.6) gelagert.



### 1.3.4.2 Applikation von L-Carnitin und anschließende Applikation von Salmeterol

Die Konzentration der L-Carnitinchlorid-Lösung betrug in Anlehnung an Gnadt et al. [84] 25 mg/mL (Base), hergestellt in Millipore® Wasser (siehe 1.3.3). Während des Transportes wurde die Lösung auf Eis gelagert. Die L-Carnitin-Lösung wurde direkt nach der Äquilibration (siehe 1.2) des Systems und vor der Applikation des Salmeterols (siehe 1.3.4.1) vernebelt. Für die Applikation wurde das gleiche System wie bei Salmeterol verwendet (siehe 1.3.4.1), allerdings mit dem Pari LC® Sprint Vernebler (blauer Düsenaufsatz). Das Aerosol war charakterisiert durch einen MMD von 2,9 µm, und einen Massenanteil von 75 % einer Größe unter 5 µm [84].

Das L-Carnitin wurde über eine Dauer von 10 min appliziert, wobei mithilfe des Unterbrechers nur während der Inspirationsphase vernebelt wurde.

Die applizierte Dosis des L-Carnitins wurde in Anlehnung an Gnadt et al. [84] mithilfe folgender Gleichung (Formel 1) berechnet, was einen Wert von 62,7 mg L.Carnitin Base] ergab:

$$\text{Formel 1} \quad \text{Dosis} = (t \cdot f \cdot T_{\text{insp}}) \cdot 0,59 \frac{\text{ml}}{\text{min}} \cdot c$$

mit t: Verneblungszeit [min]; f: Atemfrequenz [L/min];  $T_{\text{insp}}$ : Dauer einer Inspirationsphase [min]; c: Konzentration der Applikationslösung [mg/mL]; 0,59 mL/min: Ausstoßrate des Verneblers (0,59 mg/min), eine relative Dichte von 1 mg/mL der wässrigen L-Carnitin-Lösung angenommen.

### 1.3.5 Probengewinnung

Proben wurden direkt am venösen Ausgang mithilfe einer Einweg-Pasteurpipette entnommen und in ein 15 mL Reagenzgefäß überführt. Das Volumen der Proben betrug 6 mL und sie wurden bereits während der Applikation des Salmeterols, 2, 5 und 10 min nach Start der Verneblung, gewonnen. Nach Beendigung der Applikation wurden Proben zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20, 30, 45 und 60 min nach Ende der Dosierung gezogen. Das entnommene Volumen wurde jeweils durch frischen Perfusionspuffer (siehe 1.1.2) ersetzt. Die Proben wurden vor Ort in 1 mL Aliquots aufgeteilt und auf Eis gelagert, wobei für die spätere Probenaufbereitung (siehe 1.4.2)

ein Aliquot in ein 15 mL Reagenzgefäß überführt und die restlichen Aliquots in 2 mL Schraubröhren pipettiert wurden. Im Institut der Pharmazie und Lebensmittelchemie an der Julius Maximilians Universität Würzburg wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -25 °C gelagert. Nach Beendigung der Versuche wurde das Präparat vom System getrennt, und der Spacer und alle Verbindungsstücke zwischen dem Bronchus der Lunge und dem Beatmungsgerät wurden für die spätere Bestimmung der tatsächlich applizierten Dosis (siehe 1.3.6) verpackt.

### **1.3.6 Bestimmung der tatsächlich applizierten Dosis von Salmeterol**

Zur Bestimmung der tatsächlich applizierten Dosis von Salmeterol wurde in Anlehnung an Gnadt et al. [84] folgende Berechnung zu Grunde gelegt (Formel 2):

#### **Formel 2**

$$\mathbf{Dosis_{appliziert}} = \mathbf{Substanz_{Vernebler}} - \mathbf{Restmenge_{Vernebler}} - \mathbf{Substanz_{Spacer}}$$

mit  $Dosis_{appliziert}$ : tatsächlich in das Präparat applizierte Menge Salmeterol (Base);  
 $Substanz_{Vernebler}$ : in den Vernebler gegebene Menge Salmeterol (Base);  
 $Restmenge_{Vernebler}$ : im Vernebler verbliebene Menge an Salmeterol (Base) nach Applikation;  $Substanz_{Spacer}$ : am Spacer und Verbindungsstücken nach Verneblung haftende Menge Salmeterol (Base).

#### **1.3.6.1 Bestimmung der Konzentration der Applikationslösung**

Um die Konzentration der Applikationslösung zu bestimmen, wurde ein Aliquot mit einer methanolischen Lösung von Formoterolhydrochlorid (0,5 mg/mL, interner Standard) versetzt und anschließend 1:10000 (V/V) in 50 % Wasser/Methanol verdünnt. Die Verdünnung führte zu einer finalen Konzentration des internen Standards von 10 ng/mL (Base). Die Lösung wurde in einem Braunglas Inlet Vial bei -25 °C gelagert. Die Analyse erfolgte mittels LC-MS/MS (siehe 1.4.3).

### **1.3.6.2 Bestimmung der Restdosis im Vernebler**

Zur Bestimmung der restlichen Menge an Applikationslösung, die nach der Applikation im Vernebler zurückblieb, wurden 0,2 mL interner Standard in den Vernebler pipettiert, und anschließend wurde der Vernebler mit Methanol ausgewaschen. Die erhaltene Lösung wurde bis zur weiteren Verarbeitung in eine 15 mL Schraubröhre gegeben und bei -25 °C gelagert. Für die Analytik mittels LC-MS/MS (siehe 1.4.3) wurde die Lösung 1:1000 (V/V) mit 50 % Wasser/Methanol verdünnt und in einem Braunglas Inlet Vial bei -25 °C gelagert. Die finale Konzentration des internen Standards betrug 10 ng/mL (Base).

### **1.3.6.3 Bestimmung der an Spacer und Verbindungsstücken haftenden Menge Salmeterol**

Um die während der Verneblung am Spacer und an den Verbindungsstücken zwischen Tubus der Lunge und dem Beatmungsgerät adsorbierte Substanz zu bestimmen, wurden 0,1 mL interner Standard in den Spacer pipettiert und verteilt und anschließend mit allen Verbindungsstücken mit Methanol ausgewaschen, die Waschlösung in eine 50 mL Schraubröhre überführt und bei -25 °C gelagert. Für die Analytik mittels LC-MS/MS (siehe 1.4.3) wurde eine Verdünnung von 1:200 (V/V) mit 50 % Wasser/Methanol durchgeführt und bis zur quantitativen Bestimmung in einem Braunglas Inlet Vial bei -25 °C gelagert. Die finale Konzentration des internen Standards betrug 10 ng/mL (Base).

### **1.3.7 Stabilität von Salmeterol in Perfusionsflüssigkeit**

Zur Überprüfung der Stabilität des Salmeterol während der Dauer der Lungenperfusionsexperimente wurden exemplarisch mithilfe der Leerwerte (siehe 1.2) aus drei verschiedenen Perfusionsversuchen Salmeterol Proben analog zu den Kalibrierstandards hergestellt (siehe 1.4.1.1). Aus jedem Leerwert wurden zwei Lösungen hergestellt, wobei eine unverzüglich mit internem Standard versetzt und extrahiert wurde (siehe 1.4.2) und die andere in einem Wasserbad bei 37 °C für 2 h inkubiert wurde. Anschließend wurden die inkubierten Lösungen mit internem Standard versetzt und extrahiert (siehe 1.4.2). Die Proben wurden vermessen (siehe 1.4.3) und quantifiziert (siehe 1.4.4) und die Konzentration von Salmeterol in den

Proben ohne Inkubation wurde mit der Konzentration in den Proben mit Inkubation verglichen.

## **1.4 Quantitative Analyse der Perfusionsversuche mit Salmeterol**

### **1.4.1 Kalibrierstandards**

#### **1.4.1.1 Kalibrierstandards aus Perfusionsflüssigkeit**

Die bei den Perfusionen gewonnene Leerprobe (siehe 1.2) diene als Matrix für die jeweiligen Kalibrierstandards. Hierzu wurden 0,9 mL Matrix mit methanolischen Salmeterol Standardlösungen versetzt und falls erforderlich mit Methanol auf 1 mL ergänzt und geschüttelt. Durch unterschiedliche Verhältnisse der Salmeterol Standardlösungen und Methanol wurden Konzentrationen zwischen 0,05 – 20 ng/mL (Kalibrierbereich) Salmeterol (Base) erreicht. Die Standards wurden in gleicher Weise aufgearbeitet wie die Perfusionsproben (siehe 1.4.2).

#### **1.4.1.2 Kalibrierstandards aus 50 % Wasser/Methanol**

Zur Quantifizierung der 50 % Wasser/Methanol-Lösungen (V/V) (siehe 1.3.6) wurden Kalibrierstandards zwischen 1 – 50 ng/mL Salmeterol (Base) mit je 10 ng/mL Endkonzentration interner Standard (Base) hergestellt.

### **1.4.2 Probenaufarbeitung aus Perfusionsflüssigkeit**

Als interner Standard diene eine methanolische 10 ng/mL (Base) Formoterolhydrochloridlösung, hergestellt durch Verdünnung aus einer methanolischen 0,5 mg/mL (Base) Lösung.

Es wurden alle bei den Perfusionen gewonnenen Proben und die Kalibrierstandards aufgearbeitet. Hierzu wurden die gewonnenen Proben und Kalibrierstandards mit 0,1 mL internen Standards versetzt und geschüttelt, was zu einer finalen Konzentration des internen Standards von 1 ng/mL (Base) führte.

Anschließend wurde eine Flüssig-Flüssig Extraktion durchgeführt. Dazu wurden 5 ml Diethylether zu den Proben pipettiert, die Proben wurden 10 sec geschüttelt und auf einem Mischrad 20 min lang mit ca. 10 Umdrehungen pro Minute bei

Raumtemperatur extrahiert. Nach Zentrifugation (5 min, 1200 g) wurde der Überstand abgenommen, in einen Glaskolben überführt und unter Stickstoff-Atmosphäre bei Raumtemperatur verdampft. Der getrocknete Rückstand wurde mit 0,2 mL 50 % Wasser/Methanol aufgenommen, in Braunglas Inlet Vials überführt und bis zur Analyse mittels LC-MS/MS (siehe 1.4.3) bei -25 °C gelagert.

### 1.4.3 LC MS/MS System

Alle Proben und Kalibrierstandards wurden mittels eines Massenspektrometers, ausgestattet mit einem G 6460 TripleQuad LC/MS mit Turbo Elektronen Spray Ionisation (ESI) (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA) analysiert. Der Massenspektrometer war an eine High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Agilent Technologies, Inc.) gekoppelt. Die Ionisierung erfolgte mittels positiver Elektronen Spray Ionisation mit einer Kapillarspannung (CV) von 3,5 kV. Stickstoff diente sowohl als Verneblungs- als auch Mantelgas (sheathgas). Die Gastemperatur betrug 300 °C, die Mantelgastemperatur 350 °C mit einer Flussrate von je 10 L/min. Substanzen wurden im multiplen Reaktionsmodus (MRM), mit den folgenden Einstellungen (Tab. 6), detektiert.

**Tab. 6: Parameter der MRM Methode zur Quantifizierung von Salmeterol und Formoterol.**

Substanz	Precursor Ion (m/z)	Produkt Ion (m/z)	Frag (V)	CE (V)	Dwell-Zeit (ms)
Salmeterol	416,3	389,2*	115	9	200
		232,2	115	17	200
Formoterol	345,2	121,0*	105	41	200
		149,1	105	13	200

Frag: Fragmentorspannung; CE: Kollisionsenergie

\*Quantifier

Zur flüssigchromatographischen Auftrennung des Analyten (Salmeterol) und internen Standards (Formoterol) wurde eine XTerra MS C18 Säule (3,0 x 150 mm, 3,5 µm

Partikelgröße mit passender Vorsäule, Waters Corp., Milford, MA, USA) verwendet. Als Fließmittel dienten 0,2 % Ameisensäure (A) (V/V) und Acetonitril (B). Die Substanzen wurden nach Injektion (10 µL) mittels einer linearen Gradientenelution (20 % B – 95 % B in 6 min) mit einer Flussrate von 0,5 mL/min getrennt. Anschließend folgten eine Spül- und eine Äquilibrationsphase (siehe Tab. 7).

**Tab. 7: Zeitlicher Verlauf des Gradienten der flüssig-chromatographischen Trennung des Analyten Salmeterols und des internen Standards Formoterol.**

Zeit nach Injektion [min]	Flussrate [mL/min]	Fließmittelanteil B [%]	Fließmittelanteil A [%]	Vorgang
0	0,5	20	80	Chromatographische Trennung
6	0,5	95	5	
6,01	0,5	99	1	Spülen der Säule
8,5	0,5	99	1	
8,51	0,5	20	80	Äquilibration der Säule
13	0,5	20	80	

#### 1.4.4 Quantifizierung

Die erhaltenen Chromatogramme wurden mit Hilfe der Software Agilent MassHunter ausgewertet. Hierzu wurden im Vorfeld die Chromatogramme der einzelnen Fragmente (siehe Tab. 6) aus dem Totalionenstrom isoliert, wobei für Salmeterol das Fragment mit einem m/z von 389,2 und für Formoterol (interner Standard) mit einem m/z von 121,0 für die Quantifizierung verwendet wurden. Hierfür wurden die Quotienten der Peakflächen der Analyten zu der der internen Standards gebildet.

## 1.5 Validierung der Methode zur quantitativen Analyse von Salmeterol

### 1.5.1 Linearität

Die Linearität der Methode wurde mithilfe von sechs Kalibriergeraden mit je sechs Proben mit Konzentrationsniveaus im Bereich von 0,05 – 20 ng/mL, die aus Perfusionsflüssigkeit extrahiert wurden (siehe 1.4.2), bestimmt. Hierfür wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt und für die Geradengleichung (siehe Formel 3) wurden folgende Ergebnisse (siehe Tab. 8) erhalten.

**Formel 3**  $y = a \cdot x + b$

mit y: Peakfläche; a: Steigung der Geraden; x: Konzentration der Probe; b: y-Achsenabschnitt.

**Tab. 8: Linearität der LC/MSMS Methode von Salmeterol nach Extraktion aus Perfusionsflüssigkeit, dargestellt als Mittelwert mit 95 % Konfidenzintervall.**

Steigung (a)	y-Achsenabschnitt (b)	Korrelationskoeffizient (R <sup>2</sup> )
0,66979 (0,65357 – 0,68601)	-0,01638 (-0,15895 – 0,12619)	0,99505

### 1.5.2 Präzision und Richtigkeit

Zur Bestimmung der Präzision und Richtigkeit wurden bei drei verschiedenen Konzentrationen Proben aus Perfusionsflüssigkeit extrahiert (siehe 1.4.2). Die Konzentrationen wurden im unteren, mittleren und oberen Bereich der Kalibrierung gewählt. Für die Bestimmung der Präzision zwischen verschiedenen Tagen (interday) wurde jede Konzentration an drei verschiedenen Tagen extrahiert und vermessen (insgesamt neun Proben). Für die Bestimmung der Präzision innerhalb eines Tages (intraday) wurden an einem Tag je vier Proben pro Konzentrationsniveau extrahiert und vermessen (insgesamt 12 Proben).

Die Präzision [%] wurde durch die relative Standardabweichung ausgedrückt. Die Richtigkeit wurde mit Formel 4 berechnet.

$$\text{Formel 4} \quad \text{Richtigkeit [\%]} = \frac{\sum_{i=1}^n C_n}{n \cdot C_a}$$

mit n: Anzahl der Messungen; C<sub>n</sub>: nominale Konzentration; C<sub>a</sub> : gemessene Konzentration.

Die erhaltenen Werte lagen innerhalb der geforderten Grenzen von 15 % Präzision und einer Richtigkeit von 85 – 115 % (siehe Tab. 9) [190].

**Tab. 9: Präzision und Richtigkeit für Salmeterol aus Perfusionsflüssigkeit.**

Konzentration (ng/mL)	Intraday		Interday	
	Präzision [%]	Richtigkeit [%]	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
0,25	9,13	95,35	7,76	99,57
7,5	3,75	103,33	1,01	97,66
15	5,3	98,91	2,97	103,64

### 1.5.3 Bestimmungsgrenze (LLOQ)

Um zu ermitteln, ob der niedrigste verwendete Standard die Kriterien der Bestimmungsgrenze erfüllt, wurden sechs Matrix-Proben extrahiert (siehe 1.4.2) und vermessen. Die noch akzeptablen Grenzen von 20 % Präzision und 80 – 120 % Richtigkeit wurden eingehalten [190]. Damit lag die Bestimmungsgrenze bei 0,05 ng/mL (siehe Tab. 10).

**Tab. 10: Bestimmungsgrenze der Salmeterol LC/MS-MS Methode aus Perfusionsflüssigkeit.**

Konzentration [ng/mL]	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
0,05	5,53	105,56



### 1.5.4 Wiederfindung

Zur Bestimmung der Wiederfindung von Salmeterol bei der Extraktion aus Perfusionsflüssigkeit (siehe 1.4.2) wurden je vier Standards von drei Konzentrationen in 50 % Wasser/Methanol hergestellt und vermessen. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass sie einer Wiederfindung von 100 % von drei Konzentrationen nach Extraktion aus Perfusionsflüssigkeit entsprachen, die am selben Tag vermessen wurden. Die Wiederfindung wurde mit Formel 5 berechnet und betrug im Durchschnitt 32 % (siehe Tab. 11).

**Formel 5**     **Wiederfindung**= (Peakfläche A / Peakfläche B) · 100 %

mit Peakfläche A: Peakfläche nach Extraktion aus Perfusionsflüssigkeit;  
Peakfläche B: Peakfläche der Wasser/Methanol Standards (entsprechend 100 % Wiederfindung).

**Tab. 11: Wiederfindung von Salmeterol bei der Extraktion aus Perfusionsflüssigkeit.**

Konzentration im Perfusionspuffer [ng/mL]	Wiederfindung [%]
0,25	34,09
2,5	29,87
15	33,29

## 1.6 Durchführung der Lungenperfusionen mit IGF-1

### 1.6.1 Charakteristika der verwendeten Lungenlappen und Lungenflügel

Für die Versuche mit IGF-1/Trehalose Applikation wurden in zwei Fällen ganze Lungenflügel und in einem Fall ein Oberlappen verwendet, wobei das durchschnittliche Alter der Spender 54 Jahre betrug. Im Durchschnitt wurden zwei Arterien für die Perfusionen katheterisiert. In den Perfusionen mit IGF-1/Fibroin Applikation wurde einem Fall ein ganzer Lungenflügel und in zwei Perfusionen

Unterlappen verwendet. Die Spender waren durchschnittlich 70 Jahre alt. Es wurden im Durchschnitt drei Arterien für die Perfusionen katheterisiert (siehe Tab. 12).

**Tab. 12: Spendercharakteristika der durchgeführten Lungenperfusionen.**

<b>Applikation von IGF-1/Trehalose</b>				
<b>Nr.</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>katheterisierte Arterien</b>	<b>Art des Gewebes</b>
1	52	W	1	OL (r)
2	56	M	3	L (l)
3	53	W	3	L (l)
<b>Applikation von IGF-1/Fibroin</b>				
<b>Nr.</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>katheterisierte Arterien</b>	<b>Art des Gewebes</b>
1	63	M	2	L (l)
2	75	M	4	OL (l)
3	72	W	2	UL (r)

M: männlich; W: weiblich; OL: Oberlappen; UL: Unterlappen r: rechte Seite; l: linke Seite; L: ganzer Lungenflügel

### 1.6.2 Beatmung und Perfusion

Die Beatmung der Lungenlappen erfolgte analog zu den Perfusionsversuchen mit Salmeterol (siehe 1.3.2) im BIPAP Modus mit einer Atemfrequenz von 15/min. Die Dauer einer Inspirationsphase betrug 1,7 sec und die der Expirationsphase 2,5 sec. Der maximale Beatmungsdruck  $P_{max}$  wurde auf 20 – 25 mbar gestellt und der Positive End Expiratory Pressure (PEEP) betrug 1 mbar. Der Perfusionsfluss wurde bei jeder Perfusion individuell so eingestellt, dass idealerweise ein Druck von 20 – 40 mmHg herrschte. Die Ventilation- und Perfusionsparameter sind in Tab. 13 angegeben.

**Tab. 13: Ventilations- und Perfusionsparameter.**

	<b>Parameter</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Bereich</b>
Perfusions- parameter	Druck [mm Hg]	28	19 – 38
	Flussrate [mL/min]	97	62 – 119
Ventilations- parameter	Atemfrequenz [1/min]	15	
	$P_{\max}$ [mbar]	23	19 – 26
	PEEP [mbar]	1,1	0 – 6

### 1.6.3 IGF-1-Partikel

Die IGF-1 Mikropartikel wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. Dr. Meinel (Pharmazeutische Technologie, Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um Trehalose- und Fibroin-Mikropartikel (Ursprung: Seidenspinner), die mit IGF-1 beladen waren und durch Sprühtrocknung produziert wurden [184]. Die IGF-1/Trehalose-Partikel waren charakterisiert durch einen MMD von  $3,1 \mu\text{m}$  und einen Massenanteil unter einem Durchmesser von  $5 \mu\text{m}$  von 64,1 % [184]. Die IGF-1/Fibroin-Partikel hatten einen MMD von  $3,4 \mu\text{m}$  und einen Massenanteil unter einem Durchmesser von  $5 \mu\text{m}$  von 41,3 % inne [184].

