

Therapeutisches Zielorgan Lunge: Pharmakokinetische Untersuchungen am humanen Lungenperfuisionsmodell



DISSERTATION

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

vorgelegt von
Matthias Freiwald
aus Würzburg

Würzburg 2006

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Frau Prof. Dr. Petra Högger

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

Meiner Familie

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits an folgenden Stellen veröffentlicht:

Originalpublikation:

Freiwald M, Valotis A, Kirschbaum A, McClellan M, Mürdter T, Fritz P, Friedel G, Thomas M, Högger P. Monitoring the initial pulmonary absorption of two different beclomethasone dipropionate aerosols employing a human lung reperfusion model. *Respir Res* 2005; 6: 21.

Posterbeitrag:

Freiwald M, Valotis A, Kirschbaum A, McClellan M, Mürdter T, Fritz P, Friedel G, Högger P. A human lung reperfusion model for monitoring the initial pulmonary absorption of drugs from aerosol devices, 15th Annual Congress of the European Respiratory Society, Kopenhagen, 17. - 21. September 2005.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen sehr herzlich danken, die mich direkt oder indirekt bei der Entwicklung und Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle danke ich Frau Prof. Dr. Petra Högger für die Überlassung des sehr interessanten Themas und ihr mir entgegengebrachtes Vertrauen. Großen Freiraum bei der Ausarbeitung der einzelnen Projekte zu gewähren, gleichzeitig aber jederzeit wissenschaftlich anregende Hilfestellungen zu geben, haben für mich ideale Arbeitsbedingungen dargestellt. Auch über die gebotene Möglichkeit, mich im Fach Klinische Pharmazie weiterzubilden, bin ich sehr froh.

Ganz besonderer Dank gilt auch Dr. Andreas Kirschbaum, der mittlerweile von der Klinik Schillerhöhe in Gerlingen nach Freiburg gewechselt ist, für sein trotz der erheblichen dienstlichen Belastungen als Chirurg unermüdliches Engagement, die Projekte am Lungenperfusionsmodell zu verwirklichen und mir einen doch recht tiefen Einblick in die Welt der Thoraxchirurgie zu verschaffen. Die Zusammenarbeit mit ihm hat mir sehr viel bedeutet.

Bei PD Dr. Godehard Friedel von der Klinik Schillerhöhe in Gerlingen, Dr. Peter Fritz vom Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart und Frau Monika McClellan vom Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie, ebenfalls Stuttgart, bedanke ich mich für die Möglichkeit, das an der Klinik Schillerhöhe etablierte humane Lungenperfusionsmodell für meine Arbeit nutzen zu können, und die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Lungenperfusionsversuche.

Ich danke recht herzlich Nicole Rauschert und Dr. Anagnostis Valotis dafür, jederzeit für eine wissenschaftliche Diskussion offen und mit ihrer nahezu grenzenlosen Hilfsbereitschaft immer zur Stelle gewesen zu sein, wenn ich nicht mehr weiter wusste. Besonderen Dank schulde ich auch Roswitha Skrabala für ihre exzellente technische Assistenz vor allem bei den Untersuchungen am Dialyse- und am Lungenperfusionsmodell. Neben der guten Zusammenarbeit werde ich gerade die einzigartigen und unvergesslichen AK-Abende mit ihnen vermissen.

Erst die Sonderanfertigung, aber auch Reparatur, so mancher Versuchsmaterialien ermöglichte die Entwicklung der vorliegenden Modelle. Ich bedanke mich daher insbesondere bei den Mitarbeitern der institutseigenen Werkstatt Matthias Völker, Karl Vollmuth und Georg Walter und beim Glasbläser des Instituts für Organische Chemie Manfred Ludwig für ihren Beitrag zu dieser Arbeit.

PD Dr. Godehard Friedel und dem gesamten OP-Team der Klinik Schillerhöhe, Gerlingen, danke ich für die Geduld und Rücksicht, die sie mir gegenüber im OP-Bereich zeigten, und für die Bereitstellung von Gewebeproben. Für Letzteres gilt mein Dank auch Dr. Manfred Jachmann von der Klinik Michelsberg bei Münnerstadt.

Michael Kraus, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, und Matthias Unger danke ich für die Unterstützung bei den LC-MS/MS-Messungen.

Auch wenn so manche Hürde zu nehmen war, war es trotzdem eine angenehme Herausforderung, das Fach Klinische Pharmazie neu etablieren zu helfen. Für das hierzu essentielle gute Arbeitsklima bedanke ich mich besonders bei Julia Thern, von der ich vor allem auf dem Gebiet der Pharmakotherapie viel gelernt habe. Nicht vergessen möchte ich in diesem Zusammenhang aber Mirjam Machon, die sich später nahtlos in das Team „KlinPharm“ einfügte und mir zusätzlich auch bei den letzten Lungenperfusionsversuchen hilfreich zur Seite stand.

Den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises Samar Affify, Dr. Tanja Grimm, Nicole Rauschert, Angelika Schäfer, Roswitha Skrabala, Julia Thern, Dr. Meike Timmermann und Dr. Anagnostis Valotis danke ich ganz herzlich für die tolle Zeit und das freundschaftliche Verhältnis.

Ich bedanke mich bei meinem Vater, Dr. Anagnostis Valotis und Nicole Rauschert außerdem für das aufmerksame Korrekturlesen und die wertvollen Tipps bei der Formatierung und äußeren Gestaltung der Dissertation.

Ganz besonderen Dank verdienen schließlich meine Eltern, Brigitte und Lothar Freiwald, und Nicole Rauschert. Ihre Liebe und kompromisslose Unterstützung gaben mir in jeder Lage die Kraft, meine gesteckten Ziele auch zu erreichen.

*Wer es einmal so weit gebracht hat, dass er nicht mehr irrt,
der hat auch zu arbeiten aufgehört.
(Max Planck, Physiker, 1858-1947)*

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	21
1 Die Lunge: Wirkort und Portal für systemisch wirkende Arzneistoffe	23
1.1 Inhalationstherapie.....	23
1.1.1 Lunge als Wirkort	23
1.1.2 Lunge als Portal für systemisch wirkende Arzneistoffe	24
1.1.3 Deposition von Aerosolpartikeln in den Atemwegen	24
1.1.4 Pharmakokinetik inhalativ applizierter Arzneistoffe	27
1.2 Systemische Applikation von Arzneistoffen zur Behandlung von Erkrankungen der Lunge	29
2 Zielsetzung der Arbeit	30
B. Allgemeiner Teil	33
1 <i>In-vitro</i>-Untersuchungen zur pulmonalen Absorption von Beclomethasondipropionat nach Freisetzung aus den handelsüblichen Dosieraerosolen Sanasthmax[®] und Ventolair[®]	35
1.1 Problemstellung	35
1.2 Dialysemodell.....	39
1.2.1 Prinzip der Bestimmung	39
1.2.1.1 Hintergrund der <i>In-vitro</i> -Untersuchung	39
1.2.1.2 Ausführung der Dialyseversuche	40
1.2.2 Ergebnisse	43
1.2.3 Diskussion	45
1.3 Humanes Lungenperusionsmodell.....	48
1.3.1 Prinzip der Bestimmung	48
1.3.1.1 Eigenschaften der Lungenperusionsmodelle.....	48
1.3.1.2 Durchführung der <i>In-vitro</i> -Untersuchungen am humanen Lungenperusionsmodell.....	49
1.3.2 Ergebnisse	52
1.3.3 Diskussion	54
1.4 Einfluss der Partikelmorphologie auf die Auflösungskinetik von Beclomethasondipropionat in Bronchialsekret.....	57
1.5 Abschließende Schlussfolgerungen.....	59

2	<i>In-vitro</i>-Untersuchung zur Bestimmung von Thalidomid-Konzentrationen mittels Mikrodialyse	61
2.1	Problemstellung	61
2.1.1	Bestimmung von Gewebespiegeln.....	62
2.1.2	Modellsubstanz: Thalidomid.....	65
2.2	Prinzip der Bestimmung.....	67
2.2.1	Mikrodialyse	67
2.2.1.1	Prinzip der Mikrodialyse	67
2.2.1.2	Relative Recovery (RR).....	70
2.2.1.3	Grundlagen der Sondenkalibrierung	71
2.2.2	Etablierung und Optimierung des Mikrodialysesystems	74
2.2.3	Systematische Untersuchung der Sondenkalibrierung	75
2.3	Ergebnisse.....	76
2.3.1	Etablierung und Optimierung des Mikrodialysesystems	76
2.3.2	Systematische Untersuchung der Sondenkalibrierung	78
2.4	Diskussion	80
3	<i>In-vitro</i>-Untersuchung zum Anfluten von Thalidomid in bronchialem Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem peripheren Lungengewebe nach Simulation einer systemischen Applikation	85
3.1	Problemstellung	85
3.2	Prinzip der Bestimmung.....	88
3.2.1	Mikrodialyse	88
3.2.2	Durchführung der Versuche	89
3.3	Ergebnisse.....	91
3.4	Diskussion	94
C.	Experimenteller Teil.....	103
1	<i>In-vitro</i>-Untersuchung zur Auflösungs- und Umverteilungskinetik inhalativer Glucocorticoide an einem Dialysemodell.....	105
1.1	Verwendete Reagenzien	105
1.1.1	Substanzen	105
1.1.2	Lösungen	105
1.1.2.1	Krebs-Ringer-HEPES-Puffer	105
1.1.2.2	Standardlösungen für die Quantifizierung	106
1.2	Verwendete Geräte und Materialien	107
1.2.1	Humanes Gewebe und Blutplasma.....	107

1.2.1.1	Herkunft	107
1.2.1.2	Herstellung des Lungenhomogenats	107
1.2.2	Dialyseapparatur	108
1.2.3	HPLC-System.....	110
1.2.4	Sonstige Geräte und Materialien.....	111
1.3	Durchführung der Dialyseversuche.....	112
1.3.1	Kontrollversuche zur Bestimmung der Funktionsfähigkeit.....	112
1.3.1.1	Test der einzelnen Arbeitsschritte und Abläufe während eines Dialyseversuches.....	112
1.3.1.2	Kalibrierung der Mikroliterpipette für die Probenentnahme	113
1.3.2	Bestimmung der Auflösungs- und Umverteilungskinetik von Beclomethasondipropionat nach Freisetzung aus den handelsüblichen Dosieraerosolen Sanasthmax [®] und Ventolair [®]	115
1.3.2.1	Vorbereitung	116
1.3.2.2	Applikation der Dosis.....	116
1.3.2.3	Ablauf der Dialyse.....	117
1.3.3	Bestimmung der applizierten Dosis.....	118
1.4	Bestimmung der Glucocorticoidkonzentrationen in den einzelnen Proben.....	119
1.4.1	Probenaufbereitung.....	119
1.4.1.1	Dialyseversuch	119
1.4.1.2	Dosisbestimmung	120
1.4.2	Quantifizierung mittels HPLC	120
1.5	Auswertung	122
2	<i>In-vitro</i>-Untersuchung zur pulmonalen Absorption inhalativ applizierter Glucocorticoide am humanen Lungenperfusionsmodell.....	124
2.1	Verwendete Reagenzien.....	124
2.1.1	Substanzen	124
2.1.2	Lösungen.....	124
2.1.2.1	Perfusionspuffer (I)	124
2.1.2.2	Standardlösungen für die Quantifizierung	125
2.2	Verwendete Geräte und Materialien	125
2.2.1	Humanes Gewebe.....	125
2.2.2	Humanes Lungenperfusionsmodell.....	126
2.2.3	HPLC-Systeme.....	128
2.2.3.1	UV-Detektion	128
2.2.3.2	Detektion mittels Massenspektrometrie.....	128
2.2.4	Sonstige Geräte und Materialien.....	129

2.3	Durchführung der Versuche am humanen Lungenperfusionsmodell	129
2.3.1	Reperfusion und Beatmung des resezierten Lungenlappens	129
2.3.2	Applikation der Dosis	130
2.3.3	Bestimmung der pulmonalen Absorption von Beclomethasondipropionat nach Freisetzung aus den handelsüblichen Dosieraerosolen Sanasthmax® und Ventolair®	131
2.4	Quantitative Analyse der pulmonalen Absorption	132
2.4.1	Bestimmung der unbekanntenen Glucocorticoidkonzentrationen in der Perfusionsflüssigkeit	132
2.4.1.1	Probenaufbereitung	132
2.4.1.2	Quantifizierung mittels HPLC-MS/MS	133
2.4.2	Bestimmung der tatsächlich applizierten Dosis	134
2.4.2.1	Extraktion des an der Applikationshilfe adsorbierten Teils der Dosis	134
2.4.2.2	Quantifizierung mittels HPLC-UV	134
2.5	Auswertung	136
3	<i>In-vitro</i>-Untersuchung zur Bestimmung von Thalidomid-Konzentrationen mittels Mikrodialyse	137
3.1	Verwendete Reagenzien	137
3.1.1	Substanzen	137
3.1.2	Lösungen	137
3.1.2.1	Standardlösungen für die Quantifizierung	137
3.1.2.2	Krebs-Ringer-HEPES-Puffer	138
3.1.2.3	Mikrodialysepuffer	138
3.1.2.4	Stammlösung für die Retrodialyse	139
3.1.2.5	Sørensen-Citrat-Puffer	139
3.1.2.6	Perfusionspuffer (II)	139
3.2	Verwendete Geräte und Materialien	140
3.2.1	Humanes Gewebe und Blutplasma	140
3.2.1.1	Herkunft	140
3.2.1.2	Herstellung von fein geschnittenem Gewebe	140
3.2.2	Ausrüstung für die Mikrodialyse	141
3.2.3	Mikrodialyseapparatur	141
3.2.3.1	Versuchsaufbau zur Etablierung und Optimierung des Mikrodialysesystems	141
3.2.3.2	Versuchsaufbau zur systematischen Untersuchung der Sondenkalibrierung	141
3.2.4	HPLC-Systeme	143
3.2.4.1	UV-Detektion	143
3.2.4.2	Detektion mittels Massenspektrometrie	143

3.2.5	Sonstige Geräte und Materialien.....	143
3.3	Durchführung der Mikrodialyseversuche.....	144
3.3.1	Vorbereitung und Lagerung der Mikrodialysesonden.....	144
3.3.2	Etablierung und Optimierung des Mikrodialysesystems.....	145
3.3.3	Systematische Untersuchung der Sondenkalibrierung.....	146
3.3.3.1	Vergleich verschiedener Kalibrierungsmethoden	147
3.3.3.2	Vergleich verschiedener Matrices.....	150
3.4	Bestimmung der Thalidomidmengen im Dialysat und in der Matrix.....	151
3.4.1	Probenvorbereitung.....	151
3.4.1.1	Proben aus der Etablierung und Optimierung des Mikrodialysesystems	151
3.4.1.2	Proben aus der systematischen Untersuchung der Sondenkalibrierung.....	151
3.4.2	Quantitative Analyse mittels HPLC.....	152
3.4.2.1	Proben aus der Etablierung und Optimierung des Mikrodialysesystems	152
3.4.2.2	Proben aus der systematischen Untersuchung der Sondenkalibrierung.....	153
3.5	Auswertung.....	154
3.5.1	Optimierung des Mikrodialysesystems.....	154
3.5.2	Kalibrierungsmethoden	156
3.5.3	Berechnung der Proteinbindung.....	157
4	<i>In-vitro</i>-Untersuchung zum Anfluten von Thalidomid in bronchialem Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem peripheren Lungengewebe nach Simulation einer systemischen Applikation.....	158
4.1	Verwendete Reagenzien.....	158
4.1.1	Substanzen	158
4.1.2	Lösungen.....	158
4.1.2.1	Standardlösungen für die Quantifizierung	158
4.1.2.2	Krebs-Ringer-HEPES-Puffer	158
4.1.2.3	Perfusionspuffer (II)	158
4.1.2.4	Lösungen für die Mikrodialyse	158
4.1.2.5	Applikationslösung.....	159
4.2	Verwendete Geräte und Materialien	159
4.2.1	Humanes Gewebe.....	159
4.2.2	Humanes Lungenperfusionsmodell.....	160
4.2.3	Ausrüstung für die Mikrodialyse	160
4.2.4	HPLC-System.....	160
4.2.5	Sonstige Geräte und Materialien.....	161
4.3	Durchführung der Versuche am humanen Lungenperfusionsmodell.....	161

4.3.1	Beatmung und Reperfusion des resezierten Lungenlappens	161
4.3.2	Durchführung der Retrodialyse	162
4.3.3	Bestimmung der Gewebespiegel mittels Mikrodialyse nach Zugabe von THAL in den Perfusionspuffer	163
4.4	Quantitative Analyse des Anflutens von THAL im Tumorgewebe und peripheren Lungengewebe	164
4.4.1	Probenvorbereitung	164
4.4.2	Quantitative Analyse mittels HPLC-MS/MS	164
4.5	Auswertung	165
5	Validierung der analytischen Methoden	166
5.1	Selektivität	166
5.2	Kalibrierfunktion	167
5.3	Präzision und Richtigkeit	169
5.3.1	Bestimmung von BDP und dessen Metabolite 17-BMP, 21-BMP und B	169
5.3.2	Bestimmung von THAL in verschiedenen Matrices	171
5.4	Bestimmungsgrenze	173
5.5	Extraktionseffizienz	174
5.5.1	Bestimmung von BDP und dessen Metabolite 17-BMP, 21-BMP und B	175
5.5.2	Bestimmung von THAL in verschiedenen Matrices	178
D.	Tabellarischer Anhang	181
1	<i>In-vitro</i>-Untersuchungen zur pulmonalen Absorption von Beclomethasondipropionat nach Freisetzung aus den handelsüblichen Dosieraerosolen Sanasthmax[®] und Ventolair[®]	183
1.1	Dialysemodell	183
1.1.1	Versuche mit Sanasthmax [®]	183
1.1.1.1	Tatsächlich applizierte Dosis	183
1.1.1.2	Dialyseflüssigkeit: KRP-HEPES	183
1.1.1.3	Dialyseflüssigkeit: Humanes Blutplasma	185
1.1.2	Versuche mit Ventolair [®]	186
1.1.2.1	Tatsächlich applizierte Dosis	186
1.1.2.2	Dialyseflüssigkeit: KRP-HEPES	187
1.1.2.3	Dialyseflüssigkeit: Humanes Blutplasma	188
1.2	Humanes Lungenperfusionsmodell	190
1.2.1	Anpassung der Zusammensetzung des Perfusionspuffers	190
1.2.2	Versuche mit Sanasthmax [®]	190
1.2.2.1	Perfusionsbedingungen	190

1.2.2.2	Ergebnisse.....	191
1.2.3	Versuche mit Ventolair®.....	192
1.2.3.1	Perfusionsbedingungen.....	192
1.2.3.2	Ergebnisse.....	193
2	<i>In-vitro</i>-Untersuchung zur Bestimmung von Thalidomid-Konzentrationen mittels Mikrodialyse.....	195
2.1	Etablierung und Optimierung des Mikrodialysesystems.....	195
2.1.1	Optimierung des Perfusatflusses mit Krebs-Ringer-HEPES-Puffer als Perfusat.....	195
2.1.1.1	Experimentelle Daten.....	195
2.1.1.2	Ermittelte Funktion des mathematischen Modells.....	195
2.1.2	Steigerung der relativen Recovery durch Variation der Perfusatzusammensetzung.....	196
2.1.3	Optimierung des Perfusatflusses mit Mikrodialysepuffer als Perfusat.....	197
2.1.3.1	Experimentelle Daten.....	197
2.1.3.2	Ermittelte Funktion des mathematischen Modells.....	197
2.2	Systematische Untersuchung der Sondenkalibrierung.....	198
2.2.1	Verschiedene Kalibriermethoden.....	198
2.2.1.1	Extraktionsmethode.....	198
2.2.1.2	Retrodialyse.....	198
2.2.1.3	No-Net-Flux-Methode.....	199
2.2.2	Sondenkalibrierung in verschiedenen Matrices.....	200
2.2.2.1	Matrix: Krebs-Ringer-HEPES Puffer.....	200
2.2.2.2	Matrix: Gewebesuspension.....	200
2.2.2.3	Matrix: Perfusionspuffer.....	201
2.2.2.4	Matrix: Humanes Blutplasma.....	201
2.2.3	Bestimmung der Proteinbindung.....	202
2.2.3.1	Bindung an bovines Serumalbumin.....	202
2.2.3.2	Bindung an Plasmaproteine.....	202
3	<i>In-vitro</i>-Untersuchung zum Anfluten von Thalidomid in bronchialem Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem peripheren Lungengewebe nach Simulation einer systemischen Applikation.....	203
3.1	Perfusionsbedingungen.....	203
3.2	Sondenkalibrierung mittels Retrodialyse.....	204
3.3	Gemessene Konzentrationsverläufe.....	204
3.3.1	Lungenperfusionsexperiment 1 (= Perfusion I).....	204
3.3.2	Lungenperfusionsexperiment 2.....	205

3.3.3	Lungenperfusionsexperiment 3 (= Perfusion II)	205
3.3.4	Lungenperfusionsexperiment 4	206
3.3.5	Lungenperfusionsexperiment 5 (= Perfusion III)	206
3.3.6	Lungenperfusionsexperiment 6	207
3.3.7	Lungenperfusionsexperiment 7	207
3.3.8	Lungenperfusionsexperiment 8	208
3.3.9	Lungenperfusionsexperiment 9	208
E.	Zusammenfassung	211
1	Zusammenfassung	213
2	Summary	215
F.	Abkürzungsverzeichnis	217
G.	Literaturverzeichnis.....	219

A. Einleitung

1 Die Lunge: Wirkort und Portal für systemisch wirkende Arzneistoffe

1.1 Inhalationstherapie

1.1.1 Lunge als Wirkort

Die topische Anwendung von Wirkstoffen bietet den Vorteil, die erwünschte Wirkung lokal zu maximieren und dabei gleichzeitig unerwünschte systemische Wirkungen zu minimieren. Vergleicht man z.B. die Inhalation von Fenoterol, einem kurzwirksamen β_2 -Sympathomimetikum, mit dessen peroraler Verabreichung hinsichtlich Bronchodilatation als beabsichtigten Effekt und Veränderung der Herzfrequenz als typische Nebenwirkung, so wird bei Inhalation nur ca. 1/50 der peroralen Dosis benötigt, um äquivalente positive Effekte hervorzurufen. Dies wiederum hat zur Folge, dass auch die Steigerung der Herzfrequenz bei inhaliertem Fenoterol sehr viel schwächer ausgeprägt ist als nach Einnahme einer Tablette. Außerdem wird der Wirkungseintritt ebenfalls signifikant beschleunigt [1]. Inhalativ applizierte Arzneistoffe stellen daher schon lange eine bevorzugte Therapieform bei der Behandlung von Erkrankungen der Lunge dar [2].

Sieht man von der klassischen Inhalation von Salzlösungen und/oder ätherischen Ölen bei Erkältungskrankheiten und akuter Bronchitis ab, sind als Hauptindikationsgebiete in diesem Zusammenhang sicherlich die chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD) und Asthma bronchiale zu nennen, bei deren Behandlung die Inhalationstherapie eine dominante Rolle spielt. Breiten Einsatz finden hier vor allem kurz- und langwirksame β_2 -Sympathomimetika (Fenoterol, Salbutamol, Formeterol, Salmeterol, usw.), Muskarinrezeptor-Antagonisten (z.B. Ipratropium, Tiotropium) und Glucocorticoide (GC) wie Budesonid, Beclomethasondipropionat oder Fluticasonpropionat [1, 3, 4].

Daneben gewinnen inhalativ angewendete Wirkstoffe aber auch bei anderen Indikationen immer mehr an Beachtung. Wichtige Fortschritte konnten z.B. bei der Therapie von Mukoviszidose (Cystische Fibrose, CF) durch die Inhalation des Aminoglycosidantibiotikums Tobramycin zur Infektabwehr bzw. -prophylaxe [5] oder der Dornase alpha, ein rekombinantes, humanes, DNA-spaltendes Enzym, zur Verflüssigung des Bronchialschleims erreicht werden [6]. Außerdem haben mit Pentamidin und Ribavirin zwei Antiinfektiva Einzug in die Behandlung von Pneumonien, verursacht durch *Pneumocystis carinii* bzw. Viren (z.B. Respiratory-Syncytial-Virus), gehalten [7, 8].

Dieser Auswahl bereits in Deutschland für die inhalative Anwendung zugelassener Arzneimittel steht allerdings noch eine große Zahl weiterer Wirkstoffe, die sich entweder schon

kurz vor der Zulassung befinden oder intensiver pharmakotherapeutischer Forschung unterliegen, gegenüber [1]. Dabei werden nicht nur alternative Therapieoptionen zur Behandlung der schon genannten Lungenerkrankungen berücksichtigt [9-11], sondern auch eine Reihe neuer Indikationen erschlossen. Als stellvertretendes Beispiel sei hierzu der Einsatz von Stickstoffmonoxid-Donatoren oder Prostaglandinen bei pulmonaler Hypertonie [12] und Immunmodulatoren wie Cyclosporin oder Interferonen bei Lungentransplantatabstoßungen bzw. Tumorerkrankungen der Lunge genannt [13, 14].

1.1.2 Lunge als Portal für systemisch wirkende Arzneistoffe

Aufgrund ihrer physiologischen Funktion beim Gasaustausch weist die Lunge Eigenschaften auf, die diese auch für einen Resorptionsort von Arzneimitteln prädestinieren. So steht vor allem im Bereich der respiratorischen Bronchiolen und Alveolen eine sehr große Absorptionsfläche (ca. 100 m²) zur Verfügung. Gleichzeitig gewährleisten der hohe Vaskularitätsgrad und die bis zu 0,5 µm dünnen Barrieren zwischen Alveolarraum und Blutgefäßlumen einen guten Stoffaustausch. Zusätzlich entfällt im Gegensatz zur enteralen Applikation der First-Pass-Effekt in der Leber. Vergleicht man die Inhalation weiterhin mit anderen parenteralen Applikationsformen, spricht auch der hier erreichbare schnelle Wirkungseintritt trotz des nicht-invasiven Charakters für die inhalative Verabreichung von Arzneimitteln [15, 16].

Verbindet man diese Tatsachen mit den Fortschritten in der technologischen Entwicklung von geeigneten Methoden zur Generierung von Aerosolen, verwundert es nicht, dass vermehrt am pulmonalen Weg zur Verabreichung von verschiedensten, systemisch wirkenden Arzneimitteln geforscht wird [2]. Dabei beschränkt sich die Auswahl der infrage kommenden Substanzen nicht nur auf niedermolekulare Verbindungen (unter anderem Opioide [17] und niedermolekulare Heparine [18]), sondern, im Gegenteil, gerade hochmolekulare Biopharmazeutika wie z.B. Hormone, die parenteral appliziert werden müssen, sollen in zunehmenden Maße über die Lunge in die systemische Zirkulation gelangen [19]. Ein aktuelles und prominentes Beispiel hierzu liefert die Zulassung von inhalativem Insulin [20].

1.1.3 Deposition von Aerosolpartikeln in den Atemwegen

Voraussetzung sowohl für die lokale als auch systemische Wirkung eines inhalativ angewendeten Wirkstoffs ist die Deposition der Aerosolpartikel in geeigneten Regionen der Atemwege. Da die Absorptionsbarrieren im Alveolarbereich, wie unter 1.1.2 bereits erwähnt

wurde, am geringsten sind, ist bei Substanzen, die die Lunge als Resorptionsort nutzen, folglich eine Deposition vor allem in diesem Bereich wünschenswert [21]. Soll dagegen ein Effekt in der Lunge erzeugt werden, so ist hier von Interesse, wo die entsprechenden Zielstrukturen genau lokalisiert sind [22]. Wenn man als Beispiel wieder die kurzwirksamen β_2 -Sympathomimetika heranzieht, deren primärer Einsatzgrund die Bronchodilatation darstellt, müssen folgende Begebenheiten beachtet werden. Zwar liegen auch im Alveolarbereich β_2 -Rezeptoren vor, die Intention der Bronchodilatation wird aber durch Rezeptoren auf den glatten Muskelzellen der zuführenden Atemwege, also kleinere Bronchien und nachfolgenden Bronchiolen induziert. Eine optimierte Wirkung sollte daher die Inhalation von Partikeln aufweisen, die bevorzugt in dieser Region deponiert werden. Eben diese Beobachtung konnte in einer klinischen Studie von Usmani und Kollegen gemacht werden [23].

Die Depositionswahrscheinlichkeit von Aerosolpartikeln in bestimmten Regionen der Atemwege wird dabei generell durch vier Faktoren beeinflusst. Zuerst sind hier sicherlich die physikalischen Eigenschaften der zu inhalierenden Partikel, insbesondere Größe, Form und Dichte, zu nennen. Des Weiteren spielen auch die Atemtechnik des Patienten und die zeitliche Koordinierung der Dosisabgabe während eines Atemzugs eine wichtige Rolle. Zuletzt sollte auch die Anatomie der Lunge des Patienten gerade unter Berücksichtigung von pathologischen Veränderungen nicht vernachlässigt werden, auch wenn dieser Faktor bei der Inhalation nicht beeinflusst werden kann [24].

Um das Verhalten von Aerosolpartikeln verschiedener Substanzen und Applikationsformen besser bewerten zu können, werden die physikalischen bzw. aerodynamischen Eigenschaften dieser Partikel durch Bestimmung einer einheitlichen Kenngröße, dem aerodynamischen Partikeldurchmesser d_{ae} , standardisiert. Partikel mit einem bestimmten d_{ae} weisen dann dasselbe aerodynamische Verhalten auf wie eine Kugel mit der Dichte 1 g/cm^3 und einem diesem d_{ae} entsprechenden Durchmesser [1]. Auf diese Weise können bereits ohne klinische Studien mit Hilfe mathematischer Modelle sehr gute Schätzungen zum Depositionsverhalten in bestimmten Atemwegsregionen angestellt werden (siehe *Diagramm 1*). Diese Modelle verleiden aber oft zu der Annahme, hier präzise Aussagen über die Situation *in vivo* treffen zu können. Es ist jedoch zu beachten, dass der d_{ae} nur einen der oben genannten Faktoren repräsentiert, und deshalb die idealisierten Bedingungen der Modelle, nämlich normale Atmung und ein permanentes Vorhandensein von schwebenden Partikeln in der Atemluft, in keiner Weise die Realität widerspiegeln [25].

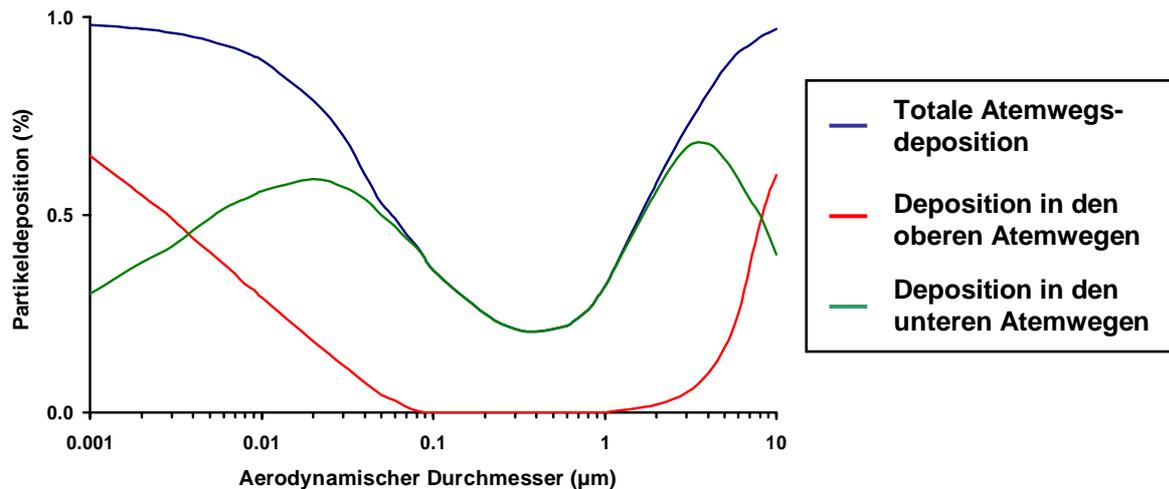


Diagramm 1: Depositionshäufigkeit in bestimmten Atemwegsregionen in Abhängigkeit vom aerodynamischen Partikeldurchmesser (d_{ae}): Als obere Atemwege werden in diesem Zusammenhang der Mund- und Rauchenraum bis zum Kehlkopf definiert, die unteren Atemwege beinhalten die Bereiche von der Luftröhre bis zum Alveolarbereich (Diagramm nach [25]).

Grundsätzlich lässt sich durch diese Modelle ableiten, dass drei Prozesse für die Deposition von Partikeln verantwortlich sind: der Aufprall auf der Gewebeoberfläche, verursacht durch die Trägheit der Partikel und damit das Unvermögen, dem Luftstrom zu folgen, die Sedimentation im Luftstrom, hervorgerufen durch die Schwerkraft, und die Diffusion im Luftstrom [24]. Trägheit und Sedimentation sind dabei die treibenden Kräfte zur Deposition von Partikel bis zu einer Größe von $1 \mu\text{m}$ (= untere Grenze), während Partikel mit einem d_{ae} von $0.1\text{-}1 \mu\text{m}$ hauptsächlich durch Sedimentation und Diffusion in Kontakt mit dem Lungengewebe kommen. In den genannten Intervallen nimmt der Einfluss des zuerst aufgeführten Prozesses mit abnehmendem d_{ae} ab. Darunter spielt wiederum fast ausschließlich die freie Diffusion der Partikel eine Rolle [26].

Bei einem d_{ae} über ca. $3 \mu\text{m}$ verhindert vor allem die Trägheit einen generellen Eintritt der Partikel zu den unteren Atemwegen, da diese dem Luftstrom nicht folgen können und folglich vermehrt schon im Mund- und Rauchenraum bzw. Kehlkopf deponiert werden (siehe *Diagramm 1*). Die angegebene Grenze verschiebt sich hierbei je nach Geschwindigkeit des Gasstroms, wobei hohe Flussraten die Aufprallwahrscheinlichkeit erhöhen. Haben Partikel den Kehlkopf allerdings passiert, werden diese aufgrund der kurzen Passagezeit und geringen Richtungsänderungen nur selten auf der Luftröhre oder den Hauptbronchien deponiert. Mit kleiner werdendem d_{ae} lagern sich die Partikel, die sich bereits in den unteren Atemwegen befinden, dann zunehmend später und damit in periphereren Bereichen der Lunge ab. Wird ein d_{ae} von etwa $1 \mu\text{m}$ erreicht bzw. unterschritten, verringert sich die Sedimentationsgeschwindigkeit derart, dass verstärkt durch das geringe Ausmaß der Diffusion dieser Teilchen seltener ein Kontakt mit der Gewebeoberfläche zustande kommt und diese Partikel deshalb

größtenteils wieder ausgeatmet werden. Die Depositionshäufigkeit solcher Teilchen steigt dabei mit der Verweilzeit in der Lunge. Aerosolpartikel mit einem d_{ae} unter $0.1 \mu\text{m}$ wiederum zeigen keine relevante Trägheit oder Sedimentation, jedoch nimmt die Diffusion ein solches Ausmaß an, dass die Dauer der Einatemphase wieder für eine vermehrte Ablagerung in den Atemwegen ausreicht (siehe *Diagramm 1*) [24, 26].

Für die orale Inhalationstherapie bedeutet dies, dass je nach Zielregion bevorzugt Aerosole mit medianen aerodynamischen Massenäquivalentdurchmessern von 1 bis $5 \mu\text{m}$ erzeugt werden sollten [27]. Um die Depositionswahrscheinlichkeit zu optimieren, sollte weiterhin die zu inhalierende Dosis schubweise aber mit geringer Ausbreitungsgeschwindigkeit des Aerosols zu Beginn der Inspirationsphase freigesetzt werden und der Patient diese anschließend langsam und tief einatmen. Auf diese Weise wird die Aufprallwahrscheinlichkeit größerer Partikel gesenkt und die Verweilzeit der Teilchen in der Lunge maximiert. Gleichzeitig sorgt die schubweise Abgabe der Dosis zu Beginn der Inspirationsphase dafür, dass durch nachfolgende Atemluft das Aerosol insgesamt tiefer in die Lunge befördert werden kann [24].

1.1.4 Pharmakokinetik inhalativ applizierter Arzneistoffe

Ist eine geeignete Deposition der Aerosolpartikel in den Atemwegen sichergestellt (siehe 1.1.3), stellt sich die Frage: Was geschieht danach mit dem Wirkstoff? Wird er resorbiert? Und wenn ja, wie schnell und in welchem Ausmaß? Denn abhängig davon, ob der Wirkstoff mit der Absicht einer topischen oder systemischen Wirkung inhalativ verabreicht wurde, bestimmen diese Vorgänge das Nutzen-Risiko-Profil der Inhalationstherapie [28]. Das heißt, die Untersuchung der Umverteilung vom Lungengewebe in die systemische Zirkulation stellt einen zentralen Gesichtspunkt bei der Beurteilung und auch Optimierung dieser Therapieform dar (siehe *Abbildung 1*).

Wird eine lokale Wirkung beabsichtigt, sollte der Wirkstoff möglichst lange und in hohen Konzentrationen im Lungengewebe verbleiben. Zu vermeiden ist dagegen ein schneller Übergang größerer Mengen der Substanz in den Blutkreislauf, um die so erzeugten Plasmakonzentrationen zu minimieren. Schließlich korrelieren die Blutspiegel eines Wirkstoffes meist direkt mit der Stärke systemischer Effekte, hier hauptsächlich unerwünschter Wirkungen [28].

Eine Retention des inhalativ angewendeten Arzneistoffs im Lungengewebe kann dabei durch verschiedene Mechanismen erreicht werden. So können Substanzen z.B. eine besonders hohe Affinität zu pulmonalen Gewebestrukturen aufweisen [29]. Auch wurde für die Glucocorticoide Budesonid und Ciclesonid von einer Veresterung der Verbindungen mit

Fettsäuren berichtet, wodurch nach anschließender Einlagerung in die Zellmembran eine Depotwirkung durch langsame Wiederfreisetzung der aktiven Verbindungen entstehen soll [30, 31]. Im Falle von Tiotropium wird wiederum vor allem eine besonders langsame Dissoziation vom Muskarinrezeptor für das günstige Wirkungsprofil verantwortlich gemacht [32]. Schließlich kann auch schon im Vorfeld durch eine verzögerte Auflösungsgeschwindigkeit von festen Aerosolpartikeln im epithelialen Flüssigkeitsfilm eine Retardierung erzielt werden [33].

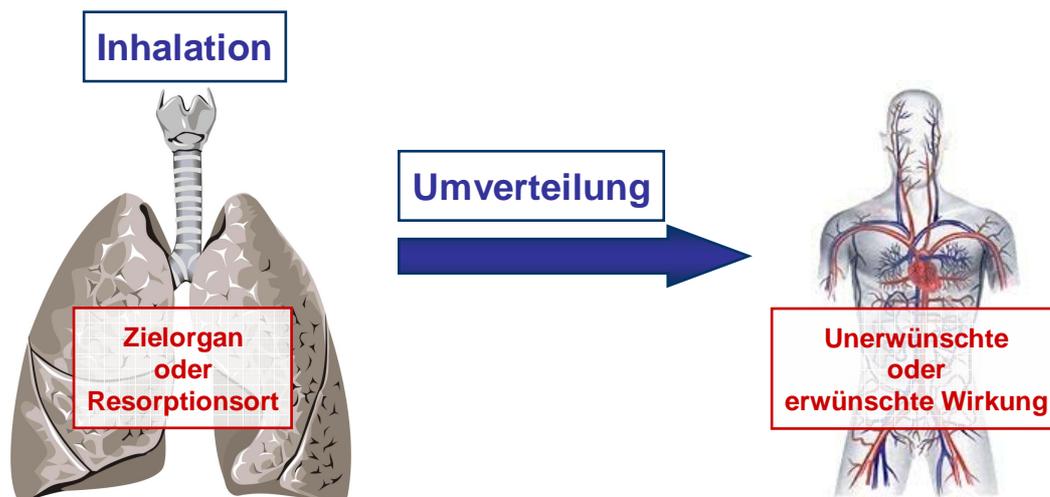


Abbildung 1: Nach Deposition des Arzneistoffs in den Atemwegen (links) wird dieser absorbiert und anschließend in die systemische Zirkulation (rechts) umverteilt. Der Verlauf und die Höhe der so erzeugten Wirkstoffkonzentrationen im Plasma bestimmen wiederum das Ausmaß der systemischen Effekte.

Andererseits sollten Arzneistoffe, die die Lungen als Resorptionsort für das Anfluten in der systemischen Zirkulation nutzen, eher ein genau entgegengesetztes Verhalten zeigen. Hier ist eine möglichst hohe absolute Bioverfügbarkeit Ziel der inhalativen Applikation. Dabei muss auf jeden Fall gewährleistet sein, dass verabreichte Dosen verlässlich effektive Plasmakonzentrationen des Wirkstoffes erzeugen. Je nachdem, ob eine schnelle oder gleichmäßige und lang anhaltende Wirkung angestrebt wird, sollten Ausmaß und Geschwindigkeit der Absorption weiterhin so ausgerichtet sein, dass entsprechende Konzentration-Zeit-Verläufe im Blut erzielt werden [16].

Wichtig für eine reproduzierbare Dosierung ist zunächst ein geeignetes Applikationssystem, mit dem konstante Dosen möglichst selektiv in der Lunge und hier bevorzugt in den peripheren Bereichen deponiert werden. Gerade bei Biopharmazeutika ist bei der Aerosolbildung auf die Stabilität der Stoffe zu achten. Nach Ablagerung auf dem epithelialen Flüssigkeitsfilm der Atemwege beeinflussen Löslichkeit, Stabilität und die Fähigkeit der Substanz, biologische Barrieren zu überwinden, die erreichbare Absorptionsrate. Werden in

diesem Zusammenhang Stabilisatoren (z.B. Protease-Inhibitoren) oder Lösungs- bzw. Resorptionsvermittler eingesetzt, muss die Effizienz und Unbedenklichkeit deren Einsatzes gesichert sein [15, 24].

1.2 Systemische Applikation von Arzneistoffen zur Behandlung von Erkrankungen der Lunge

Die Fragestellung, welche Konzentrationen eines Arzneistoffs im Lungengewebe *in vivo* genau erzielt werden, spielt bei der inhalativen Applikation zunächst einmal eine untergeordnete Rolle. Weisen *In-vitro*-Untersuchungen nicht auf eine Malabsorption hin und konnte in Humanstudien die klinische Effektivität des Arzneistoffs nachgewiesen werden, geht man bei der topischen Anwendung prinzipiell davon aus, dass die gute Absorptionsbedingungen in der Lunge (siehe 1.1.2) eine für die Wirkung ausreichende Gewebekonzentration gewährleisten. Wie im vorangegangenen Kapitel erläutert, sind hier die im Blut auftretenden Wirkstoffkonzentrationen von größerem Interesse.

Soll allerdings ein Arzneistoff, der zuerst im systemischen Kreislauf anflutet, einen Effekt in der Lunge hervorrufen, kann umgekehrt nicht mehr von diesen Verhältnissen ausgegangen werden. Zwar wurde lange angenommen, dass die Sicherstellung geeigneter Plasmakonzentrationen auf dem gewählten Applikationsweg wie z.B. peroral, intramuskulär, subkutan oder intravenös ausreicht, um auch wirksame Arzneistoffspiegel im Lungengewebe zu erzeugen. Die Entwicklung neuer Bestimmungsmethoden und die intensive Erforschung dieser Thematik in den letzten Jahren haben aber offengelegt, dass diese Annahme keine allgemeine Gültigkeit besitzt. Im Gegenteil, erste Erkenntnisse auf diesem Gebiet mahnen die Notwendigkeit systematischer Untersuchungen der Gewebespiegel von Wirkstoffen an [34-36]. Die Bedeutung der Penetration von Arzneistoffen in das Lungengewebe soll im Folgenden am Beispiel von Antibiotika zur Behandlung von Pneumonien erläutert werden.

Bakterielle Lungeninfektionen stellen, vor allem wenn diese nosokomial erworben wurden, ein erhebliches gesundheitliches Problem dar [37]. Obwohl in der folgenden Statistik keine Aufschlüsselung der zugrunde liegenden Erreger angegeben wurde, sollte doch allein die Tatsache, dass die Pneumonie 2005 in Deutschland zu den zehn häufigsten Todesursachen zählte [38], die Relevanz einer adäquaten Therapie verdeutlichen. Betrachtet man nun die verfügbaren pharmakokinetischen Daten von Patienten, bei denen das eingesetzte antibakterielle Behandlungsregime zu keiner Beseitigung der Erreger und damit auch zu keiner

Abheilung der Erkrankung geführt hatte, so kann nur bei einem gewissen Anteil der Patienten das Therapieversagen aufgrund zu niedrigerer Plasmakonzentrationen erklärt werden. Bezieht man dagegen Daten zu Gewebekonzentrationen in derartige Auswertungen ein, kann die Korrelation zwischen ungeeigneten Wirkstoffspiegeln und Therapieversagen signifikant verbessert werden. Denn die entsprechenden Gewebepentrationsstudien *in vivo* zeigten, dass vor allem unter Berücksichtigung patientenspezifischer Parameter wie dem Gesundheitszustand Plasmakonzentrationen eines Antibiotikums keineswegs die Kinetik der Substanz im Lungengewebe widerspiegeln [39, 40].

2 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten daher Modelle entwickelt und etabliert werden, mit Hilfe derer die zuvor erläuterten Umverteilungsvoränge (siehe 1.1.4 und 1.2) vom Lungengewebe in die systemische Zirkulation und umgekehrt möglichst realitätsnah beschrieben werden können. Die Basis der Untersuchungen bildet dabei das von Lindner und Kollegen [41] entwickelte humane Lungenperfuisionsmodell. Als Modellsubstanzen dienten bei der Simulation der pulmonalen Absorption von inhalativ applizierten Arzneistoffen das topisch angewandte Glucocorticoid Beclomethasondipropionat (BDP) und bei den Gewebepentrationsversuchen Thalidomid (THAL), das unter anderem bei der Therapie von Lungenkarzinomen eingesetzt werden kann. Für die Bestimmung der Gewebekonzentrationen sollte eine Mikrodialyse-Methode entwickelt werden.

B. Allgemeiner Teil

1 ***In-vitro*-Untersuchungen zur pulmonalen Absorption von Beclomethason-dipropionat nach Freisetzung aus den handelsüblichen Dosieraerosolen Sanasthmax[®] und Ventolair[®]**

1.1 **Problemstellung**

Inhalative Glucocorticoide spielen bei der Behandlung des persistierenden Asthma bronchiale eine entscheidende Rolle. In aktuellen Leitlinien stellen sie schon ab einem geringfügigen Schweregrad als Dauermedikation das Arzneimittel der ersten Wahl dar [4, 42]. Dabei hängt ihre Effektivität nicht nur von der Potenz des Wirkstoffes ab, sondern wird auch ganz entscheidend durch ihr pharmakokinetisches Profil geprägt [43]. Hochhaus und Kollegen [44] wiesen hierzu bereits 1997 das Ausmaß der pulmonalen Deposition, die Verweilzeit der Substanz im Lungengewebe und deren pulmonale Auflösungs- bzw. Umverteilungskinetik zusätzlich zu den traditionellen Parametern wie orale Bioverfügbarkeit und systemischer Clearance als Kernpunkte für die Beurteilung dieser Substanzklasse aus.

Zwar wurde diese Thematik in den folgenden Jahren von verschiedenen Autoren immer wieder aufgegriffen und weiterentwickelt [45-48], diese Kernpunkte blieben dennoch erhalten. Demnach sollte bei der Applikation ein möglichst hoher Anteil des inhalativen Glucocorticoids (GC) in die Lunge gelangen und gleichzeitig eine übermäßige Ablagerung im Mund- und Rachenraum vermieden werden. Um systemische Wirkungen ausgehend vom verschluckten Anteil der Dosis zu verhindern, ist eine minimale orale Bioverfügbarkeit obligat. Im Lungengewebe angekommen sollte die Substanz für eine optimierte Wirkung möglichst lange im therapeutischen Zielorgan verweilen und von dort nur sehr langsam in die systemische Zirkulation umverteilt werden. Da ein Übergang der Substanz in den Blutkreislauf letztlich nicht zu verhindern ist, müssen die pharmakokinetischen Eigenschaften des GC schließlich so geartet sein, dass eine systemische Wirkungsentfaltung, die sich im typischen Nebenwirkungsprofil der GC wie z.B. Suppression der Nebennierenrindenfunktion oder Einfluss auf das Wachstum eines Kindes äußern kann [49], minimiert wird. Hierbei kommt vor allem dem Ausmaß der systemischen Elimination und im geringeren Maße auch der Höhe der Plasmaproteinbindung [50] besondere Bedeutung zu (siehe *Abbildung 2*). Des Weiteren ist anzunehmen, dass eine gleichmäßig langsame Umverteilung der schnellen Absorption mit hohen maximalen Plasmaspiegeln vorzuziehen ist.

Während die klassischen pharmakokinetischen Parameter (systemische Clearance, Proteinbindung, orale Bioverfügbarkeit) und die Deposition der Dosis nach Aktivierung eines

Dosieraerosols relativ gut beschrieben werden können, können sich Untersuchungen zur systemischen Bioverfügbarkeit nach Inhalation oder der Umverteilungskinetik von Lungengewebe in die Zirkulation als äußerst problematisch erweisen [51, 52]. Humanstudien stoßen hier allein aus ethischen Überlegungen schnell an die Grenzen des Machbaren. Zur Betrachtung der Affinität eines GC zu Lungengewebe (Gewebebindung) und damit der Verweilzeit im therapeutischen Zielorgan sind beispielsweise in solchen Studien Konzentrationsverhältnisse in Blutplasma im Vergleich zum Lungengewebe meist nur punktuell zu gewinnen [53-55].

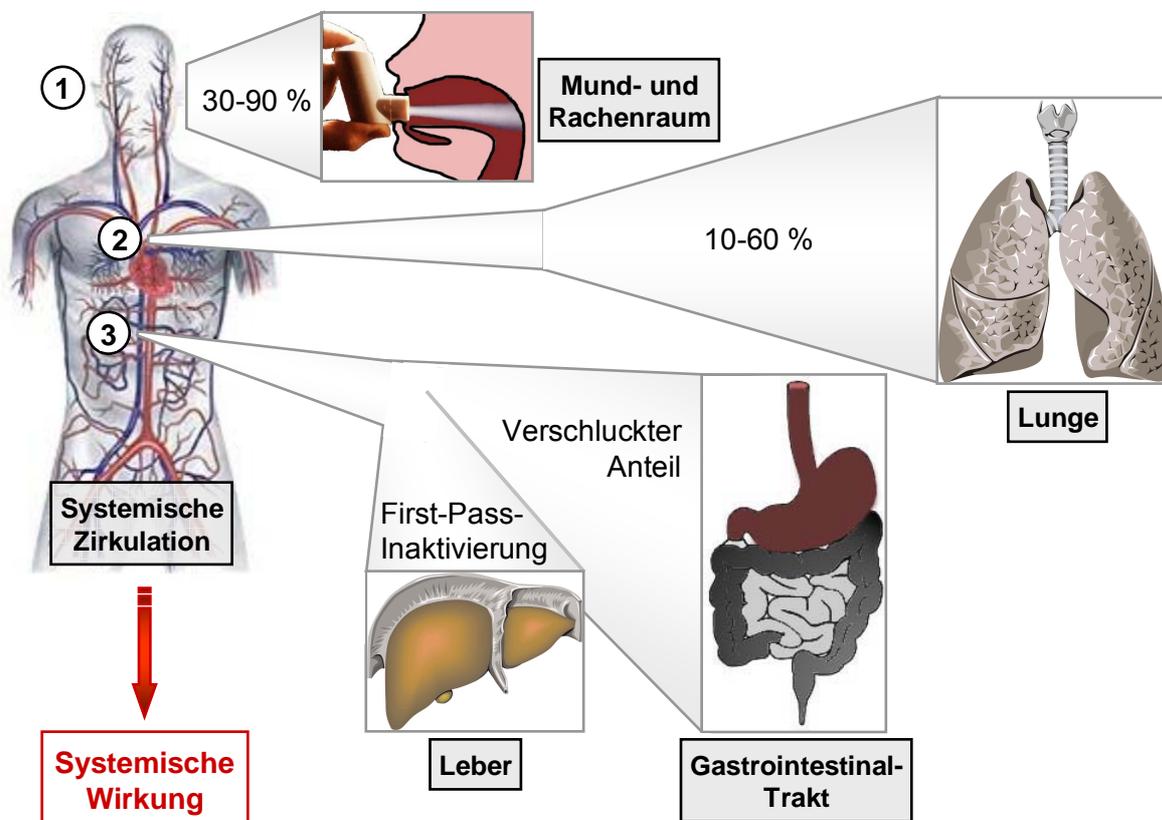


Abbildung 2: Schicksal eines inhalativen Glucocorticoids nach Applikation eines Dosieraerosols: Abhängig von der Formulierung wird ein Großteil der versprühten Dosis (30-90 %) bereits im Mund- und Rachenraum deponiert **(1)** und anschließend fast vollständig verschluckt [56]. Partikel, die schließlich mit dem Luftstrom in die Lunge gelangen (10-70 %), lagern sich dort überwiegend ab, ein geringer Anteil wird allerdings auch wieder ausgeatmet (bis zu 10 %) **(2)**. Der verschluckte Anteil wiederum kann abhängig von der oralen Bioverfügbarkeit ebenfalls zu systemischen Wirkstoffspiegeln beitragen **(3)**. (Abbildung modifiziert nach [57])

Tierexperimentelle *In-vivo*-Untersuchungen dagegen unterliegen nicht diesen Limitationen und werden daher häufig für diese Art von Experimenten eingesetzt [58-60]. Allerdings stehen den erweiterten Bestimmungsmöglichkeiten im Tiermodell oft entscheidende Einschränkungen in

deren Aussagekraft gegenüber. Denn neben Unterschieden auf molekularer Ebene wie z.B. Proteinbindungsstellen oder Enzymausstattung unterscheiden sich gerade die Atemwege der gebräuchlichen Versuchstiere, Hund und Nagetiere, in ihrem anatomischen und physiologischen Aufbau signifikant von den humanen. Dabei konnte in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden, dass die Struktur der Atemwege und die Art der pulmonalen Perfusion einen erheblichen Einfluss auf die Deposition inhalierter Partikel einerseits und die folgenden Absorptionsvorgänge andererseits haben können [61, 62]. Weiterhin stellt auch die Verabreichung inhalativer Applikationsformen ein nur schwer zu lösendes Problem dar. In den überwiegenden Fällen können die Wirkstoffe nur in Form einer intratrachealen Instillation oder Verneblung getestet werden, gängige Arzneiformen wie Pulverinhalatoren oder Dosieraerosole dagegen bleiben die Ausnahme [63, 64]. Zusätzlich sind die Tiere meist während des ganzen Versuches narkotisiert, so dass eine dem Wachzustand entsprechende Physiologie nicht gewährleistet werden kann. Bei einigen inhalativen Narkosemitteln wird sogar vermutet, dass sie die pulmonale Absorption signifikant beeinträchtigen könnten [65].

Eines haben aber alle *In-vivo*-Untersuchungen gemeinsam: Sie sind nicht in der Lage, die bei der pulmonalen Absorption auftretende Umverteilungskinetik isoliert zu betrachten, da die dabei gemessenen Blutspiegel aufgrund der Probenentnahme aus dem venösen Blut bereits durch Verteilungsprozesse in andere Gewebe, Metabolisierung in der Leber oder andere Eliminationsschritte verfälscht sind. Werden Substanzen mit einer signifikanten oralen Bioverfügbarkeit untersucht, kann auch dieser Anteil zusätzlich die Bestimmung beeinträchtigen [66]. Um diese Vorgänge tatsächlich isoliert beschreiben zu können, muss auf *In-vitro*-Modelle zurückgegriffen werden.

Nahezu physiologische Bedingungen können hier durch Lungenperfuisionsmodelle simuliert werden, wobei bisher ausschließlich Perfuisionsmodelle mit tierischen Lungen Anwendung fanden [63, 67-71]. Ziel dieser Untersuchung war es daher, die Vorteile eines Lungenperfuisionsmodells mit der Authentizität humanen Gewebes zu verbinden und so einen Versuchsaufbau zu etablieren, der es erlaubt, die initiale Phase der pulmonalen Absorption eines inhalativen Glucocorticoids nach Anwendung eines handelsüblichen Dosieraerosols zu verfolgen. In diesem Zusammenhang sollte außerdem zunächst ein einfaches Dialysemodell entwickelt werden, das im Vorfeld eine erste Abschätzung der Umverteilungskinetik inhalativ applizierter Glucocorticoide von Lungengewebe in ein frei wählbares Dialysat ermöglicht. Die Flexibilität bei der Auswahl der Dialyseflüssigkeit sollte gleichzeitig dazu genutzt werden, den Einfluss der Zusammensetzung dieser auf den Verlauf und das Ausmaß der Umverteilung zu bestimmen.

Als Modellsubstanz wurde Beclomethasondipropionat (BDP) gewählt, das per se nur eine geringe Affinität zum Glucocorticoid-Rezeptor besitzt. Die Substanz muss erst durch Esterspaltung in das sehr viel potentere Beclomethason-17-propionat überführt werden, um ihre volle Wirkung zu entfalten [72]. Der Abbau der Muttersubstanz zu seinem Hauptmetaboliten Beclomethason-17-propionat (17-BMP) sowie zu Beclomethason-21-propionat (21-BMP) und Beclomethason (B), die für die klinische Wirkung eine vernachlässigbare Rolle spielen, wird wahrscheinlich durch unspezifische Esterasen katalysiert und vollzieht sich auch in humanem Blutplasma und Lungengewebe [73] (siehe *Abbildung 3*). Weitere Metabolite sind außer in Spuren in diesen Matrices nicht zu erwarten. Aufgrund dessen kann ein Nachweis dieser Metabolite als Surrogatparameter für die biologische Integrität der Modelle dienen.

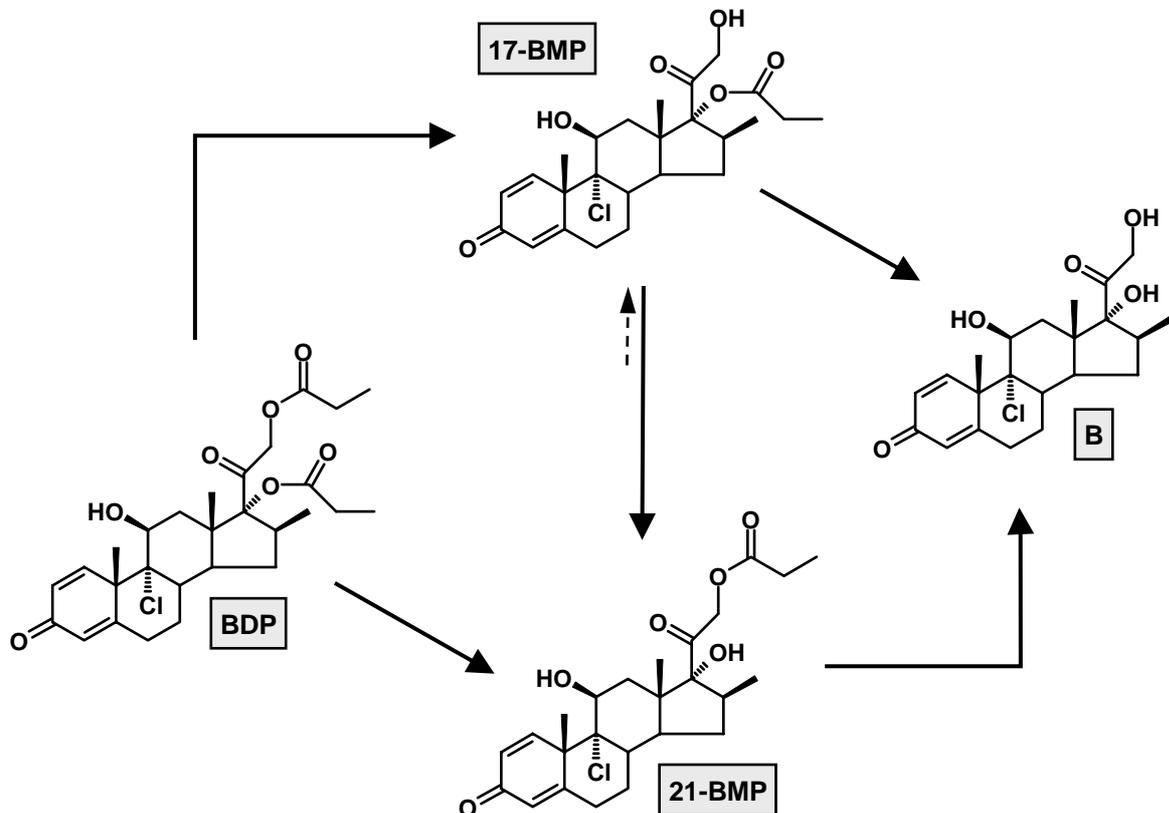


Abbildung 3: Beclomethasondipropionat (BDP) wird in humanem Lungenhomogenat sehr rasch, in humanem Plasma in geringerem Maße, in Beclomethason-17-propionat (17-BMP) umgewandelt, dessen verbliebene Esterbindung wiederum verzögert zum Beclomethason (B) gespalten wird. Im Gegensatz zum Lungenhomogenat kann in Plasma zusätzlich ein Metabolismus der Muttersubstanz BDP und der aktiven Form 17-BMP zum Beclomethason-21-propionat (21-BMP) beobachtet werden, wobei das Gleichgewicht der Umesterungsreaktion stark zugunsten des Esters in Position 21 verschoben ist. Auch 21-BMP wird letztendlich in den freien Alkohol B umgesetzt [73].

BDP ist als Wirkstoff für die Inhalationstherapie schon seit 1976 zugelassen [74], so dass sich zum einen eine Reihe von verschiedenen Formulierungen im Handel befindet und zum anderen ausreichend Datenmaterial aus klinischen Studien zur Verifizierung der Ergebnisse zur Verfügung steht. Des Weiteren hatte sich im Zuge der Umstellung auf FCKW-freie Treibgase herausgestellt, dass die Zusammensetzung der Hilfsstoffe von Dosieraerosolen einen erheblichen Einfluss auf die Pharmakokinetik dieser Substanz haben kann [75-78]. Aus diesem Grund wurden bei der vorliegenden Untersuchung die beiden handelsüblichen Dosieraerosole Sanasthmax[®] und Ventolair[®], die wegen des Einsatzes verschiedener Hilfsstoffe ein unterschiedliches Partikelspektrum erzeugen [27], einander gegenübergestellt. Es sollte festgestellt werden, ob mit Hilfe der entwickelten Systeme zusätzlich mögliche Unterschiede in der Pharmakinetik von BDP in Abhängigkeit vom verwendeten Präparat detektiert werden können.

1.2 Dialysemodell

1.2.1 Prinzip der Bestimmung

1.2.1.1 Hintergrund der *In-vitro*-Untersuchung

Die pulmonale Absorption inhalativer Glucocorticoide wird zu einem erheblichen Maße durch deren Auflösungskinetik im epithelialen Flüssigkeitsfilm (Epithelial Lining Fluid) und ihre Affinität zum Gewebe bestimmt. Sich in der Lunge befindliche Wirkstoffkristalle müssen sich zunächst im ELF auflösen, um ihre Wirkungen entfalten zu können. Dabei ist es einerseits wichtig, dass möglichst schnell geeignete Wirkstoffspiegel erreicht werden, andererseits sollte aber nicht der gesamte Arzneistoff sofort in Lösung gehen, da dies nur eine rasche Absorption in die systemische Zirkulation zur Folge hätte [79, 80]. Wirkstoffkristalle, die sich nur langsam auflösen, würden dagegen eine Depotwirkung erzeugen [81].

Nach dem Auflösen der Substanz wird diese dann in das umliegende Gewebe resorbiert, wo sie entweder an die Zielstruktur oder an andere, unspezifische intra- und extrazelluläre Bestandteile binden kann. Dem wirkt die Umverteilung des Wirkstoffs erst in das Blut und schließlich in die übrigen Gewebe entgegen. Ausmaß und Geschwindigkeit dieses Prozesses hängen dabei von dessen Gewebeaffinität ab, wobei eine hohe Affinität zum Lungengewebe einer retardierten Umverteilung und damit längeren lokalen Wirkung gleichkommt [82].

Methoden zur Beschreibung dieser Prozesse *in vitro* erfassen meist nur einen der Vorgänge separat. So wurden sowohl Untersuchungen zur Auflösungskinetik in verschiedenen Medien und unter unterschiedlichen Bedingungen [29, 33, 83, 84] als auch zur Bindung von Glucocorticoiden an eine Auswahl relevanter Zielgewebe [82, 85] publiziert. Vorteile der Gewebestudien ergeben sich aus der Tatsache, dass hier mit humanen Gewebesuspensionen gearbeitet werden kann. Dabei wird Lungengewebe in sehr feine Stücke zerkleinert und in Puffer oder Blutplasma inkubiert. Nach Zugabe der zu untersuchenden Substanz können Adsorption und Desorption beobachtet werden. Gleichzeitig besteht aber auch die Möglichkeit, Metabolisierungsvorgänge aufgrund der Enzymaktivität im Lungengewebe, die bis zu 34 % der Aktivität in der Leber betragen kann [86], zu beobachten. Ähnliches gilt auch für Lungenhomogenate [87]. Allerdings werden die GC in diesen Untersuchungen stets als Lösung eingesetzt, so dass der Beitrag der Auflösungskinetik zur Gewebeaffinität hiermit nicht beurteilt werden kann. Das entwickelte Dialysemodell sollte nun diese beiden Vorgänge in einem möglichst einfachen Versuchsaufbau vereinen, um so für ein erstes Screening geeignet zu sein.

Die Diffusionsstrecken während der pulmonalen Absorption in die systemische Zirkulation sind sehr kurz, so liegen zwischen Alveolarraum und Lumen eines Kapillargefäßes nur etwa 0.5 µm intra- und extrazellulärer Matrix. Gleichzeitig ist die Lunge aufgrund des pulmonalen Blutkreislaufs vor allem im Bereich der Alveolen und respiratorischen Bronchiolen bei einer Kapillarendothelfläche von etwa 126 m² eines der am besten durchbluteten Organe des menschlichen Körpers [88]. Obwohl die Kapillardichte dabei besonders auf den Alveolarbereich konzentriert ist und im zunehmenden Abstand hiervon stark abnimmt [89], muss dieser Tatsache bei der Geometrie des Versuchsaufbaus Rechnung getragen werden. Des Weiteren sind einerseits die Zielzellen inhalativer GC, nämlich proinflammatorische eosinophile Granulozyten, Lymphozyten oder Makrophagen, gleichmäßig über das Lungengewebe verteilt [22], andererseits wird aber vor allem Entzündungsvorgänge in den kleinen Atemwegen bei Asthma immer mehr Rechnung getragen [90]. Daher erschien es sinnvoll, humanes Lungenhomogenat aus peripherem Gewebe als Lungenersatzmatrix zu verwenden.