### 1.6.4 Applikation der Partikel

Sowohl die Trehalose- als auch die Fibroinpartikel wurden mithilfe des Dry Powder Insufflator™ Model DP-4M in Kombination mit der Air Pump Model AP-1 (Penn-Century, Inc. Wyndmoor, PA, USA) verabreicht. Hierfür wurde über ein Loch in dem Silikonschlauch zwischen Lungenlappen und dem Beatmungsgerät die Applikationsnadel des Insufflators mit der Öffnung der Nadel ca. 1 – 2 cm über dem Bronchus des Lungenlappens in das System eingebracht. Bei der Air Pump handelte es sich um eine Vorrichtung, mit der Luftstöße in kurzer Zeit abgegeben werden konnte, um somit eine schnelle und vollständige Versprühung der Partikel aus dem Dry Powder Insufflator™ zu gewährleisten. Das Applikationsvolumen eines Spühstoßes betrug 5 mL. Während der Applikation wurde der  $P_{\max}$  auf 25 mmHg erhöht (sofern nicht schon vorher eingestellt), um eine Deposition der Partikel in den

peripheren Luftwegen zu gewährleisten. Die Applikation erfolgte durch Betätigung der Air Pump während einer Inspirationsphase. Für die IGF-1/Trehalose Applikation wurde die Air Pump im Durchschnitt elfmal (4 – 20) betätigt, was in einer durchschnittlichen Applikationsdauer von 53 sec (20 – 100 sec) resultierte. Die IGF-1/Fibroin-Partikel wurden in jedem Perfusionsversuch über eine Dauer von 44 sec appliziert und die Air Pump wurde zehnmal betätigt. Zur Bestimmung der tatsächlich applizierten Dosis (siehe 1.6.6) wurde der Dry Powder Insufflator™ nach Beendigung der Applikation mit Parafilm® umwickelt und auf Eis gelagert.

### 1.6.5 Probengewinnung

Proben wurden bereits während der Applikation und anschließend zwischen 0 und 80 min direkt am venösen Ausgang mithilfe einer Einweg-Pasteurpipette entnommen und in ein 15 mL Reagenzgefäß überführt. Das entnommene Volumen wurde durch frischen Perfusionspuffer (siehe 1.1.2) ersetzt. Die Proben wurden vor Ort in 2 mL Schraubröhrchen pipettiert und auf Trockeneis gelagert. Im Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie an der Julius Maximilians Universität Würzburg wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Nach Beendigung der Perfusionsversuche wurden alle Verbindungsstücke zwischen dem Bronchus und dem Beatmungsgerät vom System getrennt und für die spätere Bestimmung der tatsächlich applizierten Dosis (siehe 1.6.6) verpackt und auf Eis gelagert.

### 1.6.6 Bestimmung der tatsächlich applizierten Dosis von IGF-1

Die tatsächlich applizierte Menge an IGF-1 wurde durch folgende Berechnung ermittelt (Formel 6).

#### Formel 6

$$\text{Dosis}_{\text{appliziert}} = \text{Substanz}_{\text{Applikator}} - \text{Restmenge}_{\text{Applikator}} - \text{Substanz}_{\text{Verbindungsstücke}}$$

mit  $\text{Dosis}_{\text{appliziert}}$ : tatsächlich applizierte Dosis an IGF-1;  $\text{Substanz}_{\text{Applikator}}$ : gesamt in den Dry Powder Insufflator™ gegebene Menge an IGF-1;  $\text{Restmenge}_{\text{Applikator}}$ : zurückgebliebene Menge an IGF-1 im Dry Powder Insufflator™;  $\text{Substanz}_{\text{Verbindungsstücke}}$ : An den Verbindungsstücken haftende Menge IGF-1.

### **1.6.6.1 Bestimmung der in den Applikator gegebenen Menge IGF-1**

Die tatsächliche Menge IGF-1, die sich jeweils in dem Applikator ( $\text{Substanz}_{\text{Applikator}}$ ) befand, konnte anhand der Beladung und der Menge der Mikropartikel, die in den Dry Powder Insufflator™ gegeben wurde, bestimmt werden.

Zur Bestimmung der an die Trehalose gebundenen Menge IGF-1 wurden IGF-1/Trehalose-Mikropartikel in 1 mL Millipore® Wasser aufgelöst, und bis zur Bestimmung der Konzentration mithilfe eines Sandwich Elisa (siehe 3.1) bei -80 °C gelagert. Die Menge IGF-1, die an das Fibroin gebunden war, wurde bestimmt, indem IGF-1/Fibroin-Partikel mit 1 mL Millipore® Wasser versetzt wurden, und das IGF-1 über Nacht bei Raumtemperatur aus den Partikeln diffundierte. Anschließend wurden die Partikel bei 2.600 g 5 min lang durch Zentrifugation von der Lösung abgetrennt. Der Überstand wurde gewonnen und bis zur quantitativen Analyse mithilfe eines Sandwich Elisa (siehe 3.1) bei -80 °C gelagert.

### **1.6.6.2 Bestimmung der in der Applikationsvorrichtung haftenden Menge IGF-1**

Um die nach Applikation in dem Applikator zurückgebliebene Menge an IGF-1 ( $\text{Restmenge}_{\text{Applikator}}$ ) zu bestimmen, wurde der Dry Powder Insufflator™ geöffnet und in mehreren Schritten mit insgesamt 1 mL Millipore® Wasser ausgewaschen. Im Falle von IGF-1/Fibroin wurde das IGF-1 über Nacht aus den Partikeln freigesetzt und anschließend von den Partikeln durch Zentrifugation befreit (siehe 1.6.6.1). Die Lösungen wurden bis zur quantitativen Bestimmung mithilfe eines Sandwich Elisa (siehe 3.1) bei -80 °C gelagert.

### **1.6.6.3 Bestimmung der an den Verbindungstücken haftenden Menge IGF-1**

Zur Bestimmung der an den Verbindungsstücken haftenden Menge IGF-1 ( $\text{Substanz}_{\text{Verbindungsstücke}}$ ) wurden diese mit insgesamt 10 mL Millipore® Wasser in mehreren Schritten ausgewaschen. Die ausgewaschenen IGF-1/Fibroin-Partikel wurden über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen, so dass das IGF-1 aus den Partikeln diffundieren konnte. Die Lösung wurde anschließend durch

Zentrifugation von den Partikeln befreit (siehe 1.6.6.1). Bis zur Analyse mithilfe eines Sandwich Elisa (siehe 3.1) wurden die Lösungen bei -80°C gelagert.

### **1.6.7 Stabilität von IGF-1 in der Perfusionsflüssigkeit**

Die Stabilität von IGF-1 wurde überprüft, indem eine wässrige IGF-1-Lösung zu vier verschiedenen Leerproben (siehe 1.2) aus den Perfusionen pipettiert wurde. Hierbei wurden jeweils zwei Ansätze hergestellt. Einer wurde als Kontrolle verwendet und unmittelbar nach Herstellung bei -80 °C eingefroren. Der andere Ansatz wurde 90 min unter Schütteln (100 Umdrehungen/min) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C gelagert. Die quantitative Analyse erfolgte mithilfe eines Elisa (siehe 3.1).

## **1.7 Freisetzung von IGF-1 aus Fibroinpartikeln in bronchioalveolärer Lavage**

### **1.7.1 Bronchioalveoläre Lavage**

Die bronchioalveoläre Lavage wurde von humanen volljährigen Spendern gewonnen, die sich aus medizinisch indizierten Gründen einem diagnostischen Eingriff unterziehen mussten. Das Studienprotokoll wurde vom Ethikkomitee der Universität Würzburg genehmigt. Die diagnostische Analyse des Bronchialsekretes wurde durch die Verwendung eines kleinen Aliquots für Forschungszwecke nicht beeinträchtigt. Die Lavage wurde in der Medizinischen Klinik und Poliklinik 1 an der Universität Würzburg gewonnen und durch Zentrifugation von Zellbestandteilen befreit. Anschließend wurde sie auf Trockeneis transportiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### **1.7.2 Konzentrierung der bronchioalveolären Lavage**

Die bronchioalveoläre Lavage (40 mL) wurde über einen Zeitraum von ca. 24 h mithilfe eines Lyophilisators (Christ Alpha 1-4 LD Plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz) auf  $\frac{1}{4}$  (10 mL) des ursprünglichen Volumens eingeengt.

### **1.7.3 Durchführung der Freisetzungsversuche**

IGF-1/Fibroin-Partikel wurden in ein 1,5 mL Reagiergefäß gegeben. Die Freisetzung wurde gestartet, indem 1 mL eingeengte Lavage (siehe 1.7.2) bzw. 1 mL Millipore® Wasser auf die Partikel pipettiert und 10 sec mit dem Vortex geschüttelt wurden. Die Versuche wurden unter Schütteln (100 Umdrehungen/min) bei 37 °C durchgeführt. Insgesamt wurden vier Proben mit je 100 µL vom Start bis zu 60 min entnommen. Das Volumen wurde jeweils mit Lavage bzw. Millipore® Wasser ersetzt. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert. Die Analyse erfolgte mittels Sandwich Elisa (siehe C3.1)

## 2 Untersuchen der pulmonalen Pharmakokinetik von IGF-1 in vitro

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Reagenzien

Eagles Minimum Essential Medium (MEM), 4,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI), Glucoselösung 45 % (m/V), CF™ 555-markierter anti-rabbit IgG, Zona Occludin Protein 1 Antikörper (Prestige Antibodies®) und die 10 mg/mL Insulinlösung (human) wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) und die Formaldehydlösung 4 % (V/V) von VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland) erworben, das fetale bovine Serum (FBS), Penicillin G/Streptomycin-Lösung, nicht essentielle Aminosäuren, Phosphate Buffered Saline (PBS), Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) und Trypanblaulösung von Biochrom AG (Berlin, Deutschland). Dimethylsulfoxid (DMSO) und Mowiol 4-88 stammten von Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland). Rekombinantes IGF-1 stammte von Novartis Pharma AG (Basel, Schweiz) und wurde von Prof. Dr. Dr. Meinel (Universität Würzburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.2 Sonstige Geräte und Materialien

---

Serologische Pipette	Einmal-Pipette 10 mL, wattiert, einzeln steril verpackt, (Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland), 50 mL, wattiert, einzeln steril verpackt (Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich)
Mikroliterpipette 20 - 200 µL, 100 – 1000 µL	Eppendorf Research®, 20 – 200 µL, 100 – 1000 µL variabel (Eppendorf AG, Hamburg)
Transferpipette 500 – 5000 µL	Transferpipette® electronic (Brand GmbH + CO KG, Wertheim)



---

Röhre 15 mL, 50 mL	Schraubröhre 15 mL, Spitzboden, aus Polypropylen, mit Schraubverschluss, steril, 120 x 17 mm, Schraubröhre 50 mL, aus Polypropylen, mit Schraubverschluss, steril, 115 x 28 mm (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)
Zentrifugen	Centrifuge 5702 max. 2750 x g (4400 Upm), Winkelarbeitskopf 30 x 15 mL (Eppendorf AG) Microfuge 22R Centrifuge (Beckman Coulter GmbH, Krefeld)
Reagiergefäße	1,5 mL, mit konischem Boden und anhängendem Deckel; 2 mL, Safeseal Reagiergefäß mit anhängendem Deckel (Sarstedt AG & Co.)
Mikro-Schraubröhre 2 mL	2 mL, aus Polypropylen, steril (Sarstedt AG & Co.)
Sterilwerkbank	HerasafeKS 12 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)
Plattenlesegerät	Multiskan Ascent (Thermo Fisher Scientific, Inc.)
Plattenlesegerät	Infinite <sup>®</sup> F200, (Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz)
Zellkulturplatten	Zellkultur Multiwellplatte, 12 Well, aus Polystyrol, steril, einzeln verpackt (Greiner Bio-One International AG)
Zellkulturflaschen	Nunc <sup>™</sup> Polystyrol Zellkulturflaschen mit Filterkappe, Wachstumsfläche 75 cm <sup>2</sup> (Thermo Fisher Scientific, Inc.)
Zellkulturbrutschrank	Heracell 240i (Thermo Fisher Scientific, Inc.)
Plattformschüttler	Unimax 1010 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach)
Vortex	Modell K-550-GE (Bender und Hobei AG, Zürich, Schweiz)
Voltohmmeter	EVOM2 in Verbindung mit der Chopstick Elektrode STX3 (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA)
Inversmikroskop	Eclipse TS 100 (Nikon GmbH, Düsseldorf)

---

Epifluoreszenzmikroskop	Axio Observer Z1 (Carl Zeiss AG, Oberkochen)
Einfrierbehältnis	Nalgene (Thermo Fisher Scientific, Inc.)

---

### 2.1.3 Zellkultur

Calu-3 Zellen wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. Carsten Ehrhardt, (Trinity College, Dublin, Irland) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um eine Bronchialkarzinom- Zelllinie, die von einem 25 Jahre alten männlichen Spender gewonnen wurde [191].

## 2.2 Routinearbeiten in der Zellkultur

### 2.2.1 Kultivierung

Die Calu-3 Zellen wurden in Zellkulturflaschen (gefüllt mit 10 mL Vollmedium) mit Filterkappe und einer Wachstumsfläche von 75 cm<sup>2</sup> in einem Brutschrank bei 37 °C und einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre bei 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Vollmedium diente Minimal Essential Eagle Medium (MEM) (mit Earl Salzen, L-Glutamin und Natriumbicarbonat) mit folgenden Bestandteilen:

- FBS 10 % (V/V)
- Penicillin G 100 U/mL
- Streptomycin 0,17 mM
- Nicht essentielle Aminosäuren 0,1 mM
- Natriumpyruvat 1 mM
- Glucose 16 mM

Das Medium wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt.

### 2.2.2 Passagieren

Die Zellen wurden in der Wachstumsphase nach Erreichen einer entsprechenden Dichte mithilfe von Trypsin/EDTA 0,25/0,02 % vom Flaschenboden abgelöst. Hierfür wurde die Trypsin/EDTA-Lösung im Voraus auf 37 °C erwärmt. Das Medium wurde

aspiriert und der Monolayer der Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Trypsin (5 mL) auf die Zellen gegeben. Nach 5 – 8 min bei 37 °C hatten das Enzym und der Komplexbildner die extrazelluläre Matrix der Zellen so weit zerstört, dass sich die Zellen vom Flaschenboden ablösten. Um die Reaktion mit Trypsin durch Überschuss an Protein zu stoppen und die Zellen zu resuspendieren, wurde ein zum Trypsin/EDTA äquivalentes Volumen an Vollmedium zugegeben und vermischt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 300 g zentrifugiert und dadurch gewaschen. Die Zellen konnten, nachdem sie gezählt wurden (siehe 2.2.4), in entsprechender Dichte ausgesät werden (siehe 2.3.2).

### **2.2.3 Einfrieren und Auftauen**

Als Einfriermedium diente eine Mischung aus Vollmedium, mit 20 % FBS als Schutzkolloid und 10 % DMSO (V/V) (Endkonzentration). Die Zellzahl der trypsinierten Zellen wurde bestimmt (siehe 2.2.4), die Zellen im Einfriermedium suspendiert (ca.  $10^6$ /mL) und je 1 mL in sterile 2 mL Schraubröhrchen verteilt. Anschließend wurden die Röhrchen in ein bei 4 °C vorgekühltes Einfrierbehältnis gegeben, welches im Voraus mit 2-Propanol befüllt wurde, und dann bei -80 °C über Nacht eingefroren. Das Einfrierverfahren bewirkte eine Absenkung der Temperatur in dem Einfriergefäß um 1 °C/min. Hierdurch wurde eine geeignete Kühlrate in Bezug auf die Bildung von intrazellulären Eiskristallen und die Aufbewahrung in sehr konzentrierter Lösung gewährleistet. Die Langzeitlagerung erfolgte in einem Tank mit flüssigem Stickstoff bei -196 °C.

Zum Auftauen und Aussäen der Zellen wurden die eingefrorenen Zellen in 37 °C warmem Wasser aufgetaut und, nachdem keine Eiskristalle mehr sichtbar waren, in eine Flasche mit vorgewärmtem Vollmedium pipettiert. Um Schäden des DMSO an den Zellen zu verhindern, wurde innerhalb von 24 h das Medium gewechselt.

### **2.2.4 Zellzählung**

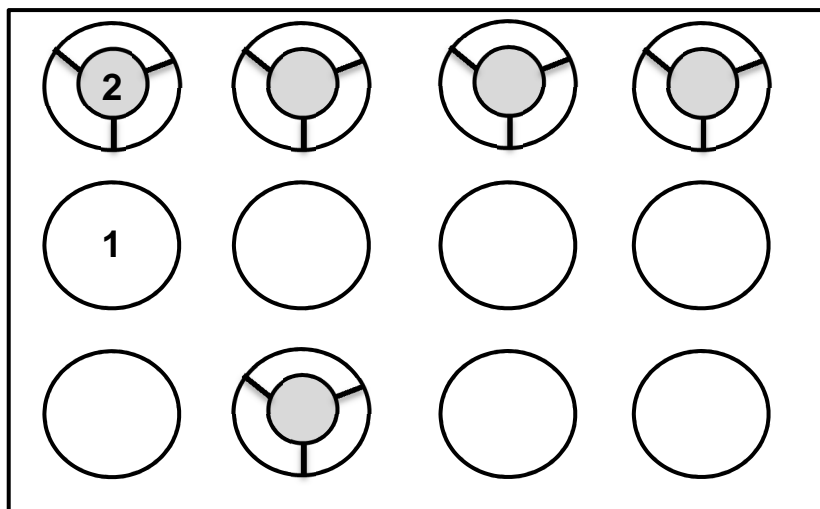
Zur Zählung der Zellen wurde nach der Passagierung (siehe 2.2.2) ein Aliquot aus der Zellsuspension entnommen und mit einer Trypanblaulösung (0,5 %, m/V) 1:1 vermischt. Die Mischung wurde auf eine Neubauerkammer (Zählkammer C-Chip, Biochrom AG) gegeben und unter einem Inversmikroskop ausgezählt. Es wurden nur

die vitalen Zellen gezählt. Die toten Zellen unterschieden sich dadurch, dass sie den Farbstoff in das Zytosol aufgenommen hatten und deshalb dunkelblau unter dem Mikroskop erschienen, wogegen die lebendigen Zellen hell leuchteten. Es wurde der Durchschnitt aus vier Kammern bestimmt. Eine Kammer besaß ein Volumen von 0,0001 mL. Die Durchschnittszahl der Zellen wurde durch das Volumen der Kammer dividiert, um so die Konzentration der Zellen zu erhalten (Zellen/mL).

## 2.3 Kultivierung der Calu-3 Zellen auf porösen Filtern

### 2.3.1 Aufbau des Permeationsmodells

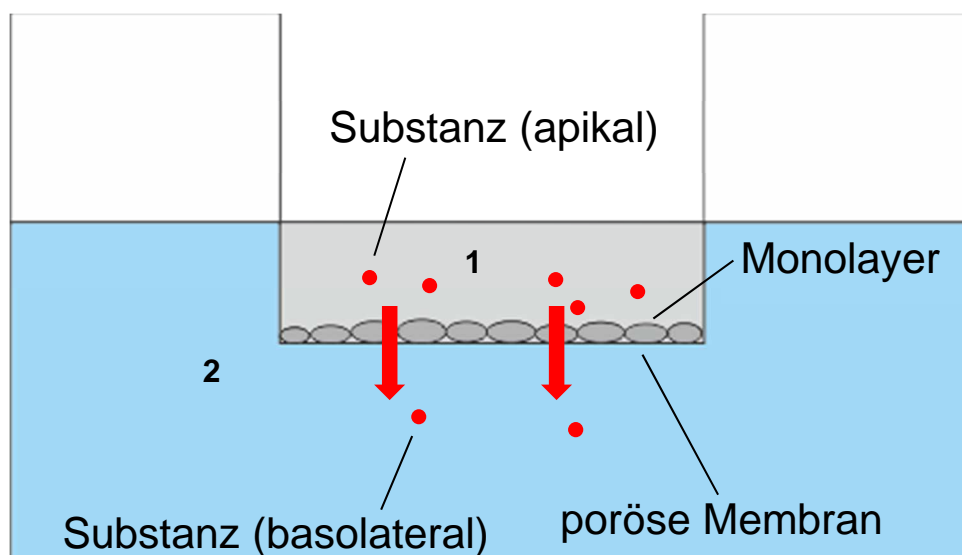
Für die Transportstudien wurden 12 Well Platten verwendet. In die Platten wurden poröse Polyethylenfilter (Thincert™, Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich) mit einer Porengröße von 0,4 µm und einer Wachstumsfläche von 1,13 cm<sup>2</sup> gesetzt (siehe Abb. 20).



**Abb. 20:** 12 Well Platte mit porösen Filtern; 1: Well (äußere/basolaterale Kammer) in 12 Well Platte; 2: Poröser Filter (innere/apikale Kammer) hängend im Well.

Die Halterungen der Filter lagen auf den oberen Rändern der Wells auf, so dass die Filter nicht den Boden der Wells berührten. Dadurch entstand ein System mit zwei Kammern, zum einen die Kammer des Wells, die die äußere/basolaterale Kammer bildete, und die Kammer des Filters, die die innere/apikale Kammer bildete. Die

poröse Membran stellte somit die einzige Verbindung zwischen den beiden Kammern dar. Die Zellen wurden auf die Filter bzw. die poröse Membran gesät (siehe 2.3.2) und so lange kultiviert, bis ein dichter Monolayer entstanden war. Der Monolayer fungierte somit als Barriere zwischen apikaler und basolateraler Kammer. Dadurch konnte die Zellbarriere in der Lunge imitiert werden, mit der apikalen Seite als der Luft zugewandten Seite und der basolateralen Seite als der Blut zugewandten Seite. Wurde eine Substanzlösung auf die apikale Seite der Zellen gegeben, musste die Substanz den Zellmonolayer überwinden, um auf die basolaterale Seite zu gelangen. Aus der basolateralen Kammer konnten Proben gewonnen werden. Dadurch konnten die pulmonalen Permeationseigenschaften von Substanzen mithilfe eines Modells untersucht werden (siehe Abb. 21).



**Abb. 21:** Well mit porösem Filter; 1: Filter (innere/apikale Kammer) mit Zellmonolayer überdeckt mit Substanzlösung (grau); 2: Well (äußere/basolaterale) Kammer mit Zellkulturmedium (blau).

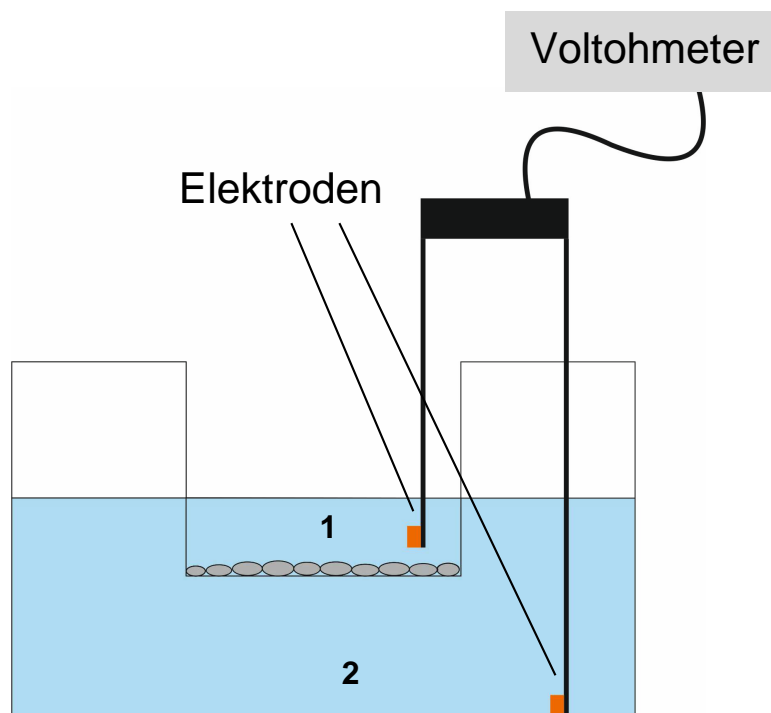
### 2.3.2 Aussaat der Zellen auf poröse Filter

Die Zellen wurden in einer Dichte von 100000 Zellen pro  $\text{cm}^2$  auf die Filter ausgesät. Die Filter befanden sich in einer 12 Well Platte mit 1,5 mL Vollmedium in der basolateralen Kammer und 0,5 mL in der apikalen Kammer (siehe 2.3.1). Das Medium wurde alle 1 – 3 Tage gewechselt.

## 2.4 Qualifizierung der Monolayer

### 2.4.1 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes

Zur Überprüfung der Qualität der Monolayer und der ausgebildeten Tight Junctions wurde der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) mit Hilfe des Voltometers Evom 2 in Verbindung mit der Chopstickelektrode STX 3 gemessen. Es handelte sich um eine Doppelelektrode, mit der der Widerstand zwischen der basolateralen (äußeren) und der apikalen (inneren) Kammer gemessen werden konnte (siehe Abb. 22).



**Abb. 22:** Schematische Darstellung der Messung des TEER; Doppelelektrode mit der kürzeren Elektrode in der apikalen Kammer (1), und der längeren Elektrode auf dem Boden der basolateralen Kammer (2).

Die Messung erfolgte 15 – 30 min nach Wechseln des Mediums apikal (0,5 mL) und basolateral (1,5 mL). Hierfür wurde die längere Seite der Elektrode so in die basolaterale Kammer getaucht, dass sie den Boden berührte, und die kürzere Seite wurde in die apikale Kammer getaucht, ohne den Zellrasen zu berühren (siehe Abb. 22).

Anschließend wurde der elektrische Widerstand zwischen den beiden Kammern gemessen. Neben Filtern mit Zellen wurde ein Leerwert (Blank) ohne Zellen gemessen. Der finale TEER Wert wurde mithilfe der Formel 7 berechnet.

**Formel 7**      $TEER = (TEER_{\text{Monolayer}} - TEER_{\text{Blank}}) \cdot A$

mit TEER: finaler TEER Wert [ $\Omega\text{cm}^2$ ];  $TEER_{\text{Monolayer}}$ : TEER gemessen auf Monolayer [ $\Omega$ ];  $TEER_{\text{Blank}}$ : TEER gemessen auf Filter ohne Zellen [ $\Omega$ ]; A: Wachstumsfläche des Filters [ $\text{cm}^2$ ].

Um den Zeitpunkt mit der bestmöglichen Qualität der Monolayer festzustellen, wurde eine Messreihe mit  $n = 6$  Monolayern durchgeführt. Die Messung erfolgte täglich ab Tag 3 in Kultur.

## 2.4.2 Permeation mit Fluoreszein

Für die Permeationsversuche wurde eine 20 mM Stammlösung von Fluoreszein-Natrium (Fluoreszein) hergestellt. Dafür wurde Fluoreszein in Ethanol gelöst. Die Stammlösung wurde in HBSS 1:1000 (V/V) verdünnt, was zu einer finalen Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  Fluoreszein führte.

Die Monolayer für die Fluoreszein Transportversuche, die zur Qualifizierung dienen, wurden parallel zu denen kultiviert, die für die IGF-1 Permeationen (siehe 2.5) verwendet wurden. Die Versuche fanden am selben Tag statt wie die mit IGF-1.

Die Zellen wurden auf Polyethylenfilter gesät und kultiviert (siehe 2.3.2). Am Morgen der Versuche wurde das Medium apikal und basolateral gewechselt und der TEER wurde gemessen. Vor Beginn der Permeationsversuche mit Fluoreszein wurde das Medium apikal und basolateral aspiriert und die Zellen wurden dreimal mit auf 37 °C gewärmtem HBSS gewaschen. Anschließend folgte über 30 – 45 min eine Inkubation in HBSS bei 37 °C. Das HBSS in beiden Kammern wurde aspiriert und apikal wurden 500  $\mu\text{L}$  der 20  $\mu\text{M}$  Fluoreszein-Donorlösung auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde zur Bestimmung der initialen Donorkonzentration eine 20  $\mu\text{L}$  Probe der Donorlösung in der apikalen Kammer gewonnen. Zum Start der Permeation wurden die Filter in eine neue Platte mit 1,5 mL frischem HBSS in der basolateralen Kammer gesetzt. Die Permeation erfolgte bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre bei 5 %  $\text{CO}_2$ . Außerdem wurde die Platte mit 100 Umdrehungen pro

Minute horizontal geschüttelt. Proben wurden zwischen 15 und 60 min basolateral gezogen, in 1,5 mL Reagiergefäße pipettiert und anschließend bei -25 °C gelagert. Das entnommene Volumen wurde mit frischem vorgewärmten HBSS ersetzt. Die Proben wurden mit einem Plattenlesegerät (Infinite® F200, Tecan Group AG, Männedorf, Switzerland) bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und eine Emissionswellenlänge von 535 nm analysiert (siehe 3.3).

### 2.4.3 Berechnung des Permeationskoeffizienten

Der apparente Permeationskoeffizient [Paap] konnte mit folgender Gleichung (Formel 8) berechnet werden.

**Formel 8**     
$$Paap = \frac{\Delta n}{\Delta t} \cdot \frac{1}{A \cdot C_0}$$

mit  $\frac{\Delta n}{\Delta t}$ : Mengenänderung [ $\mu\text{mol}$  bei Fluoreszein, ng bei IGF-1 und Insulin) über die Zeit [sec]; A: Wachstumsfläche des Filters [ $\text{cm}^2$ ];  $C_0$ : Initiale Konzentration der Donorlösung ( $\mu\text{mol/mL}$  bei Fluoreszein, ng/mL bei IGF-1 und Insulin); Paap: apparenter Permeationskoeffizient [cm/s].

### 2.4.4 Markierung der Tight Junctions

Die Zellen wurden wie unter 2.3.2 beschrieben auf Polyethylenfiltern gesät und kultiviert. Am Tag 10 in Kultur wurde das Medium apikal und basolateral entfernt und der Monolayer mit PBS dreimal gewaschen. Der Filter mit dem Zellmonolayer wurde mit einem Skalpell (Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg) ausgeschnitten und mit einer gepufferten (pH 6,9) 4 % (V/V) Formaldehydlösung 20 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Lösung von 0,1 % (V/V) Triton X, verdünnt in PBS, für 10 min permeabilisiert. Nach einem Waschvorgang mit PBS wurden die Zellen 1 h mit einer 5 % (m/V) BSA in PBS-Lösung bei Raumtemperatur blockiert. Die BSA-Lösung wurde mit dem Zona Occludin Protein 1 (primärer Antikörper), verdünnt 1:1000 (V/V) in PBS, ersetzt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörperlösung wurde aspiriert und der Monolayer mit PBS gewaschen.



Anschließend folgte die Inkubation mit einem CF™ 555 markierten goat anti rabbit Antikörper (sekundärer Antikörper), verdünnt 1:500 (V/V) in 5 % BSA/PBS, für 1 h bei Raumtemperatur. Nach Entfernen des sekundären Antikörpers wurden die Zellkerne mit einer 2,5 mg/mL DAPI-Lösung, verdünnt 1:1000 (V/V) in Millipore® Wasser, 10 min lang angefärbt. Der Monolayer wurde mit PBS gewaschen, auf einem Objektträger in Moviol 4-88 eingebettet und unter einem Epifluoreszenz-Mikroskop betrachtet. Die erhaltenen Bilder wurde mit einer 63x Vergrößerung (Plan Achromat 63x/1.4 Oil DIC M27, Carl Zeiss AG, Oberkochen) mit einer AxioCam (MRm3 S/N 5925, Carl Zeiss AG) erstellt.

## **2.4.5 Zusammenfassung der Qualitätsuntersuchungen und Vorbehandlung der Monolayer für Transportversuche**

Die Zellen wuchsen zu Monolayern mit hohen TEER Werten und einer Plateauphase zwischen Tag 9 - 15 (siehe B2.3.2), außerdem waren die Monolayer in der Lage eine dichte Barriere für den parazellulären Marker Fluoreszein zu formen (siehe B2.3.3) und bildeten das Zona Occludin Protein 1 aus (siehe B2.3.4), das Bestandteil der Tight Junctions ist [131]. Somit wurden die Qualitätsmerkmale erfüllt und die Zellen konnten für Transportstudien verwendet werden.

Zur schnellen Kontrolle der Monolayerqualität (Vorbehandlung) wurde vor dem Start der jeweiligen Transportversuche der TEER gemessen, und nur Monolayer mit einem  $TEER > 1000 \Omega cm^2$  wurden verwendet. Hierfür wurde vor Beginn der Transportversuche das Medium in beiden Kammern gewechselt, und nach 15 – 30 min Inkubation im Brutschrank wurde der TEER gemessen (siehe 2.4.1).

## **2.5 Transportversuche mit IGF-1 in Vollmedium**

### **2.5.1 Lösungen**

Die Kultivierung der Monolayer erfolgte im Vollmedium. Die IGF-1-Donorlösung wurde in Vollmedium hergestellt. Dafür wurde zunächst die Stammlösung, um sie von möglichen Tensiden zu befreien, mithilfe einer Säule, die mit einem Tensid bindenden Resin gefüllt war, (Pierce® Detergent Removal Spin Column, Thermo Scientific, Inc.) gereinigt. Die Säule wurde 1 min bei 1500 g zentrifugiert, wobei der Lagerungspuffer

entfernt wurde. Anschließend wurde die Säule in ein neues 2 mL Reagenzröhrchen gegeben und 0,4 mL PBS wurden auf die Säule gegeben und 1 min bei 1500 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Die Säule wurde in ein neues 1,5 mL Reagenzröhrchen gesetzt und die gewünschte Menge an IGF-1-Stammlösung wurde auf die Säule pipettiert und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Säule mit der Stammlösung für 2 min bei 1500 g zentrifugiert und somit die Stammlösung über die Säule gereinigt. Die erhaltene Lösung wurde in Vollmedium auf die gewünschte Konzentration (53 – 78 µg/mL, Donorlösung) verdünnt.

### **2.5.2 Durchführung der Versuche**

Die Versuche fanden in der Plateauphase statt (siehe B2.3.2.2), in diesem Fall am Tag 10 – 11 in Kultur. Die Monolayer wurden wie unter 2.4.5 vorbehandelt. Anschließend wurde das Medium aspiriert und apikal durch die IGF-1-Donorlösung (0,5 mL) ersetzt, und unmittelbar danach wurde zur Bestimmung der initialen Donorkonzentration eine 20 µL Probe von der Donorlösung in der apikalen Kammer entnommen. Die Filter wurden zum Start der Permeation in eine neue Platte mit 1,5 mL Vollmedium in der basolateralen Kammer gesetzt. Die Permeation wurde bei 37 °C in mit Wasserdampf gesättigter Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> unter Schütteln (100 Umdrehungen/min) durchgeführt. Proben (150 µL) wurden basolateral zwischen 60 und 150 min gezogen und in 1,5 mL Reagiergefäße pipettiert, das entnommene Volumen wurde mit vorgewärmten Vollmedium ersetzt. Nach Ende der Versuche wurde von der Donorlösung in der apikalen Kammer erneut eine 20 µL Probe gezogen. Alle Proben wurden bei -25°C gelagert. Die Analyse erfolgte mittels Elisa nach dem Sandwichprinzip (siehe 3.1).

### **2.5.3 Einfluss von IGF-1 in Vollmedium auf die Tight Junctions**

Der Einfluss von IGF-1 in Vollmedium auf die Tight Junctions während der Versuchsdauer wurde nach Ende der Permeationsversuche überprüft. Die Zellen wurden in drei Waschschritten mit 500 µL Vollmedium apikal und 1,5 mL Vollmedium basolateral gewaschen. Anschließend wurden sie 45 min im Brutschrank mit

Vollmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubation wurde der TEER gemessen.

### **2.5.4 Stabilität von IGF-1 während der Transportversuche**

Die Stabilität von IGF-1 in Vollmedium während der Transportversuche wurde überprüft, indem 20 µL Proben der Donorlösung vor Permeationsbeginn und nach Permeationsende gewonnen (siehe 2.5.2) und die Konzentration von IGF-1 verglichen wurden.

## **2.6 Transportversuche mit IGF-1 und Hemmsubstanzen der Transzytose**

### **2.6.1 Hemmstoffe**

Amiloridhydrochlorid, Indometacin, Nocodazol, Phenylarsinoxid, Amantadinhydrochlorid, Dynasoremonohydrat stammten von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland).

### **2.6.2 Lösungen**

Stammlösungen (1000fach) der Hemmsubstanzen wurden in DMSO hergestellt und bei -25 °C gelagert. Die Stammlösungen wurden für die Transportversuche 1:1000 (V/V) in Vollmedium verdünnt (Inkubationsmedium), so dass sich eine finale Konzentration von 0,1 % DMSO (V/V) in jedem Inkubationsmedium befand. Für Amantadin wurde keine Stammlösung hergestellt, sondern das Amantadin wurde direkt in Vollmedium (Inkubationsmedium) gelöst und anschließend mit 0,1 % DMSO versetzt. Für das Inkubationsmedium ohne Hemmsubstanz (Kontrolle) wurde Vollmedium mit 0,1 % DMSO versetzt. Folgende Endkonzentrationen wurden hergestellt: Amilorid 50 µM; Indometacin 300 µM; Nocodazol 30 µM; Phenylarsinoxid 5 µM; Amantadin 1 mM; Dynasore 60 µM.

Die Donorlösungen mit IGF-1 wurden durch Verdünnung der von Tensiden befreiten IGF-1-Stammlösung (siehe 2.5.1) in dem jeweiligen Inkubationsmedium hergestellt (59 – 74 µg/mL). Die Donorlösungen für die Versuche mit Amantadin wurden in Vollmedium (mit 0,1 % DMSO, kein Inhibitor) hergestellt.

### **2.6.3 Durchführung**

Die Versuche fanden in der Plateauphase (siehe B2.3.2.2) statt (Tag 14 in Kultur). Im Anschluss an die Vorbehandlung der Monolayer (siehe 2.4.5) wurde das Medium erneut apikal und basolateral aspiriert, und die Monolayer wurden mit dem jeweiligen Inkubationsmedium für folgende Dauer im Brutschrank mit 0,5 mL apikal und 1 mL basolateral inkubiert: Amilorid, Indometacin, Phenylarsinoxid, Amantadin, Dynasore 15 min, Nocodazol 30 min. Darauf folgend wurde das Transportmedium aspiriert und apikal 500 µL der jeweiligen Donorlösung pipettiert. Der Transport wurde gestartet, indem die Filter, in denen sich die Donorlösung befand, in eine neue Platte, mit 1,5 mL der jeweiligen Inkubationslösung bzw. für die Versuche mit Amantadin Vollmedium (0,1 % DMSO) in der basolateralen Kammer, platziert wurden. Die Versuche fanden unter Schütteln im Brutschrank statt (siehe 2.5.2). Die Monolayer wurden 60 min inkubiert und anschließend wurden Proben aus der basolateralen Kammer entnommen, in ein 1,5 mL Reagiergefäß pipettiert und bis zur Analyse mittels eines Sandwich Elisa (siehe 3.1) bei -25 °C gelagert. Ein Aliquot der jeweiligen Donorlösung wurde zur Bestimmung der Donorkonzentration ebenfalls in ein 1,5 mL Reagiergefäß pipettiert und bei -25 °C gelagert. Parallel zu den Transportversuchen mit einem Inhibitor wurden Kontrollversuche mit einer IGF-1-Donorlösung ohne einen Inhibitor, allerdings mit 0,1 % DMSO, durchgeführt.

## **2.7 Transportversuche mit IGF-1 in bronchioalveolärer Lavage**

### **2.7.1 Bronchioalveoläre Lavage**

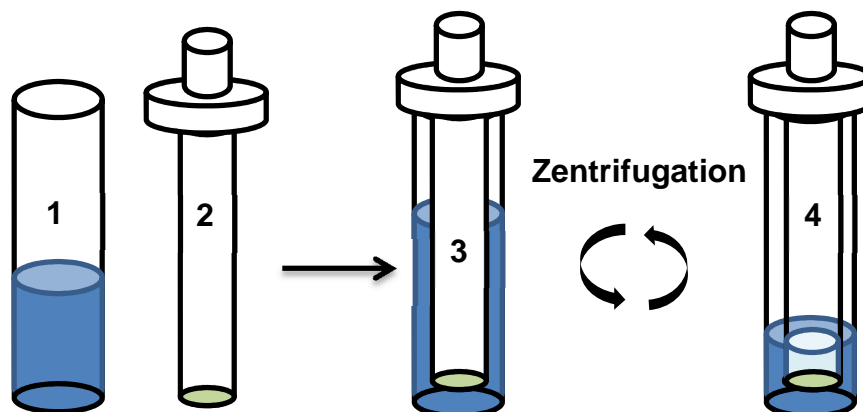
Die bronchioalveoläre Lavage (BAL) wurde von humanen volljährigen Spendern gewonnen, die sich aus medizinisch indizierten Gründen einem diagnostischen Eingriff unterziehen mussten. Die diagnostische Analyse des Bronchialsekretes wurde durch die Verwendung eines kleinen Aliquots für Forschungszwecke nicht beeinträchtigt. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg, Deutschland, genehmigt. Die Lavage wurde in der Medizinischen Klinik und Poliklinik 1 an der Universität Würzburg gewonnen und durch Zentrifugation von Zellbestandteilen befreit. Anschließend

wurde sie auf Trockeneis transportiert und bis zur Konzentrierung (siehe 2.7.2) bei -80 °C gelagert.

## 2.7.2 Konzentrierung der bronchioalveolären Lavage

Die bronchioalveoläre Lavage wurde über Filtereinheiten mit einer Membran, die nur für Bestandteile unter 50 kDa durchlässig ist (Centriprep YM-50, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), filtriert. In die äußere Kammer der Filtereinheiten wurden jeweils 15 mL der Rohlavage gegeben, und sie wurde mit der inneren Kammer verschlossen. Die Lavage wurde bei 1.500 g in mehreren Zentrifugationsschritten über die Membran in die innere Kammer filtriert und somit von Bestandteilen unter 50 kDa befreit und konzentriert. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde das Filtrat aus der inneren Kammer entfernt und ein weiterer Zentrifugationsschritt folgte. Die gesamte Zentrifugationszeit variierte abhängig von der Beschaffenheit der Lavage und dem eingesetzten Volumen (30 – 100 mL) zwischen 60 – 145 min.

Nach Beendigung der Zentrifugationsschritte erhielt man die konzentrierte Lavage mit Bestandteilen über 50 kDa als Rückstand in der äußeren Kammer. Der Vorgang der Konzentrierung ist schematisch in Abb. 23 dargestellt.



**Abb. 23:** Schematische Darstellung der Aufkonzentrierung der Lavage mit Filtereinheiten; 1: äußere Kammer gefüllt mit Rohlavage (dunkelblau); 2: innere Kammer mit Membran (grün); 3: zusammengesetzte Filtereinheit mit äußeren und inneren Kammer; 4: Filtereinheit nach Zentrifugationsschritt mit der konzentrierten Lavage in der äußeren Kammer (dunkelblau), und der filtrierten Lavage in der inneren Kammer (hellblau). Nach [192].

Beispielsweise erhielt man so aus 50 mL Rohlavage 0,69 mL konzentrierte Lavage, was einer 72,5fachen Konzentrierung entsprach.

### 2.7.3 Lösungen

Die konzentrierte bronchioalveoläre Lavage (siehe 2.7.2) wurde anschließend mit Zellkulturmedium (siehe 2.2.1) ohne FBS verdünnt und als Transportmedium verwendet. Von einer 72,5x konzentrierten Lavage wurden beispielsweise 0,6 mL mit 5,9 mL Zellkulturmedium ohne FBS versetzt. So wurde eine finale 6,7fache Konzentrierung (6,7x BAL) erreicht. Für die Kontrollversuche mit FBS im Medium wurde Vollmedium als Transportmedium verwendet. Die von Tensiden befreite (siehe 2.5.1) IGF-1-Stammlösung wurde in dem jeweiligen Transportmedium auf die gewünschte Konzentration (16 – 58 µg/mL) verdünnt (Donorlösung). Außerdem wurden Donormedien mit IGF-1 in 6,7x BAL (51 – 61 µg/mL) und Inkubationsmedien in Vollmedium mit den Hemmstoffen Nocodazol (30 µM) und Dynasore (60 µM) analog zu 2.6.2 hergestellt.