1.2.1.2 Ausführung der Dialyseversuche

Die Dialyse wurde in dafür selbst konstruierten, zylindrischen Dialysekammern durchgeführt, die jeweils durch eine Dialysemembran in zwei Teile separiert wurden. Im unteren Teil mit einer Tiefe von 3 mm und einem Fassungsvermögen von 4.8 mL befand sich Lungenhomogenat, im oberen, bei einer Tiefe von 6 mm und einem Fassungsvermögen von 9.5 mL, die gewünschte

Dialyseflüssigkeit (siehe *Abbildung 4, C*). Um das Homogenat mit GC-Kristallen versetzen zu können, wie sie durch die Dosieraerosole Sanasthmax[®] bzw. Ventolair[®] erzeugt werden, wurden außerdem eigens zwei passende Applikationshilfen angefertigt (siehe *Abbildung 4, A*).

Die Versorgung des Kammeroberteils mit Dialyseflüssigkeit erfolgte über ein Reservoir, das über ein Mehrwegeventil mit der Dialyseapparatur verbunden war. Dabei ermöglichte eine Öffnung im Kammeroberteil, durch Erzeugung von Unterdruck entweder mit Hilfe eines Pipettensaugers oder einer Mikroliterpipette Flüssigkeit aus dem genannten Reservoir in das Kammeroberteil zu saugen. Auf diese Weise konnten zum einen die Kammer zu Beginn des Versuches mit der Dialyseflüssigkeit befüllt und zum anderen während des Versuches unter gleichzeitigem Volumenersatz Proben aus dem Dialysat gewonnen werden (siehe *Abbildung 4, B und D*).

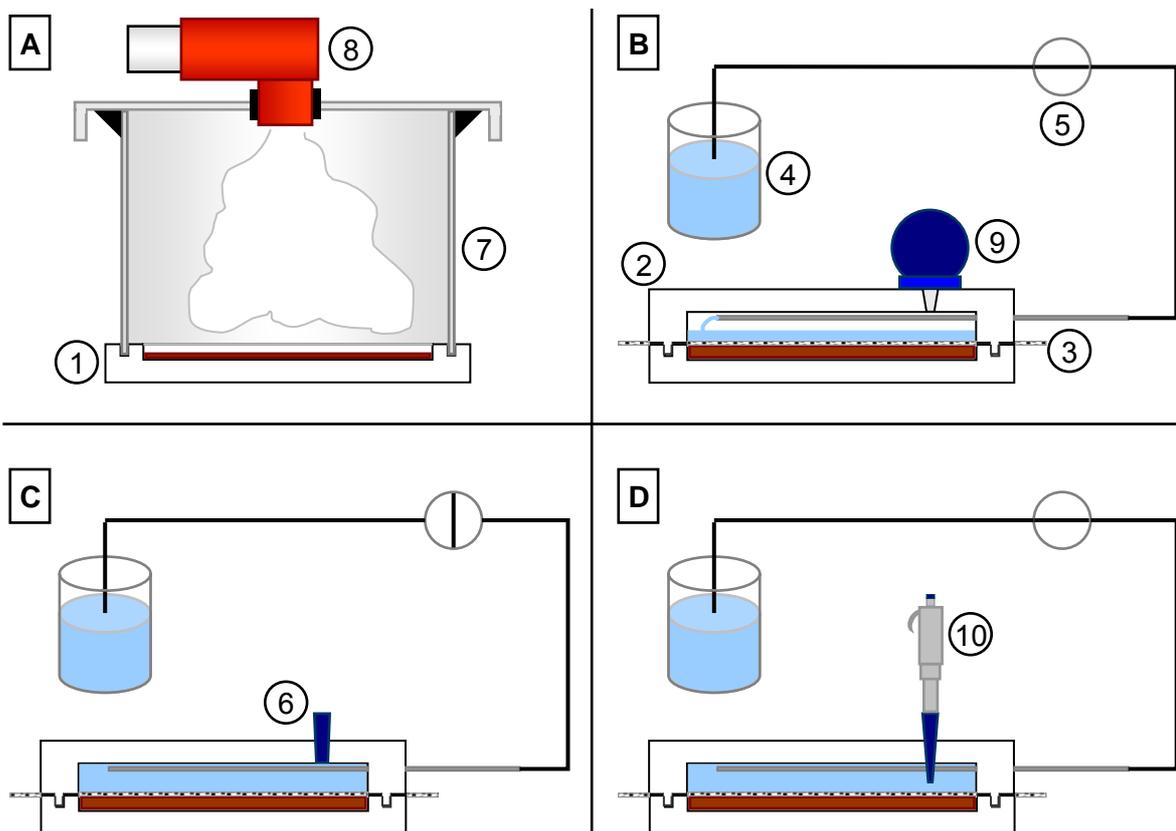


Abbildung 4: Schematische Darstellung zum Ablauf eines Dialyseversuches: **(A)** Besprühen des Lungenhomogenates mit dem zu untersuchenden Dosieraerosol. **(B)** Befüllen der Kammer mit der Dialyseflüssigkeit. **(C)** Inkubation bei 37 °C. **(D)** Probenentnahme. [1) Unterteil der Dialysekammer; 2) Oberteil der Dialysekammer; 3) Dialysemembran; 4) Reservoir; 5) Mehrwegeventil; 6) Verschluss; 7) Applikationshilfe; 8) Aktiviertes Dosieraerosol; 9) Pipettensauger; 10) Mikroliterpipette]

Da ein Mehrwegeventil bei der Verbindung von Dialysekammer und Flüssigkeitsreservoir Anwendung fand, war außerdem ein Parallelversuch mit zwei Kammern möglich. Der genaue Aufbau und die exakten Ausmaße der einzelnen Bestandteile der Dialyseapparatur können Kapitel 1.2.2, C – Experimenteller Teil, entnommen werden.

Nach Vorwärmen aller Bestandteile der Dialyseapparatur, insbesondere Dialyseflüssigkeit und Dialysekammer, und des Lungenhomogenats auf 37 °C wurde ein Teil des Homogenats in das Kammerunterteil überführt und mit dem zu untersuchenden Dosieraerosol besprüht (siehe *Abbildung 4, A*). Es wurden dabei äquivalente Nominaldosen von 500 µg BDP aufgebracht. Anschließend wurde das restliche Homogenat hinzugegeben und das gesamte Homogenat durchmischt. Für die folgende Dialyse wurde dann die vorbereitete Membran aufgelegt, die Dialysekammer mit dem Oberteil verschlossen und schließlich die Dialyseflüssigkeit unter Erzeugung eines Unterdruckes im Kammeroberteil durch einen Pipettensauger eingeleitet (siehe *Abbildung 4, B*). Als Flüssigkeit wurde entweder Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (pH = 7.4) oder humanes Blutplasma verwendet.

War das Kammeroberteil vollständig mit der Dialyseflüssigkeit befüllt worden, wurde die Verbindung zum Reservoir unterbrochen und die Dialysekammer verschlossen (siehe *Abbildung 4, C*). Während der folgenden Inkubation bei 37 °C über 360 Minuten wurden in festgelegten Abständen Proben mit einem Volumen von 500 µL aus dem Dialysat gewonnen. Dabei wurde zunächst die Verbindung zum Flüssigkeitsreservoir wiederhergestellt und eine Mikroliterpipette in der Öffnung des Kammeroberteils positioniert. Die anschließende Entnahme der Probe bewirkte mittels Druckausgleich gleichzeitig den Ersatz des Probenvolumens durch frische, 37 °C warme Dialyseflüssigkeit aus dem Reservoir (siehe *Abbildung 4, D*).

Beendet wurde die Probenentnahme durch Wiederverschließen der Dialysekammer und Abtrennung der Verbindung zum Reservoir (siehe 1.3.2.3, C – Experimenteller Teil). Alle Proben wurden auf den Gehalt von BDP und dessen Metaboliten 17-BMP, 21-BMP und B hin untersucht. Für beide Präparate wurden je drei Dialyseversuche pro Dialyseflüssigkeit durchgeführt.

Da sich die physikalischen Eigenschaften der erzeugten Aerosole von Sanasthmax[®] und Ventolair[®] vor allem hinsichtlich Partikelgröße und Ausbreitungsgeschwindigkeit stark unterscheiden [27], war anzunehmen, dass auch der Anteil der Dosis, der nach Aktivierung eines Dosieraerosols tatsächlich im Homogenat verbleiben würde, abhängig vom verwendeten Präparat variieren würde. Deswegen wurde dieser Anteil für jedes der getesteten Dosieraerosole in einer Dreifach-Bestimmung quantifiziert. Hierzu wurde ein Kammerunterteil bei RT mit KRP-HEPES gefüllt und eine Dosisapplikation identisch zur der während eines

Dialyseversuches vollzogen. Anschließend konnte diejenige Menge BDP, die sich im Puffer befand oder am Kammerunterteil adsorbiert vorlag, bestimmt werden. Ausgehend von dieser Untersuchung konnten die bestimmten Dialysatkonzentrationen von BDP, 17-BMP, 21-BMP und B in den Anteil der tatsächlich applizierten Dosis umgerechnet werden, der bis zum Zeitpunkt der Probenentnahme in das Dialysat übergegangen war (siehe 1.5, C - Experimenteller Teil).

1.2.2 Ergebnisse

Wie erwartet unterschieden sich beide Präparate in der tatsächlich auf dem Lungenhomogenat deponierten Dosis. Während mit Sanasthmax[®] aufgrund seiner geringeren Ausbreitungsgeschwindigkeit bei der Generierung des Aerosols und der größeren Partikel $153 \pm 15 \mu\text{g}$ BDP in den Dosierungsversuchen wieder gefunden wurden, konnten bei Ventolair[®], dessen erzeugtes Aerosol mit hoher Geschwindigkeit auf die Oberfläche des Kammerunterteils prallte, von dort wieder aufwirbelte und nur sehr langsam sedimentierte, nur $61 \pm 2 \mu\text{g}$ nachgewiesen werden (siehe 1.2.1.2).

Trotz der geringeren deponierten Dosis wurden nach Applikation von Ventolair[®] aber ähnliche Konzentrationen an BDP und 17-BMP im Dialysat ermittelt wie in den Versuchen mit Sanasthmax[®]. Berechnete man daher den Anteil der tatsächlich applizierten Dosis, der zu einem bestimmten Zeitpunkt bereits in das Dialysat übergegangen war, wiesen die Dialyseverläufe beider Präparate erhebliche Unterschiede auf (siehe *Diagramm 2*).

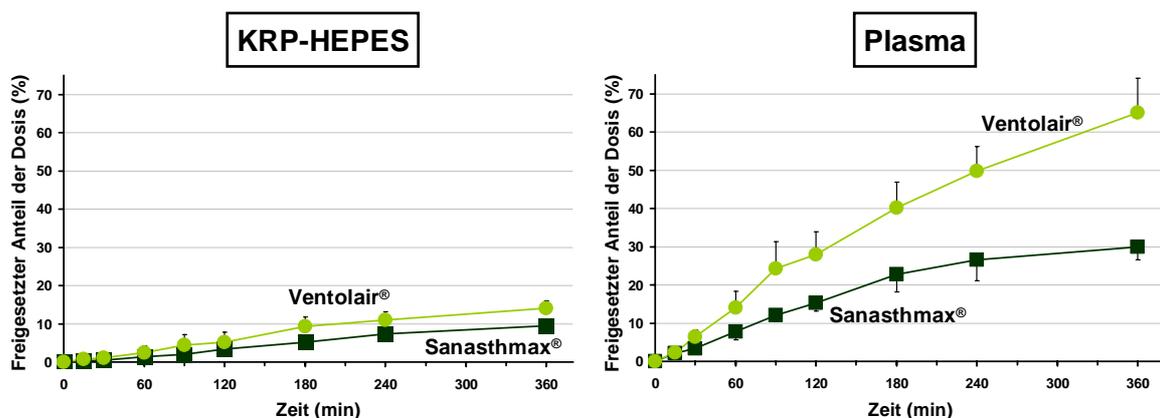


Diagramm 2: Verlauf des in das Dialysat freigesetzten Anteils der tatsächlich applizierten Dosis in Abhängigkeit von der verwendeten Dialyseflüssigkeit: Das rechte Diagramm zeigt den Verlauf in Plasma, der linke in KRP-HEPES. [Mittelwert \pm Mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert, $n = 3$]

Von Ventolair® erzeugte BDP-Kristalle bewirkten dabei eine sehr viele schnellere Freisetzung der Substanz und deren Metabolite in das Dialysat als diejenigen von Sanasthmax®. Der Vergleich der beiden verwendeten Dialyseflüssigkeiten KRP-HEPES und humanes Blutplasma wiederum zeigten eine ebenso signifikante Abweichung in den Dialyseverläufen. Zwar wurde in beiden Medien qualitativ der gleiche Unterschied in der Freisetzung der Dosis zwischen den Präparaten beobachtet, in Plasma wurden aber im Gegensatz zum Puffer um etwa den Faktor 3 höhere Mengen der applizierten Dosis gefunden (siehe *Diagramm 2*). Im Folgenden wird daher nur auf die Dialyseversuche mit Plasma näher eingegangen.

Während zu Beginn der Dialyse nach 15 min noch äquivalente Dosisanteile von im Mittel 2.2 % bei Versuchen mit Sanasthmax® und 2.3 % bei Ventolair® in das Dialysat übergegangen waren, traten bereits nach 30 min unterschiedliche Dosisanteile, 3.3 % bei Sanasthmax® und 6.5 % bei Ventolair®, im Dialysat auf, deren Diskrepanz sich bis zum Ende der Dialyse nach 360 min sogar noch auf 29.9 % beziehungsweise 65.1 % vergrößerte.

Betrachtete man die Dialyseverläufe der Muttersubstanz BDP und 17-BMP einzeln, so bestätigen sich in beiden Fällen die beobachteten Unterschiede (siehe *Diagramm 3*). Dabei ist vor allem bei BDP der sehr viel steilere Kurvenverlauf am Anfang der Dialyse offensichtlich. In Übereinstimmung mit dem beschriebenen Metabolismus der Substanz (siehe 1.1) liegt weiterhin ein Großteil der applizierten Dosis als aktiver Metabolit vor, der bereits nach 15 min in nennenswerten Konzentrationen (Sanasthmax®: 94 ng/mL, Ventolair®: 44 ng/mL) zu finden ist.

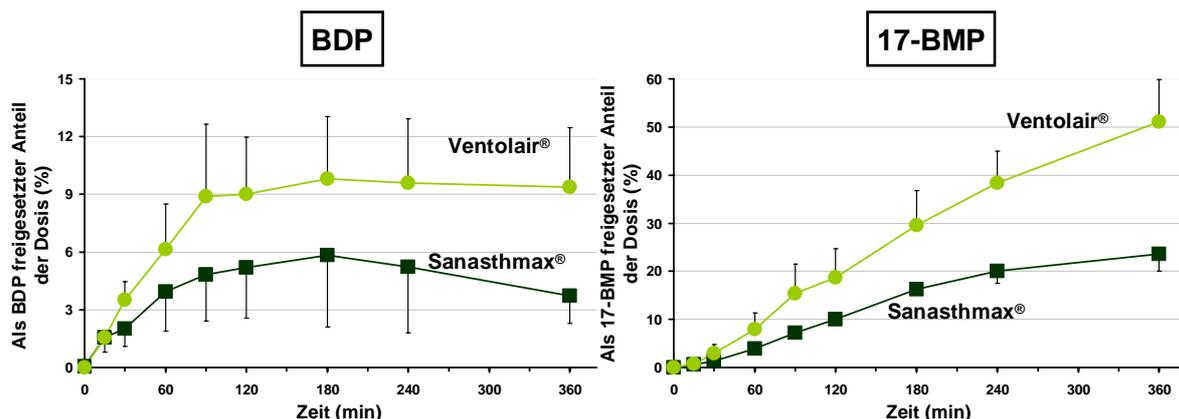


Diagramm 3: Verlauf des als BDP oder 17-BMP in das Dialysat (Humanplasma) freigesetzten Anteils der tatsächlich applizierten Dosis. [Mittelwert \pm Mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert, n = 3]

Auch bezüglich der Metaboliten 21-BMP und B zeigten sich Übereinstimmungen mit entsprechenden Metabolismusstudien [73]. So wurde sowohl bei Puffer als auch Plasma als Dialyseflüssigkeit erst nach gut 120 min genügend B produziert, dass dieses im Dialysat

nachweisbar war. 21-BMP wurde aufgrund der zusätzlichen metabolischen Kapazität teilweise schon 90 min nach Inkubation in quantifizierbaren Plasmakonzentrationen detektiert, im Puffer dagegen wurden erst in Proben 180 min nach Beginn der Dialyse entsprechende Mengen beobachtet. Die Herkunft des im Puffer gefundenen 21-BMP ist dabei wohl auf chemische Hydrolyse zurückzuführen (siehe 1.1, D - Tabellarischer Anhang).

1.2.3 Diskussion

Wie eingangs beschrieben ist eine lange Verweilzeit inhalativer Glucocorticoide in der Lunge erwünscht. Als *In-vitro*-Parameter für diese können die Affinität der Substanz zu humanem Lungengewebe (Gewebebindung) und die Auflösungsgeschwindigkeit z.B. in Bronchialflüssigkeit dienen. Das Dialysemodell wurde entworfen, das Zusammenspiel dieser Prozesse beschreiben zu können. Da in diesem Fall zwei Präparate mit demselben Wirkstoff untersucht wurden, sollten die beobachteten Unterschiede nur in der Auflösungskinetik begründet liegen. Einflüsse durch die verwendeten Matrices können weitestgehend ausgeschlossen werden, wenn man bedenkt, dass sowohl das verwendete Gewebemomenat als auch das Plasma je Aliquots desselben Ausgangspools (siehe 1.2.1, C – Experimenteller Teil) waren.

Von Sanasthmax[®] versprühte Kristalle scheinen sich folglich langsamer im Lungenhomenat aufgelöst zu haben als diejenigen erzeugt von Ventolair[®], dabei aber anfangs schnell genug, um in den ersten 15 min der Dialyse ähnliche Mengen der Dosis freizusetzen wie bei Versuchen mit dem Vergleichspräparat. Das Ausmaß der Freisetzung hing wiederum stark von der Zusammensetzung der Dialyseflüssigkeit ab. Zwar glichen sich die Konzentrationsprofile in beiden Medien in Bezug auf die beobachteten Unterschiede in der Auflösungs- und Umverteilungskinetik, in KRP-HEPES wurden aber deutlich geringere Mengen der Dosis nachgewiesen als in Plasma. Für eine sinnvolle Interpretation dieses Sachverhaltes muss zunächst das Prinzip des Stoffaustausches während einer Dialyse berücksichtigt werden.

Es können ausschließlich Moleküle, die frei bzw. ungebunden in Lösung vorliegen, über eine Dialysemembran diffundieren. Quantitativ wird dieser Übergang durch einen bestehenden Konzentrationsgradienten eben dieses Anteils der Substanz bestimmt [91]. Da KRP-HEPES keine Bestandteile enthält, die die untersuchten GC potentiell binden könnten, entsprechen die hier gemessenen Konzentrationen auch den freien Konzentrationen der GC. Im Plasma hingegen sind die enthaltenen Proteine durchaus in der Lage, Bindungen mit diesen Verbindungen einzugehen. Auf diese Weise wird die tatsächliche freie Konzentration erniedrigt, der Konzentrationsgradient bleibt steiler und auch länger bestehen und es geht folglich mehr

Substanz in das Dialysat über. Auch wenn für 17-BMP keine Daten vorliegen, sollte allein die Tatsache, dass für BDP eine Plasmaproteinbindung von 87 % publiziert wurde [57], den dargelegten Sachverhalt ausreichend unterstützen.

Die Unterschiede zwischen den getesteten Präparaten in der Auflösungs- und Umverteilungskinetik wurden allerdings erst durch den Bezug der Dialysatkonzentrationen auf die tatsächlich applizierte Dosis erkennbar. Hierzu lässt sich zunächst argumentieren, dass in den Experimenten mit Sanasthmax[®] im Durchschnitt die etwa zweieinhalbfache Menge an BDP im Vergleich zu Versuchen mit Ventolair[®] auf das Lungenhomogenat aufgebracht wurde und dieses Ungleichgewicht die ähnlichen Konzentrationsprofile bedingten. Gleichzeitig wirft die hohe mit Sanasthmax[®] applizierte Dosis aber auch die Frage auf, ob die Dialysatkonzentrationen während dieser Versuche nicht unabhängig von der tatsächlich vorliegenden BDP-Menge durch Löslichkeitsprobleme beeinflusst wurden und die Umrechnung auf den freigesetzten Anteil der Dosis daher irreführend war. Hinweise auf diese Problematik geben die nachfolgend beschriebenen Beobachtungen.

In den Experimenten mit Ventolair[®] wurden nach 6 h Inkubation im Mittel 65 % der applizierten Dosis im Plasma wiedergefunden. Weiterhin wurde in den Dialyseversuchen aufgrund des Kammeraufbaus doppelt soviel Dialyseflüssigkeit eingesetzt wie Lungenhomogenat. Im Falle einer zumindest gleichmäßigen Verteilung in beiden Matrices bedeutet dies, dass sich zu diesem Zeitpunkt die gesamte verabreichte Dosis in Lösung befand. Unterstützt wird die Annahme durch Gewebestudien [82], in denen nach Inkubation von feinsten, mit GC gesättigten Gewebestücken mit Blutplasma im zehnfachen Überschuss 53 % des BDP und 70 % des 17-BMP am Gewebe verblieben, womit eine unverhältnismäßig bevorzugte Verteilung ins Plasma ausgeschlossen werden kann. Im Gegensatz dazu waren nach Applikation von Sanasthmax[®] am Ende der Dialyse im Mittel nur 30 % der deponierten Dosis ins Plasma übergegangen. Geht man von vergleichbaren Bindungsverhältnissen im Homogenat aus, führt das zu dem Schluss, dass sich selbst nach 6 h Inkubation noch nicht alle Substanzkristalle aufgelöst hatten.

Außerdem besitzen inhalative GC aufgrund ihrer Lipophilie im Allgemeinen eine sehr schlechte Wasserlöslichkeit. Högger und Kollegen [92] berichten in diesem Zusammenhang von einer Wasserlöslichkeit des BDP von 0.13 µg/mL, so dass bei Plasmakonzentrationen von vereinzelt bis zu 1.3 µg/mL durchaus die Löslichkeitsgrenze erreicht worden sein konnte. Ausgeglichen werden die Verhältnisse aber durch das besser lösliche 17-BMP (15.5 µg/ml [92]), das in Dialysatkonzentrationen unter 3.0 µg/mL nachgewiesen wurde. Da der Großteil der Dosis in Form des Hauptmetaboliten vorliegt, wird eine Beschränkung der Umverteilung auf

diese Weise unwahrscheinlich, vor allem auch vor dem Hintergrund, dass aufgrund der Plasmaproteinbindung die Löslichkeitsverhältnisse in Plasma nicht mit denen in Wasser zu vergleichen sind. Die bei den Versuchen mit Sanasthmax[®] am Ende noch vorhandenen Substanzkristalle sind daher positiv zu bewerten, da dies einen erwünschten Retardierungseffekt darstellt.

Negative Auswirkungen könnte diesbezüglich eher die fehlende mechanische Durchmischung innerhalb der Dialysekammer haben. Im Homogenat gelöste Substanz kann nur langsam in das Dialysat übergehen und erzeugt so Sättigungszustände. Hinweise auf das Vorhandensein solcher Prozesse geben die Konzentrationsverläufe der Dialyseversuche, wo trotz sechsständiger Inkubationen und Normierung auf die Gesamtmenge aller vorliegender GC kein Plateau zu erkennen ist. Zwar wird BDP in der Literatur ein im Vergleich zu anderen GC langsame Auflösungs geschwindigkeit bescheinigt [33], trotzdem kann eine Limitierung der Aussagekraft des Dialysemodells durch diesen Sachverhalt nicht ausgeschlossen werden.

Weitere Einschränkungen der Übertragbarkeit auf die Situation *in vivo* ergeben sich aus dem Aufbau der Dialysekammer. Da die Substanzpartikel gleichmäßig im Lungenhomogenat verteilt werden, sind gelöste Moleküle unter Umständen über 3 mm von der Austauschoberfläche zwischen Gewebe und Dialysat entfernt. Selbst in unmittelbarer Nähe zur Dialysemembran beträgt die Barriere zwischen diesen Kompartimenten aufgrund der Membranstärke mehr als 60 µm (siehe 1.2.4, C - Experimenteller Teil). Diese Diffusionstrecken bzw. Entfernungsverhältnisse übersteigen diejenigen *in vivo* um ein Vielfaches (siehe 1.2.1.1). Abgesehen hiervon ist natürlich auch die Größe der Austauschoberflächen nicht vergleichbar. Allerdings sollte bedacht werden, dass solche Verhältnisse *in vitro* auch kaum zu realisieren sind, sondern nur bestmöglich angenähert werden können. Die Verwendung eines Lungenhomogenats birgt außerdem die Nachteile, dass zum einen Organ- und Zellstrukturen zerstört werden, wodurch Bindungs- und Verteilungsprozesse beeinträchtigt werden können, und zum anderen unphysiologisch hohe Flüssigkeitsvolumina zum Auflösen der deponierten Wirkstoffkristalle zur Verfügung stehen (siehe 1.4).

Neben den unphysiologischen Verhältnissen in der Dialysekammer können auch Adsorptionseffekte, gerade die Dialysemembran betreffend, Einfluss auf das Ergebnis der Dialyse nehmen. Vor allem lipophile Substanzen wie inhalativ angewendete GC neigen zur Adsorption an Kunststoffoberflächen. Dem kann aber z.B. durch Verwendung von Blutplasma als Dialyseflüssigkeit sehr gut entgegengewirkt werden [93]. Schließlich muss auch erwähnt werden, dass das auf das Lungenhomogenat applizierte Partikelspektrum auch Partikel enthält, die aufgrund ihres aerodynamischen Durchmessers *in vivo* bereits im Mund- und Rachenraum

abgeschieden worden wären [94]. Welchen Einfluss dies auf den Verlauf der Dialyse hatte, kann aber nicht abgeschätzt werden.

1.3 Humanes Lungenperfusionsmodell

1.3.1 Prinzip der Bestimmung

1.3.1.1 Eigenschaften der Lungenperfusionsmodelle

Lungenperfusionsmodelle ermöglichen durch extrakorporale Reperfusion und Beatmung resezierten Lungengewebes eine realitätsnahe Simulation der pulmonalen Physiologie. Während in Modellen tierischen Ursprungs auch die gesamte Lunge verwendet werden kann, beschränkt sich die Reperfusion von humanem Gewebe bisher auf Lungenlappen und Lungenflügel. Im Gegensatz zu anderen Untersuchungen mit humanem Gewebestücken oder -homogenaten bleibt dabei die Organstruktur, gekennzeichnet durch anatomischen Aufbau, zelluläre Integrität, Permeabilitätsbarrieren, Zell-Zell-Interaktionen und biochemische Aktivität weitestgehend erhalten [95, 96]. In der Lunge ablaufende pharmakokinetische Vorgänge können daher isoliert von systemischen Einflüssen wie Umverteilung in andere Gewebe, Metabolisierung durch Leberenzyme oder Eliminationsprozesse unter nahezu physiologischen Bedingungen beschrieben werden.

Limitiert wird die Aussagekraft dieser Modelle hauptsächlich durch deren zeitlich begrenzte Einsatzfähigkeit, die in zunehmenden Zelluntergängen und Ödembildung begründet liegt [96, 97]. So können auch in Tiermodellen mit ganzen Lungen selten Perfusionszeiten von über fünf Stunden ohne signifikante pathophysiologische Veränderungen erreicht werden, wenn mit hohen, der Physiologie angenäherten Flussraten gearbeitet wird [98]. Entscheidend für die Wahl der Flussraten ist dabei der erzeugte Perfusionsdruck im Kapillarbett, da die Ödembildung und Schädigung der Lunge durch unphysiologisch hohe Drücke forciert wird [99]. Im humanem Lungenperfusionsmodell werden entsprechende Verhältnisse schon bei weit unter dem physiologischen Wert liegenden Perfusionsflüssen erreicht [41].

Neben dem Perfusatfluss spielt auch die Zusammensetzung der verwendeten Perfusionslösung eine entscheidende Rolle. Generell stehen hierzu entweder Blutprodukte (Vollblut, Plasma, Erythrozytenkonzentrate) oder Pufferlösungen zur Verfügung. Werden Pufferlösungen verwendet, ist die Zugabe von Glucose für den Zellstoffwechsel und makromolekularer Substanzen wie z.B. Hydroxyethylstärke, Dextrane oder Proteine zum

Aufbau eines onkotischen Druckes im Perfusat essentiell [98, 100-102]. In ähnlichem Ausmaß ist auch auf ein geeignetes Beatmungsregime zu achten, da Überbelüftung und zu hohe Beatmungsdrücke sowohl das Gewebe schädigen als auch die Perfusion einzelner Gewebeareale beeinflussen können [103-106].

Im Allgemeinen wird nur die pulmonale Zirkulation wiederhergestellt werden, der bronchiale Kreislauf und pulmonale Lymphfluss bleiben unberücksichtigt. Ausgehend von den Pulmonalarterien laufen die Blutgefäße der pulmonalen Zirkulation entlang der größeren Atemwege zum Bereich der respiratorischen Bronchiolen, den Alveolargängen und Alveolen, wo sie sich schließlich in ein dichtes Netz von Kapillaren aufteilen und somit den größten Teil des Lungengewebes versorgen. Dabei führt der pulmonale Blutkreislauf das gesamte Herzzeitvolumen des rechten Herzens. Die zuführenden Atemwege, von Hauptbronchien bis terminalen Bronchiolen, werden dagegen vom Körperkreislauf versorgt. Im Gegensatz zur pulmonalen Durchblutung werden diese Blutgefäße aber im gesunden Menschen nur mit etwa 1 % des Herzzeitvolumens des linken Herzens versorgt.

Da zusätzlich beide Blutkreisläufe über die Bronchialvene und den rechten Vorhof bzw. die Pulmonalvene und den linken Vorhof in direkter Verbindung stehen, ist der Beitrag der bronchialen Zirkulation zur pulmonalen Absorption von inhalativen Arzneistoffen und zur Umverteilung von Substanzen in nicht belüftete Gewebeteile weitestgehend unbekannt [22, 61, 107]. Zwar konnten Wagner und Kollegen [108] in einer Studie an Schafen zeigen, dass die pulmonale Absorption von Partikeln, die auf zuführenden Atemwegen deponiert wurden, nachhaltig durch die bronchialen Zirkulation beeinträchtigt wird, so kann trotzdem davon ausgegangen werden, dass aufgrund der großen alveolaren Oberfläche und der üblichen Partikelgrößenverteilung der Aerosole die initiale pulmonale Resorption inhalativer Glucocorticoide fast ausschließlich durch die pulmonale Zirkulation bestimmt wird [109-112].

1.3.1.2 Durchführung der *In-vitro*-Untersuchungen am humanen Lungenperfusionsmodell

Dem hier verwendeten System liegt das von Linder und Kollegen beschriebene humane Lungenperfusionsmodell zugrunde [41]. Quellen des benötigten humanen Gewebes waren Patienten, die an Lungenkrebs litten und sich deshalb im Rahmen der üblichen Therapie einer Lobektomie, Bilobektomie oder Pneumonektomie unterziehen mussten. Da das Gewebe erst nach der operativen Entfernung für die Anwendung am Modell präpariert wurde, entstanden für den Patienten während des Eingriffs keine zusätzlichen Belastungen. Auch wurde das Lungengewebe nach Beendigung des jeweiligen Experimentes wieder den routinemäßigen pathologischen Untersuchungen zugeführt, die durch diese Anwendung ebenfalls nicht

beeinträchtigt wurden. Die Studie wurde durch die zuständige Ethikkommission genehmigt und es wurden nur Patienten eingeschlossen, die auch schriftlich ihr Einverständnis dazu gegeben hatten.

Nach erfolgter Resektion des Lungengewebes, wobei für die Bestimmung der pulmonalen Absorption nur Lungenlappen verwendet wurden, wurden der Bronchus anastomosiert und danach geeignete Äste der Pulmonalarterie katheterisiert. Anschließend wurde das Lungengewebe an ein Beatmungsgerät und den Perfusionskreislauf angeschlossen. Die Reperfusion erfolgte im halboffenen Kreislauf, bei dem die aus der nicht katheterisierten Vene tropfende Perfusionslösung aufgefangen und der Zirkulation wiederzugeführt wurde (siehe 2.2.2, C - Experimenteller Teil). Beatmet wurde der Lungenlappen volumenkontrolliert.

Für die Verabreichung handelsüblicher Dosieraerosole wurde eigens eine Applikationshilfe konstruiert, die zwischen Lungenlappen und Beatmungsgerät platziert wurde. Der Abstand zwischen Bronchusstumpf und Applikationshilfe sollte dabei möglichst klein sein. Nach Aktivierung eines Dosieraerosols fungierte die Vorrichtung dann als eine Art Spacer (siehe *Abbildung 5*). Abweichend von dem ursprünglich für dieses Modell entwickelten Puffer [113] wurde in der vorliegenden Untersuchung außerdem der makromolekulare Anteil der Perfusionslösung durch eine Mischung aus Dextran 70000 und bovinem Serumalbumin (BSA) ersetzt (siehe 2.1.2.1, C - Experimenteller Anteil).

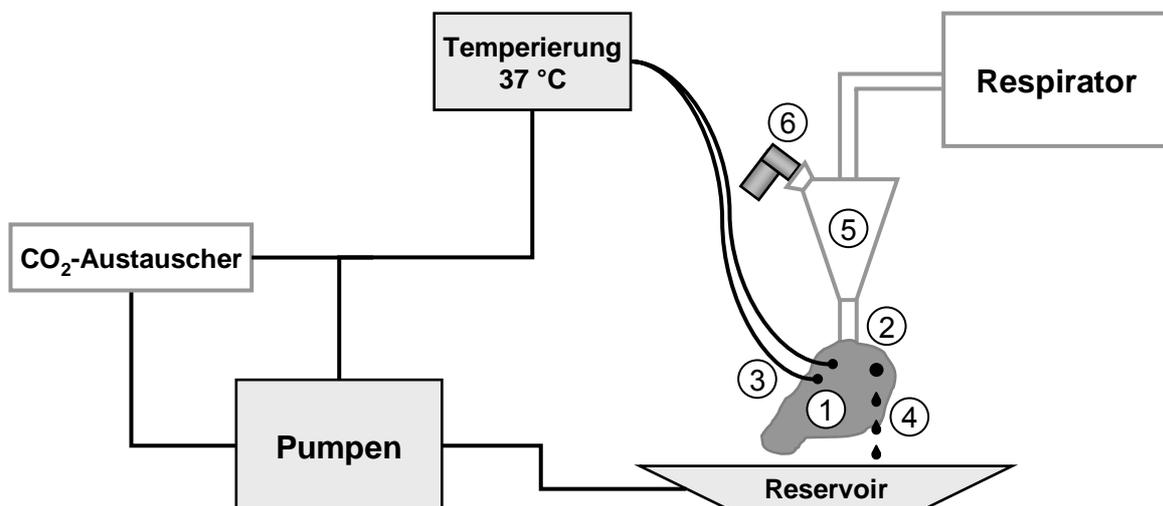


Abbildung 5: Schematische Darstellung des experimentellen Versuchsaufbaus zur Bestimmung der initialen pulmonalen Absorption von BDP am humanen Lungenperfuisionsmodell. [1) Lungenlappen; 2) Anastomosierter Bronchus; 3) Katheterisierte Arterien; 4) Aus offener Vene tropfende Perfusionslösung; 5) Applikationshilfe; 6) Dosieraerosol]

Die veränderte Zusammensetzung wurde durch Vorversuche am Dialysemodell (siehe 1.2) ermittelt, wobei die Anteile der makromolekularen Bestandteile so modifiziert wurden, dass letztendlich eine dem Plasma entsprechende Freisetzung des BDP und dessen primären Metaboliten vom Lungenhomogenat in die Perfusionslösung als Dialysat erhalten wurde (siehe 1.2.1, D - Tabellarischer Anhang). Auf diese Weise sollten zusätzlich möglichst realitätsnahe bzw. physiologische Absorptionsbedingungen geschaffen werden.

Nach Etablierung der Beatmung und Reperfusion des präparierten Lungenlappens wurde mittels eines der zu testenden Dosieraerosole eine äquivalente Nominaldosis von 500 µg BDP verabreicht, wobei das Atemzugsvolumen während der Dosierung um das Eineinhalbfache erhöht wurde. Anschließend wurde das Atemzugsvolumen wieder auf den ursprünglichen Wert erniedrigt und die pulmonale Absorption des Arzneistoffes 45 Minuten lang verfolgt. Hierzu wurden in festgelegten Abständen Proben von 5 mL Perfusionsflüssigkeit direkt aus dem venösen Ausfluss gewonnen und das entnommene Probenvolumen durch Zugabe von frischem Perfusionspuffer in das Reservoir ersetzt (siehe 2.3, C - Experimenteller Teil).

Um den biologisch intakten Zustand des Lungenlappens möglichst lange aufrechtzuerhalten, wurden während eines Perfusionsexperimentes außerdem regelmäßig pH-Wert und Hydrogencarbonat-Konzentration des Perfusats kontrolliert. Da im Gegensatz zum menschlichen Körper das Perfusat kaum mit durch Metabolismus erzeugtem Kohlendioxid (CO₂) angereichert wird, besteht ein Missverhältnis von produziertem und abgeatmetem CO₂. Der sich daraus entwickelnden respiratorischen Alkalose wurde mit Hilfe des CO₂-Austauschers im Sekundärkreislauf entgegengesteuert (siehe *Abbildung 5*).

Für die Evaluierung der pulmonalen Absorption wurden alle Proben auf den Gehalt von BDP, 17-BMP, 21-BMP und B hin analysiert. Es wurden je drei Perfusionsexperimente mit Sanasthmax[®] und Ventolair[®] durchgeführt.

In Anlehnung an die Dialyseversuche (siehe 1.2.1.2) wurde auch hier der Anteil der versprühten Dosis abgeschätzt, der tatsächlich die Atemwege des perfundierten Lungenlappens erreicht hatte. Dazu wurden nach Beendigung eines Versuches die Applikationshilfe und der zum Bronchusstumpf führende Schlauch mit Diethylether gewaschen und dann das im organischen Lösungsmittel enthaltene BDP quantifiziert. Die genaue Aufstellung der dabei berücksichtigten Bauteile einschließlich des angewandten Verfahrens sind in Kapitel 2.4.2, C – Experimenteller Teil, beschrieben.

1.3.2 Ergebnisse

Im Gegensatz zum Dialysemodell unterschieden sich die berechneten tatsächlich applizierten Dosen hier nicht wesentlich voneinander. Bei der Applikation von Sanasthmax[®] lagen im Mittel 157 µg BDP und bei Ventolair[®] 108 µg adsorbiert an die Applikationshilfe und die Verbindung zum Lungenlappen vor, so dass bei Sanasthmax[®] eine Deposition von ca. 343 ± 13 µg und bei Ventolair[®] von 392 ± 40 µg im Lungenlappen angenommen wurde. Dabei ist zu beachten, dass aufgrund des hohen Anteils sehr feiner Partikel im Aerosol von Ventolair[®] nicht auszuschließen ist, dass im Vergleich zu Sanasthmax[®] ein gewisser Anteil der Dosis exhaliiert wurde. Da diese Fraktion durch die verwendete Methode zur Dosisbestimmung (siehe 2.4.2, C – Experimenteller Teil) nicht erfasst wird, muss also davon ausgegangen werden, dass die berechnete tatsächlich applizierte Dosis eher überschätzt wurde [27, 114].

Die schon in den Dialyseversuchen (siehe 1.2.2) beobachteten Unterschiede in der kombinierten Kinetik von Auflösungs- und Umverteilungsprozessen von BDP in Abhängigkeit vom verwendeten Präparat spiegelten sich nun auch in der initialen Phase der pulmonalen Absorption wider. So wurden nach Applikation von Ventolair[®] schneller größere Anteile der Dosis im Perfusat wieder gefunden, wobei sich die Freisetzung auf einen Schub in den ersten 10 bis 15 min zu konzentrieren schien (siehe *Diagramm 4*).

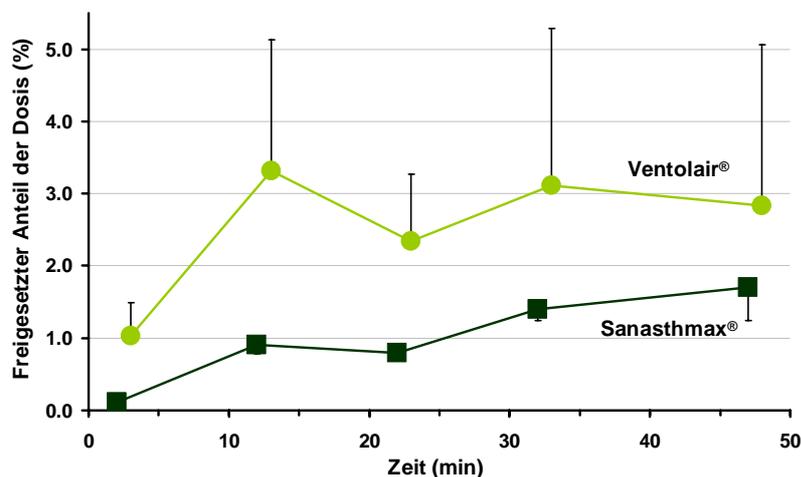


Diagramm 4: Verlauf des in die Perfusionslösung freigesetzten Anteils der tatsächlich applizierten Dosis: Die Zeitpunkte der Probenentnahmen beziehen sich auf den Beginn der Dosierung (0 min). [Mittelwert \pm Mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert, n = 3]

Dieser Schub äußerte sich in einem Resorptionspeak bei 13 min und anschließendem Abfall des berechneten freigesetzten Anteils der Dosis. Möglich wurde dieser Verlauf durch die Probenentnahme aus dem venösen Ausfluss. Denn offensichtlich ging zu Anfang eine so große

Menge an GC in das Perfusat über, dass die resultierenden GC-Konzentrationen in der Perfusionslösung, die direkt aus der Vene floss, zunächst signifikant größer waren als die in der restlichen Perfusionslösung. Nachfolgend verteilte sich zum einen die zuvor absorbierte GC-Menge homogen und zum anderen sank die Absorptionsrate, so dass die zuvor gemessenen GC-Konzentrationen selbst in der aus dem venösen Ausfluss gewonnenen Perfusionslösung nicht mehr erreicht werden konnten.

Substanzkristalle aus dem von Sanasthmax[®] erzeugten Aerosol hingegen hatten eine langsamere und gleichmäßigere Absorption der applizierten Dosis zur Folge, die in Übereinstimmung mit den Dialyseversuchen auch innerhalb der Versuchsreihe homogener ablief als bei Experimenten mit Ventolair[®].

Evidenter werden die verschiedenen Absorptionsverhalten, wenn man die einzelnen Konzentrationsverläufe von BDP und 17-BMP im Perfusat betrachtet (siehe *Diagramm 5*).

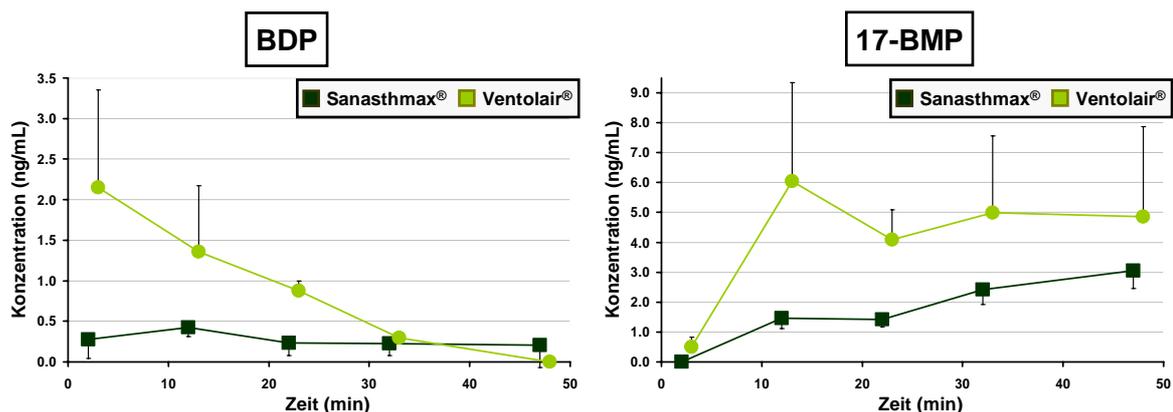


Diagramm 5: Verlauf der in der Perfusionslösung gefundenen BDP- (linkes Diagramm) und 17-BMP-Konzentrationen (rechtes Diagramm): Die Zeitpunkte der Probenentnahmen beziehen sich auf den Beginn der Dosierung (0 min). [Mittelwert \pm Mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert, n = 3]

Während die Muttersubstanz BDP in Experimenten mit Ventolair[®] schon in den ersten Proben etwa 3 min nach Beginn der Dosierung eine mittlere Peakkonzentration von 2.2 ng/mL aufwies, die im weiteren Verlauf dann exponential abnahm, wurden in den Perfusatproben nach Applikation von Sanasthmax[®] konstant niedrige BDP-Spiegel im Bereich der Bestimmungsgrenze von 0.4 ng/mL gemessen, die kein ausgeprägtes Maximum wie bei Ventolair[®] zeigten.

Ähnlich verschieden waren auch die Konzentrationsprofile der aktiven Form 17-BMP. Wenn Sanasthmax[®] für die Dosierung verwendet wurde, konnte eine langsame und stete Freisetzung der Substanz mit einer mittleren 17-BMP Konzentration von 3.1 ng/mL in der

letzten Perfusatprobe beobachtet werden. Dagegen stiegen die Perfusatkonzentrationen von 17-BMP in Perfusionen mit Ventolair® zu Beginn sprunghaft zu einem Maximum bei ca. 13 min an, nahmen dann nur leicht ab und pendelten sich auf einem hohen Konzentrationsniveau um die 5 ng/mL ein. In Anbetracht dessen wurde analog zu den Dialyseversuchen daher der Verlauf des Anteils der applizierten Dosis, der zu einem gewissen Zeitpunkt in die Perfusionsflüssigkeit übergegangen war, initial durch die Muttersubstanz BDP und dann vor allem durch den aktiven Metaboliten 17-BMP geprägt.

Der Nachweis von 17-BMP in der Perfusionsflüssigkeit bereits 3 min nach Beginn der Dosierung mit Ventolair® lässt wiederum vermuten, dass die biologische Aktivität des Modells voll erhalten blieb. Auch B konnte in geringen Konzentrationen am Ende des untersuchten Zeitfensters, vereinzelt auch schon nach 23 min, detektiert werden. Detektierbare Mengen an 21-BMP hingegen wurden nicht beobachtet (siehe 1.2, D - Tabellarischer Anhang). Bedenkt man die geringe Geschwindigkeit der chemischen Hydrolyse in den Dialyseversuchen mit KRP-HEPES (siehe 1.2.2) und das Fehlen der Metabolisierungsschritte zum Produkt 21-BMP im Lungenhomogenat [87], erscheint das Ausbleiben von detektierbaren 21-BMP-Konzentrationen im Perfusat erklärbar.

1.3.3 Diskussion

Während die Unterschiede in der kombinierten Kinetik von Auflösungs- und Umverteilungsprozessen zwischen Sanasthmax® und Ventolair® bei den Dialyseversuchen vor allem mengenmäßig im Anteil der tatsächlich applizierten Dosis, die im Dialysat wiedergefunden wurde, zutage traten (siehe 1.2.2), unterschieden sich die Präparate bei Lungenperfusionsexperimenten signifikant im initialen Absorptionsprofil. Die einer intravenösen Gabe gleichenden Konzentrationsverläufe nach der Applikation von Ventolair® verdeutlichen dabei sehr anschaulich, welchen Einfluss Austauschoberfläche und Länge der Diffusionstrecken auf die initiale pulmonale Absorption haben (siehe auch 1.2.3). Da beim Lungenperfusionsmodell ausschließlich die pulmonale Zirkulation, wie bereits unter 1.3.1.1 erläutert wurde, simuliert wurde, muss hier der Alveolarbereich besonders hervorgehoben werden.

Dieser nimmt beim erwachsenen Menschen eine Oberfläche von ca. 100 m² ein, im Vergleich dazu sind es bei den zuführenden Atemwegen nur etwa 2.5 m² [115]. Gleichzeitig wird dieser Bereich über den pulmonalen Kreislauf in körperlicher Ruhe mit durchschnittlich 5 mL/min/g Gewebe durchblutet, was dem Herzzeitvolumen entspricht [116-118]. Angesichts der dünnen Diffusionsbarrieren zwischen Alveolarraum und Kapillarlumen bieten diese

Begebenheiten daher ideale Resorptionsbedingungen, die weitestgehend auch im isolierten Lungenlappen vorherrschen. Größere Abweichungen von der Situation *in vivo* ergeben sich nur in der Perfusion des Gewebes. Um die Schädigung des Lungengewebes nicht zu forcieren, wurden bei der Reperfusion des präparierten Gewebes Perfusionsdrücke über 20 mmHg möglichst vermieden, wodurch im Mittel nur eine Flussgeschwindigkeit von 0.4 mL/min/g Gewebe angelegt werden konnte.

Dass der Alveolarbereich und der pulmonale Blutkreislauf auch *in vivo* eine entscheidende Rolle bei der initialen Phase der pulmonalen Absorption spielen, zeigt der Vergleich der eigenen Daten mit den Ergebnissen einer Humanstudie, die von Woodcock und Kollegen 2002 [119] publiziert wurde (siehe *Diagramm 6*).

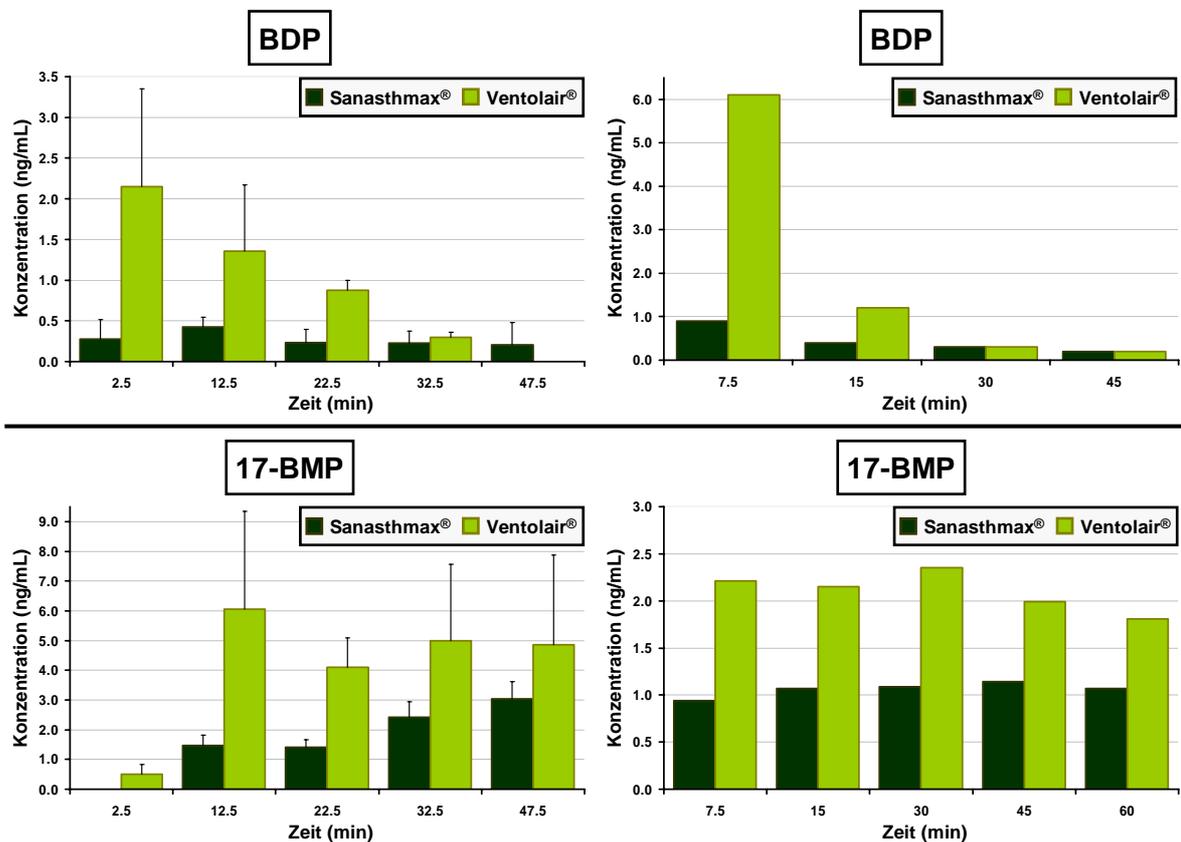


Diagramm 6: Bestimmung der initialen pulmonalen Absorption von BDP nach Applikation von Sanasthmax® und Ventolair® am humanen Lungenperfuisionsmodell [Diagramme auf der linken Seite; Mittelwert \pm Mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert, $n = 3$] im Vergleich zu Daten aus einer Studie publiziert von Woodcock und Kollegen [119] mit gesunden Probanden, denen mit Präparaten der entsprechenden Aerosoltechnologien je eine Dosis von 1000 μg verabreicht wurde [Diagramme auf der rechten Seite; Median, $n = 12$].

In dieser pharmakokinetischen Studie wurde gesunden Probanden mittels Sanasthmax® und Ventolair® entsprechenden Aerosoltechnologien ebenfalls BDP inhalativ verabreicht und anschließend die Pharmakokinetik im Plasma verfolgt. Um analytisch zugängliche Plasmakonzentrationen zu erhalten, wurden hier allerdings 1000 µg BDP appliziert.

Die nahezu identischen Absorptionsprofile bestätigen eindrucksvoll, einerseits wie realitätsnah im Lungenperfuisionsmodell die pulmonale Physiologie simuliert werden kann, und andererseits dass der niedrige Perfuisionsfluss und die fehlende bronchiale Zirkulation keinen relevanten Einfluss auf die initiale pulmonale Absorption zu haben scheinen. Im Gegenteil, aufgrund der hohen zeitlichen Auflösung konnte die Anfangsphase der pulmonalen Resorption am Lungenperfuisionsmodell sogar besser bestimmt werden als in der Humanstudie. Hier lassen die später erhobenen Datenpunkte keine zuverlässigen Rückschlüsse zur Metabolisierungsgeschwindigkeit von BDP zu 17-BMP zu.

Als wichtigste Limitierung der Untersuchungen am humanen Lungenperfuisionsmodell wiederum ist die geringe zeitliche Einsatzfähigkeit zu bewerten, wobei der Beobachtungszeitraum hier 45 min nach erfolgter Dosierung beinhaltete. Dies erscheint zunächst sehr kurz, sichtet man allerdings pharmakokinetische Daten aus klinischen Studien, so wird die Zeit bis zur maximalen Plasmakonzentration von 17-BMP durchwegs mit unter 1 h angegeben, wenn Dosieraerosole mit FCKW-freien Treibmittel verabreicht wurden [75, 77, 78, 119-121]. Im Falle von FCKW-haltigen Präparaten wurden dagegen erst nach 1-2 h Maxima in der 17-BMP-Konzentration ermittelt [77, 119, 120, 122].

Berichte über die pulmonale Absorption von BDP wiederum offenbaren, dass die Muttersubstanz in sehr geringen Konzentrationen nur bei höheren Dosierung nachgewiesen werden konnte und dann auch nur in Proben bis 30-60 min nach Verabreichung des GC. Bei diesen Werten ist weiterhin zu beachten, dass BDP in Form seines aktiven Metaboliten 17-BMP eine orale Bioverfügbarkeit von 41 % besitzt. Da bei oraler Applikation erst nach ca. 4 h maximale Plasmakonzentrationen erreicht werden, kann der intestinal resorbierte Anteil zur Verschiebung der Zeit bis zur maximalen 17-BMP-Konzentration führen [123]. Basierend auf diesen publizierten Daten wurde das verwendete Untersuchungsfenster für die Beschreibung der initialen pulmonalen Absorption als ausreichend angesehen. Natürlich kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass ein spätes Maximum vor allem bei Perfusionen mit Sanasthmax® nicht erfasst werden konnte.

1.4 Einfluss der Partikelmorphologie auf die Auflösungskinetik von Beclomethasonpropionat in Bronchialsekret

Mit der Umstellung auf FCKW-freie Treibmittel wurden zwei grundsätzlich verschiedene Wege bei der Entwicklung von Dosieraerosolen für inhalative GC beschritten. Zum einen wurde versucht, durch Zugabe von absolutem Ethanol (EtOH) eine Lösung des GC im Hydrofluoralkan (HFA), HFA_{134a} oder HFA₂₂₇, zu erzeugen. Durch ein geeignetes Mischungsverhältnis können auf diese Weise Aerosole produziert werden, die mit einem medianen aerodynamischen Massenäquivalentdurchmesser (MMAD) von ca. 1.1 µm einen hohen Anteil feinsten Partikel aufweisen [27, 124]. Folglich steigt die pulmonale Deposition und es können auch kleinste Bronchiolen und der Alveolarbereich gut erreicht werden.

Ein Vertreter dieser Technologie ist das getestete Ventolair[®]. In klinischen Studien konnte schnell eine Überlegenheit dieser Aerosoltechnologie bezüglich der pulmonalen Depositionsrate gegenüber den FCKW-haltigen Präparaten aufgezeigt werden [110, 114]. Diese hat zur Folge, dass einerseits bei Applikation gleicher Dosen die pulmonale Bioverfügbarkeit und damit die korrespondierenden Plasmakonzentrationen im Vergleich zu FCKW-haltigen Präparaten steigen und andererseits die Dosis beim Wechsel zum FCKW-freien Dosieraerosol halbiert werden kann bzw. angepasst werden muss [78, 125].

Dem gegenüber verfolgt die Modulite[®]-Technologie das Ziel, Inhaliergeräte mit maßgeschneiderter - z.B. bezüglich Partikelgröße oder Ausbreitungsgeschwindigkeit des Aerosols - Aerosolproduktion zu entwickeln [27]. Für BDP wurde hierzu ein Dosieraerosol entwickelt, das ähnliche Eigenschaften besitzt wie die Originale mit FCKW-haltigen Treibmittel. So sollte der Einfluss auf die Pharmakokinetik und die klinische Effektivität minimiert werden, damit bei der Umstellung auf ein FCKW-freies Präparat keine Dosisanpassung nötig wird und die bisher mit FCKW-haltigen Präparaten gesammelten klinischen Daten ihre Gültigkeit behalten [119, 126]. Erreicht wird dies durch ein Lösungsgemisch aus HFA, EtOH und Glycerol, in dem BDP ebenfalls gelöst vorliegt. Dabei sorgt unter anderem das langsamer verdampfende Glycerol für die Generierung des gewünschten Partikelspektrums. Auf diese Weise werden Partikel mit einem MMAD von etwa 2.9 µm erzeugt, wodurch sich diese nur unwesentlich von Partikel aus FCKW-haltigen Präparaten (MMAD: ca. 3.4 µm) unterscheiden. Zwar bewirkt der geringfügig höhere Anteil feinerer Partikel früher höhere Spitzenkonzentrationen von 17-BMP, die Flächen unter den Plasmakonzentration-Zeit-Kurven weichen aber nicht signifikant voneinander ab [119]. Daher konnten auch auf dem pharmakodynamischen Sektor die gesteckten Ziele erreicht werden [126].

Überraschenderweise unterscheiden sich die von Sanasthmax[®] und Ventolair[®] freigesetzten Partikel nicht nur im MMAD, sondern weisen auch unterschiedliche Morphologien auf. Während elektronenmikroskopische Aufnahmen der BDP-Kristalle erzeugt von Sanasthmax[®] eine voluminöse, stark poröse Struktur mit großer Oberfläche zeigen, besitzen von Ventolair[®] produzierte Partikel eine kompakte, rundliche Form. Um einen ersten Eindruck von der Auflösungskinetik der verschiedenen Partikel zu bekommen, inkubierte Valotis zusätzlich je Präparat etwa 40-50 Kristalle für 1 h bei 37 °C mit 200 µL Bronchialsekret und visualisierte diese anschließend wieder elektronenmikroskopisch (siehe *Abbildung 6*) [29].

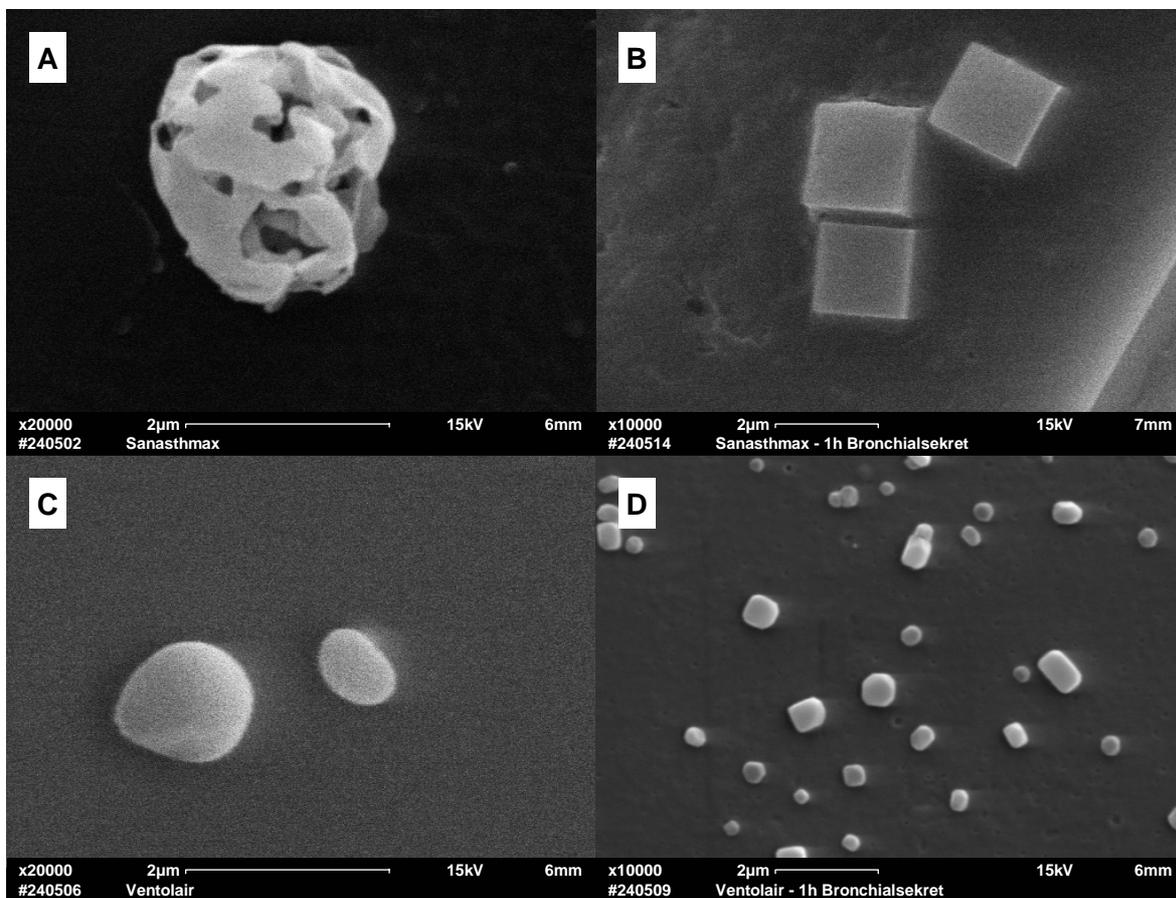


Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme repräsentativer BDP-Kristalle nach Freisetzung aus dem handelsüblichen Dosieraerosol Sanasthmax[®] auf eine Glasoberfläche (A) oder auf Bronchialsekret mit anschließender Inkubation für 1 h bei 37 °C (B) im Vergleich zu entsprechenden Kristallen generiert von Ventolair[®] [Glasoberfläche: (C); Bronchialsekret: (D)].

Dabei offenbarten die Bilder einen höchst interessanten Vorgang: Die von Sanasthmax[®] freigesetzten Kristalle schienen in dem begrenzten Flüssigkeitsvolumen einem ausgeprägten Umkristallisierungsprozess zu unterliegen, bei dem thermodynamisch stabilere, würfelförmige Partikel entstehen. Auch bei dem mit Ventolair[®] besprühten Bronchialsekret konnten in

geringerem Ausmaß ähnliche Prozesse beobachtet werden, wobei die resultierenden Partikel einen größeren Substanzverlust zu verzeichnen schienen (siehe *Abbildung 6*).

Fraglich ist nun, ob die Bedingungen, die zur Umkristallisation führen, auch *in vivo* gegeben sind. Die Oberfläche der Lunge ist beginnend mit einer Stärke von 5-10 μm in den oberen Atemwegen bis hin zum Alveolarbereich, hier im Mittel nur noch 0.05-0.08 μm dünn, mit einem Flüssigkeitsfilm (ELF) bedeckt, in dem sich die GC-Kristalle lösen müssen. Geht man von einer Epithelfläche von ca. 100 m^2 im Alveolarbereich und 2.5 m^2 bei den zuführenden Atemwegen aus, so nimmt der ELF in diesen Bereichen jeweils ein Gesamtvolumen von etwa 8 bzw. 25 mL ein [115]. Bezogen auf ein Areal von 1 cm^2 entspricht dies 1 μL ELF in den zuführenden Atemwegen und nicht mehr als 8 nL im Alveolarbereich.

In Bezug auf die *In-vitro*-Untersuchungen von Valotis, wo 40-50 Partikel auf 200 μL Bronchialsekret verteilt wurden, bedeutet dies, dass im Alveolarbereich theoretisch ein Partikel pro 500 cm^2 Epithelfläche oder 2000 Partikel auf den gesamten Bereich verteilt ausreichen würden, um ähnliche Konzentrationsverhältnisse zu erhalten. Es lässt sich daher mit hoher Sicherheit vermuten, dass in der Lunge deponierte BDP-Kristalle zunächst aufgrund der großen Oberfläche wenigstens teilweise schnell in Lösung gehen, dadurch eine lokale Übersättigung hervorrufen und folglich in einer stabileren Struktur wieder ausfallen. Dabei liegt die große Oberfläche bei von Sanasthmax[®] erzeugten Partikeln vorwiegend in der porösen Struktur und bei denjenigen von Ventolair[®] im sehr feinen Partikelspektrum begründet. Des Weiteren würde der beschriebene Prozess die augenblicklich nach Applikation der Dosis resorbierbare Menge GC während der Versuche am Lungenperforationsmodell und die darauf folgende retentierte Freisetzung, die für eine optimierte Wirkung erwünscht ist, erklären. Auch die Unterschiede im Auflösungs- bzw. Umverteilungsverhalten der Partikel in Abhängigkeit vom verwendeten Dosieraerosol ließe sich auf die verschieden ausgeprägte Umkristallisation und die größere Oberfläche der von Ventolair[®] freigesetzten Partikel, die auch nach der Umkristallisation erhalten bleibt bzw. eventuell sogar verstärkt wird, zurückführen.