### 2.7.4 Durchführung der Transportversuche

Die Versuche wurden analog zu denen mit Vollmedium durchgeführt (siehe 2.5.2) und fanden in der Plateauphase (siehe B2.3.2.2) statt (Tag 12 in Kultur). Nach der Vorbehandlung der Monolayer (siehe 2.4.5) wurde das Medium apikal und basolateral aspiriert und 500 µL Donorlösung (siehe 2.7.3) wurden apikal auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Filter in eine neue Platte gesetzt, in der sich basolateral 1,5 mL Vollmedium befanden. Proben von je 150 µL wurden zwischen 60 – 150 min gewonnen und in 1,5 mL Reagiergefäße pipettiert. Das entnommene Volumen wurde mit vorgewärmten Vollmedium ersetzt. Unmittelbar im Anschluss wurde zur Bestimmung der Initialdosis vor dem Start der Transportversuche apikal eine Probe von der Donorlösung (20 µL) entnommen. Parallel zu den Versuchen mit der 6,7x BAL wurden Transportversuche mit IGF-1 in Vollmedium (siehe 2.5.2) als Kontrolle durchgeführt. Alle Proben wurden bis zur Analytik mit einem Elisa nach dem Sandwichprinzip (siehe 3.1) bei -25 °C gelagert. Permeationen mit den Hemmstoffen Dynasore und Nocodazol in 6,7x BAL als Donormedien wurden analog zu 2.6.3 durchgeführt.

## **2.7.5 Einfluss der bronchioalveolären Lavage auf die Tight Junctions**

Um einen möglichen Einfluss der 6,7x BAL auf die Tight Junctions zu überprüfen wurden Monolayer, die für die IGF-1 Permeationen in Vollmedium und die Monolayer, die für Permeationen in 6,7x BAL verwendet wurden, im Anschluss an die Versuche in drei Waschsritten mit Vollmedium gewaschen und 15 – 30 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der TEER gemessen. Neben der Messung des TEER wurden im Anschluss Fluoreszein Permeationen durchgeführt. Hierfür wurden sowohl Monolayer, die für Permeationen von IGF-1 in Vollmedium als auch in 6,7x BAL verwendet wurden, in drei Waschsritten mit HBSS gewaschen, 45 min im Brutschrank inkubiert und anschließend für Fluoreszein Permeationen verwendet (siehe 2.4.2).

## **2.7.6 Stabilität von IGF-1 während der Transportversuche**

Die Stabilität von IGF-1 in 6,7x BAL während der Transportversuche wurde überprüft, indem 20 µL Proben der Donorlösung in der apikalen Kammer vor Permeationsbeginn und nach Permeationsende gewonnen und die Konzentrationen miteinander verglichen wurden.

## **2.8 Transportversuche mit Insulin in Vollmedium**

### **2.8.1 Lösungen**

Als Transportmedium wurde analog zu den Versuchen mit IGF-1 Vollmedium verwendet (siehe 2.2.1). Die Insulin-Stammlösung 10 mg/mL wurde auf die gewünschte Konzentration (90 – 104 µg/mL) in Vollmedium (Donorlösung) verdünnt.

### **2.8.2 Durchführung der Versuche**

Die Transportversuche mit Insulin wurden parallel zu denen mit IGF-1 in Vollmedium durchgeführt. Die Durchführung entsprach der der Versuche mit IGF-1 (siehe 2.5.2). Apikal wurde nach der Vorbehandlung der Monolayer (siehe 2.4.5) und Aspiration des Mediums die Insulin-Donorlösung auf den Monolayer gegeben, und die Filter wurden in eine neue Platte mit basolateral 1,5 mL Vollmedium gesetzt. Proben von

je 150  $\mu\text{L}$  wurden analog zu IGF-1 zwischen 60 und 150 min gewonnen, in 1,5 mL Reaktionsgefäße gegeben und bei  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Das entnommene Volumen wurde mit vorgewärmtem Vollmedium ersetzt. Vor und nach dem Ende der Versuche wurden von der Donorlösung in der apikalen Kammer 20  $\mu\text{L}$  Proben entnommen und bei  $-25^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die quantitative Bestimmung aller Proben erfolgte durch Anwendung eines Elisa nach dem Sandwichprinzip (siehe 3.2).

### **2.8.3 Einfluss von Insulin in Vollmedium auf die Tight Junctions**

Im Anschluss an die Transportversuche wurden die Monolayer in drei Waschschrritten mit Vollmedium gewaschen und mit apikal 500  $\mu\text{L}$  und basolateral 1,5 mL 45 min im Brutschrank bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde der TEER gemessen.

### **2.8.4 Stabilität von Insulin während der Transportversuche**

Die Stabilität von Insulin in Vollmedium während der Transportversuche wurde überprüft, indem 20  $\mu\text{L}$  Proben der Donorlösung in der apikalen Kammer vor Permeationsbeginn und nach Permeationsende gewonnen und die Konzentrationen miteinander verglichen wurden.



### **3 Analytik von IGF-1, Insulin und Fluoreszein**

#### **3.1 Quantitative Bestimmung von IGF-1**

##### **3.1.1 Proben aus den in vitro Versuchen**

Die gewonnenen Proben der Permeationsversuche mit IGF-1 in Vollmedium als Donorlösung (siehe 2.5) und auch die mit IGF-1 6,7x BAL (siehe 2.7) als Donorlösung wurden mithilfe eines Elisa nach dem Sandwichprinzip (Human IGF-1 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, Minneapolis, USA) quantifiziert (siehe 3.1.3). Die basolateral gewonnenen Proben wurden unverdünnt vermessen. Die apikal, zur Bestimmung der Konzentration der Donorlösung, gewonnenen Proben wurden für die Vermessung in Vollmedium verdünnt.

##### **3.1.2 Proben aus den Lungenperfusions- und Freisetzungsversuchen**

Die venösen Proben, die während der Lungenperfusionsversuche (siehe 1.6.5) gewonnen wurden, wurden entweder unverdünnt oder, wenn erforderlich, in Millipore® Wasser verdünnt, mithilfe eines Elisa nach dem Sandwichprinzip (siehe 3.1.3) quantifiziert.

Die Proben, die zur Bestimmung der tatsächlich applizierten Dosis dienten (siehe 1.6.6), sowie die Proben aus den Freisetzungsversuchen (siehe 1.7) wurden in Millipore® bzw. in einer 3 % (m/V) BSA in 0,1 M Tris-HCl-Lösung verdünnt.

##### **3.1.3 Durchführung des Elisa zur Bestimmung des IGF-1**

Das Human IGF-1 Quantikine Elisa Kit wurde basierend auf den Herstellerangaben durchgeführt und funktionierte nach dem Sandwichprinzip. Zur Herstellung der Kalibrierstandards wurde das im Kit enthaltene lyophilisierte rekombinante IGF-1 Pulver mit der angegebenen Menge Millipore® Wasser aufgelöst und 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Konzentration der Standardlösung belief sich auf 60 ng/mL. Daraufhin wurde der Standard durch Verdünnungsschritte in dem mitgelieferten Calibrator Diluent RD5-22 auf die Konzentrationen 6, 3, 1,5, 0,75, 0,375, 0,01875, 0,09375 ng/mL verdünnt. Diese Lösungen dienten als

Kalibrierstandards. In die jeweiligen Nöpfchen wurde jeweils 150 µL des Assay Diluent RD1-53 pipettiert. Anschließend wurden je 50 µL der Kalibrierstandards oder der jeweiligen Proben (siehe 3.1.1, 3.1.2 ) in die Nöpfchen gegeben. Nach 2 h Inkubation bei 4 – 8 °C wurde der Inhalt der Nöpfchen verworfen und es folgten vier Waschschriffe. Dafür wurde im Voraus das Wash Buffer Concentrate 1:25 (V/V) in Millipore® verdünnt. Für jeden Waschschriff wurde 400 µL in die Nöpfchen pipettiert und anschließend wieder verworfen. Zwischen den Waschschriffen und nach dem letzten Waschschriff wurden die Nöpfchen durch Klopfen auf Papierhandtücher getrocknet. Im Anschluss erfolgte eine 1 h Inkubation mit je 200 µL des IGF-1 Conjugate (IGF-1 Antikörper konjugiert mit Horseradish Peroxidase) pro Nöpfchen bei 4 – 8 °C. Es folgten erneut vier Waschschriffe und eine 30 min Inkubation mit 200 µL der Substratlösung im Dunkeln. Hierbei handelte es sich um eine 1:1 (V/V) Mischung der mitgelieferten Farbreagentien A und B, die stabilisiertes Wasserstoffperoxid und das Chromogen enthielten. Nach den 30 min wurden je 50 µL Stopplösung (2 N Schwefelsäure) zugegeben, wodurch ein Farbumschlag hervorgerufen wurde. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einem Plattenleser (Multiskan Ascent, Thermo Fisher Scientific Inc.) vermessen. Die Auswertung erfolgte wie unter 3.2.3 beschrieben.

## **3.2 Quantitative Bestimmung von Insulin**

### **3.2.1 Proben aus den in vitro Versuchen**

Die Proben der Permeationsversuche mit Insulin in Vollmedium wurden mithilfe des Human Insulin Elisa (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) analysiert (siehe 3.2.2). Die basolateral gewonnenen Proben wurden unverdünnt, die apikal von der Donorlösung gewonnenen Proben wurden in Vollmedium verdünnt.

### **3.2.2 Durchführung des Elisa zur Bestimmung des Insulin**

Der Human Insulin Elisa wurde basierend auf den Herstellerangaben durchgeführt und funktionierte nach dem Sandwichprinzip. Die Kalibrierstandards waren gebrauchsfertig in dem Kit enthalten (2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 µU/mL). In die benötigte Anzahl an Nöpfchen wurden im Voraus 300 µL des verdünnten HRP

Waschpuffer (hergestellt durch Verdünnung des 10x konzentrierten Waschpuffer mit Millipore® Wasser) pipettiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Waschpuffer entfernt und es wurden 20 µL des Assaypuffers (BSA in PBS) in jedes Nöpfchen gegeben. Daraufhin wurden je 20 µL eines Standards oder einer Probe (siehe 3.2.1) in ein Nöpfchen pipettiert, anschließend wurden 20 µL des Detektionsantikörpers in die Nöpfchen gegeben und es folgte eine Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur. Die Flüssigkeit in den Nöpfchen wurde entfernt und es folgten drei Waschschriffe mit jeweils 300 µL des verdünnten Waschpuffers. Nach jedem Waschschriff wurde die Flüssigkeit durch Klopfen auf Papierhandtücher komplett entfernt. Anschließend wurden 100 µL der Enzymlösung (Streptavidin-Horseradish-Peroxidase) in jedes Nöpfchen pipettiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünf Waschschriffen wurden 100 µL Substratlösung (Chromogen) in jedes Nöpfchen gegeben und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 µL Stopplösung (0,3 M Salzsäure) in jedes Nöpfchen pipettiert, wodurch ein Farbumschlag bewirkt wurde. Die Messung der Absorption erfolgte mit einer Wellenlänge von 450 nm bei einem Plattenlesegerät (Multiskan Ascent).

### **3.2.3 Auswertung der Elisas**

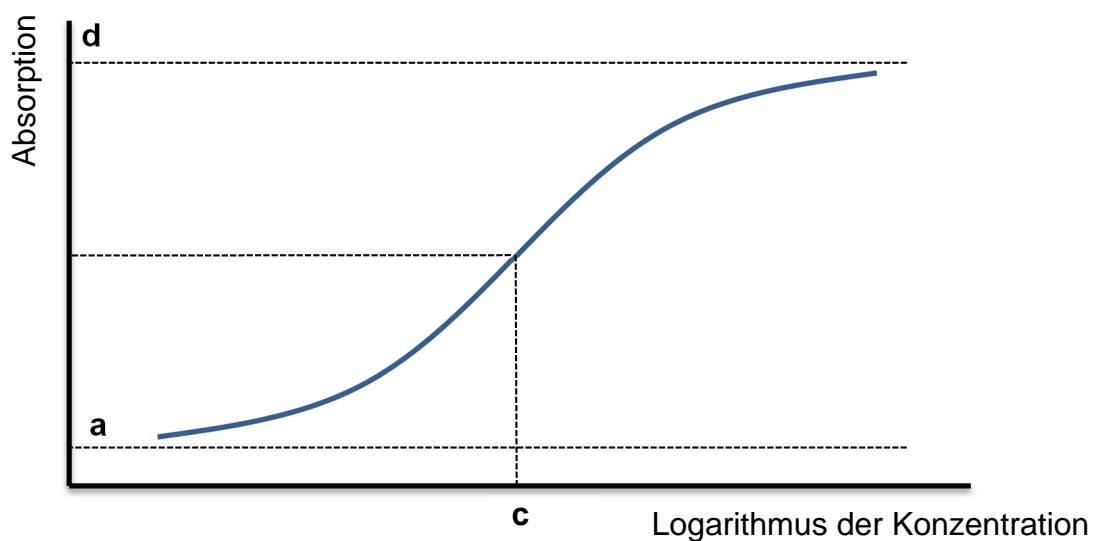
Die Kalibrierkurven, die durch Messung der Absorptionen der Elisa-Standards (siehe 3.1.3, 3.2.2) entstanden, wurden mithilfe eines nicht linearen Regressionsmodell ausgewertet. Verwendet wurde das 5 Parameter Logistik Modell, welches auf dem 4 Parameter Logistik Modell basiert. Hierbei wurden auf der x-Achse der Logarithmus der Konzentrationen aufgetragen und auf der y-Achse die dazu gehörenden Absorptionen. Daraus resultierte eine Kurve, die im Falle der 4 Parameter Logistik Funktion durch 4 Parameter und im Falle der 5 Parameter Logistik Funktion durch 5 Parameter aus folgender Gleichung charakterisiert wurde (Formel 9).

**Formel 9** 
$$y = d + \frac{a-d}{\left[1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b\right]^g}$$

mit a: geschätzte Absorption bei Konzentration von 0; d: geschätzte Absorption bei einer unendlichen Konzentration; c: Konzentration am Wendepunkt der Kurve; b= Steigung der Kurve am Wendepunkt; g: Asymmetriefaktor (Wert= 1 bei 4 Parameter Logistik Funktion).

Die 4 Parameter Logistik Funktion bildete eine symmetrische Kurve um den Wendepunkt. Die 5 Parameter Logistik Funktion ergänzte die Gleichung der 4 Parameter Logistik Funktion um einen weiteren Parameter, den Asymmetrie-Faktor g. Dadurch konnten auch asymmetrische Kurven gebildet werden.

Als Beispiel ist in eine Kurve mit einem sigmoidalen symmetrischen Verlauf in Abb. 24 dargestellt, mit dem Logarithmus der Konzentration auf der x-Achse und der Absorption auf der y-Achse.



**Abb. 24:** Schematische Darstellung eines sigmoiden Kurvenverlaufs; a: geschätzte Absorption bei Konzentration von 0; c: Konzentration am Wendepunkt der Kurve; d: geschätzte Absorption bei einer unendlichen Konzentration.

### 3.3 Quantitative Bestimmung von Fluoreszein

Die Proben der Fluoreszeinpermeationen (siehe 2.4.2, 2.7.5) wurden mithilfe eines Plattenlesegerätes (Infinite® F200, Tecan Group AG) analysiert. Die Proben, die zur Bestimmung der initialen Donorkonzentration dienten, wurden in HBSS 1:10000 (V/V) verdünnt, die basolateral gewonnen Proben wurden unverdünnt analysiert. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer Kalibriergerade zwischen 0,1 – 10 nM. Es wurden jeweils 200 µL der Proben oder der Standards der Kalibriergeraden in eine 96 Well Platte pipettiert und mithilfe des Plattenlesegeräts mit einer Wellenlänge von 485 nm angeregt, wobei eine Messung der Emission mit einer Wellenlänge von 535 nm erfolgte.



## **D Tabellarischer Anhang**

---





# 1 Untersuchung der pulmonalen Pharmakokinetik von Salmeterol mithilfe des Lungenperfusionsmodells

## 1.1 Tatsächlich applizierte Dosis von Salmeterol in den Lungenperfusionsversuchen

Perfusionsversuch	Tatsächlich applizierte Dosis Salmeterol ( $\mu\text{g}$ )	An den Verbindungsstücken adsorbierter Anteil Salmeterol (%)
Salmerol-1	196	9
Salmerol-2	193	21
Salmerol-3	278	18
L-Carnitin/Salmerol-1	203	23
L-Carnitin/Salmerol-2	195	27
L-Carnitin/Salmerol-3	184	27
Mittelwert	208	21
Stabw	35	7

Stabw: Standardabweichung

## 1.2 Ergebnisse der Lungenperfusionsversuche mit alleiniger Salmeterol Applikation

Konzentration von Salmeterol in der Perfusionsflüssigkeit (ng/mL)					
Versuch	1	2	3	Mittelwert	MAbM
Zeit (min)					
-10	19,12	0,37	0,34	6,61	8,34
-7	1,38	0,97	0,52	0,96	0,29
-2	2,40	1,45	0,88	1,58	0,55
0	3,54	3,04	1,10	2,56	0,97
10	12,89	2,65	1,99	5,84	4,70
20	11,59	4,32	2,32	6,08	3,68
30	11,20	5,34	2,60	6,38	3,21
45	10,24	5,68	2,66	6,19	2,70
60	9,47	5,77	3,06	6,1	2,25

MAbM: Mittlere Abweichung vom Mittelwert

In die Perfusionsflüssigkeit verteilter Dosisanteil von Salmeterol (%)					
Versuch	1	2	3	Mittelwert	MAbM
Zeit (min)					
-10	14,62	0,29	0,18	5,03	6,39
-7	1,12	0,76	0,28	0,72	0,29
-2	1,90	1,13	0,48	1,17	0,49
0	2,78	2,38	0,60	1,92	0,88
10	9,99	2,09	1,08	4,39	3,74
20	9,09	3,41	1,27	4,59	3,00
30	8,88	4,23	1,43	4,85	2,69
45	8,21	4,53	1,47	4,74	2,32
60	7,70	4,64	1,70	4,68	2,01

MAbM: Mittlere Abweichung vom Mittelwert

---

<b>Fläche Unterhalb der Kurve</b>	
<b>Versuch</b>	<b>AUC (% * min)</b>
1	533
2	233
3	83
Mittelwert	283
MAbM	167

MAbM: Mittlere Abweichung vom Mittelwert

### 1.3 Ergebnisse der Lungenperfusionsversuche mit L-Carnitin/Salmeterol Applikation

Konzentration von Salmeterol in der Perfusionsflüssigkeit (ng/mL)					
Versuch	1	2	3	Mittelwert	MAbM
Zeit (min)					
-10	0,16	0,11	0,04	0,10	0,04
-7	0,27	0,44	0,12	0,28	0,11
-2	0,23	0,65	0,27	0,38	0,18
0	0,31	0,54	0,30	0,38	0,10
10	0,31	0,53	0,35	0,40	0,09
20	0,32	0,58	0,37	0,42	0,10
30	0,34	0,57	0,38	0,43	0,09
45	0,36	0,54	0,36	0,42	0,08
60	0,36	0,48	0,37	0,40	0,05

MAbM: Mittlere Abweichung vom Mittelwert

In die Perfusionsflüssigkeit verteilter Dosisanteil von Salmeterol (%)					
Versuch	1	2	3	Mittelwert	MAbM
Zeit (min)					
-10	0,12	0,08	0,04	0,08	0,03
-7	0,20	0,34	0,10	0,21	0,08
-2	0,17	0,5	0,22	0,30	0,14
0	0,23	0,42	0,25	0,30	0,08
10	0,23	0,42	0,29	0,31	0,07
20	0,24	0,45	0,31	0,33	0,08
30	0,26	0,45	0,32	0,34	0,07
45	0,27	0,43	0,31	0,34	0,06
60	0,28	0,39	0,31	0,33	0,04

MAbM: Mittlere Abweichung vom Mittelwert

<b>Fläche Unterhalb der Kurve</b>	
<b>Versuch</b>	<b>AUC (% * min)</b>
1	17
2	29
3	20
Mittelwert	22
MABM	5

MABM: Mittlere Abweichung vom Mittelwert

#### **1.4 Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung von Salmeterol in der Perfusionsflüssigkeit**

<b>Versuch</b>	<b>Konzentration ohne Inkubation (ng/ml)</b>	<b>Konzentration mit Inkubation (ng/ml)</b>
1	4,42	4,57
2	4,38	4,66
3	4,50	4,42
Mittelwert	4,43	4,55
MABM	0,04	0,09

MABM: Mittlere Abweichung vom Mittelwert

## 2 Untersuchung der pulmonalen Pharmakokinetik von IGF-1 in vitro

### 2.1 Ergebnisse der Qualitätsüberprüfungen

#### 2.1.1 TEER Werte der 21 tägigen Messung

TEER Werte ( $\Omega \text{ cm}^2$ )								
Monolayer	1	2	3	4	5	6	MW	Stabw
<b>Tage in Kultur</b>								
3	8	17	38	26	20	10	20	11
4	68	57	112	72	85	29	71	28
5	330	308	355	414	338	501	374	72
6	833	818	968	836	817	681	826	91
7	1347	1392	1351	1704	1391	1248	1406	155
8	1087	1211	1337	1107	1269	1269	1213	99
9	1548	1619	1767	1353	1606	1660	1592	138
10	1583	1589	1700	1400	1476	1585	1556	104
11	1650	1693	1767	1561	1575	1557	1634	85
12	1685	1741	1862	1408	1594	1620	1652	153
13	1658	1675	1745	1474	1606	1728	1648	99
14	1641	1703	1803	1399	1697	1810	1676	150
15	1484	1477	1549	1307	1348	1496	1444	94
16	1358	1356	1472	1144	1305	1396	1339	110
17	1254	1219	1309	1110	1218	1216	1221	65
18	1156	1136	1262	1088	1151	1158	1159	57
19	993	968	1077	818	963	975	966	84
20	959	932	1057	861	953	970	955	63
21	955	911	1044	873	1002	1080	978	79

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung

## 2.1.2 Fluoreszeinpermeationen

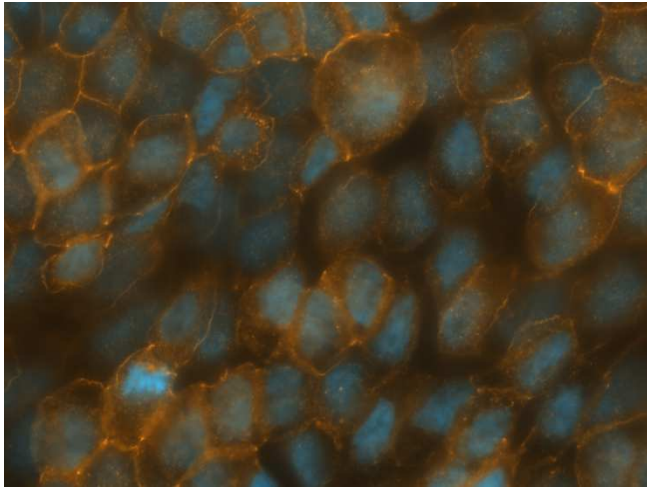
Konzentration von Fluoreszein in der basolateralen Kammer (mM)				Konzentration Donorlösung apikal (mM)	Paap *10 <sup>-8</sup> (cm/s)
Zeit (min)	15	30	60		
<b>Monolayer</b>					
1	0,0020	0,0040	0,0060	20,05	14,28
2	0,0010	0,0019	0,0034	20,46	8,15
3	0,0013	0,0019	0,0037	19,85	8,66
4	0,0008	0,0015	0,0025	20,62	5,65
5	0,0010	0,0016	0,0037	20,35	8,69
6	0,0014	0,0019	0,0033	19,94	7,49
7	0,0010	0,0017	0,0034	19,56	8,32
8	0,0008	0,0013	0,0024	19,35	5,93
9	0,0006	0,0010	0,0021	19,08	5,46
Mittelwert	0,0011	0,0019	0,0034	19,92	8,07
Stabw	0,0004	0,0009	0,0011	0,52	2,67

Stabw: Standardabweichung; Paap: apparenter Permeationskoeffizient

Permeierter Dosisanteil von Fluoreszein (%)			
Zeit (min)	15	30	60
<b>Monolayer</b>			
1	0,031	0,073	0,124
2	0,015	0,033	0,067
3	0,020	0,037	0,075
4	0,013	0,026	0,049
5	0,016	0,030	0,070
6	0,022	0,032	0,069
7	0,016	0,033	0,069
8	0,013	0,026	0,051
9	0,009	0,020	0,044
Mittelwert	0,017	0,034	0,069
Stabw	0,006	0,015	0,023

Stabw: Standardabweichung; Paap: apparenter Permeationskoeffizient

### 2.1.3 Markierung der Tight Junctions



Calu-3 Monolayer mit markierten ZO-1 (orange) und angefärbten Zellkern (blau).



## 2.2 Ergebnisse der Permeationen durch Calu-3 Zellen in Vollmedium

### 2.2.1 Permeationen mit IGF-1 in Vollmedium

Konzentration von IGF-1 in der basolateralen Kammer (ng/mL)					Konz. Donorlsg. apikal (µg/mL)	Paap *10 <sup>-8</sup> (cm/s)
Zeit (min)	60	90	120	150		
Monolayer						
1	1,04	1,39	2,12	2,45	52,82	0,90
2	1,35	1,79	2,59	3,92	53,55	1,44
3	0,93	1,49	1,87	2,96	54,89	1,06
4	1,08	1,63	2,07	3,32	57,66	1,12
5	1,05	1,78	2,34	3,15	54,89	1,15
6	1,11	2,05	3,27	4,80	66,53	1,60
7	1,13	2,15	3,36	5,29	71,04	1,63
8	1,21	2,05	3,27	4,80	70,85	1,47
9	1,16	2,12	3,20	5,58	68,58	1,77
10	1,03	1,88	3,03	5,07	69,66	1,61
11	1,76	2,89	5,16		75,36	1,89
12	1,80	3,20	5,68		77,83	2,08
13	1,38	2,50	4,21		73,20	1,62
Mittelwert	1,23	2,07	3,24	4,13	65,14	1,49
Stabw	0,27	0,53	1,17	1,11	9,06	0,35

Stabw: Standardabweichung; Konz.: Konzentration; Donorlsg.: Donorlösung;

Paap: apparenter Permeationskoeffizient

<b>Permeierter Dosisanteil von IGF-1 (%)</b>				
<b>Zeit (min)</b>	60	90	120	150
<b>Monolayer</b>				
1	0,0062	0,0089	0,0140	0,0172
2	0,0079	0,0112	0,0170	0,0262
3	0,0053	0,0090	0,0120	0,0193
4	0,0058	0,0090	0,0120	0,0195
5	0,0060	0,0107	0,0150	0,0209
6	0,0052	0,0101	0,0168	0,0255
7	0,0049	0,0098	0,0160	0,0258
8	0,0053	0,0096	0,0159	0,0240
9	0,0053	0,0102	0,0161	0,0284
10	0,0046	0,0089	0,0149	0,0254
11	0,0073	0,0127	0,0233	
12	0,0072	0,0136	0,0248	
13	0,0059	0,0113	0,0196	
Mittelwert	0,0059	0,0104	0,0167	0,0232
Stabw	0,0010	0,0015	0,0038	0,0037

Stabw: Standardabweichung

## 2.2.2 Einfluss von IGF-1 in Vollmedium auf die Tight Junctions

TEER Werte der IGF-1 Monolayer ( $\Omega\text{cm}^2$ )			
	Vor Permeation	Nach Permeation	Verhältniss Nach/Vor (%)
<b>Monolayer</b>			
1	1443	388	27
2	1480	385	26
3	1377	372	27
4	1362	383	28
5	1387	451	33
6	1705	538	32
7	1716	573	33
8	1916	563	29
9	1611	512	32
10	1732	534	31
Mittelwert	1573	470	30
Stabw	190	82	3

Stabw: Standardabweichung

### 2.2.3 Permeationen von Insulin in Vollmedium

Konzentration von Insulin in der basolateralen Kammer (ng/mL)					Konz. Donorlsg. apikal ( $\mu\text{g/mL}$ )	Paap $\cdot 10^{-8}$ (cm/s)
Zeit (min)	60	90	120	150		
<b>Monolayer</b>						
1	4,84	5,72	8,59	9,89	89,61	2,00
2	5,43	7,16	10,14	14,21	94,94	2,86
3	5,38	6,98	8,22	14,10	97,02	2,61
4	5,02	7,00	9,04	8,32	104,32	1,34
5	3,29	3,86	5,85	7,40	99,15	1,38
6	2,85	4,68	7,06	7,80	102,43	1,59
7	3,53	4,72	6,42	9,98	100,05	1,91
8	4,52	5,78	9,45		90,80	2,41
9	6,49	10,09	12,39		96,81	2,88
10	4,90	6,09	9,15		92,60	2,13
Mittelwert	4,63	6,21	8,63	10,24	96,77	2,11
Stabw	1,11	1,75	1,91	2,84	4,87	0,57

Stabw: Standardabweichung; Paap: apparenter Permeationskoeffizient

---

<b>Permeierter Dosisanteil von Insulin (%)</b>				
<b>Zeit (min)</b>	60	90	120	150
<b>Monolayer</b>				
1	0,0169	0,0216	0,0336	0,0412
2	0,0179	0,0254	0,0375	0,0543
3	0,0173	0,0242	0,0304	0,0520
4	0,0150	0,0225	0,0307	0,0312
5	0,0104	0,0132	0,0207	0,0274
6	0,0087	0,0152	0,0238	0,0282
7	0,0110	0,0159	0,0226	0,0358
8	0,0156	0,0214	0,0361	
9	0,0209	0,0347	0,0454	
10	0,0165	0,0222	0,0346	
Mittelwert	0,0150	0,0216	0,0315	0,0386
Stabw	0,0038	0,0061	0,0076	0,0110

Stabw: Standardabweichung

## 2.2.4 Einfluss von Insulin in Vollmedium auf die Tight Junctions

TEER Werte der Insulin Monolayer ( $\Omega\text{cm}^2$ )			
	Vor Permeation	Nach Permeation	Verhältniss Nach/Vor (%)
<b>Monolayer</b>			
1	1368	394	29
2	1356	405	30
3	1380	388	28
4	1351	397	29
5	1509	514	34
6	1615	574	36
7	1490	563	38
Mittelwert	1438	462	32
Stabw	101	85	4

Stabw: Standardabweichung

## 2.2.5 Stabilität von IGF-1 und Insulin im Permeationsmedium

Konzentration der Donorlösung in der apikalen Kammer ( $\mu\text{g/mL}$ )				
	IGF-1		Insulin	
	Vor Versuchs- beginn	Nach Versuchs- ende	Vor Versuchs- beginn	Nach Versuchs- ende
<b>Monolayer</b>				
1	52,82	60,16	85,48	81,00
2	53,55	59,92	84,53	87,74
3	54,89	56,10	83,29	79,28
4	57,66	54,28	79,37	95,27
5	54,89	58,26		
Mittelwert	54,72	57,74	83,16	85,82
Stabw	1,85	2,53	2,68	7,28

Stabw: Standardabweichung

## 2.3 Ergebnisse der Permeation von IGF-1 in Vollmedium mit Hemmstoffen der Transzytose/Endozytose

### 2.3.1 Permeation mit Inhibitor Nocodazol

Konzentration von IGF-1 in der basolateralen Kammer (ng/mL) nach 60 min				
Inhibitor	Nocodazol (30 $\mu$ M)	IGF-1 Konz. Donorlsg. ( $\mu$ g/mL)	Kontrolle	IGF-1 Konz. Donorlsg. ( $\mu$ g/mL)
<b>Monolayer</b>				
1	1,65	67,45	2,53	63,92
2	1,98		2,49	
3	1,67		3,10	
4	2,08		2,45	
5	1,43		2,15	
Mittelwert	1,76		2,54	
Stabw	0,26		0,35	

Stabw: Standardabweichung; Konz.: Konzentration; Donorlsg.: Donorlösung

Permeierter Dosisanteil von IGF-1 im Verhältnis zur Kontrolle		
Inhibitor	Nocodazole (30 $\mu$ M)	Kontrolle
<b>Monolayer</b>		
1	0,62	0,99
2	0,74	0,98
3	0,62	1,22
4	0,77	0,96
5	0,53	0,84
Mittelwert	0,66	1,00
Stabw	0,10	0,14

Stabw: Standardabweichung

### 2.3.2 Permeation mit Inhibitor Dynasore

Konzentration von IGF-1 in der basolateralen Kammer (ng/mL) nach 60 min				
Inhibitor	Dynasore (60 $\mu$ M)	IGF-1 Konz. Donorlsg. ( $\mu$ g/mL)	Kontrolle	IGF-1 Konz. Donorlsg. ( $\mu$ g/mL)
<b>Monolayer</b>				
1	1,99	62,08	2,86	62,49
2	1,94		1,86	
3	1,49		2,76	
4	1,41		3,27	
5	1,53		2,10	
Mittelwert	1,67		2,57	
Stabw	0,27		0,58	

Stabw: Standardabweichung; Konz.: Konzentration; Donorlsg.: Donorlösung

Permeierter Dosisanteil von IGF-1 im Verhältnis zur Kontrolle		
Inhibitor	Dynasore (60 $\mu$ M)	Kontrolle
<b>Monolayer</b>		
1	0,78	1,11
2	0,76	0,72
3	0,59	1,07
4	0,55	1,27
5	0,60	0,82
Mittelwert	0,66	1,00
Stabw	0,11	0,22

Stabw: Standardabweichung



### 2.3.3 Permeation mit Inhibitor Phenylarsinoxid

Konzentration von IGF-1 in der basolateralen Kammer (ng/mL) nach 60 min				
Inhibitor	Phenylarsinoxid (5 $\mu$ M)	IGF-1 Konz. Donorlsg. ( $\mu$ g/mL)	Kontrolle	IGF-1 Konz. Donorlsg. ( $\mu$ g/mL)
<b>Monolayer</b>				
1	1,44	74,29	1,28	75,48
2	1,43		1,62	
3	3,08		2,51	
4	1,80		1,35	
5	1,88		1,62	
Mittelwert	1,93		1,68	
Stabw	0,68		0,49	

Stabw: Standardabweichung; Konz.: Konzentration; Donorlsg.: Donorlösung

Permeierter Dosisanteil von IGF-1 im Verhältnis zur Kontrolle		
Inhibitor	Phenylarsinoxid (5 $\mu$ M)	Kontrolle
<b>Monolayer</b>		
1	0,87	0,76
2	0,87	0,97
3	1,87	1,5
4	1,09	0,81
5	1,14	0,97
Mittelwert	1,17	1,00
Stabw	0,41	0,29

Stabw: Standardabweichung

### 2.3.4 Permeation mit Inhibitor Amilorid

Konzentration von IGF-1 in der basolateralen Kammer (ng/mL) nach 60 min				
Inhibitor	Amilorid (50 $\mu$ M)	IGF-1 Konz. Donorlsg. ( $\mu$ g/mL)	Kontrolle	IGF-1 Konz. Donorlsg. ( $\mu$ g/mL)
<b>Monolayer</b>				
1	2,71	70,85	2,53	63,92
2	2,41		2,49	
3	1,98		3,10	
4	3,02		2,45	
5	2,93		2,15	
Mittelwert	2,61		2,54	
Stabw	0,42	0,35		

Stabw: Standardabweichung; Konz.: Konzentration; Donorlsg.: Donorlösung

Permeierter Dosisanteil von IGF-1 im Verhältnis zur Kontrolle		
Inhibitor	Amilorid (50 $\mu$ M)	Kontrolle
<b>Monolayer</b>		
1	0,96	0,99
2	0,85	0,98
3	0,70	1,22
4	1,07	0,96
5	1,04	0,84
Mittelwert	0,92	1,00
Stabw	0,15	0,14

Stabw: Standardabweichung

### 2.3.5 Permeation mit Inhibitor Amantadin

Konzentration von IGF-1 in der basolateralen Kammer (ng/mL) nach 60 min				
Inhibitor	Amantadin (1 mM)	IGF-1 Konz. Donorlsg. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Kontrolle	IGF-1 Konz. Donorlsg. ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>Monolayer</b>				
1	2,09	59,41	2,13	60,88
2	1,38		1,73	
3	1,62		1,60	
4	2,60		1,49	
5	2,17		1,25	
Mittelwert	1,97		1,64	
Stabw	0,48		0,33	

Stabw: Standardabweichung; Konz.: Konzentration; Donorlsg.: Donorlösung

Permeierter Dosisanteil von IGF-1 im Verhältnis zur Kontrolle		
Inhibitor	Amantadin (1 mM)	Kontrolle
<b>Monolayer</b>		
1	1,31	1,30
2	0,86	1,06
3	1,01	0,98
4	1,63	0,91
5	1,36	0,76
Mittelwert	1,23	1,00
Stabw	0,30	0,20

Stabw: Standardabweichung

## 2.3.6 Permeation mit Inhibitor Indometacin

Konzentration von IGF-1 in der basolateralen Kammer (ng/mL) nach 60 min				
Inhibitor	Indometacin (300 µM)	IGF-1 Konz. Donorlsg. (µg/mL)	Kontrolle	IGF-1 Konz. Donorlsg. (µg/mL)
<b>Monolayer</b>				
1	2,16	70,12	2,53	63,92
2	2,43		2,49	
3	2,55		3,10	
4	2,60		2,45	
5	2,59		2,15	
Mittelwert	2,47		2,54	
Stabw	0,18		0,35	

Stabw: Standardabweichung; Konz.: Konzentration; Donorlsg.: Donorlösung

Permeierter Dosisanteil von IGF-1 im Verhältnis zur Kontrolle		
Inhibitor	Indometacin (300 µM)	Kontrolle
<b>Monolayer</b>		
1	0,77	0,99
2	0,87	0,98
3	0,91	1,22
4	0,93	0,96
5	0,93	0,84
Mittelwert	0,88	1,00
Stabw	0,07	0,14

Stabw: Standardabweichung

### 2.3.7 Mittelwert der Konzentrationen von IGF-1 in den Donorlösungen mit Vollmedium

Konzentration von IGF-1 in der Donorlösung ( $\mu\text{g/mL}$ )	
Versuch (H/K)	
Nocodazol (H)	67,45
Phenylarsinoxid (H)	74,29
Dynasore (H)	62,08
Amilorid (H)	70,85
Amantadin (H)	59,41
Indometacin (H)	70,12
Nocodazol (K) Amilorid (K) Indometacin (K)	63,92
Dynasore (K)	62,49
Amantadin (K)	60,88
Phenylarsinoxid (K)	75,48
Mittelwert	66,70
Stabw	5,75

Stabw: Standardabweichung; H: Donorlösung mit Hemmstoff;

K: Donorlösung der Kontrolle

## 2.4 Ergebnisse der Permeationen in BAL

### 2.4.1 Permeation von IGF-1 in BAL als Donorlösung

Konzentration von IGF-1 in der basolateralen Kammer (ng/mL)					Konz. Donorlsg. apikal ( $\mu\text{g/mL}$ )	Paap $\cdot 10^{-8}$ (cm/s)
Zeit (min)	60	90	120	150		
<b>Monolayer</b>						
1	3,92				50,17	2,88
2	4,09				53,80	2,56
3	2,46				52,87	1,72
4	0,28	0,29	0,44	0,69	16,82	0,74
5	0,09	0,17	0,37	0,47	15,97	0,71
6	0,29	0,42	1,10	1,89	15,57	2,87
7	0,08	0,19	0,31	0,70	17,21	1,20
8	0,33	0,46	0,65	0,95	19,71	0,94
9	0,34	0,52	0,71	1,03	20,47	0,67
10	0,51	0,90	1,46	1,86	21,54	1,90
11	0,44	0,71	1,16	1,56	22,26	1,51
12	0,42	0,73	1,01	1,34	21,71	1,27
Mittelwert	1,10	0,49	0,80	1,17	27,34	1,58
Stabw	1,49	0,25	0,40	0,52	15,23	0,82

Stabw: Standardabweichung; Konz.: Konzentration; Donorlsg.: Donorlösung;

Paap: apparenter Permeationskoeffizient

## 2.4.2 Permeation von IGF-1 in Vollmedium (Kontrolle) als Donorlösung

Konzentration von IGF-1 in der basolateralen Kammer (ng/mL)					Konz. Donorlsg. apikal ( $\mu\text{g/mL}$ )	Paap $\cdot 10^{-8}$ (cm/s)
Zeit (min)	60	90	120	150		
<b>Monolayer</b>						
1	2,20				57,54	1,41
2	1,88				55,52	1,25
3	2,16				53,80	1,48
4	0,21	0,28	0,49	0,69	19,97	0,72
5	0,12	0,23	0,38	0,63	18,80	0,76
6	0,22	0,27	0,37	0,54	17,71	0,56
7	0,16	0,42	0,55	0,74	17,33	0,97
8	0,21	0,30	0,41	0,53	17,66	0,58
9	0,40	0,71	1,03	1,47	24,56	1,27
10	0,36	0,56	0,65	1,05	23,33	0,85
11	0,44	0,65	0,99	1,46	25,58	1,18
12	0,38	0,54	0,79	1,14	24,46	0,94
13	0,31	0,52	0,68	0,91	22,04	0,82
14	0,32	0,45	0,59	0,92	24,68	0,72
Mittelwert	0,67	0,45	0,63	0,92	28,78	0,97
Stabw	0,77	0,16	0,23	0,34	14,84	0,30

Stabw: Standardabweichung; Konz.: Konzentration; Donorlsg.: Donorlösung;

Paap: apparenter Permeationskoeffizient

### 2.4.3 Permeation von IGF-1 in BAL mit Hemmstoffen der Transzytose/Endozytose

#### 2.4.3.1 Permeation mit Hemmstoff Nocodazol

Konzentration von IGF-1 in der basolateralen Kammer (ng/mL) nach 60 min				
Inhibitor	Nocodazol (30 µM)	IGF-1 Konz. Donorlsg. (µg/mL)	Kontrolle	IGF-1 Konz. Donorlsg. (µg/mL)
<b>Monolayer</b>				
1	0,98	61,28	1,74	59,91
2	1,46		2,12	
3	0,95		1,87	
4	0,95		2,38	
5	1,24		1,66	
6	0,80	53,21	1,19	51,10
7	0,88		1,46	
8	0,91		1,78	
9	1,22		1,97	
10	1,00		1,34	
Mittelwert	1,04		1,75	
Stabw	0,20		0,36	

Stabw: Standardabweichung; Konz.: Konzentration; Donorlsg.: Donorlösung



<b>Permeierter Dosisanteil von IGF-1 im Verhältnis zur Kontrolle</b>		
<b>Inhibitor</b>	Nocodazol (30 $\mu$ M)	Kontrolle
<b>Monolayer</b>		
1	0,48	0,74
2	0,52	0,91
3	0,54	1,11
4	0,73	1,23
5	0,60	0,83
6	0,51	0,92
7	0,76	1,13
8	0,49	0,99
9	0,49	1,27
10	0,65	0,88
Mittelwert	0,58	1,00
Stabw	0,10	0,18

Stabw: Standardabweichung

## 2.4.3.2 Permeation mit Hemmstoff Dynasore

Konzentration von IGF-1 in der basolateralen Kammer (ng/mL) nach 60 min				
Inhibitor	Dynasore (60 $\mu$ M)	IGF-1 Konz. Donorlsg. ( $\mu$ g/mL)	Kontrolle	IGF-1 Konz. Donorlsg. ( $\mu$ g/mL)
<b>Monolayer</b>				
1	2,19	60,27	1,74	59,91
2	1,64		2,12	
3	2,00		1,87	
4	1,87		2,38	
5	1,89		1,66	
Mittelwert	1,92		1,95	
Stabw	0,20		0,30	

Stabw: Standardabweichung; Konz.: Konzentration; Donorlsg.: Donorlösung

Permeierter Dosisanteil von IGF-1 im Verhältnis zur Kontrolle		
Inhibitor	Dynasore (60 $\mu$ M)	Kontrolle
<b>Monolayer</b>		
1	1,12	0,89
2	0,83	1,08
3	1,02	0,96
4	0,95	1,22
5	0,96	0,85
Mittelwert	0,98	1,00
Stabw	0,11	0,15