1.5 Abschließende Schlussfolgerungen

Zusammenfassend lassen sich folgende Aussagen treffen: (1) Es wurde erfolgreich eine Dialyseapparatur entwickelt, die die Untersuchung der kombinierten Kinetik von Auflösungs- und Umverteilungsprozessen inhalativ verabreichter Arzneistoffe *in vitro* ermöglicht. Dies stellt

eine Weiterentwicklung früherer Gewebestudien dar. Außerdem können die zu testenden Substanzen auch mit handelsüblichen Dosieraerosolen appliziert werden, um realitätsnahe Ausgangsbedingungen zu schaffen. Aufgrund des einfachen Versuchsaufbaus erlaubt das Dialysemodell eine schnelle Durchführung von Versuchsreihen und ist damit als Screening-Verfahren geeignet. Nachteile ergeben sich vor allem durch die großen Diffusionsstrecken bei fehlender mechanischer Konvektion und dem im Verhältnis zur eingesetzten Gewebemenge geringen Volumen der Dialyseflüssigkeit. Aussagen über das eventuelle Verhalten einer untersuchten Substanz *in vivo* ergeben daher nur im relativen Vergleich mehrerer Substanzen untereinander Sinn.

Im Zuge der Etablierung des Dialysemodells wurde weiterhin die Zusammensetzung der Dialyseflüssigkeit als bedeutender Faktor für die Planung eines Dialyseexperimentes identifiziert. So muss auch in Hinblick auf die Wahl einer geeigneten Perfusionslösung für Versuche am humanen Lungenperfusionsmodell berücksichtigt werden, dass eine Dialyseflüssigkeit abhängig von der Substanz den Plasmaproteinen entsprechende Bindungsstellen bereitstellen kann, um realitätsnahe Umverteilungsbedingungen zu simulieren. Werden als Dialyse- oder Perfusionslösung statt Blutprodukten, wie z.B. Vollblut, Blutplasma oder Blutserum, saline Puffer eingesetzt, ist daher auf geeignete Zusätze zu achten.

(2) In der vorliegenden Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass die initiale Phase der pulmonalen Absorption inhalativ applizierter Wirkstoffe am humanen Lungenperfusionsmodell sinnvoll beschrieben werden kann. Die beobachteten Konzentrationsverläufe korrelierten dabei sehr gut mit Erkenntnissen aus Humanstudien. Eingeschränkt wird die Nutzbarkeit des Modells aber durch die geringe zeitliche Einsatzfähigkeit von nur bis zu 2 h. Bedenkt man weiter den Aufwand bei der Durchführung der Lungenperfusionsversuchen und die Notwendigkeit geeigneter Patienten, ist dieses Modell nicht als Screeningverfahren geeignet, sondern sollte gezielten Fragestellungen vorbehalten sein.

(3) BDP weist in Abhängigkeit von der verwendeten Aerosoltechnologie Sanasthmax[®] oder Ventolair[®] unterschiedliche Auflösungs- bzw. Umverteilungskinetiken auf, die wahrscheinlich in der unterschiedlichen Partikelgrößenverteilung und Partikelmorphologie begründet liegen. Aus pharmakokinetischer Sicht ist dabei das Präparat Sanasthmax[®] zu favorisieren, da nach dessen Applikationen im Gegensatz zu Ventolair[®] hohe Spitzenspiegel vermieden und gleichzeitig längere Verweilzeiten im Lungengewebe erreicht werden. Ob dadurch auch klinisch ein signifikanter Vorteil zu erwarten ist, kann bei derzeitiger Datenlage allerdings nicht beurteilt werden.

2 In-vitro-Untersuchung zur Bestimmung von Thalidomid-Konzentrationen mittels Mikrodialyse

2.1 Problemstellung

Ein Arzneistoff kann nur dann einen Effekt hervorrufen, wenn er am Wirkort in ausreichender Menge vorliegt [36]. So trivial diese Aussage auf den ersten Blick klingen mag, so komplex gestaltet sich gleichzeitig aber auch die Aufgabe, die damit verbundenen Vorgänge wissenschaftlich zu erfassen. Generell kann diese These zunächst durch das Zusammenspiel zweier verschiedener Disziplinen angesehen werden: der Pharmakokinetik, die den Zusammenhang zwischen verabreichter Dosis und daraus resultierenden Wirkstoffspiegeln beschreibt, und der Pharmakodynamik, die die Effektstärke in Abhängigkeit von der vorliegenden Arzneistoffkonzentration angibt. Die Wirkstoffkonzentration im Körper stellt dabei die Schnittstelle der beiden Bereiche dar [34, 127].

Kombiniert man nun die Erkenntnisse beider Disziplinen über denselben Wirkstoff, sollten dadurch grundsätzlich Vorhersagen über den klinischen Effekt einer applizierten Dosis möglich werden. Die Idee, Dosierungen anhand der zu erwartenden Arzneistoffkonzentrationen auszuwählen, hat ihre ersten Züge bereits vor beinahe 30 Jahren angenommen, als klinische Pharmakokinetiker erstmals eine derartige Dosisindividualisierung im Gegensatz zur ansonsten üblichen Einheitsdosis für alle postulierten [128]. Hieraus entwickelte sich bis heute das schnell expandierende Feld der pharmakokinetisch-pharmakodynamischen Modellierung, die, kurz zusammengefasst, Daten aus bereits durchgeführten Studien nutzt, um eine mögliche Korrelation zwischen Konzentration-Zeit-Verläufen und klinischen Effekten herzustellen und so optimierte Dosisregimes aufdecken bzw. vorhersagen zu können. Aufgrund der sich hieraus bietenden Möglichkeiten ist die pharmakokinetisch-pharmakodynamische Modellierung daher nicht nur aus der Arzneistoffentwicklung sondern auch aus der Etablierung und Optimierung neuer Therapieoptionen kaum noch wegzudenken [129].

Dennoch sind der allgemeinen Anwendbarkeit und Akzeptanz dieser Methodik bisher noch entscheidende Grenzen gesetzt. Gründe hierfür können sowohl auf der pharmakodynamischen als auch –kinetischen Seite ausgemacht werden. Bedenkt man die Komplexität der physiologischen und pathophysiologischen Prozesse, die letztendlich zu einem klinischen Effekt führen, wird offensichtlich, dass häufig trotz des Einsatzes immer umfangreicherer mathematischer Modelle der Einfluss bestimmter Wirkstoffspiegel auf einen Krankheitsverlauf am Computer nicht sinnvoll beschrieben werden kann. Schon die Verfügbarkeit oder Auswahl

geeigneter Surrogatparameter bzw. Surrogatendpunkte stellen nicht selten eine immense Herausforderung dar [130, 131].

Neben dieser Problematik, die in diesem Zusammenhang sicherlich am schwersten zu gewichten ist, können aber auch die pharmakokinetischen Daten eine Fehlerquelle bieten. So gehen in Modelle fast ausschließlich Plasmakonzentrationen der einzelnen Arzneistoffe ein, ein Kompartiment also, das zwar für eine kontinuierliche Verfolgung von Wirkstoffspiegeln messtechnisch sehr gut geeignet ist, jedoch nur selten wie z.B. bei Antikoagulantien das therapeutische Zielgewebe einer Substanz repräsentiert. War Vielen schon lange bewusst, dass das zentrale Nervensystem durch den Schutz der Blut-Hirn-Schranke für Fremdstoffe schwer zugänglich sein kann, rückt diese Problematik bei anderen Geweben dagegen erst langsam ins Augenmerk [34, 132]. Die Bestimmung von Gewebekonzentrationen kann daher einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis der klinischen Wirkung einer Substanz leisten.

2.1.1 Bestimmung von Gewebespiegeln

Anders als bei Plasmakonzentrationen spielt bei Gewebespiegeln die Methodik der Probengewinnung eine entscheidende Rolle, wenn es darum geht, gewonnene Daten richtig zu interpretieren oder mit anderen Quellen zu vergleichen. Denn Blutplasma ist eine eindeutig definierte Matrix und Unterschiede in der Technik der Probenentnahme marginal. Im Gegensatz hierzu können sich hinter den Begriffen Gewebeverteilung oder Gewebekonzentrationen eines Arzneistoffes grundlegend verschiedene Bedeutungen verbergen, da die zur Quantifizierung der jeweiligen Substanz herangezogene Matrix nicht zwangsläufig festgelegt ist. Je nach Messmethode kann diese nur aus dem Interstitium eines spezifizierten Gewebes bestehen, den gesamten Extra- und Intrazellularraum des Gewebes beinhalten oder gar eine interstitielle Ersatzmatrix darstellen [35]. Favorisiert wird dabei die Erfassung des ungebundenen Anteils der im Gewebe vorliegenden Substanzmenge, da nur derartige Moleküle mit Zielstrukturen in Wechselwirkung treten können [36]. Schwer zu deuten sind dann allerdings Konzentrationen von Substanzen, die eine hohe Affinität an gewebespezifische Strukturen aufweisen. In diesem Fall können aber Erkenntnisse auch aus *In-vitro*-Untersuchungen zu zellulären Verteilungsprozessen und zur Bindung an Gewebekomponenten geeignete Interpretationshilfen bieten.

Die vordergründig am besten geeignete Methode scheint die Analyse von Gewebehomogenaten zu sein, die aus Biopsiematerial gewonnen werden. Sieht man aber von tierexperimentellen Ansätzen ab, beschränkt sich die Quelle für entsprechende Proben meist

auf routinemäßige chirurgische Eingriffe, so dass selten mehr als eine Gewebeart gleichzeitig untersucht und auch nur punktuelle Informationen zu Gewebespiegeln geliefert werden können. Außerdem wird Substanz, gebunden und ungebunden, aus einer Vielzahl von intra- und extrazellulären Komponenten miteinander vermischt, was publizierte Konzentrationen schwer vergleichbar aber auch schwer interpretierbar macht [39].

Präzisere Aussagen hinsichtlich des untersuchten Gewebekompartimentes lässt dagegen die Hautblasentechnik zu. Hier werden entweder durch einen mechanischen (z.B. Unterdruck) oder chemischen Reiz (z.B. Cantharidin) künstlich Hautblasen erzeugt, in deren nahezu proteinfreien Flüssigkeit Wirkstoffmoleküle aus dem umgebenden Interstitium diffundieren können. Die dort analysierte Wirkstoffkonzentration entspricht dann annähernd der freien Konzentration des Wirkstoffes in der interstitiellen Flüssigkeit der Haut. Neben den Unannehmlichkeiten für den Patienten bzw. Probanden wirken sich aber hauptsächlich die weiterhin fehlende Möglichkeit, den Verlauf der Gewebekonzentrationen durch frequentierte Probenentnahme nachzuvollziehen, und die Beschränkung auf ein Organ nachteilig auf den breiten Einsatz dieser Methode aus. Des Weiteren ist es fraglich, ob die Blasenflüssigkeit nicht doch Bestandteile enthält, die eine Überschätzung der tatsächlichen Gewebekonzentration zur Folge haben [133-135].

Ähnlich zur Hautblasentechnik bildet die Diffusion ungebundener Moleküle vom Extrazellulärraum in den Speichel die Grundlage für den Ansatz, Wirkstoffspiegel in dieser Matrix als Surrogatparameter für Konzentrationen in peripheren Kompartimenten zu verwenden. Zwar kann Speichel nicht-invasiv und in regelmäßigen Zeitabständen gesammelt werden, die Vergleichbarkeit der so bestimmten Arzneistoffkonzentrationen mit den tatsächlich in der interstitiellen Flüssigkeit verschiedener Organe vorliegenden freien Konzentrationen ist aber ebenfalls ungewiss [136-139]. Neben diesen Surrogatparametern, die eher Erkenntnisse zum allgemeinen Gewebepenetrisationsvermögen einer Substanz zulassen sollen, gibt es noch zahlreiche, weniger verbreitete Ansätze, Gewebekonzentrationen in speziellen Kompartimenten abschätzen zu können. Hierzu gehört z.B. die cerebrospinale Flüssigkeit für das zentrale Nervensystem und die broncho-alveolare Spülflüssigkeit für den epithelialen Flüssigkeitsfilm der Atemwege [140, 141]. Ähnliche Vor- und Nachteile dieser Methoden ergeben sich auch hier durch die Verfügbarkeit von Probenmaterial und die Aussagekraft der Ergebnisse.

Die bisher vorgestellten Verfahren zur Bestimmung von Gewebespiegeln stellen nun lang etablierte Standardmethoden dar, die einerseits wichtige Beiträge zum Verständnis von Verteilungsvorgängen leisten können, aber andererseits durch die aufgeführten Eigenschaften in ihren Möglichkeiten, Konzentrationsverläufe in den unterschiedlichsten Geweben sinnvoll zu

beschreiben, stark begrenzt sind. In den letzten Jahren haben daher neue Methodiken Einzug in pharmakokinetische Humanstudien gefunden, die genau diese Lücke schließen können und deshalb eine immer dominanter werdende Rolle in der Untersuchung von Gewebekinetiken einnehmen. An erster Stelle ist in diesem Zusammenhang die Mikrodialyse zu nennen, aber auch die Technik der Ultrafiltration und bildgebende Verfahren wie die Positronenemissionstomographie (PET) oder Magnetresonanztomographie (Magnetic Resonance Imaging, MRI) reihen sich hier ein [142].

So können mittels PET und MRI sowohl der Verlauf als auch das Ausmaß von Verteilungsprozessen mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung im gesamten Körper beobachtet werden, wobei MRI zusätzlich die Vorteile bietet, nur den ungebundenen Anteil der verabreichten Substanzmenge darstellen und gleichzeitig auch Metabolite, die bei PET nur in bestimmten Ausnahmen abgebildet werden können, erfassen zu können. Jedoch ist der Einsatz dieser Verfahren noch sehr limitiert, denn der technische Aufwand und die damit verbundenen Kosten sind enorm hoch. Außerdem müssen für die PET geeignete Radioisotope in das Molekül eingebaut werden, neben der Kostenfrage und der Belastung für den Patienten kann gerade die Synthese dieser Verbindungen eine große Herausforderung sein. Bei der MRI hingegen ergeben sich weitere Nachteile durch die Komplexität der Datenerhebung bzw. -auswertung und die geringe Sensitivität [143, 144].

Die Methodik der Mikrodialyse und der Ultrafiltration vereint nun relativ kostengünstige Durchführung und Möglichkeit, die Pharmakokinetik eines Wirkstoffes direkt am Wirkort zu untersuchen, miteinander. Da die hier eingesetzten Sonden sehr klein sind und für den Patienten oder Probanden nur eine sehr geringe Belastung darstellen, können diese mittlerweile in nahezu jedes Gewebe (z.B. Gehirn [145], Leber [146], Lunge [40], Muskel [147], Unterhautfettgewebe [148], etc.) eingesetzt werden. Dort platziert, werden in regelmäßigen Abständen Proben gesammelt, die die Zusammensetzung des Interstitiums widerspiegeln und Rückschlüsse auf die freie Konzentration einer Substanz zulassen. Für die anschließende Analyse dieser Proben stehen dann alle gängigen Analyseverfahren zur Verfügung, so dass prinzipiell jeglicher Arzneistoff inklusiv eventueller Metabolite, aber auch Biomarker nachgewiesen werden können [91, 149].

Aufgrund dieser Eigenschaften nimmt vor allem die Mikrodialyse einen immer größeren Stellenwert in pharmakokinetischen Humanstudien ein, was auch durch die exponentiell wachsende Anzahl von Publikationen seit etwa 10 Jahren deutlich wird. Nähere Erläuterungen zum Prinzip der Mikrodialyse und ein Vergleich mit der Ultrafiltrationsmethode werden in Kapitel 2.2.1.1 gegeben. In der vorliegenden Untersuchung sollte daher erstmals die Bestimmung von

Wirkstoffkonzentrationen mittels Mikrodialyse im Arbeitskreis etabliert werden. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf einen möglichen Einsatz zur Messung von Gewebespiegeln am humanen Lungenperfusionmodell gelegt werden. Als Modellsubstanz sollte Thalidomid verwendet werden, das unter Anwendung der zu entwickelnden Methode bei hoher zeitlicher Auflösung möglichst sensitiv detektiert werden können sollte.

2.1.2 Modellsubstanz: Thalidomid

Als Sedativum Contergan[®] schrieb Thalidomid ein dunkles Kapitel in der Geschichte der Arzneimittelentwicklung. Doch schon 1965, wenige Jahre nach Aufdeckung des hohen teratogenen Potentials und anschließender Rücknahme der Substanz vom Markt, verhinderte die zufällige Beobachtung eines israelischen Arztes, der Restbestände des Medikamentes leprakranken Patienten mit Erythema nodosum leprosum verabreichte, dass die Verbindung völlig aus dem Interesse der Wissenschaft verschwand. Die Effektivität bei dieser schmerzhaften Komplikation öffnete schließlich die Tür zu einer Renaissance des Arzneistoffes und führte 1998 zur Zulassung in dieser Indikation durch amerikanische Behörden [150]. Als 1994 D'Amato und Kollegen [151] noch postulierten, dass die Malformationen der Kindern, wie sie durch Einnahme von Thalidomid während der Schwangerschaft verursacht wurden, durch Beeinflussung der Angiogenese hervorgerufen worden seien, war auch der Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten im Bereich der Onkologie ein Anfang gesetzt.

Aufgrund der mittlerweile nachgewiesenen antiinflammatorischen, immunmodulatorischen und antiangiogenetischen Wirkung liefen und laufen bisher eine Vielzahl von Studien mit Thalidomid. Um nur einen kurzen Querschnitt der aktuellen Bemühungen zu geben, sei hier z.B. der Einsatz der Substanz bei Abstoßungsreaktionen [152], Morbus Crohn [153], verschiedenen Komplikationen wie z.B. dem Kaposi Sarkom bei HIV-Infizierten [154], Herzinsuffizienz [155], multiples Myelom [156] und unterschiedlichsten soliden Tumoren [157-160] genannt. Der genaue Wirkungsmechanismus ist dabei nicht vollständig geklärt, es wird aber u.a. eine Modulation inflammatorischer Cytokine wie Tumornekrosefaktor TNF α , nuklearer Faktor NF κ B, Interleukin 10 und 12, Interferon γ oder Cyclooxygenase 2 diskutiert. Für die beobachteten antitumoralen Eigenschaften wurden außerdem schon die Herunterregulierung von tumoralen Wachstumsfaktoren, z.B. Interleukin 6 oder vaskulär endothelialer Wachstumsfaktor, und Integrinen verantwortlich gemacht [161]. Ebenfalls nur in Ansätzen wird die Bedeutung von Metaboliten, insbesondere der Derivate mit der Hydroxylgruppe in Position 5 und 5' (siehe *Abbildung 7*), für die Wirkung von Thalidomid verstanden [162].

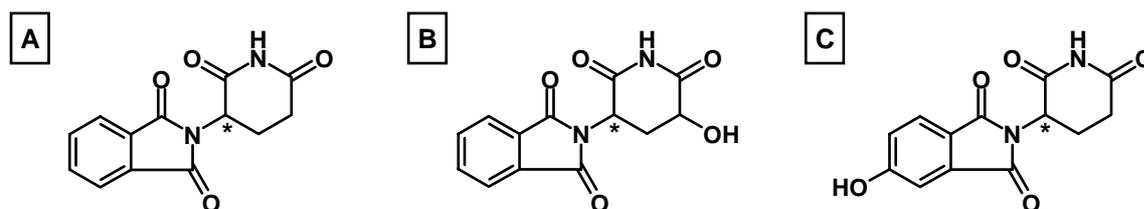


Abbildung 7: Strukturformeln von Thalidomid (A) und den Metaboliten 5'-Hydroxythalidomid (B) und 5-Hydroxythalidomid (C). [* markiert das optisch aktive Zentrum.]

Auch aus pharmakokinetischer Sicht stellt Thalidomid eine besondere Herausforderung dar. Verantwortlich hierfür sind die geringe Wasserlöslichkeit, wobei die reinen Enantiomere etwa fünfmal besser löslich sind als das Racemat (ca. 25-80 µg/mL) [163-165], und die hohe Reaktivität in wässrigen Lösungen, die sich in der Hydrolyse der beiden Imid-Bindungen und/oder in einer raschen Umwandlung der Enantiomere ineinander äußert [166, 167]. Die Geschwindigkeit sowohl der Elimination als auch der chiralen Inversion differiert geringfügig zwischen den Enantiomeren.

Weiterhin stammen bis dato gesammelte Erkenntnisse zu den grundlegenden pharmakokinetischen Parametern Clearance, Verteilungsvolumen oder Halbwertszeit von Thalidomid fast ausschließlich aus Humanstudien mit oralen Darreichungsformen, da auch heute noch keine zugelassene parenteral applizierbare Arzneiform für Thalidomid verfügbar ist [168] und daher nur eine einzige Pilotstudie [163] publiziert wurde, bei der eine experimentelle Lösung intravenös infundiert wurde. Studien zu Gewebespiegeln oder der oralen Bioverfügbarkeit im Menschen sucht man dagegen vergebens.

Als gesichert gilt, dass sich die Substanz gleichmäßig im Blut verteilt, also keine ausgeprägte Bindung an Blutzellen besitzt, und die Plasmaproteinbindung mit ca. 60 % als moderat einzustufen ist [166]. Die Elimination erfolgt hauptsächlich durch einfache Hydrolyse, die mit der Öffnung einer der beiden Ringe beginnt und dann eine Aufspaltung in eine Vielzahl von Verbindung zur Folge hat [169]. Renale und hepatische Elimination sind zu vernachlässigen. Zwar wurde in einer *In-vitro*-Untersuchung zur Metabolisierung nachgewiesen, dass durch Hydroxylierung, überwiegend katalysiert von Cytochrom-P450-Isoenzymen 2C19, eine Reihe von Metaboliten entstehen können [170-172], in Humanstudien konnten bei therapeutischen Dosen allerdings bisher entweder keine entsprechenden Verbindungen oder nur sehr geringe Mengen an 5-Hydroxy- und/oder 5'-Hydroxythalidomid (siehe *Abbildung 7*) gefunden werden [172-176]. Die resultierende Halbwertszeit muss mit 4.5 h abgeschätzt werden [163]. Nahezu doppelt so schnell verläuft dagegen die chirale Inversion in das jeweils andere Enantiomer, da hier im Gegensatz zur Hydrolyse humanes Serumalbumin katalytisch wirkt. Folglich stellt sich bei oraler Applikation unabhängig davon, ob Thalidomid

enantiomerenrein oder als Racemat verabreicht wurde, immer ein Pseudogleichgewicht zwischen den Enantiomeren ein, wobei die R-Konfiguration aufgrund geringfügig unterschiedlicher Geschwindigkeitskonstanten 1.6-fach im Überschuss vorliegt [177]. Lediglich die Zeit bis zum Erreichen dieses Pseudogleichgewichts verlängert sich bei Gabe einer enantiomerenreinen Dosis. Daten zu Plasmaspiegeln werden in Kapitel 3.1 diskutiert.

2.2 Prinzip der Bestimmung

2.2.1 Mikrodialyse

2.2.1.1 Prinzip der Mikrodialyse

Die Mikrodialyse (MD) basiert zunächst wie eine herkömmliche Dialyse auf der Diffusion von Molekülen durch eine semipermeable Membran in Richtung eines bestehenden Konzentrationsgradienten, wobei die Größe der Moleküle, die die Membran ungehindert passieren können, durch die Porengröße der Membran begrenzt wird. Um nun aber kontinuierliche Konzentrationsmessungen in einer definierten Umgebung durchführen zu können, ohne diese dabei maßgeblich zu beeinflussen, müssen mehrere Faktoren berücksichtigt werden. Zum einen können Konzentrationsänderungen nur dann verfolgt werden, wenn kein Gleichgewicht abgewartet wird, sondern die Dialyseflüssigkeit in regelmäßigen Abständen ausgetauscht wird. Gleichzeitig muss aber die Substanzmenge, die in das Dialysat übergeht, möglichst gering gehalten werden. Zum anderen sollte der Raum, der für die Messung in Anspruch genommen wird, gerade in Hinblick auf eine Anwendung *in vivo* möglichst klein sein. Vereinigt werden diese Anforderungen in der Konstruktion der Mikrodialysesonden, deren Form und Größe je nach Anwendungszweck sehr unterschiedlich ausfallen kann. Im Folgenden wird daher nur auf Sonden vom konzentrischen Typ näher eingegangen, da diese den weitaus größten Anteil an den in der pharmakokinetischen Forschung eingesetzten Sonden ausmachen und auch in der vorliegenden Untersuchung zum Einsatz kamen [178, 179].

Grundsätzlich ist eine solche Mikrodialysesonde aus Eingangskapillare, Splitter, Schaft, Dialysemembran und Ausgangskapillare aufgebaut (siehe *Abbildung 8, A*). Über die mit einem Reservoir, hier sind Spritzenpumpen typisch, verbundene Eingangskapillare wird die Sonde an einen konstanten Fluss der Dialyseflüssigkeit (= Mikrodialyseperfusat), die im Allgemeinen aus der Physiologie angepassten Puffern besteht, angeschlossen. Das MD-Perfusat strömt mit einer Geschwindigkeit von üblicherweise 0.5-5 $\mu\text{L}/\text{min}$ in Richtung Splitter, wo Ein- und Ausgangskapillare derart vereint werden, dass die Eingangskapillare konzentrisch innerhalb der

Ausgangskapillare verläuft, und diese so den Schaft bilden. Am Ende des Schaftes gelangt das Perfusat schließlich zur Dialysemembran (Außendurchmesser: ca. 0.2-0.6 mm, Länge: 4-30 mm), die von dieser für den Stoffaustausch umspült wird. Nach Passieren der Membran wird das entstandene Dialysat wieder in den Schaft geführt, nur dass die Flüssigkeit dieses Mal zwischen Außenwand der Eingangskapillare und Innenwand der Ausgangskapillare entlangfließt. Im Splitter erfolgt wiederum die Trennung zwischen Eingangs- und Ausgangskapillare, wobei das Dialysat in der Ausgangskapillare verbleibt. Dialysatproben werden dann durch Sammeln der aus der Ausgangskapillare tropfenden Flüssigkeit für einen definierten Zeitraum gewonnen, so dass die dort enthaltenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanz die mittlere Matrixkonzentration während des Probenintervalls repräsentiert [178].

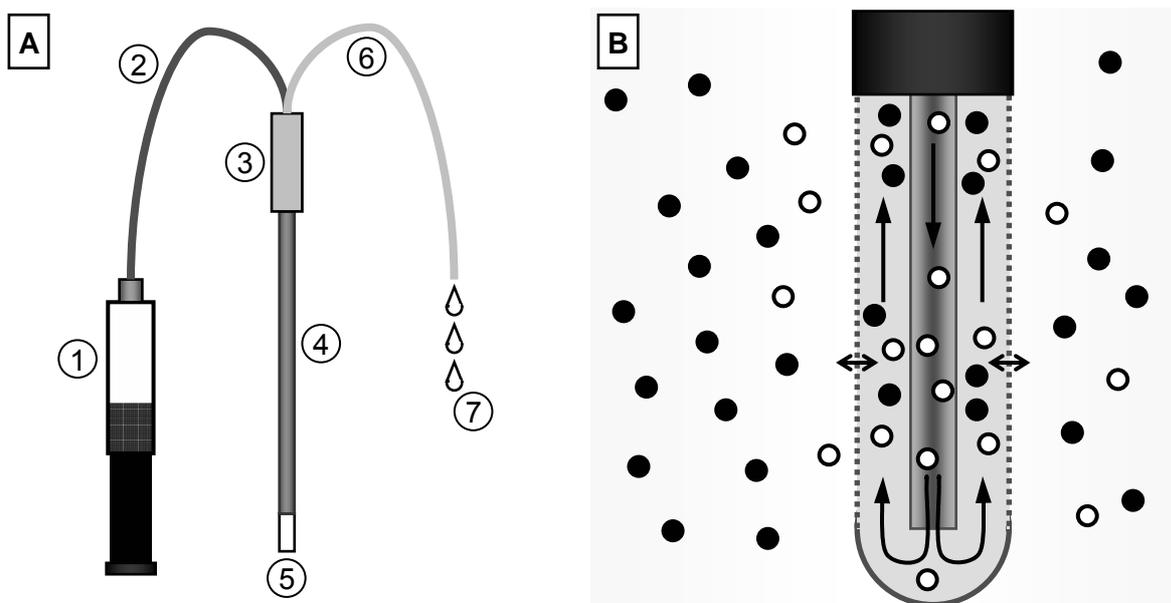


Abbildung 8: (A) Schematische Darstellung einer messbereiten Mikrodialyse-sonde vom konzentrischen Typ. [1) Spritze mit Mikrodialyseperfusat; 2) Eingangskapillare; 3) Splitter; 4) Schaft; 5) Dialysemembran; 6) Ausgangskapillare; 7) Dialysat]. (B) Diffusionsvorgänge während der Durchführung einer Mikrodialyse [Schwarze Punkte: Moleküle aus Matrix; Weiße Punkte: Moleküle aus MD-Perfusat; Erläuterungen siehe Text]

Betrachtet man nun die einzelnen Vorgänge an der Membran während der Passage des MD-Perfusats genauer, so müssen vor allem folgende drei Aspekte beachtet werden (siehe *Abbildung 8, B*). Erstens, zu einem Übergang zwischen Matrix und MD-Perfusat sind nur Moleküle in der Lage, die in ungebundener, freier Form in Lösung vorliegen. Es sind daher ausschließlich Rückschlüsse auf die freie Konzentration der zu untersuchenden Verbindung in der Matrix möglich. Zweitens, der Stoffaustausch über die Dialysemembran ist quantitativ in

beide Richtungen gleich und folgt vorhandenen Konzentrationsgradienten. Das heißt, dass auch Substanzen, die im MD-Perfusat in höheren Konzentrationen als in der umgebenden Matrix vorliegen, effektiv im gleichen Maß in die Matrix diffundieren, wie diese im umgekehrten Fall von der Matrix in das Perfusat gelangen würden. Und drittens, da das Perfusat kontinuierlich an der Membran vorbeifließt, wird die Zeit, in der ein Stoffaustausch erfolgen kann, zu kurz sein, um ein Gleichgewicht zwischen Dialyseflüssigkeit und umgebender Matrix zu erreichen. Die gemessene Dialysatkonzentration der untersuchten Substanz wird also niemals deren wahre freie Konzentration in der Matrix widerspiegeln, sondern um einen bestimmten Faktor geringer sein. Sollen daher quantitative Aussagen über die vorherrschende Matrixkonzentration getroffen werden, muss vorher eine Kalibration der Mikrodialysesonde durchgeführt werden. Bei der Sondenkalibrierung kann dann der Anteil der freien Konzentration in der Matrix bestimmt werden, der mit einer definierten Methode im Dialysat wiedergefunden werden kann [180]. Dieser wird auch als Wiederfindungsrate oder relative Recovery (RR) bezeichnet.

Die Ultrafiltrationstechnik wiederum baut auf einer ähnlichen Sondenometrie auf, nur die Probengewinnung beruht nicht auf Dialyseprozessen sondern auf Filtration. So wird durch Anlegen eines leichten Unterdruckes interstitielle Flüssigkeit über eine Membran angesaugt, wodurch makromolekulare Bestandteile ausselektiert werden. Wie auch bei der Mikrodialyse werden so freie Matrixkonzentrationen einer Verbindung kontinuierlich gemessen. Allerdings kommt es durch diese Art der Probengewinnung zu keinem Unterschied zwischen Substanzkonzentration im Filtrat und im Interstitium, so dass eine Kalibrierung entfällt. Dies stellt einen erheblichen Vorteil gegenüber der Mikrodialyse dar. Die Filtration birgt aber gleichzeitig auch einige Nachteile. So werden je nach Methode Probenvolumina von 0.05-10 $\mu\text{L}/\text{min}$ erzeugt, die vor allem bei hohen Filtrationsgeschwindigkeiten zu einer forcierten Substitution der Flüssigkeit aus den Blutkapillaren führt. Daher kann dieses Verfahren nicht ohne Bedenken in jedem Gewebe eingesetzt werden und auch eine stärkere Beeinflussung der Kinetik im Gewebe ist nicht auszuschließen. Außerdem erfordert das geringe Probenvolumen eine sehr empfindliche Analytik, die oft nur durch Biosensoren (z.B. Glucose) gewährleistet werden kann, was den Kreis für die Ultrafiltration geeigneter Substanzen sehr einschränkt [181].

2.2.1.2 Relative Recovery (RR)

Die RR einer Methode hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab. Im Zuge einer pragmatischen Gliederung kann man diese zunächst willkürlich in zwei Gruppen unterteilen: fixe Faktoren, die aufgrund der Aufgabenstellung gegeben sind und auf die daher nur bedingt Einfluss genommen werden kann, und variable Faktoren, die gezielt angepasst werden können, um eine möglichst hohe RR zu erzielen und damit einen Gewinn an Sensitivität zu erhalten. Geht man davon aus, dass ein Mikrodialysesystem unter Vorgabe der zu untersuchenden Substanz und der Matrix etabliert wird, können als wichtigste fixe Faktoren die physikochemischen Eigenschaften der Substanz, hier sind vor allem lipophile Verbindungen problematisch, und die Beschaffenheit der Matrix identifiziert werden [182]. Zählt man zur Beschaffenheit der Matrix Temperatur und Ausmaß der Konvektion hinzu, gerät man unter Umständen in einen Grenzbereich zu den variablen Faktoren. Sollten diese Parameter bei *In-vitro*-Untersuchungen veränderbar sein, so sollte unbedingt auf eine ausreichende Konvektion geachtet werden, da bei ungenügender Durchmischung der Umgebung um die Mikrodialysesonde erhebliche Schwankungen in der RR auftreten können [183]. Allgemein ist beim Wechsel in eine andere Matrixumgebung, gerade wenn Systeme von *in vitro* auf *in vivo* übertragen werden, mit einer signifikant unterschiedlichen RR zu rechnen [184, 185].

Aus Sicht des Experimentators interessanter sind natürlich Variablen, die hinsichtlich der Optimierung einer Methode aktiv modifiziert werden können. Bei der Mikrodialyse stehen hierzu drei dominante Faktoren zur Verfügung. Zu Anfang können die Eigenschaften der Dialysemembran bestimmt werden. Neben der Porengröße und dem Membranmaterial ist hier die Oberfläche und damit die Länge der Membran von entscheidender Bedeutung [186, 187]. Begrenzt wird die freie Entscheidung allerdings durch die Tatsachen, dass mit wachsender Membrangröße die örtliche Auflösung leidet oder die Membranlänge bereits durch die Ausmaße der Untersuchungsumgebung limitiert ist. Eine weitere Möglichkeit, die RR zu steigern, ist die Zugabe von Lösungsvermittlern, Komplexbildnern oder ähnlich funktionellen Verbindungen in das Mikrodialyseperfusat, um die Affinität der zu untersuchenden Substanz zum Perfusat zu erhöhen oder Adsorptionseffekte zu verhindern. In diesem Zusammenhang kamen z.B. schon Emulgatoren, bovines Serumalbumin oder verschiedene Cyclodextrine inklusive chemischer Derivate zum Einsatz [187-191]. Wurden Sondendesign und Perfusionsmedium festgelegt, spielt schließlich die Höhe der Flussrate eine ganz entscheidende Rolle. Umso niedriger der Fluss ist, desto mehr Austauschzeit bleibt an der Membran und folglich desto höhere RR können erhalten werden. Die Abnahme der RR mit zunehmender Flussrate folgt dabei einem exponentiellen Verlauf (siehe 3.5.1, C - Experimenteller Teil). Für die endgültige Wahl der Flussrate muss dann der Zugewinn an RR gegen die Verlängerung des Zeitintervalls, das zum

Sammeln einer für die Analyse ausreichenden Menge Dialysat benötigt wird, abgewogen werden.

2.2.1.3 Grundlagen der Sondenkalibrierung

Prinzipiell beruhen alle Methoden zur Sondenkalibrierung auf der Messung entweder des Substanzgewinns oder des Substanzverlusts im Dialysat im Vergleich zum MD-Perfusat. In der praktischen Umsetzung bedeutet dies, dass im einfachsten Fall das zu kalibrierende Mikrodialysesystem dazu verwendet wird, Messungen in einer Matrix mit bekannter Konzentration der zu untersuchenden Verbindung durchzuführen. Die RR ergibt sich dann aus dem Quotienten von Dialysat- und Matrixkonzentration. Vorteile dieses Verfahrens, das im Folgenden Extraktionsmethode genannt wird, sind die Einfachheit der Durchführung und die in Bezug auf die spätere Anwendung gleichgerichtete Diffusion von der Umgebung in das MD-Perfusat.

Voraussetzung für eine adäquate Schätzung der tatsächlich RR ist es aber, dass die Kalibrierumgebung möglichst genau mit der Matrix, in der später Konzentrationen der entsprechenden Verbindung bestimmt werden sollen, übereinstimmt (siehe 2.2.1.2). Enthält also eine Matrix Bestandteile, an die die jeweilige Substanz bindet, müsste bei der Verwendung einer äquivalenten Matrix für die Sondenkalibrierung die freie Konzentration der Substanz exakt bekannt sein. Folglich stößt die Extraktionsmethode selbst bei *In-vitro*-Untersuchungen schnell an die Grenzen des Möglichen, eine Nutzung der Kalibrierdaten alleine auf der Basis dieses Verfahrens für *In-vivo*-Studien sollte daher obsolet sein [178, 180].

Wenn zuvor der Substanzgewinn das Grundprinzip der Kalibrierung war, liegt dem folgenden Verfahren der Substanzverlust über die Membran zugrunde. Der theoretische Hintergrund hierzu ergibt sich aus der bereits geschilderten Annahme (siehe 2.2.1.1), dass der Grad des Stoffaustausches derselben Verbindung unabhängig davon ist, ob die höhere Konzentration im MD-Perfusat oder in der umgebenden Matrix vorliegt. Für die Sondenkalibrierung wird daher das MD-Perfusat mit einer definierten Menge der zu testenden Verbindung versetzt, um anschließend dem verwendeten Mikrodialysesystem entsprechend Messungen in einer Matrix, die die zu kalibrierende Substanz nicht enthalten darf, vorzunehmen. Nach Quantifizierung der untersuchten Verbindung im Dialysat wird diese Konzentration von der ursprünglichen Perfusatkonzentration subtrahiert und die so erhaltene Abnahme der Substanzkonzentration wiederum durch die Perfusatkonzentration geteilt. Der resultierende Quotient nähert dann die RR an. Wegen der Umkehrungen der üblichen Mikrodialyseprozesse wird diese Methode auch Retrodialyse genannt [192].

Im Gegensatz zur Extraktionsmethode müssen bei diesem Verfahren keine separaten Matrices oder gar Ersatzmatrices zum Einsatz kommen, sondern die Sondenkalibrierung per Retrodialyse kann im Vorfeld des eigentlichen Versuches direkt in derselben Matrix vollzogen werden. Auf diese Weise können Verfälschungen des Schätzwertes für die tatsächliche RR durch Matrixeffekte weitestgehend ausgeschlossen werden. Auch sollte die während der Retrodialyse in die Umgebung abgegebene Substanzmenge so gering sein, dass vor allem *in vivo* folgende Untersuchungen nicht beeinflusst werden. Die Retrodialyse stellt deshalb auch bei pharmakokinetischen Humanstudien die Standardmethode schlechthin für die Sondenkalibrierung dar. Vorsicht ist nur geboten, wenn das MD-Perfusat Substanzen enthält, die die anfangs postulierten Grundlagen der Methode außer Kraft setzen.

Häufig als Referenzmethode zur Sondenkalibrierung herangezogen ist die No-Net-Flux-Methode streng genommen kein reines Kalibrierverfahren, sondern wird eigentlich direkt zur Messung von freien Matrixkonzentrationen eingesetzt. Ermitteln der Substanzkonzentration in der Matrix und Kalibrierung erfolgen dabei in einem Schritt. Voraussetzung für die Anwendbarkeit und gleichzeitig größter Nachteil der Methode ist, dass die Konzentration der zu untersuchenden Substanz während der gesamten Mikrodialyseversuche konstant bleiben muss [193]. Die Bestimmung der gewünschten Parameter besteht aus der Vermessung einer Reihe verschiedener MD-Perfusate, die sich ausschließlich in ihrem Gehalt an der zu testenden Verbindung unterscheiden, wobei die zu erwartende Substanzkonzentration in der Matrix möglichst innerhalb dieses Konzentrationsbereiches liegen sollte. Versuchsbedingungen das verwendete Mikrodialysesystem betreffend bleiben bis auf die Zusammensetzung der MD-Perfusate bei allen Versuchen gleich.

Wurden alle Konzentrationsniveaus vermessen, wird je Perfusat die Konzentrationsdifferenz zwischen Perfusat und korrespondierendem Dialysat ermittelt und diese wieder gegen die entsprechende Perfusatkonzentration aufgetragen. Zur Veranschaulichung der Auswertung einer solchen Versuchsreihe soll das frei gewählte Beispiel in *Abbildung 9* dienen, wo die Mehrfachbestimmung von vier verschiedenen Perfusatkonzentrationen graphisch dargestellt wird.

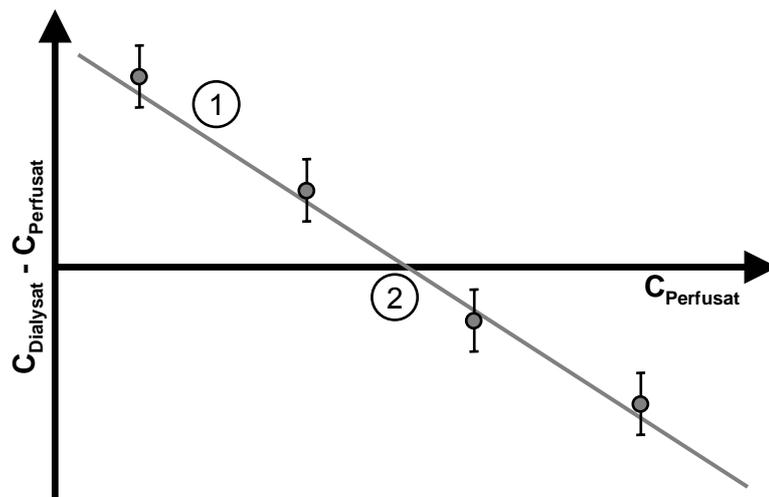


Abbildung 9: Frei gewähltes Beispiel zur Auswertung der während der Durchführung der No-Net-Flux-Methode gewonnenen Daten mit Mehrfachbestimmungen pro Konzentrationsniveau (Lageparameter \pm Streuungsmaß) und Regressionsgerade. [1) Steigung der Regressionsgeraden = $-RR$; 2) Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse = freie Matrixkonzentration der untersuchten Verbindung; C_{Dialysat} : Dialysatkonzentration der untersuchten Verbindung; C_{Perfusat} : Perfusatkonzentration der untersuchten Verbindung]

Wie man auf den ersten Blick gut erkennen kann, sollten die bestimmten Datenpunkte normalerweise eine Gerade beschreiben. Nach Durchführung einer linearen Regression lassen sich dann anhand der Regressionsgeraden die RR und die freie Matrixkonzentration der untersuchten Substanz berechnen. So entspricht der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse dem Zustand, wo Dialysat- und Perfusatkonzentrationen gleich groß sind, also netto kein Substanz Austausch zwischen MD-Perfusat und Umgebung erfolgte. Dies kann aber nur der Fall sein, wenn auch freie Matrixkonzentration und Perfusatkonzentration im Betrag identisch sind. Der Schätzwert für die RR wird wiederum durch den Betrag der Steigung wiedergespiegelt [194]. Im Allgemeinen findet die No-Net-Flux-Methode in der Bestimmung von humanen Gewebespiegeln kaum Anwendung, jedoch hat dieses Verfahren als Referenzmethode für neue Methoden zur Sondenkalibrierung immer noch seinen festen Platz in der Mikrodialyse. Es sei zuletzt noch erwähnt, dass die beschriebene Auswertungsmethode ebenfalls auf denselben Annahmen fußt wie die Retrodialyse.

Neben diesen drei Verfahren wurden bis heute natürlich noch andere Methoden zur Sondenkalibrierung entwickelt. Sei es die Verwendung von endogenen Stoffen wie z.B. Harnstoff [195-199] oder der Einsatz von internen Standards [200], letztendlich beruhen doch all diese Methoden auf den Prinzipien der Extraktionsmethode und Retrodialyse, nur dass nun auch andere Verbindungen als nur die zu testende Substanz einbezogen werden. Auch im Hinblick darauf, dass in der vorliegenden Untersuchung nur die hier ausgeführten Kalibrier-

methoden verwendet wurden, wird deshalb auf weitere Ausführungen zu den anderen Verfahren verzichtet.

2.2.2 Etablierung und Optimierung des Mikrodialysesystems

Ausgehend von den pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften der Substanz (siehe 2.1.2) wurde das Mikrodialysesystem nur für Thalidomid selbst optimiert und in allen Versuchen das Racemat eingesetzt. Um aus analytischer Sicht die Verfälschung der Thalidomidkonzentration einer Probe durch Hydrolyse zu verhindern, wurde nach jeder Probenentnahme jener sofort 500 µL Sørensen-Citratpuffer (pH = 1.6) zugegeben, womit eine ausreichende Stabilität der Verbindung erreicht werden konnte [201-203]. In Hinblick auf die Anwendung des Systems am humanen Lungenperfusionsmodell, das nur Versuchsdauern von 2-3 h erlaubt, war ein möglichst kurzes Probenintervall gefordert und wurde deshalb mit 10 min festgelegt. Die Länge der Sondenmembran von 10 mm stellte einen Kompromiss aus Maximierung der RR und dem Erhalt der Möglichkeit, Messungen auch in räumlich begrenzten Gewebeabschnitten (z.B. Tumor) durchführen zu können, dar. Für die Etablierung des Mikrodialysesystems wurde außerdem auf eine Temperierung verzichtet und stets bei Raumtemperatur gearbeitet. Weiterhin wurden alle Versuche mit derselben Sonde durchgeführt, so dass eine Beeinflussung der Ergebnisse, verursacht durch die Variabilität der Sondereigenschaften innerhalb einer Charge, ausgeschlossen wurde.

Die ersten Schritte der Methodenentwicklung bestanden aus der Bestimmung der RR gemäß Extraktionsmethoden in Abhängigkeit vom Perfusatfluss, wobei als MD-Perfusat und als Matrix (Thalidomidkonzentration: 10 µg/mL) ein Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (KRP-HEPES) verwendet wurde. Getestet wurden Flussraten zwischen 2 und 4 µL/min je unter vierfacher Wiederholung. Die optimale Flussrate ergab sich aus der Überlegung, dass die nach Probenaufbereitung zu vermessende Lösung für die anschließende chromatographische Analyse (siehe 3.4.1 und 3.4.2, C – Experimenteller Teil) ein definiertes Mindestvolumen aufweisen muss. Da die in den Dialysatproben enthaltene Menge an Thalidomid folglich unabhängig vom Ausgangsvolumen zur Quantifizierung immer in denselben Volumen vorliegen würde, war der für die Optimierung ausschlaggebende Parameter nicht die RR, sondern eben diese Substanzmenge im Dialysat. Die extrahierbare Menge kann wiederum mit dem Detektorsignal gleichgesetzt werden. Auf diese Weise wurde zunächst eine Flussrate von 3.5 µL/min ermittelt.

Die hohe zeitliche Auflösung der Methode - bei Humanstudien übliche Probenintervalle liegen im Bereich von 20 -30 min [37, 204-206] - wirkt sich aufgrund der geringeren Substanzmenge, die gesammelt werden kann, natürlich negativ auf die Sensitivität aus. Will man diesen Verlust ausgleichen, muss die Affinität der Substanz zum MD-Perfusat und damit die RR erhöht werden, indem man die Zusammensetzung des Perfusats verändert. Eine geeignete Substanz hierzu erschien das (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin (HPCD), nach dessen Zugabe bereits eine Verbesserung der Löslichkeit und Stabilität von Thalidomid durch Komplexbildung nachgewiesen wurde [165]. In den folgenden Versuchen wurde daher untersucht, inwiefern die RR durch HPCD verbessert werden konnte. Als Alternative wurde auch bovines Serumalbumin (BSA) getestet. Die Versuchsbedingungen beinhalteten unter Beibehaltung der oben genannten Matrix einen Fluss von 3.5 μ L/min und die Verwendung von KRP-HEPES entweder ohne Zusatz oder versetzt mit 2 % (m/V) BSA, 2 %, 3 %, 5 %, 7.5 %, 10 %, 15 % oder 20 % (m/V) HPCD als MD-Perfusat. Jeweils in Vierfachbestimmungen wurde so die RR mittels Extraktionsmethode bestimmt.

Zuletzt wurde nach Optimierung der Perfusatzusammensetzung wiederum die Flussrate angepasst. Der Ablauf entsprach dem Verfahren aus dem ersten Schritt zur Etablierung des Systems, wobei das endgültige Perfusat nun auch 10 % (m/V) HPCD enthielt und fortgehend als Mikrodialysepuffer (siehe 3.1.2.3, C - Experimenteller Teil) bezeichnet wird. Nach Bestimmung der RR bei den Flussraten 2, 3, 4, 4.5, 5 und 6 μ L/min wurden die erhaltenen Daten diesmal dazu genutzt, den optimalen Fluss mit Hilfe einer eigens entwickelten, mathematischen Modellierung zu ermitteln (siehe 3.5.1, C - Experimenteller Teil).

2.2.3 Systematische Untersuchung der Sondenkalibrierung

Um später das Verhalten des entwickelten Mikrodialysesystems am humanen Lungenperfusionmodell besser beurteilen zu können, wurde weiterhin untersucht, welchen Einfluss einerseits verschiedene Kalibriermethoden auf die Abschätzung und andererseits unterschiedliche Matrices auf die Höhe der RR haben. Dazu kam ausschließlich das optimierte System mit Mikrodialysepuffer als MD-Perfusat, einem Sammelintervall von 10 min und einer Flussrate von 5 μ L/min zum Einsatz und die Matrix wurde stets auf 37 °C temperiert. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde analog zu Kapitel 2.2.2 durch Verwendung derselben Mikrodialysetsonde innerhalb einer entsprechenden Versuchsreihe gewährleistet.

Beim Vergleich verschiedener Kalibriermethoden wurde KRP-HEPES als Matrix eingesetzt. Die Bestimmung der RR mittels Extraktionsmethode und Retrodialyse erfolgte

sechsfach, wobei die Thalidomidkonzentration in der Matrix oder dem MD-Perfusat jeweils 600 ng/mL betrug. Für die No-Net-Flux-Methode wurden vier Konzentrationsniveaus, 100, 400, 700 und 1000 ng/mL, im Perfusat untersucht, die korrespondierende Konzentration in der Matrix lag bei 600 ng/mL. Es wurden bei jedem Perfusat vier Dialysatproben gesammelt.

KRP-HEPES, Perfusionspuffer, humanes Blutplasma und eine Gewebesuspension aus peripherem humanen Lungengewebe in KRP-HEPES bildeten die Grundlagen für die Untersuchung zum Einfluss der Matrixbeschaffenheit auf die RR. Der Perfusionspuffer stimmte dabei in seiner Zusammensetzung mit demjenigen, der als Perfusionslösung für entsprechende Lungenperfusionsexperimente verwendet werden sollte (siehe 3.2.2), überein. Die Herstellung der Gewebesuspension richtete sich nach den Versuchsbedingungen, die von Valotis und Kollegen 2004 für die Untersuchung der Affinität von Glucocorticoiden zu humanem Lungengewebe beschrieben wurden [85]. Hier wurde das Gewebe in ca. 1-3 mm³ große Stücke zerschnitten und mit einem Anteil von 0.5 g pro 20 mL Puffer eingesetzt.

Für die Bestimmung der RR wurde in allen Medien zunächst eine Retrodialyse, sechsfach, mit einer Perfusatkonzentration des Thalidomids von 600 ng/mL durchgeführt. Zusätzlich erfolgte bei KRP-HEPES und der Gewebesuspension eine Ermittlung der RR mittels Extraktionsmethode, wobei die Matrixproben der Gewebesuspension aus dem klaren Überstand der zuvor scharf zentrifugierten Suspension bestand. Als Matrixkonzentration wurde in beiden Fällen ein Spiegel von 600 ng/mL anvisiert, die Bestimmung wurde ebenfalls sechsfach durchgeführt. Am Ende des Versuches mit der Gewebesuspension wurde schließlich noch eine Gewebeprobe aus der Suspension entnommen und diese ebenfalls auf den Gehalt von THAL hin analysiert. Wurde Perfusionspuffer oder Plasma verwendet, wurden außerdem Proben für die Abschätzung der Proteinbindung von Thalidomid gewonnen. Hierzu wurde nach der Retrodialyse eine Matrixkonzentration von etwa 1200 ng/mL aufgebaut und anschließend unter Anwendung des entwickelten Mikrodialysesystems sechs Messungen der freien Konzentration und sechs korrespondierende Probenentnahmen aus der Matrix vorgenommen.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Etablierung und Optimierung des Mikrodialysesystems

Schon die Vorversuche mit reinem KRP-HEPES als MD-Perfusat zeigten, dass Thalidomid (THAL) für die Mikrodialyse gut geeignet war. So wurde bei 2 µL/min eine RR von 56.7 % beobachtet, die selbst bei einer für die Mikrodialyse hohen Flussrate von 4 µL/min nur auf

28.4 % abfiel. Wie erwartet konnte durch die Zugabe von HPCD die RR nochmals deutlich gesteigert werden (siehe *Diagramm 7*), so dass diese bei einem Gehalt von 10 % (m/V) HPCD mit 83.3 % im Vergleich zu reinem Puffer mit 43.4 % fast verdoppelt werden konnte. Bei einer weiteren Steigerung des HPCD-Gehaltes fiel die RR allerdings wieder ab. Überraschend war dagegen der Einfluss von BSA auf die Effektivität des Stoffaustausches, da eine derart starke Verminderung der RR auf 24.7 % nicht zu erwarten war.

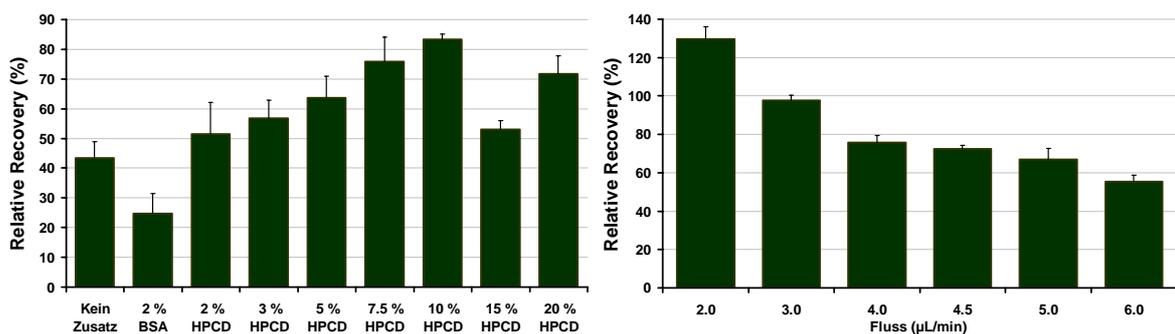


Diagramm 7: Relative Recovery in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des MD-Perfusats bei einem Fluss von 3.5 µL/min (linkes Diagramm) und der Flussrate bei KRP-HEPES mit 10 % (m/V) HPCD als MD-Perfusat (rechtes Diagramm) [Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 4$].

Bei der anschließenden Optimierung der Flussrate mit dem endgültigen Perfusat wurde der postulierte exponentielle Abfall der RR erhalten, wobei auffällig war, dass nun auch RR über 100 % zu erreichen waren (siehe *Diagramm 7*). Trotz dieser Anomalie konnten die Daten aber verwendet werden, um die RR mittels Regressionsanalyse sinnvoll als mathematische Funktion der Flussrate darzustellen, wodurch wiederum, wie in *Diagramm 8* gezeigt, die Beschreibung der aus einer Dialysatprobe extrahierbaren Menge THAL in Abhängigkeit von der Flussrate ermöglicht wurde (siehe 3.5.1, C – Experimenteller Teil).

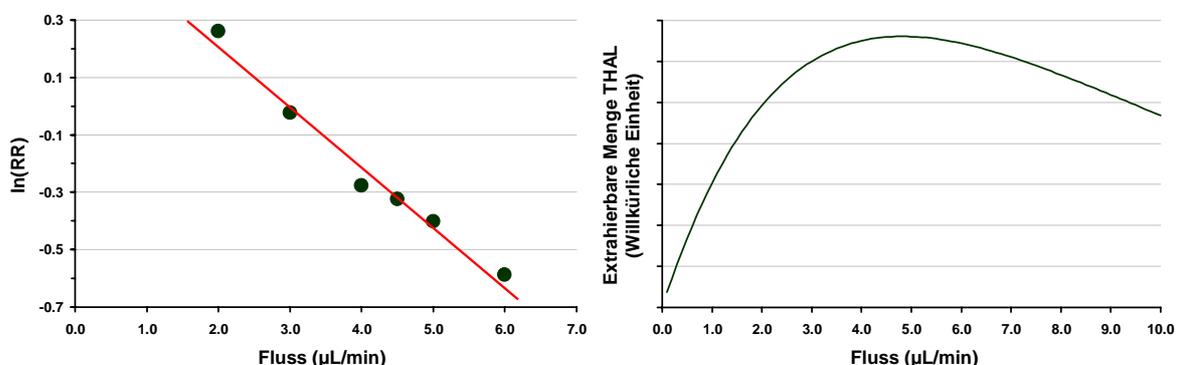


Diagramm 8: Nach mathematischer Modellierung des Zusammenhangs zwischen RR und Flussrate (linkes Diagramm, $r = -0.9892$) kann die aus einer Dialysatprobe extrahierbare Menge THAL als Funktion der Flussrate (rechtes Diagramm) beschrieben werden.

Die mathematische Annäherung des optimalen Flusses durch Maximierung der extrahierbaren Menge THAL ergab dabei einen Wert von 4.8 $\mu\text{L}/\text{min}$.

2.3.2 Systematische Untersuchung der Sondenkalibrierung

Unter Verwendung des optimierten Mikrodialysesystems (siehe 2.2.3) offenbarte der Vergleich der Sondenkalibrierung mittels Extraktionsmethode, Retrodialyse und No-Net-Flux-Methode einen signifikanten Unterschied in der Abschätzung der tatsächlichen RR (einfaktorielle, univariate Varianzanalyse; $p < 0.01$). Geht man davon aus, dass aufgrund der einfachen Matrix KRP-HEPES die Extraktionsmethode dem wahren Wert am nächsten kommt, wird die RR durch die Retrodialyse und die No-Net-Flux-Methode nahezu um den Faktor 2 unterschätzt (siehe *Diagramm 9*).

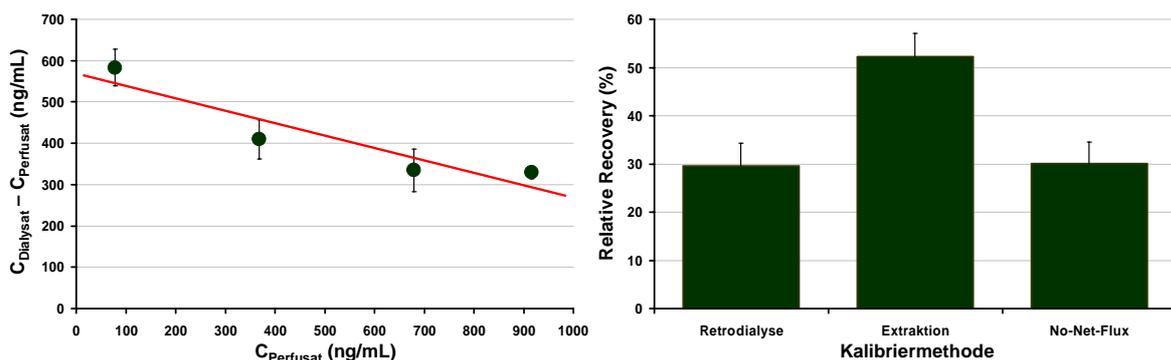


Diagramm 9: Das linke Diagramm zeigt die Auswertung der Versuche zur No-Net-Flux-Methode bereits mit eingezeichneter Regressionsgerade [Datenpunkt: Mittelwert \pm Standardabweichungen, $n = 4$]. Rechts wird die RR in Abhängigkeit von der zur Bestimmung verwendeten Methode illustriert [Extraktionsmethode und Retrodialyse: Mittelwert \pm Standardabweichungen, $n = 6$; No-Net-Flux-Methode: Betrag der Steigung aus linearer Regression \pm Standardfehler der Steigung, $n = 36$].

Weiterhin muss beachtet werden, dass bei der No-Net-Flux-Methode nie ein Substanzverlust aus dem Mikrodialysepuffer beobachtet werden konnte (siehe *Diagramm 9*), obwohl die THAL-Konzentration in der Matrix niedrigerer war als in den Perfusaten der beiden höchsten Konzentrationsniveaus. Die Regressionsgerade schneidet daher die Abszisse erst bei einer berechneten Konzentration von 1888 ng/mL.

Auch innerhalb verschiedener Matrices wurde ein ähnliches Bild erhalten. Die Retrodialyse war im Vergleich zur Extraktionsmethode weder im Puffer noch in der Gewebesuspension in der Lage, die tatsächliche RR ausreichend zu beschreiben. Dabei blieb

auch der zuvor beobachtete Faktor 2 durchgängig erhalten (siehe *Diagramm 10*). Trotz der doch sehr verschiedenen Beschaffenheit der Matrices konnte gleichzeitig bis auf den Perfusionspuffer kein wesentlicher Unterschied im Kalibrierungsverhalten der Sonde festgestellt werden.

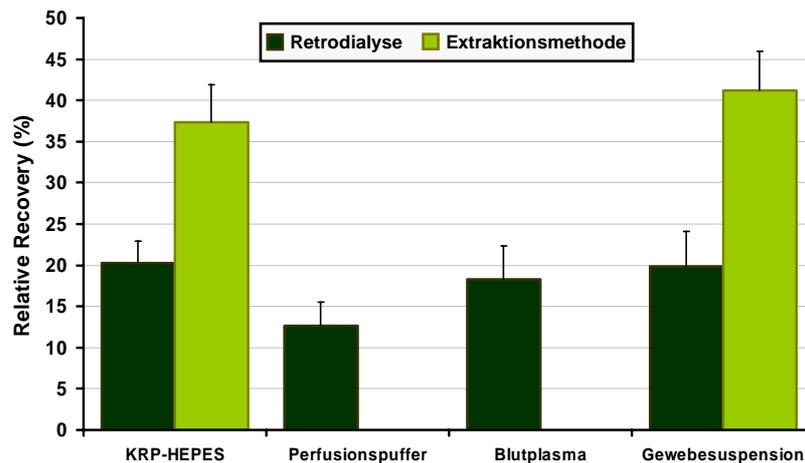


Diagramm 10: Einfluss der Matrix auf die relative Recovery [Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 6$].

So sind die mittels Retrodialyse abgeschätzten RR nach Testung mit einer einfaktoriellen, univariaten Varianzanalyse abhängig von der Matrix zwar untereinander statistisch signifikant ($p < 0.01$) verschieden, dieser Unterschied konnte durch anschließendes multiples Testen nach Tukey allein auf die im Perfusionspuffer erhaltene RR zurückgeführt werden. Für die per Extraktionsmethode bestimmten RR hingegen wurde kein statistisch signifikanter Unterschied in Abhängigkeit von der Matrix ermittelt (beidseitiger, unverbundener t-Test; $p > 0.05$).

Aufgrund dieser Problematik bei der Sondenkalibrierung wurde die Proteinbindung auf Basis sowohl der im entsprechenden Medium durchgeführten Retrodialyse als auch der in KRP-HEPES mittels Extraktionsmethode ermittelten RR berechnet. Dabei ergab sich eine Plasmaproteinbindung des THAL von 27.0 ± 2.4 % unter Anwendung der Retrodialysedaten und 64.2 ± 1.2 % mit der RR aus den Pufferdaten, ein Bindung an BSA konnte mit dieser Methode jedoch nicht nachgewiesen werden. Zum Vergleich betrug das Verhältnis von Gesamtgewebekonzentration zu korrespondierender Konzentration im Überstand der Suspension am Ende der Extraktionsmethode mit der Gewebesuspension als Matrix 1 : 0.74.

2.4 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde erfolgreich ein Mikrodialysesystem entwickelt, unter Anwendung dessen freie Thalidomidkonzentrationen in verschiedensten Matrices mit hoher zeitlicher Auflösung bei gleichzeitig optimierter Sensitivität bestimmt werden können. Die verminderte Substanzmenge aufgrund des kurzen Sammelintervalls konnte dabei durch Zugabe von HPCD in das Mikrodialyseperfusat ausgeglichen werden, wodurch die relative Recovery nahezu verdoppelt wurde. Der gewählte Gehalt an HPCD von 10 % (m/V) stellte gleichzeitig auch das Maximum dieses Effekts dar (siehe *Diagramm 7*). Der anschließende Abfall der RR bei weiterer Steigerung der HPCD-Konzentration liegt höchstwahrscheinlich in der Analytik der Dialysatkonzentrationen begründet. Hier wird THAL aus den Proben mit Ether extrahiert (siehe 3.4.1.2, C - Experimenteller Teil), so dass zu hohe Gehalte an HPCD die Extraktionseffizienz nachhaltig beeinflussen können. Neben der Erhöhung der Affinität von THAL zum Perfusat sorgt die Komplexierung durch HPCD außerdem für eine verbesserte Stabilität der Substanz [165], was sich zusätzlich positiv auf die Genauigkeit der Methode auswirkt.

Hinsichtlich der Messung in Geweben muss weiterhin beachtet werden, dass der onkotische Druck dieser Umgebungen einen Flüssigkeitsverlust des MD-Perfusats zur Folge haben kann, wenn jenes nicht auch einen kolloidalen Zusatz besitzt. Folglich stimmt das tatsächliche Dialysatvolumen nicht mehr mit dem theoretisch aus Flussrate und Länge des Probenintervalls berechneten überein [207]. Werden die Dialysatproben dann nicht direkt quantitativ analysiert, sondern einer irgendwie garteten Probenaufbereitung unterzogen, basiert die Kalibrierung auf einer falschen Volumenannahme und die tatsächliche Dialysatkonzentration einer Substanz wird unter Umständen stark unterschätzt. Die im entwickelten Mikrodialysesystem eingesetzten 10 % (m/V) HPCD in Verbindung mit der gewählten Membranlänge und dem hohen Fluss machen das Auftreten dieses Phänomens im vorliegenden Falle unwahrscheinlich.

Dass THAL generell gut mittels Mikrodialyse erfasst werden kann, wurde auch schon von Huang und Kollegen publiziert [208]. Diese erhielten mit einer Sonde, deren Dialysemembran ebenfalls 10 mm lang war, und einem Puffer ohne makromolekulare Komponente als MD-Perusat bei einem Fluss von 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ in Blut eine RR von ca. 31 %, die unabhängig von der in der Matrix herrschenden THAL-Konzentration war. Zwar wurde in der eigenen Untersuchung mit KRP-HEPES sowohl als Perfusat als auch als Matrix trotz höherer Flussrate (3.5 $\mu\text{L}/\text{min}$) eine RR von 43.4 % ermittelt. Da zum einen in komplexeren Matrices zumeist niedrigere RR auftreten [178] und zum anderen außer der Länge keine sonstigen

Eigenschaften der in der Tierstudie verwendeten Membran bekannt sind, ist diese Korrelation der Daten durchaus als sehr gut zu bezeichnen.