Stabw: Standardabweichung

### 2.4.3.3 Mittelwert der Konzentrationen von IGF-1 in Donorlösungen mit BAL

Konzentration von IGF-1 in den Donorlösungen ( $\mu\text{g/mL}$ )	
Versuch (H/K)	
Nocodazol (H)	61,28
	53,21
Nocodazol (K)	59,91
Dynasore (K)	
Nocodazol (K)	51,10
Dynasore (H)	60,27
Mittelwert	57,14
Stabw	4,65

Stabw: Standardabweichung; H: Donorlösung mit Hemmstoff;

K: Donorlösung der Kontrolle

## 2.4.4 Einfluss von IGF-1 in BAL auf die Tight Junctions

### 2.4.4.1 TEER Werte vor und nach der Permeation

TEER Werte der Monolayer mit IGF-1/BAL ( $\Omega\text{cm}^2$ )			
	Vor Permeation	Nach Permeation	Verhältniss Nach/Vor (%)
<b>Monolayer</b>			
1	1314	366	28
2	1262	406	32
3	1310	407	31
4	1770	548	31
5	1777	763	43
6	1886	517	27
7	1796	357	20
8	1646	394	24
9	1555	362	23
10	1415	349	25
11	1480	332	22
12	1392	328	24
Mittelwert	1550	427	28
Stabw	219	126	6

Stabw: Standardabweichung

<b>TEER Werte der Monolayer mit IGF-1/Vollmedium (<math>\Omega\text{cm}^2</math>)</b>			
	Vor Permeation	Nach Permeation	Verhältniss Nach/Vor (%)
<b>Monolayer</b>			
1	1095	406	37
2	1227	384	31
3	1246	398	32
4	1622	539	33
5	1615	706	44
6	1772	334	19
7	1747	279	16
8	1659	271	16
9	1444	353	24
10	1549	424	27
11	1413	341	24
12	1437	402	28
13	1733	418	24
14	1492	403	27
Mittelwert	1504	404	27
Stabw	208	109	8

Stabw: Standardabweichung

### 2.4.4.2 Fluoreszeinpermeation nach der Permeation von IGF-1/BAL

Konzentration von Fluoreszein in der basolateralen Kammer (mM)				Konzentration Donorlösung apikal (mM)	Paap *10 <sup>-7</sup> (cm/s)
Zeit (min)	15	30	60		
<b>Monolayer</b>					
1	0,0028	0,0046	0,0073	19,58	1,74
2	0,0015	0,0034	0,0055	19,44	1,41
3	0,0024	0,0030	0,0049	19,05	1,12
4		0,0028	0,0049	17,57	1,25
5		0,0029	0,0047	18,64	1,12
6		0,0021	0,0037	18,25	0,95
7		0,0020	0,0038	17,64	1,04
Mittelwert	0,0022	0,0030	0,0050	18,60	1,23
Stabw	0,0007	0,0009	0,0012	0,81	0,27

Stabw: Standardabweichung; Paap: apparenter Permeationskoeffizient

### 2.4.4.3 Fluoreszeinpermeation nach der Permeation von IGF-1/Vollmedium

Konzentration von Fluoreszein in der basolateralen Kammer (mM)				Konzentration Donorlösung apikal (mM)	Paap *10 <sup>-7</sup> (cm/s)
Zeit (min)	15	30	60		
<b>Monolayer</b>					
1	0,0016	0,0032	0,0062	19,83	1,54
2	0,0026	0,0028	0,0055	19,58	1,21
3	0,0017	0,0037	0,0056	19,74	1,2
4		0,0023	0,0042	18,88	1,04
5		0,0017	0,0034	18,42	0,9
6		0,0019	0,0041	18,01	1,16
7		0,0020	0,0035	17,66	0,91
Mittelwert	0,0012	0,0025	0,0046	18,87	1,14
Stabw	0,0006	0,0007	0,0011	0,87	0,22

Stabw: Standardabweichung; Paap: apparenter Permeationskoeffizient

### 2.4.5 Stabilität von IGF-1 in BAL-Donorlösung

Konzentration von IGF-1 in der Donorlösung in der apikalen Kammer ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	Vor Versuchsbeginn	Nach Versuchsende
<b>Monolayer</b>		
1	17,93	16,99
2	16,82	16,82
3	15,97	17,05
4	17,21	16,71
Mittelwert	16,98	16,89
Stabw	0,82	0,16

Stabw: Standardabweichung

### 3 Untersuchung der pulmonalen Pharmakokinetik von IGF-1 mithilfe des Lungenperfusionsmodells

#### 3.1 Tatsächlich applizierte Dosis von IGF-1 in den Lungenperfusionsversuchen

<b>Perfusionsversuch</b>	<b>Tatsächlich applizierte Dosis IGF-1 (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>An den Verbindungsstücken adsorbierter Anteil IGF-1 (%)</b>
Trehalose-1	336	0,1
Trehalose-2	652	5,9
Trehalose-3	635	4,7
Mittelwert	541	3,6
MAbM	137	2,3
Seide-Fibroin-1	189	1,7
Seide-Fibroin-2	187	0,2
Seide-Fibroin-3	196	1,6
Mittelwert	191	1,2
MAbM	4	0,5

MAbM: Mittlere Abweichung vom Mittelwert



### 3.2 Ergebnisse der Lungenperfusionsversuche mit IGF-1/Trehalose Applikation

Konzentration von IGF-1 in der Perfusionsflüssigkeit (ng/mL)					
Versuch	1	2	3	Mittelwert	MABM
Zeit (min)					
-0,25	0,13	0	0	0,04	0,06
0	0,30	0	0,28	0,19	0,13
2	0	0,83	1,29	0,71	0,47
5	0	1,00	3,58	1,53	1,37
10	1,29	1,66	4,28	2,41	1,25
20	5,53	3,19	9,37	6,03	2,23
30	8,03	4,66	12,46	8,38	2,72
45	11,9	5,69	14,07	10,55	3,24
60	16,0	8,35	15,08	13,14	3,20

MABM: Mittlere Abweichung vom Mittelwert

In die Perfusionsflüssigkeit verteilter Dosisanteil von IGF-1 (%)					
Versuch	1	2	3	Mittelwert	MABM
Zeit (min)					
-0,25	0,05	0	0	0,02	0,02
0	0,12	0	0,07	0,06	0,04
2	0	0,19	0,31	0,17	0,11
5	0	0,23	0,85	0,36	0,33
10	0,5	0,38	1,01	0,63	0,25
20	2,1	0,74	2,22	1,69	0,63
30	3,45	1,08	2,96	2,5	0,94
45	5,01	1,32	3,35	3,23	1,27
60	6,54	1,94	3,6	4,03	1,68

MABM: Mittlere Abweichung vom Mittelwert

### 3.3 Ergebnisse der Lungenperfusionsversuche mit IGF-1/Fibroin Applikation

Konzentration in der Perfusionsflüssigkeit (ng/mL)					
Versuch	1	2	3	Mittelwert	MAbM
Zeit (min)					
-0,25	0	0,08	0	0,03	0,036
0	0	0,10	0	0,03	0,04
2	0	0,38	0,51	0,30	0,20
5	0	1,23	1,37	0,87	0,58
10	0	1,01	3,91	1,64	1,51
20	0	1,63	5,27	2,30	1,98
30	0,35	3,48	5,91	3,25	1,93
45	0,60	4,95	7,73	4,43	2,55
60	1,08	5,67	9,07	5,27	2,80
80	1,47	10,69	12,68	8,28	4,54

MAbM: Mittlere Abweichung vom Mittelwert

In die Perfusionsflüssigkeit verteilter Dosisanteil von IGF-1 (%)					
Versuch	1	2	3	Mittelwert	MAbM
Zeit (min)					
-0,25	0	0,07	0	0,02	0,03
0	0	0,08	0	0,03	0,04
2	0	0,31	0,39	0,23	0,16
5	0	0,98	1,04	0,67	0,45
10	0	0,81	2,99	1,27	1,15
20	0	1,31	4,04	1,78	1,50
30	0,28	2,8	4,55	2,54	1,51
45	0,47	3,98	5,96	3,47	2,00
60	0,86	4,58	7,00	4,15	2,19
80	1,17	8,62	9,79	6,53	3,57

MAbM: Mittlere Abweichung vom Mittelwert

### 3.4 Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen von IGF-1 in Perfusionsflüssigkeit

Versuch	Konzentration ohne Inkubation (ng/ml)	Konzentration mit Inkubation (ng/ml)
1	16,82	16,44
2	16,82	15,44
3	16,65	16,38
4	14,68	15,32
Mittelwert	16,24	15,90
Stabw	1,04	0,60

Stabw: Standardabweichung

### 3.5 Ergebnisse der Freisetzungversuche von IGF-1/Fibroin-Partikeln

Freigesetzte Menge von IGF-1 in BAL (ng) normiert auf die Einwaage					Einwaage IGF-1-Fibroinpartikel (g)
Zeit (min)	15	30	45	60	
Versuch					
1	15550	16816	36982	33392	1,14
2	9402	24568	36261	34791	1,12
3	9346	26118	34577	37125	1,13
Mittelwert	11433	22500	35940	35103	1,13
MAbM	2745	3790	909	1348	0,01

MAbM: Mittlere Abweichung vom Mittelwert

Freigesetzte Menge von IGF-1 in Wasser (Kontrolle) (ng) normiert auf die Einwaage					Einwaage IGF-1-Fibroinpartikel (g)
Zeit (min)	15	30	45	60	
Versuch					
1	17717	21112	29564	35629	1,09
2	8858	15567	39556	38624	1,10
3	2008	31354	23807	28276	1,12
Mittelwert	9528	22678	30976	34176	1,10
MAbM	3789	2813	4127	1654	0,01

MAbM: Mittlere Abweichung vom Mittelwert





## **E Zusammenfassung**

---





## 1 Zusammenfassung

Für inhalativ applizierte Arzneimittel spielt das Ausmaß der pulmonalen Absorption eine entscheidende Rolle. Für Substanzen, die lokal in der Lunge wirken sollen, sind für eine gute Wirksamkeit hohe lokale Wirkstoffkonzentrationen, und für eine geringe Nebenwirkungsrate niedrige systemische Plasmaspiegel wichtig. Sollen allerdings Substanzen das Lungenepithel überwinden und im systemischen Kreislauf wirken, ist eine hohe systemische Verfügbarkeit für eine gute Wirkung gewünscht. Das Ziel dieser Studie war es mit in vitro und ex vivo Methoden das Absorptions- und Permeationsverhalten von pulmonal applizierten Substanzen zu studieren.

Der Transportmechanismus über das Lungenepithel des langwirksamen  $\beta_2$ -Agonisten Salmeterol wurde mithilfe des humanen ex vivo Lungenperfusionsmodells untersucht. Die Anwendung von L-Carnitin als Hemmstoff von organischen Kationen/Carnitin Transportern (OCT/N) bewirkte eine Verringerung der pulmonalen Absorption von Salmeterol von ca. 90 %, was auf eine Beteiligung von Transportern, möglicherweise des OCTN2 oder OTCN1, für den Transport von Salmeterol über das Lungenepithel hindeutete. Es wurde somit zum ersten Mal erfolgreich gezeigt, dass Salmeterol wahrscheinlich als Substrat der Transportproteine fungiert und der Übertritt über das Lungenepithel von organischen Kationen/Carnitin Transportern abhängig ist. Bisher wurde eine Interaktion von Salmeterol mit den OCT/N nur in in vitro Versuchen studiert und Salmeterol wurde nur als Hemmstoff und nicht als Substrat untersucht. Die Beteiligung eines Transporters für die pulmonale Absorption von Salmeterol steht außerdem im Einklang mit Untersuchungen über weitere  $\beta_2$ -Agonisten wie das kurzwirksame Salbutamol und das langwirksame GW597901. Somit scheinen sowohl lipophile als auch hydrophile  $\beta_2$ -Agonisten Substrate für die OCT/N zu sein.

Die Fähigkeit von IGF-1, nach pulmonaler Applikation in den systemischen Kreislauf zu gelangen, wurde in der vorliegenden Studie mit Hilfe des Lungenperfusionsmodells untersucht. Das IGF-1 wurde gebunden an Trehalose oder an Fibroin als Pulver verabreicht. Die Trehalose sollte eine schnelle Abgabe des IGF-1 bewirken, und das Fibroin sollte zum einen ein Trägermaterial mit schützenden Eigenschaften für das IGF-1 darstellen, und zum anderen sollte eine mögliche

verzögerte Freisetzung von IGF-1 aus Fibroin in einem ex vivo Modell untersucht werden, die in vorausgegangenen in vitro Versuchen über 3 h lang vorhanden war. Das Peptid wurde nach der Applikation sowohl der Trehalosepartikel als auch der Fibroinpartikel pulmonal absorbiert und folgte einer linearen Verteilungskinetik. Dieses lineare Absorptionsverhalten des IGF-1 war vergleichbar mit der Kinetik von inhalativem Insulin, die in in vivo Studien beobachtet wurde. Somit konnte gezeigt werden, dass das IGF-1 nach pulmonaler Applikation systemisch verfügbar sein könnte und eine vergleichbare pulmonale Pharmakokinetik wie das strukturell ähnliche Insulin besitzt. Außerdem unterschied sich das Absorptionsverhalten von IGF-1, gebunden an Trehalose, nicht signifikant von dem von IGF-1/Fibroin, was im Gegensatz zu in vitro Untersuchungen stand, in denen das IGF-1 verzögert aus Fibroin freigesetzt wurde. Somit wirkte sich die kontrollierte Abgabe in vitro nicht auf die Verteilungskinetik ex vivo aus. Daraus ergibt sich, dass sowohl Trehalose als auch Fibroin als Trägermaterial für IGF-1 zur pulmonalen Applikation geeignet wären, und dass IGF-1, gebunden an Fibroin eine Formulierung wäre, die zum einen das IGF-1 schützen kann und die zum anderen eine gleiche pulmonale Kinetik wie IGF-1, gebunden an schnell auflösende Trägersubstanzen, besitzt. Außerdem wurde dadurch die Wichtigkeit betont, die Pharmakokinetik von pulmonal verabreichten Substanzen am intakten Organ mit erhaltener Komplexität und Funktionalität zu untersuchen, und dass das Lungenperusionsmodell hierfür eine geeignete Methode darstellt. Darüber hinaus wurde belegt, dass mithilfe des Lungenperusionsmodells erfolgreich pharmakokinetische Daten für nieder- und höhermolekulare Substanzen gesammelt werden können, die als Aerosol oder als Pulver appliziert werden.

Auch in den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten in vitro Permeationsversuchen, die mit der Bronchialepithelzelllinie Calu-3 durchgeführt wurden, zeigte IGF-1 vergleichbare lineare Permeationseigenschaften wie das Insulin, mit einem apparenten Permeationskoeffizienten von  $1,49 \cdot 10^{-8}$  cm/sec für IGF-1 und  $2,11 \cdot 10^{-8}$  cm/sec für Insulin. Das IGF-1 schien durch die Calu-3 Zellen sowohl parazellulär als auch transzytotisch zu permeieren, wie es für Makromoleküle generell vermutet wird. Durch die Verwendung von Hemmstoffen der Transzytose bzw. bestimmter endozytotischer Mechanismen in den Permeationsstudien konnte gezeigt werden, dass, wie bereits genannt, der Transport durch die Zellen eine wichtige Rolle für den Übertritt von IGF-1 über Calu-3 Zellmonolayer spielte. Die

Studien ergaben außerdem, dass die zelluläre Aufnahme des IGF-1 unabhängig von Clathrin und abhängig von Dynamin war.

Der Einsatz einer humanen bronchioalveolären Lavage in den Permeationsversuchen bewirkte zum einen eine Erhöhung des Transportes von IGF-1 durch die Calu-3 Zellen, und zum anderen war die zelluläre Aufnahme in diesem Fall unabhängig von Dynamin und unterschied sich somit von den vorherigen Untersuchungen, in denen keine Lavage eingesetzt wurde. Das bedeutet, dass Faktoren in einer bronchioalveolären Lavage enthalten waren, die sowohl das Ausmaß der Permeation als auch den Mechanismus der zellulären Aufnahme von IGF-1 in Calu-3 Zellen beeinflussten.

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Arbeit erfolgreich weitere Hinweise für die Beteiligung von Transportern an der pulmonalen Absorption von  $\beta_2$ -Agonisten mithilfe des ex vivo Lungenperfusionsmodells gefunden werden, was somit eine wertvolle Ergänzung zu bisher vorhanden in vitro Studien darstellt. Daneben wurde zum ersten Mal gezeigt, dass das IGF-1 nach Applikation in die Lunge pulmonal absorbiert werden könnte. Das belegt den Nutzen der Lunge als Eintrittsort in den systemischen Kreislauf, was vor allem für peptidische Arzneistoffe von Bedeutung ist.

## 2 Summary

The extent of the pulmonary absorption plays an important role for drugs applied via inhalation. For substances meant to exhibit local effects within the lung, high local concentrations are crucial for maximum efficacy, and for a low rate of systemic adverse effects low plasma levels are advantageous. But if substances are meant to pass the lung epithelia and act in the systemic circulation a high systemic availability is requested for good efficacy.

The aim of this study was to investigate the absorption and permeation behavior of pulmonarily applied substances using in vitro and ex vivo methods.

The transport mechanism of the long acting  $\beta_2$ -agonist salmeterol through lung epithelia was studied with the help of an ex vivo lung perfusion model. The organic cation/carnitine transporter inhibitor l-carnitine caused a decrease of the pulmonary absorption of salmeterol of about 90 %, indicating an involvement of transporters, possibly OCTN2 or OCTN1, for the uptake of salmeterol through the lung epithelia. For the first time it was successfully shown that salmeterol acts as a substrate for transport proteins and that its transport through the lung epithelia is dependent on the organic cation/carnitine transporters (OCT/N). So far the interaction of salmeterol with the OCT/N had been studied only in vitro and salmeterol had been solely described as an inhibitor and not as a substrate. Furthermore the results on the pulmonary absorption of salmeterol are in accordance with studies about other  $\beta_2$ -agonists like the short acting salbutamol and the long acting GW597901. Apparently, lipophilic and hydrophilic  $\beta_2$ -agonists are substrates for the OCT/N.

The pulmonary absorption of IGF-1 was investigated in this study using the lung perfusion model. IGF-1 was applied bound to trehalose or fibroin. The trehalose was used for a fast release of IGF-1. The fibroin as a carrier was meant to provide a protection of IGF-1, and a possible sustained release that was shown in previous in vitro assays over about 3 h, was to be studied in an ex vivo model. The peptide was absorbed pulmonarily after application of the trehalose and fibroin microparticles and exhibited linear distribution kinetics. This linear absorption behavior of IGF-1 was comparable to the kinetics of inhaled insulin observed in in vivo studies. Therefore it was shown that IGF-1 might be systemically available after pulmonary application and that IGF-1 displays comparable pulmonary pharmacokinetics to the structurally

similar insulin. Additionally, the absorption behavior of IGF-1 bound to trehalose was not significantly different from IGF-1/fibroin, which was in contrast to in vitro studies showing a sustained release of IGF-1 bound to fibroin. Thus, the in vitro controlled release was not mirrored in the distribution kinetics ex vivo. This suggests that both trehalose and fibroin are suitable carriers for pulmonary application of IGF-1 and that IGF-1 bound to fibroin provides a formulation that is able to protect IGF-1 and possesses comparable pulmonary kinetics to IGF-1 bound to fast dissolving carriers. Additionally these data demonstrated the importance to study the pharmacokinetics of pulmonarily applied substances by using the intact organ with conserved complexity and functionality, and that the human isolated perfused lung is a suitable model. Furthermore it was proven, that pharmacokinetic data of low and high molecular compounds applied as aerosol or powder, can be successfully obtained using the lung perfusion model.

The in vitro permeation experiments of the present study employing Calu-3 bronchial epithelial cells also showed a linear absorption behavior of IGF-1 comparable to that of insulin, with an apparent permeability coefficient of  $1,49 \cdot 10^{-8}$  cm/sec for IGF-1 and  $2,11 \cdot 10^{-8}$  cm/sec for insulin. IGF-1 apparently passed the Calu-3 cells via a paracellular and transcytotic mechanisms, which are thought to be the major routes of macromolecules. The use of inhibitors of transcytosis and certain endocytotic pathways showed that the transport through the cells was important for the passage of IGF-1 through Calu-3 cell monolayers, as mentioned before. Furthermore the studies revealed that the cellular uptake of IGF-1 was independent of clathrin and dependent on dynamin.

Human bronchoalveolar lavage caused an increase of the IGF-1 transport through the Calu-3 cells and in contrast to former investigations without a lavage the cellular uptake was independent of dynamin in this case. That implies that the bronchoalveolar lavage contained factors influencing both the extent and the mechanism of the cellular IGF-1 uptake into Calu-3 cells.

In conclusion, this work employing an ex vivo lung perfusion model provides additional evidence for the involvement of transporters in the pulmonary absorption of  $\beta_2$ -agonists. These data demonstrate a valuable extension of knowledge compared to previous in vitro studies. Furthermore, for the first time it has been shown that IGF-1 might be pulmonarily absorbed after application to the lung. This shows the suitability

of the lung as point of entrance into the systemic circulation, which is especially interesting for peptide drugs.