Bei der Optimierung der Flussrate war unter den gegebenen Umständen die maximal extrahierbare Menge THAL und damit das größte Detektorsignal Ziel der Untersuchung (siehe 2.2.2). Wenn also die Analyse mittels HPLC mit UV-Detektion erfolgte, müsste man nur die Peakflächen, die man in den Chromatogrammen der Dialysatproben abhängig von der jeweiligen Flussrate erhielt, untereinander vergleichen. Erschwert wird diese Auswertung allerdings durch die Instabilität der Substanz. Das bedeutet, dass die Konzentration von Thalidomid in der Matrix während der Versuchsreihe abnimmt, was selbst bei Erhöhung der RR letztlich zu einer erniedrigten Peakfläche führt. Um die damit einhergehende Verfälschung der Ergebnisse zu verhindern, wurde ein mathematisches Modell entwickelt, in das mit der RR eine Größe einging, die unabhängig von der Matrixkonzentration war (siehe 3.5.1, C – Experimenteller Teil).

In den Vorversuchen (siehe 2.2.2) zur Bestimmung eines optimierten Flusses, in denen KRP-HEPES als MD-Perfusat verwendet wurde, wurde aber zunächst keine nennenswerte Abnahme der Matrixkonzentration innerhalb der Versuchsreihe beobachtet (siehe 2.1.1.1, D - Tabellarischer Anhang). Hier konnte daher eine parallele Auswertung durchgeführt werden, wodurch eine gewisse Kontrolle der mathematischen Modellierung erreicht wurde. Dabei stimmte die vom Modell vorgeschlagene Flussrate sehr gut mit den experimentellen Daten überein. Als aber die endgültige Flussoptimierung mit Mikrodialysepuffer als MD-Perfusat durchgeführt wurde, nahm die THAL-Konzentration in der Matrix entgegen der zuvor beschriebenen Stabilität innerhalb der Versuchsreihe kontinuierlich ab (siehe 2.1.3.1, D - Tabellarischer Anhang). Verantwortlich hierfür war ein Zusammenspiel von zwei Faktoren. Einerseits fanden alle Versuche zur Optimierung des Mikrodialysesystems bei RT statt, so dass die Hydrolysegeschwindigkeit während der Vorversuche, die im Gegensatz zur zweiten Flussoptimierung zu einer kälteren Jahreszeit (März ⇔ Juni) durchgeführt wurden, aufgrund niedrigerer Umgebungstemperaturen geringer war. Andererseits war auch die Versuchsdauer länger, da mehr verschiedene Flussraten getestet wurden. Eine Auswertung nur unter Berücksichtigung der Peakflächen wäre in diesem Fall deshalb nicht möglich gewesen.

Bovines Serumalbumin schien einen besonderen Einfluss auf Thalidomid zu haben. So wurde nicht nur die RR drastisch gesenkt, wenn BSA Bestandteil des MD-Perfusats war (siehe *Diagramm 7*), sondern auch die Anwesenheit in der die Sonde umgebenden Matrix bewirkte eine signifikante Veränderung der Messeigenschaften (siehe *Diagramm 10*). Ließe sich ersteres noch dadurch erklären, dass BSA eventuell die Hydrolyse des THAL katalysiert, ist auch diese

vermutete Eigenschaft des BSA fraglich, denn für humanes Serumalbumin konnten diese katalytische Wirkung ausgeschlossen werden [166, 167]. Eine mögliche Erklärung für die niedrige abgeschätzte RR wäre natürlich die Tatsache, dass die komplexe Matrix, wie dies auch schon häufig erläutert wurde, dafür ausschlaggebend war. Allerdings würde das die Frage aufwerfen, warum dies bei den ähnlich komplexen Matrices Plasma und Gewebesuspension nicht beobachtet wurde. Außerdem wurden selbst unter Verwendung der höheren RR, bestimmt mittels Extraktionsmethode in Puffer, freie Konzentrationen von THAL im Perfusionspuffer vorhergesagt, die den totalen Konzentrationen entsprachen bzw. sogar tendenziell größer waren als diese (siehe 2.2.3.1, D – Tabellarischer Anhang). Da auch in der Literatur keine weiteren Hinweise gefunden werden konnten, können zu dieser Fragestellung ohne weitere Untersuchungen keine schlüssigen Antworten gegeben, noch weiterführende Vermutungen angestellt werden.

Anders ist die Sachlage beim HPCD, hier kann die Komplexbildung eine gute Erklärung für die ermittelten Werte liefern. Grundlage ist dabei die Tatsache, dass THAL im Mikrodialysepuffer entsprechend der Gleichgewichtskonstanten immer zu einem Teil komplexiert an HPCD und zum anderen Teil ungebunden in Lösung vorliegt. Betrachtet man dann zunächst die Bedingungen während der Bestimmung von Matrixkonzentrationen bzw. der Durchführung der Extraktionsmethode, laufen folgende Prozesse ab: Durch die rasche Komplexbildung wird Substanz [209], die von der Matrix in das MD-Perfusat übergeht, sofort teilweise an HPCD-Moleküle gebunden und somit die freie Konzentration in der Nähe der Membran im Vergleich zu einem Perfusat ohne HPCD-Zusatz verringert. Auf diese Weise bleibt der Konzentrationsgradient vermeintlich steiler, es diffundieren pro Zeiteinheit mehr Moleküle durch die Dialysemembran und die RR steigt.

Ist jedoch THAL im Mikrodialysepuffer vorgegeben und die Matrix gleichzeitig frei von Substanz, dreht sich der Effekt um. Denn nun ist die Konzentration an freien THAL-Molekülen geringer, der Konzentrationsgradient dementsprechend flacher und es treten pro Zeiteinheit weniger Moleküle vom Perfusat in die Matrix. Folglich wird die tatsächliche RR bei der Retrodialyse falsch wiedergegeben [190]. Ausgeglichen könnte dieser Effekt werden in Matrices, die ihrerseits Komponenten beinhalten, an die die Substanz bindet. Abhängig von den Bindungskonstanten würden in die Matrix übergegangene THAL-Moleküle dort ebenfalls gebunden und ein steilerer Konzentrationsgradient der ungebundenen Substanz aufrechterhalten werden. Während daher die Unterschiede in der Sondenkalibrierung bei KRP-HEPES als Matrix, die auch in sehr ähnlicher Weise von Khramov und Stenken für tricyclische Antidepressiva publiziert wurden [190], sehr gut nachvollziehbar sind, überrascht doch die Konstanz der RR in den Matrices Plasma und Gewebekomogenat.

Berücksichtigt man, dass die Plasmaproteinbindung in der Literatur mit ca. 60.5 % (R-Enantiomer 55 %, S-Enantiomer 66 %) [166] angegeben wird und in den eigenen Untersuchungen unter Verwendung der RR abgeschätzt durch die Extraktionsmethode in KRP-HEPES ein Wert von 64.2 % ermittelt wurde (siehe 2.3.2), muss auch in Plasma bezüglich der RR von ähnlichen Verhältnissen wie in den Matrices KRP-HEPES und Gewebesuspension ausgegangen werden. Zwar könnte auch bei der Durchführung der Extraktionsmethode in der Gewebesuspension die so erhaltene RR verfälscht worden sein, wenn man annimmt, dass die im Matrixüberstand gemessenen THAL-Konzentrationen aufgrund eventuell vorhandener Gewebebestandteile nicht den freien Konzentrationen entsprachen. Da aber am Ende des Versuches eine totale Gewebekonzentration von 730 ng/g Gewebe, wobei die Konzentration von THAL in der letzten Matrixprobe gleichzeitig 540 ng/mL betrug, bestimmt wurde und die Kenntnisse über das pharmakokinetische Verteilungsvolumen bisher keine besondere Akkumulation im Gewebe erkennen ließen [168], sollte dieser Fehler minimal sein. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die Affinität von THAL zur Formierung eines Komplexes mit HPCD, unbesetzte Moleküle dessen im Perfusatfluss immer wieder nachgeliefert werden, sehr viel höher ist als zur Bindung an Plasma- bzw. Gewebestrukturen und dabei einen so dominanten Einfluss auf die Diffusionsprozesse hat, dass Parameter wie die Beschaffenheit der Matrix die RR kaum beeinflussen können.

Die No-Net-Flux-Methode stellt eine Kombination der Prozesse aus Extraktionsmethode und Retrodialyse dar und basiert auf den Voraussetzungen, dass alle Moleküle der zu untersuchenden Substanz im MD-Perfusat ungebunden vorliegen und die Matrixkonzentration gleichzeitig möglich konstant bleibt. Der Einsatz des Komplexbildners musste deshalb zwangsläufig ähnliche Konsequenzen haben, wie es bei der Retrodialyse der Fall war. Interessanterweise entsprach die hier berechnete RR sogar derjenigen aus der Retrodialyse (beidseitiger, unverbundener t-Test; $p > 0.05$). Abgesehen von der Problematik, die der Komplexbildner hervorruft, ist es aber fraglich, ob die No-Net-Flux-Methode grundsätzlich dazu geeignet ist, als Kalibriermethode für Mikro dialysesysteme zur Messung von Thalidomidspiegeln Anwendung zu finden. Denn die Instabilität der Substanz macht die Durchführung dieser Methode zusätzlich äußerst schwierig (siehe 3.3.3.1, C – Experimenteller Teil), was sicherlich auch einen negativen Einfluss auf die Güte der Bestimmung hatte (siehe 2.2.1.3, D - Tabellarischer Anhang).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das entwickelte Mikro dialysesystem die Anforderungen zur Anwendung am humanen Lungenperfusionsmodell erfüllte, da es in der Lage war, Thalidomidkonzentrationen trotz der hohen zeitlichen Auflösung von 10 min sensitiv zu erfassen. Den Vorteilen des Zusatzes von HPCD in das MD-Perfusat, z.B. gesteigerte

relative Recovery und Stabilität, steht dabei dessen dominanter Einfluss auf die Diffusionsvorgänge während der Mikro dialyse nachteilig gegenüber. Zwar schienen Matrixeinflüsse auf die RR dadurch minimiert zu werden, jedoch wird eine Sondenkalibrierung mit Hilfe herkömmlicher Methoden wie der Retro dialyse nicht möglich. Um trotzdem quantitative Rückschlüsse auf die tatsächliche freie Gewebekonzentration des Thalidomids ziehen zu können, mussten daher andere Kalibriermethoden in Betracht gezogen werden. Ein mögliches Verfahren wird in Kapitel 3.2.1 erörtert.

3 *In-vitro*-Untersuchung zum Anfluten von Thalidomid in bronchialem Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem peripheren Lungengewebe nach Simulation einer systemischen Applikation

3.1 Problemstellung

Im Jahre 2005 verstarben die meisten Krebspatienten in Deutschland an Lungenkrebs, in der Liste der häufigsten Todesursachen überhaupt nahm dieser Platz 4 ein [38]. Unterscheidet man nach Geschlecht, erkennt man, dass diese Statistik maßgeblich durch die hohen Fallzahlen bei Männern bestimmt wird. Allerdings spielt die Erkrankung auch bei Frauen eine immer größere Rolle. Litten an Krebs verstorbene Frauen in Deutschland z.B. noch öfter an Brustkrebs, so übersteigt in den USA die Anzahl der Todesfälle durch Lungenkrebs bereits diejenige durch Brustkrebs. Verantwortlich hierfür ist wahrscheinlich der gesellschaftliche Wandel zur Stellung der Frau seit Mitte der 70iger Jahre des letzten Jahrhunderts, der unter anderem auch zu einem veränderten Rauchverhalten in der Bevölkerung führte. So konnte bei Männern seitdem erst ein Stagnieren, dann sogar ein leichtes Sinken der Inzidenz, an Lungenkrebs zu erkranken, beobachtet werden, während die Rate der Neuerkrankungen bei Frauen dagegen in den letzten Jahren kontinuierlich zunimmt [210, 211].

Mit ein Grund für diese erschreckenden Zahlen sind die nahezu gleich bleibend schlechten Heilungschancen, denn trotz der raschen medizinischen Entwicklung konnte die 5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit in den letzten 30 Jahren von ursprünglich im Mittel 13 % bis heute lediglich auf ca. 16 % verbessert werden [210]. Zwar hat auch die Therapie des Lungenkrebses in gewisser Weise Fortschritte gemacht, man muss jedoch bedenken, dass Lungenkrebs immer noch sehr spät erkannt wird und damit die 5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit von über 60 % in frühen Stadien mit operablen Tumoren auf 10-15 % in fortgeschrittenen Stadien fällt. Liegt eine sehr aggressive Form (kleinzelliges Lungenkarzinom) vor, die in ca. einem Viertel der Fälle auftritt, sind 5 Jahre nach Diagnosestellung eines fortgeschrittenen Stadiums im Mittel sogar nur noch weniger als 5 % der Patienten am Leben [212-214]. Außerdem sind die Ansprechraten dieser Tumore auf Chemo- oder Radiotherapie sehr schlecht, so dass Therapieoptionen bei Lungenkrebs Felder intensiver klinischer Forschung darstellen. Neben der Kombination etablierter Zytostatika gehört hierbei auch die Testung von Substanzen mit neuen Wirkmechanismen zur pharmakotherapeutischen Entwicklung [215].

Solide Tumore wie das Bronchialkarzinom benötigen für ihr Wachstum ausreichend Nährstoffe. Kann der Bedarf bis zu einer Größe von etwa 2 mm im mittleren Durchmesser durch die Grundversorgung des umgebenden Gewebes gedeckt werden, muss darüber hinaus ein eigenes Gefäßsystem aufgebaut werden, um das weitere Wachstum sicherzustellen [216]. Ein Eingriff in die Angiogenese würde daher Tumoren die dringend benötigte Nährstoffgrundlage entziehen und könnte so deren Wachstum inhibieren oder durch Zelluntergänge sogar zu einer Remission führen. Basierend auf diesen Überlegungen wurden und werden deshalb vermehrt auch Substanzen mit antiangiogenetischen Effekt entwickelt [217-219].

Obwohl Thalidomid (THAL), eher bekannt aufgrund seiner Teratogenität beim Einsatz zur Bekämpfung von Schlafstörungen, zunächst nicht als typische Neuentwicklung antiangiogenetischer Substanzen erscheint, hat die 1994 veröffentlichte Entdeckung der Beeinflussung eben dieses Vorgangs [151] dennoch dessen Weg in die klinische Erprobung im Gebiet der antitumoralen Therapie geebnet. Dabei wird die genaue Pharmakodynamik der Substanz in diesem Zusammenhang erst in den ersten Grundzügen verstanden (siehe 2.1.2). Neben anderen Indikationen wurde THAL bereits in ersten klinischen Studien bei der Behandlung von Lungenkrebs eingesetzt und für diesen Zweck meist beginnend mit 200 mg einmal täglich eskalierend bis zu 1000 mg pro Tag oral dosiert [159, 220-222]. Bei einer Einmaldosierung von 200 mg wird dadurch zwischen 3 und 4 h nach Verabreichung ein maximaler Plasmaspiegel von ca. 1-2 µg/mL erzielt, die Werte hängen hier stark von der verwendeten Formulierung ab [223, 224]. Während einer Mehrfachapplikation wird eine vernachlässigbare Akkumulation beobachtet, so dass im Fließgleichgewicht maximale Plasmakonzentrationen um die 1.8 µg/mL zu erwarten sind. Zum Vergleich werden bei der einmal täglichen Gabe von 1000 mg THAL mittlere Steady-State-Spiegel von maximal 9.2 µg/mL erreicht [225]. Weitere pharmakokinetische Eigenschaften der Verbindung können in Kapitel 2.1.2 eingesehen werden.

Für die antitumorale Aktivität ist es essentiell, dass eine Substanz zunächst bis zu ihrer Zielstruktur vordringt und dort ihren Effekt entfaltet. Schlechte Ansprechraten solider Tumore können daher sowohl in pharmakokinetischen als auch pharmakodynamischen Prozessen begründet liegen [226, 227]. Sind Resistenzmechanismen von Tumorzellen dabei gut untersucht, muss die Datenlage zu tumorspezifischen Gewebekonzentrationen im Menschen als unzureichend betrachtet werden, weshalb bei der Definition von Zielkonzentrationen größtenteils allein auf Daten zu Plasmakonzentrationen zurückgegriffen wird [228]. Korrelationen zwischen Wirksamkeit und Wirkstoffspiegel im Blut können aber bei Therapieversagen dann nicht zwischen Resistenz der Tumorzellen und ungeeigneter Wirkstoffkonzentration vor Ort differenzieren [229].

Dass der Aspekt der tumorspezifischen Gewebespiegel auch tatsächlich eine relevante Fragestellung darstellt, legen schon die veränderten physiologischen Bedingungen innerhalb dieses Gewebes nahe. So unterscheidet sich nicht nur das Gefäßsystem bezüglich Verteilung, Art, Größe und Länge der Arterien und Venen signifikant von dem des angrenzenden Gewebes, sondern auch die Permeabilität der Blutgefäße, der Blut- und Lymphfluss und die Struktur des Interstitiums weisen innerhalb des Tumorgewebes besondere Eigenschaften auf. Das Zusammenspiel dieser Faktoren lässt daher vermuten, dass die Verteilung eines Arzneistoffes vom Blut in das Tumorgewebe komplexen Vorgängen unterliegt und damit der Konzentrationsverlauf im Plasma denjenigen im Tumorgewebe nur ungenügend widerspiegelt [230-232]. Der schlechte Kenntnisstand zu Wirkstoffkonzentrationen im Tumor wiederum beruht dabei nicht nur auf der Vernachlässigung dieser Thematik. Bis zur Entwicklung neuer Bestimmungsmethoden (siehe 2.1.1) standen fast ausschließlich Tiermodelle für pharmakokinetische Untersuchungen *in vivo* zur Verfügung, bei denen zu gewissen Zeitpunkten die Versuchstiere getötet und anschließend Gewebekomponenten analysiert wurden. Hierdurch gewonnene Gesamtgewebekonzentrationen sind schwer zu interpretieren und konnten den zeitlichen Verlauf der Wirkstoffspiegel nur ansatzweise oder gar nicht wiedergeben [230] (siehe auch 2.1.1). Erst mit Etablierung der Mikrodialyse in pharmakokinetischen Studien bot sich die Möglichkeit, Konzentrationsverläufe in humanem Tumorgewebe *in vivo* systematisch zu erfassen (siehe auch 2.1.1). Seitdem werden auch vermehrt Humanstudien zu Gewebespiegeln von Zytostatika publiziert [233].

Nachfolgend sollte daher das Anfluten von Thalidomid in bronchialem Tumorgewebe im Vergleich zu peripheren Lungengewebe mit Hilfe des in Kapitel 2 beschriebenen Mikrodialysesystems untersucht werden. Da aus ethischer Sicht in Humanstudien die Bestimmung von Gewebekonzentrationen mittels Mikrodialyse auf Gewebearten begrenzt ist, die entweder minimal-invasiv oder im Rahmen routinemäßiger Operationen für die Platzierung einer Mikrodialysesonde zugänglich sind, sollten die Versuche erstmals an einem humanen Lungenperfusionsmodell (siehe 1.3.1.1) durchgeführt werden [233]. Die Aufgabenstellung beinhaltete folglich, das bestehende Modell dahingehend zu modifizieren, dass nach Simulation einer systemischen Applikation von THAL die Konzentrationsverläufe in der Perfusionslösung, dem peripheren Lungengewebe und dem Tumorgewebe simultan beobachtet werden können. Ausgehend von den bisher üblicherweise in Humanstudien eingesetzten Dosen sollten dazu Spiegel in der Perfusionslösung ähnlich den Plasmakonzentrationen nach oraler Gabe von 200 mg THAL aufgebaut werden. Es wurden daher maximale THAL-Konzentrationen in der Perfusionslösung um die 1.5 µg/mL angestrebt.

3.2 Prinzip der Bestimmung

3.2.1 Mikrodialyse

Die Grundlagen der Mikrodialyse und die Notwendigkeit der Sondenkalibrierung wurden bereits ausführlich in Kapitel 2.2.1 erläutert. Für die Bestimmung der Gewebekonzentration von THAL im Tumorgewebe und peripheren Lungengewebe kam das im vorangegangenen Kapitel 2 optimierte Mikrodialysesystem zum Einsatz. Zur Erinnerung, die hierbei eingesetzten Mikrodialysesonden haben eine Membranlänge von 10 mm, der als MD-Perfusat verwendete Mikrodialysepuffer besteht aus KRP-HEPES mit einem Zusatz von 10 % (m/V) HPCD und während der Messung wird das Dialysat bei einer Flussrate von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ jeweils für 10 min gesammelt. Jeder Probe werden direkt nach ihrer Gewinnung zu Stabilisierung des THAL 500 μL Sørensen-Citrat-Puffer (SCP) zugegeben.

Da die systematische Untersuchung der Sondenkalibrierung mit diesem System offenbarte, dass herkömmliche Kalibriermethoden höchstwahrscheinlich keine verlässliche Abschätzung der realtiven Recovery (RR) gewährleisten würden (siehe 2.3.2 und 2.4), musste für die Interpretation der Daten aus dem Lungenperfusionsexperimenten zunächst ein geeignetes Verfahren für die Sondenkalibrierung gefunden werden. Ansätze für die Entwicklung einer geeigneten Methode boten dabei die Untersuchungen von Strindberg und Kollegen [199]. Diese etablierten unter folgenden Annahmen eine Kalibriermethode für Humanstudien mit der endogenen Substanz Harnstoff: Zum einen, Harnstoff ist gleichmäßig im Gesamtkörperwasser verteilt und liegt fast ausschließlich im ungebundenen Zustand vor, so dass die Plasma- bzw. Serumkonzentration der freien Konzentration im Gewebe entspricht. Und zum anderen, der Betrag des Faktors, um den sich die *in vitro* bestimmte RR von der *in vivo* ermittelten unterscheidet, ist weitestgehend unabhängig von der Substanz.

Soll nun die RR einer zu untersuchenden Verbindung *in vivo* abgeschätzt werden, muss folglich im Vorfeld erst die RR von Harnstoff und jene der zu testenden Substanz *in vitro* mittels Extraktionsmethode bestimmt werden (siehe 2.2.1.3). Hieraus erhält man dann den Quotient aus RR der Testsubstanz und der des Harnstoffs. Während des eigentlichen *In-vivo*-Experimentes lässt sich wiederum die RR des Harnstoffs *in vivo* unkompliziert durch Messung der Harnstoffkonzentration im Dialysat und Blutplasma analog zur Extraktionsmethode berechnen. Um schließlich einen Schätzwert für die tatsächliche RR der untersuchten Substanz *in vivo* zu erhalten, muss nur die RR des Harnstoffs *in vivo* mit dem in den *In-vitro*-Versuchen ermittelten Quotienten der RR multipliziert werden. Schwalbe und Kollegen [198] wendeten

dieses Verfahren bereits erfolgreich bei der Bestimmung der Gewebekonzentrationen von Linezolid mittels Mikrodialyse an.

Um die Messung einfach zu halten und eine zusätzliche Fehlerquelle in Form einer weiteren zu analysierenden Substanz zu vermeiden, sollte allerdings diese Methode nicht direkt übernommen, sondern nur an die gegebenen Umstände angepasst werden. Für die Übertragung auf die Sondenkalibrierung in den Untersuchungen am humanen Lungenperfusionmodell bedeutet dies daher, dass die ursprüngliche Annahme mit Bezug auf die RR in verschiedenen Matrices dahingehend erweitert werden musste, dass der Betrag des Faktors, um den sich die *in vitro* bestimmte RR von der *in vivo* ermittelten unterscheidet, auch weitestgehend unabhängig von der Kalibriermethode sei. Betrachtet man daher zunächst diejenigen *In-vitro*-Untersuchungen, in denen Extraktionsmethode und Retrodialyse miteinander verglichen wurden (siehe 2.2.3), kann hier ein entsprechender Quotient wie im oben beschriebenen Verfahren gebildet werden, wenn die per Extraktionsmethode abgeschätzte RR im Zähler und die RR gemäß Retrodialyse im Nenner steht. Der so erhaltene Wert könnte anschließend dazu verwendet werden, eine in den Lungenperfusionsexperimenten mittels Retrodialyse ermittelten RR entsprechend zu korrigieren (siehe 4.5, C – Experimenteller Teil). Voraussetzung für die Richtigkeit dieser Methode ist natürlich, dass die tatsächliche RR beim vorliegenden Mikrodialysesystem nur sinnvoll mit Hilfe die Extraktionsmethode beschrieben werden kann (siehe 2.4).

Bei allen Perfusionsversuchen wurde deshalb eine Retrodialyse durchgeführt. Einerseits konnte so das Verhalten des Mikrodialysesystems in dieser Umgebung mit den zuvor in Kapitel 2.2.3 aufgeführten Experimenten verglichen werden, andererseits stellte dies die einzige praktikable Möglichkeit dar, quantitative Aussagen über die Gewebekonzentrationen von THAL machen zu können.

3.2.2 Durchführung der Versuche

Alle Versuche wurden wiederum an demselben humanen Lungenperfusionmodell durchgeführt, wie es schon in Kapitel 1.3.1 beschrieben wurde. Da kein Arzneistoff inhalativ verabreicht werden musste, wurde allerdings auf die entsprechende Applikationshilfe verzichtet (siehe *Abbildung 5*). Weitere geringfügige Modifikationen an der Apparatur werden in Kapitel 4.2.2, C – Experimenteller Teil, detailliert aufgeführt, diese veränderten aber das zugrunde liegende System nicht. Nach Genehmigung der Studie durch die zuständige Ethikkommission

wurden neun Patienten mit primärem Bronchialkarzinom in die Studie eingeschlossen, deren Einverständnis ebenfalls vorlag (siehe 4.2.1, C – Experimenteller Teil).

Direkt im Anschluss an die operative Entfernung des Lungengewebes durch Lobektomie, Bilobektomie oder Pneumonektomie wurde das Gewebe analog zu Kapitel 1.3.1.2 möglichst schnell präpariert und anschließend sofort isoliert beatmet und reperfundiert. Als Perfusionslösung kam ein modifizierter Krebs-Ringer-Puffer mit bovinem Serumalbumin zum Einsatz (siehe 4.1.2.3, C – Experimenteller Teil). Danach wurde eine Mikrodialysesonde innerhalb des Tumors und eine zweite in räumlicher Nähe im peripheren Lungengewebe platziert (siehe *Abbildung 10*). Bevor die eigentlichen Messungen begannen, wurde eine Retrodialyse zur Sondenkalibrierung durchgeführt. Der Mikrodialysepuffer enthielt dazu 600 ng/mL THAL, es wurde eine Perfusat- und je Sonde eine Dialystaprobe gewonnen.

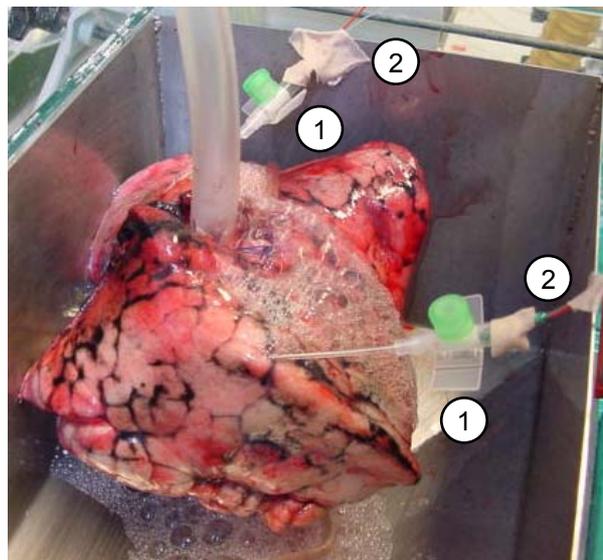


Abbildung 10: Die entweder im Tumor oder im peripheren Lungengewebe platzierten Mikrodialysesonden werden erst mit dem Splitter am Venenverweilkatheter befestigt (1) und dann an dem Auffangbehälter für die aus dem venösen Ausfluss tropfende Perfusionslösung fixiert (2) (siehe auch 4.3.1, C - Experimenteller Teil).

Nachdem das MD-Perfusat wieder auf normalen Mikrodialysepuffer umgestellt worden war, erfolgte die Simulation der systemischen Applikation des THAL. Hierzu wurden der Perfusionslösung im Reservoir (siehe *Abbildung 11*) bei den ersten drei Perfusionsexperimenten 5 mg THAL und bei den übrigen Versuchen eine an das Gewicht des Lungengewebes adaptierte Menge THAL, die sich aus einer Grundmenge von 2.25 mg und einer variablen Menge von 6.5 µg pro Gramm Gewebe zusammensetzte, in Form einer Lösung zugegeben.

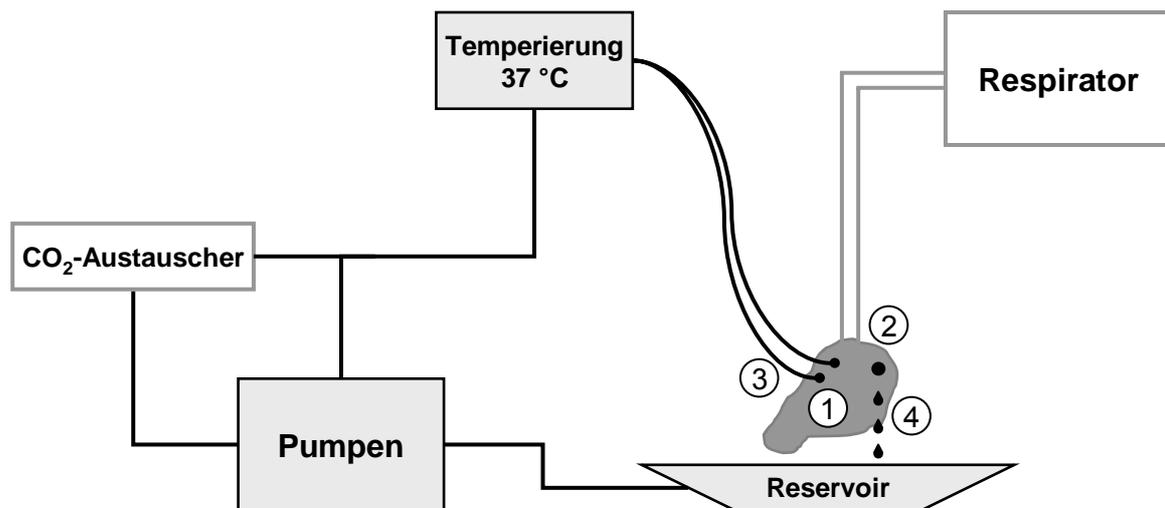


Abbildung 11: Schematischer Versuchsaufbau des den Mikrodialyseversuchen zugrunde liegenden humanen Lungenperfusionsmodells. [1) Lungengewebe mit Tumor; 2) Anastomosierter Bronchus; 3) Katheterisierte Arterien; 4) Aus offener Vene tropfende Perfusionslösung]

Darauffolgend wurden die Konzentrationsverläufe von THAL in der Perfusionslösung, im Tumorgewebe und im peripheren Lungengewebe maximal 60 min lang verfolgt. Für die Bestimmung der THAL-Konzentration in der Perfusionslösung wurden dieser jeweils in der Mitte eines Sammelintervalls der Mikrodialyse Proben entnommen, die ebenfalls sofort mit SCP stabilisiert wurden. Am Ende jeder Perfusion wurde außerdem eine tumorfremde Gewebeprobe aus den peripheren Bereichen des Segmentes, in dem auch die entsprechende Mikrodialysesonde platziert worden war, gewonnen, um nach Analyse der Gesamtgewebekonzentration einen Vergleichs- bzw. Kontrollwert zu erhalten.

3.3 Ergebnisse

Von neun durchgeführten Lungenperfusionsexperimenten konnte trotz ausreichender THAL-Konzentrationen in der Perfusionslösung nur in drei Versuchen ein Anfluten in den untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurden aber auch nur bei Lungenperfusionen mit messbaren Gewebespiegeln in den Gesamtgewebeproben nennenswerte THAL-Mengen gefunden (siehe 3.3, D – Tabellarischer Anhang). Nachfolgend werden diese drei Perfusionsversuche als Perfusion I, II und III bezeichnet.

Die Sondenkalibrierung per Retrodialyse zeigte ein sehr inhomogenes Bild, so wurden RR zwischen 0 und 51.8 % ermittelt (siehe 3.2, D – Tabellarischer Anhang). Auffällig war allerdings,

dass während erfolgreicher Perfusionsversuche wiederum die Werte durchwegs gut mit den Untersuchungen in Kapitel 2 korrelierten. Besonders hervorgehoben werden muss hierbei die Retrodialyse zu Beginn von Perfusion I. Die berechneten Werte von 32.4 % für die Sonde im peripheren Lungengewebe und 51.8 % für diejenige im Tumorgewebe stehen in guter Übereinstimmung mit den entsprechenden RR, die bei Durchführung der Extraktionsmethode in KRP-HEPES bestimmt wurden, wenn man die Herstellungschargen der Mikrodialysesonden berücksichtigt (siehe *Diagramm 9* und *Diagramm 10* unter 2.3.2). Dagegen näherten sich die RR, bestimmt während der Perfusionen II und III, wie erwartet den korrespondierenden Werten bei den Experimenten zur Retrodialyse in KRP-HEPES an (siehe 2.3.2). Zur Abschätzung der freien Konzentration von THAL in den untersuchten Geweben wurden daher bei Perfusion I die mittels Retrodialyse bestimmten RR direkt verwendet, die im Lungenperfusionsexperiment ermittelten RR bei Perfusion II und III wurden jedoch um den unter 3.2.1 erörterten Faktor korrigiert (siehe 4.5, C – Experimenteller Teil). Würde man auch die in Perfusion I ermittelten RR mit dem Kalibrierfaktor multiplizieren, so würde man vor allem für die Sonde im Tumorgewebe mit beinahe 100 % unverhältnismäßig große RR erhalten, die nicht mit den bisherigen Erkenntnisse in Einklang gebracht werden können.

Um die gewünschten Wirkstoffspiegel zu erreichen, wurden die Perfusionslösungen von Perfusion I und II mit je 5 mg und jene von Perfusion III gewichtsadaptiert mit 4 mg THAL versetzt. Die bei der hohen Dosierung in den Perfusionslösungen erzeugten THAL-Konzentrationen glichen im Verlauf bei den ersten drei Versuchen eher einer intravenösen Applikation, wo schnell maximale Spiegel auftraten, die daraufhin kontinuierlich abnahmen. Ein langsames Ansteigen der Konzentration hin zu einem Maximum, wie man es bei einer oralen Verabreichung erwarten würde, konnte hingegen erst bei der gewichtsadaptierten Dosierung beobachtet werden (siehe *Diagramm 11: I-B, II-B* und *III-B*).

Ähnlich verhielt es sich auch mit den Wirkstoffspiegeln in den Dialysaten der Mikrodialyse. Bei den Perfusionen I und II wurde ein sehr rascher Anstieg der Dialysatkonzentrationen von THAL mit anschließendem Plateau nach etwa 30 min verzeichnet, während die Dialysate aus Perfusion III nur langsam, parallel zur Perfusionslösung anwachsende THAL-Konzentrationen enthielten, die auch am Ende des Versuches kein Plateau erkennen ließen. Als absolute Ausnahme sticht allerdings die Messung der Gewebespiegel im peripheren Lungengewebe bei Perfusion II heraus. Hier wurde nach scheinbar normalen Verhältnissen in der ersten Dialysatprobe ein plötzlicher Einbruch in der THAL-Konzentration beobachtet, so dass in der darauf folgenden Probe kein THAL mehr nachgewiesen und auch in den weiteren Proben nur geringfügige Mengen an THAL gefunden werden konnten (siehe *Diagramm 11: I-A, II-A* und *III-A*). Unabhängig davon lässt sich dennoch ein gewisser Trend bezüglich der Gewebespiegel

in den verschiedenen Umgebungen erkennen. So scheint die Konzentration von THAL im peripheren Lungengewebe schneller anzusteigen als im Tumorgewebe und schließlich auch größere Maximalwerte anzunehmen.

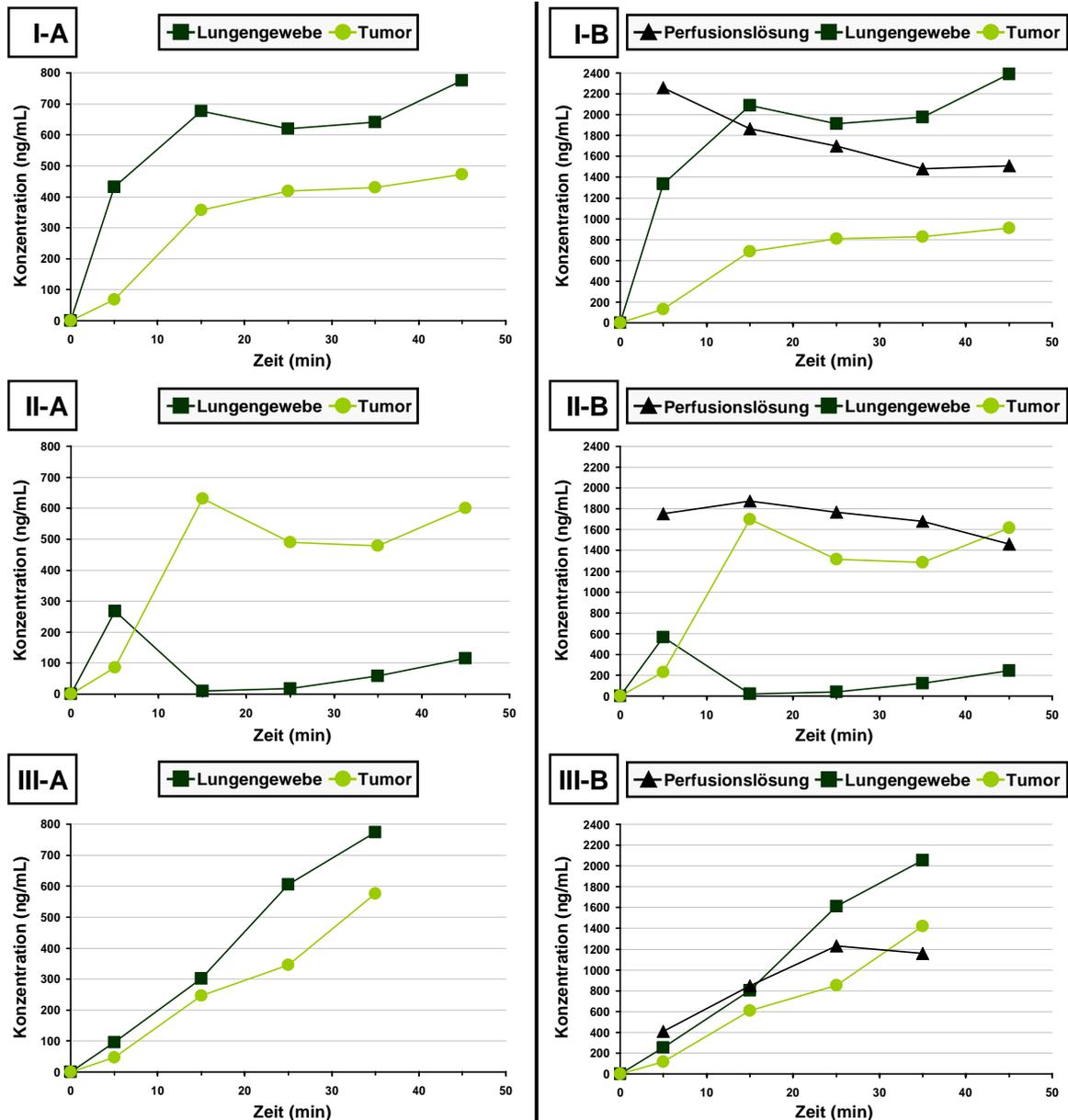


Diagramm 11: Konzentrationsverläufe von THAL bei den Perfusion I, II und III im Dialysat (A) oder in der Perfusionslösung im Vergleich zu den berechneten freien Gewebekonzentrationen (B).

Schätzt man die tatsächlichen freien THAL-Konzentrationen in den Geweben ab, bleiben die bei den Dialysatkonzentrationen gemachten Beobachtungen erhalten. Die freien Konzentrationen im peripheren Lungengewebe bewegten sich zumeist schon nach 15 min im Bereich der THAL-Spiegel in der Perfusionslösung und überstiegen diese dann im weiteren Verlauf. Im Gegensatz

hierzu näherten sich die freien Konzentrationen im Tumorgewebe nur langsam dem Niveau der Perfusionslösung an. So konnten im Tumorgewebe nur am Ende der Perfusionen II und III mit der entsprechenden Perfusionslösung übereinstimmende Wirkstoffspiegel erreicht werden, die bei Perfusion I abgeschätzten freien Tumorkonzentrationen dagegen lagen während des gesamten Zeitraumes deutlich unter den THAL-Konzentrationen in der Perfusionslösung (siehe *Diagramm 11: I-B, II-B und III-B*).

Für die Gesamtgewebekonzentration im peripheren Lungengewebe ergaben sich bei Perfusion I 661 ng/g, bei Perfusion II 876 ng/g und bei Perfusion III 517 ng/g Gewebe, was $49.5 \pm 7.1 \%$ (Mittelwert \pm Mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert) der letzten Konzentrationsbestimmung in der Perfusionslösung entspricht. Die Daten zu den übrigen Lungenperfusionsexperimenten können Kapitel 3.3, D – Tabellarischer Anhang, entnommen werden.

3.4 Diskussion

Das verwendete humane Lungenperfuisionsmodell wurde, wie bereits des Öfteren erwähnt, von Lindner und Kollegen entwickelt und dessen Etablierung schließlich 1997 veröffentlicht [41]. In den darauf folgenden Jahren führte diese Arbeitsgruppe Versuche mit zu der vorliegenden Untersuchung sehr ähnlichen Fragestellungen durch. So wurden am Modell ebenfalls Gewebespiegel verschiedener Zytostatika – Cyclophosphamid, Doxorubicin und dessen Prodrug HMR 1826 – in Tumor- und Lungengewebe gemessen bzw. die metabolische Aktivierung dieser Verbindungen verfolgt [113, 234-236]. Allerdings wurden die Konzentrationen hier in Gewebekomogenaten bestimmt, so dass aus dem Lungengewebe zwar mehrere Proben entnommen werden konnten, um in der Lage zu sein, Konzentrationsverläufe einer Substanz zu beschreiben, Spiegel im Tumor jedoch aus ethischen Gründen ausschließlich punktuell in Proben, gewonnen am Ende der jeweilige Perfusion, analysiert wurden (siehe auch 2.1.1).

Die Ergebnisse jener Studien wiesen dabei übereinstimmend im Vergleich zur Perfusionslösung äußerst geringe Konzentrationen der untersuchten Substanzen im Lungen- und Tumorgewebe auf. Im Mittel erreichten die Tumorkonzentrationen der Substanzen nur etwa ein Zehntel der Werte in der Perfusionslösung, vereinzelt blieben dort messbare Spiegel sogar ganz aus. Selbst die Gewebekomogenate des peripheren Lungengewebes zeigten höchstens einen Gehalt von ca. 30 % des in der Perfusionslösung vorgelegten Wirkstoffs.

Eben diese Verhältnisse konnten größtenteils auch bei den eigenen Experimenten beobachtet werden. Da die Gewebespiegel hier mittels Mikrodialyse bestimmt wurden, ließen sich auch die unterschiedlich hohen Wirkstoffspiegel in den Geweben, wenn diese denn nachgewiesen werden konnten, erklären. Denn im Gegensatz zur Mikrodialyse, wo nur der ungebundene Anteil einer Substanz im Extrazellularraum eines Gewebes erfasst wird, stellt das Gewebekompartiment eine Mischung jeglicher Kompartimente dar. Sind Moleküle einer Verbindung also bevorzugt im Interstitium zu finden oder werden nicht im besonderen Maße an Gewebestrukturen gebunden bzw. intrazellulär akkumuliert, wird die Substanz im Gewebe durch die Homogenisierung verdünnt. Gut vorstellbar ist dies vor allem bei hydrophilen Verbindungen mit geringer Proteinbindung, wie es bei den oben genannten Substanzen der Fall ist [235].

Dennoch sprechen die extremen Gegensätze von entweder hohen Konzentrationen oder dem vollständigen Ausbleiben von quantifizierbaren Mengen an THAL gegen eine derart ausgeprägte Minderverteilung der Substanz in die Gewebe. Eine erste mögliche Fehlerquelle könnte hier in zweierlei Hinsicht das Mikrodialysesystem bieten. Zum einen muss hinterfragt werden, ob nicht eine ungenügende Sensitivität Grund für das Scheitern beim Quantifizieren der Gewebespiegel war. Und zum anderen ist auch bekannt, dass die Platzierung von Mikrodialysesonden Veränderungen bzw. Prozesse im entsprechenden Gewebe hervorrufen kann, die sich eventuell negativ auf die Bestimmung selbst oder auch schon das Anfluten einer Substanz auswirken [178].

Geht man zunächst davon aus, dass minimal mit einer RR von 20 % gerechnet werden kann, so können bei einer Bestimmungsgrenze von 15 ng/mL der analytischen Methode (siehe 5.4, C – Experimenteller Teil) noch freie Gewebekonzentrationen von bis zu 75 ng/mL erfasst werden. Dies entspricht etwa 5 % der korrespondierenden Spiegel in der Perfusionslösung. Gleichzeitig geben die pharmakokinetischen Parameter keinen Hinweis darauf, dass Thalidomid übermäßig an Gewebestrukturen bindet oder intrazellulär akkumuliert [168], und die Vorversuche in Kapitel 2.3.2 konnten keinerlei Bindung an BSA aufzeigen. Auch unter Berücksichtigung der teilweise gemessenen THAL-Konzentrationen im Gewebe erscheinen ein Vorkommen sehr niedriger freier Konzentrationen und damit eine mangelnde Sensitivität des Mikrodialysesystems daher äußerst unwahrscheinlich.

Die Platzierung einer Mikrodialysesonde geht natürlich mit einer Verletzung des Gewebes und auch dem Einbringen eines Fremdkörpers in den Organismus einher. Folglich muss *in vivo* generell mit inflammatorischen Prozessen gerechnet werden, was wiederum die eigentliche physiologische Umgebung des zu untersuchenden Gewebes beeinträchtigt. Während diese

Sachlage bei längerer Implantierung einer Sonde in das Gehirn möglicherweise zu Problemen führen kann [237], wird der Einfluss dieser Prozesse auf die Gewebespiegel bzw. Vorgänge bei der Mikrodialyse aber im Allgemeinen als vernachlässigbar eingeschätzt [238-241]. Relevante Einschränkungen der RR ergeben sich am humanen Lungenperfuisionsmodell eher aus dem Verkrusten der Membranoberfläche. So können unabhängig von Entzündungsreaktionen Proteine oder auch Zellen an die Dialysemembran adsorbiert werden und auf diese Weise die Anzahl der Poren für den Stoffaustausch verringern. Ein Abfall der RR muss hier vor allem gleich zu Beginn der Mikrodialyse erwartet werden [242]. Allerdings kann ein vollständiges Zusetzen der Membran innerhalb der Laufzeit der Lungenperfuisionsexperimente von maximal 2 h nahezu ausgeschlossen werden [180].

Aber selbst wenn das Mikrodialysesystem tatsächlich nicht in der Lage gewesen wäre, die aufgetretenen Gewebespiegel zu messen, bleibt doch eine entscheidende Frage offen: Warum wurde immer nur im Falle positiver Dialysatkonzentrationen auch in den Gesamtgewebeproben, gewonnen am Ende eines Perfuisionsversuches, nennenswerte Mengen an THAL wiedergefunden? Analog zur Analytik im Mikrodialysepuffer lag die Bestimmungsgrenze bei 15 ng/g Lungengewebe und sollte damit nicht der limitierende Faktor gewesen sein.

Eine Größe, anhand derer alle Beobachtungen logisch erklärt werden könnten, wäre dagegen das Ausmaß der Gewebeprefusion. Schlecht perfundierte Gewebereale würden dabei nicht nur minimale THAL-Konzentrationen zur Folge haben, auch die RR einschließlich deren Bestimmung per Retrodialyse wären aufgrund der fehlenden bzw. unzureichenden Konvektion Schwankungen unterworfen. Der erhebliche Einfluss der Konvektion auf die RR wurde bereits in Kapitel 2.2.1.2 erwähnt und ähnliche Begebenheiten auch schon von Untersuchungen *in vivo* (Mikrodialyse in cerebrospinaler Flüssigkeit) berichtet [243]. Zusätzlich muss bedacht werden, dass der Fluss der Perfuionslösung mit ca. 0.4 mL/min/g Gewebe im Vergleich zum pulmonalen Blutfluss *in vivo* grundsätzlich sehr gering ist (siehe 1.3.3). Zwar wurden die Vorversuche unter analogen Konvektionsbedingungen durchgeführt (siehe 3.3.3, C - Experimenteller Teil), um sicherzustellen, dass die RR hierdurch nicht nachteilig beeinflusst wird, die Auswirkungen einer weiteren Absenkung des Perfuionsflusses konnte allerdings nicht abgeschätzt werden.

Wahrscheinlich wird dieses Szenario durch die bei der Präparation des Lungengewebes auftretenden Schwierigkeiten. Für die Reperfusion müssen zunächst die das Gewebe versorgenden Arterien katheterisiert werden. Wurde der gesamte Lungenflügel operativ entfernt, bleibt die entsprechende Pulmonalarterie unverzweigt erhalten und dieser Vorgang gelingt leicht. Im Gegensatz hierzu besitzt aber ein Lungenlappen mehrere arterielle Zugänge.

Je nach Größe dieser Arterien und der chirurgisch notwendig gewordenen Operationstechniken eignen sich dann nicht alle Gefäße dazu, katheterisiert zu werden. Das heißt, entsprechende arterielle Zuläufe können nicht an den Perfusionskreislauf angeschlossen werden, wodurch wiederum nachgeschaltete Gewebeareale abhängig von der Redundanz des Gefäßsystems weniger gut perfundiert werden.

Weiterhin können auch mit dem Perfusionskreislauf verbundene Gefäßsysteme Reperfusiondefizite aufweisen. Hinweise hierfür geben Erkenntnisse aus dem Bereich der Lungentransplantation. Da das entnommene Lungengewebe des Spenders über einen längeren Zeitraum konserviert werden muss, treten hier ähnliche Problematiken wie beim Lungenperfusionsmodell auf. Insbesondere die Prozesse in der Ischämiezeit zwischen erfolgter Resektion und Wiedereinbindung des Gewebes in ein physiologisches System, sei es Perfusionsmodell oder Patient, sind da von Interesse.

Bedingt durch den Blutstau, die sinkenden Temperaturen im Gewebe und die relative Hypoxie laufen schon während der Operationen erste pathophysiologische Vorgänge an. Bezüglich der Güte der Reperfusion des Lungengewebes sind in erster Linie die vermehrte Bildung prothrombotischer und antifibrinolytischer Faktoren sowie das Entstehen größerer Mengen von Sauerstoffradikalen zu nennen, aber auch Einflüsse auf den zellulären Calcium- bzw. Kaliumhaushalt und den Stickstoffmonoxid-Stoffwechsel spielen eine Rolle [244, 245]. Folgen dieser Prozesse sind die Bildung von mikrovaskulären Thromben, Vasokonstriktion und Schädigung des Gefäßendothels, die wiederum sowohl das Ausmaß der Gewebeperfusion betreffen als auch die Entstehung eines Lungenödems begünstigen.

In einem ersten Schritt kann dem durch Ausspülen des in den Gefäßen verbliebenen Blutes, wie es auch zu Beginn eines jeden Perfusionsversuches praktiziert wurde, entgegen gewirkt werden [246]. Neben dem Entfernen von einer Vielzahl pathophysiologisch relevanter Substanzen und Zellen werden so die Bildung (weiterer) mikrovaskulären Thromben vermieden bzw. bereits bestehende Thromben ausgewaschen. Bei den Experimenten mit THAL enthielt der verwendete Puffer (siehe 4.1.2.3, C - Experimenteller Teil) abweichend von der von Lindner und Kollegen [41] beschriebenen Perfusionslösung daher zusätzlich unfraktioniertes Heparin, dessen Aktivität in der Lösung von 2.5 IU/mL an die Dosierung bei einem kardiopulmonalen Bypass angelehnt ist [247]. Auf den Einsatz weiterer Zusätze, die zur Antagonisierung der oben aufgeführten Prozesse (z.B. Antioxidantien, Vasodilatoren, usw.) diskutiert werden, wurde allerdings verzichtet, da die bisher an diesem humanen Lungenperfusionsmodell durchgeführten Untersuchungen keine Hinweise auf derartige Perfusionsprobleme von Gewebearealen und damit auf zusätzlichen Handlungsbedarf gaben.

Ausgehend von den bisherigen Erläuterungen muss folglich angenommen werden, dass Daten aus Perfusionsversuchen, in denen keine THAL-Konzentrationen in den Geweben nachgewiesen werden konnten, in keiner Weise die Situation *in vivo* widerspiegeln, sondern durch negative Eigenschaften des Modells verfälscht wurden. Die Gewebepenetration von THAL sollte deshalb ausschließlich auf Basis der Daten aus den Perfusionen I, II und III beurteilt werden, wobei auch die Dialysatkonzentrationen von der Mikrodialyse im peripheren Lungengewebe bei Perfusion II bis auf den ersten Wert nicht berücksichtigt werden (siehe *Diagramm 11*). Betrachtet man diesen Konzentrationsverlauf vor dem Hintergrund der bereits erörterten Fehlerquellen wie dem Zusetzen der Dialysemembran durch interstitielle Komponenten und der Minderperfusion von Gewebearealen, erscheint dies sinnvoll.

Insgesamt ist die Verteilung des THAL in die untersuchten Gewebe daher als gut einzustufen. Aufgrund der fehlenden Bindung an BSA kann gefolgert werden, dass die freien Konzentrationen im Extrazellularraum der Gewebe schnell annähernd die Werte derjenigen in der Perfusionslösung angenommen haben. Da bisher auch in der Literatur für die Substanz keine sonstigen, signifikanten Transportmechanismen beschrieben wurden, kann des Weiteren auf eine rein diffusionskontrollierte Verteilung geschlossen werden. Das Verhältnis von Gesamtgewebekonzentration zu den korrespondierenden THAL-Spiegeln in der Perfusionslösung bzw. zu den berechneten freien Gewebekonzentrationen lässt außerdem vermuten, dass THAL zumindest im Lungengewebe überwiegend ungebunden in der intra- und extrazellulären Flüssigkeit vorliegt. Zwar ist jenes Verhältnis gegenüber den Ergebnissen aus den Vorversuchen in Kapitel 2.3.2 signifikant erniedrigt, aber die Tendenz ist in beiden Fällen gleich. Auch könnte die Gesamtgewebekonzentration bei den Lungenperfusionsexperimenten durch das Abspülen der Gewebeproben mit isotonischer Kochsalzlösung verfälscht worden sein (siehe 4.3.3, C - Experimenteller Teil).

Die vom peripheren Lungengewebe abweichende Pharmakokinetik im Tumor wiederum korreliert mit dem unterschiedlichen anatomischen Aufbau der beiden Gewebearten. Denn während peripheres Lungengewebe eines der am besten durchbluteten Gewebe des Körpers darstellt [22], variiert die Versorgung innerhalb des Tumors stark (siehe 3.1). So unterteilt sich ein solider Tumor bezüglich Blutfluss und Art und Umfang der Vaskularisation radial in verschiedene Bereiche, was dazu führen kann, dass die Konzentration einer Substanz von Außen nach Innen abnimmt. Je nach Tumorgröße und Entwicklungsstadium ist dieser Konzentrationsgradient unterschiedlich stark ausgeprägt [248]. Berücksichtigt man die Länge der Dialysemembran, muss folglich angenommen werden, dass die mittels Mikrodialyse gemessenen Spiegel einerseits von der Lage der Sonde abhängen und andererseits einen Durchschnittswert innerhalb des Tumors repräsentieren.

Diese Umstände äußerten sich hier offensichtlich in einem verzögerten Anfluten im Tumorgewebe. Reichte dabei die Versuchsdauer von 40-50 min bei den Perfusionen II und III anscheinend aus, um am Ende der Perfusion auch innerhalb des gesamten Tumors eine nahezu gleichmäßige Verteilung von THAL hervorzurufen, gelang dies bei Perfusion I nicht. Allerdings sollte die rasche Elimination der Substanz auch *in vivo* verhindern, dass nach oraler Applikation im gesamten Tumor immer ähnliche freie Konzentrationen auftreten.

Um nun abschätzen zu können, inwiefern die beobachteten Konzentrationsprofile auf die Situation *in vivo* übertragbar sind, wäre eine konkruente Humanstudie wie in Kapitel 2.4 oder zumindest eine Mikrodialysestudie mit analogen Untersuchungszielen und anderem Wirkstoff wünschenswert. Die Platzierung der Mikrodialysesonden *in vivo* würde aber einen chirurgischen Eingriff voraussetzen, so dass aus ethischer Sicht nur Lungenkrebspatienten infrage kämen, die sich im Rahmen ihrer Grunderkrankung oder auch einer Begleiterkrankung einer routinemäßigen Operation unterziehen müssen, im Verlaufe derer ohne Benachteiligung des Patienten die Implantierung der Sonden erfolgen kann. Aus diesem und weiteren, ähnlichen Gründen wurden bisher jedoch keine derartigen Humanstudien durchgeführt, auch ist generell die Zahl der Humanstudien, die mittels Mikrodialyse Wirkstoffspiegel in Tumoren bestimmen, im Gegensatz zu der ansonsten rasant wachsenden Anzahl an pharmakokinetischen Studien gering [233]. Hierdurch wird eindrucksvoll die Bedeutung solcher Untersuchungen am humanen Lungenperfusionsmodell zusätzlich hervorgehoben.

Vergleicht man die erhaltenen Ergebnisse stattdessen mit Daten aus jenen humanen Mikrodialysestudien, bei denen die Pharmakokinetik von Zytostatika in anderen soliden Tumoren untersucht wurden, können hier trotz der unterschiedlichen den Tumor umgebenden Gewebe und Substanzen Parallelen erkannt werden [229, 249-257]. So wurden in den Tumorgeweben durchwegs ähnliche Konzentrationsverläufe wie im umgebenden Gewebe erhalten, die freien Konzentrationen entsprachen dabei zumeist annähernd denen im Blutplasma. Es wurde ebenfalls beobachtet, dass die Konzentrationen im Tumor starken Schwankungen, die auch deutlich niedrigere Spiegel als in den übrigen Matrices einschlossen, unterworfen waren und die maximalen Konzentrationen dort häufig verzögert auftraten. Dadurch waren z.B. Vorhersagen der intratumoralen Spiegel auf Basis der Plasmaspiegel durch mathematische Modelle in einer Studie, publiziert von Müller und Kollegen, nicht möglich [255]. Während in den meisten Studien die untersuchten Zytostatika parenteral verabreicht wurden, führten Mader und Kollegen eine Studie mit oral appliziertem Capecitabin bei metastasierenden Brustkrebs durch [254]. Diese beobachteten im Vergleich zu Plasma eine im Mittel um 30 min verschobene Maximalkonzentration in subkutanem Bindegewebe und um 45 min in kutanen Metastasen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das humane Lungenperusionsmodell grundsätzlich dazu geeignet ist, die Gewebepenetration von Arzneistoffen zu bestimmen. Für die vorliegende Untersuchung wurde zu diesem Zweck erstmals die Mikrodialyse am Modell erfolgreich eingesetzt. Mit Hilfe dieser Technik konnten außerdem erstmals mögliche Unterschiede in der Pharmakokinetik von Thalidomid in Tumorgewebe im Vergleich zu peripherem Lungengewebe aufgezeigt werden, wobei die gewonnenen Daten in guter Übereinstimmung mit Erkenntnissen aus entsprechenden Humanstudien zu Tumorkonzentrationen von antineoplastischen Substanzen stehen.

Obwohl das Lungenperusionsmodell zurzeit die einzige Möglichkeit darstellt, das Anfluten von Zytostatika im humanen Bronchialkarzinom nahezu unter *In-vivo*-Bedingungen zu verfolgen, kann eine weitere Anwendung des Modells für die Untersuchung von Gewebespiegeln ohne eine weitere Optimierung aber nicht empfohlen werden. Neben einer Modifizierung der Technik zur Präparation des Lungengewebes, z.B. durch bessere Materialien und/oder Methoden auch kleinste Arterien katheterisieren zu können, sollten auch alternative Zusammensetzungen der Perfusionslösung in Erwägung gezogen werden, um die Problematik der schlecht perfundierten Gewebeareale zu entschärfen.

Denkbar sind hier z.B. Pufferzusätze, die der Radikalbildung und der Vasokonstriktion entgegenwirken. Aus dem Bereich der Lungentransplantation existieren in diesem Zusammenhang unter anderem positive Studien zu Glutathion, Acetylcystein, Allopurinol [258, 259], Prostaglandin E₁ [260], Stickstoffmonoxid-Donatoren wie Nitroglycerin oder Nitroprussid-Natrium [261-264] und Calciumkanalblockern sowohl vom Verapamil- also auch Dihydropyridin-Typ [265-267]. Weiterhin könnte das präparierte Lungengewebe auch retrograd, also von der venösen Seite aus, gespült werden, denn auf diese Weise würde die Spülflüssigkeit unabhängig von verengten Arterien oder Arteriolen gleichmäßiger verteilt werden [268].

Unabhängig von den oben genannten Verbesserungsvorschlägen ist auch eine Kontrolle der Gewebepfusion direkt zu Beginn eines Lungenperusionsversuches empfehlenswert. Eine Möglichkeit, diese ohne nachhaltige Beeinträchtigung des Versuchsablaufes durchzuführen, böte z.B. die IC-VIEW[®]-Technologie, die auf der Fluoreszenz von Indocyaningrün im Nahinfrarotbereich beruht und ursprünglich für die Beurteilung der Gewebepfusion *in vivo* entwickelt wurde. Bei diesem Verfahren wird der Farbstoff in die das zu evaluierende Gewebe versorgende Arterie injiziert und anschließend das entsprechende Areal mit einer speziellen Kamera gefilmt. Da Indocyaningrün fast vollständig an Plasmaprotein gebunden vorliegt, verbleibt die Substanz intravasal und die Durchblutung peripher gelegener Gefäßsysteme kann durch Anregung des Farbstoffes mit Licht der Wellenlänge um die 800 nm abgebildet werden

(siehe *Abbildung 12*) [269]. In der Humanmedizin wurde diese Technik bereits unter anderem bei der Einschätzung von Verbrennungstiefen, des Fortschrittes einer Wundheilung oder der Perfusionssituation von Haut- und Muskeltransplantaten erfolgreich eingesetzt [270, 271].

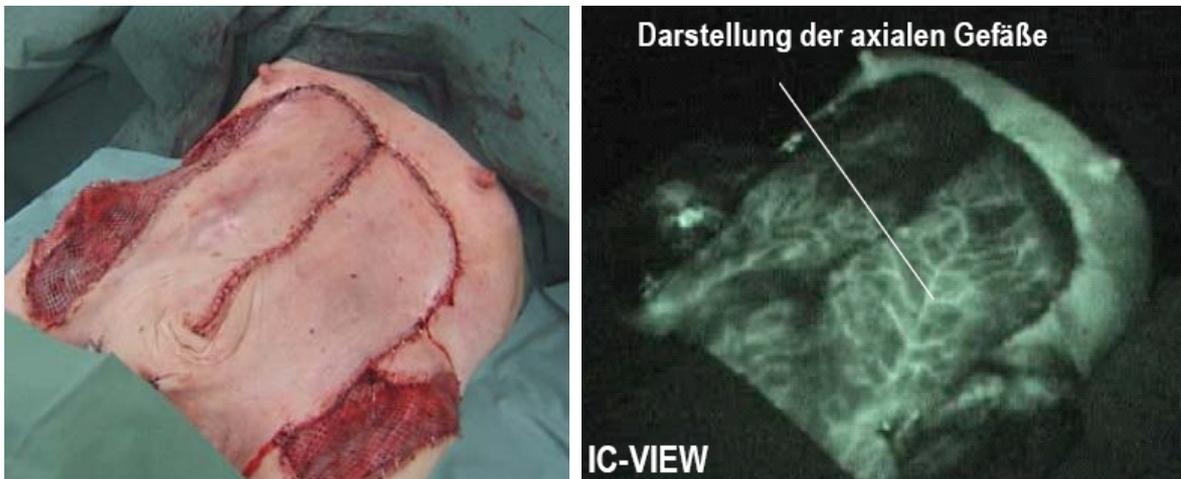


Abbildung 12: Aufnahme der Gewebepfusion gestielter Leistenlappen mit der IC-VIEW-Technologie nach operativer Korrektur eines Bauchdeckendefektes (Bilder wurden einer frei zugänglichen Präsentation zur Produktinformation von PULSION Medical Systems entliehen [272]).

Am humanen Lungenperfuionsmodell wäre die Anwendung des Verfahrens während des Spülens des Gefäßsystems (siehe 4.3.1, C - Experimenteller Teil) vorstellbar. Auf diese Weise würde die Zeit bis zum Etablieren der Beatmung und Reperfusion nicht unnötig verlängert werden und die Güte der lokalen Gewebepfusion wäre schon vor Versuchsbeginn bzw. Platzierung der Mikrodialysesonden bekannt. Würde man außerdem die Farbstofflösung nur für eine kurze Zeit am Anfang des Auswaschvorgangs der Spüllösung zusetzen, könnte nach Beurteilung der Perfusionssituation das im Präparat verbliebene Indocyaningrün mit der restlichen Spülflüssigkeit wieder entfernt werden.

C. Experimenteller Teil

1 ***In-vitro*-Untersuchung zur Auflösungs- und Umverteilungskinetik inhalativer Glucocorticoide an einem Dialysemodell**

1.1 **Verwendete Reagenzien**

1.1.1 **Substanzen**

Beclomethasondipropionat (BDP), Beclomethason-17-propionat (17-BMP), Beclomethason-21-propionat (21-BMP), Beclomethason (B) und Fluticasonpropionat (FP) wurden von GlaxoSmithKline (Greenford, England) zur Verfügung gestellt. Die FCKW-freien Druckgas-Dosieraerosole Sanasthmax[®] (Asche Chiesi, Hamburg, Deutschland) und Ventolair[®] (3M Medica, Neuss, Deutschland) in den Dosierungen 250 µg beziehungsweise 100 µg BDP pro Sprühstoß wurden in einer öffentlichen Apotheke erworben. Diethylether (HPLC-Qualität) und Acetonitril (MeCN, HPLC-gradient-grade) wurden jeweils von Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland) und Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) bezogen. Das verwendete Wasser stammt aus einer hauseigenen Demineralisationsanlage (Umkehrosiose) und wurde mit einer Wasseraufbereitungsanlage (Milli-Q[®] - reagent grade water system) von Millipore (Schwalbach, Deutschland) weiter aufgereinigt. Des Weiteren wurden N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES) von GERBU (Gaiberg, Deutschland), der Farbstoff *Fast Green FCF* von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) und Stickstoff sowohl in Druckgasflaschen (Qualität 5.0) als auch in flüssiger Form von Linde (München, Deutschland) erworben. Alle weiteren Chemikalien wurden in p.a.-Qualität von E. Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

1.1.2 **Lösungen**

1.1.2.1 **Krebs-Ringer-HEPES-Puffer**

Zur Herstellung des hier eingesetzten Krebs-Ringer-HEPES-Puffers (KRP-HEPES) wurden zunächst drei Stammlösungen angefertigt und diese bei 4 bis 8 °C gelagert:

➤ -Lösung A:	Natriumchlorid	1.18 M
	Kaliumchlorid	44.8 mM
	Kaliumdihydrogenphosphat	12.0 mM
	Magnesiumsulfat Hexahydrat	24.3 mM
➤ Lösung B:	Calciumchlorid Dihydrat	24.4 mM
➤ Lösung C:	HEPES	100 mM

Vor der Herstellung des KRP-HEPES wurden die drei Lösungen auf Raumtemperatur (RT) gebracht, daraufhin jeweils 10.0 mL der Lösung A bis C miteinander vermischt und die resultierende Lösung mit Wasser auf ca. 90 mL aufgefüllt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 molarer Natriumhydroxid-Lösung auf den Wert 7.4 eingestellt und schließlich das Volumen mit Wasser zu 100.0 mL ergänzt. Der Puffer wurde vor jedem Dialyseversuch und zur Herstellung des Gewebehomogenats frisch angesetzt.

1.1.2.2 Standardlösungen für die Quantifizierung

➤ *Interner Standard*

Als Stammlösung für die Zugabe des internen Standards wurde eine Lösung von Fluticasonpropionat mit einer Konzentration von 1 mg/mL in Methanol hergestellt. Diese Stammlösung wurde mit MeOH bis zu einer Konzentration von 3 µg/mL verdünnt (Verdünnung V1). Die Stammlösung und Verdünnungen wurden bei -20 °C gelagert.

➤ *Kalibrierstandards*

Zur Erstellung der Kalibrierlösungen wurde jeweils für BDP, 17-BMP, 21-BMP und B eine Stammlösung in Methanol hergestellt, die das entsprechende Glucocorticoid in einer Konzentration von 1 mg/mL enthielt. Die unten aufgeführten Arbeitslösungen V1, V2, und V3 wurden aus Verdünnungen dieser vier Stammlösungen mit MeOH erhalten, wobei schon beim ersten Verdünnungsschritt eine Lösung gewonnen wurde, die alle vier Verbindungen in der gleichen Konzentration vereinte:

Lösung V1	20 µg/mL
Lösung V2	5 µg/mL
Lösung V3	0.5 µg/mL

Die Stammlösungen und Verdünnungen wurden bei -20 °C gelagert.

1.2 Verwendete Geräte und Materialien

1.2.1 Humanes Gewebe und Blutplasma

1.2.1.1 Herkunft

Für die Dialyseversuche wurde ausschließlich gesundes peripheres Lungengewebe von Patienten verwendet, die sich aufgrund eines Lungenkarzinoms einer Lobektomie unterziehen mussten. Die infragekommenden Spender wurden in den Fachkliniken für Thoraxchirurgie der Klinik Michelsberg und der Universität Würzburg von den behandelnden Ärzten rekrutiert und durften während der letzten vier Wochen vor der Lungenteilresektion nicht mit Glucocorticoiden behandelt worden sein. Von den Patienten wurde vor der Operation eine Einverständniserklärung für die weitere Verwendung des entnommenen Gewebes eingeholt. Das gewonnene Gewebe wurde unverzüglich nach Entnahme von einer Operationsschwester mit isotonischer Kochsalzlösung blutfrei gewaschen, unter Kühlung mit Eis zum Institut für Pharmazie transportiert, dort mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

Das humane Plasma stammt von gesunden Probanden, die bei der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie der chirurgischen Klinik und Poliklinik, Universität Würzburg, für eine Blutspende vorstellig wurden. Eine schriftliche Einverständniserklärung lag auch hier vor. Für die Dialyseversuche wurde das Plasma von drei Spendern vermischt, in Aliquots zu je 50 mL aufgeteilt und bei -70 °C eingelagert.

1.2.1.2 Herstellung des Lungenhomogenats

Um bei den Dialyseexperimenten eine möglichst gute Reproduzierbarkeit bezüglich des Proteingehaltes und der Enzymaktivität des Lungenhomogenats zu erzielen, wurde vor Beginn der Versuchsreihen eine ausreichende Menge Homogenat hergestellt. Es wurde peripheres Lungengewebe von drei verschiedenen Patienten verwendet.

Das Gewebe wurde im noch gefrorenen Zustand zunächst in kleine Stücke zerschnitten, wobei das Volumen dieser Stücke etwa Würfeln mit der Kantenlängen von 1 bis 3 mm entsprach. Dabei wurde auf einer Glasplatte gearbeitet, die während des gesamten Schneidevorgangs auf Eis lagerte. Wurde die Konsistenz des Gewebes für eine weitere Zerkleinerung ungeeignet, wurde das Lungengewebe wieder mit flüssigem Stickstoff abgekühlt. Nach der Zerkleinerung wurde ein Teil Gewebe mit zwei Teilen KRP-HEPES vermischt und diese Gewebesuspension mit dem Ultra-Turrax bei etwa 20000 Upm weiter homogenisiert. Hierbei wurde das Gerät in vier Intervallen jeweils 20 Sekunden betätigt und dann 20 Sekunden wieder ausgeschaltet, um lokal Temperaturen über 40 °C im Lungenhomogenat zu verhindern.

Die Homogenisierung erfolgte unter ständiger Kühlung des Gefäßes in einem Eisbad. Anschließend wurden je 5 g des Homogenats abgewogen, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

1.2.2 Dialyseapparatur

Für die Dialyseversuche wurde eine neue Dialyseapparatur entworfen, wobei nicht kommerziell erhältliche Komponenten in der institutseigenen Werkstatt angefertigt wurden. Die Hauptbestandteile der Apparatur sind das Flüssigkeitsreservoir, das Mehrwegeventil und die eigentliche Dialysekammer, deren Ausmaße und Anordnung der *Abbildung 13* entnommen werden können. Als Werkstoff für die Dialysekammer wurde Teflon verwendet, um mögliche Adsorptionseffekte der lipophilen Arzneistoffe zu minimieren.

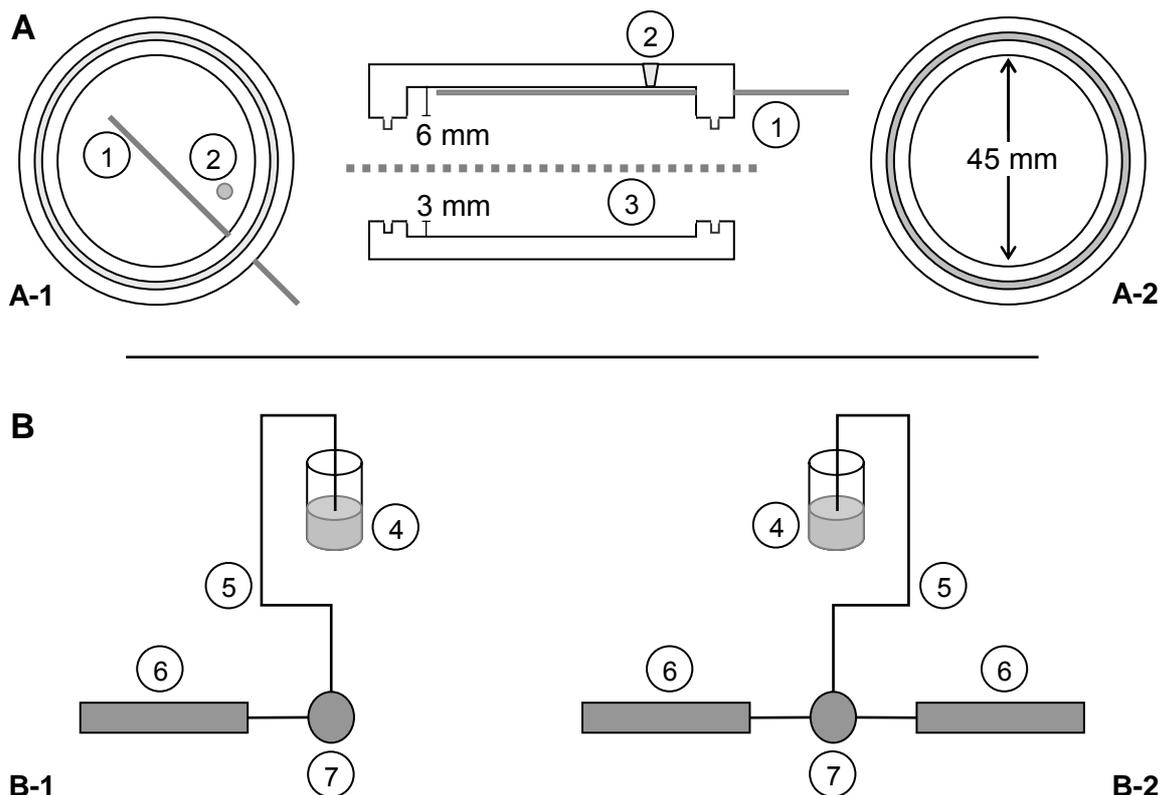


Abbildung 13: (A) Aufbau einer Dialysekammer: Ober- (A-1) und Unterteil (A-2) besitzen denselben Innendurchmesser und sind außen in Aufsicht dargestellt. In der Mitte wird ein Querschnitt der gesamten Kammer gezeigt. [1) Edelstahlkapillare, 2) Öffnung für die Probenentnahme, 3) Dialysemembran] (B) Schematischer Versuchsaufbau für Einzel- (B-1) und Parallelversuche (B-2) [4) Reservoir, 5) Kapillarschlauch, 6) Dialysekammer, 7) Mehrwegeventil]

Die beiden Hälften der Dialysekammer wurden so konstruiert, dass sie beim Aufeinandersetzen bündig schlossen und so während einer Dialyse praktisch kein Flüssigkeitsverlust auftrat. Zusätzlich werden die Kammerhälften unterstützend durch zwei Federklammern aus Metall aufeinander gepresst. Da die Probenentnahme unter Zuhilfenahme einer Mikroliterpipette für Volumina von 100 bis 1000 μL erfolgte, wurde die dafür vorgesehene Öffnung passgenau für die verwendeten Pipettenspitzen geformt, die nach dem Aufsetzen wiederum weniger als 1 mm in die Kammer ragten. Dadurch konnte während der Probenentnahme ein leichter Unterdruck aufrechterhalten und gleichzeitig eine mit Silikon gefüllte Spitze als Verschluss verwendet werden. Als Flüssigkeitsreservoir diente ein einfaches Becherglas, dessen Inhalt gegen Verdunstungsverluste mit Parafilm abgedichtet wurde.

Die Verteilung der Dialyseflüssigkeit wurde zentral über das Mehrwegeventil gesteuert. Dabei verbanden Kapillarschläuche das Reservoir mit dem Ventil, während die Dialysekammer direkt über die Edelstahlkapillare an das System angeschlossen war. Während der Inkubation trennte das Ventil die Dialysekammer bzw. beide Kammern im Parallelversuch vom Reservoir ab, so dass der Flüssigkeitsraum einer Dialysekammer am Ende der Stahlkapillare abgegrenzt wurde. Beim Befüllen und zur Probenentnahme wurde die Dialysekammer mit dem Reservoir verbunden, wobei bei Parallelversuchen nur eine Kammer gleichzeitig Flüssigkeit aus dem Reservoir beziehen konnte. Die zweite Kammer war während dieses Vorgangs weiterhin verschlossen.

Um die Vorgänge innerhalb der Kammer überprüfen zu können, wurde das Oberteil einer Dialysekammer dahingehend modifiziert, dass dessen Oberseite aus Plexiglas gefertigt wurde. Diese bauliche Variation wurde nur zur Durchführung von Kontrolluntersuchungen verwendet. Aus fertigungstechnischen Gründen betrug die Höhe innerhalb des Oberteils im Gegensatz zu den Kammern, die für die Dialyseversuche eingesetzt wurden, nicht 6 sondern 9 mm.

Da die Dialyseversuche mit BDP direkt nach Freisetzung aus einem handelsüblichen Dosieraerosol durchgeführt werden sollten, wurden zusätzlich Applikationshilfen in Auftrag gegeben, um eine standardisierte und reproduzierbare Dosierung der zu untersuchenden Substanz zu gewährleisten. Eine Applikationshilfe setzt sich dabei aus einem Glasrohr und einem passenden Deckel zusammen. Das Glasrohr mit einem Innendurchmesser von 53 mm, einem Außendurchmesser von 58 mm und einer Höhe von 100 mm wurde vom Glasbläser des Instituts für Organische Chemie der Universität Würzburg gefertigt (siehe auch *Abbildung 4* in Kapitel 1.2.1.2, B - Allgemeiner Teil). Aufgrund dieser Dimensionierung konnte das Rohr stabil auf das Unterteil einer Dialysekammer gestellt werden. Der Deckel der Dosierhilfe wurde in eigener Arbeit aus einer Kunststoff-Petrischale hergestellt. Eine Öffnung im Boden der Schale glich hierbei in ihren Ausmaßen dem Mundstück eines der zu untersuchenden Dosieraerosole.

Um eine möglichst dichte Passform für das entsprechende Mundstück entstehen zu lassen, wurde der Rand dieser Öffnung mit Silikon ausgespritzt. Für ein bündiges Schließen von Deckel und Glasrohr wurde auf den Innenboden der Petrischale ein kreisförmiger Silikonwulst aufgetragen, dessen Innendurchmesser dem Außendurchmesser des Glasrohrs entsprach und in dessen Mitte sich die Öffnung für das Mundstück des Dosieraerosols befand. Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurden zwei baugleiche Glasrohre und je ein Deckel mit entsprechender Öffnung für die zu untersuchenden Dosieraerosole angefertigt.

1.2.3 HPLC-System

Degaser	Modell 1525 <i>In-Line</i> Vakuum-Degaser (Waters, Milford, USA);
Pumpe	Modell 1525 für binäre Hochdruckgradienten mit analytischem Pumpenkopf (Waters);
Probengeber	Modell 717plus mit integriertem Kühler und Heizer (Waters);
Säulenofen	1500er Serie (Waters);
Analytische HPLC-Säule	Symmetry [®] C18, 150 x 4.6 mm, 5 µm Partikel (Waters);
Detektor	Dualband-UV-Detektor Modell 2487 (Waters);
Steuerung und Datenverarbeitung	Software Breeze [®] Version 3.30 (Waters);

1.2.4 Sonstige Geräte und Materialien

Analysewaage	ABJ 220-4M, 0.01-220 g, 0.1 mg minimale Wägedifferenz (Kern & Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland);
Dialysemembran	Spectra/Por® 6 mit einer molekularen Porengrößenbegrenzung von 2000 Dalton (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, USA);
Dispenser	Eppendorf Multipette® 4780 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland);
Kapillarschläuche	Kapillarschläuche aus Teflon mit einem Innendurchmesser von 1.1 mm (Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Deutschland);
Kunststoffe	Teflon und Plexiglas (Pfister & Pfrang Technischer Großhandel, Waldbüttelbrunn, Deutschland)
Mehrwegeventil	LV-4, Zubehör für Chromatographie (Amersham);
Mischrad	Außendurchmesser 340 mm, 24 Halterungen für Normschliffe NS 14/23, Umdrehungszahl 10 Upm (Konstruktion der institutseigenen Werkstatt);
Mikroliterpipette 10–100 µL	Eppendorf Research® variabel, 10–100 µL (Eppendorf);
Mikroliterpipette 100–1000 µL	Eppendorf Research® variabel, 100–1000 µL (Eppendorf);
Präzisionswaage	Mettler P1200, 0.1-1200 g, 10 mg minimale Wägedifferenz (Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland);
Spitzkolben	Spitzkolben mit Normschliff NS 14/23, Inhalt 5 mL (Witeg Labortechnik, Wertheim, Deutschland);
Thermostat für Wasserbad	Modell F4391 (Haake, Berlin, Deutschland);
Ultra-Turrax	Modell TP 18-10 (Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland);
Vortex	Modell K-550-GE (Bender & Hobein, Zürich, Schweiz);
Wärmeschrank	Modell 400 (Memmert, Schwabach, Deutschland);
Zentrifuge	Labofuge II mit Winkelarbeitskopf 12 x 15 mL (Heraeus-Christ, Osterode am Harz, Deutschland);
Zentrifugengläser	Rundbodengläser 16 x 100 mm mit Normschliff NS 14/23 (Normschliff Gerätebau, Wertheim, Deutschland);

1.3 Durchführung der Dialyseversuche

1.3.1 Kontrollversuche zur Bestimmung der Funktionsfähigkeit

1.3.1.1 Test der einzelnen Arbeitsschritte und Abläufe während eines Dialyseversuches

Getestet wurde der prinzipielle Ablauf eines Dialyseversuches mit dem Ziel, die Durchführbarkeit der Dialyseversuche vor allem hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit sicher zu stellen. Ein spezielles Augenmerk lag dabei auf folgenden Schritten:

- Befüllung der Dialysekammer unter Vermeidung von Luftbläschen
- Probenentnahme
- Diffusion und Konvektion im Oberteil der Dialysekammer während der Inkubation

Für den Kontrollversuch wurden zunächst 100 mL KRP-HEPES-Puffer - wie unter 1.1.2.1 beschrieben - hergestellt. Nachdem eine Dialysemembran so zurechtgeschnitten worden war, dass sie die Grundfläche des Dialysekammerunterteils an jeder Stelle um ca. 1 cm überragte, wurde diese für etwa 30 Minuten bei RT in Millipore®-Wasser eingelegt. Danach wurde sie mit Millipore®-Wasser aus einer Spritzflasche gewaschen und bei 37 °C für weitere 45 Minuten in den frisch hergestellten Puffer gelegt. Während der Äquilibration der Dialysemembran wurde ein Becherglas mit Puffer befüllt, die Flüssigkeit über einen Kapillarschlauch mit dem Mehrwegeventil verbunden und das Becherglas schließlich mit Parafilm verschlossen. Anschließend wurde dem Aufbau eines Einzelversuches (siehe *Abbildung 13*) entsprechend das Oberteil der Dialysekammer an das Ventil angeschlossen und die vorbereitete Apparatur sowie das noch nicht angefügte Unterteil der Kammer wurden bis zum Beginn des Versuches bei 37 °C in den Wärmeschrank gestellt. Als Oberteil wurde die mit Plexiglas modifizierte Version (siehe 1.2.2) verwendet.

Nach Konditionierung der Dialysemembran im Puffer wurde das Unterteil der Dialysekammer aus dem Wärmeschrank genommen, mit 5 mL Puffer aus dem vortemperierten Reservoir befüllt und mit der Membran bedeckt. Dabei wurde darauf geachtet, dass möglichst keine Luftblasen zwischen der Membran und der Flüssigkeitsoberfläche eingeschlossen wurden und die Membran bündig auf dem inneren Rand des Unterteils zum Liegen kam. Der Positionierung der Dialysemembran folgten das augenblickliche Aufsetzen des Oberteils und die Fixierung durch zwei Federklammern. Um das Oberteil der Kammer mit Flüssigkeit zu füllen, wurde zunächst die Verbindung zum Reservoir geöffnet. Danach setzte man einen Pipettensauger im entleerten Zustand so an die Öffnung an der Oberseite der Kammer an, dass Flüssigkeit vom Reservoir in die Kammer gesaugt werden konnte. War die Kammer schließlich zu etwa 95 % gefüllt, wurde die endgültige Befüllung mit einer Mikroliterpipette (100 – 1000 µL) beendet. Hierzu wurde die Kammer leicht gekippt, damit die Öffnung der Kammer im höchsten

Teil der Kammer lag, und solange versucht, ein Volumen von 900 μL zu entnehmen, bis Flüssigkeit in der Pipettenspitze zu erkennen war. Bevor die Mikroliterpipette daraufhin entfernt wurde, wurde zunächst das Ventil geschlossen. Danach erfolgte der Verschluss der Dialysekammer.

Zur Visualisierung der Probenentnahme wurde nach Befüllung der Dialysekammer eine Spatelspitze (ca. 10 mg) des Farbstoffs *Fast Green FCF* in das Reservoir gegeben, der Puffer kurz mit Hilfe des Spatels umgerührt und die gesamte Dialyseapparatur für 15 Minuten bei 37 °C in den Wärmeschrank gestellt. Nach der Inkubation war der Farbstoff vollständig gelöst und das Reservoir wies eine gleichmäßig grüne Lösung auf. Für die Probenentnahme, die außerhalb des Wärmeschranks erfolgte, wurde bei der Mikroliterpipette vorerst ein Volumen von 500 μL eingestellt. Dieses Volumen entsprach dem angestrebten Sollvolumen der Proben während der geplanten Dialyseversuche. Nachdem der Verschluss der Dialyseapparatur durch die zur Volumenentnahme bereite Mikroliterpipette ersetzt war, wurde das Ventil zum Reservoir hin geöffnet. Im selben Augenblick wurde begonnen, das Probevolumen langsam in die Pipettenspitze zu ziehen. Die gefärbte Lösung ermöglichte es dann, zu beobachten, ob während der Probenentnahme zum einen ein Rückstrom von der Kammer in das Reservoir stattfinden und zum anderen das entnommene Volumen auch tatsächlich durch Flüssigkeit aus dem Reservoir ersetzt werden würde. Als Endpunkt der Probenentnahme wurde der Zeitpunkt definiert, zu dem kein sichtbarer Volumenstrom vom Reservoir in die Kammer mehr wahrnehmbar war. Analog zur Befüllung der Dialysekammer wurde auch am Ende der Probenentnahme zunächst das Ventil geschlossen und dann erst die Pipette durch den Verschluss ersetzt. Anschließend wurde die Dialyseapparatur wiederum für 15 Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Währenddessen wurde visuell kontrolliert, inwiefern und wie schnell sich unter diesen Bedingungen eine homogene Farbstofflösung innerhalb des Oberteils der Dialysekammer bildete.

1.3.1.2 Kalibrierung der Mikroliterpipette für die Probenentnahme

Der Aufbau und das Zusammensetzen der Dialyseapparatur, die für die Kalibrierungsversuche verwendet wurde, entsprachen größtenteils denen des vorangehenden Kapitels. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Testversuchen wurde allerdings bei allen Schritten anstelle des KRP-HEPES Millipore®-Wasser eingesetzt. Weiterhin wurde nicht das modifizierte Oberteil der Dialysekammer verwendet, sondern ein Kammeroberteil in die Apparatur eingebaut, wie es auch bei den Dialyseversuchen mit BDP zum Einsatz kommen würde. Auch auf die Temperierungsschritte im Wärmeschrank und die Zugabe eines Farbstoffes in das Reservoir wurde verzichtet.

Für die Kalibrierung der Mikroliterpipette musste das tatsächliche Probenvolumen bestimmt werden können. Hierzu wurde die Dialyseapparatur und ein bis zur Hälfte mit Millipore®-Wasser gefülltes 100 mL-Becherglas zunächst für 2 Stunden bei Raumtemperatur - Da eine konstante Temperierung des gesamten Raumes inklusive Analysenwaage auf 37 °C technisch nicht durchführbar war und die Probenentnahme bei den anstehenden Versuchen ebenfalls außerhalb des Wärmeschrankes erfolgen sollte, wurde auf eine Umgebungstemperatur von 37 °C bewusst verzichtet. - neben die Analysenwaage gestellt, um ein Gleichgewicht mit den Umgebungsbedingungen zu gewährleisten. Daraufhin wurde die Wassertemperatur im Becherglas gemessen und dieses in die Waage gestellt. Aufgrund der gemessenen Temperatur von 21 °C wurde für das Wasser eine Dichte von 0.997117 mg/mm³ angenommen [273]. Wurde nun eine Probe aus der Dialysekammer genommen, wurde diese direkt in das Becherglas überführt. Aus dem gemessenen Gewicht konnte dann nach *Formel 1* das Volumen berechnet werden. Die Probenentnahme erfolgte analog zu Punkt 1.3.1.1. Da aufgrund des verwendeten Oberteils aber kein Einblick mehr in die Vorgänge innerhalb der Kammer genommen werden konnte, musste für die Probenentnahme ein Zeitfenster festgelegt werden, nach dem der Volumenstrom vom Reservoir zur Kammer als beendet angesehen werden konnte. Unter Berücksichtigung der Erfahrungen aus den Testversuchen wurde daher nach vollständiger Entlastung des Kolbens der Mikroliterpipette noch 10 Sekunden gewartet, bevor man das Mehrwegeventil schloss.

Formel 1

$$V = \frac{m}{\rho}$$

ρ Dichte
 m Masse
 V Volumen

Ziel der Kalibrierung war ein effektives Probenvolumen von 500 μ L. Es wurden zunächst 5 verschiedene Volumeneinstellungen der Pipette getestet, wobei beginnend mit 500 μ L schrittweise um 5 μ L erhöht wurde. Je Einstellung wurden vier Proben vermessen. Aus den so gewonnenen Daten erhielt man schließlich ein vorläufiges Nennvolumen von 519 μ L. Um zu verifizieren, dass diese errechnete Einstellung auch tatsächlich das gewünschte Probenvolumen - innerhalb der vom Pipettenhersteller angegeben Fehlergrenzen – liefern würde, wurden mit dieser Einstellung 10 weitere Proben vermessen. Aus dieser Messreihe wurden anschließend gemäß *Formel 2* und *Formel 3* die systematische und zufällige Messabweichung berechnet und jene mit den Herstellerangaben abgeglichen.

Formel 2

$$e_s = \frac{(\bar{V} - 500 \mu\text{L})}{500 \mu\text{L}} \cdot 100\%$$

$$\bar{V} = \frac{1}{10} \cdot \sum_{i=1}^{10} V_i$$

Formel 3

$$e_z = \frac{s}{\bar{V}} \cdot 100\%$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{10} (V_i - \bar{V})^2}{9}}$$

e_s	systematische Messabweichung
e_z	zufällige Messabweichung
V_i	gemessenes Volumen der i-ten Probenentnahme

In allen folgenden Dialyseversuchen wurde für die Probenentnahme ausschließlich die auf diese Weise kalibrierte Mikroliterpipette in der Volumeneinstellung 519 μL verwendet.

1.3.2 Bestimmung der Auflösungs- und Umverteilungskinetik von Beclomethasondipropionat nach Freisetzung aus den handelsüblichen Dosieraerosolen Sanasthmax[®] und Ventolair[®]

Jeder Dialyseversuch zur Bestimmung der Auflösungs- und Umverteilungskinetik des BDP nach Freisetzung aus einem Dosieraerosol wurde als Parallelversuch mit dem Aufbau gemäß *Abbildung 13* durchgeführt, wobei immer beide Präparate gleichzeitig getestet wurden. In allen Dialyseversuchen enthielten die Kammerunterteile humanes Lungenhomogenat. Als Dialyseflüssigkeit wurden dagegen sowohl KRP-HEPES-Puffer als auch Plasma verwendet. Es wurden dabei mit jeder der beiden Flüssigkeiten drei Dialyseversuche durchgeführt.

1.3.2.1 Vorbereitung

Zwei Aliquots humanem Lungenhomogenats und falls benötigt ein Aliquot humanem Plasmas wurden bei RT aufgetaut. Wurde KRP-HEPES als Dialyseflüssigkeit eingesetzt, wurde dieser stets vor jedem Dialyseversuch frisch hergestellt. 35 mL der jeweils verwendeten Dialyseflüssigkeit wurden dann in das Reservoir überführt, das nach anschließendem Einführen des Kapillarschlauchs mit Parafilm verschlossen wurde. Die Dialyseapparatur wurde soweit zusammengesetzt, dass bereits die oberen Kammerhälften und das Reservoir an das Mehrwegeventil angeschlossen waren. Weiter wurden zwei Dialysemembranen, die vorher wie unter 1.3.1.1 bereits dargestellt zurechtgeschnitten worden waren, zunächst für 30 min bei RT in Millipore®-Wasser getaucht, danach wiederum mit frischem Millipore®-Wasser gewaschen und anschließend zum Äquilibrieren in die jeweilige Dialyseflüssigkeit gelegt. Alle hier aufgeführten Materialien und Reagenzien sowie die beiden Unterteile und Verschlüsse der Dialysekammern wurden dann für mindestens 45 Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank vorinkubiert.

1.3.2.2 Applikation der Dosis

Ein Kammerunterteil und ein Aliquot des Lungenhomogenats wurden dem Wärmeschrank entnommen. Nachdem das Unterteil mit etwa 2.5 g des Homogenats gleichmäßig befüllt worden war, wurde das Glasrohr der Applikationshilfe konzentrisch auf das Unterteil gestellt und der Deckel passend zu dem nun zu applizierenden Dosieraerosol aufgesetzt. Das entsprechende Dosieraerosol wurde für 10 sec kräftig geschüttelt und dessen Mundstück anschließend in die vorgesehene Öffnung eingefügt. Im Falle des Sanasthmax® wurde das Aerosol darauf kurz hintereinander zweimal betätigt. Bei Ventolair® hingegen wurden zuerst drei Sprühstöße abgegeben, danach wurde der Druckgasbehälter vom Mundstück abgenommen und dieser wieder für 10 sec kräftig geschüttelt. Nach dem Wiedereinsetzen des Behälters wurde das Aerosol nochmals zweimal betätigt. War der letzte Sprühstoß appliziert, wurde 120 sec lang gewartet, bevor die Applikationshilfe entfernt wurde, um dem Sprühnebel die Möglichkeit zu geben, auf das Homogenat abzusinken.

Anschließend wurde das restliche Lungenhomogenat des bereits verwendeten Aliquots in das Kammerunterteil gegeben und das Homogenat für 15 sec mit einem kleinen Spatel gut vermischt. Danach wurde die vorbereitete Dialyseapparatur dem Wärmeschrank entnommen und das befüllte Unterteil mit einem der Kammeroberteile vereinigt. Der Kammerverschluss wurde durch zwei Federklammern unterstützt. Nun konnte die Kammer mit der Dialyseflüssigkeit befüllt werden, indem die Flüssigkeit durch Unterdruck, der durch einen Pipettensauger an der Probenöffnung der Dialysekammer erzeugt wurde, in die Kammer

gesaugt wurde (siehe 1.3.1.1). Sobald die erste Flüssigkeit in den Pipettensauger gezogen wurde, wurde dieser entfernt und die Dialysekammer leicht schräg gehalten, so dass die Öffnung möglichst hoch lag. Daraufhin wurde mit der Mikroliterpipette solange versucht, Flüssigkeit aus der Kammer zu ziehen, bis keine Luft mehr gezogen wurde, sondern die erste Dialyseflüssigkeit in der Pipettenspitze stand. Analog zu den Vorversuchen wurde auch hier zunächst das Ventil geschlossen, bevor die Pipette nach dem Ansaugen von Flüssigkeit wieder aus der Öffnung entfernt wurde. Die Flüssigkeit wurde wie jene aus dem Pipettensauger verworfen.

Mit dem Verschluss des Ventils begann die Inkubationszeit von 360 min. Es wurde daher gleich im Anschluss die Probe für den Zeitpunkt 0 min der Inkubation genommen. Hierzu wurde die für die Volumenentnahme bereite Mikroliterpipette mit einer Volumeneinstellung von 519 μL wieder auf die Probenöffnung gesetzt. Nach dem Öffnen des Ventils wurde sofort begonnen, das Probenvolumen langsam aufzunehmen. Nach vollständiger Entlastung des Pipettenkolbens wurde bei KRP-HEPES als Dialyseflüssigkeit 10 sec und bei dem viskoserem Plasma 20 sec lang gewartet, bevor man das Ventil wieder schloss und die Pipette durch den Kammerverschluss ersetzte. Die Probe wurde in ein Zentrifugenglas überführt und dieses augenblicklich bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingelagert. Die Dialyseapparatur wurde zur Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wieder zurück in den Wärmeschrank gestellt.

Es folgte die Applikation des zweiten Dosieraerosols, die analog zu der Vorangegangenen verlief. Während der gesamten Versuchsreihe wurde die Applikation des BDP immer abwechselnd mit Sanasthmax[®] oder Ventolair[®] begonnen.

1.3.2.3 Ablauf der Dialyse

Die Probenentnahme aus der jeweiligen Dialysekammer wurde außerhalb des Wärmeschrankes vorgenommen und entsprach in ihrer Durchführung der oben dargelegten. Nach der Probenentnahme wurden die Proben sofort bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingelagert und die Apparatur wieder zur Inkubation in den Wärmeschrank zurückgestellt. Es wurden Proben 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 und 360 min nach Beginn der jeweiligen Inkubationszeit gewonnen.

Mit Beendigung der letzten Probenentnahme wurden sieben Aliquots der Dialyseflüssigkeit mit einem Volumen von 500 μL aus dem Reservoir in Zentrifugengläser abgefüllt. Sechs dieser Aliquots wurden zur Herstellung der Standards für die Kalibriergerade verwendet und einer diente als Leerwert-Kontrolle oder *Blank* der Matrix. Während der *Blank* sofort bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren wurde, wurden den anderen Aliquots zunächst BDP und dessen Metabolite 17-BMP, 21-BMP und B in bekannten Konzentrationen zugesetzt, bevor sie ebenfalls bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingelagert wurden. Die Zugabe der Glucorticoide

erfolgte durch Zupipettieren der erforderlichen Menge Standardlösung V1, V2 oder V3. Die einzelnen Konzentrationen der Glucocorticoide in den sechs Kalibrierstandards können *Tabelle 1* entnommen werden.

Tabelle 1: Glucocorticoid-Konzentrationen der einzelnen Kalibrierstandards für die Dialyseversuche zur Bestimmung der Auflösungs- und Umverteilungskinetik von BDP in Abhängigkeit der verwendeten Dialyseflüssigkeit

KRP-HEPES-Puffer					Humanes Plasma				
Bezeichnung des Standards	Konzentration (ng/mL)				Bezeichnung des Standards	Konzentration (ng/mL)			
	BDP	17-BMP	21-BMP	B		BDP	17-BMP	21-BMP	B
S1	20	20	20	20	S1	20	20	20	20
S2	50	50	50	50	S2	100	100	100	100
S3	150	150	150	150	S3	200	200	200	200
S4	300	300	300	300	S4	400	400	400	400
S5	600	600	600	600	S5	800	800	800	800
S6	1000	1000	1000	1000	S6	1500	1500	1500	1500

1.3.3 Bestimmung der applizierten Dosis

Es wurde der Anteil der Dosis bestimmt, der tatsächlich bei der Applikation des BDP während eines Dialyseversuches in das Lungenhomogenat gelangte. Hierzu wurde das Unterteil einer Dialysekammer mit 2.5 mL eines frisch hergestellten KRP-HEPES-Puffers befüllt, zu dem zusätzlich 150 µL der methanolischen Stammlösung von FP als interner Standard gemischt wurden. Danach wurde mit Hilfe der Applikationshilfe die übliche Nominaldosis von 500 µg BDP aus einem der untersuchten Dosieraerosole verabreicht, wobei methodisch wie bei einem normalen Dialyseversuch (siehe 1.3.2.2) vorgegangen wurde. Nach dem Entfernen der Applikationshilfe wurden weitere 2.5 mL KRP-HEPES in das Kammerunterteil pipettiert und der Puffer für 15 sec mit einem kleinen Spatel umgerührt. Das Unterteil wurde anschließend in den Wärmeschrank gestellt, dort mit einer Schale abgedeckt und bei 37 °C für 15 min stehen gelassen. Anschließend wurde der Puffer möglichst quantitativ zu gleichen Teilen in zwei Zentrifugengläser überführt und das nun leere Unterteil zweimal hintereinander mit 2 mL Diethylether ausgespült. Der Ether wurde ebenfalls gleichmäßig auf diese Zentrifugengläser

verteilt. Die so gewonnen Proben wurden schließlich bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert. Pro Präparat wurden drei Dosisbestimmungen durchgeführt.

Zur Generierung einer Kalibriergeraden wurden Standards hergestellt, deren Konzentration einer vom KRP-HEPES aufgenommenen Menge BDP von 10, 50, 150, 300 oder 500 µg entsprachen. Es wurden dazu pro Konzentration zwei Zentrifugengläser mit je 2.5 mL Puffer und 1.5 mL Ether befüllt. Danach wurden den Inhalten der beiden Zentrifugengläser in gleichen Teilen 150 µL der Stammlösung von FP und eine der angestrebten Konzentration entsprechenden Menge der methanolischen Stammlösung von BDP zugesetzt. Die so erhaltenen Kalibrierstandards wurden bei -20 °C eingelagert. Als Leerwert-Kontrolle der Matrix (*Blank*) diente eine Mischung aus 5 mL Puffer, 3 mL Ether und 150 µL reinem Methanol, die gleichermaßen auf zwei Zentrifugengläser aufgeteilt und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert wurde.

1.4 Bestimmung der Glucocorticoidkonzentrationen in den einzelnen Proben

1.4.1 Probenaufbereitung

1.4.1.1 Dialyseversuch

Die Kalibrierstandards, Proben aus den Dialyseversuchen und die Leerwert-Kontrolle wurden bei RT aufgetaut. Bei Versuchen mit Plasma als Dialyseflüssigkeit wurden die Proben, die zu den Inkubationszeitpunkten 180, 240 und 360 min entnommen wurden, nach Erreichen der RT im Verhältnis 1 : 1 mit Plasma verdünnt, da hier GC-Konzentrationen zu erwarten waren, die außerhalb des Kalibrierbereichs lagen. Danach wurden den Kalibrierstandards und den Dialyseproben 50 µL der Verdünnung V1 von FP als internen Standard und dem *Blank* 50 µL MeOH zupipettiert. Die Mischungen wurden direkt nach Zugabe der methanolischen Lösungen kurz auf dem Vortex vermengt.

Anschließend wurde zweimal mit Diethylether extrahiert. Hierzu wurden die Proben pro Extraktionszyklus mit 2 mL Ether versetzt, für 15 min an das Mischräd gehängt und bei ca. 3000 Upm 5 min lang zentrifugiert. Die organischen Phasen beider Extraktionsschritte wurden vereinigt und bei 30 °C unter einem leichten, kontinuierlichen Gasstrom aus Stickstoff bis zur Trockne eingengt. Zur Quantifizierung mittels HPLC wurden die resultierenden Rückstände in 200 µL MeOH aufgenommen und sofort vermessen.

1.4.1.2 Dosisbestimmung

Alle Standards und Proben zur Bestimmung der tatsächlich applizierten Dosis wurden zunächst bei RT aufgetaut. Nach Temperierung auf RT wurden zusätzlich 2 mL Ether zugegeben, bevor die Zentrifugengläser für 20 min an das Mischrad gehängt und anschließend für 5 min bei ca. 3000 Upm zentrifugiert wurden. Die jeweilige Etherphase wurde abgenommen und durch 3 mL frischen Ether ersetzt. Es folgte ein weiterer Extraktionsschritt analog zu dem oben beschriebenen, wonach die organischen Phasen beider Extraktionszyklen vereinigt und anschließend bei 30 °C unter Stickstoffbegasung bis zur Trockne eingeeengt wurden.

Für die Bestimmung des BDP-Gehaltes wurde der Rückstand aus der organischen Phase zunächst in 1000 µL MeOH aufgenommen. Die resultierende Lösung wurde daraufhin im Verhältnis 1 : 20 mit MeOH verdünnt. Nachdem die erste Verdünnung auf dem Vortex gut durchmischt worden war, wurden 20 µL dieser Verdünnung in ein Probegläschen überführt und dort mit MeOH auf ein Volumen von 200 µL ergänzt. Das Probegläschen wurde sofort zur Analyse per HPLC in den Probengeber überführt.

1.4.2 Quantifizierung mittels HPLC

Die chromatographische Trennung der einzelnen Komponenten einer Analyse erfolgte bei einem Fluss von 1 mL/min mittels Gradientenelution (siehe *Tabelle 2*). Als Fließmittel wurde dabei ein Gemisch aus zwei Komponenten verwendet. Komponente A setzte sich aus 0.2 % (V/V) Essigsäure in Millipore®-Wasser zusammen und Komponente B bestand aus Acetonitril (MeCN). Es wurden jeweils 20 µL einer Probe injiziert, wobei während der gesamten Analyse die Probegläschen im Autosampler auf 10 °C, die analytische Säule im Säulenofen auf 25 °C temperiert wurden. Zur Detektion der eluierten Substanzen wurde die Absorption der mobilen Phase bei 254 nm gemessen.

Tabelle 2: Zeitlicher Verlauf der Gradientenanalyse einer Probe in Abhängigkeit von der Matrix, aus der die Probe extrahiert wurde.

Puffer			
Zeitpunkt nach Injektion der Probe (min)	Anteil Komponente A (%)	Anteil Komponente B (%)	Vorgang
0	60	40	Linearer Gradient
30	29	71	
31	0	100	Spülen der analytischen Säule
40	0	100	
41	60	40	Äquilibrierung der analytischen Säule
50	60	40	
Plasma			
Zeitpunkt nach Injektion der Probe (min)	Anteil Komponente A (%)	Anteil Komponente B (%)	Vorgang
0	62	38	Nichtlinearer Gradient
22	53	47	
40	28	72	Linearer Gradient
41	0	100	Spülen der analytischen Säule
50	0	100	
51	62	38	Äquilibrierung der analytischen Säule
60	62	38	

Die Auswertung der erhaltenen Chromatogramme erfolgte durch Bestimmung der Peakflächen bei den Retentionszeiten der einzelnen Glucocorticoide und anschließender Bildung des Flächenverhältnisses Substanz zu internem Standard. Es konnte dann aus den Messwerten der Standards eine Kalibriergerade durch lineare Regression der Wertepaare Flächenverhältnis und eingesetzter Konzentration erstellt werden. Um die Glucocorticoidkonzentrationen in den Dialyseproben zu berechnen, wurden schließlich die Flächenverhältnisse aller Substanzpeaks in die entsprechende Geradengleichung eingesetzt und diese nach der unbekannt Konzentration aufgelöst.

1.5 Auswertung

Für den zeitlichen Konzentrationsverlauf von BDP und dessen Metaboliten 17-BMP, 21-BMP und B im Dialysat wurden zu allen Probenentnahmezeitpunkten die jeweiligen arithmetischen Mittelwerte aus den drei unabhängigen Versuchsansätzen gebildet. Als Streuungsmaß wurde aufgrund der geringen Versuchsanzahl die mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert (MabwM) berechnet [274]. Dieselben Parameter wurden auch bei der Bestimmung der tatsächlich applizierten Dosis verwendet.

Um die Dialyseverläufe der beiden getesteten Dosieraerosole besser vergleichen zu können, wurde aus den ermittelten Glucocorticoidkonzentrationen für jeden Entnahmezeitpunkt der Anteil der applizierten Dosis (D_i) berechnet, der bis zu diesem Zeitpunkt in die verwendete Dialyseflüssigkeit übergegangen war. Hierzu wurde zunächst sowohl die Menge an untersuchten Glucocorticoiden bestimmt, die sich während der i -ten Probenentnahme im gesamten Dialysat (A_i^{gesamt} , *Formel 4*) befand, als auch diejenige, die durch diese Probenentnahme aus dem Dialysat (A_i^{entfernt} , *Formel 5*) entfernt wurde. Die Glucocorticoidmengen wurden dabei auf die äquivalente Menge an Muttersubstanz umgerechnet.

Formel 4

$$A_i^{\text{gesamt}} = \left(c_i^{\text{BDP}} + c_i^{17\text{-BMP}} \cdot \frac{\text{MW}_{\text{BDP}}}{\text{MW}_{17\text{-BMP}}} + c_i^{21\text{-BMP}} \cdot \frac{\text{MW}_{\text{BDP}}}{\text{MW}_{21\text{-BMP}}} + c_i^{\text{B}} \cdot \frac{\text{MW}_{\text{BDP}}}{\text{MW}_{\text{B}}} \right) \cdot V_{\text{KO}}$$

$$V_{\text{KO}} = \frac{d^2}{4} \cdot h \cdot \pi$$

c_i^{GC}	Konzentration des benannten Glucocorticoids in der i -ten Probe
d	Innendurchmesser des Kammeroberteils
h	Innenraumbhöhe des Kammeroberteils
MW_{GC}	Molekulargewicht des benannten Glucocorticoids
V_{KO}	Volumen des Kammeroberteils

Formel 5

$$A_i^{\text{entfernt}} = A_i^{\text{gesamt}} \cdot \frac{V_{\text{Probe}}}{V_{\text{KO}}}$$

V_{Probe} Probenvolumen

Wurde anschließend als Wert für die tatsächlich applizierte Dosis ($D_{\text{appliziert}}$) der Mittelwert aus den drei unabhängigen Versuchen zur Dosisbestimmung herangezogen, konnte D_i gemäß *Formel 6* ermittelt werden.

Formel 6

$$i = 1: D_i = \frac{A_i^{\text{gesamt}}}{D_{\text{appliziert}}} \cdot 100 \%$$

$$i > 1: D_i = \frac{A_i^{\text{gesamt}} + \sum_{j=2}^i A_{j-1}^{\text{entfernt}}}{D_{\text{appliziert}}} \cdot 100 \%$$

Analog wurden auch die Konzentrationsverläufe der einzelnen Substanzen in Abhängigkeit von der applizierten Dosis dargestellt. Die erhaltenen Werte können dann als der Anteil der Dosis (D_i^{GC}) interpretiert werden, der zum Zeitpunkt der Probenentnahme in der bezeichneten Verbindung (= GC) vorlag. Für die Bestimmung dieser Werte musste *Formel 6* nur dahingehend verändert werden, dass A_i^{gesamt} und A_i^{entfernt} durch die Terme A_i^{GC} bzw. $A_i^{\text{GCentfernt}}$ (siehe *Formel 7*) ersetzt werden:

Formel 7

$$A_i^{\text{GC}} = c_i^{\text{GC}} \cdot \frac{MW_{\text{BDP}}}{MW_{\text{GC}}} \cdot V_{\text{KO}}$$

$$V_{\text{KO}} = \frac{d^2}{4} \cdot h \cdot \pi$$

$$A_i^{\text{GCentfernt}} = A_i^{\text{GC}} \cdot \frac{V_{\text{Probe}}}{V_{\text{KO}}}$$

Auch bei den transformierten Daten wurden zu jedem Probenentnahmezeitpunkt das arithmetische Mittel und die MAbwM aus den drei unabhängigen Versuchen berechnet.

2 *In-vitro*-Untersuchung zur pulmonalen Absorption inhalativ applizierter Glucocorticoide am humanen Lungenperfusionmodell

2.1 Verwendete Reagenzien

2.1.1 Substanzen

Bovines Serumalbumin (BSA, Typ H1) und Dextran 70 000 (Pharmazeutische Qualität) wurden von GERBU (Gaiberg, Deutschland) und Glucose Monohydrat von Gruessing (Filsum, Deutschland) erworben. Ein antibiotikahaltiges Konzentrat, das Penicillin G zu 10 000 IU/mL und Streptomycin zu 10 000 µg/mL in physiologischer Kochsalzlösung enthält, wurde von Biochrom (Berlin, Deutschland) bezogen. Die Bezugsquellen aller weiteren verwendeten Chemikalien können dem vorangegangenen Kapitel (siehe 1.1.1) entnommen werden.

2.1.2 Lösungen

2.1.2.1 Perfusionspuffer (I)

Die Zusammensetzung des verwendeten Perfusionspuffers lehnte sich größtenteils an den von Mürdter und Kollegen 1997 beschriebenen Puffer an [113]. Zur Herstellung des Perfusionspuffers wurden die Substanzen zunächst für folgende Endkonzentrationen eingewogen.

BSA	5 % (m/V)
Calciumchlorid Dihydrat	2.5 mM
Dextran 70 000	2 % (m/V)
Glucose Monohydrat	5.5 mM
Kaliumchlorid	3.5 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	2.5 mM
Magnesiumsulfat Hexahydrat	1.18 mM
Natriumchlorid	85 mM
Natriumhydrogencarbonat	20 mM

Nach dem Auflösen der Substanzen in ca. 900 mL Millipore®-Wasser wurden der Lösung 500 µL des antibiotikahaltigen Konzentrates zugesetzt und der Puffer mit einer 10%igen (m/V)

Natriumhydrogencarbonat-Lösung auf einen pH-Wert von 7.4 eingestellt. Zuletzt wurde das Volumen mit Millipore®-Wasser auf 1000.0 mL ergänzt.

2.1.2.2 Standardlösungen für die Quantifizierung

➤ *Interner Standard*

Als Stammlösung für die Zugabe des internen Standards wurde eine Lösung von Fluticasonpropionat mit einer Konzentration von 1 mg/mL in MeOH hergestellt. Diese Stammlösung wurde mit MeOH bis zu einer Konzentration von 300 ng/mL verdünnt (Verdünnung V1). Die Stammlösung und Verdünnungen wurden bei -20 °C gelagert.

➤ *Kalibrierstandards*

Zur Erstellung der Kalibrierlösungen wurde jeweils für BDP, 17-BMP, 21-BMP und B eine Stammlösung in MeOH hergestellt, die das entsprechende Glucocorticoid in einer Konzentration von 1 mg/mL enthielt. Die unten aufgeführten Arbeitslösungen V1, V2-1, V2-2, V3-1 und V3-2 wurden aus Verdünnungen dieser vier Stammlösungen mit MeOH erhalten:

V1 enthielt BDP, 17-BMP, 21-BMP und B jeweils in einer Konzentration von 500 ng/mL.

V2-1 enthielt BDP und 17-BMP jeweils in einer Konzentration von 100 ng/mL.

V2-2 enthielt 21-BMP und B jeweils in einer Konzentration von 250 ng/mL.

V3-1 enthielt BDP und 17-BMP jeweils in einer Konzentration von 20 ng/mL.

V3-2 enthielt 21-BMP und B jeweils in einer Konzentration von 80 ng/mL.

Die Stammlösungen und Verdünnungen wurden bei -20 °C gelagert.

2.2 Verwendete Geräte und Materialien

2.2.1 Humanes Gewebe

Es wurden sechs Patienten, die sich im Rahmen der üblichen Therapie eines Lungenkarzinoms in der Klinik Schillerhöhe, Gerlingen, Deutschland, einer Lobektomie unterziehen mussten, in die Studie aufgenommen. Patienten, die in den letzten vier Wochen vor der Operation mit Glucocorticoiden behandelt worden waren oder deren Tumor innerhalb des Lungenlappens nicht peripher lokalisiert war, wurden ausgeschlossen. Die Perfusion des Lungenlappens erfolgte nur nach Vorliegen einer Einverständniserklärung des Patienten und wurde in

räumlicher Nähe zum Operationssaal durchgeführt. Nach Beendigung des Versuches wurde der Lungenlappen sofort den üblichen, pathologischen Routineuntersuchungen zugeführt. Genehmigt wurde das vorliegende Studienprotokoll von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Deutschland.

2.2.2 Humanes Lungenperusionsmodell

Zum Vergleich des Verlaufs der pulmonalen Absorption von BDP nach Applikation von Sanasthmax[®] oder Ventolair[®] wurde ein von Linder und Kollegen [41] beschriebenes isoliertes humanes Lungenperusionsmodell (siehe *Abbildung 14*) modifiziert. Bei diesem Modell wird nach einer routinemäßigen Lobektomie für den entnommenen Lungenlappen eine möglichst physiologische Umgebung wiederhergestellt, in der sowohl die Blutzirkulation als auch die Atemtätigkeit simuliert werden können.

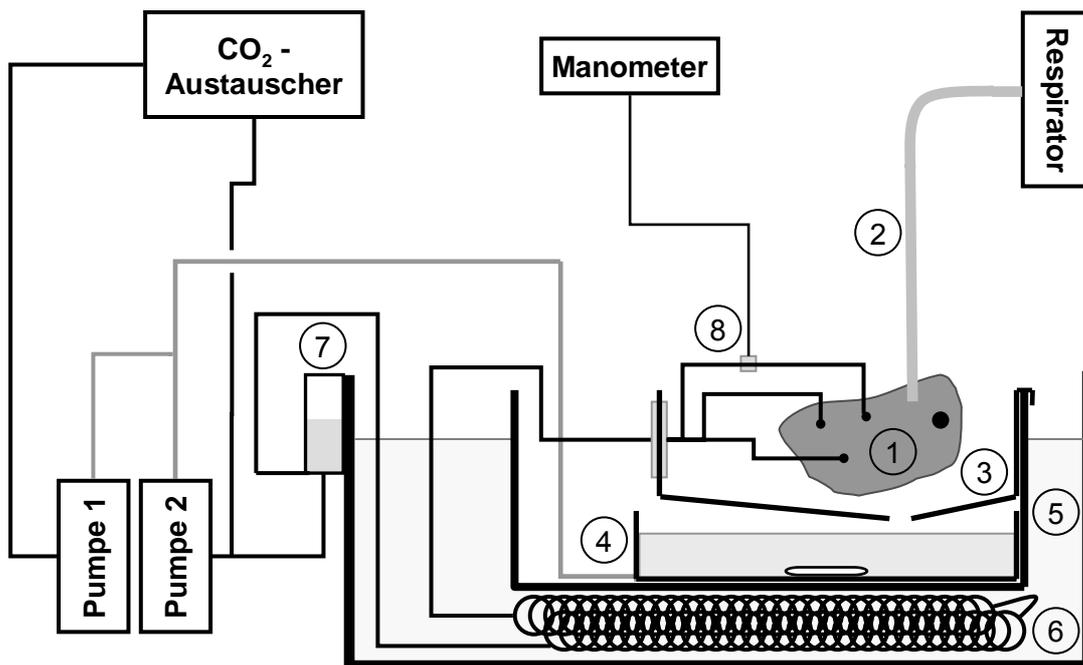


Abbildung 14: Schematischer Aufbau des humanen Lungenperusionsmodells nach [41]: Leitungen des Perfusionskreislaufes, in denen der Puffer aus dem Flüssigkeitsreservoir in die Pumpen gesaugt wird, sind grau, diejenigen, die den Puffer Richtung Lungenlappen leiten, schwarz hinterlegt. [1) Präparierter Lungenlappen mit katheterisierten Arterien, offener Vene und anastomisiertem Bronchus; 2) Verbindung des anastomisierten Bronchus mit dem Respiратор; 3) Auffangbehälter für die aus der offenen Vene tropfende Perfusionsflüssigkeit; 4) Reservoir mit Rührfisch; 5) Wasserbad (37 °C); 6) Wärmeaustauscher; 7) Luftfalle; 8) Messung des arteriellen Perfusionsdruckes]

Die Perfusion des Gefäßsystems erfolgt hierbei durch ein halb offenen Kreislauf, bei dem eine Pufferlösung unter physiologischen Druck- und Flussgeschwindigkeitsverhältnissen in die katheterisierten Arterien des Lungenlappens gepumpt wird, das Gewebe dann über die offene Vene wieder verlässt und so durch einen Sammelbehälter wieder in den Pumpenkreislauf gelangt. Die Beatmung erfolgt über den Anschluss des anastomisierten Bronchus an ein handelsübliches Beatmungsgerät.

Während in der Originalarbeit [41] eine kontinuierliche Messung sowohl der Konzentration an Natrium-, Kalium- und Hydrogencarbonationen als auch des pH-Wertes im Perfusionspuffer beschrieben wurde, konnten in dieser Studie lediglich punktuell die Hydrogencarbonationenkonzentration und der pH-Wert kontrolliert werden. Hierzu wurden pro Messpunkt ca. 300 μL des Perfusionspuffers aus dem Reservoir entnommen und mit dem Blutgasanalysator ABL[®] 510 (Radiometer, Willich-Schiefbahn, Deutschland) augenblicklich vor Ort analysiert.

Für die Applikation des Dosieraerosols wurde weiterhin zwischen Respirator und anastomisiertem Bronchus eine Applikationshilfe (siehe *Abbildung 15*) installiert, die eigens für diesen Zweck entworfen und beim Glasbläser des Instituts für Organische Chemie der Universität Würzburg in Auftrag gegeben wurde. Die Anschlüsse zum Einbau in den Beatmungsweg wurden in der institutseigenen Werkstatt angefertigt. Um nach Abgabe eines Sprühstoßes den Transport des Aerosols im Luftstrom Richtung Lungenlappen zu gewährleisten, wurde außerdem in eigener Arbeit ein geeigneter Adapter für die getesteten Dosieraerosole konstruiert.

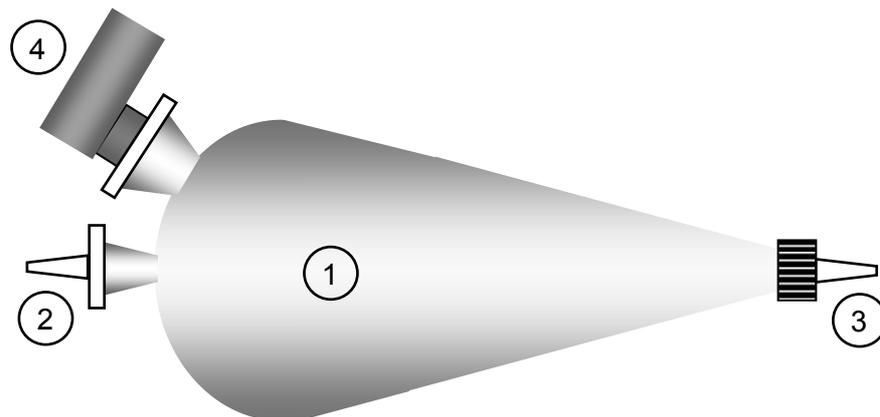


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Applikationshilfe: 1) Keulenförmiger, hohler Grundkörper aus Glas mit zwei Schliiffanschlüssen (NS 14/23 und NS 29/32) und einem Schraubgewinde (GL 18) [Volumen: 710 mL, Gesamtlänge: 280 mm, breiteste Stelle: 96 mm, schmalste Stelle: 15.5 mm]; 2) Anschluss an Normschliiff NS 14/23 für die Verbindung zum Respirator; 3) Anschluss an Schraubgewinde für die Verbindung zum Bronchus; 4) Anschluss des Dosieraerosol-Adapters an Normschliiff NS 29/32.

Hierzu wurden zunächst zwei hohle Plastikstopfen NS 29/32 auf beiden Seiten entlang des gesamten Umfangs aufgeschnitten. In den so entstandenen Röhren wurden anschließend jeweils die Mundstücke der beiden Fabrikate derart befestigt, dass sich bei einer Aktivierung des Dosieraerosols der Sprühstoß geradlinig vom Adapter in die Applikationshilfe ausbreiten konnte. Damit bei der Beatmung des Lungenlappens keine Luft über den Adapter entweichen konnte, was einen Verlust des Beatmungsdruckes und somit der effektiven Belüftung des Gewebes zur Folge gehabt hätte, wurden zusätzlich alle Zwischenräume innerhalb des Adapters auf Höhe der Sprühdüse des Mundstückes bis auf die Düsenöffnung selber luftdicht verschlossen.

2.2.3 HPLC-Systeme

2.2.3.1 UV-Detektion

Es wurde hier dieselbe Anlage wie bei den Dialyseversuchen (siehe 1.2.3) verwendet.

2.2.3.2 Detektion mittels Massenspektrometrie

Degaser	Vakuum-Degaser der 1100er Serie (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland);
Pumpe	Pumpe für binäre Hochdruckgradienten mit analytischem Pumpenkopf der 1100er Serie (Agilent Technologies);
Probengeber	Standardprobengeber der 1100er Serie mit integriertem Kühler und Heizer (Agilent Technologies);
Analytische HPLC-Säule	Symmetry [®] C18, 150 x 4.6 mm, 5 µm Partikel (Waters, Milford, USA);
Detektor	Massenspektrometer LC/MSD Trap SL mit ESI-Interface (Agilent Technologies);
Steuerung und Datenverarbeitung	ChemStation-for-LC-3D [®] und LC/MSD-Trap [®] Version 4.2 (Agilent Technologies);

2.2.4 Sonstige Geräte und Materialien

Messzylinder	FORTUNA® Messzylinder 10 ± 0.2 mL (Poulten & Graf, Wertheim, Deutschland);
Pasteurpipette	Einweg-Pipette aus Polyethylen, unsteril, 7.7 mL, 150 mm lang (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland);
Probengefäß	Glas-Kulturröhrchen mit Rundboden, DIN-Gewinde GL 18 und Schraubkappe (A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland);

Alle weiteren, verwendeten Geräte oder Materialien können dem Punkt 1.2.4 des vorangegangenen Kapitels entnommen werden.

2.3 Durchführung der Versuche am humanen Lungenperfusionsmodell

2.3.1 Reperfusion und Beatmung des resezierten Lungenlappens

Bereits während der Lobektomie wurde der Perfusions- und Beatmungskreislauf vorbereitet, um die Zeit zwischen vollständiger Resektion und Reperfusion des Gewebes möglichst zu minimieren. Hierzu wurden das Wasserbad auf 37 °C temperiert, das Flüssigkeitsreservoir mit 1.5 L Perfusionspuffer (I) befüllt und die Applikationshilfe mit dem Beatmungsgerät verbunden. Zum Vorwärmen des Puffers zirkulierte die Perfusionslösung bis zum Anschluss des Lungenlappens im halboffenen Kreislauf.

Nach Präparation des entnommenen Lungenlappens wurde zunächst dessen Gefäßsystem mit 500 mL Perfusionspuffer (I) gespült. Die untemperierte Waschlösung wurde dabei mit etwa 50 mL/min von einem separaten Pumpensystem ohne Rückfluss gefördert und anschließend verworfen. Danach wurden der Lappen gewogen und sowohl Gewicht als auch Art und Anzahl aller bis dahin vorhandener Anschlüsse dokumentiert. Nun konnten der anastomosierte Bronchus mit der Applikationshilfe verbunden, so dass der Lungenlappen frei schwebend knapp über dem Boden des Auffangbehälters hing, und die katheterisierte/n Arterie/n an den Perfusionskreislauf angeschlossen werden. Die Beatmung des Lappens erfolgte bei einem durchschnittlichen Atemzugsvolumen von 358 mL (240-480 mL) und einem durchschnittlichen Atemminutenvolumen von 2.8 L/min (2.0-3.6 L/min). Hierbei trat im Mittel ein maximaler Respirationsdruck von 35 mbar (27-42 mbar) auf. Zur Perfusion des Gefäßsystems

wurde ein durchschnittlicher Fluss von 109 mL/min (40-230 mL/min) angelegt, der einen mittleren arteriellen Perfusionsdruck von 39 mmHg (10-60 mmHg) erzeugte. Der erfolgreichen Etablierung der Reperfusion und Beatmung des Lungenlappens schloss sich eine mindestens 5 min lange Äquilibrationsphase des Systems an. Am Ende dieser Phase wurden direkt aus dem venösen Ausstrom 5 mL Perfusionspuffer als Leerwert-Kontrolle (*Blank*) mittels Messzylinder abgemessen, von dort in ein Probengefäß überführt und dieses wiederum bis zur Einlagerung bei -20 °C am eigenen Institut auf Trockeneis gelegt. Das entnommene Probenvolumen wurde durch frischen Perfusionspuffer (I) (siehe 2.1.2.1), der in das Reservoir gegeben wurde, ersetzt.

2.3.2 Applikation der Dosis

Während der Äquilibrationsphase des Systems wurde das zu untersuchende Präparat zunächst kräftig geschüttelt und anschließend dreimal aktiviert. Daraufhin wurde der Druckbehälter vom Mundstück getrennt und in den Adapter der Applikationshilfe (siehe *Abbildung 15*) eingesetzt. Nach Beendigung der Probenentnahme für die Leerwert-Kontrolle wurde das Atemzugvolumen auf das 1.5-Fache des Wertes, der während der Etablierung der Reperfusion und Beatmung des Lungenlappens eingestellt wurde, erhöht und vor der Applikation des ersten Sprühstoßes mindestens zwei Atemzüge lang gewartet. Die Aktivierung des Dosieraerosols erfolgte dann am Ende der Expirationsphase, wo praktisch kein Luftstrom in Richtung des Beatmungsgerätes mehr beobachtet werden konnte. Da eine äquivalente Dosis von 500 µg BDP *ex-valve* verabreicht werden sollte, musste das Dosieraerosol Sanasthmax[®] zweimal und Ventolair[®] fünfmal appliziert werden. Zwischen zwei aufeinander folgenden Sprühstößen lagen ebenfalls zwei Atemzüge. Nach Abgabe der letzten Teildosis wurde wiederum zwei Atemzüge lang abgewartet, bevor analog zur Leerwert-Kontrolle eine 5mL-Probe entnommen wurde, die den Zeitpunkt 0 min markierte. Direkt im Anschluss daran wurde das Atemzugvolumen auf den ursprünglichen Wert zurückgesetzt. Vor der nächsten Probenentnahme wurde zwischen zwei Inspirationsphasen der Adapter für das verwendete Dosieraerosol an der Applikationshilfe durch einen normalen Schliffstopfen NS 29/32 ersetzt.

2.3.3 Bestimmung der pulmonalen Absorption von Beclomethasondipropionat nach Freisetzung aus den handelsüblichen Dosieraerosolen Sanasthmax[®] und Ventolair[®]

Abhängig von der maximalen Laufzeit des jeweiligen Experimentes wurden 10, 20, 30, 45, 60, 80 und 100 Minuten nach dem Zeitpunkt 0 min Proben aus dem venösen Ausgang des Lungenlappens entnommen. Die Methodik der Probengewinnung und das Probenvolumen entsprachen dem bereits dargelegten Verfahren während der Entnahme der Leerwert-Kontrolle.

Das Ende der Beatmung und Reperfusion des Lungenlappens wurde bei jedem Experiment individuell festgelegt. Ausschlaggebend für den Abbruch des Experimentes war die Bildung eines signifikanten Ödems, das durch eine Gewichtszunahme des Lungenlappens von über 50 % des Startgewichtes (siehe 2.3.1) definiert wurde. Um möglichst physiologische Bedingungen aufrecht zu erhalten und gleichzeitig die anschließenden pathologischen Untersuchungen nicht zu beeinflussen, sollte eine Ödembildung weitestgehend vermieden werden. Da eine Bestimmung des Gewichtes während der Perfusion nicht möglich war, lag die Entscheidung über die Beendigung der Perfusion beim Experimentator. Bei der Entscheidungsfindung wurden die visuell bestimmte Abnahme des Flüssigkeitsspiegels im Reservoir, sicht- und tastbare Veränderungen in der Beschaffenheit des Lungengewebes und die Entwicklung des Beatmungs- und Perfusionsdruckes während des Versuches berücksichtigt. Nach erfolgtem Versuchsabbruch wurde der Lungenlappen einschließlich aller gemäß 2.3.1 dokumentierten Anschlüsse gewogen und die prozentuale Gewichtszunahme bestimmt. Die Applikationshilfe bestehend aus Glaskörper, den Anschlüssen für die Beatmungsschläuche, dem Adapter für das untersuchte Dosieraerosol und dem Verbindungsschlauch zum Bronchus wurde unverändert verpackt und zur späteren Dosisbestimmung bei RT ans eigene Institut transportiert.