## F Abkürzungsverzeichnis

Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

Abb.	Abbildung
ASP <sup>+</sup>	4-(4-(dimethylamini) styryl)-N-methylpyridinium iodide
AUC	Fläche unterhalb der Kurve
BAL	Bronchioalveoläre Lavage
BIPAP	Biphasic positive airway pressure
BSA	Bovines Serum Albumin
COPD	Chronisch obstruktive Lungenkrankheit
DA	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	Fetales bovines Serum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FL	Lungenflügel
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IGFBP	Insulin-like Growth Factor Binding Protein
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry
LPM	Lungenperfusionsmodell
M	männlich
MAbM	Mittlere Abweichung vom Mittelwert
MG	Molekulargewicht
ML	Mittellappen
MMD	Mittlerer Massendurchmesser
mRNA	Messenger RNA
MW	Mittelwert
OCT	Organischer Kationentransporter

OCTN	Organischer Kationen und Carnitin Transporter
OL	Oberlappen
Paap	Aparenter Permeationskoeffizient
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEEP	Positive End Expiratory Pressure
$P_{\max}$	Maximaler Beatmungsdruck
$R^2$	Bestimmtheitsmaß
Stabw	Standardabweichung
siRNA	Small interfering RNA
Tab.	Tabelle
TEA	Triethylamin
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand
UL	Untelappen
W	weiblich
ZO	Zona Occludin Protein



## G Literaturverzeichnis

- [1] J.S. Patton, Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **19**: 3-36; 1996.
- [2] D. Bösch, Lunge und Atemwege, herausgegeben von Steffel, J. und Lüscher T.; *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*; 2014.
- [3] R. Wattiez, P. Falmagne, Proteomics of bronchoalveolar lavage fluid, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **815**: 169-178; 2005.
- [4] A. Gunther, C. Ruppert, R. Schmidt, P. Markart, F. Grimminger, D. Walmrath, W. Seeger, Surfactant alteration and replacement in acute respiratory distress syndrome, *Respir Res*, **2**: 353-364; 2001.
- [5] I. Noel-Georis, A. Bernard, P. Falmagne, R. Wattiez, Database of bronchoalveolar lavage fluid proteins, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **771**: 221-236; 2002.
- [6] B. Magi, E. Bargagli, L. Bini, P. Rottoli, Proteome analysis of bronchoalveolar lavage in lung diseases, *Proteomics*, **6**: 6354-6369; 2006.
- [7] J. Vestbo, S.S. Hurd, A.G. Agusti, P.W. Jones, C. Vogelmeier, A. Anzueto, P.J. Barnes, L.M. Fabbri, F.J. Martinez, M. Nishimura, R.A. Stockley, D.D. Sin, R. Rodriguez-Roisin, Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary, *Am J Respir Crit Care Med*, **187**: 347-365; 2013.
- [8] M. Decramer, S. Rennard, T. Troosters, D.W. Mapel, N. Giardino, D. Mannino, E. Wouters, S. Sethi, C.B. Cooper, COPD as a lung disease with systemic consequences--clinical impact, mechanisms, and potential for early intervention, *Copd*, **5**: 235-256; 2008.
- [9] Fachinformation Salbutamol-ratiopharm N Dosieraerosol, *gefunden auf [www.fachinfo.de](http://www.fachinfo.de)*; Zugriff 03/2015.
- [10] Fachinformation Berotec N 100 µg Dossier-Aerosol, *gefunden auf [www.fachinfo.de](http://www.fachinfo.de)*; Zugriff 03/2015.
- [11] Fachinformation Serevent Dossier-Aerosol/Serevent Diskus, *gefunden auf [www.fachinfo.de](http://www.fachinfo.de)*; Zugriff 03/2015.
- [12] Fachinformtion Foradil P, *gefunden auf [www.fachinfo.de](http://www.fachinfo.de)*; Zugriff 03/2015.
- [13] Fachinformation Aerodur Turbohaler, *gefunden auf [www.fachinfo.de](http://www.fachinfo.de)*; Zugriff 04/2015.

- [14] Fachinformation Ultibro Breezhaler, *gefunden auf www.fachinfo.de*; Zugriff 04/2015.
- [15] Fachinformation Atrovent N Dosieraerosol, *gefunden auf www.fachinfo.de*; Zugriff 03/2015.
- [16] Fachinformation Spiriva Respimat, *gefunden auf www.fachinfo.de*; Zugriff 03/2015.
- [17] Fachinformation Eklira Genuair 322 Mikrogramm, *gefunden auf www.fachinfo.de*; Zugriff 04/2015.
- [18] E.D. Bateman, S.S. Hurd, P.J. Barnes, J. Bousquet, J.M. Drazen, M. FitzGerald, P. Gibson, K. Ohta, P. O'Byrne, S.E. Pedersen, E. Pizzichini, S.D. Sullivan, S.E. Wenzel, H.J. Zar, Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary, *Eur Respir J*, **31**: 143-178; 2008.
- [19] K. Nahar, N. Gupta, R. Gauvin, S. Absar, B. Patel, V. Gupta, A. Khademhosseini, F. Ahsan, In vitro, in vivo and ex vivo models for studying particle deposition and drug absorption of inhaled pharmaceuticals, *Eur J Pharm Sci*, **49**: 805-818; 2013.
- [20] L.E. Mather, A. Woodhouse, M.E. Ward, S.J. Farr, R.A. Rubsamen, L.G. Eltherington, Pulmonary administration of aerosolised fentanyl: pharmacokinetic analysis of systemic delivery, *Br J Clin Pharmacol*, **46**: 37-43; 1998.
- [21] S.A. Cryan, N. Sivadas, L. Garcia-Contreras, In vivo animal models for drug delivery across the lung mucosal barrier, *Adv Drug Deliv Rev*, **59**: 1133-1151; 2007.
- [22] M.T. Marino, D. Costello, R. Baughman, A. Boss, J. Cassidy, C. Damico, S. van Marle, A. van Vliet, P.C. Richardson, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled GLP-1 (MKC253): proof-of-concept studies in healthy normal volunteers and in patients with type 2 diabetes, *Clin Pharmacol Ther*, **88**: 243-250; 2010.
- [23] K. Rave, S. Bott, L. Heinemann, S. Sha, R.H. Becker, S.A. Willavize, T. Heise, Time-action profile of inhaled insulin in comparison with subcutaneously injected insulin lispro and regular human insulin, *Diabetes Care*, **28**: 1077-1082; 2005.
- [24] Y. Qi, G. Zhao, D. Liu, Z. Shriver, M. Sundaram, S. Sengupta, G. Venkataraman, R. Langer, R. Sasisekharan, Delivery of therapeutic levels of heparin and low-molecular-weight heparin through a pulmonary route, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**: 9867-9872; 2004.
- [25] Exubera Prescribing Information and Medication Guide Sept 2008, *gefunden auf www.fda.gov*; Zugriff 01/2015.

- [26] J. Kling, Inhaled insulin's last gasp?, *Nat Biotechnol*, **26**: 479-480; 2008.
- [27] Prescribing Information Afreza, *gefunden auf www.mannkindkorp.com*; Zugriff 12/2014.
- [28] R. Siekmeier, G. Scheuch, Inhaled insulin--does it become reality?, *J Physiol Pharmacol*, **59 Suppl 6**: 81-113; 2008.
- [29] J.S. Patton, C.S. Fishburn, J.G. Weers, The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery, *Proc Am Thorac Soc*, **1**: 338-344; 2004.
- [30] M. Haghi, H.X. Ong, D. Traini, P. Young, Across the pulmonary epithelial barrier: Integration of physicochemical properties and human cell models to study pulmonary drug formulations, *Pharmacol Ther*. 2014.
- [31] K. Bleasby, J.C. Castle, C.J. Roberts, C. Cheng, W.J. Bailey, J.F. Sina, A.V. Kulkarni, M.J. Hafey, R. Evers, J.M. Johnson, R.G. Ulrich, J.G. Slatter, Expression profiles of 50 xenobiotic transporter genes in humans and pre-clinical species: A resource for investigations into drug disposition, *Xenobiotica*, **36**: 963-988; 2006.
- [32] C. Bosquillon, Drug transporters in the lung--do they play a role in the biopharmaceutics of inhaled drugs?, *J Pharm Sci*, **99**: 2240-2255; 2010.
- [33] R.H. Hastings, H.G. Folkesson, M.A. Matthay, Mechanisms of alveolar protein clearance in the intact lung, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **286**: L679-689; 2004.
- [34] K.J. Kim, A.B. Malik, Protein transport across the lung epithelial barrier, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **284**: L247-259; 2003.
- [35] R. Yumoto, H. Nishikawa, M. Okamoto, H. Katayama, J. Nagai, M. Takano, Clathrin-mediated endocytosis of FITC-albumin in alveolar type II epithelial cell line RLE-6TN, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **290**: L946-955; 2006.
- [36] R. Yumoto, S. Suzuka, K. Oda, J. Nagai, M. Takano, Endocytic uptake of FITC-albumin by human alveolar epithelial cell line A549, *Drug Metab Pharmacokinet*, **27**: 336-343; 2012.
- [37] M. Ikehata, R. Yumoto, Y. Kato, J. Nagai, M. Takano, Mechanism of insulin uptake in rat alveolar type II and type I-like epithelial cells, *Biol Pharm Bull*, **32**: 1765-1769; 2009.
- [38] K. Oda, R. Yumoto, J. Nagai, H. Katayama, M. Takano, Mechanism underlying insulin uptake in alveolar epithelial cell line RLE-6TN, *Eur J Pharmacol*, **672**: 62-69; 2011.

- [39] R. Bahhady, K.J. Kim, Z. Borok, E.D. Crandall, W.C. Shen, Characterization of protein factor(s) in rat bronchoalveolar lavage fluid that enhance insulin transport via transcytosis across primary rat alveolar epithelial cell monolayers, *Eur J Pharm Biopharm*, **69**: 808-816; 2008.
- [40] R. Bahhady, K.J. Kim, Z. Borok, E.D. Crandall, W.C. Shen, Enhancement of insulin transport across primary rat alveolar epithelial cell monolayers by endogenous cellular factor(s), *Pharm Res*, **24**: 1713-1719; 2007.
- [41] A. Hussain, F. Ahsan, Indication of transcytotic movement of insulin across human bronchial epithelial cells, *J Drug Target*, **14**: 181-190; 2006.
- [42] C. Le Roy, J.L. Wrana, Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**: 112-126; 2005.
- [43] G.J. Doherty, H.T. McMahon, Mechanisms of endocytosis, *Annu Rev Biochem*, **78**: 857-902; 2009.
- [44] S. Mayor, R.E. Pagano, Pathways of clathrin-independent endocytosis, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**: 603-612; 2007.
- [45] B. Greene, S.H. Liu, A. Wilde, F.M. Brodsky, Complete reconstitution of clathrin basket formation with recombinant protein fragments: adaptor control of clathrin self-assembly, *Traffic*, **1**: 69-75; 2000.
- [46] S.L. Schmid, Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process, *Annu Rev Biochem*, **66**: 511-548; 1997.
- [47] S.A. Mousavi, L. Malerod, T. Berg, R. Kjekken, Clathrin-dependent endocytosis, *Biochem J*, **377**: 1-16; 2004.
- [48] A. Fotin, Y. Cheng, P. Sliz, N. Grigorieff, S.C. Harrison, T. Kirchhausen, T. Walz, Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy, *Nature*, **432**: 573-579; 2004.
- [49] H.T. McMahon, E. Boucrot, Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **12**: 517-533; 2011.
- [50] X. Chen, N.G. Irani, J. Friml, Clathrin-mediated endocytosis: the gateway into plant cells, *Curr Opin Plant Biol*, **14**: 674-682; 2011.
- [51] F.G. van der Goot, J. Gruenberg, Intra-endosomal membrane traffic, *Trends Cell Biol*, **16**: 514-521; 2006.
- [52] R.G. Parton, K. Simons, The multiple faces of caveolae, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**: 185-194; 2007.

- [53] I.R. Nabi, P.U. Le, Caveolae/raft-dependent endocytosis, *J Cell Biol*, **161**: 673-677; 2003.
- [54] H.A. Anderson, Y. Chen, L.C. Norkin, Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae, *Mol Biol Cell*, **7**: 1825-1834; 1996.
- [55] E. Stang, J. Kartenbeck, R.G. Parton, Major histocompatibility complex class I molecules mediate association of SV40 with caveolae, *Mol Biol Cell*, **8**: 47-57; 1997.
- [56] K. Sandvig, S. Pust, T. Skotland, B. van Deurs, Clathrin-independent endocytosis: mechanisms and function, *Curr Opin Cell Biol*, **23**: 413-420; 2011.
- [57] A. El-Sayed, H. Harashima, Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis, *Mol Ther*, **21**: 1118-1130; 2013.
- [58] C. Lamaze, A. Dujancourt, T. Baba, C.G. Lo, A. Benmerah, A. Dautry-Varsat, Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway, *Mol Cell*, **7**: 661-671; 2001.
- [59] R. Rohatgi, H.Y. Ho, M.W. Kirschner, Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate, *J Cell Biol*, **150**: 1299-1310; 2000.
- [60] S. Sabharanjak, P. Sharma, R.G. Parton, S. Mayor, GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway, *Dev Cell*, **2**: 411-423; 2002.
- [61] J.G. Donaldson, Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane, *J Biol Chem*, **278**: 41573-41576; 2003.
- [62] S. Kumari, S. Mg, S. Mayor, Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell, *Cell Res*, **20**: 256-275; 2010.
- [63] O.O. Glebov, N.A. Bright, B.J. Nichols, Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells, *Nat Cell Biol*, **8**: 46-54; 2006.
- [64] R. Levin, S. Grinstein, D. Schlam, Phosphoinositides in phagocytosis and macropinocytosis, *Biochim Biophys Acta*: 2014.
- [65] H. Koepsell, H. Endou, The SLC22 drug transporter family, *Pflugers Arch*, **447**: 666-676; 2004.
- [66] G. Horvath, N. Schmid, M.A. Fragoso, A. Schmid, G.E. Conner, M. Salathe, A. Wanner, Epithelial organic cation transporters ensure pH-dependent drug absorption in the airway, *Am J Respir Cell Mol Biol*, **36**: 53-60; 2007.

- [67] H. Koepsell, K. Lips, C. Volk, Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications, *Pharm Res*, **24**: 1227-1251; 2007.
- [68] K.S. Lips, C. Volk, B.M. Schmitt, U. Pfeil, P. Arndt, D. Miska, L. Ermert, W. Kummer, H. Koepsell, Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium, *Am J Respir Cell Mol Biol*, **33**: 79-88; 2005.
- [69] K.S. Lips, A. Luehrmann, T. Tschernig, T. Stoeger, F. Alessandrini, V. Grau, R.V. Haberberger, H. Koepsell, R. Pabst, W. Kummer, Down-regulation of the non-neuronal acetylcholine synthesis and release machinery in acute allergic airway inflammation of rat and mouse, *Life Sciences*, **80**: 2263-2269; 2007.
- [70] M. Sakagami, In vivo, in vitro and ex vivo models to assess pulmonary absorption and disposition of inhaled therapeutics for systemic delivery, *Adv Drug Deliv Rev*, **58**: 1030-1060; 2006.
- [71] C.A. Fernandes, R. Vanbever, Preclinical models for pulmonary drug delivery, *Expert Opin Drug Deliv*, **6**: 1231-1245; 2009.
- [72] H.L. Winton, H. Wan, M.B. Cannell, D.C. Gruenert, P.J. Thompson, D.R. Garrod, G.A. Stewart, C. Robinson, Cell lines of pulmonary and non-pulmonary origin as tools to study the effects of house dust mite proteinases on the regulation of epithelial permeability, *Clin Exp Allergy*, **28**: 1273-1285; 1998.
- [73] J.J. Salomon, V.E. Muchitsch, J.C. Gausterer, E. Schwagerus, H. Huwer, N. Daum, C.M. Lehr, C. Ehrhardt, The cell line NCI-H441 is a useful in vitro model for transport studies of human distal lung epithelial barrier, *Mol Pharm*, **11**: 995-1006; 2014.
- [74] N.R. Mathia, J. Timoszyk, P.I. Stetsko, J.R. Megill, R.L. Smith, D.A. Wall, Permeability characteristics of calu-3 human bronchial epithelial cells: in vitro-in vivo correlation to predict lung absorption in rats, *J Drug Target*, **10**: 31-40; 2002.
- [75] R.W. Niemeier, The isolated perfused lung, *Environ Health Perspect*, **56**: 35-41; 1984.
- [76] P.R. Byron, N.S. Roberts, A.R. Clark, An isolated perfused rat lung preparation for the study of aerosolized drug deposition and absorption, *J Pharm Sci*, **75**: 168-171; 1986.
- [77] H.M. Mehendale, L.S. Angevine, Y. Ohmiya, The isolated perfused lung--a critical evaluation, *Toxicology*, **21**: 1-36; 1981.
- [78] D.D. Morgan, D. Warshawsky, R.W. Niemeier, E. Bingham, The Pharmacokinetics of Benzo[a]Pyrene in the Isolated Perfused Rabbit Lung - the

- Influence of Benzo[a]Pyrene, Normal-Dodecane, Particulate, or Sulfur-Dioxide, *Toxicology*, **33**: 275-289; 1984.
- [79] Y. Pang, M. Sakagami, P.R. Byron, The pharmacokinetics of pulmonary insulin in the in vitro isolated perfused rat lung: implications of metabolism and regional deposition, *Eur J Pharm Sci*, **25**: 369-378; 2005.
- [80] M. Sakagami, P.R. Byron, J. Venitz, F. Rypacek, Solute disposition in the rat lung in vivo and in vitro: determining regional absorption kinetics in the presence of mucociliary escalator, *J Pharm Sci*, **91**: 594-604; 2002.
- [81] A. Tronde, B. Norden, A.B. Jeppsson, P. Brunmark, E. Nilsson, H. Lennernas, U.H. Bengtsson, Drug absorption from the isolated perfused rat lung--correlations with drug physicochemical properties and epithelial permeability, *J Drug Target*, **11**: 61-74; 2003.
- [82] A. Linder, G. Friedel, P. Fritz, K.T. Kivisto, M. McClellan, H. Toomes, The ex-vivo isolated, perfused human lung model: description and potential applications, *Thorac Cardiovasc Surg*, **44**: 140-146; 1996.
- [83] M. Freiwald, A. Valotis, A. Kirschbaum, M. McClellan, T. Murdter, P. Fritz, G. Friedel, M. Thomas, P. Hogger, Monitoring the initial pulmonary absorption of two different beclomethasone dipropionate aerosols employing a human lung reperfusion model, *Respir Res*, **6**: 21; 2005.
- [84] M. Gnadt, B. Trammer, M. Freiwald, B. Kardziej, M.K. Bayliss, C.D. Edwards, M. Schmidt, G. Friedel, P. Hogger, Methacholine delays pulmonary absorption of inhaled beta(2)-agonists due to competition for organic cation/carnitine transporters, *Pulm Pharmacol Ther*, **25**: 124-134; 2012.
- [85] M. Gnadt, B. Trammer, B. Kardziej, M.K. Bayliss, C.D. Edwards, M. Schmidt, P. Hogger, Comparison of the bronchodilating effects of inhaled beta(2)-agonists after methacholine challenge in a human lung reperfusion model, *Eur J Pharm Biopharm*, **81**: 617-626; 2012.
- [86] R.F. Phalen, M.J. Oldham, R.K. Wolff, The relevance of animal models for aerosol studies, *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, **21**: 113-124; 2008.
- [87] K.C. Stone, R.R. Mercer, P. Gehr, B. Stockstill, J.D. Crapo, Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung, *Am J Respir Cell Mol Biol*, **6**: 235-243; 1992.
- [88] H. Derendorf, G. Hochhaus, H. Mollmann, Evaluation of pulmonary absorption using pharmacokinetic methods, *J Aerosol Med*, **14 Suppl 1**: S9-17; 2001.
- [89] L. Borgstrom, M. Nilsson, A method for determination of the absolute pulmonary bioavailability of inhaled drugs: terbutaline, *Pharm Res*, **7**: 1068-1070; 1990.

- [90] P.T. Daley-Yates, A.C. Price, J.R. Sisson, A. Pereira, N. Dallow, Beclomethasone dipropionate: absolute bioavailability, pharmacokinetics and metabolism following intravenous, oral, intranasal and inhaled administration in man, *Br J Clin Pharmacol*, **51**: 400-409; 2001.
- [91] J. Beier, J. van Noord, A. Deans, J. Brooks, C. Maden, S. Baggen, R. Mehta, A. Cahn, Safety and efficacy of dual therapy with GSK233705 and salmeterol versus monotherapy with salmeterol, tiotropium, or placebo in a crossover pilot study in partially reversible COPD patients, *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, **7**: 153-164; 2012.
- [92] M. Cazzola, R. Testi, M.G. Matera, Clinical pharmacokinetics of salmeterol, *Clin. Pharmacokinet.*, **41**: 19-30; 2002.
- [93] Molekulare Daten von Salmeterol, *gefunden auf www.drugbank.ca*; Zugriff 07/2014.
- [94] M. Gnadt, Pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization of inhaled  $\beta_2$  - agonists using the isolated human lung perfusion model: Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie; 2011.
- [95] Molekulare Daten von Salbutamol, *gefunden auf www.drugbank.ca*; Zugriff 07/2014.
- [96] C. Ehrhardt, C. Kneuer, C. Bies, C.M. Lehr, K.J. Kim, U. Bakowsky, Salbutamol is actively absorbed across human bronchial epithelial cell layers, *Pulm Pharmacol Ther*, **18**: 165-170; 2005.
- [97] M. Haghi, D. Traini, M. Bebawy, P.M. Young, Deposition, diffusion and transport mechanism of dry powder microparticulate salbutamol, at the respiratory epithelia, *Mol Pharm*, **9**: 1717-1726; 2012.
- [98] M. Mamlouk, P.M. Young, M. Bebawy, M. Haghi, S. Mamlouk, V. Mulay, D. Traini, Salbutamol sulfate absorption across Calu-3 bronchial epithelia cell monolayer is inhibited in the presence of common anionic NSAIDs, *J Asthma*, **50**: 334-341; 2013. Abstract.
- [99] J.J. Salomon, Y. Hagos, S. Petzke, A. Kuhne, J.C. Gausterer, K.I. Hosoya, C. Ehrhardt, Beta-2 Adrenergic Agonists Are Substrates and Inhibitors of Human Organic Cation Transporter 1, *Mol Pharm* 2015; DOI: 10.1021/mp500854e
- [100] T. Nakamura, T. Nakanishi, T. Haruta, Y. Shirasaka, J.P. Keogh, I. Tamai, Transport of Ipratropium, an Anti-Chronic Obstructive Pulmonary Disease Drug, Is Mediated by Organic Cation/Carnitine Transporters in Human Bronchial Epithelial Cells: Implications for Carrier-Mediated Pulmonary Absorption, *Mol Pharm*, **7**: 187-195; 2010.