Für die quantitative Analyse von BDP und dessen Metaboliten 17-BMP, 21-BMP und B in der Perfusionsflüssigkeit wurden am Tag des Experimentes sechs Kalibrierstandards hergestellt. Hierzu wurden sechs Aliquots zu je 1 mL Perfusionspuffer (I) mit definierten Mengen an Standardlösungen (siehe 2.1.2.2) versetzt, am Vortex vermischt und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C eingelagert. Die resultierenden Konzentrationen der einzelnen Glucocorticoide in den Standards können *Tabelle 3* entnommen werden.

Tabelle 3: Glucocorticoid-Konzentrationen der einzelnen Kalibrierstandards für die Bestimmung der pulmonalen Absorption von Beclomethasondipropionat nach Freisetzung aus handelsüblichen Dosieraerosolen am humanen Lungenperfusionsmodell

Bezeichnung des Standards	Konzentration (ng/mL)			
	BDP	17-BMP	21-BMP	B
S1	0.4	0.4	1	1
S2	1.5	1.5	3	3
S3	3	3	5	5
S4	5	5	7.5	7.5
S5	10	10	10	10
S6	15	15	15	15

2.4 Quantitative Analyse der pulmonalen Absorption

2.4.1 Bestimmung der unbekanntenen Glucocorticoidkonzentrationen in der Perfusionsflüssigkeit

2.4.1.1 Probenaufbereitung

Die Proben aus der Perfusionsflüssigkeit und die entsprechenden Kalibrierstandards (siehe 2.3.3) wurden zunächst bei RT aufgetaut und anschließend je 1 mL der Perfusionsproben zur Analyse in Zentrifugengläser überführt. Danach wurden die Leerwert-Kontrolle mit 25 μ L MeOH, alle weiteren Proben mit je 25 μ L der Verdünnung V1 des internen Standards (siehe 2.1.2.2) versetzt und für wenige Sekunden auf dem Vortex geschüttelt. Die Extraktion der Analyten aus der Probenmatrix erfolgte durch Zugabe von je 3 mL Diethylether, wobei das Gemisch für 15 min am Mischrad verweilte, bevor es für 5 min bei ca. 3000 U/min zentrifugiert und darauf folgend die organische Phase in einen 5mL-Spitzkolben überführt wurde. Die Extraktion wurde ein zweites Mal wiederholt und die vereinigten Etherphasen bei 30 °C unter einem leichten, kontinuierlichen Gasstrom aus Stickstoff beinahe bis zur Trockne eingengt. Vor der vollständigen Entfernung des Extraktionsmittels wurden die Kolbenränder nochmals mit 750 μ L Ether gespült. Die resultierenden Rückstände wurden dann in 50 μ L MeOH aufgenommen und sofort mittels HPLC vermessen.

2.4.1.2 Quantifizierung mittels HPLC-MS/MS

Nach Injektion von 25 µL einer Probe, die im Autosampler konstant auf 10 °C temperiert wurde, wurden die einzelnen Komponenten der Analyse mittels Gradientenelution (siehe *Tabelle 4*) bei RT chromatographisch getrennt.

Tabelle 4: Zeitlicher Verlauf der Gradientenanalyse

Zeitpunkt nach Injektion der Probe (min)	Anteil Komponente A (%)	Anteil Komponente B (%)	Fluss (mL/min)	Vorgang
0	50	50	0.6	Lineare Gradienten
8	35	65	0.6	
12	30	70	0.6	
20	20	80	0.6	
21	0	100	0.8	Spülen der analytischen Säule
33	0	100	0.8	
34	50	50	0.6	Äquilibrierung der analytischen Säule
40	50	50	0.6	

Komponente A: 0.1% (V/V) Ameisensäure in Millipore®-Wasser
 Komponente B: Acetonitril

Die anschließende Überführung der Verbindungen in die Gasphase unter gleichzeitiger positiver Ionisation erfolgte im ESI-Interface bei einer Kapillarspannung von -4.5 kV. Die Verneblung wurde pneumatisch bei einem Druck von 50 psi, die Entfernung des Fließmittels mit einem 325°C heißen Gastrom von 10 L/min unterstützt. Für die Ionentransferoptik und den Betrieb der Ionenfalle wurden folgende Einstellungen gewählt: CapExit 120.0 V, Skimmer 20.0 V, OctRF 50.0 V, Oct1DC 8.0 V, Oct2DC 1.9 V, Lens1 - 4.0 V, Lens2 -43.0 V und TrapDrive 46.0 V. Die einzelnen GC wurden dann im MRM-Modus detektiert, wobei bei BDP (Mutterion: m/z = 521.4) eine Fragmentierungsamplitude von 1.5 V, bei 17-BMP und 21-BMP (Mutterion: m/z = 465.4) 1.6 V, bei B (Mutterion: m/z = 409.4) ebenfalls 1.6 V und beim internen Standard FP (Mutterion: m/z = 501.3) 1.2 V (SMART-Modus) anlag. Während der Fragmentierungsphase wurden Fragmente bis zu einem m/z von 31 % des Mutterions gesammelt.

Für die quantitative Auswertung wurden zunächst die Ionenchromatogramme des m/z 313 ± 0.5, 355 ± 0.5, 373 ± 0.5 und 411 ± 0.5 aus dem Totalionenstrom extrahiert und die darin enthaltenen Peaks integriert. Die Ionen mit einem m/z von 313 stellten dabei die zur

Quantifizierung herangezogenen Fragmente von FP dar, entsprechend wurden die Fragmente 355 für B, 373 für 17-BMP und 21-BMP und 411 für BDP genutzt. Nach Identifizierung der Substanzpeaks über die Retentionszeit in der entsprechenden Ionenspur wurden jeweils die Flächenverhältnisse Substanz zu internem Standard gebildet. Die unbekanntes GC-Konzentrationen in der Perfusionsflüssigkeit konnten dann über die Kalibrierfunktion, die durch lineare Regression der Wertepaare Konzentration eines GC im Kalibrierstandard und Flächenverhältnis im entsprechenden Chromatogramm ermittelt wurde, berechnet werden.

2.4.2 Bestimmung der tatsächlich applizierten Dosis

2.4.2.1 Extraktion des an der Applikationshilfe adsorbierten Teils der Dosis

In die gemäß 2.3.3 zusammengesetzte Applikationshilfe wurde als Extraktionsmittel ein Gemisch aus 40 mL Diethylether und 75 µL der Stammlösung von FP (siehe 2.1.2.2) gegeben. Anschließend wurde das Extraktionsmittel durch Schüttelbewegung so in der Applikationshilfe verteilt, dass alle inneren Oberflächen ausreichend in Kontakt mit der organischen Phase kamen. Nach dem Ablassen des Extraktionsmittels wurde die Applikationshilfe ein weiteres Mal mit 10 mL Ether gespült. Die organischen Phasen wurden vereinigt und anschließend bei 30 °C unter einem leichten, kontinuierlichen Gasstrom aus Stickstoff bis zur Trockne eingengt. Zur Bestimmung der extrahierten Menge an BDP wurde der so erhaltene Rückstand erst in 1000 µL MeOH gelöst, dann 2 µL dieser Lösung in ein Probengefäß für die HPLC überführt und schließlich 198 µL MeOH in das Probengefäß hinzupipettiert. Die Lösung im Probengefäß wurde kurz auf dem Vortex vermengt und sofort mittels HPLC vermessen.

2.4.2.2 Quantifizierung mittels HPLC-UV

Die chromatographischen Bedingungen, unter denen die Probenlösungen analysiert wurden, stimmen mit denen der unter 1.4.2 beschriebenen Methode zur Bestimmung der GC im Plasma überein. Die Auswertung der erhaltenen Chromatogramme erfolgte durch Integration der Peaks zu den Retentionszeiten der Substanzen und anschließender Bildung des Flächenverhältnisses von BDP- zu FP-Peak.

Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurden je 2 mL Perfusionspuffer (I) durch Zugabe von methanolischen Stammlösungen mit einer bekannten Menge an BDP versetzt und so Kalibrierstandards mit einer Konzentration von 5, 20, 50, 100, 200 und 400 ng/mL hergestellt. Für die nachfolgende Flüssig-Flüssig-Extraktion wurden den Standards zunächst 50 µL einer Lösung von 3 µg/mL FP in MeOH als internen Standard zupipettiert und die erhaltene Lösung

am Vortex für wenige Sekunden durchmischt. Nach Zugabe von 3 mL Diethylether wurden die Analyten dann für 15 min am Mischrad aus dem Puffer extrahiert, um anschließend durch Zentrifugation (3000 U/min, 5 min) eine scharfe Phasentrennung zu bewirken. Die organische Phase wurde daraufhin in einen 5mL-Spitzkolben überführt und die Extraktion mit weiteren 3 mL Ether wiederholt. Die vereinigten organischen Phasen beider Extraktionsschritte wurden abschließend bei 30 °C unter einem leichten, kontinuierlichen Gasstrom aus Stickstoff bis zur Trockne eingengt. Waren die resultierenden Rückstände dann in 200 µL MeOH rekonstituiert worden, erfolgte die Analyse mittels HPLC und die darauf folgende Auswertung der Chromatogramme analog zu den Probenlösungen.

In die Geradengleichung, die man durch lineare Regression der Wertepaare Konzentration von BDP in einem Kalibrierstandard und entsprechendes Flächenverhältnis erhalten hatte, wurden dann die gemessenen Flächenverhältnisse der Probenlösungen eingesetzt und nach den theoretischen Konzentrationen aufgelöst. Die so berechnete Konzentration entsprach dann dem Betrag nach der Menge an BDP in Mikrogramm ($A_{\text{Applikationshilfe}}$), die an der Applikationshilfe adsorbiert worden war. Da laut Herstellerangaben während der Dosierung jeweils eine Gesamtmenge von 500 µg BDP die Dosierkammern der Dosieraerosole (*ex-valve*) verlassen haben, kann die tatsächlich applizierte Dosis $D_{\text{appliziert}}$ wie folgt abgeschätzt werden:

Formel 8

$$D_{\text{appliziert}} = 500 \mu\text{g} - A_{\text{Applikationshilfe}}$$

Um die Güte der Dosisbestimmung abschätzen zu können, wurde in Kontrollexperimenten die Richtigkeit und die Präzision bestimmt, mit der $A_{\text{Applikationshilfe}}$ gemessen werden konnte. Hierzu wurde an der inneren Oberfläche der Applikationshilfe, deren Zusammensetzung der während der normalen Dosisbestimmung entsprach, eine bekannte Menge BDP-Stammlösung (2.1.2.2) gleichmäßig verteilt. Nachdem das Lösungsmittel verdampft war, konnte so eine definierte Menge an adsorbiertem BDP simuliert werden. Es wurden alternierend zwei BDP-Niveaus, 100 und 250 µg, jeweils in einer Dreifachbestimmung gemessen, die Durchführung der Qualitätskontrollen war dabei mit der während einer Dosisbestimmung identisch. Zusätzlich wurden zwischen den ersten vier Messungen Leerwert-Kontrollen durchgeführt, damit interferierende Peaks erkannt und die Reinigungsprozedur der Applikationshilfe beurteilt werden konnte. Die Ausführung der Leerwert-Kontrollen gestaltete sich analog zur Dosisbestimmung, nur dass beim Extraktionsvorgang (2.4.2.1) 75 µL MeOH anstelle der

FP-Lösung in das Extraktionsmittel pipettiert wurden. Bei Simulation einer adsorbierten BDP-Menge von 100 µg ergab die Analyse 101 ± 5 µg, die Qualitätskontrollen auf dem 250µg-Niveau wurden mit 246 ± 12 µg bestimmt, wobei die Angaben aufgrund der geringen Versuchszahl als Mittelwert und mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert zu verstehen sind [274]. Die Chromatogramme der Leerwert-Kontrollen wiesen im Bereich der Retentionszeiten von BDP und FP keine Peaks auf.

2.5 Auswertung

Die Konzentrationen von BDP und dessen Metaboliten in der Perfusionsflüssigkeit wurden analog zu Kapitel 1.5 im arithmetischen Mittel und der mittleren absoluten Abweichung vom Mittelwert zusammengefasst. Weiterhin wurden die Konzentrationen zum besseren Vergleich der beiden Applikationsformen auf den Anteil der Dosis umgerechnet, der zu einem bestimmten Zeitpunkt in die Perfusionsflüssigkeit übergegangen war. Das Prinzip der Umrechnung und alle benötigten Formeln können auch hier Kapitel 1.5 entnommen werden. Es ist einzig zu beachten, dass zum einen in allen Formeln das Volumen des Kammeroberteils V_{KO} durch das Volumen der Perfusionsflüssigkeit von 1.5 L ersetzt werden muss, und zum anderen für die tatsächlich applizierte Dosis $D_{\text{appliziert}}$ der für jeden Versuch individuell bestimmte Wert gemäß 2.4.2 verwendet wurde.

3 ***In-vitro*-Untersuchung zur Bestimmung von Thalidomid-Konzentrationen mittels Mikrodialyse**

3.1 **Verwendete Reagenzien**

3.1.1 **Substanzen**

(2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin (HPCD) und Phenacetin wurden von FLUKA (Buchs, Schweiz), Thalidomid von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) und Heparin-Natrium-5000-ratiopharm[®] (Ratiopharm, Ulm, Deutschland) in einer lokalen Apotheke erworben. Die Bezugsquellen aller weiteren verwendeten Chemikalien können den vorangegangenen Kapiteln (siehe 1.1.1 und 2.1.1) entnommen werden.

3.1.2 **Lösungen**

3.1.2.1 **Standardlösungen für die Quantifizierung**

➤ *Phenacetin (Interner Standard)*

Als Stammlösung wurde eine Lösung von 1 mg/mL Phenacetin in MeOH verwendet. Diese Lösung wurde dann mit MeOH in geeigneten Schritten zu den Arbeitslösungen V1 mit einer Konzentration von 1.5 μ g/mL und V2 mit 1 μ g/mL verdünnt. Die Lagerung der Lösungen erfolgte bei -20 °C.

➤ *Thalidomid*

Ausgangspunkt für die Herstellung der Arbeitslösungen war eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL Thalidomid in Acetonitril (MeCN), mit der in demselben Lösungsmittel folgende Verdünnungen durchgeführt wurden:

V1	2.5 μ g/mL
V2	0.5 μ g/mL
V3	0.03 μ g/mL

Die Stammlösung und alle Verdünnungen wurden bei -20 °C gelagert.

3.1.2.2 Krebs-Ringer-HEPES-Puffer

Bei der Herstellung von 1000.0 mL KRP-HEPES wurden zunächst die Substanzen in den folgenden Konzentrationen eingewogen:

Calciumchlorid Dihydrat	2.5 mM
HEPES	10 mM
Kaliumchlorid	4.8 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	1.2 mM
Magnesiumsulfat Hexahydrat	1.18 mM
Natriumchlorid	120 mM

Nach Auflösen der Substanzen in etwa 900 mL Millipore®-Wasser wurde der pH-Wert der Lösung mit 1-M-Natriumhydroxid-Lösung auf 7.4 eingestellt und anschließend das Volumen auf 1000.0 mL ergänzt. Frisch hergestellter Puffer, der nicht innerhalb des Herstellungstages verbraucht wurde, wurde zu je 50 mL aliquotiert und bis zur späteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.1.2.3 Mikrodialysepuffer

Für 100.0 mL Mikrodialysepuffer wurden vorgelegt:

Calciumchlorid Dihydrat	2.5 mM
HEPES	10 mM
HPCD	10 % (m/V)
Kaliumchlorid	4.8 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	1.2 mM
Magnesiumsulfat Hexahydrat	1.18 mM
Natriumchlorid	120 mM

Die eingewogenen Substanzen wurden dann in ca. 90 mL Millipore®-Wasser gelöst und die erhaltenen Lösungen mit 1-M-Natriumhydroxid-Lösung auf einen pH-Wert von 7.4 eingestellt. Zuletzt wurde mit Millipore®-Wasser auf 100.0 mL aufgefüllt. Nach Fertigstellung der Lösung wurde diese entweder sofort verbraucht oder in Aliquots zu je 15 mL bei -20 °C eingelagert.

3.1.2.4 Stammlösung für die Retrodialyse

Durch Verdünnung der Thalidomid-Stammlösung mit Mikrodialysepuffer wurde eine Pufferlösung mit einer Konzentration von 60 µg/mL THAL hergestellt. Die Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

3.1.2.5 Sørensen-Citrat-Puffer

Der Sørensen-Citratpuffer (SCP) zur Stabilisierung der Thalidomidproben nach [202] enthielt 25 mM Citronensäure und 75 mM Salzsäure in Millipore®-Wasser. Der pH-Wert der Lösung wird mit 1.6 angegeben.

3.1.2.6 Perfusionspuffer (II)

Folgende Einwaagen gingen der Herstellung des Perfusionspuffers voraus:

BSA	5 % (m/V)
Calciumchlorid Dihydrat	2.5 mM
Glucose Monohydrat	5.5 mM
Kaliumchlorid	3.5 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	2.5 mM
Magnesiumsulfat Hexahydrat	1.18 mM
Natriumchlorid	85 mM
Natriumhydrogencarbonat	20 mM

Für 1000.0 mL Puffer wurden dann etwa 90 % des gewünschten Endvolumens an Millipore®-Wasser, 500 µL eines antibiotikahaltigen Konzentrates (siehe 2.1.1) und 100 µL Heparin-Natrium-5000-ratiopharm® zu den Substanzen gegeben und bis zum Erhalt einer klaren Lösung gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert mit 10%iger (m/V) Natriumhydrogencarbonat-Lösung auf 7.4 eingestellt und das Volumen mit Millipore®-Wasser auf 1000.0 mL ergänzt. Der fertige Perfusionspuffer wurde schließlich bis zum Einsatz im Mikrodialyseversuch bei -20 °C eingefroren.

3.2 Verwendete Geräte und Materialien

3.2.1 Humanes Gewebe und Blutplasma

3.2.1.1 Herkunft

Bei dem während der Mikrodialyseversuche eingesetzten Lungengewebe handelte es sich ausschließlich um gesundes peripheres Gewebe. Infragekommende Spender waren Patienten, die sich aufgrund eines Karzinoms in der Lunge einer Lobektomie unterziehen mussten und während der letzten 4 Wochen nicht mit Thalidomid behandelt worden waren. Die Rekrutierung der Patienten erfolgte in der Thoraxchirurgie der Klinik Schillerhöhe in Gerlingen, wo nach mündlicher Aufklärung durch den behandelnden Chirurgen eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt wurde. Nach Entnahme eines Gewebestückes wurde dieses mit isotonischer Kochsalzlösung blutfrei gewaschen und zunächst bei -20 °C zwischengelagert. Nach Transport auf Trockeneis an das eigene Institut wurde eine Lagerungstemperatur von -70 °C verwendet.

Die Herkunft des humanen Plasmas kann Kapitel 1.2.1.1 entnommen werden. Für die Mikrodialyseversuche wurde ein Pool aus Plasma von drei verschiedenen Spendern verwendet, der bei -70 °C lagerte.

3.2.1.2 Herstellung von fein geschnittenem Gewebe

Es wurde Lungengewebe in gleichen Teilen von drei verschiedenen Patienten gemäß Kapitel 1.2.1.2 zerkleinert. Von dem so aufbereiteten Gewebe wurden 3 g abgewogen, umgehend mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C eingelagert.

3.2.2 Ausrüstung für die Mikrodialyse

Kapillarschläuche aus Silikon	Innendurchmesser 0.5 und 1.0 mm, Außendurchmesser 1.3 mm und 3.0 mm (Deutsch & Neumann, Berlin, Deutschland);
Kapillarschläuche aus Teflon	Innendurchmesser 1.1 mm, Außendurchmesser 1.8 mm (Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Deutschland);
Mikrodialysesonden	Typ MAB7.80.10 mit einer molekularen Porengrößenbegrenzung von 15000 Dalton (TSE-Systems, Bad Homburg, Deutschland);
Spritzen	Gasdichte Glasspritzen mit Luer-Anschluss LT1002 und LT1010 (Hamilton Deutschland, Martinsried, Deutschland);
Spritzenpumpe	Typ 540200 (TSE-Sytems);
Verbindungsstücke	Union adapter Luerlock female/M6 female, Tubing connector flangeless/M6 male und Union M6 female/ ¹ / ₁₆ ” male (Amersham Biosciences Europe);

3.2.3 Mikrodialyseapparatur

3.2.3.1 Versuchsaufbau zur Etablierung und Optimierung des Mikrodialysesystems

Die Matrix, in der die Messungen mit der Mikrodialysesonde vorgenommen wurden, wurde in einem Glas-Kulturröhrchen mit Rundboden vorgelegt. Als Verschluss diente ein dazugehöriger Schraubdeckel, der es durch eine entsprechende Bohrung erlaubte, dass der Splitter der Mikrodialysesonde formbündig abschloss, wenn die Membran der Mikrodialysesonde in die Matrix gelegt wurde. In dem Gefäß befand sich außerdem ein Rührstäbchen, so dass nach dem Platzieren des Gefäßes über einem Magnetrührer eine konstante Konvektion innerhalb der Matrix aufrechterhalten werden konnte. Das Dialysat der Sonde wurde in Zentrifugengläsern aufgefangen.

3.2.3.2 Versuchsaufbau zur systematischen Untersuchung der Sondenkalibrierung

Die Messung der Matrixkonzentration mittels Mikrodialyse erfolgte hier in einer temperierbaren Inkubationskammer. Für eine geeignete Durchmischung der Matrix sorgte eine Schlauchpumpe, mit Hilfe derer die Matrix bei einem Fluss von 90 mL/min im System zirkulierte. Proben direkt aus der Matrix konnte durch einen Dreiweghahn mit angeschlossener Probenspritze gewonnen werden. Auf diesem Weg war es ebenfalls möglich, konzentrierte Thalidomid-

lösungen zu applizieren, um in der Matrix gewünschte Konzentrationen der Substanz zu erzeugen. Während der Versuche wurde die Temperatur der Matrix durch einen Wasserkreislauf konstant auf 37 °C gehalten. Je nach Bedarf konnte weiterhin zur Erhöhung des zirkulierenden Matrixvolumens ein zusätzliches Vorratsgefäß in den Kreislauf eingebaut werden, dessen Temperierung durch ein Wasserbad bereitgestellt wurde. Eine schematische Darstellung des beschriebenen Versuchsaufbaus kann *Abbildung 16* entnommen werden.

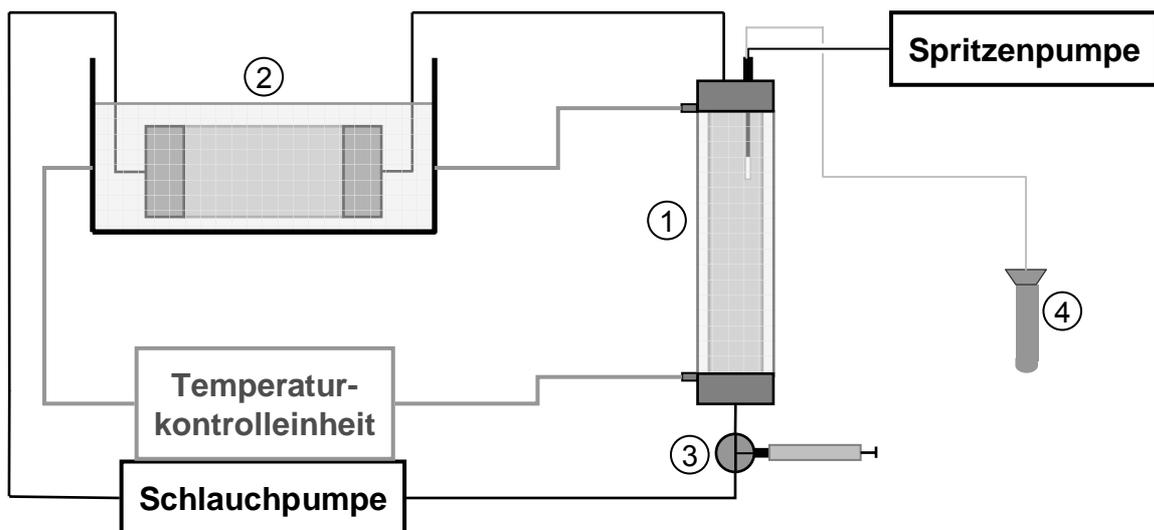


Abbildung 16: Versuchsanordnung zur systematischen Untersuchung der Sondenkalibrierung [1) Inkubationskammer mit Mikrodialysesonde; 2) Wasserbad mit Vorratsgefäß; 3) Dreivegehahn mit Probenspritze; 4) Zentrifugenglas zum Auffangen des Dialysats]

Zur Temperierung der Matrix pumpte die Temperaturkontrolleinheit Wasser geeigneter Temperatur zunächst in den Mantel der Inkubationskammer, von wo aus es gegebenenfalls in das Wasserbad mit dem Vorratsgefäß weitergeleitet wurde. Das Ansaugen des Wassers zurück in die Temperaturkontrolleinheit erfolgte dann entweder aus dem zweiten Anschluss des Temperiermantels oder direkt aus dem Wasserbad. Die Zirkulation der Matrix wiederum verlief ausgehend von der Schlauchpumpe in Richtung der Oberseite der Inkubationskammer, wo auch die Mikrodialysesonde eingeführt wurde, und von dort über den Dreivegehahn wieder zurück zur Pumpe. Bei Nutzung des Vorratsgefäßes wurde dieses im Kreislauf zwischen Pumpe und Oberseite der Inkubationskammer positioniert. Das Dialysat der Mikrodialysesonde wurde in Zentrifugengläsern gesammelt.

3.2.4 HPLC-Systeme

3.2.4.1 UV-Detektion

Das verwendete HPLC-System entsprach bis auf die analytische Säule dem unter 1.2.3 beschriebenen. Zur Trennung der Analyten wurde hier auf eine HPLC-Säule der Spezifikation SunFire[®] C18 mit den Dimensionen 150 x 4.6 mm und einer Partikelgröße von 5 µm (Waters, Milford, USA) zurückgegriffen.

3.2.4.2 Detektion mittels Massenspektrometrie

Die Spezifikationen der HPLC-Anlage, des angeschlossenen Massenspektrometers sowie der Software zur Steuerung und Datenauswertung können Kapitel 2.2.3.2 entnommen werden. Als analytische Säule wurde die XTerra[®] MS C18 mit den Dimensionen 150 x 3.0 mm und 3.5µm-Partikeln (Waters, Milford, USA) verwendet.

3.2.5 Sonstige Geräte und Materialien

Dreiwegehahn	Mehrwegehahn Discifix [®] für Infusionstherapie und Monitoring (B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland);
Glaswolle	Glaswatte reinst, silanisiert, für GC (SERVA Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland);
Inkubationskammer	Chromatographiesäule XK 16/20 mit Temperiermantel (Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Deutschland);
Kühlzentrifuge	Microfuge 22 R mit Rotor F241.5P (Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland);
Kunststoffprobengefäß	Reaktionsgefäß 1.5 mL, Polypropylen, farblos (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland);
Magnetrührer	VARIOMAG [®] Mono (H + P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland);
Probenspritze	Injekt-F [®] -Feindosierungsspritze, 1 mL (B. Braun Melsungen);
Schlauchpumpe	STA-Schlauchpumpe (DESAGA, Heidelberg, Deutschland);
Temperaturkontrolleinheit	Cell temperature controller (Pye Unicam, Cambridge, UK);

Vorratsgefäß	Zylinderförmiges Reservoir mit einem Innendurchmesser von 30 mm und einer Höhe von 95 mm (Amersham Biosciences Europe);
--------------	---

Alle weiteren Geräte und Materialien, die bisher noch nicht genannt wurden, entsprachen den in den Kapiteln 1.2.4 und 2.2.4 genannten.

3.3 Durchführung der Mikrodialyseversuche

3.3.1 Vorbereitung und Lagerung der Mikrodialysesonden

Für die Verbindung der Mikrodialysesonden mit den Spritzen wurden zunächst die ursprünglichen Verbindungsstücke der Sonden abgeschnitten und durch ein System aus Silikonschläuchen verschiedener Durchmesser ersetzt. Dabei wurde erst ein etwa 5 mm langes Stück Schlauch (Innendurchmesser: 0.5 mm) bündig über die Eingangskapillare der Sonde gezogen und anschließend dieser Bereich der Kapillare etwa zur Hälfte in einen ebenfalls ca. 5 mm langen Silikonschlauch (Innendurchmesser: 1.3 mm) geschoben.

Um den Standort der Spritzenpumpe möglichst flexibel wählen zu können, wurde ein Überbrückungssystem entwickelt, bei dem durch einfaches Austauschen eines Kapillarschlauches aus Teflon jede beliebige Entfernung überwunden werden konnte. Hierzu wurde an die eine Seite der entsprechenden Teflonkapillare ein Verbindungsstück mit weiblichem Luer-Anschluss und an die andere Seite ein Verbindungsstück befestigt, das konisch in eine Kapillare mit einem Außendurchmesser von 1.6 mm auslief. Da die Spritzen über einen männlichen Luer-Anschluss verfügten, konnten so die Spritzen mit dem weiblichen Gegenstück am Kapillarschlauch verbunden und das überstehende Stück Silikonschlauch an der Kapillare der Mikrodialyse sonde über die Spitze des anderen Verbindungsstücks gezogen werden.

Vor jedem Versuch wurde die Dialysemembran der Sonde zunächst bei RT für 10 min in Millipore®-Wasser vorgequollen. Danach wurde mit einer Spritze per Hand so lange Millipore®-Wasser durch die Sonde gespült, bis 20 Tropfen von der Ausgangskapillare der Sonde abgefallen waren. Schließlich wurde die Sonde noch weitere 20 min im Wasser belassen, bevor sie für die Versuche verwendet wurde.

Nach Beendigung eines Versuches wurde die Sonde äußerlich erst mit 20%-igen Ethanol und dann mit Millipore®-Wasser vorgereinigt. Anschließend wurde vorsichtig per Hand

Millipore®-Wasser in die Eingangskapillare gespritzt, um die Sonde von innen zu spülen. Dieser Spülvorgang wurde beendet, wenn 40 Tropfen die Ausgangskapillare verlassen hatten. Für die Lagerung der Sonde wurde sie zunächst über Nacht in einem Gefäß mit Millipore®-Wasser belassen, am Morgen dann mit Millipore®-Wasser gespült (20 Tropfen aus der Ausgangskapillare), um sie schließlich nach vorsichtigem Ausblasen der Flüssigkeit aus den Kapillaren in der vom Hersteller mitgelieferten Schutzhülle bis zur weiteren Verwendung zu verpacken.

3.3.2 Etablierung und Optimierung des Mikrodialysesystems

Alle Versuche wurden bei RT durchgeführt, als Matrix wurden dabei jeweils 10 mL KRP-HEPES verwendet. Nach Vorbereitung der Mikrodialysesonde (siehe 3.3.1) wurde jene in der Matrix platziert und an die Spritze mit dem jeweiligen MD-Perfusat angeschlossen. Anschließend wurde der Magnetrührer aktiviert und der Vorschub der Spritzenpumpe solange manuell betätigt, bis 20 Tropfen des Perfusats frei von der Ausgangskapillare abgefallen waren. Dem Konditionieren der Sonde folgte das Einstellen des gewünschten Flusses. Vor Beginn der Versuchsreihen wurde die Matrix mit 100 µL der Thalidomid-Stammlösung versetzt, um eine Konzentration von 10 µg/mL zu erzeugen, und dem System schließlich erlaubt, für 60 Minuten zu äquilibrieren. Wurden während einer Versuchsreihe verschiedene Flussgeschwindigkeiten untersucht, wurde dem Einstellen einer neuen Flussgeschwindigkeit eine Äquilibrationsphase von 45 min angeschlossen, bevor wieder neue Proben gesammelt wurden. Bei einem Wechsel zwischen MD-Perfusaten verschiedener Zusammensetzung wurden jeweils sowohl die Spritze als auch das Verbindungssystem durch neue Elemente ersetzt. Danach folgte eine Konditionierung der Sonde mit dem neuen Perfusat, indem mit diesem manuell wiederum 20 Tropfen aus der Sonde gedrückt wurden. Anschließend wurde ebenfalls eine Äquilibration des Systems 45 min lang abgewartet. Zur adäquaten Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde während der Etablierung und Optimierung des Systems stets dieselbe Sonde verwendet. Reinigung und Lagerung dieser Sonde können Kapitel 3.3.1 entnommen werden. Um eventuelle Störpeaks in der Analyse erkennen zu können, wurden außerdem zu Beginn einer Versuchsreihe von allen untersuchten Perfusaten und der Matrix je 50 µL in ein Zentrifugenglas überführt, 500 µL SCP hinzupipettiert und das resultierende Gemisch (Leerwert-Kontrollen) nach kurzem Vermengen am Vortex bei -20 °C eingelagert.

Zunächst wurde eine orientierende Versuchsreihe mit KRP-HEPES als Perfusat bei den Flussgeschwindigkeiten 2, 3 und 4 µL/min durchgeführt. Das Dialysat wurde dabei je viermal für

10 min gesammelt und zu Beginn des dritten Probenintervalls dem jeweilig anliegenden Fluss entsprechend eine Probe von 20, 30 oder 40 μL aus der Matrix entnommen. Sofort nach Probennahme bzw. Ende des Sammelintervalls wurden 500 μL Sørensen-Citrat-Puffer (SCP) zugegeben, die Proben auf dem Vortex gut vermischt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur quantitativen Analyse eingelagert. Anhand der Erkenntnisse dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss verschiedener Zusammensetzungen des Perfusats bei folgenden Bedingungen untersucht: Fluss 3.5 $\mu\text{L}/\text{min}$, Sammelintervall 10 min, Anzahl der Dialysatproben pro getesteten MD-Perfusat 4. Bei den untersuchten Perfusaten handelte es sich um KRP-HEPES, dem entweder nichts, 2 % (m/V) BSA, 2 %, 3 %, 5 %, 7.5 %, 10 %, 15 % oder 20 % (m/V) HPCD zugesetzt worden waren. Es wurden bei jedem untersuchten Perfusat direkt nach dem zweiten Sammelintervall 35 μL Matrix entnommen. Alle gewonnen Proben wurden analog zur ersten Versuchsreihe behandelt.

Zur Etablierung des Mikrodialysesystems wurde zuletzt für den endgültig als Perfusat verwendeten Mikrodialysepuffer die Flussgeschwindigkeit optimiert. Hierzu wurden bei 2, 3, 4, 4.5, 5 und 6 $\mu\text{L}/\text{min}$ je vier Dialysatproben mit einem Sammelintervall von 10 min und eine korrespondierende Matrixprobe gewonnen. Die Probenentnahme aus der Matrix erfolgte analog zu den vorherigen Versuchen jeweils zu Beginn des dritten Probenintervalls, wobei der Flussgeschwindigkeit entsprechend 20, 30, 40, 45, 50 oder 60 μL entnommen wurden. Auch die weitere Behandlung der Proben richtete sich nach der bereits beschriebenen.

3.3.3 Systematische Untersuchung der Sondenkalibrierung

Bei allen Versuchen wurde das optimierte Mikrodialysesystem verwendet. Dies bedeutete, dass Mikrodialysepuffer, mit oder ohne Zusatz von Thalidomid, als MD-Perfusat bei einem Fluss von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ zum Einsatz kam und Dialysatproben über 10 min gesammelt wurden. Allen Proben dieser Versuchsreihen wurden direkt nach der Gewinnung je 500 μL SCP zugesetzt, bevor sie auf dem Vortex kurz durchmischt und bis zur weiteren Analyse bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren wurden. Zur Bestimmung der THAL-Konzentration wurden weiterhin am Ende eines jeden Versuches Kalibrierstandards hergestellt, die ebenfalls bis zur Probenaufbereitung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingelagert wurden. Als Matrix für die Standards diente eine Lösung aus 50 μL Mikrodialysepuffer und 500 μL SCP. Dieser wurden durch Zupipettieren der Verdünnungen V1, V2 oder V3 der THAL-Stammlösung (siehe 3.1.2.1) definierte Mengen THAL zugesetzt, so dass Kalibrierstandards mit den Konzentrationen 15, 100, 250, 500, 750, 1000 und 1500 ng/mL entstanden.

3.3.3.1 Vergleich verschiedener Kalibrierungsmethoden

Es wurde KRP-HEPES als Matrix verwendet. Zur direkten Vergleichbarkeit der verschiedenen Methoden wurde die relative Wiederfindungsrate (Recovery) stets mit derselben Mikrodialysesonde bestimmt. Die Wiederverwendbarkeit der Sonde wurde durch entsprechende Reinigungs- und Lagerungsverfahren (siehe 3.3.1) sichergestellt.

Für die Bestimmung der relativen Recovery mittels No-Net-Flux-Methode wurden vier Konzentrationsniveaus im Perfusat untersucht: 100, 400, 700 und 1000 ng/mL. Die entsprechenden Perfusate wurden durch geeignete Verdünnung der Thalidomid-Stammlösung mit Mikrodialysepuffer hergestellt. In der Matrix lag gleichzeitig eine THAL-Konzentration von ca. 600 ng/mL vor. Hierzu wurden 200 mL Puffer mit 200 µL THAL-Stammlösung versetzt und gut vermischt. Die Pufferlösung wurde dann in vier Aliquots zu je 50 mL aufgeteilt und zunächst bei 4-8 °C gelagert. Waren alle Aliquots der Matrix mindestens 60 min lang einer Temperatur von 4-8 °C ausgesetzt worden, wurde das erste Aliquot entnommen und für 40 min bei 37 °C in einen Wärmeschrank überführt. Danach wurde der Versuchsaufbau (siehe 3.2.3.2) mit der vorgewärmten Matrix befüllt und die Zirkulation gestartet, wobei ohne zusätzliches Vorratsgefäß gearbeitet wurde. Anschließend wurde sofort die vorbereitete Sonde (siehe 3.3.1) positioniert und deren Konditionierung mit dem ersten der zu untersuchenden Perfusate durchgeführt. Dabei wurde solange manuell ein Perfusatfluss erzeugt, bis 20 Tropfen die Sonde verlassen hatten. Vor Beginn der Messung wurde es dem System noch erlaubt, insgesamt 30 min zu äquilibrieren, wobei die Sondenkonditionierung mit in diese Zeitspanne einzurechnen war. Es wurden darauf folgend vier Dialysatproben gesammelt und vier Proben jeweils in der Mitte eines Sammelintervalls aus dem entsprechenden Perfusat entnommen. Nach Beendigung des letzten Probenintervalls wurde der Mikrodialysefluss gestoppt und die Matrix aus dem Versuchsaufbau abgelassen. Als Kontrolle wurde vor dem Verwerfen der Matrix eine Probe von 50 µL gezogen.

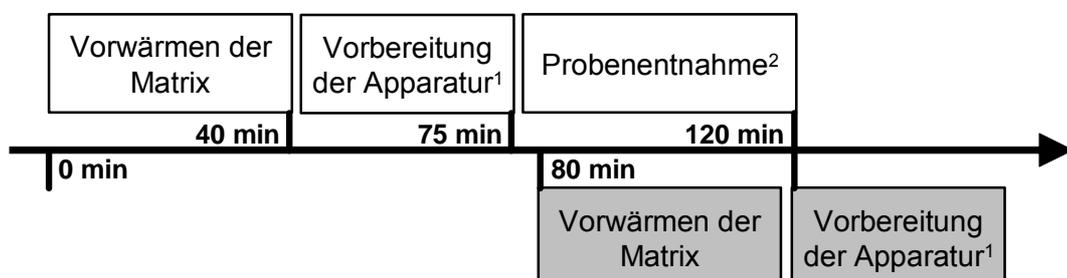


Abbildung 17: Zeitlinie bei der Bestimmung der relativen Recovery mittels No-Net-flux-Methode: Weiß und grau unterlegte Kästen zeigen die Überschneidung der Abläufe zur Vermessung verschiedener MD-Perfusate (nähere Erläuterung siehe Text). [¹ Vorbereitung beinhaltet Beladen der Apparatur mit Matrix, Positionierung und Konditionierung der Sonde und Äquilibration des Systems. ² Probenentnahme beinhaltet vier Dialysatproben mit korrespondierenden Proben aus Perfusat und das Entleeren der Apparatur mit anschließender Kontrollprobe aus Matrix.]

Gemäß dem beschriebenen Versuchsablauf beginnend mit der Temperierung eines weiteren Aliquots der Matrix wurden dann die übrigen drei Perfusate untersucht. Dabei war auf ein exaktes Einhalten der angegebenen Zeitspannen zu achten, um bezüglich der THAL-Konzentration möglichst reproduzierbare Matrixbedingungen zu schaffen (siehe *Abbildung 17*). Die Reihenfolge der Untersuchung der vier Perfusate erfolgte zufällig, beim Wechsel des Perfusats wurden immer die Spritze und das Verbindungssystem zur Sonde ausgetauscht.

Die Kalibrierung per Retrodialyse bzw. Extraktionsmethode wurde in einem Versuchsansatz durchgeführt. Verwendet wurde dazu der Versuchsaufbau mit zusätzlichem Vorratsgefäß. Nach dem Einbringen von etwa 120 mL Matrix in den Versuchsaufbau wurde die Temperierung dieser auf 37 °C abgewartet. Danach wurde die vorbereitete Sonde (siehe 3.3.1) eingebracht und mit dem Retrodialyseperfusat, das aus einer 1 : 100 Verdünnung der Stammlösung für die Retrodialyse (siehe 3.1.2.4) mit Mikro dialysepuffer bestand, manuell vorkonditioniert (20 Tropfen aus der Ausgangskapillare). Diesem Prozess schloss sich eine 30-minütige Äquilibrierungsphase an. Anschließend wurden zur Bestimmung der relativen Recovery mittels Retrodialyse sechs Dialysatproben gesammelt und gleichzeitig jeweils in der Mitte eines Probenintervalls 50 µL aus dem Retrodialyseperfusat entnommen. Direkt nach dem Ende des letzten Sammelintervalls wurde der Mikro dialysefluss gestoppt und die Mikro dialysesonde an eine neue Spritze mit Verbindungssystem angeschlossen, die reinen Mikro dialysepuffer enthielt. Die Sonde wurde anschließend manuell solange mit dem neuen Perfusat gespült, bis 20 Tropfen frei von der Ausgangskapillare abgefallen waren. Danach wurde der Perfusatfluss wieder aufgenommen und die Sonde so weitere 15 min lang gespült. Vor Zugabe von THAL in die Matrix wurden Leerwert-Kontrollen (*Blank*) des Perfusats und der Matrix entnommen. Hierzu wurde zum einen eine Dialysatprobe gesammelt und zum anderen in der Mitte des Probenintervalls 50 µL Matrix entnommen. Die Gewinnung der Matrixprobe erfolgte durch die Probenspritze, wobei diese bei permanentem Kontakt mit der Zirkulation zunächst dreimal hintereinander komplett aufgezogen und wieder entleert wurde, um dann ca. 100 µL der Matrix abzumessen. Nach dem Abtrennen der Spritze von der Zirkulation wurde deren Inhalt in ein Kunststoffprobengefäß (KPG) überführt und daraus schließlich 50 µL entnommen (siehe *Tabelle 5*).

Tabelle 5: Zeitlicher Verlauf der Kalibrierung per Retrodialyse bzw. Extraktionsmethode

Zeitintervall (min)	MD-Fluss ($\mu\text{L}/\text{min}$)	MD-Perfusat	Matrix	Vorgang
0-30	20 Tropfen* 5	Mikrodialysepuffer mit ca. 600 ng/mL THAL	KRP-HEPES	Konditionierung der Sonde* Äquilibration des Systems
30-90	5	Mikrodialysepuffer mit ca. 600 ng/mL THAL	KRP-HEPES	Entnahme der Retrodialyseproben*
90-95	20 Tropfen*	Mikrodialysepuffer	KRP-HEPES	Konditionierung der Sonde*
95-110	5			Spülphase
110-120	5	Mikrodialysepuffer	KRP-HEPES	Entnahme <i>Blank</i>
120-125	5	Mikrodialysepuffer	KRP-HEPES mit ca. 600 ng/mL THAL	Aufbau des THAL-Spiegels in der Matrix*
125-155				Äquilibration des Systems
155-215	5	Mikrodialysepuffer	KRP-HEPES mit ca. 600 ng/mL THAL	Entnahme der Mikrodialyseproben*

* nähere Erläuterung siehe Text;

Für die anschließende Durchführung der Extraktionsmethode wurden 100 μL der THAL-Stammlösung in ein KPG pipettiert und bis auf 1 mL mit Matrix aufgefüllt. Das Gemisch wurde dann in die Probenspritze aufgezogen und in die Matrixzirkulation injiziert. Um eventuelle Rückstände von THAL in dem KPG, der Spritze oder dem Dreiwegehahn zu entfernen, wurden noch zweimal je 1 mL Matrix in das KPG gegeben, wieder mit der Spritze aufgesogen und injiziert. Nachdem auf diese Weise eine Zielkonzentration während der Probengewinnung von etwa 600 ng/mL THAL innerhalb der Matrix aufgebaut worden war, wurde das System 30 min lang äquilibriert. Die Bestimmung der relativen Recovery erfolgte schließlich durch das Sammeln von sechs Dialysatproben unter gleichzeitiger Entnahme korrespondierender Matrixproben (siehe *Tabelle 5*). Die Matrixproben wurden dabei analog zum *Blank* der Matrix gewonnen.

3.3.3.2 Vergleich verschiedener Matrices

Um den Einfluss verschiedener Matrices auf die Mikro dialyse sinnvoll beschreiben zu können, wurde auch hier für jeden Versuch dieselbe Mikro dialysesonde verwendet. Die hierfür notwendige Pflege der Sonde kann in Kapitel 3.3.1 nachgeschlagen werden.

Als Matrices wurden KRP-HEPES, humanes Blutplasma, Perfusionspuffer (II) und eine Gewebesuspension aus peripherem humanen Lungengewebe und KRP-HEPES eingesetzt. Der Ablauf der Versuche stimmte mit den vorangegangenen Ausführungen (siehe 3.3.3.1) zur Bestimmung der relativen Recovery mittels Retro dialyse bzw. Extraktionsmethode überein. Auch das Retro dialyseperfusat wurde ohne Veränderung übernommen. Unterschiede ergaben sich nur in der jeweiligen THAL-Zielkonzentration in der Matrix und in einer Anpassung des Versuchsansatzes für die Gewebesuspension. Die zugegebene Menge THAL sollte während der Probennahme im Plasma und Perfusionspuffer (II) eine Konzentration von ca. 1200 ng/mL und in dem KRP-HEPES und der Gewebesuspension einen Spiegel von ca. 600 ng/mL erzeugen. Hierzu wurden beim Blutplasma und Perfusionspuffer (II) 230 µL, bei der Gewebesuspension 120 µL und beim KRP-HEPES wiederum 100 µL THAL-Stammlösung injiziert.

Die Zusammensetzung der Gewebesuspension wurde an die von Valotis und Kollegen [85] beschriebene Versuchsanordnung zur Bestimmung der Gewebefindung von inhalativen Glucocorticoiden angelehnt. Umgerechnet auf den hier verwendeten Aufbau wurden daher etwa 3 g fein geschnittenes Gewebe (siehe 3.2.1.2) mit 120 mL Puffer vermischt. Zur Herstellung der Gewebesuspension und damit Befüllung des Versuchsaufbaus wurde zunächst der Boden der Inkubationskammer mit einer dünnen Schicht Glaswolle bedeckt. Diese diente dazu, den Gewebeanteil in der Inkubationskammer zu halten und dadurch das Verstopfen der Zirkulation durch Gewebestücke zu verhindern. Nach Vorlegen von 20 mL Puffer in die Inkubationskammer wurde das zuvor bei RT aufgetaute Gewebeatiquot hinzugegeben, die Kammer verschlossen und der Versuchsaufbau mit dem restlichen KRP-HEPES befüllt. Der weitere Verlauf des Versuches folgte der bereits beschriebenen Prozedur. Abweichungen ergaben sich erst wieder bei der Gewinnung der Matrixproben. Nach dem Entleeren der Probenspritze in ein KPG wurde die Probe erst bei 4 °C und 13000 U/min für 5 min zentrifugiert, bevor 50 µL davon mit SCP vermischt und eingefroren wurden. Weiterhin wurde direkt nach Beendigung des Versuches eine Gewebeprobe aus der Matrix entnommen, indem ein KPG etwa zur Hälfte mit zerkleinertem Gewebe gefüllt wurde. Die konzentrierte Suspension wurde ebenfalls bei 4 °C und 13000 U/min für 5 min zentrifugiert, um anschließend den noch enthaltenen Puffer möglichst vollständig entfernen zu können. Das so aufgereinigte Gewebe wurde schließlich mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur quantitativen Analyse bei -70 °C gelagert.

3.4 Bestimmung der Thalidomidmengen im Dialysat und in der Matrix

3.4.1 Probenvorbereitung

3.4.1.1 Proben aus der Etablierung und Optimierung des Mikrodialysesystems

Nach dem Auftauen bei RT wurden den Proben der interne Standard zugesetzt. In Leerwert-Kontrollen wurden je 25 µL MeOH und in die Proben je 25 µL der Verdünnung V2 des internen Standards (siehe 3.1.2.1) pipettiert. Anschließend wurde die Lösung kurz auf dem Vortex durchmischt und dann mit 2 mL Diethylether versetzt. Es folgte eine Extraktion der Analyten für 10 min am Mischrad. Bevor die Etherphasen in Spitzkolben überführt wurden, sorgte die Zentrifugation der Proben für 5 min bei RT und ca. 3000 U/min für eine saubere Phasentrennung. Der Extraktionsvorgang wurde mit weiteren 2 mL Ether wiederholt und die vereinigten organischen Phasen mit Hilfe eines leichten, kontinuierlichen Gasstromes aus Stickstoff bei 30 °C fast bis Trockne eingeengt. Anschließend wurden die Ränder der Spitzkolben nochmals sorgfältig mit 750 µL Ether abgespült, um darauf das Lösungsmittel endgültig unter besagtem Gasstrom bis zur Trockne zu entfernen. Zur Analyse mittels HPLC-UV wurden die Rückstände in jeweils 50 µL MeOH aufgenommen.

3.4.1.2 Proben aus der systematischen Untersuchung der Sondenkalibrierung

Während die übrigen Proben und Kalibrierstandards bei RT im Begriff waren aufzutauen, wurde die Gewebeprobe vorbereitet. Das Gewebe wurde dabei im gefrorenen Zustand in eine Reibschale mit Pistill, die zuvor mit flüssigem Stickstoff vorbehandelt worden waren, überführt. Nachdem das Gewebe ebenfalls mit flüssigem Stickstoff überschüttet worden war, wurde es mit dem Pistill in möglichst kleine Bruchstücke zerrieben. Dabei wurde darauf geachtet, die Reibschale, den Pistill und das Gewebe immer mit flüssigem Stickstoff soweit abzukühlen, dass das Gewebe stets gefroren blieb. War die Zerkleinerung abgeschlossen, wurden ein weiteres Mal flüssiger Stickstoff in die Reibschale gegossen und daraufhin auf der Analysenwaage etwa 50 mg Gewebe in ein Zentrifugenglas abgewogen. Das genaue Gewicht wurde notiert. Bevor die Gewebeprobe analog zu den anderen Proben aufgearbeitet werden konnte, mussten noch 500 µL SCP zugesetzt und die resultierende Suspension kurz auf dem Vortex durchmischt werden. Das restliche Gewebe wurde in einem frischen Kunststoffprobengefäß gesammelt und wieder bei -70 °C als Rückstellprobe eingelagert.

Die Aufarbeitung der Proben bzw. Kalibrierstandards begann mit der Beimengung von je 25 µL MeOH zu den Leerwert-Kontrollen und je 25 µL der Verdünnung V1 des internen Standards (siehe 3.1.2.1) zu den Proben und Kalibrierstandards. Nach dem Durchmischen am Vortex wurden die Analyten analog zu 3.4.1.1 einschließlich des Spülens der Kolbenränder mit

Diethylether extrahiert. Die resultierenden Rückstände wurden zur Analyse mittels HPLC-MS/MS mit 50 μ L Fließmittel (Startbedingungen) rekonstituiert.

3.4.2 Quantitative Analyse mittels HPLC

3.4.2.1 Proben aus der Etablierung und Optimierung des Mikro dialysesystems

Alle Proben wurden vor der Injektion von 20 μ L auf 10 °C heruntergekühlt. Die chromatographische Trennung auf der temperierten Säule (25 °C) erfolgte mittels Gradientenelution, deren Verlauf *Tabelle 6* entnommen werden kann. Thalidomid wurde durch Messung der Absorption der mobilen Phasen bei 298 nm und Phenacetin entsprechend bei 254 nm detektiert.

Tabelle 6: Zeitlicher Verlauf der Gradientenanalyse

Zeitpunkt nach Injektion der Probe (min)	Anteil Komponente A (%)	Anteil Komponente B (%)	Fluss (mL/min)	Vorgang
0	80	20	1.0	Linearer Gradient
15	70	30	1.0	
16	0	100	1.0	Spülen der analytischen Säule
25	0	100	1.0	
26	80	20	1.0	Äquilibrierung der analytischen Säule
35	80	20	1.0	

Komponente A: 1 % (V/V) Essigsäure in Millipore®-Wasser
 Komponente B: Acetonitril

Zur Datenauswertung wurden die Flächenverhältnisse der THAL-Peaks zu den jeweiligen Peaks des internen Standards verwendet. Die Peakflächen wurden nach Integration der erhaltenen Chromatogramme anhand der Retentionszeiten zugeordnet, wobei die Chromatogramme der Leerwert-Kontrollen zuvor auf interferierende Peaks hin kontrolliert worden waren.

3.4.2.2 Proben aus der systematischen Untersuchung der Sondenkalibrierung

Im Probengeber wurden die Proben zunächst auf 10 °C temperiert. Dann wurden je Probe 20 µL injiziert und die Analyten bei RT mittels binärem Fließmittelgradienten (siehe *Tabelle 7*) getrennt von der analytischen Säule eluiert.

Tabelle 7: Zeitlicher Verlauf der Gradientenanalyse

Zeitpunkt nach Injektion der Probe (min)	Anteil Komponente A (%)	Anteil Komponente B (%)	Fluss (mL/min)	Vorgang
0	65	35	0.4	Linearer Gradient
12	53	47	0.4	
13	0	100	0.5	Spülen der analytischen Säule
23	0	100	0.5	
24	65	35	0.4	Äquilibrierung der analytischen Säule
30	65	35	0.4	

Komponente A: 0.15 % (V/V) Ameisensäure in Millipore®-Wasser
 Komponente B: Acetonitril

Zur Detektion wurde die mobile Phase nach dem Verlassen der Säule in die Gasphase überführt und die gleichzeitig positiv ionisierten Substanzen massensensitiv erfasst. Das hierzu verwendete ESI-Interface arbeitete bei einer Kapillarspannung von -4.5 kV und die pneumatische Unterstützung der Verneblung bei einem Druck von 50 psi. Zur restlosen Entfernung des Fließmittels wurde ein 300 °C heißer Gastrom von 10 L/min eingesetzt. Der Ionenferoptik und dem Betrieb der Ionenfalle wurden folgende Parameter zugewiesen: CapExit 120.0 V, Skimmer 30.0 V, OctRF 125.0 V, Oct1DC 12.0 V, Oct2DC 1.45 V, Lens1 - 4.5 V, Lens2 -50.0 V und TrapDrive 34.0 V. Um die Selektivität zu erhöhen, wurde der Massenspektrometer zusätzlich im MRM-Modus gefahren, wobei für Thalidomid Ionen mit einem m/z von 259.4 und für Phenacetin diejenigen mit 180.2 zur Fragmentierung herangezogen wurden. Die Fragmentierungsamplitude und die Grenze des m/z, bis zu dem Fragmente in der Fragmentierungsphase noch gesammelt wurden, waren bei Thalidomid entsprechend 1.4 V und 100 und bei Phenacetin 1.7 V und 70.

Für die quantitative Auswertung wurden zunächst für Thalidomid die Ionenchromatogramme des m/z 231 ± 0.5 aus dem Totalionenstrom des Mutterions 259.4 und für Phenacetin die mit 110 ± 0.5 aus dem Totalionenstrom des Mutterions 180.2 isoliert. Nach Integration wurden die Peakflächen entsprechend ihrer Retentionszeiten den Substanzen

zugeordnet und jeweils das Flächenverhältnis THAL zu internem Standard gebildet. Die Kalibrierfunktion zur Konzentrationsbestimmung konnte dann über lineare Regression der Konzentrationen der Kalibrierstandards als unabhängige und den korrespondierenden Flächenverhältnissen als abhängige Variable ermittelt werden. Über diese Funktion und die gemessenen Flächenverhältnisse der einzelnen Proben wurden schließlich die unbekanntes THAL-Konzentrationen berechnet.

3.5 Auswertung

3.5.1 Optimierung des Mikro dialysesystems

Bei der Optimierung des Mikro dialysesystems wurden zwei Faktoren berücksichtigt: Zusammensetzung des Mikro dialyseperfusats und Flussgeschwindigkeit. Da die Absorption von ultraviolettem Licht als Detektionsart genutzt wurde und sich Peakflächen daher aufgrund des Lambert-Beer'schen Gesetzes direkt proportional zur Konzentration verhalten, erfolgte die Auswertung direkt über die gemessenen Flächenverhältnisse. Die relative Recovery RR_F bei gegebenem MD-Fluss F konnte folglich leicht anhand *Formel 9* berechnet werden, wobei als Streuungsmaß die Standardabweichung der Vierfachbestimmung angegeben wurde.

Formel 9

$$RR_F = \frac{\overline{FV_{Dialysat}}}{FV_{Matrix}}$$

$\overline{FV_{Dialysat}}$ Mittleres Peakflächenverhältnis aus vier Dialysatproben
 FV_{Matrix} Peakflächenverhältnis aus korrespondierender Matrixprobe

Wurden MD-Perfusate verschiedener Zusammensetzung verglichen, waren Flussgeschwindigkeit, Matrixkonzentration und quantitative Analyse identisch. Deshalb reichte der visuelle Vergleich der RR aus, um über die Überlegenheit eines bestimmten Perfusates zu entscheiden.

Wenn dagegen Flussgeschwindigkeiten verändert wurden, so variierte bei gleichem Sammelintervall entsprechend auch das Dialysatvolumen. Bedingt durch die Tatsache, dass zur Analyse per HPLC aber ein Minimalvolumen von 50 μ L benötigt wurde, wurde dieser Unterschied gleichzeitig wieder nivelliert. Folglich war hier nur von Interesse, welche Dialysatprobe die höchste, maximal extrahierbare Menge Thalidomid enthalten und damit das

größte Peakflächenverhältnis erzeugen würde. Mathematisch kann diese Feststellung wie folgt beschrieben werden:

Formel 10

$$A_{\text{extrahierbar}} = C_{\text{Matrix}} \cdot RR_F \cdot F \cdot \Delta t$$

$A_{\text{extrahierbar}}$	Extrahierbare Menge THAL aus Dialysatprobe
C_{Matrix}	THAL-Konzentration in der Matrix
F	MD-Fluss
RR_F	Relative Recovery bei entsprechendem MD-Fluss F
Δt	Länge des Sammelintervalls

Reduzierte man diese Funktion auf eine einzige Variable, nämlich die Flussgeschwindigkeit, so entsprach das lokale Maximum dieser Funktion dem optimalen MD-Fluss. Da Matrixkonzentration und Probenintervall bei allen Versuchen Konstanten waren, musste nur die relative Recovery in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit dargestellt werden. Aufgrund des Zusatzes von HPCD war der in der Literatur beschriebene [139], mathematische Zusammenhang zwischen MD-Fluss und RR_F (Gleichung (1), *Formel 11*) nicht mehr gegeben und musste durch Gleichung (2) angenähert werden. Die Konstanten k_{RR} und k_{\max} konnten dann mit Hilfe der experimentell bestimmten RR_F ermittelt werden, indem die Wertepaare Flussgeschwindigkeit und natürlicher Logarithmus der korrespondierenden RR_F einer linearen Regression unterzogen wurden. Dabei entsprach die erhaltene Steigung $-k_{RR}$ und der Achsenabschnitt k_{\max} .

Formel 11

$$(1) \quad RR_F = 1 - e^{-k_{RR} \cdot \frac{1}{F}}$$

$$(2) \quad RR_F = RR_{\max} \cdot e^{-k_{RR} \cdot F} = e^{k_{\max} - k_{RR} \cdot F}$$

RR_{\max} Theoretische RR bei einem MD-Fluss von 0 $\mu\text{L}/\text{min}$

Wurde anschließend die RR_F in *Formel 10* durch diese experimentell gewonnene Funktion ersetzt, konnte die maximal extrahierbare Menge Thalidomid $A_{\text{extrahierbar}}$ einer Dialysatprobe in Abhängigkeit vom MD-Fluss F dargestellt werden:

Formel 12

$$A_{\text{extrahierbar}} = C_{\text{Matrix}} \cdot e^{k_{\text{max}} - k_{\text{RR}} \cdot F} \cdot F \cdot \Delta t$$

$$\frac{d(A_{\text{extrahierbar}})}{dF} = C_{\text{Matrix}} \cdot \Delta t \cdot e^{k_{\text{max}} - k_{\text{RR}} \cdot F} \cdot (1 - k_{\text{RR}} \cdot F)$$

Die 1. Ableitung dieser Funktion besitzt nur eine Nullstelle, so dass das gesuchte Maximum mit dem Kehrwert von k_{RR} beschrieben werden konnte.

3.5.2 Kalibrierungsmethoden

Die Auswertung der verschiedenen Kalibrierungsmethoden erfolgte gemäß der von Stenzen beschriebenen Verfahren [180]. Proben des MD-Perfusats, die Thalidomid enthielten, wurden auf ausreichende Stabilität während des Verwendungszeitraums hin untersucht. Da die gemessenen Konzentrationen dabei keinen abnehmenden Trend aufwiesen, sondern nur im Bereich des analytischen Fehlers zu streuen schienen, wurden diese im arithmetischen Mittelwert (C_{Perfusat}) zusammengefasst.

Bei der No-Net-Flux-Methode wurde zunächst die Differenz aus Dialysatkonzentration C_{Dialysat} und korrespondierender C_{Perfusat} gebildet. Pro Konzentrationsniveau im MD-Perfusat erhielt man auf diese Weise vier Konzentrationsdifferenzen. Anschließend wurde eine lineare Regression mit 14 Freiheitsgraden durchgeführt, wobei C_{Perfusat} als unabhängige und die Konzentrationsdifferenz als abhängige Variable eingesetzt wurden. Als Streuungsmaß für die so berechnete relative Recovery wurde der Standardfehler der Steigung angegeben.

Zur Bestimmung der RR mittels Retrodialyse wurde die Recovery erst individuell für jede Dialysatprobe ermittelt:

Formel 13

$$RR_i = \frac{C_{\text{Perfusat}} - C_{\text{Dialysat}}^i}{C_{\text{Perfusat}}}$$

C_{Dialysat}^i THAL-Konzentration im Dialysat des i-ten Probenintervalls
 RR_i Relative Recovery im i-ten Probenintervall

Aus den sechs Einzelbestimmungen wurden dann der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Ähnlich zur Retrodialyse wurde auch bei der Extraktionsmethode die RR für jede Probe individuell berechnet:

Formel 14

$$RR_i = \frac{C_{\text{Dialysat}}^i}{C_{\text{Matrix}}^i}$$

C_{Matrix}^i THAL-Konzentration in Matrix zum Zeitpunkt des i-ten Probenintervalls

Die RR ermittelt durch die Extraktionsmethode wurde anschließend als arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung der sechs Einzelbestimmungen dargestellt.

3.5.3 Berechnung der Proteinbindung

In den Versuchsreihen, bei denen humanes Blutplasma oder Perfusionspuffer (II) als Matrix zum Einsatz kam, wurde das Ausmaß der Bindung von Thalidomid an die enthaltenen Proteinstrukturen bestimmt. Der Anteil f_{PB} des THAL, der in der Matrix an Proteine gebunden vorlag, konnte wie folgt berechnet werden:

Formel 15

$$f_{\text{PB}} = \frac{C_{\text{Matrix}}^i - \frac{C_{\text{Dialysat}}^i}{RR}}{C_{\text{Matrix}}^i}$$

RR Unter 3.5.2 auf Basis der Extraktionsmethode oder der Retrodialyse als arithmetischer Mittelwert für die jeweilige Matrix berechnete rel. Recovery

Die Proteinbindung wurde dabei in Form von f_{PB} für jedes der sechs Sammelintervalle ermittelt, während derer THAL-freies Perfusat verwendet wurde, und schließlich als arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung wiedergegeben.

4 *In-vitro*-Untersuchung zum Anfluten von Thalidomid in bronchialem Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem peripheren Lungengewebe nach Simulation einer systemischen Applikation

4.1 Verwendete Reagenzien

4.1.1 Substanzen

Die Bezugsquellen aller hier verwendeten Substanzen sind bereits in den Kapiteln 1.1.1, 2.1.1 oder 3.1.1 aufgeführt.

4.1.2 Lösungen

4.1.2.1 Standardlösungen für die Quantifizierung

Es wurden bei Thalidomid die Stammlösung und die Arbeitslösungen V1, V2 und V3 und beim internen Standard Phenacetin die Stammlösung und die Verdünnung V1 aus Kapitel 3.1.2.1 weiter verwendet.

4.1.2.2 Krebs-Ringer-HEPES-Puffer

Die Zusammensetzung des Puffers ist mit der aus Kapitel 3.1.2.2 identisch. Der Puffer wurde vor jeder Sondenkalibrierung und jedem Ansatz von Applikationslösung frisch hergestellt.

4.1.2.3 Perfusionspuffer (II)

2 L des bei den Lungenperfusionen zum Einsatz kommenden Puffers wurden am Abend vor einem Versuch am humanem Lungenperfuptionsmodell gemäß der Vorschrift aus Kapitel 3.1.2.6 stets frisch hergestellt. Bis zum Transport am nächsten Morgen wurde die Lösung bei 4-8 °C gelagert.

4.1.2.4 Lösungen für die Mikrodialyse

Alle zur Mikrodialyse notwendigen Lösungen wurden von den Versuchen zur Messung von Thalidomidkonzentrationen mittels Mikrodialyse (Kapitel 3) übernommen. Der Mikrodialyse-puffer (3.1.2.3) wurde in Aliquots von je 15 mL bei -20 °C gelagert, Sørensen-Citrat-Puffer (SCP, 3.1.2.5) in Aliquots zu je 50 mL bei Raumtemperatur.

Am Abend vor einem Versuch am humanen Lungenperfusionsmodell wurden ein Aliquot Mikrodialysepuffer bei RT aufgetaut und anschließend 5.0 mL davon mit 52 µL Stammlösung für die Retrodialyse (3.1.2.4) versetzt. Der so entstandene Retrodialysepuffer wurde kurz auf dem Vortex durchmischt und dann bis zum Transport bei -20 °C eingefroren. Der restliche Mikrodialysepuffer wurde ebenfalls für den anstehenden Versuch benötigt und zunächst bei 4-8 °C gelagert.

4.1.2.5 Applikationslösung

Zur Simulation der systemischen Applikation von Thalidomid wurde eine konzentrierte wässrige Lösung der Substanz benötigt. Hierzu wurden 0.5 mg/mL THAL und 40 % (m/V) (2-Hydroxypropyl)-β-cyclodextrin (HPCD) in KRP-HEPES gelöst und die entstandene Lösung dann sofort in Aliquots zu 15 mL bei -20 °C eingelagert.

4.2 Verwendete Geräte und Materialien

4.2.1 Humanes Gewebe

Geeignet für diese Studie waren generell Patienten, die sich aufgrund eines primären Bronchialkarzinoms einer Lobektomie, Bilobektomie oder Pneumonektomie in der Klinik Schillerhöhe, Gerlingen, Deutschland, unterziehen mussten. Dem Eingriff durfte keine neoadjuvante Behandlung vorangegangen sein, auch sollte der Patient in den letzten vier Wochen vor der Operation kein Thalidomid erhalten haben. Es wurden neun Patienten aufgeklärt und nach Einholen einer Einverständniserklärung schließlich in die Studie eingeschlossen. Die resezierten Lungenlappen wurden in räumlicher Nähe zum Operationssaal reperfundiert bzw. beatmet und nach Beendigung des Versuches sofort den üblichen, pathologischen Routineuntersuchungen zugeführt. Genehmigt wurde das vorliegende Studienprotokoll von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Deutschland.

4.2.2 Humanes Lungenperfusionsmodell

Die vorliegende Untersuchung wurde an demselben humanen Lungenperfusionsmodell durchgeführt, das auch schon für die Bestimmung der pulmonalen Absorption von Beclomethasondipropionat genutzt wurde (siehe 2.2.2). Da keine Inhalation des zu untersuchenden Arzneistoffs vorgesehen war, wurde das Modell ohne Applikationshilfe betrieben. Weiterhin wurde der Auffangbehälter für die aus der offenen Vene tropfende Perfusionslösung (siehe *Abbildung 14* in Kapitel 2.2.2) durch eine Deckelkonstruktion verschlossen, um zu starkes Abkühlen oder auch Austrocknen des peripheren Lungengewebes zu vermeiden. Der Deckel aus Kunststoff wurde in der institutseigenen Werkstatt angefertigt. Da dieser nicht flach war, sondern trapezförmige Seitenflächen besaß, die ähnlich einer Pyramide nach oben hin zusammenliefen und erst auf einer Höhe von 7 cm über der Oberkante des Auffangbehälters durch eine waagerechte Fläche abgeschlossen wurden, bot die Konstruktion mehrere Zugangsmöglichkeiten in den Innenraum. Zum einen machten es schlitzförmige Aussparungen an der Unterkante möglich, Messsonden und die Kapillaren der Mikrodialysesonden nach außen zu führen. Zum anderen konnten durch zwei verschließbare Fenster an den Seitenflächen auch während des Experimentes alle nötigen Handhabungen im Innenraum vorgenommen werden. Die Größe der Öffnungen nahm dabei fast die gesamte Fläche der entsprechenden Seite ein. Der Beatmungsschlauch wurde durch eine möglichst passgenaue Bohrung auf der Oberseite des Deckels geführt. Außerdem wurde der bisher verwendete Respirator durch ein Beatmungsgerät vom Typ Evita 4 (Dräger Medical, Lübeck, Deutschland) ersetzt.

4.2.3 Ausrüstung für die Mikrodialyse

Die Messung der Gewebespiegel von Thalidomid wurde mit derselben Ausrüstung durchgeführt, wie sie bereits in Kapitel 3.2.2 aufgeführt wurde. Für die Verbindung der Mikrodialysesonde mit der Perfusat-Spritze wurde dabei das unter 3.3.1 beschriebene System verwendet. Das Dialysat wurde wiederum in Zentrifugengläsern gesammelt.

4.2.4 HPLC-System

Das hier verwendete HPLC-System mit massensensitiver Detektion entspricht dem aus Kapitel 3.2.4.2.

4.2.5 Sonstige Geräte und Materialien

Pipette	Serologische Pipette 10 oder 25 mL, wattiert, pyrogenfrei, einzeln steril verpackt (A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland);
Venenverweilkatheter	Vasofix® Braunüle® 18 G (B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland);

Alle anderen benötigten Geräte und Materialien wurden bereits ausreichend in den Kapiteln 1.2.4, 2.2.4 oder 3.2.5 beschrieben.

4.3 Durchführung der Versuche am humanen Lungenperfusionsmodell

4.3.1 Beatmung und Reperfusion des resezierten Lungenlappens

Analog zu Kapitel 2.3.1 wurde schon während der Operation das Wasserbad auf 37 °C temperiert und nach Befüllen des Flüssigkeitsreservoirs mit 1.5 L Perfusionspuffer (II) der Perfusionskreislauf gestartet, so dass die Lösung zum Vorwärmen frei zirkulieren konnte. Zur Vorbereitung der Perfusion gehörte auch die Konditionierung von zwei Mikrodialysesonden. Hierzu wurden die Sonden zunächst in isotonischer Kochsalzlösung platziert und solange manuell mit Mikrodialysepuffer perfundiert, bis je 20 Tropfen die Ausgangskapillaren verlassen hatten. Danach wurde weiterhin mit Mikrodialysepuffer als Perfusat für mindestens 30 min jeweils ein Fluss von 2 µL/min angelegt. Die gesamte Konditionierung erfolgte bei Raumtemperatur. Schließlich wurde noch der Retrodialysepuffer, der in gefrorenem Zustand auf Trockeneis herantransportiert worden war (siehe 4.1.2.4), bei RT aufgetaut und anschließend in zwei separate Spritzen mit Verbindungssystem abgefüllt.

Nach erfolgter Resektion des Lungengewebes wurde dieses Kapitel 2.3.1 entsprechend präpariert, mit 500 mL Perfusionspuffer (II) gespült, anschließend gewogen und in die Perfusionsapparatur eingebracht. Bevor die Beatmung und Reperfusion des Gewebes begann, wurden erst die Mikrodialysesonden gelegt. Hierzu wurde die Mikrodialysepumpe gestoppt, die Sonden von Verbindungssystemen zu den Spritzen getrennt und schließlich am Schaft der Sonden zwei Markierungen angebracht. Die erste Markierung sollte zu erkennen geben, ab welchem Punkt die Sondenmembran nach Einfädeln in die Verweilkanüle eines nun zum Einsatz kommenden Venenverweilkatheters an deren Ende angekommen sein würde, die

zweite, ab wann sie diese vollständig passiert haben und damit wieder frei liegen würde. Daraufhin wurde von einem Chirurgen je ein Katheter in peripheres Lungengewebe und zentral in das Tumorgewebe gestochen. Nach Entfernen des Mandrin wurde die Sonde bis zur ersten Markierung eingeführt und dann der Verweilkatheter vorsichtig mindestens bis zur zweiten Markierung zurückgezogen, ohne dabei die Position der Mikrodialysesonde zu verändern. Um ein Verrutschen der Sonde während des Versuches - vor allem durch die simulierten Atembewegungen des Lungengewebes - zu verhindern, wurde mit Heftpflaster die Sonde erst am Verweilkatheter fixiert und abschließend am Rand des Auffangbehälters für die aus dem venösen Ausfluss tropfende Perfusionsflüssigkeit (siehe *Abbildung 10* in Kapitel 3.2.2, B - Allgemeiner Teil) befestigt. Waren beide Sonden auf diese Weise platziert worden, wurde die Deckelkonstruktion angebracht und die Mikrodialysesonden mit den Spritzen, die den Retrodialysepuffer enthielten, verbunden.

Nun konnte die Beatmung und Reperfusion des Lungengewebes initiiert werden. Dabei wurde ein durchschnittlicher Perfusionsfluss von 110 mL/min (70-180 mL/min) angelegt, so dass im Mittel ein mittlerer arterieller Druck von 32 mmHg (12-58 mmHg) entstand. Die Beatmung erfolgte im BIPAP-Modus (Biphasic Positive Airway Pressure), bei dem ein oberes Druckniveau von 18 mbar, eine Atemfrequenz von 15 Atemzüge/min und ein PEEP (Positive End-Expiratory Pressure) von 5 mbar eingestellt war. Hieraus resultierte durchschnittlich ein Atemminutenvolumen von 3.6 L/min (2.7-6.3 L/min).

4.3.2 Durchführung der Retrodialyse

Nachdem die Reperfusion und Beatmung des Lungenlappens etabliert worden war, wurden die Sonden manuell mit dem angeschlossenen Retrodialysepuffer gespült. Hierzu wurden die Spritzenkolben behutsam soweit nach vorne gedrückt, bis 20 Tropfen von den Ausgangskapillaren abgefallen waren. Danach wurde an beiden Sonden ein Fluss von 5 µL/min angelegt und dem gesamten System erlaubt, für 15 min zu äquilibrieren. Dem folgend wurde zur Bestimmung der Wiederfindungsrate (relative Recovery) für 10 min das jeweilige Dialysat gesammelt und in der Mitte dieses Probenintervalls 50 µL des Retrodialysepuffers in 500 µL Sørensen-Citrat-Puffer (SCP) pipettiert. Am Ende des Sammelintervalls wurden den Dialysatproben ebenfalls je 500 µL SCP zugesetzt, bevor die drei Proben gut durchmischt auf Trockeneis zwischengelagert wurden.

Augenblicklich nach Beendigung der Probenentnahme wurde die Retrodialyse gestoppt und die beiden Spritzen einschließlich ihrer Verbindungssysteme durch solche mit

Mikrodialysepuffer ausgetauscht. Um die darauf folgende Auswaschphase zu beschleunigen, wurden die Sonden zunächst mit dem neuen Perfusat manuell vorkonditioniert (20 Tropfen). Daraufhin wurde an beiden Sonden wieder ein Fluss von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ aufgenommen und 10 min gewartet, bevor Leerwert-Kontrollen gewonnen werden konnten.

4.3.3 Bestimmung der Gewebespiegel mittels Mikrodialyse nach Zugabe von THAL in den Perfusionspuffer

Direkt im Anschluss an die Auswaschphase (siehe 4.3.2) wurden wieder für 10 min die Dialysate der zwei Sonden getrennt aufgefangen. Diese Leerwert-Kontrollen dienten nicht nur zur Überprüfung eventueller Störfaktoren in der Matrix, sondern auch um zu sehen, ob sich noch Substanz von der Retrodialyse in den Sonden oder dem Gewebe befand. Zur Kontrolle der Perfusionslösung wurden in der Mitte des Probenintervalls 50 μL des zirkulierenden Puffers aus dem Reservoir entnommen und anschließend sofort mit 500 μL SCP vermischt. Analog zu den Probenentnahmen bei der Retrodialyse wurden auch hier am Ende des Sammelintervalls je 500 μL SCP zu den Dialysatproben pipettiert und die resultierenden Lösungen nach einem kurzen manuellen Schütteln zusammen mit der Probe aus der Perfusionslösung auf Trockeneis zwischengelagert.

Der eigentliche Versuch zur Beschreibung des Anflutens von THAL im Lungen- und Tumorgewebe begann übergangslos am Ende des Sammelintervalls für die Leerwert-Kontrollen. Hierzu wurden direkt nach Ablauf dieses Probenintervalls eine definierte Menge Applikationslösung in das Reservoir gegeben und gleichzeitig die Auffanggefäße für die Dialysate gewechselt, so dass der Abschluss der Probengewinnung für die Leerwert-Kontrollen mit dem Zeitpunkt 0 min des Experimentes zusammenfiel. Die Applikationslösung, die analog zum Retrodialysepuffer auf Trockeneis gelagert vorlag (siehe 4.1.2.5 und 4.3.1), wurde dabei erst kurz vor Anwendung bei RT aufgetaut und auch sofort nach Entnahme der gewünschten Dosis wieder auf Trockeneis eingefroren. Anschließend wurden maximal 60 Minuten lang Dialysatproben gesammelt, wobei wiederum Probenintervalle von 10 min eingehalten und jeweils in der Mitte eines Sammelintervalls 50 μL Perfusionslösung aus dem Reservoir entnommen wurden. Beim Vermischen der Proben mit je 500 μL SCP und darauf folgender Lagerung auf Trockeneis wurde analog zu den Leerwert-Kontrollen vorgegangen. Zur Bestimmung der Gesamtgewebekonzentration als Referenzwert wurde außerdem innerhalb des letzten Sammelintervalls, möglichst kurz nach Gewinnung der Probe aus der Perfusionslösung, eine Gewebeprobe entnommen. Dazu wurden aus dem Segment, wo auch die Mikrodialyse-sonde für die Messung der THAL-Konzentration im Lungengewebe platziert worden war, etwa

200 mg peripher gelegenes Gewebe herausgeschnitten. Das Gewebe wurde zunächst kurz mit isotonischer Kochsalzlösung abgespült und dann sofort auf Trockeneis eingefroren. Der genaue Zeitpunkt der Gewebeprobeentnahme wurde dokumentiert.

Während der ersten drei Perfusionen wurden konstant 10 mL Applikationslösung verabreicht, was einer Thalidomid-Dosis von 5 mg entsprach. Da hierbei ein Konzentrationsverlauf in der Perfusionslösung erzeugt wurde, der mit einer hohen Spitzenkonzentration zu Beginn des Experimentes, die darauf kontinuierlich abnahm, eher einer intravenösen Gabe entsprach, wurde die Dosierung anhand der gewonnenen Daten für die folgenden sechs Versuche gewichtsadaptiert angepasst. Dies bedeutete, dass einem Grundwert von 2.25 mg THAL pro Gramm Anfangsgewicht des zu perfundierenden Lungengewebes 0.0065 mg THAL addiert wurden. Die hieraus resultierende Gesamtdosis wurde in das benötigte Volumen Applikationslösung umgerechnet und auf ein Zehntel Milliliter gerundet.

Nach Beendigung einer Perfusion wurden alle gewonnenen Proben und die nicht verbrauchte Applikationslösung auf Trockeneis an das eigene Institut transportiert und dort bei -20 °C eingelagert. Bei jeder Perfusion wurden außerdem am selben Tag noch Kalibrierstandards hergestellt und anschließend ebenfalls bei -20 C eingefroren. Anzahl und Beschaffenheit der Kalibrierstandards entsprachen denen aus Kapitel 3.3.3.

4.4 Quantitative Analyse des Anflutens von THAL im Tumorgewebe und peripheren Lungengewebe

4.4.1 Probenvorbereitung

Alle Aufarbeitungsschritte einschließlich der Bearbeitung der Gewebeprobe können Kapitel 3.4.1.2 entnommen werden. Analog zu den dort erwähnten Leerwert-Kontrollen wurde auch hier den Kontrollproben, die direkt nach der Auswaschphase (siehe 4.3.3) gewonnen wurden, statt 25 µL der entsprechenden Standardlösung des internen Standards 25 µL MeOH zugegeben.

4.4.2 Quantitative Analyse mittels HPLC-MS/MS

Die Quantifizierung des in den Proben und Kalibrierstandards enthaltenen THAL erfolgte mittels derselben Methode, wie sie bereits in Kapitel 3.4.2.2 beschrieben wurde.

4.5 Auswertung

Die Abschätzung der tatsächlichen freien Gewebekonzentrationen anhand der zugrunde liegenden Dialysatkonzentration aus der Mikrodialyse erfolgte nach *Formel 16*. Die so erhaltene Gewebekonzentration ist als mittlere Konzentration über das gesamte Sammelintervall zu interpretieren. Daher ist der Zeitpunkt, an dem diese Konzentration vorlag, so definiert worden, dass er der verstrichenen Zeit beginnend mit dem Zeitpunkt 0 min des Experimentes (siehe 4.3.3) bis zur der Mitte des korrespondierenden Probenintervalls entsprechen sollte.

Formel 16

$$C_{\text{Gewebe}} = \frac{C_{\text{Dialysat}}}{k_{\text{Korrektur}} \cdot RR_{\text{Retro}}}$$

C_{Gewebe}	Geschätzte freie Gewebekonzentration zum Zeitpunkt des jeweiligen Probenintervalls
C_{Dialysat}	Korrespondierende Dialysatkonzentration
$k_{\text{Korrektur}}$	Korrekturfaktor
RR_{Retro}	Relative Recovery gemäß Retrodialyse der entsprechenden Perfusion

Da die systematischen Untersuchungen zur Sondenkalibrierung vermuten ließen, dass die Retrodialyse nicht in der Lage sein würde, die tatsächliche RR zu beschreiben (siehe 2.3.2, B - Allgemeiner Teil), wurden die Gewebekonzentrationen für beiden Eventualitäten berechnet. Für den Fall einer korrekten Bestimmung der RR mittels Retrodialyse wurde $k_{\text{Korrektur}}$ gleich 1 gesetzt und für die Begebenheit, dass die wahre RR stark unterschätzt worden war, gleich 1.89. Der Faktor 1.89 entsprang den Versuchen zur Sondenkalibrierung in KRP-HEPES und einer Gewebesuspension (siehe 3.3.3). Hierzu wurden aus drei Versuchsreihen (siehe 2.2.1, 2.2.2.1 und 2.2.2.2, D - Tabellarischer Anhang) die Verhältnisse der RR, bestimmt mittels Extraktionsmethode, zu der gemäß Retrodialyse gebildet und daraus anschließend der arithmetische Mittelwert berechnet.

Bei der Zusammenfassung von Ergebnissen mehrerer Perfusionen werden die Konzentrationen als arithmetischer Mittelwerte dargestellt, das Streuungsmaß entspricht, wenn angegeben, aufgrund der geringen Versuchszahl der mittleren absoluten Abweichung vom Mittelwert [274].

5 Validierung der analytischen Methoden

Beschaffenheit und Menge der Probenmatrices, die für die Validierung verwendet wurden, entsprachen, falls nicht anders spezifiziert, denen der in den jeweiligen Untersuchungen angegebenen Kalibrierstandards. Alle Proben wurden für mindestens eine Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, bevor sie aufgearbeitet und/oder vermessen wurden. Dabei erfolgte die Probenaufbereitung, wenn nicht anderweitig beschrieben, analog zu den bereits erwähnten Kalibrierstandards. Die Auswertung der Daten wurde mit Microsoft[®] Excel 2002 SP3 und GraphPad[™] Prism Version 4.00 für Windows[®], San Diego, USA, durchgeführt.

5.1 Selektivität

Alle Probenmatrices wurden auf interferierende Peaks im Chromatogramm hin untersucht. Im Rahmen der Validierung wurden hierzu je drei Aliquots der verwendeten Matrices analysiert, wobei diesen $50\text{ }\mu\text{L}$ desjenigen Lösungsmittels zupipettiert wurden, mit dem die Stammlösungen der entsprechenden Kalibrierstandards hergestellt worden waren. Die anschließende Aufarbeitung erfolgte analog zu den Leerwert-Kontrollen der entsprechenden Untersuchungen. Weiterhin gewährleistete die Entnahme von Leerwert-Kontrollen während jeder Versuchsreihe die kontinuierliche Kontrolle der Selektivität [275]. In keinem der dazugehörigen Chromatogramme traten Substanzpeaks auf, die im Bereich der Retentionszeiten der untersuchten Verbindungen eluiert wurden (siehe *Diagramm 12*).

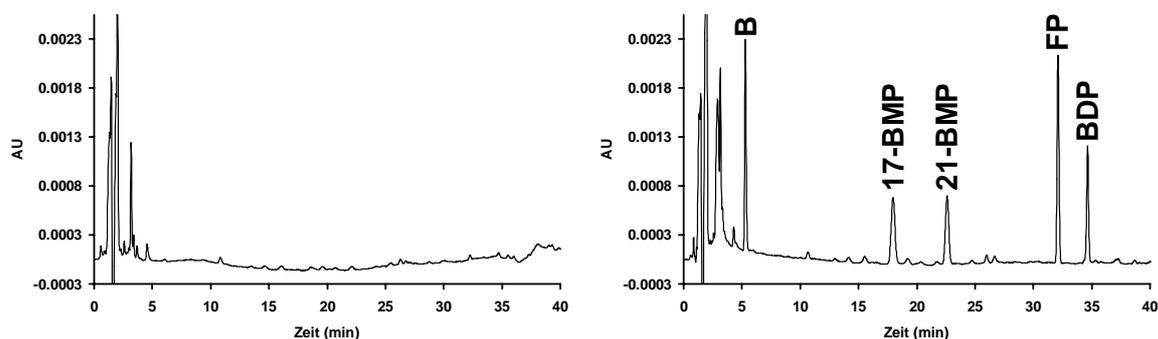


Diagramm 12: Beispielchromatogramme von der Bestimmung von BDP und dessen Metabolite 17-BMP, 21-BMP und B in humanem Blutplasma mittels HPLC-UV: Das linke Chromatogramm wurde nach Injektion einer Leerwert-Kontrolle erhalten, das rechte Diagramm zeigt das Chromatogramm des Kalibrierstandards S3 (siehe 1.3.2.3). [FP = interner Standard]

5.2 Kalibrierfunktion

Es wurde ein einfacher linearer Zusammenhang zwischen Konzentration der Probenlösung und Peakflächenverhältnis von Substanz zu internem Standard angenommen, so dass die Kalibrierfunktion wie folgt dargestellt werden kann:

Formel 17

$$y = b + a \cdot x$$

a	Steigung der Kalibrierfunktion
b	Achsenabschnitt der Kalibrierfunktion
x	Konzentration der Probe
y	Peakflächenverhältnis

Die lineare Regressionsanalyse zur Ermittlung der Steigung a und des Achsenabschnitts b erfolgte nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate. Es wurde dabei keine Gewichtung vorgenommen und auch b wurde nicht auf den Wert Null beschränkt. Als unabhängige Variable fungierte die Konzentration der Kalibrierstandards und als abhängige Variable das dazu gemessene Peakflächenverhältnis.

Um zu überprüfen, ob dieses Modell auf die verwendeten Bestimmungsmethoden angewendet werden konnte, wurden sowohl Homoskedasizität und Normalverteilung der Residuen als auch die Linearität überprüft. Auf Varianzhomogenität wurde dabei nach Bartlett und auf Normalverteilung gemäß Kolmogorov-Smirnov getestet. Die Linearität wurde bestätigt, indem mit demselben Datensatz eine nichtlineare Regression durchgeführt wurde, die ein Polynom zweiter Ordnung als Funktion zugrunde legte. War ein linearer Zusammenhang gegeben, so musste das 95%-Konfidenzintervall für den Koeffizienten des quadratischen Terms die Null einschließen [276]. Außerdem wurden Residuenplots und Plots der Detektorantwort, die als Verhältnis der Differenz Peakflächenverhältnis und Achsenabschnitt zu eingesetzter Konzentration definiert wurde, verwendet, um Trends oder eventuelle Varianzhomogenitäten besser beurteilen zu können. Der zur Auswertung herangezogene Datensatz beinhaltete dabei die Peakflächenverhältnisse und Konzentrationen der Kalibrierstandards der jeweiligen Methode, wobei je Konzentrationsniveau sechs unabhängige Kalibrierstandards vermessen wurden (siehe *Tabelle 8*).

Tabelle 8: Angegeben sind die Ergebnisse der Regressionsanalyse des Datensatzes zur Beurteilung der Linearität mit den entsprechenden 95%-Konfidenzintervallen in eckigen Klammern (n = 36). Steigung und Achsenabschnitt entsprechen den Werten der linearen Regression, der Koeffizient des quadratischen Terms geht aus der nichtlinearen Regression (Polynom zweiter Ordnung) hervor.

Substanz	Matrix	Steigung	Achsenabschnitt	Koeffizient des quadratischen Terms
BDP	KRP-HEPES	0.00260 [0.00250-0.00270]	0.01853 [-0.03071-0.06777]	0.00000003 [-3.5x10 ⁻⁷ -4.1x10 ⁻⁷]
	Plasma	0.00311 [0.00303-0.00318]	-0.01815 [-0.07283-0.03654]	0.00000014 [-0.4x10 ⁻⁷ -3.3x10 ⁻⁷]
	Perfusionspuffer (I)	0.06078 [0.05918-0.06239]	-0.00520 [-0.01766-0.007254]	-0.000035 [-0.00046-0.00039]
17-BMP	KRP-HEPES	0.00308 [0.00297-0.00319]	0.00810 [-0.04540-0.06159]	0.00000007 [-3.4x10 ⁻⁷ -4.8x10 ⁻⁷]
	Plasma	0.00386 [0.00377-0.00396]	-0.04209 [-0.11130-0.02713]	0.00000017 [-0.6x10 ⁻⁷ -4.1x10 ⁻⁷]
	Perfusionspuffer (I)	0.01598 [0.01531-0.01666]	-0.00652 [-0.01177-(-0.00128)]	0.000028 [-0.00015-0.00021]
21-BMP	KRP-HEPES	0.00322 [0.00311-0.00333]	-0.00520 [-0.05998-0.04959]	0.00000013 [-2.9x10 ⁻⁷ -5.5x10 ⁻⁷]
	Plasma	0.00278 [0.00270-0.00286]	-0.04617 [-0.1029 to 0.01061]	0.00000008 [-1.2x10 ⁻⁷ -2.8x10 ⁻⁷]
	Perfusionspuffer (I)	0.00310 [0.00290-0.00330]	-0.00101 [-0.00267-0.00065]	-0.000026 [-7.2x10 ⁻⁵ -1.9x10 ⁻⁵]
B	KRP-HEPES	0.00361 [0.00347-0.00374]	0.04956 [-0.01767-0.11680]	0.00000007 [-4.4x10 ⁻⁷ -5.9x10 ⁻⁷]
	Plasma	0.00431 [0.00421-0.00441]	0.01201 [-0.06112-0.08514]	0.00000011 [-1.4x10 ⁻⁷ -3.7x10 ⁻⁷]
	Perfusionspuffer (I)	0.01265 [0.01205-0.01324]	-0.01141 [-0.01635-(-0.00647)]	0.000078 [-5.8x10 ⁻⁵ -21x10 ⁻⁵]
THAL	Mikrodialysepuffer	0.00031 [0.000297-0.000314]	0.00245 [-0.00425-0.00914]	-1.4x10 ⁻⁹ [-2.1x10 ⁻⁸ -1.8x10 ⁻⁸]

Die Residuen der untersuchten Datensätze waren normal verteilt und deren Varianzen wurden als homogen betrachtet, auch die Bedingung für die Linearität wurden bei allen Methoden eingehalten (siehe *Tabelle 8*). Während aller Untersuchungen wiesen die erstellten Kalibriergeraden stets einen Korrelationskoeffizienten größer als 0.99 auf.

5.3 Präzision und Richtigkeit

Präzision und Richtigkeit wurden anhand von Qualitätsstandards (QS) bestimmt. Die Konzentrationen der Standards wurden so gewählt, dass sich einer im unteren, einer im mittleren und einer im oberen Konzentrationsbereich der Kalibriergeraden befanden. Jedes Konzentrationsniveau wurden 12-mal vermessen, wobei sechs Wiederholungen am selben Tag (*intra day*) und sechs jeweils einzeln an aufeinander folgenden Tagen (*inter day*) aufgearbeitet und analysiert wurden. Als Präzision wurde die relative Standardabweichung (RSD) in Prozent angegeben, während die Richtigkeit über folgende Formel berechnet wurde:

Formel 18

$$\text{Richtigkeit (\%)} = \frac{\sum_{i=1}^6 C_{\text{ist}}^i}{6 \cdot C_{\text{soll}}} \cdot 100$$

C_{ist}^i Berechneten Konzentrationen des i-ten QS
 C_{soll} Nominale Konzentration

Tolerierbar waren eine RSD kleiner als 15 % und eine Richtigkeit zwischen 85 % und 115 % [277].

5.3.1 Bestimmung von BDP und dessen Metabolite 17-BMP, 21-BMP und B

Alle Qualitätsstandards wurden durch Versetzen der entsprechenden Matrices mit bestimmten Mengen an Arbeitslösung der Kalibrierstandards (siehe 1.1.2.2 und 2.1.2.2) hergestellt. Im Falle der Bestimmung dieser GC in Plasma mittels HPLC-UV wurden auch Verdünnungen von Proben im Verhältnis 1 : 1 vermessen (siehe 1.4.1.1). Daher wurde bei dieser Methode ein viertes Konzentrationsniveau (2800 ng/mL) hinzugefügt, das außerhalb des Kalibrierbereichs lag. Folglich mussten diese Standards analog zu den Dialysatproben erst im Verhältnis 1 : 1 verdünnt werden, bevor sie wie die restlichen Proben aufgearbeitet werden konnten. Weiterhin

wurde für jeden Satz Proben, die an demselben Tag aufgearbeitet wurden, eine neue Kalibriergerade ermittelt (siehe *Tabelle 9* und *Tabelle 10*).

Tabelle 9: *Intra day* Präzision und Richtigkeit (n = 6) der Qualitätsstandards zur Bestimmung von BDP und dessen Metabolite 17-BMP, 21-BMP und B

HPLC-UV: KRP-HEPES						
<i>Substanz</i>	<i>Richtigkeit (%)</i>			<i>Präzision (%)</i>		
	35*	400*	900*	35*	400*	900*
BDP	110.5	99.7	93.4	7.3	5.3	6.8
17-BMP	113.8	103.4	96.9	3.1	2.1	5.3
21-BMP	106.4	102.3	97.5	2.5	2.8	5.1
B	108.3	102.6	98.9	8.8	2.3	4.5

HPLC-UV: Plasma								
<i>Substanz</i>	<i>Richtigkeit (%)</i>				<i>Präzision (%)</i>			
	50*	600*	1200*	2800*	50*	600*	1200*	2800*
BDP	100.3	95.1	98.9	100.5	5.0	5.1	3.1	0.7
17-BMP	103.1	96.3	102.0	103.4	3.9	3.9	3.4	1.1
21-BMP	110.5	97.9	103.1	105.5	2.3	4.0	3.7	0.9
B	113.2	94.4	100.4	100.3	7.9	4.6	3.2	0.9

HPLC-MS/MS: Perfusionspuffer (I)						
<i>Substanz</i>	<i>Richtigkeit (%)</i>			<i>Präzision (%)</i>		
	0.8 / 2.0 [#]	7.0*	13.0*	0.8 / 2.0 [#]	7.0*	13.0*
BDP	84.7	100.2	106.6	14.8	6.3	4.6
17-BMP	103.1	100.9	97.2	12.0	9.2	8.3
21-BMP	108.8	105.8	95.2	12.9	5.0	7.6
B	113.0	99.0	99.1	12.4	7.3	12.3

* Konzentrationsniveau der Qualitätsstandards in ng/mL;

Konzentrationsniveau der Qualitätsstandards in ng/mL: BDP und 17-BMP 0.8, 21-BMP und B 2.0;

Tabelle 10: *Inter day* Präzision und Richtigkeit (n = 6) der Qualitätsstandards zur Bestimmung von BDP und dessen Metabolite 17-BMP, 21-BMP und B

HPLC-UV: KRP-HEPES								
<i>Substanz</i>	<i>Richtigkeit (%)</i>			<i>Präzision (%)</i>				
	35*	400*	900*	35*	400*	900*		
BDP	101.4	103.3	96.5	11.0	3.7	5.9		
17-BMP	105.5	104.6	96.7	11.4	5.3	3.3		
21-BMP	107.0	100.6	99.3	9.0	3.5	7.1		
B	102.2	102.8	98.7	11.2	2.7	4.5		

HPLC-UV: Plasma								
<i>Substanz</i>	<i>Richtigkeit (%)</i>				<i>Präzision (%)</i>			
	50*	600*	1200*	2800*	50*	600*	1200*	2800*
BDP	96.2	95.5	100.6	104.3	7.5	5.2	5.1	3.5
17-BMP	101.9	97.8	104.0	105.7	5.4	5.2	6.4	2.8
21-BMP	114.1	96.7	103.7	105.6	13.6	5.4	10.5	5.4
B	100.0	96.9	102.8	104.3	15.2	6.3	6.0	3.5

HPLC-MS/MS: Perfusionspuffer (I)						
<i>Substanz</i>	<i>Richtigkeit (%)</i>			<i>Präzision (%)</i>		
	0.8 / 2.0 [#]	7.0*	13.0*	0.8 / 2.0 [#]	7.0*	13.0*
BDP	103.6	104.6	102.8	12.2	14.5	4.1
17-BMP	110.0	107.4	98.6	12.2	6.9	6.3
21-BMP	106.0	98.4	102.1	9.2	8.1	8.4
B	114.2	102.8	96.7	11.1	8.6	4.9

* Konzentrationsniveau der Qualitätsstandards in ng/mL;

[#] Konzentrationsniveau der Qualitätsstandards in ng/mL: BDP und 17-BMP 0.8, 21-BMP und B 2.0;

5.3.2 Bestimmung von THAL in verschiedenen Matrices

Da Thalidomid nicht nur in Mikrodialysepuffer, sondern auch in KRP-HEPES, Perfusionspuffer, humanem Plasma und peripherem humanen Lungengewebe quantifiziert werden sollte, mussten diese Matrices bei der Herstellung von Qualitätsstandards ebenfalls berücksichtigt

werden. Als Matrix wurde dabei ein Gemisch aus je 50 µL KRP-HEPES, Mikrodialysepuffer, Perfusionspuffer (II) oder Plasma und 500 µL SCP verwendet. Bei der Herstellung der Standards für das Lungengewebe wurde zunächst Gewebe von drei verschiedenen Spendern (siehe 3.2.1.1) gemäß der in Kapitel 3.4.1.2 beschriebenen Methode zerkleinert und dann Aliquots von je 50 mg mit 500 µL SCP vermischt. Während bei den Qualitätsstandards für Mikrodialysepuffer mit 30, 600 und 1300 ng/mL der gesamte Konzentrationsbereich abgedeckt wurde, wurden ausgehend von den zu erwartenden Zielkonzentrationen für Perfusionspuffer (II) und Plasma nur Standards mit einer Konzentration von 1300 ng/mL und für KRP-HEPES und Lungengewebe von 600 ng/mL bzw. 600 ng/mg Gewebe vermessen (siehe *Tabelle 11*). Die entsprechenden Thalidomidkonzentrationen wurden wiederum durch Zupipettieren einer geeigneten Menge an Arbeitslösung der Kalibrierstandards (siehe 3.1.2.1) erreicht. Außerdem wurde für Proben, die am selben Tag bearbeitet wurden, immer eine separate Kalibriergerade (siehe 3.3.3) erstellt.

Tabelle 11: Präzision und Richtigkeit (n = 6) der Qualitätsstandards zur Bestimmung von THAL in verschiedenen Matrices

<i>Intra day</i>						
<i>Matrix</i>	<i>Richtigkeit (%)</i>			<i>Präzision (%)</i>		
	<i>30*</i>	<i>600*</i>	<i>1300*</i>	<i>30*</i>	<i>600*</i>	<i>1300*</i>
MD-Puffer	92.0	101.2	98.9	13.9	5.3	5.8
KRP-HEPES	-	102.9	-	-	5.4	-
Perfusionspuffer (II)	-	-	104.3	-	-	5.2
Plasma	-	-	96.2	-	-	6.0
Lungengewebe	-	100.0	-	-	10.2	-

<i>Inter day</i>						
<i>Matrix</i>	<i>Richtigkeit (%)</i>			<i>Präzision (%)</i>		
	<i>30*</i>	<i>600*</i>	<i>1300*</i>	<i>30*</i>	<i>600*</i>	<i>1300*</i>
MD-Puffer	98.2	97.7	93.0	10.4	8.4	4.9
KRP-HEPES	-	100.5	-	-	6.7	-
Perfusionspuffer (II)	-	-	94.4	-	-	4.2
Plasma	-	-	94.9	-	-	5.5
Lungengewebe	-	99.7	-	-	6.2	-

* Konzentrationsniveau der Qualitätsstandards in ng/mL bzw. ng/mg Gewebe;

Um einen Einfluss unterschiedlicher Matrices auf die Bestimmung der Thalidomidkonzentration auszuschließen, wurde für die Qualitätsstandards mit den Konzentrationen 600 ng/mL bzw. 600 ng/mg Gewebe und 1300 ng/mL je eine einfaktorielle, univariate Varianzanalyse durchgeführt. Als unabhängige Variable ging hierbei die Matrix und als abhängige die jeweils bestimmte Konzentration ein. Es konnte weder bei den *Intra-day*-Standards (600 ng/mL bzw. 600 ng/mg Gewebe: $p = 0.7846$; 1300 ng/mL: $p = 0.0693$) noch bei den *Inter-day*-Standards (600 ng/mL bzw. 600 ng/mg: $p = 0.7781$; 1300 ng/mL: $p = 0.7768$) ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den eingesetzten Matrices festgestellt werden.

5.4 Bestimmungsgrenze

Die Kriterien, die zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze herangezogen wurden, waren die Genauigkeit und die Präzision, mit der diese Konzentration bestimmt werden konnte. Bei einer Sechsfachbestimmung sollte dabei die berechnete Konzentration weniger als 20 % von der nominalen abweichen und die RSD kleiner als 20 % sein [277]. Die Bestimmungsgrenze entsprach gleichzeitig der Konzentration des niedrigsten Kalibrierstandards (siehe *Tabelle 12*). Für die Durchführung wurden Kalibrierstandards einer Kalibriergeraden und sechs Proben, deren Konzentration der Bestimmungsgrenze entsprach, durch Zugabe der entsprechenden Standardlösungen (siehe 1.1.2.2, 2.1.2.2 und 3.1.2.1) zur jeweiligen Matrix hergestellt und wie eingangs beschreiben untersucht.

Tabelle 12: Präzision und Richtigkeit (n = 6) der Proben zur Festlegung der Bestimmungsgrenze in Abhängigkeit von der verwendeten Methode (siehe 5.3)

Substanz	Matrix	Bestimmungsgrenze (ng/mL)	Richtigkeit (%)	Präzision (%)
BDP	KRP-HEPES	20	110.7	6.1
	Plasma	20	103.6	5.3
	Perfusionspuffer (I)	0.4	112.7	3.5
17-BMP	KRP-HEPES	20	116.3	1.8
	Plasma	20	91.7	11.1
	Perfusionspuffer (I)	0.4	95.2	2.9
21-BMP	KRP-HEPES	20	105.0	2.7
	Plasma	20	104.4	19.0
	Perfusionspuffer (I)	1.0	104.1	6.1
B	KRP-HEPES	20	95.8	2.9
	Plasma	20	103.3	15.9
	Perfusionspuffer (I)	1.0	87.9	6.6
THAL	Mikrodialysepuffer	15	90.0	16.8

5.5 Extraktionseffizienz

Die Extraktionseffizienz wurde durch den Quotient zweier Peakflächen berechnet. Der Zähler wurde durch die resultierende Peakfläche einer extrahierten Probe repräsentiert und den Nenner erhielt man durch das Vermessen einer Standardlösung mit einer der extrahierten Probe analogen Konzentration des Analyten [275]. Ausgehend von einer Mehrfachbestimmung konnte die Extraktionseffizienz wie folgt berechnet werden:

Formel 19

$$\text{Extraktionseffizienz} = \frac{n \cdot \sum_{i=1}^m \text{PF}_{\text{Probe}}^i}{m \cdot \sum_{i=1}^n \text{PF}_{\text{Standard}}^i}$$

m	Anzahl der Bestimmungen der Extraktionsproben
n	Anzahl der Bestimmungen der Standardlösungen
$\text{PF}_{\text{Probe}}^i$	Peakfläche des Analyten in der i-ten extrahierten Probe
$\text{PF}_{\text{Standard}}^i$	Peakfläche des Analyten in der i-ten Standardlösung

Als Streuung wurde die dazugehörige Standardabweichung (StAbw) gemäß dem Fehlerfortpflanzungsgesetz nach Gauß angegeben:

Formel 20

$$\text{StAbw} = \sqrt{[(\text{RSD}_{\text{Probe}})^2 + (\text{RSD}_{\text{Standard}})^2] \cdot (\text{ExEff})^2}$$

ExEff	Berechnete Extraktionseffizienz
$\text{RSD}_{\text{Probe}}$	RSD der Peakflächen des Analyten in den extrahierten Proben
$\text{RSD}_{\text{Standard}}$	RSD der Peakflächen des Analyten in den Standardlösungen

5.5.1 Bestimmung von BDP und dessen Metabolite 17-BMP, 21-BMP und B

Für die Bestimmung der GC in KRP-HEPES wurden zunächst drei methanolische Standardlösungen E11, E12 und E13 hergestellt, die BDP, 17-BMP, 21-BMP, B und FP in folgenden Konzentrationen enthielten:

- E11: BDP, 17-BMP, 21-BMP und B je 350 ng/mL; FP 3.0 µg/mL;
- E12: BDP, 17-BMP, 21-BMP und B je 4.5 µg/mL; FP 3.0 µg/mL;
- E13: BDP, 17-BMP, 21-BMP und B je 8.0 µg/mL; FP 3.0 µg/mL;

Dann wurden je sechs Aliquots Matrix mit 50 µL E11, E12 oder E13 versetzt und dem üblichen Messverfahren zugeführt. Gleichzeitig hierzu wurden von jeder Standardlösung sechs Aliquots von je 50 µL in ein HPLC-Probengefäß überführt, dort mit 150 µL MeOH vermischt und anschließend analog zu den Extraktionsproben über Nacht bei -20 °C gelagert. Am Tag der Probenaufbereitung wurden diese Lösungen wieder auf RT erwärmt und zusammen mit den extrahierten Proben vermessen. Die Extraktion der Proben erfolgte analog zu der von Kalibrierstandards (siehe 1.4.1.1), nur dass kein interner Standard mehr zupipettiert wurde (siehe *Tabelle 13*).

Dieses Verfahren wurde auch bei der Ermittlung der Extraktionseffizienz aus humanem Plasma angewendet (siehe *Tabelle 13*). Die hierbei angesetzten Standardlösungen E21, E22 und E23 wiesen folgende GC-Konzentrationen auf:

- E21: BDP, 17-BMP, 21-BMP und B je 0.5 µg/mL; FP 3.0 µg/mL;
- E22: BDP, 17-BMP, 21-BMP und B je 6.0 µg/mL; FP 3.0 µg/mL;
- E23: BDP, 17-BMP, 21-BMP und B je 12.0 µg/mL; FP 3.0 µg/mL;

Es ist wieder zu beachten, dass die Aufarbeitung der Extraktionsproben zwar analog zu der von Kalibrierstandards vollzogen wurde, allerdings wieder ohne Zugabe des internen Standards (siehe 1.4.1.1).

Bei der HPLC-MS/MS-Methode wurde ebenfalls größtenteils nach diesem Schema vorgegangen (siehe *Tabelle 13*). Hergestellt wurden wieder methanolische Standardlösungen mit bekannten GC-Konzentrationen:

- E31: BDP und 17-BMP je 16 ng/mL; 21-BMP und B je 40 ng/mL; FP 150 ng/mL;
- E32: BDP, 17-BMP, 21-BMP und B je 140 ng/mL; kein FP;
- E33: BDP, 17-BMP, 21-BMP und B je 260 ng/mL; kein FP;

Auch das Versetzen der dreimal sechs Aliquots an Matrix mit je 50µL Standardlösung E31, E32 oder E33 wurde beibehalten. Nur bei den Standardlösungen konnte hier auf jegliches Verdünnen in den HPLC-Probengefäßen verzichtet werden. Bei der Probenaufarbeitung wurde bis auf die Zugabe der Interner-Standard-Lösung wiederum analog zu den Kalibrierstandards verfahren (siehe 3.4.1.2).

Tabelle 13: Extraktionseffizienz \pm Standardabweichung (n = 6) bei der Bestimmung von BDP und dessen Metabolite 17-BMP, 21-BMP und B

HPLC-UV: KRP-HEPES			
<i>Substanz</i>	<i>Extraktionseffizienz (%)</i>		
	35*	450*	800*
BDP	96.4 \pm 4.6	101.1 \pm 2.0	103.8 \pm 2.3
17-BMP	97.4 \pm 6.4	99.1 \pm 2.2	102.6 \pm 2.1
21-BMP	97.3 \pm 4.2	100.6 \pm 1.6	103.8 \pm 2.2
B	96.3 \pm 5.8	99.5 \pm 4.0	101.4 \pm 2.8
FP ⁺	98.3 \pm 2.7	100.7 \pm 1.9	103.6 \pm 2.4
HPLC-UV: Plasma			
<i>Substanz</i>	<i>Extraktionseffizienz (%)</i>		
	50*	600*	1200*
BDP	107.6 \pm 13.0	99.4 \pm 6.5	105.5 \pm 3.8
17-BMP	94.8 \pm 7.5	99.4 \pm 5.2	104.9 \pm 4.0
21-BMP	90.2 \pm 13.8	98.0 \pm 4.7	104.9 \pm 3.8
B	108.6 \pm 6.4	99.7 \pm 5.5	106.3 \pm 3.0
FP ⁺	97.8 \pm 6.2	98.7 \pm 5.1	105.3 \pm 4.0
HPLC-MS/MS: Perfusionspuffer (I)			
<i>Substanz</i>	<i>Extraktionseffizienz (%)</i>		
	0.8 / 2.0 [#]	7.0*	13.0*
BDP	90.8 \pm 9.91	80.8 \pm 7.0	87.2 \pm 8.2
17-BMP	80.5 \pm 11.87	77.4 \pm 7.8	82.2 \pm 3.9
21-BMP	101.8 \pm 14.21	104.0 \pm 8.9	111.6 \pm 14.3
B	84.9 \pm 9.66	78.3 \pm 6.3	84.6 \pm 5.6
FP ⁺	-	88.5 \pm 8.37	-

* Konzentrationsniveau der Extraktionsproben in ng/mL;

Konzentrationsniveau der Extraktionsproben in ng/mL: BDP und 17-BMP 0.8, 21-BMP und B 2.0;

+ Konzentrationsniveau des internen Standards immer gleich (siehe Text);

5.5.2 Bestimmung von THAL in verschiedenen Matrices

Aufgrund der verschiedenen Matrices, in denen THAL quantifiziert werden sollte, wurde auch hier die Extraktionseffizienz sowohl in der Matrix der Kalibrierstandards als auch in den Matrices KRP-HEPES, Perfusionspuffer (II), humanes Blutplasma und peripheres humanes Lungengewebe bestimmt. Ähnlich zu den Qualitätsstandards in Kapitel 5.3.2 wurden die eingesetzten Konzentrationsniveaus bei den zusätzlich untersuchten Matrices wieder auf die zu erwartenden Zielkonzentrationen eingeschränkt. Ansonsten wurden stellvertretend drei Konzentrationen verteilt auf den gesamten Kalibrierbereich getestet (siehe *Tabelle 14*). Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Matrices, die für die Extraktionsproben verwendet wurden, können Kapitel 5.3.2 entnommen werden. Pro Konzentrationsniveau und Matrix wurden sechs Bestimmungen durchgeführt, nur die Extraktion aus Lungengewebe erfolgte als Vierfachbestimmung (siehe *Tabelle 14*).

Zunächst wurden Standardlösungen hergestellt. Ausgehend von den Stammlösungen der Konzentration 1 mg/mL (siehe 3.1.2.1) wurden mit einem Gemisch aus 30 % (V/V) Acetonitril und 0.15 % (V/V) Ameisensäure in Wasser als Lösungsmittel die Verdünnungen E1, E2 und E3 erzeugt:

- E1: THAL 40 ng/mL; PHEN 750 ng/mL;
- E2: THAL 600 ng/mL; PHEN 750 ng/mL;
- E3: THAL 1300 ng/mL; PHEN 750 ng/mL;

Dann wurden zu den Aliquots mit Mikrodialysepuffer als Matrix je 50 µL Lösung E1, E2 oder E3, zu denen mit KRP-HEPES und Lungengewebe je 50 µL E2 und zu denen mit Perfusionspuffer (II) und Plasma je 50 µL E3 pipettiert. Von den Verdünnungen E1, E2 und E3 wurden anschließend je sechs Aliquots in HPLC-Probengefäße überführt und mit den Extraktionsproben bei -20 °C eingefroren. Am nächsten Tag wurden alle Proben bei RT aufgetaut und die Extraktionsproben weiter aufgearbeitet, wobei die Extraktionsmethode der von Kalibrierstandards entsprach, ohne jedoch die Proben vorher nochmals mit internem Standard zu versehen (siehe 3.4.1.2).

Tabelle 14: Extraktionseffizienz \pm Standardabweichung (Lungengewebe n = 4, ansonsten n =6) zur Bestimmung von THAL in verschiedenen Matrices

Substanz	Matrix	Extraktionseffizienz (%)		
		40*	600*	1300*
THAL	MD-Puffer	88.5 \pm 11.5	87.1 \pm 10.2	88.3 \pm 7.4
	KRP-HEPES	-	92.1 \pm 7.9	-
	Perfusionspuffer (II)	-	-	91.5 \pm 4.9
	Plasma	-	-	93.0 \pm 5.6
	Lungengewebe	-	91.3 \pm 4.6	-
PHEN [#]	MD-Puffer	99.1 \pm 8.7	99.7 \pm 9.9	101.9 \pm 4.0
	KRP-HEPES	-	97.9 \pm 4.6	-
	Perfusionspuffer (II)	-	-	95.8 \pm 6.1
	Plasma	-	-	96.9 \pm 7.0
	Lungengewebe	-	92.6 \pm 3.2	-

* Konzentrationsniveau der Extraktionsproben in ng/mL;

Konzentrationsniveau des internen Standards immer gleich (siehe Text);

Analog zu den Qualitätsstandards wurde auch hier statistisch getestet, ob die Matrices unabhängige Einflussvariablen in Bezug auf die Extraktionseffizienz waren. Dabei wurde nicht nur die Extraktionseffizienz von THAL, sondern auch die von PHEN überprüft. Zur Anwendung kam eine einfaktorielle, univariate Varianzanalyse mit der Matrix als unabhängige Variable und dem jeweiligen Konzentrationsniveau als abhängige. Es konnte weder bei THAL (600 ng/mL bzw. 600 ng/mg Gewebe: $p = 0.5608$; 1300 ng/mL: $p = 0.4096$) noch bei PHEN ($p = 0.4543$) ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

D. Tabellarischer Anhang

1 *In-vitro*-Untersuchungen zur pulmonalen Absorption von Beclomethasondipropionat nach Freisetzung aus den handelsüblichen Dosieraerosolen Sanasthmax[®] und Ventolair[®]

1.1 Dialysemodell

1.1.1 Versuche mit Sanasthmax[®]

1.1.1.1 Tatsächlich applizierte Dosis

Tatsächlich applizierte Dosis in µg			
Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittelwert ± MAbwM
130	157	172	153 ± 15

MAbwM Mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert

1.1.1.2 Dialyseflüssigkeit: KRP-HEPES

Zeitpunkt (min)	Konzentration (ng/mL) im Dialysat											
	Versuch 1				Versuch 2				Versuch 3			
	BDP	17-BMP	21-BMP	B	BDP	17-BMP	21-BMP	B	BDP	17-BMP	21-BMP	B
0	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
15	23	n. n.	n. n.	n. n.	56	n. n.	n. n.	n. n.	66	n. n.	n. n.	n. n.
30	60	n. n.	n. n.	n. n.	39	n. n.	n. n.	n. n.	108	32	n. n.	n. n.
60	100	67	n. n.	n. n.	148	72	n. n.	n. n.	134	73	n. n.	n. n.
90	94	112	n. n.	n. n.	136	105	n. n.	n. n.	207	166	n. n.	21
120	161	292	n. n.	n. n.	222	248	n. n.	n. n.	207	264	n. n.	23
180	157	424	22	n. n.	181	500	22	n. n.	218	527	32	25
240	118	761	41	n. n.	161	767	44	n. n.	190	721	52	35
360	72	806	97	36	145	1159	103	31	133	952	90	52

n. n. Nicht nachweisbar

Zeitpunkt (min)	In das Dialysat freigesetzter Anteil der Dosis (%)								
	Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
	Gesamt	als BDP	als 17-BMP	Gesamt	als BDP	als 17-BMP	Gesamt	als BDP	als 17-BMP
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
15	0.1	0.1	0.0	0.3	0.3	0.0	0.4	0.4	0.0
30	0.4	0.4	0.0	0.3	0.3	0.0	0.9	0.7	0.2
60	1.1	0.7	0.5	1.5	1.0	0.5	1.4	0.9	0.5
90	1.5	0.6	0.8	1.7	0.9	0.8	2.8	1.4	1.2
120	3.2	1.1	2.1	3.3	1.5	1.8	3.6	1.5	1.9
180	4.4	1.1	3.1	5.1	1.3	3.7	5.9	1.6	3.9
240	6.9	0.9	5.7	7.3	1.3	5.7	7.6	1.5	5.4
360	7.9	0.7	6.2	10.9	1.2	8.7	9.6	1.2	7.3

Zeitpunkt (min)	Mittelwert \pm MAbwM							
	Konzentration (ng/mL) im Dialysat				In das Dialysat freigesetzter Anteil der Dosis (%)			
	BDP	17-BMP	21-BMP	B	Gesamt	als BDP	als 17-BMP	
0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	
15	48 \pm 17	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0.3 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	
30	69 \pm 26	11 \pm 14	0 \pm 0	0 \pm 0	0.5 \pm 0.3	0.4 \pm 0.2	0.1 \pm 0.1	
60	128 \pm 18	71 \pm 2	0 \pm 0	0 \pm 0	1.3 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1	0.5 \pm 0.0	
90	146 \pm 41	127 \pm 26	0 \pm 0	7 \pm 9	2.0 \pm 0.5	1.0 \pm 0.3	0.9 \pm 0.2	
120	197 \pm 24	268 \pm 16	0 \pm 0	8 \pm 10	3.4 \pm 0.2	1.4 \pm 0.2	2.0 \pm 0.1	
180	185 \pm 22	483 \pm 40	25 \pm 4	8 \pm 11	5.2 \pm 0.5	1.3 \pm 0.2	3.6 \pm 0.3	
240	156 \pm 26	750 \pm 19	46 \pm 4	12 \pm 16	7.3 \pm 0.2	1.2 \pm 0.2	5.6 \pm 0.1	
360	117 \pm 30	972 \pm 124	96 \pm 4	40 \pm 8	9.5 \pm 1.1	1.0 \pm 0.2	7.4 \pm 0.9	

MAbwM Mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert

1.1.1.3 Dialyseflüssigkeit: Humanes Blutplasma

Zeitpunkt (min)	Konzentration (ng/mL) im Dialysat											
	Versuch 1				Versuch 2				Versuch 3			
	BDP	17-BMP	21-BMP	B	BDP	17-BMP	21-BMP	B	BDP	17-BMP	21-BMP	B
0	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	22	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
15	413	130	n. n.	n. n.	261	46	n. n.	n. n.	67	107	n. n.	n. n.
30	367	149	n. n.	n. n.	455	149	n. n.	n. n.	100	237	n. n.	n. n.
60	846	658	n. n.	n. n.	832	435	n. n.	n. n.	128	520	n. n.	n. n.
90	866	1073	n. n.	n. n.	1091	795	n. n.	n. n.	178	1109	25	n. n.
120	764	1412	n. n.	n. n.	1253	1209	n. n.	n. n.	178	1376	40	24
180	558	1908	37	25	1624	2394	35	34	212	2168	86	65
240	399	2033	41	41	1373	3079	114	52	208	2668	133	129
360	397	3240	98	116	558	2178	76	57	198	3439	285	359

n. n. Nicht nachweisbar

Zeitpunkt (min)	In das Dialysat freigesetzter Anteil der Dosis (%)								
	Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
	Gesamt	als BDP	als 17-BMP	Gesamt	als BDP	als 17-BMP	Gesamt	als BDP	als 17-BMP
0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
15	3.5	2.6	0.9	2.0	1.6	0.3	1.2	0.4	0.7
30	3.5	2.4	1.1	4.0	2.9	1.1	2.3	0.6	1.7
60	10.2	5.5	4.7	8.6	5.4	3.1	4.6	0.9	3.8
90	13.8	5.9	7.9	13.1	7.3	5.8	9.5	1.2	8.1
120	16.2	5.6	10.6	17.7	8.7	9.0	12.1	1.3	10.4
180	19.6	4.5	14.6	29.7	11.4	17.7	19.1	1.5	16.4
240	20.6	3.7	16.2	35.0	10.4	23.4	24.3	1.6	20.7
360	30.9	3.9	25.4	25.0	5.7	18.2	33.7	1.6	27.1

Zeitpunkt (min)	Mittelwert \pm MAbwM						
	Konzentration (ng/mL) im Dialysat				In das Dialysat freigesetzter Anteil der Dosis (%)		
	BDP	17-BMP	21-BMP	B	Gesamt	als BDP	als 17-BMP
0	7 \pm 10	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0.0 \pm 0.1	0.0 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0
15	247 \pm 120	94 \pm 32	0 \pm 0	0 \pm 0	2.2 \pm 0.9	1.5 \pm 0.7	0.7 \pm 0.2
30	308 \pm 138	179 \pm 39	0 \pm 0	0 \pm 0	3.3 \pm 0.6	2.0 \pm 0.9	1.3 \pm 0.3
60	602 \pm 316	537 \pm 80	0 \pm 0	0 \pm 0	7.8 \pm 2.1	3.9 \pm 2.1	3.9 \pm 0.6
90	712 \pm 356	992 \pm 132	8 \pm 11	0 \pm 0	12.1 \pm 1.8	4.8 \pm 2.4	7.2 \pm 1.0
120	732 \pm 369	1332 \pm 82	13 \pm 18	8 \pm 11	15.3 \pm 2.2	5.2 \pm 2.6	10.0 \pm 0.7
180	798 \pm 551	2157 \pm 166	53 \pm 22	41 \pm 16	22.8 \pm 4.6	5.8 \pm 3.7	16.2 \pm 1.1
240	660 \pm 475	2594 \pm 374	96 \pm 37	74 \pm 37	26.6 \pm 5.6	5.2 \pm 3.4	20.1 \pm 2.6
360	384 \pm 124	2952 \pm 516	153 \pm 88	177 \pm 121	29.9 \pm 3.2	3.7 \pm 1.4	23.6 \pm 3.6

MABwM Mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert

1.1.2 Versuche mit Ventolair®

1.1.2.1 Tatsächlich applizierte Dosis

Tatsächlich applizierte Dosis in μ g			
Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittelwert \pm MAbwM
59	63	60	61 \pm 2

MABwM Mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert

1.1.2.2 Dialyseflüssigkeit: KRP-HEPES

Zeitpunkt (min)	Konzentration (ng/mL) im Dialysat											
	Versuch 1				Versuch 2				Versuch 3			
	BDP	17-BMP	21-BMP	B	BDP	17-BMP	21-BMP	B	BDP	17-BMP	21-BMP	B
0	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
15	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	25	n. n.	n. n.	91	28	n. n.	n. n.
30	27	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	118	37	n. n.	n. n.
60	55	52	n. n.	n. n.	20	n. n.	n. n.	n. n.	189	109	n. n.	n. n.
90	122	130	n. n.	n. n.	32	n. n.	n. n.	n. n.	245	203	n. n.	26
120	122	203	n. n.	n. n.	41	28	n. n.	n. n.	200	222	n. n.	24
180	133	332	n. n.	n. n.	88	257	n. n.	n. n.	242	402	25	24
240	109	442	22	n. n.	99	313	22	n. n.	181	473	31	24
360	86	542	46	n. n.	85	506	53	n. n.	117	619	54	38

n. n. Nicht nachweisbar

Zeitpunkt (min)	In das Dialysat freigesetzter Anteil der Dosis (%)								
	Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
	Gesamt	als BDP	als 17-BMP	Gesamt	als BDP	als 17-BMP	Gesamt	als BDP	als 17-BMP
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
15	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.4	1.9	1.4	0.5
30	0.4	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	1.9	0.7
60	1.8	0.9	0.9	0.3	0.3	0.0	5.1	3.1	2.0
90	4.3	2.0	2.3	0.5	0.5	0.0	8.5	4.2	3.7
120	5.8	2.1	3.7	1.2	0.7	0.5	8.4	3.7	4.3
180	8.6	2.4	6.2	6.1	1.5	4.6	13.1	4.5	7.6
240	11.0	2.1	8.5	7.9	1.7	5.8	14.1	3.7	9.3
360	13.3	1.8	10.6	12.0	1.6	9.5	17.0	2.9	12.3

Zeitpunkt (min)	Mittelwert \pm MAbwM						
	Konzentration (ng/mL) im Dialysat				In das Dialysat freigesetzter Anteil der Dosis (%)		
	BDP	17-BMP	21-BMP	B	Gesamt	als BDP	als 17-BMP
0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
15	30 \pm 41	17 \pm 12	0 \pm 0	0 \pm 0	0.8 \pm 0.8	0.5 \pm 0.6	0.3 \pm 0.2
30	49 \pm 47	12 \pm 16	0 \pm 0	0 \pm 0	1.0 \pm 1.1	0.8 \pm 0.8	0.2 \pm 0.3
60	88 \pm 67	54 \pm 37	0 \pm 0	0 \pm 0	2.4 \pm 1.8	1.5 \pm 1.1	1.0 \pm 0.7
90	133 \pm 75	111 \pm 74	0 \pm 0	9 \pm 12	4.4 \pm 2.7	2.2 \pm 1.3	2.0 \pm 1.3
120	121 \pm 53	151 \pm 82	0 \pm 0	8 \pm 11	5.2 \pm 2.6	2.2 \pm 1.0	2.8 \pm 1.6
180	155 \pm 58	330 \pm 49	8 \pm 11	8 \pm 11	9.3 \pm 2.6	2.8 \pm 1.2	6.1 \pm 1.0
240	130 \pm 34	409 \pm 64	25 \pm 4	8 \pm 11	11.0 \pm 2.1	2.5 \pm 0.8	7.8 \pm 1.4
360	96 \pm 14	556 \pm 42	51 \pm 3	13 \pm 17	14.1 \pm 1.9	2.1 \pm 0.5	10.8 \pm 1.0

MAbwM Mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert

1.1.2.3 Dialyseflüssigkeit: Humanes Blutplasma

Zeitpunkt (min)	Konzentration (ng/mL) im Dialysat											
	Versuch 1				Versuch 2				Versuch 3			
	BDP	17-BMP	21-BMP	B	BDP	17-BMP	21-BMP	B	BDP	17-BMP	21-BMP	B
0	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
15	109	25	n. n.	n. n.	99	n. n.	n. n.	n. n.	88	108	n. n.	n. n.
30	308	127	n. n.	n. n.	180	58	n. n.	n. n.	166	312	n. n.	n. n.
60	591	446	n. n.	n. n.	300	156	n. n.	n. n.	230	715	n. n.	n. n.
90	870	986	n. n.	n. n.	454	344	n. n.	n. n.	263	1187	n. n.	n. n.
120	738	1004	n. n.	n. n.	535	524	n. n.	n. n.	252	1420	33	n. n.
180	687	1540	32	n. n.	648	1006	n. n.	n. n.	261	2090	67	44
240	625	1954	45	27	621	1505	n. n.	n. n.	227	2430	112	99
360	449	2107	68	62	682	2415	58	52	224	3213	196	282

n. n. Nicht nachweisbar

Zeitpunkt (min)	In das Dialysat freigesetzter Anteil der Dosis (%)								
	Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3		
	Gesamt	als BDP	als 17-BMP	Gesamt	als BDP	als 17-BMP	Gesamt	als BDP	als 17-BMP
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
15	2.2	1.7	0.4	1.6	1.6	0.0	3.3	1.4	1.9
30	7.2	4.9	2.3	3.9	2.9	1.0	8.3	2.7	5.6
60	17.7	9.6	8.0	7.8	5.0	2.8	16.8	3.8	13.0
90	32.5	14.5	17.9	13.9	7.6	6.3	26.5	4.5	22.0
120	32.3	13.2	19.2	19.0	9.3	9.8	32.4	4.6	27.2
180	43.1	13.0	29.6	30.2	11.5	18.7	47.4	4.9	40.3
240	52.2	12.6	38.3	40.1	11.6	28.5	57.0	4.6	48.3
360	55.6	10.3	42.8	61.1	13.1	45.9	78.5	4.7	64.3

Zeitpunkt (min)	Mittelwert \pm MAbwM							
	Konzentration (ng/mL) im Dialysat				In das Dialysat freigesetzter Anteil der Dosis (%)			
	BDP	17-BMP	21-BMP	B	Gesamt	als BDP	als 17-BMP	
0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	
15	99 \pm 7	44 \pm 43	0 \pm 0	0 \pm 0	2.3 \pm 0.6	1.6 \pm 0.1	0.8 \pm 0.8	
30	218 \pm 60	166 \pm 98	0 \pm 0	0 \pm 0	6.5 \pm 1.7	3.5 \pm 0.9	3.0 \pm 1.8	
60	374 \pm 145	439 \pm 189	0 \pm 0	0 \pm 0	14.1 \pm 4.2	6.1 \pm 2.3	7.9 \pm 3.4	
90	529 \pm 227	839 \pm 330	0 \pm 0	0 \pm 0	24.3 \pm 6.9	8.9 \pm 3.8	15.4 \pm 6.1	
120	508 \pm 171	983 \pm 306	11 \pm 15	0 \pm 0	27.9 \pm 5.9	9.0 \pm 3.0	18.7 \pm 6.0	
180	532 \pm 181	1545 \pm 363	33 \pm 23	15 \pm 19	40.2 \pm 6.7	9.8 \pm 3.2	29.5 \pm 7.2	
240	491 \pm 176	1963 \pm 311	52 \pm 39	42 \pm 38	49.8 \pm 6.4	9.6 \pm 3.3	38.4 \pm 6.6	
360	451 \pm 154	2578 \pm 423	107 \pm 59	132 \pm 100	65.1 \pm 9.0	9.4 \pm 3.1	51.0 \pm 8.9	

MAbwM Mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert

1.2 Humanes Lungenperfusionsmodell

1.2.1 Anpassung der Zusammensetzung des Perfusionspuffers

Es wurde ein Versuch am entwickelten Dialysemmodell gemäß der in Kapitel 1, C - Experimenteller Teil, beschriebenen Vorschrift für Blutplasma als Dialyseflüssigkeit durchgeführt, wobei Perfusionspuffer I als Dialyseflüssigkeit und das Dosieraerosol Sanasthmax[®] für die Applikation des Beclomethasondipropionats verwendet wurde. Der erhaltene Dialyseverlauf wurde dann mit den entsprechenden Experimenten mit Plasma verglichen (siehe hierzu 1.1.1.3).