- [101] H.X. Ong, D. Traini, M. Bebawy, P.M. Young, Ciprofloxacin is actively transported across bronchial lung epithelial cells using a Calu-3 air interface cell model, *Antimicrob Agents Chemother*, **57**: 2535-2540; 2013.
- [102] M. Cazzola, M.G. Matera, J. Lotvall, Ultra long-acting beta 2-agonists in development for asthma and chronic obstructive pulmonary disease, *Expert Opin Investig Drugs*, **14**: 775-783; 2005.
- [103] P.A. Procopiou, V.J. Barrett, N.J. Bevan, K. Biggadike, P.R. Butchers, D.M. Coe, R. Conroy, D.D. Edney, R.N. Field, A.J. Ford, S.B. Guntrip, B.E. Looker, I.M. McLay, M.J. Monteith, V.S. Morrison, P.J. Mutch, S.A. Richards, R. Sasse, C.E. Smith, Synthesis and structure-activity relationships of long-acting beta2 adrenergic receptor agonists incorporating arylsulfonamide groups, *J Med Chem*, **52**: 2280-2288; 2009.
- [104] R. Ohashi, I. Tamai, J. Nezu Ji, H. Nikaido, N. Hashimoto, A. Oku, Y. Sai, M. Shimane, A. Tsuji, Molecular and physiological evidence for multifunctionality of carnitine/organic cation transporter OCTN2, *Mol Pharmacol*, **59**: 358-366; 2001.
- [105] R. Ohashi, I. Tamai, H. Yabuuchi, J.I. Nezu, A. Oku, Y. Sai, M. Shimane, A. Tsuji, Na(+)-dependent carnitine transport by organic cation transporter (OCTN2): its pharmacological and toxicological relevance, *J Pharmacol Exp Ther*, **291**: 778-784; 1999.
- [106] C.A. Wagner, U. Lukewille, S. Kaltenbach, I. Moschen, A. Broer, T. Risler, S. Broer, F. Lang, Functional and pharmacological characterization of human Na(+)-carnitine cotransporter hOCTN2, *Am J Physiol Renal Physiol*, **279**: F584-591; 2000.
- [107] M. Johnson, The beta-adrenoceptor, *Am J Respir Crit Care Med*, **158**: S146-153; 1998.
- [108] M. Johnson, P.R. Butchers, R.A. Coleman, A.T. Nials, P. Strong, M.J. Sumner, C.J. Vardey, C.J. Whelan, The pharmacology of salmeterol, *Life Sci*, **52**: 2131-2143; 1993.
- [109] G.P. Anderson, Current issues with beta(2)-adrenoceptor agonists - Pharmacology and molecular and cellular mechanisms, *Clin Rev Allergy Immunol*, **31**: 119-130; 2006.
- [110] J.J. Salomon, S. Endter, G. Tachon, F. Falson, S.T. Buckley, C. Ehrhardt, Transport of the fluorescent organic cation 4-(4-(dimethylamino)styryl)-N-methylpyridinium iodide (ASP+) in human respiratory epithelial cells, *Eur J Pharm Biopharm*, **81**: 351-359; 2012.
- [111] Technische Daten des Pari LC Spirnt Star Verneblers, *gefunden auf www.pari.de*; Zugriff 02/2014.

- [112] H. Chrystyn, Anatomy and physiology in delivery: can we define our targets?, *Allergy*, **54**: 82-87; 1999.
- [113] C.L. Leach, P.J. Kuehl, R. Chand, L. Ketai, J.P. Norenberg, J.D. McDonald, Characterization of respiratory deposition of fluticasone-salmeterol hydrofluoroalkane-134a and hydrofluoroalkane-134a beclomethasone in asthmatic patients, *Ann Allergy Asthma Immunol*, **108**: 195-200; 2012. Abstract.
- [114] B. Trammer, Ex-vivo-Modelle zur Charakterisierung der Pharmakokinetik pulmonal applizierter Wirkstoffe: Dialyse- und humanes Lungenperfusionsmodell, in, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie; 2011.
- [115] W.J. Evans, What Is Sarcopenia, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **50**: 5-8; 1995.
- [116] S. Ali, J.M. Garcia, Sarcopenia, cachexia and aging: diagnosis, mechanisms and therapeutic options - a mini-review, *Gerontology*, **60**: 294-305; 2014.
- [117] G. Goldspink, Age-related loss of muscle mass and strength, *J Aging Res*, **2012**: 158279; 2012.
- [118] F. Mourkioti, N. Rosenthal, IGF-1, inflammation and stem cells: interactions during muscle regeneration, *Trends Immunol*, **26**: 535-542; 2005.
- [119] Y. Rolland, G. Abellan van Kan, S. Gillette-Guyonnet, B. Vellas, Cachexia versus sarcopenia, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **14**: 15-21; 2011.
- [120] T. Shavlakadze, N. Winn, N. Rosenthal, M.D. Grounds, Reconciling data from transgenic mice that overexpress IGF-I specifically in skeletal muscle, *Growth Horm IGF Res*, **15**: 4-18; 2005.
- [121] Y.H. Song, J.L. Song, P. Delafontaine, M.P. Godard, The therapeutic potential of IGF-I in skeletal muscle repair, *Trends Endocrinol Metab*, **24**: 310-319; 2013.
- [122] S. Perrini, L. Laviola, M.C. Carreira, A. Cignarelli, A. Natalicchio, F. Giorgino, The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis, *J Endocrinol*, **205**: 201-210; 2010.
- [123] S. Hayashi, H. Aso, K. Watanabe, H. Nara, M.T. Rose, S. Ohwada, T. Yamaguchi, Sequence of IGF-I, IGF-II, and HGF expression in regenerating skeletal muscle, *Histochem Cell Biol*, **122**: 427-434; 2004.
- [124] A.M. Solomon, P.M. Bouloux, Modifying muscle mass - the endocrine perspective, *J Endocrinol*, **191**: 349-360; 2006.
- [125] G.R. Adams, S.A. McCue, Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats, *J Appl Physiol*, **84**: 1716-1722; 1998.

- [126] E.R. Barton-Davis, D.I. Shoturma, A. Musaro, N. Rosenthal, H.L. Sweeney, Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 15603-15607; 1998.
- [127] S.A. Coolican, D.S. Samuel, D.Z. Ewton, F.J. McWade, J.R. Florini, The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways, *J Biol Chem*, **272**: 6653-6662; 1997.
- [128] V. Jacquemin, D. Furling, A. Bigot, G.S. Butler-Browne, V. Mouly, IGF-1 induces human myotube hypertrophy by increasing cell recruitment, *Exp Cell Res*, **299**: 148-158; 2004.
- [129] Fachinformation Increlex, *gefunden auf www.fachinfo.de*; Zugriff 08/2014.
- [130] B.Q. Shen, W.E. Finkbeiner, J.J. Wine, R.J. Mrsny, J.H. Widdicombe, Calu-3: A human airway epithelial cell line that shows cAMP-dependent Cl<sup>-</sup> secretion, *Am J Physiol* **266**: L493-L501; 1994.
- [131] H. Wan, H.L. Winton, C. Soeller, G.A. Stewart, P.J. Thompson, D.C. Gruenert, M.B. Cannell, D.R. Garrod, C. Robinson, Tight junction properties of the immortalized human bronchial epithelial cell lines Calu-3 and 16HBE14o, *Eur Respir J*, **15**: 1058-1068; 2000.
- [132] A.C. da Paula, A.S. Ramalho, C.M. Farinha, J. Cheung, R. Maurisse, D.C. Gruenert, J. Ousingsawat, K. Kunzelmann, M.D. Amaral, Characterization of novel airway submucosal gland cell models for cystic fibrosis studies, *Cell Physiol Biochem*, **15**: 251-262; 2005.
- [133] L.J. MacVinish, G. Cope, A. Ropenga, A.W. Cuthbert, Chloride transporting capability of Calu-3 epithelia following persistent knockdown of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR, *Br J Pharmacol*, **150**: 1055-1065; 2007.
- [134] L. Matilainen, T. Toropainen, H. Vihola, J. Hirvonen, T. Jarvinen, P. Jarho, K. Jarvinen, In vitro toxicity and permeation of cyclodextrins in Calu-3 cells, *J Control Release*, **126**: 10-16; 2008.
- [135] M.E. Cavet, M. West, N.L. Simmons, Transepithelial transport of the fluoroquinolone ciprofloxacin by human airway epithelial Calu-3 cells, *Antimicrob Agents Chemother*, **41**: 2693-2698; 1997.
- [136] K.A. Foster, M.L. Avery, M. Yazdanian, K.L. Audus, Characterization of the Calu-3 cell line as a tool to screen pulmonary drug delivery, *Int J Pharm*, **208**: 1-11; 2000.

- [137] J. Patel, D. Pal, V. Vangal, M. Gandhi, A.L. Mitra, Transport of HIV-protease inhibitors across 1  $\alpha$ ,25di-hydroxy vitamin D<sub>3</sub>-treated Calu-3 cell monolayers: modulation of P-glycoprotein activity, *Pharm Res*, **19**: 1696-1703; 2002.
- [138] B.I. Florea, M.L. Cassara, H.E. Junginger, G. Borchard, Drug transport and metabolism characteristics of the human airway epithelial cell line Calu-3, *J Control Release*, **87**: 131-138; 2003.
- [139] I. Pezron, R. Mitra, D. Pal, A.K. Mitra, Insulin aggregation and asymmetric transport across human bronchial epithelial cell monolayers (Calu-3), *J Pharm Sci*, **91**: 1135-1146; 2002.
- [140] M. Marusic, I. Djurdjevic, K. Draslar, S. Caserman, Calu-3 model under AIC and LCC conditions and application for protein permeability studies, *Acta Chim Slov*, **61**: 100-109; 2014.
- [141] C.I. Grainger, L.L. Greenwell, D.J. Lockley, G.P. Martin, B. Forbes, Culture of Calu-3 cells at the air interface provides a representative model of the airway epithelial barrier, *Pharm Res*, **23**: 1482-1490; 2006.
- [142] A. Stentebjerg-Andersen, I.V. Notlevsen, B. Brodin, C.U. Nielsen, Calu-3 cells grown under AIC and LCC conditions: implications for dipeptide uptake and transepithelial transport of substances, *Eur J Pharm Biopharm*, **78**: 19-26; 2011.
- [143] D. Vllasaliu, R. Fowler, M. Garnett, M. Eaton, S. Stolnik, Barrier characteristics of epithelial cultures modelling the airway and intestinal mucosa: a comparison, *Biochem Biophys Res Commun*, **415**: 579-585; 2011.
- [144] A. World Medical, World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects, *JAMA*, **310**: 2191-2194; 2013.
- [145] C. Ehrhardt, J. Fiegel, S. Fuchs, R. Abu-Dahab, U.F. Schaefer, J. Hanes, C.M. Lehr, Drug absorption by the respiratory mucosa: cell culture models and particulate drug carriers, *J Aerosol Med*, **15**: 131-139; 2002.
- [146] J. Fiegel, C. Ehrhardt, U.F. Schaefer, C.M. Lehr, J. Hanes, Large porous particle impingement on lung epithelial cell monolayers--toward improved particle characterization in the lung, *Pharm Res*, **20**: 788-796; 2003.
- [147] S. Loman, J. Radl, H.M. Jansen, T.A. Out, R. Lutter, Vectorial transcytosis of dimeric IgA by the Calu-3 human lung epithelial cell line: upregulation by IFN- $\gamma$ , *Am J Physiol*, **272**: L951-958; 1997.
- [148] J. Geys, L. Coenegrachts, J. Verammen, Y. Engelborghs, A. Nemmar, B. Nemery, P.H. Hoet, In vitro study of the pulmonary translocation of nanoparticles: a preliminary study, *Toxicol Lett*, **160**: 218-226; 2006.

- [149] J. Geys, B. Nemery, P.H. Hoet, Optimisation of culture conditions to develop an in vitro pulmonary permeability model, *Toxicol In Vitro*, **21**: 1215-1219; 2007.
- [150] J.L. Harcourt, H. Caidi, L.J. Anderson, L.M. Haynes, Evaluation of the Calu-3 cell line as a model of in vitro respiratory syncytial virus infection, *J Virol Methods*, **174**: 144-149; 2011.
- [151] P.P. Breitfeld, W.C. McKinnon, K.E. Mostov, Effect of nocodazole on vesicular traffic to the apical and basolateral surfaces of polarized MDCK cells, *J Cell Biol*, **111**: 2365-2373; 1990.
- [152] R.H. Hastings, J.R. Wright, K.H. Albertine, R. Ciriales, M.A. Matthay, Effect of endocytosis inhibitors on alveolar clearance of albumin, immunoglobulin G, and SP-A in rabbits, *Am J Physiol*, **266**: L544-552; 1994.
- [153] M. Takano, Y. Koyama, H. Nishikawa, T. Murakami, R. Yumoto, Segment-selective absorption of lysozyme in the intestine, *Eur J Pharmacol*, **502**: 149-155; 2004.
- [154] Y. Phonphok, K.S. Rosenthal, Stabilization of clathrin coated vesicles by amantadine, tromantadine and other hydrophobic amines, *FEBS Lett*, **281**: 188-190; 1991.
- [155] E.S. Geary, R.G. Rosenfeld, A.R. Hoffman, Insulin-like growth factor-I is internalized after binding to the type I insulin-like growth factor receptor, *Horm Metab Res*, **21**: 1-3; 1989.
- [156] D.S. Schalch, C.M. Sessions, A.C. Farley, A. Masakawa, C.A. Emler, D.G. Dills, Interaction of insulin-like growth factor I/somatomedin-C with cultured rat chondrocytes: receptor binding and internalization, *Endocrinology*, **118**: 1590-1597; 1986.
- [157] R.W. Furlanetto, Receptor-mediated endocytosis and lysosomal processing of insulin-like growth factor I by mitogenically responsive cells, *Endocrinology*, **122**: 2044-2053; 1988.
- [158] J.M. Paye, K. Forsten-Williams, Regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) delivery by IGF binding proteins and receptors, *Ann Biomed Eng*, **34**: 618-632; 2006.
- [159] T.C. Lee, Y. Zhang, C. Aston, R. Hintz, J. Jagirdar, M.A. Perle, M. Burt, W.N. Rom, Normal human mesothelial cells and mesothelioma cell lines express insulin-like growth factor I and associated molecules, *Cancer Res*, **53**: 2858-2864; 1993.
- [160] E.I. Christensen, H. Birn, Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule, *Am J Physiol Renal Physiol*, **280**: F562-573; 2001.

- [161] E. Carro, C. Spuch, J.L. Trejo, D. Antequera, I. Torres-Aleman, Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin-like growth factor I, *J Neurosci*, **25**: 10884-10893; 2005.
- [162] M. Bolos, S. Fernandez, I. Torres-Aleman, Oral administration of a GSK3 inhibitor increases brain insulin-like growth factor I levels, *J Biol Chem*, **285**: 17693-17700; 2010.
- [163] M. Lindahl, B. Stahlbom, J. Svartz, C. Tagesson, Protein patterns of human nasal and bronchoalveolar lavage fluids analyzed with two-dimensional gel electrophoresis, *Electrophoresis*, **19**: 3222-3229; 1998.
- [164] A.A. Rehman, H. Ahsan, F.H. Khan, alpha-2-Macroglobulin: a physiological guardian, *J Cell Physiol*, **228**: 1665-1675; 2013.
- [165] M. Westwood, J.D. Aplin, I.A. Collinge, A. Gill, A. White, J.M. Gibson, alpha 2-Macroglobulin: a new component in the insulin-like growth factor/insulin-like growth factor binding protein-1 axis, *J Biol Chem*, **276**: 41668-41674; 2001.
- [166] W. Borth, Alpha 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics, *FASEB J*, **6**: 3345-3353; 1992.
- [167] G.C. da Silva, N. Teixeira, S.C. Bell, Major secretory product of the mesometrial decidua in the rat, a variant of alpha-2-macroglobulin, binds insulin-like growth factor I via a protease-dependent mechanism, *Mol Reprod Dev*, **44**: 103-110; 1996.
- [168] J. Park, J. Park, S.S. Nahm, I. Choi, J. Kim, Identification of anti-adipogenic proteins in adult bovine serum suppressing 3T3-L1 preadipocyte differentiation, *BMB Rep*, **46**: 582-587; 2013.
- [169] E. Wenk, H.P. Merkle, L. Meinel, Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications, *J Control Release*, **150**: 128-141; 2011.
- [170] L. Meinel, D.L. Kaplan, Silk constructs for delivery of musculoskeletal therapeutics, *Adv Drug Deliv Rev*, **64**: 1111-1122; 2012.
- [171] E.M. Pritchard, P.B. Dennis, F. Omenetto, R.R. Naik, D.L. Kaplan, Review physical and chemical aspects of stabilization of compounds in silk, *Biopolymers*, **97**: 479-498; 2012.
- [172] L. Meinel, S. Hofmann, V. Karageorgiou, C. Kirker-Head, J. McCool, G. Gronowicz, L. Zichner, R. Langer, G. Vunjak-Novakovic, D.L. Kaplan, The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo, *Biomaterials*, **26**: 147-155; 2005.
- [173] L. Uebersax, T. Apfel, K.M. Nuss, R. Vogt, H.Y. Kim, L. Meinel, D.L. Kaplan, J.A. Auer, H.P. Merkle, B. von Rechenberg, Biocompatibility and osteoconduction

- of macroporous silk fibroin implants in cortical defects in sheep, *Eur J Pharm Biopharm*, **85**: 107-118; 2013.
- [174] R.L. Horan, K. Antle, A.L. Collette, Y. Wang, J. Huang, J.E. Moreau, V. Volloch, D.L. Kaplan, G.H. Altman, In vitro degradation of silk fibroin, *Biomaterials*, **26**: 3385-3393; 2005.
- [175] J. Zhang, E. Pritchard, X. Hu, T. Valentin, B. Panilaitis, F.G. Omenetto, D.L. Kaplan, Stabilization of vaccines and antibiotics in silk and eliminating the cold chain, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**: 11981-11986; 2012.
- [176] Q. Lu, X. Wang, X. Hu, P. Cebe, F. Omenetto, D.L. Kaplan, Stabilization and release of enzymes from silk films, *Macromol Biosci*, **10**: 359-368; 2010.
- [177] A. Kuzuhara, T. Asakura, R. Tomoda, T. Matsunaga, Use of silk fibroin for enzyme membrane, *J Biotechnol*, **5**: 199-207; 1987.
- [178] D.J. Hines, D.L. Kaplan, Mechanisms of controlled release from silk fibroin films, *Biomacromolecules*, **12**: 804-812; 2011.
- [179] E. Wenk, A.J. Wandrey, H.P. Merkle, L. Meinel, Silk fibroin spheres as a platform for controlled drug delivery, *J Control Release*, **132**: 26-34; 2008.
- [180] H. Katayama, M. Issiki, H. Yoshitomi, Application of fibroin in controlled release tablets containing theophylline, *Biol Pharm Bull*, **23**: 1229-1234; 2000.
- [181] T. Dyakonov, C.H. Yang, D. Bush, S. Gosangari, S. Majuru, A. Fatmi, Design and characterization of a silk-fibroin-based drug delivery platform using naproxen as a model drug, *J Drug Deliv*. 2012, DOI: 2010.1155/2012/490514;
- [182] L. Uebersax, M. Mattotti, M. Papaloizos, H.P. Merkle, B. Gander, L. Meinel, Silk fibroin matrices for the controlled release of nerve growth factor (NGF), *Biomaterials*, **28**: 4449-4460; 2007.
- [183] L. Uebersax, H.P. Merkle, L. Meinel, Insulin-like growth factor I releasing silk fibroin scaffolds induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *J Control Release*, **127**: 12-21; 2008.
- [184] I. Schultz, F. Vollmers, T. Lühmann, J.-C. Rybak, R. Wittmann, K. Stank, H. Steckel, B. Kardziej, M. Schmidt, P. Högger, L. Meinel, Pulmonary insulin-like growth factor I delivery from trehalose and silk-fibroin microparticles, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **1**: 119-129; 2015.
- [185] S. Pham, T.S. Wiedmann, Note: dissolution of aerosol particles of budesonide in Survanta, a model lung surfactant, *J Pharm Sci*, **90**: 98-104; 2001.
- [186] T.S. Wiedmann, R. Bhatia, L.W. Wattenberg, Drug solubilization in lung surfactant, *J Control Release*, **65**: 43-47; 2000.

- [187] K.M. Rave, L. Nosek, A. de la Pena, M. Seger, C.S. Ernest, 2nd, L. Heinemann, R.P. Batycky, D.B. Muchmore, Dose response of inhaled dry-powder insulin and dose equivalence to subcutaneous insulin lispro, *Diabetes Care*, **28**: 2400-2405; 2005.
- [188] E. Kipnis, K. Hansen, T. Sawa, K. Moriyama, A. Zurawel, A. Ishizaka, J. Wiener-Kronish, Proteomic analysis of undiluted lung epithelial lining fluid, *Chest*, **134**: 338-345; 2008.
- [189] N. Sivadas, D. O'Rourke, A. Tobin, V. Buckley, Z. Ramtoola, J.G. Kelly, A.J. Hickey, S.A. Cryan, A comparative study of a range of polymeric microspheres as potential carriers for the inhalation of proteins, *Int J Pharm*, **358**: 159-167; 2008.
- [190] E.M. Agency, Guideline on bioanalytical method validation, *gefunden auf [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)*; 08/2011.
- [191] H.L. Winton, H. Wan, M.B. Cannell, D.C. Gruenert, P.J. Thompson, D.R. Garrod, G.A. Stewart, C. Robinson, Cell lines of pulmonary and non-pulmonary origin as tools to study the effects of house dust mite proteinases on the regulation of epithelial permeability, *Clin Exp Allergy*, **28**: 1273-1285; 1998.
- [192] User Guide Centriprep Centrifugal Filter Devices, *gefunden auf [www.merckmillipore.com](http://www.merckmillipore.com)*; Zugriff 10/2014.