Zeitpunkt (min)	Konzentration (ng/mL) im Dialysat				In das Dialysat freigesetzter Anteil der Dosis (%)
	<i>BDP</i>	<i>17-BMP</i>	<i>21-BMP</i>	<i>B</i>	
0	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	0.0
15	135	405	n. n.	n. n.	3.7
30	175	727	28	n. n.	6.6
60	194	1143	71	n. n.	10.2
90	197	1511	133	21	13.9
120	224	1934	248	42	18.7
180	225	2744	600	96	28.2
240	175	2558	788	140	29.6
360	149	2573	1404	302	36.4

n. n. Nicht nachweisbar

1.2.2 Versuche mit Sanasthmax[®]

1.2.2.1 Perfusionsbedingungen

Lungenperfusion	Tatsächlich applizierte Dosis (µg)	Gewicht des Lungengewebes (g)		
		<i>Vor Versuchsbeginn</i>	<i>Nach Versuchsabbruch</i>	<i>Prozentuale Gewichtszunahme</i>
1	363	419	692	65.2
2	334	204	349	71.1
3	331	348	410	17.8

1.2.2.2 Ergebnisse

Zeitpunkt (min)	Konzentration (ng/mL) in der Perfusionsflüssigkeit											
	Lungenperfusion 1				Lungenperfusion 2				Lungenperfusion 3			
	BDP	17-BMP	21-BMP	B	BDP	17-BMP	21-BMP	B	BDP	17-BMP	21-BMP	B
2	0.63	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	0.20	n. n.	n. n.	n. n.
12	0.25	1.90	n. n.	n. n.	0.49	1.57	n. n.	n. n.	0.54	0.94	n. n.	n. n.
22	n. n.	1.79	n. n.	n. n.	0.32	1.24	n. n.	n. n.	0.38	1.22	n. n.	n. n.
32	n. n.	3.20	n. n.	n. n.	0.33	2.11	n. n.	0.63	0.35	1.97	n. n.	n. n.
47	n. n.	2.18	n. n.	n. n.	0.62	3.79	n. n.	n. n.	n. n.	3.17	n. n.	0.55
62	n. n.	3.85	n. n.	0.67	-	-	-	-	-	-	-	-
82	n. n.	6.89	n. n.	1.25	-	-	-	-	-	-	-	-
102	n. n.	7.01	n. n.	1.24	-	-	-	-	-	-	-	-

- Daten wurden nicht erhoben.

n. n. Nicht nachweisbar

Zeitpunkt (min)	In die Perfusionsflüssigkeit freigesetzter Anteil der Dosis (%)								
	Lungenperfusion 1			Lungenperfusion 2			Lungenperfusion 3		
	Gesamt	als BDP	als 17-BMP	Gesamt	als BDP	als 17-BMP	Gesamt	als BDP	als 17-BMP
2	0.3	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0
12	1.0	0.1	0.9	1.0	0.2	0.8	0.7	0.3	0.5
22	0.8	0.0	0.8	0.8	0.2	0.6	0.8	0.2	0.6
32	1.5	0.0	1.5	1.6	0.2	1.1	1.2	0.2	1.0
47	1.0	0.0	1.0	2.2	0.3	1.9	1.9	0.0	1.6
62	2.1	0.0	1.8	-	-	-	-	-	-
82	3.8	0.0	3.2	-	-	-	-	-	-
102	3.9	0.0	3.2	-	-	-	-	-	-

- Daten wurden nicht erhoben.

Zeitpunkt (min)	Mittelwert \pm MAbwM						
	Konzentration (ng/mL) im Dialysat				In die Perfusionsflüssigkeit freigesetzter Anteil der Dosis (%)		
	BDP	17-BMP	21-BMP	B	Gesamt	als BDP	als 17-BMP
2	0.28 \pm 0.24	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0
12	0.43 \pm 0.12	1.47 \pm 0.35	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.9 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.7 \pm 0.2
22	0.24 \pm 0.26	1.42 \pm 0.25	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.8 \pm 0.0	0.1 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1
32	0.23 \pm 0.15	2.43 \pm 0.52	0.00 \pm 0.00	0.21 \pm 0.28	1.4 \pm 0.2	0.1 \pm 0.1	1.2 \pm 0.2
47	0.21 \pm 0.28	3.05 \pm 0.58	0.00 \pm 0.00	0.18 \pm 0.24	1.7 \pm 0.5	0.1 \pm 0.1	1.5 \pm 0.3

MAbwM Mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert

1.2.3 Versuche mit Ventolair®

1.2.3.1 Perfusionsbedingungen

Lungen- perfusion	Tatsächlich applizierte Dosis (μ g)	Gewicht des Lungengewebes (g)		
		Vor Versuchs- beginn	Nach Versuchs- abbruch	Prozentuale Gewichtszunahme
1	332	214	356	61.1
2	419	314	324	3.2
3	425	207	270	30.4

1.2.3.2 Ergebnisse

Zeitpunkt (min)	Konzentration (ng/mL) in der Perfusionsflüssigkeit											
	<i>Lungenperfusion 1</i>				<i>Lungenperfusion 2</i>				<i>Lungenperfusion 3</i>			
	BDP	17-BMP	21-BMP	B	BDP	17-BMP	21-BMP	B	BDP	17-BMP	21-BMP	B
3	1.54	0.69	n. n.	n. n.	0.96	n. n.	n. n.	n. n.	3.95	0.81	n. n.	n. n.
13	1.04	10.99	n. n.	n. n.	0.45	1.16	n. n.	n. n.	2.58	5.99	n. n.	n. n.
23	0.85	5.59	n. n.	0.89	1.06	3.67	n. n.	n. n.	0.72	3.02	n. n.	n. n.
33	0.38	8.85	n. n.	2.98	0.21	2.90	n. n.	0.77	0.31	3.22	n. n.	n. n.
48	n. n.	9.37	n. n.	2.49	n. n.	2.18	n. n.	n. n.	n. n.	2.99	n. n.	0.58
63	-	-	-	-	0.22	2.78	n. n.	n. n.	-	-	-	-

- Daten wurden nicht erhoben.

n. n. Nicht nachweisbar

Zeitpunkt (min)	In die Perfusionsflüssigkeit freigesetzter Anteil der Dosis (%)								
	<i>Lungenperfusion 1</i>			<i>Lungenperfusion 2</i>			<i>Lungenperfusion 3</i>		
	Gesamt	als BDP	als 17-BMP	Gesamt	als BDP	als 17-BMP	Gesamt	als BDP	als 17-BMP
3	1.0	0.8	0.4	0.3	0.4	0.0	1.7	1.6	0.3
13	6.0	0.5	5.6	0.6	0.2	0.5	3.3	1.0	2.4
23	3.7	0.4	2.8	1.9	0.4	1.5	1.4	0.3	1.2
33	6.4	0.2	4.5	1.6	0.1	1.2	1.4	0.1	1.3
48	6.2	0.0	4.7	0.9	0.0	0.9	1.5	0.0	1.2
63	-	-	-	1.2	0.1	1.1	-	-	-

- Daten wurden nicht erhoben.

Zeitpunkt (min)	Mittelwert \pm MAbwM							
	Konzentration (ng/mL) im Dialysat				In die Perfusionsflüssigkeit freigesetzter Anteil der Dosis (%)			
	BDP	17-BMP	21-BMP	B	Gesamt	als BDP	als 17-BMP	
3	2.15 \pm 1.20	0.50 \pm 0.33	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	1.0 \pm 0.5	0.9 \pm 0.4	0.2 \pm 0.1	
13	1.36 \pm 0.81	6.05 \pm 3.30	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	3.3 \pm 1.8	0.6 \pm 0.3	2.8 \pm 1.8	
23	0.88 \pm 0.12	4.09 \pm 1.00	0.00 \pm 0.00	0.30 \pm 0.40	2.3 \pm 0.9	0.4 \pm 0.1	1.8 \pm 0.7	
33	0.30 \pm 0.06	4.99 \pm 2.58	0.00 \pm 0.00	1.25 \pm 1.15	3.1 \pm 2.2	0.1 \pm 0.0	2.3 \pm 1.5	
48	0.00 \pm 0.00	4.85 \pm 3.02	0.00 \pm 0.00	1.02 \pm 0.98	2.8 \pm 2.2	0.0 \pm 0.0	2.3 \pm 1.7	

MAbwM Mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert

2 *In-vitro*-Untersuchung zur Bestimmung von Thalidomid-Konzentrationen mittels Mikrodialyse

2.1 Etablierung und Optimierung des Mikrodialysesystems

2.1.1 Optimierung des Perfusatflusses mit Krebs-Ringer-HEPES-Puffer als Perfusat

2.1.1.1 Experimentelle Daten

Fluss ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Peakflächen- verhältnis der Matrixproben	Berechnete RR (%)				
		Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Mittelwert \pm StAbw
2	0.84380	56.1	49.6	75.8	45.1	56.7 \pm 13.5
3	1.27176	49.0	37.4	47.7	43.8	44.5 \pm 5.2
4	1.89919	22.3	31.0	25.6	34.8	28.4 \pm 5.6

RR Relative Recovery

2.1.1.2 Ermittelte Funktion des mathematischen Modells

Die vorliegende Funktion zur Ermittlung des Flusses, bei dem die aus dem Dialysat extrahierbare Menge THAL maximal ist, wird im Detail in Kapitel 3.5.1, C - Experimenteller Teil, erläutert.

$$A_{\text{extrahierbar}} = 10 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \cdot e^{0.156 - 0.345 \frac{\text{min}}{\mu\text{L}} \cdot F} \cdot F \cdot 10 \text{ min}$$

$A_{\text{extrahierbar}}$ Extrahierbare Menge THAL aus Dialysatprobe [ng]
 F Perfusatfluss [$\mu\text{L}/\text{min}$]

2.1.2 Steigerung der relativen Recovery durch Variation der Perfusat-zusammensetzung

KRP-HEPES + ...	Peakflächen- verhältnis der Matrixproben	Berechnete RR (%)				
		Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Mittelwert ± StAbw
-	1.55397	49.6	37.3	46.1	40.7	43.4 ± 5.5
2 % (m/V) BSA	1.49838	33.4	17.0	25.5	22.9	24.7 ± 6.8
2 % (m/V) HPCD	1.53393	62.3	42.3	58.8	42.6	51.5 ± 10.6
3 % (m/V) HPCD	1.24700	50.4	64.7	57.3	54.9	56.8 ± 6.0
5 % (m/V) HPCD	1.17169	62.1	67.0	71.0	54.2	63.6 ± 7.3
7.5 % (m/V) HPCD	1.33958	80.8	71.6	66.4	84.5	75.8 ± 8.3
10 % (m/V) HPCD	1.21389	83.5	84.5	84.4	80.7	83.3 ± 1.7
15 % (m/V) HPCD	1.12284	56.8	49.8	52.6	53.2	53.1 ± 2.9
20 % (m/V) HPCD	1.27893	62.9	73.6	72.6	77.5	71.7 ± 6.2

RR Relative Recovery
StAbw Standardabweichung

2.1.3 Optimierung des Perfusatflusses mit Mikrodialysepuffer als Perfusat

2.1.3.1 Experimentelle Daten

Fluss ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Peakflächen- verhältnis der Matrixproben	Berechnete RR (%)				
		Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Mittelwert \pm StAbw
2	0.94187	121.6	134.4	127.7	135.1	129.7 \pm 6.3
3	1.08077	98.2	100.6	93.8	97.8	97.6 \pm 2.8
4	1.39184	78.8	71.7	74.3	78.8	75.9 \pm 3.5
4.5	2.11685	74.0	70.2	73.8	71.6	72.4 \pm 1.8
5	1.97477	68.0	68.3	66.1	66.7	67.3 \pm 1.0
6	2.66413	58.7	56.4	51.2	55.8	55.5 \pm 3.1

RR Relative Recovery
StAbw Standardabweichung

2.1.3.2 Ermittelte Funktion des mathematischen Modells

Die vorliegende Funktion zur Ermittlung des Flusses, bei dem die aus dem Dialysat extrahierbare Menge THAL maximal ist, wird im Detail in Kapitel 3.5.1, C - Experimenteller Teil, erläutert.

$$A_{\text{extrahierbar}} = 10 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \cdot e^{0.623 - 0.208 \frac{\text{min}}{\mu\text{L}} \cdot F} \cdot F \cdot 10 \text{ min}$$

$A_{\text{extrahierbar}}$ Extrahierbare Menge THAL aus Dialysatprobe [ng]
F Perfusatfluss [$\mu\text{L}/\text{min}$]

2.2 Systematische Untersuchung der Sondenkalibrierung

2.2.1 Verschiedene Kalibriermethoden

2.2.1.1 Extraktionsmethode

Messung	Gemessene THAL-Konzentration (ng/mL) in Matrix	Gemessene THAL-Konzentration (ng/mL) im Dialysat	Berechnete RR (%)
1	440	261	59.3
2	409	232	56.6
3	395	185	46.8
4	354	177	50.0
5	329	171	52.0
6	302	148	48.9
<i>Mittelwert</i>			52.3
<i>Standardabweichung</i>			4.8

RR Relative Recovery

2.2.1.2 Retrodialyse

Messung	Gemessene THAL-Konzentration (ng/mL) im Perfusat	Gemessene THAL-Konzentration (ng/mL) im Dialysat	Berechnete RR (%)
1	556	379	31.7
2	533	425	23.4
3	547	361	35.0
4	586	371	33.0
5	591	419	24.4
6	513	387	30.2
<i>Mittelwert</i>	555	<i>Mittelwert</i>	29.6
<i>Standardabweichung</i>	30	<i>Standardabweichung</i>	4.7

RR Relative Recovery

2.2.1.3 No-Net-Flux-Methode

Die Regressionsanalyse mit 14 Freiheitsgraden ergab eine Steigung von -0.300 und einen Achsenabschnitt von 567 ng/mL. Der Korrelationskoeffizient betrug dabei -0.8735.

	Perfusat 1	Perfusat 2	Perfusat 3	Perfusat 4
Gemessene THAL-Konzentration (ng/mL) in der Matrix am Ende einer Versuchsreihe	642	769	802	757

	Messung	Gemessene THAL-Konzentration (ng/mL) im Dialysat	Gemessene THAL-Konzentration (ng/mL) im Perfusat	Differenz zwischen Dialysat- und Perfusatkonzentration (ng/mL)
Perfusat 1	1	716	95	639
	2	673	65	595
	3	614	76	536
	4	639	76	561
		<i>Mittelwert ± StAbw</i>	78 ± 13	583 ± 44
Perfusat 2	1	764	326	396
	2	717	331	349
	3	820	409	452
	4	810	406	442
		<i>Mittelwert ± StAbw</i>	368 ± 45	410 ± 47
Perfusat 3	1	1024	726	345
	2	973	636	294
	3	976	683	297
	4	1083	672	403
		<i>Mittelwert ± StAbw</i>	679 ± 37	335 ± 51
Perfusat 4	1	1267	902	352
	2	1234	827	318
	3	1241	1013	325
	4	1237	921	322
		<i>Mittelwert ± StAbw</i>	916 ± 77	329 ± 15

StAbw Standardabweichung

2.2.2 Sondenkalibrierung in verschiedenen Matrices

2.2.2.1 Matrix: Krebs-Ringer-HEPES Puffer

Messung	Extraktionsmethode			Retrodialyse		
	Gemessene THAL-Konzentration (ng/mL)		Berechnete RR (%)	Gemessene THAL-Konzentration (ng/mL)		Berechnete RR (%)
	Matrix	Dialysat		Dialysat	Perfusat	
1	731	245	33.5	507	623	17.5
2	713	288	40.3	486	593	20.9
3	704	229	32.6	474	607	22.9
4	668	264	39.6	506	629	17.7
5	616	211	34.2	498	624	19.0
6	522	229	43.8	469	610	23.7
		<i>Mittelwert</i>	37.3	<i>Mittelwert</i>	615	20.3
		<i>StAbw</i>	4.5	<i>StAbw</i>	14	2.6

RR Relative Recovery
StAbw Standardabweichung

2.2.2.2 Matrix: Gewebesuspension

Die Gesamtgewebekonzentration von THAL betrug am Ende des Versuches 730 ng/g Gewebe.

Messung	Extraktionsmethode			Retrodialyse		
	Gemessene THAL-Konzentration (ng/mL)		Berechnete RR (%)	Gemessene THAL-Konzentration (ng/mL)		Berechnete RR (%)
	Matrix	Dialysat		Dialysat	Perfusat	
1	974	385	39.6	508	676	23.4
2	889	296	33.3	534	693	19.6
3	608	250	41.2	563	685	15.2
4	512	244	47.7	550	585	17.1
5	614	261	42.5	489	657	26.3
6	540	232	42.9	546	688	17.7
		<i>Mittelwert</i>	41.2	<i>Mittelwert</i>	664	19.9
		<i>StAbw</i>	4.7	<i>StAbw</i>	41	4.2

RR Relative Recovery
StAbw Standardabweichung

2.2.2.3 Matrix: Perfusionspuffer

Messung	Gemessene THAL-Konzentration (ng/mL) im Perfusat	Gemessene THAL-Konzentration (ng/mL) im Dialysat	Berechnete RR (%)
1	659	565	10.5
2	660	543	14.1
3	634	578	8.5
4	624	531	16.0
5	587	537	15.0
6	626	557	11.9
<i>Mittelwert</i>	632	<i>Mittelwert</i>	12.7
<i>Standardabweichung</i>	27	<i>Standardabweichung</i>	2.9

RR Relative Recovery

2.2.2.4 Matrix: Humanes Blutplasma

Messung	Gemessene THAL-Konzentration (ng/mL) im Perfusat	Gemessene THAL-Konzentration (ng/mL) im Dialysat	Berechnete RR (%)
1	601	507	14.5
2	581	450	24.1
3	587	488	17.7
4	544	500	15.8
5	561	460	22.4
6	687	503	15.3
<i>Mittelwert</i>	593	<i>Mittelwert</i>	18.3
<i>Standardabweichung</i>	50	<i>Standardabweichung</i>	4.0

RR Relative Recovery

2.2.3 Bestimmung der Proteinbindung

2.2.3.1 Bindung an bovines Serumalbumin

Messung	Gemessene Gesamtkonzentration (ng/mL) von THAL		Proteinbindung gemäß Sondenkalibrierung mittels Retrodialyse (2.2.2.3)		Proteinbindung gemäß Sondenkalibrierung mittels Extraktionsmethode (2.2.2.1)	
	Matrix	Dialysat	Berechnete freie Konzentration (ng/mL)	Berechnete Proteinbindung (%)	Berechnete freie Konzentration (ng/mL)	Berechnete Proteinbindung (%)
1	1023	446	3521	-	1195	-
2	802	390	3081	-	1046	-
3	805	360	2846	-	966	-
4	585	296	2336	-	793	-
5	509	254	2009	-	682	-
6	416	274	2164	-	735	-

- Daten wurden nicht erhoben.

2.2.3.2 Bindung an Plasmaproteine

Messung	Gemessene Gesamtkonzentration (ng/mL) von THAL		Proteinbindung gemäß Sondenkalibrierung mittels Retrodialyse (2.2.2.4)		Proteinbindung gemäß Sondenkalibrierung mittels Extraktionsmethode (2.2.2.1)	
	Matrix	Dialysat	Berechnete freie Konzentration (ng/mL)	Berechnete Proteinbindung (%)	Berechnete freie Konzentration (ng/mL)	Berechnete Proteinbindung (%)
1	924	122	664	28.1	326	64.7
2	977	131	714	27.0	350	64.2
3	1157	149	816	29.5	400	65.4
4	719	93	509	29.2	250	65.3
5	768	107	586	23.8	287	62.6
6	581	80	438	24.7	215	63.0
			<i>Mittelwert</i>	27.0	<i>Mittelwert</i>	64.2
			<i>StAbw</i>	2.4	<i>StAbw</i>	1.2

StAbw Standardabweichung

3 *In-vitro*-Untersuchung zum Anfluten von Thalidomid in bronchialem Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem peripheren Lungengewebe nach Simulation einer systemischen Applikation

3.1 Perfusionsbedingungen

Lungen- perfusions- experiment	Applizierte Dosis THAL (mg)	Gewicht des Lungengewebes (g)		
		<i>Vor Versuchs- beginn</i>	<i>Nach Versuchs- abbruch</i>	<i>Prozentuale Gewichtszunahme</i>
1 (= Perfusion I)	5.0	157	316	101.3
2	5.0	163	224	37.4
3 (= Perfusion II)	5.0	347	477	37.5
4	3.1	214	298	39.3
5 (= Perfusion III)	4.0	278	330	18.7
6	4.5	373	349	-
7	5.8	624	643	3.0
8	3.9	276	299	8.3
9	5.5	547	534	-

- Daten wurden nicht erhoben.

3.2 Sondenkalibrierung mittels Retrodialyse

Lungen- perfusions- experiment	Sonde im peripheren Lungengewebe			Sonde im Tumorgewebe		
	Gemessene THAL- Konzentration (ng/mL)		Berechnete RR (%)	Gemessene THAL- Konzentration (ng/mL)		Berechnete RR (%)
	Dialysat	Perfusat		Dialysat	Perfusat	
1 (= Perfusion I)	417	617	32.4	298	617	51.8
2	507	553	8.4	⁻¹	553	⁻²
3 (= Perfusion II)	472	631	25.1	507	631	19.7
4	506	563	10.1	535	563	5.0
5 (= Perfusion III)	457	571	19.9	448	571	21.4
6	774	563	⁻²	665	563	⁻²
7	596	739	19.3	754	739	⁻²
8	500	569	12.0	539	569	5.3
9	502	561	10.6	437	561	22.1

⁻¹ Bestimmung konnte nicht durchgeführt werden.

⁻² Daten wurden nicht erhoben.

RR Relative Recovery

3.3 Gemessene Konzentrationsverläufe

3.3.1 Lungenperfusionsexperiment 1 (= Perfusion I)

Proben- intervall (min)	Gemessene THAL-Konzentration (ng/mL)			Gesamt- gewebe- konzentration (ng/g)	Berechnete freie THAL- Konzentration (ng/mL)	
	Perfusions- lösung	Dialysat			Lungengewebe	Tumor
		Lungengewebe	Tumor			
0 - 10	2258	432	67	-	1334	130
10 - 20	1866	677	356	-	2088	687
20 - 30	1697	620	419	-	1912	808
30 - 40	1480	641	430	-	1978	828
40 - 50	1509	775	472	661	2392	910

- Daten wurden nicht erhoben.

3.3.2 Lungenperfusionsexperiment 2

Probenintervall (min)	Gemessene THAL-Konzentration (ng/mL)			Gesamtgewebe- konzentration (ng/g)
	Perfusions- lösung	Dialysat		
		Lungengewebe	Tumor	
0 - 10	2568	n. n.	n. n.	-
10 - 20	1750	n. n.	n. n.	-
20 - 30	1620	(3) ¹	n. n.	n. n.

- Daten wurden nicht erhoben.

¹ Konzentration liegt unter 50 % der Bestimmungsgrenze.

n. n. Nicht nachweisbar

3.3.3 Lungenperfusionsexperiment 3 (= Perfusion II)

Proben- intervall (min)	Gemessene THAL-Konzentration (ng/mL)			Gesamt- gewebe- konzentration (ng/g)	Berechnete freie THAL- Konzentration (ng/mL)	
	Perfusions- lösung	Dialysat			Lungengewebe	Tumor
		Lungengewebe	Tumor			
0 - 10	1752	268	86	-	564	231
10 - 20	1876	9	632	-	20	1699
20 - 30	1767	18	490	-	37	1317
30 - 40	1681	58	479	-	122	1287
40 - 50	1459	115	600	876	243	1615

- Daten wurden nicht erhoben.

3.3.4 Lungenperfusionsexperiment 4

Probenintervall (min)	Gemessene THAL-Konzentration (ng/mL)			Gesamtgewebe- konzentration (ng/g)
	Perfusions- lösung	Dialysat		
		Lungengewebe	Tumor	
0 - 10	2206	n. n.	n. n.	-
10 - 20	1803	n. n.	n. n.	-
20 - 30	1499	n. n.	n. n.	n. n.

- Daten wurden nicht erhoben.

n. n. Nicht nachweisbar

3.3.5 Lungenperfusionsexperiment 5 (= Perfusion III)

Proben- intervall (min)	Gemessene THAL-Konzentration (ng/mL)			Gesamt- gewebe- konzentration (ng/g)	Berechnete freie THAL- Konzentration (ng/mL)	
	Perfusions- lösung	Dialysat			Lungengewebe	Tumor
		Lungengewebe	Tumor			
0 - 10	409	96	47	-	255	116
10 - 20	849	302	247	-	803	609
20 - 30	1230	606	345	-	1609	853
30 - 40	1159	773	576	517	2055	1422

- Daten wurden nicht erhoben.

3.3.6 Lungenperfusionsexperiment 6

Probenintervall (min)	Gemessene THAL-Konzentration (ng/mL)			Gesamtgewebe- konzentration (ng/g)
	Perfusions- lösung	Dialysat		
		Lungengewebe	Tumor	
0 - 10	127	n. n.	n. n.	-
10 - 20	457	n. n.	n. n.	-
20 - 30	895	n. n.	n. n.	-
30 - 40	789	n. n.	n. n.	-
40 - 50	1147	n. n.	n. n.	-
50 - 60	1047	n. n.	n. n.	n. n.

- Daten wurden nicht erhoben.
n. n. Nicht nachweisbar

3.3.7 Lungenperfusionsexperiment 7

Probenintervall (min)	Gemessene THAL-Konzentration (ng/mL)			Gesamtgewebe- konzentration (ng/g)
	Perfusions- lösung	Dialysat		
		Lungengewebe	Tumor	
0 - 10	3656	n. n.	n. n.	-
10 - 20	3046	n. n.	n. n.	-
20 - 30	2601	n. n.	(2) ¹	-
30 - 40	2759	n. n.	n. n.	-
40 - 50	2609	n. n.	n. n.	-
50 - 60	2872	n. n.	n. n.	n. n.

- Daten wurden nicht erhoben.
1 Konzentration liegt unter 50 % der Bestimmungsgrenze.
n. n. Nicht nachweisbar

3.3.8 Lungenperfusionsexperiment 8

Probenintervall (min)	Gemessene THAL-Konzentration (ng/mL)			Gesamtgewebe- konzentration (ng/g)
	Perfusions- lösung	Dialysat		
		Lungengewebe	Tumor	
0 - 10	1726	(4) ¹	n. n.	-
10 - 20	1429	n. n.	n. n.	-
20 - 30	1485	n. n.	n. n.	-
30 - 40	1430	n. n.	n. n.	-
40 - 50	1479	n. n.	n. n.	-
50 - 60	1398	n. n.	n. n.	(4) ¹

- Daten wurden nicht erhoben.

¹ Konzentration liegt unter 50 % der Bestimmungsgrenze.

n. n. Nicht nachweisbar

3.3.9 Lungenperfusionsexperiment 9

Probenintervall (min)	Gemessene THAL-Konzentration (ng/mL)			Gesamtgewebe- konzentration (ng/g)
	Perfusions- lösung	Dialysat		
		Lungengewebe	Tumor	
0 - 10	2218	(5) ¹	10	-
10 - 20	1883	n. n.	n. n.	-
20 - 30	1742	n. n.	n. n.	-
30 - 40	1669	n. n.	13	-
40 - 50	1658	n. n.	103	-
50 - 60	1718	42	n. n.	n. n.

- Daten wurden nicht erhoben.

¹ Konzentration liegt unter 50 % der Bestimmungsgrenze.

n. n. Nicht nachweisbar

E. Zusammenfassung

1 Zusammenfassung

Die humane Lunge kann bei der Pharmakotherapie einer Erkrankung entweder als betroffenes Organ Ziel eines verabreichten Arzneistoffes sein oder aber auch als Portal für diesen in die systemische Zirkulation fungieren. Wird ein Arzneistoff inhaliert, ist für dessen Nutzen-Risiko-Profil von zentraler Bedeutung, in welchem Ausmaß und mit welcher Geschwindigkeit dieser resorbiert und anschließend in die systemische Zirkulation umverteilt wird. Wenn bei der Behandlung einer Lungenerkrankung dagegen ein Arzneistoff z.B. nach peroraler Gabe erst in der systemischen Zirkulation anflutet, müssen ausreichend hohe Wirkstoffkonzentrationen in den betroffenen Gewebearealen sichergestellt werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Möglichkeiten zu finden, diese beiden Vorgänge *in vitro* möglichst realitätsnah messen zu können.

Für die Simulation der pulmonalen Absorption nach inhalativer Applikation eines Arzneistoffs diente Beclomethasondipropionat (BDP), freigesetzt aus den handelsüblichen FCKW-freien Dosieraerosolen Sanasthmax[®] und Ventolair[®], als Modellsubstanz. Es wurde zunächst ein einfaches Dialysemodell als Screeningverfahren entwickelt. Hier wurden BDP-Partikel unter Verwendung der beiden Dosieraerosole auf humanem Lungenhomogenat deponiert und nachfolgend die kombinierten Prozesse aus Auflösung und Umverteilung der Substanz in eine Dialyseflüssigkeit, die sich entweder aus salinem Puffer oder humanem Blutplasma zusammensetzte, untersucht. Anschließend wurde erstmals ein etabliertes humanes Lungenperfusionsmodell dahingehend modifiziert, dass eine Inhalation von BDP nach Applikation eines handelsüblichen Dosieraerosols nachgestellt werden konnte. Auf diese Weise konnte an diesem realitätsnahen Modell die initiale Phase der pulmonalen Absorption von BDP in der Perfusionsflüssigkeit verfolgt werden.

Beide Modelle zeigten Unterschiede in der Auflösungs- bzw. Umverteilungskinetik von BDP in Abhängigkeit von der verwendeten Applikationsform auf. So schienen sich von Ventolair[®] erzeugte BDP-Partikel schneller und in größerer Menge aufzulösen als diejenige bei den Versuchen mit Sanasthmax[®], was eine vermehrte Umverteilung der Substanz sowohl in die Dialyseflüssigkeit als auch Perfusionslösung zur Folge hatte. Die am Lungenperfusionsmodell beobachteten Verläufe der initialen pulmonalen Absorption von BDP nach Freisetzung aus den Dosieraerosolen Sanasthmax[®] oder Ventolair[®] korrelierten dabei sehr gut mit Daten aus einer entsprechenden Humanstudie mit gesunden Probanden. Auch standen die ermittelten Unterschiede in sinnvoller Übereinstimmung mit Untersuchungen der in den von Sanasthmax[®] oder Ventolair[®] versprühten Aerosolen enthaltenen Partikel hinsichtlich Größenverteilung, Morphologie und Lösungsverhalten in Bronchialsekret.

Um die Umverteilung eines Wirkstoffs von der systemischen Zirkulation in lungenspezifisches Gewebe am humanen Lungenperusionsmodell zu simulieren, wurden die Gewebekonzentrationen von Thalidomid (THAL) in peripherem Lungengewebe im Vergleich zu den korrespondierenden Spiegeln in einem Bronchialkarzinom erstmals mittels Mikrodialyse verfolgt. Hierzu wurde im Vorfeld für diese Substanz unter Einsatz des Komplexbildners (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin (HPCD) ein bezüglich der Sensitivität und der zeitlichen Auflösung optimiertes Mikrodialysesystem etabliert und dessen Eigenschaften systematisch untersucht. Am Lungenperusionsmodell wurde dann eine an klinisch relevante Plasmaspiegel angelehnte THAL-Konzentration in der Perfusionslösung vorgelegt und anschließend das Anfluten in den oben genannten Geweben mit Hilfe des entwickelten Mikrodialysesystems beobachtet.

Durch Zugabe von HPCD in das Mikrodialyseperfusat konnte eine signifikante Erhöhung der Wiederfindungsrate im Dialysat (Relative Recovery) erreicht und damit ein Mikrodialysesystem etabliert werden, das neben hoher zeitlicher Auflösung eine ausreichende analytische Sensitivität für THAL aufwies. Allerdings wurden aufgrund dieses Perfusatzusatzes die Diffusionsvorgänge während der Mikrodialyse derart beeinflusst, dass übliche Methoden zur Sondenkalibrierung wie z.B. die Retrodialyse nicht mehr angewendet werden konnten, und daher in Hinblick auf die Messungen am Lungenperusionsmodell bestehende Kalibrierverfahren modifiziert werden mussten. Bei der Untersuchung der Gewebepenetration am Lungenperusionsmodell flutete THAL in Tumorgewebe langsamer an als in peripherem Lungengewebe, wo schnell ähnliche Konzentrationen wie in der Perfusionslösung gefunden wurden. Auch lagen die Gewebespiegel im Tumorgewebe stets unter dem ermittelten Niveau im Lungengewebe. Die erhaltenen Konzentrationsverhältnisse zwischen Perfusionslösung, peripherem Lungengewebe und Tumorgewebe deckten sich dabei mit Kenntnissen aus Humanstudien, in denen analog Plasmakonzentrationen von antineoplastischen Substanzen ebenfalls mittels Mikrodialyse in Relation zu deren Spiegeln in gesundem Gewebe und Tumorgewebe verschiedenster Ätiologie bestimmt wurden.

Damit konnten erfolgreich Methoden etabliert werden, mit Hilfe derer sowohl die Umverteilung inhalativ applizierter Arzneistoffe vom Lungengewebe in die systemische Zirkulation als auch die Kinetik der Penetration von systemisch verabreichten Arzneistoffen in lungenspezifisches Gewebe erfasst werden können. Diese Verfahren können aufgrund der realitätsnahen Simulation pulmonaler Verteilungsvorgänge einen wichtigen Beitrag für das bessere Verständnis pharmakokinetischer Abläufe in der Lunge leisten.

2 Summary

In pharmacotherapy the human lung may either represent the therapeutic target site of an applied drug or be used as portal for systemic drug delivery. In case of inhalation of a drug the rate and extent of pulmonary drug absorption and subsequent distribution into systemic circulation is essential for the benefit-risk ratio. Otherwise, when a drug is systemically administered, e.g. by intravenous or oral route, to treat a lung disease and therefore first appears in the systemic circulation, sufficient drug concentrations have to be achieved in the affected tissue areas. Thus, the aim of this thesis was to find methods that allow to describe these two processes *in vitro* as close to reality as possible.

Beclomethasone dipropionate (BDP) was chosen for the simulation of pulmonary drug absorption after administration of the two commercially available HFA-propelled metered dose inhalers (pMDI) Sanasthmax[®] and Ventolair[®]. Initially a simple dialysis model was established for screening tests. In this setting BDP particles were applied to human lung homogenate using those two inhalers and subsequently the combined processes of drug dissolution and distribution of the drug into dialysis fluid consisting of either saline buffer or human blood plasma were monitored. Then an established isolated reperfused und ventilated human lung setting was used to monitor the initial pulmonary absorption of BDP by measuring drug concentrations in the reperfusion fluid. For this purpose BDP particles containing aerosols delivered by commercially available pMDI for the first time were applied to an isolated reperfused human lung.

Both models revealed differences in the combined processes of dissolution and distribution of BDP delivered by the two pMDI Sanasthmax[®] and Ventolair[®]. BDP particles delivered by Ventolair[®] apparently dissolved faster and to a greater extent than particles delivered by Sanasthmax[®], resulting in an enhanced distribution both into dialysis fluid and into reperfusion fluid. The time course of initial pulmonary absorption of BDP delivered by the pMDI Sanasthmax[®] or Ventolair[®] observed at the isolated reperfused human lung exhibited high correlation with data from a corresponding clinical study with healthy volunteers. Furthermore, the obtained differences were consistent with results from investigations on the particles found in the aerosols produced by Sanasthmax[®] or Ventolair[®] regarding their size distribution, topology and dissolution behaviour in bronchial fluid.

To mimic the distribution of a drug from the systemic circulation into lung specific tissue employing the isolated reperfused and ventilated human lung setting, time course of tissue concentrations of thalidomide (THAL) in peripheral lung tissue in comparison with those in tumour tissue was determined for the first time by microdialysis. Firstly a microdialysis method

optimised regarding sensitivity and time resolution by utilising the complexing agent (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin (HPCD) was developed and systematically evaluated. A THAL concentration derived from clinically relevant plasma concentrations was used in the reperfusion fluid and subsequently drug influx into tissue was monitored.

By adding HPCD to the microdialysis perfusate a significant increase in the relative recovery was achieved enabling the establishment of a microdialysis method that exhibited high time resolution and appropriate analytical sensitivity. However, this perfusate additive strongly affected the diffusion processes during microdialysis so that common methods for microdialysis probe calibration, particularly the retrodialysis method, did not give accurate results. Therefore, a new calibration method suitable for the lung reperfusion experiments had to be explored. Tissue penetration evaluated in the lung reperfusion experiments revealed a slower distribution of THAL into tumour tissue than into peripheral lung tissue. In the latter concentrations similar to those detected in the reperfusion fluid were rapidly observed. Additionally, THAL concentrations achieved in tumour tissue were always lower than the corresponding levels in peripheral lung tissue. The resulting relationship between reperfusion fluid concentrations, concentrations in peripheral lung tissue, and concentrations in tumour tissue was highly correlated with data from clinical studies investigating the concentrations of antineoplastic agents in healthy and tumour tissue of various etiologies by microdialysis in relation to plasma concentrations.

In conclusion, methods enabling both characterisation of the distribution of inhaled drugs from lung tissue into systemic circulation and determination of tissue penetration kinetics of systemically administered drugs into lung specific tissue were successfully established. These techniques simulating pulmonary drug distribution very closely to reality may significantly contribute to the understanding of pharmacokinetic processes in the lung.

F. Abkürzungsverzeichnis

Es werden folgende Abkürzungen verwendet:

17-BMP	Beclomethason-17-propionat
21-BMP	Beclomethason-21-propionat
B	Beclomethason
BDP	Beclomethason-17,21-dipropionat
BIPAP	Biphasic Positive Airway Pressure
BSA	Bovines Serumalbumin
CO ₂	Kohlendioxid
d _{ae}	Aerodynamischer Partikeldurchmesser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELF	Epithelialer Flüssigkeitsfilm
ESI	Elektrosprayionisation
EtOH	Ethanol
FCKW	Fluorchlorkohlenwasserstoffe
FP	Fluticason-17-propionat
GC	Glucocorticoid
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HFA	Hydrofluoralkan
HFA _{134a}	1,1,1,2-Tetrafluorethan
HFA ₂₂₇	1,1,1,2,3,3,3-Heptafluorpropan
HPCD	(2-Hydroxypropyl)-β-cyclodextrin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPLC-MS/MS	HPLC mit massensensitiver Detektion durch Ionenfalle
HSA	Humanes Serumalbumin
KPG	Kunststoffprobengefäß
KRP-HEPES	Krebs-Ringer-HEPES-Puffer
M	Molare Masse
m/z	Verhältnis der molekularen Masse zur Ladung
MAbWM	Mittlere absolute Abweichung vom Mittelwert
MD	Mikrodialyse
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol

Millipore®-Wasser	Wasser aufgereinigt mit der Wasseraufbereitungsanlage: Milli-Q® - reagent grade water system
MMAD	Medianer aerodynamischer Massenäquivalentdurchmesser
MRI	Magnetresonanzspektroskopie
n. n.	Nicht nachweisbar
p	Irrtumswahrscheinlichkeit, Fehler 1. Art
PEEP	Positive End-Expiratory Pressure
PET	Positronenemissionstomographie
r	Korrelationskoeffizient
RR	Relative Recovery
RSD	Relative Standardabweichung
RT	Raumtemperatur
SCP	Sørensen-Citratpuffer
StAbw	Standardabweichung
THAL	Thalidomid
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	Detektion durch Messung der Absorption des ultravioletten Lichts

G. Literaturverzeichnis

- (1) Köhler D, Fleischer W. Theorie und Praxis der Inhalationstherapie. München: Arcis Verlag, 2000: 150.
- (2) Gonda I. The ascent of pulmonary drug delivery. *J Pharm Sci* 2000; 89: 940-945.
- (3) Fabbri L, Pauwels RA, Hurd SS. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: GOLD Executive Summary updated 2003. *Copd* 2004; 1: 105-141.
- (4) Global Initiative for Asthma (GINA), National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI). Global strategy for asthma management and prevention. Bethesda (MD): Global Initiative for Asthma (GINA), National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI), 2005: 184.
- (5) Cheer SM, Waugh J, Noble S. Inhaled tobramycin (TOBI): a review of its use in the management of *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis. *Drugs* 2003; 63: 2501-2520.
- (6) Suri R. The use of human deoxyribonuclease (rhDNase) in the management of cystic fibrosis. *BioDrugs* 2005; 19: 135-144.
- (7) Black CP. Systematic review of the biology and medical management of respiratory syncytial virus infection. *Respir Care* 2003; 48: 209-231.
- (8) Monk JP, Benfield P. Inhaled pentamidine. An overview of its pharmacological properties and a review of its therapeutic use in *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Drugs* 1990; 39: 741-756.
- (9) Hilleman DE. New treatment options in COPD. *J Manag Care Pharm* 2005; 11: 12-19.
- (10) Prescott WA, Jr., Johnson CE. Antiinflammatory therapies for cystic fibrosis: past, present, and future. *Pharmacotherapy* 2005; 25: 555-573.
- (11) Singh M. Newer drugs for asthma. *Indian J Pediatr* 2004; 71: 721-727.
- (12) Hoepfer MM. Drug treatment of pulmonary arterial hypertension: current and future agents. *Drugs* 2005; 65: 1337-1354.
- (13) Iacono AT, Johnson BA, Grgurich WF, et al. A randomized trial of inhaled cyclosporine in lung-transplant recipients. *N Engl J Med* 2006; 354: 141-150.
- (14) Thippawong J. Inhaled cytokines and cytokine antagonists. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58: 1089-1105.
- (15) Agu RU, Ugwoke MI, Armand M, Kinget R, Verbeke N. The lung as a route for systemic delivery of therapeutic proteins and peptides. *Respir Res* 2001; 2: 198-209.
- (16) Byron PR, Patton JS. Drug delivery via the respiratory tract. *J Aerosol Med* 1994; 7: 49-75.

- (17) Farr SJ, Otulana BA. Pulmonary delivery of opioids as pain therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58: 1076-1088.
- (18) Qi Y, Zhao G, Liu D, et al. Delivery of therapeutic levels of heparin and low-molecular-weight heparin through a pulmonary route. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 9867-9872.
- (19) Von Wichert G, von Wichert P. Möglichkeiten und Probleme der Applikation von systemisch wirksamen, höhermolekularen Wirkstoffen mittels Inhalation. *Med Klin* 2006; 101: 718-723.
- (20) Ceglia L, Lau J, Pittas AG. Meta-analysis: efficacy and safety of inhaled insulin therapy in adults with diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 2006; 145: 665-675.
- (21) Groneberg DA, Witt C, Wagner U, Chung KF, Fischer A. Fundamentals of pulmonary drug delivery. *Respir Med* 2003; 97: 382-387.
- (22) Labiris NR, Dolovich MB. Pulmonary drug delivery. Part I: physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 56: 588-599.
- (23) Usmani OS, Biddiscombe MF, Barnes PJ. Regional lung deposition and bronchodilator response as a function of beta2-agonist particle size. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 1497-1504.
- (24) Scheuch G, Kohlhaeufel MJ, Brand P, Siekmeier R. Clinical perspectives on pulmonary systemic and macromolecular delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58: 996-1008.
- (25) Scheuch G, Stahlhofen W. Deposition and dispersion of aerosols in the airways of the human respiratory tract: the effect of particle size. *Exp Lung Res* 1992; 18: 343-358.
- (26) Heyder J. Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract and consequences for regional targeting in respiratory drug delivery. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 315-320.
- (27) Ganderton D, Lewis D, Davies R, Meakin B, Brambilla G, Church T. Modulite: a means of designing the aerosols generated by pressurized metered dose inhalers. *Respir Med* 2002; 96 Suppl D: 3-8.
- (28) Witek TJ, Jr. The fate of inhaled drugs: the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs administered by aerosol. *Respir Care* 2000; 45: 826-830.
- (29) Valotis A. Pharmakokinetische und molekularpharmakodynamische Aspekte inhalativ angewandter Glucocorticoide. Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie. Würzburg: Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2005: VI, 207.
- (30) Miller-Larsson A, Mattsson H, Hjertberg E, Dahlback M, Tunek A, Brattsand R. Reversible fatty acid conjugation of budesonide. Novel mechanism for prolonged retention of topically applied steroid in airway tissue. *Drug Metab Dispos* 1998; 26: 623-630.

- (31) Nave R, Meyer W, Fuhst R, Zech K. Formation of fatty acid conjugates of ciclesonide active metabolite in the rat lung after 4-week inhalation of ciclesonide. *Pulm Pharmacol Ther* 2005; 18: 390-396.
- (32) Hvizdos KM, Goa KL. Tiotropium bromide. *Drugs* 2002; 62: 1195-1203.
- (33) Hogger P, Rawert J, Rohdewald P. Dissolution, tissue binding and kinetics of receptor binding of inhaled glucocorticoids. *Eur Respir J* 1993; 6 Suppl 17: 584.
- (34) Eichler HG, Muller M. Drug distribution. The forgotten relative in clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 1998; 34: 95-99.
- (35) Lanao JM, Fraile MA. Drug tissue distribution: study methods and therapeutic implications. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 3829-3845.
- (36) Lin JH. Tissue distribution and pharmacodynamics: a complicated relationship. *Curr Drug Metab* 2006; 7: 39-65.
- (37) Herkner H, Muller MR, Kreischitz N, et al. Closed-chest microdialysis to measure antibiotic penetration into human lung tissue. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 273-276.
- (38) Statistisches Bundesamt Deutschland. Gesundheitswesen: Todesursachen 2005. Verfügbar unter: <http://www.destatis.de>. Zugriff am: 2006/10/31
- (39) Muller M, dela Pena A, Derendorf H. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: distribution in tissue. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1441-1453.
- (40) Zeitlinger M, Muller M, Joukhadar C. Lung microdialysis--a powerful tool for the determination of exogenous and endogenous compounds in the lower respiratory tract (mini-review). *Aaps J* 2005; 7: 600-608.
- (41) Linder A, Friedel G, Fritz P, Kivisto KT, McClellan M, Toomes H. The ex-vivo isolated, perfused human lung model: description and potential applications. *Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 44: 140-146.
- (42) Buhl R, Berdel D, Criege CP, et al. Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma. *Pneumologie* 2006; 60: 139-177.
- (43) Hogger P. Dose response and therapeutic index of inhaled corticosteroids in asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2003; 9: 1-8.
- (44) Hochhaus G, Mollmann H, Derendorf H, Gonzalez-Rothi RJ. Pharmacokinetic/pharmacodynamic aspects of aerosol therapy using glucocorticoids as a model. *J Clin Pharmacol* 1997; 37: 881-892.
- (45) Derendorf H, Hochhaus G, Meibohm B, Mollmann H, Barth J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 440-446.

- (46) Edsbacker S, Johansson CJ. Airway selectivity: an update of pharmacokinetic factors affecting local and systemic disposition of inhaled steroids. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006; 98: 523-536.
- (47) Kelly HW. Establishing a therapeutic index for the inhaled corticosteroids: part I. Pharmacokinetic/pharmacodynamic comparison of the inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 36-51.
- (48) Rohatagi S, Appajosyula S, Derendorf H, et al. Risk-benefit value of inhaled glucocorticoids: a pharmacokinetic/pharmacodynamic perspective. *J Clin Pharmacol* 2004; 44: 37-47.
- (49) Kelly HW, Nelson HS. Potential adverse effects of the inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 469-478
- (50) Rohatagi S, Luo Y, Shen L, et al. Protein binding and its potential for eliciting minimal systemic side effects with a novel inhaled corticosteroid, ciclesonide. *Am J Ther* 2005; 12: 201-209.
- (51) Derendorf H, Hochhaus G, Mollmann H. Evaluation of pulmonary absorption using pharmacokinetic methods. *J Aerosol Med* 2001; 14 Suppl 1: 9-17.
- (52) Derendorf H, Daley-Yates PT, Pierre LN, Efthimiou J. Systemic bioavailability of inhaled steroids: the importance of appropriate and comparable methodology. *Eur Respir J* 2001; 17: 157-158.
- (53) Esmailpour N, Hogger P, Rabe KF, Heitmann U, Nakashima M, Rohdewald P. Distribution of inhaled fluticasone propionate between human lung tissue and serum in vivo. *Eur Respir J* 1997; 10: 1496-1499.
- (54) Holz O, Zuhlke I, Einhaus M, et al. Direct measurement of BDP and 17-BMP in bronchial and peripheral lung tissue after inhalation of HFA- vs CFC-driven aerosols. *Pulm Pharmacol Ther* 2004; 17: 233-238.
- (55) Van den Bosch JM, Westermann CJ, Aumann J, Edsbacker S, Tonnesson M, Selroos O. Relationship between lung tissue and blood plasma concentrations of inhaled budesonide. *Biopharm Drug Dispos* 1993; 14: 455-459.
- (56) Dempsey OJ, Coutie WJ, Wilson AM, Williams P, Lipworth BJ. Evaluation of the buccal component of systemic absorption with inhaled fluticasone propionate. *Thorax* 1999; 54: 614-617.
- (57) Derendorf H. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of inhaled corticosteroids in relation to efficacy and safety. *Respir Med* 1997; 91 Suppl A: 22-28.
- (58) Byron PR, Clark AR. Drug absorption from inhalation aerosols administered by positive-pressure ventilation. I: Administration of a characterized, solid disodium fluorescein aerosol under a controlled respiratory regime to the beagle dog. *J Pharm Sci* 1985; 74: 934-938.
- (59) Clark AR, Byron PR. Drug absorption from inhalation aerosols administered by positive-pressure ventilation. II: Effect of disodium fluorescein aerosol particle size on fluorescein absorption kinetics in the beagle dog respiratory tract. *J Pharm Sci* 1985; 74: 939-942.

- (60) Tronde A, Norden B, Marchner H, Wendel AK, Lennernas H, Bengtsson UH. Pulmonary absorption rate and bioavailability of drugs in vivo in rats: structure-absorption relationships and physicochemical profiling of inhaled drugs. *J Pharm Sci* 2003; 92: 1216-1233.
- (61) Chediak AD, Wanner A. The circulation of the airways: anatomy, physiology and potential role in drug delivery to the respiratory tract. *Adv Drug Deliv Rev* 1990; 5: 11-18.
- (62) Miller FJ, Mercer RR, Crapo JD. Lower Respiratory-Tract Structure of Laboratory-Animals and Humans - Dosimetry Implications. *Aerosol Sci Technol* 1993; 18: 257-271.
- (63) Brown RA, Jr., Schanker LS. Absorption of aerosolized drugs from the rat lung. *Drug Metab Dispos* 1983; 11: 355-360.
- (64) Tronde A, Baran G, Eirefelt S, Lennernas H, Bengtsson UH. Miniaturized nebulization catheters: a new approach for delivery of defined aerosol doses to the rat lung. *J Aerosol Med* 2002; 15: 283-296.
- (65) Tronde A. Pulmonary Drug Absorption: *In-vitro* and *in-vivo* investigations of drug absorption across the lung barrier and its relation to drug physicochemical properties. Faculty of Pharmacy. Uppsala: Uppsala University, 2002: 86.
- (66) Hogger P. Explaining Pulmonary Pharmacokinetics of Inhaled Corticosteroids: How Close to In Vivo Reality Can We Get? *Respiratory Drug Delivery* 2006; 1: 205-218.
- (67) Niven RW, Byron PR. Solute absorption from the airways of the isolated rat lung. I. The use of absorption data to quantify drug dissolution or release in the respiratory tract. *Pharm Res* 1988; 5: 574-579.
- (68) Pang Y, Sakagami M, Byron PR. The pharmacokinetics of pulmonary insulin in the in vitro isolated perfused rat lung: implications of metabolism and regional deposition. *Eur J Pharm Sci* 2005; 25: 369-378.
- (69) Ryrfeldt A, Persson G, Nilsson E. Pulmonary disposition of the potent glucocorticoid budesonide, evaluated in an isolated perfused rat lung model. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 17-22.
- (70) Sakagami M, Byron PR, Venitz J, Rypacek F. Solute disposition in the rat lung in vivo and in vitro: determining regional absorption kinetics in the presence of mucociliary escalator. *J Pharm Sci* 2002; 91: 594-604.
- (71) Tronde A, Norden B, Jeppsson AB, et al. Drug absorption from the isolated perfused rat lung--correlations with drug physicochemical properties and epithelial permeability. *J Drug Target* 2003; 11: 61-74.
- (72) Wurthwein G, Rohdewald P. Activation of beclomethasone dipropionate by hydrolysis to beclomethasone-17-monopropionate. *Biopharm Drug Dispos* 1990; 11: 381-394.
- (73) Foe K, Brown KF, Seale JP. Comparative kinetics of metabolism of beclomethasone propionate esters in human lung homogenates and plasma. *J Pharm Sci* 2000; 89: 1143-1150.

- (74) Gold Standard Inc. Beclomethasone. Clinical Pharmacology [online database]. Verfügbar unter: <http://www.clinicalpharmacology.com>. Zugriff am: 2006/09/20
- (75) Agertoft L, Laulund LW, Harrison LI, Pedersen S. Influence of particle size on lung deposition and pharmacokinetics of beclomethasone dipropionate in children. *Pediatr Pulmonol* 2003; 35: 192-199.
- (76) Leach CL, Davidson PJ, Boudreau RJ. Improved airway targeting with the CFC-free HFA-beclomethasone metered-dose inhaler compared with CFC-beclomethasone. *Eur Respir J* 1998; 12: 1346-1353.
- (77) Lipworth BJ, Jackson CM. Pharmacokinetics of chlorofluorocarbon and hydrofluoroalkane metered-dose inhaler formulations of beclomethasone dipropionate. *Br J Clin Pharmacol* 1999; 48: 866-868.
- (78) Seale JP, Harrison LI. Effect of changing the fine particle mass of inhaled beclomethasone dipropionate on intrapulmonary deposition and pharmacokinetics. *Respir Med* 1998; 92 Suppl A: 9-15.
- (79) Clark A, Byron P. Dependence of pulmonary absorption kinetics on aerosol particle size. *Z Erkr Atmungsorgane* 1986; 166: 13-24.
- (80) Tayab ZR, Hochhaus G. Pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of inhalation drugs: application to targeted pulmonary delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv* 2005; 2: 519-532.
- (81) Sakagami M, Byron PR. Respirable microspheres for inhalation: the potential of manipulating pulmonary disposition for improved therapeutic efficacy. *Clin Pharmacokinet* 2005; 44: 263-277.
- (82) Hogger P. Comparison of the tissue affinity of glucocorticoids to human lung, nasal and skin tissue in vitro. *Arzneimittelforschung* 2001; 51: 825-831.
- (83) Davies NM, Feddah MR. A novel method for assessing dissolution of aerosol inhaler products. *Int J Pharm* 2003; 255: 175-187.
- (84) Wiedmann TS, Bhatia R, Wattenberg LW. Drug solubilization in lung surfactant. *J Control Release* 2000; 65: 43-47.
- (85) Valotis A, Neukam K, Elert O, Hogger P. Human receptor kinetics, tissue binding affinity, and stability of mometasone furoate. *J Pharm Sci* 2004; 93: 1337-1350.
- (86) Pacifici GM, Franchi M, Bencini C, Repetti F, Di Lascio N, Muraro GB. Tissue distribution of drug-metabolizing enzymes in humans. *Xenobiotica* 1988; 18: 849-856.
- (87) Foe K, Cutler DJ, Brown KF, Seale JP. Metabolism kinetics of beclomethasone propionate esters in human lung homogenates. *Pharm Res* 2000; 17: 1007-1012.
- (88) Upton RN, Doolette DJ. Kinetic aspects of drug disposition in the lungs. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26: 381-391.
- (89) Renzoni EA, Walsh DA, Salmon M, et al. Interstitial vascularity in fibrosing alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 438-443.

- (90) Tulic MK, Hamid Q. New insights into the pathophysiology of the small airways in asthma. *Clin Chest Med* 2006; 27: 41-52.
- (91) Tsai TH. Assaying protein unbound drugs using microdialysis techniques. *J Chromatogr B* 2003; 797: 161-173.
- (92) Hogger P, Rohdewald P. Glucocorticoid receptors and fluticasone propionate. *Rev Contemp Pharmacother* 1998; 9: 501-522.
- (93) Taylor S, Harker A. Modification of the ultrafiltration technique to overcome solubility and non-specific binding challenges associated with the measurement of plasma protein binding of corticosteroids. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 41: 299-303.
- (94) Suarez S, Hickey AJ. Drug properties affecting aerosol behavior. *Respir Care* 2000; 45: 652-666.
- (95) Law FC, Eling TE, Bend JR, Fouts JR. Metabolism of xenobiotics by the isolated perfused lung. Comparison with in vitro incubations. *Drug Metab Dispos* 1974; 2: 433-442.
- (96) Mehendale HM, Angevine LS, Ohmiya Y. The isolated perfused lung--a critical evaluation. *Toxicology* 1981; 21: 1-36.
- (97) Hulsmann AR, de Jongste JC. Studies of human airways in vitro: a review of the methodology. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1993; 30: 117-132.
- (98) Fisher AB, Dodia C, Linask J. Perfusate composition and edema formation in isolated rat lungs. *Exp Lung Res* 1980; 1: 13-21.
- (99) Petak F, Habre W, Hantos Z, Sly PD, Morel DR. Effects of pulmonary vascular pressures and flow on airway and parenchymal mechanics in isolated rat lungs. *J Appl Physiol* 2002; 92: 169-178.
- (100) Awad JA, Chenard J, Lemieux JM, Lou W. Evaluation of various fluids for the perfusion of the canine pulmonary lobes. *Dis Chest* 1965; 48: 269-277.
- (101) Cope DK, Grimbert F, Downey JM, Taylor AE. Pulmonary capillary pressure: a review. *Crit Care Med* 1992; 20: 1043-1056.
- (102) Weksler B, Ng B, Lenert JT, Burt ME. Isolated single-lung perfusion: a study of the optimal perfusate and other pharmacokinetic factors. *Ann Thorac Surg* 1995; 60: 624-629.
- (103) De Perrot M, Imai Y, Volgyesi GA, et al. Effect of ventilator-induced lung injury on the development of reperfusion injury in a rat lung transplant model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 124: 1137-1144.
- (104) Kallas HJ, Domino KB, Glenn RW, Anderson EA, Hlastala MP. Pulmonary blood flow redistribution with low levels of positive end-expiratory pressure. *Anesthesiology* 1998; 88: 1291-1299.
- (105) Ricard JD, Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury. *Curr Opin Crit Care* 2002; 8: 12-20.

- (106) Yoshikawa S, King JA, Lausch RN, Penton AM, Eyal FG, Parker JC. Acute ventilator-induced vascular permeability and cytokine responses in isolated and in situ mouse lungs. *J Appl Physiol* 2004; 97: 2190-2199.
- (107) Yu J, Chien YW. Pulmonary drug delivery: physiologic and mechanistic aspects. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1997; 14: 395-453.
- (108) Wagner EM, Foster WM. The role of the bronchial vasculature in soluble particle clearance. *Environ Health Perspect* 2001; 109 Suppl 4: 563-565.
- (109) Kamin WE, Genz T, Roeder S, et al. Mass output and particle size distribution of glucocorticosteroids emitted from different inhalation devices depending on various inspiratory parameters. *J Aerosol Med* 2002; 15: 65-73.
- (110) Leach CL. Improved delivery of inhaled steroids to the large and small airways. *Respir Med* 1998; 92 Suppl A: 3-8.
- (111) Patton JS, Fishburn CS, Weers JG. The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 338-344.
- (112) Zeidler M, Corren J. Hydrofluoroalkane formulations of inhaled corticosteroids for the treatment of asthma. *Treat Respir Med* 2004; 3: 35-44.
- (113) Murdter TE, Sperker B, Kivisto KT, et al. Enhanced uptake of doxorubicin into bronchial carcinoma: beta-glucuronidase mediates release of doxorubicin from a glucuronide prodrug (HMR 1826) at the tumor site. *Cancer Res* 1997; 57: 2440-2445.
- (114) Leach CL, Davidson PJ, Hasselquist BE, Boudreau RJ. Lung deposition of hydrofluoroalkane-134a beclomethasone is greater than that of chlorofluorocarbon fluticasone and chlorofluorocarbon beclomethasone : a cross-over study in healthy volunteers. *Chest* 2002; 122: 510-516.
- (115) Patton JS. Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs. *Adv Drug Deliver Rev* 1996; 19: 3-36.
- (116) Diallo MH, Guenard H, Laurent F, Carles P, Giron J. Distribution of lung density and mass in patients with emphysema as assessed by quantitative analysis of CT. *Chest* 2000; 118: 1566-1575.
- (117) Schuster DP, Kaplan JD, Gauvain K, Welch MJ, Markham J. Measurement of regional pulmonary blood flow with PET. *J Nucl Med* 1995; 36: 371-377.
- (118) Ley S, Fink C, Puderbach M, et al. MRI Measurement of the hemodynamics of the pulmonary and systemic arterial circulation: influence of breathing maneuvers. *AJR Am J Roentgenol* 2006; 187: 439-444.
- (119) Woodcock A, Acerbi D, Poli G. Modulite technology: pharmacodynamic and pharmacokinetic implications. *Respir Med* 2002; 96 Suppl D: 9-15.
- (120) Harrison LI, Soria I, Cline AC, Ekholm BP. Pharmacokinetic differences between chlorofluorocarbon and chlorofluorocarbon-free metered dose inhalers of beclomethasone dipropionate in adult asthmatics. *J Pharm Pharmacol* 1999; 51: 1235-1240.

- (121) Harrison LI, Kurup S, Wagner C, Ekholm BP, Larson JS, Kaiser HB. Pharmacokinetics of beclomethasone 17-monopropionate from a beclomethasone dipropionate extrafine aerosol in adults with asthma. *Eur J Clin Pharmacol* 2002; 58: 197-201.
- (122) Poli G, Acerbi D. Comparison of the bioavailability and systemic effects of beclomethasone dipropionate suspension for nebulization and beclomethasone dipropionate via a metered-dose inhaler after single-dose administration in healthy male volunteers. *Respir Med* 2003; 97 Suppl B: 5-9.
- (123) Daley-Yates PT, Price AC, Sisson JR, Pereira A, Dallow N. Beclomethasone dipropionate: absolute bioavailability, pharmacokinetics and metabolism following intravenous, oral, intranasal and inhaled administration in man. *Br J Clin Pharmacol* 2001; 51: 400-409.
- (124) Gupta A, Stein SW, Myrdal PB. Balancing ethanol cosolvent concentration with product performance in 134a-based pressurized metered dose inhalers. *J Aerosol Med* 2003; 16: 167-174.
- (125) Vanden Burgt JA, Busse WW, Martin RJ, Szeffler SJ, Donnell D. Efficacy and safety overview of a new inhaled corticosteroid, QVAR (hydrofluoroalkane-beclomethasone extrafine inhalation aerosol), in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 1209-1226.
- (126) Bousquet J, Cantini L. Clinical studies in asthmatics with a new non-extra fine HFA formulation of beclomethasone dipropionate (BDP Modulite). *Respir Med* 2002; 96 Suppl D: 17-27.
- (127) Lin J, Sahakian DC, de Morais SM, Xu JJ, Polzer RJ, Winter SM. The role of absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity in drug discovery. *Curr Top Med Chem* 2003; 3: 1125-1154.
- (128) Sheiner TZ, Tozer TN. Clinical pharmacokinetics: the use of plasma concentrations of drugs. In: Melmon KL, Morelli KF, Hrsg. *Clinical pharmacology: basic principles of therapeutics*. New York: Macmillan, 1978: 71-109.
- (129) Csajka C, Verotta D. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling: history and perspectives. *J Pharmacokinetic Pharmacodyn* 2006; 33: 227-279.
- (130) Colburn WA, Lee JW. Biomarkers, validation and pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling. *Clin Pharmacokinetic* 2003; 42: 997-1022.
- (131) Derendorf H, Lesko LJ, Chaikin P, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in drug research and development. *J Clin Pharmacol* 2000; 40: 1399-1418.
- (132) Langer O, Muller M. Methods to assess tissue-specific distribution and metabolism of drugs. *Curr Drug Metab* 2004; 5: 463-481.
- (133) Benfeldt E, Serup J, Menne T. Microdialysis vs. suction blister technique for in vivo sampling of pharmacokinetics in the human dermis. *Acta Derm Venereol* 1999; 79: 338-342.
- (134) Brunner M, Schmiedberger A, Schmid R, et al. Direct assessment of peripheral pharmacokinetics in humans: comparison between cantharides blister fluid sampling, in vivo microdialysis and saliva sampling. *Br J Clin Pharmacol* 1998; 46: 425-431.

- (135) Day RM, Harbord M, Forbes A, Segal AW. Cantharidin blisters: a technique for investigating leukocyte trafficking and cytokine production at sites of inflammation in humans. *J Immunol Methods* 2001; 257: 213-220.
- (136) Al-Obaidy SS, Li Wan Po A, McKiernan PJ, Glasgow JF, Millership J. Assay of paracetamol and its metabolites in urine, plasma and saliva of children with chronic liver disease. *J Pharm Biomed Anal* 1995; 13: 1033-1039.
- (137) Lee HS, Ti TY, Lye WC, Khoo YM, Tan CC. Paracetamol and its metabolites in saliva and plasma in chronic dialysis patients. *Br J Clin Pharmacol* 1996; 41: 41-47.
- (138) Muller M, Brunner M, Schmid R, et al. Comparison of three different experimental methods for the assessment of peripheral compartment pharmacokinetics in humans. *Life Sci* 1998; 62: 227-234.
- (139) Plock N, Kloft C. Microdialysis-theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. *Eur J Pharm Sci* 2005; 25: 1-24.
- (140) Shen DD, Artru AA, Adkison KK. Principles and applicability of CSF sampling for the assessment of CNS drug delivery and pharmacodynamics. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56: 1825-1857.
- (141) Cazzola M, Blasi F, Terzano C, Matera MG, Marsico SA. Delivering antibacterials to the lungs: considerations for optimizing outcomes. *Am J Respir Med* 2002; 1: 261-272.
- (142) Brunner M, Langer O. Microdialysis versus other techniques for the clinical assessment of in vivo tissue drug distribution. *Aaps J* 2006; 8: 263-271.
- (143) Port RE, Wolf W. Noninvasive methods to study drug distribution. *Invest New Drugs* 2003; 21: 157-168.
- (144) Fischman AJ, Alpert NM, Rubin RH. Pharmacokinetic imaging: a noninvasive method for determining drug distribution and action. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41: 581-602.
- (145) Vespa PM, McArthur D, O'Phelan K, et al. Persistently low extracellular glucose correlates with poor outcome 6 months after human traumatic brain injury despite a lack of increased lactate: a microdialysis study. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 865-877.
- (146) Nowak G, Ungerstedt J, Wernerman J, Ungerstedt U, Ericzon BG. Clinical experience in continuous graft monitoring with microdialysis early after liver transplantation. *Br J Surg* 2002; 89: 1169-1175.
- (147) Karjagin J, Pahkla R, Starkopf J. Perioperative penetration of metronidazole into muscle tissue: a microdialysis study. *Eur J Clin Pharmacol* 2004; 59: 809-813.
- (148) Sasongko L, Williams KM, Day RO, McLachlan AJ. Human subcutaneous tissue distribution of fluconazole: comparison of microdialysis and suction blister techniques. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 56: 551-561.
- (149) Davies MI, Cooper JD, Desmond SS, Lunte CE, Lunte SM. Analytical considerations for microdialysis sampling. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 45: 169-188.

- (150) Teo SK, Resztak KE, Scheffler MA, et al. Thalidomide in the treatment of leprosy. *Microbes Infect* 2002; 4: 1193-1202.
- (151) D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 4082-4085.
- (152) Koc S, Leisenring W, Flowers ME, et al. Thalidomide for treatment of patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2000; 96: 3995-3996.
- (153) Vasiliauskas EA, Kam LY, Abreu-Martin MT, et al. An open-label pilot study of low-dose thalidomide in chronically active, steroid-dependent Crohn's disease. *Gastroenterology* 1999; 117: 1278-1287.
- (154) Matthews SJ, McCoy C. Thalidomide: a review of approved and investigational uses. *Clin Ther* 2003; 25: 342-395.
- (155) Agoston I, Dibbs ZI, Wang F, et al. Preclinical and clinical assessment of the safety and potential efficacy of thalidomide in heart failure. *J Card Fail* 2002; 8: 306-314.
- (156) Sze DM, Brown R, Yang S, Ho PJ, Gibson J, Joshua D. The use of thalidomide in myeloma therapy as an effective anticancer drug. *Curr Cancer Drug Targets* 2006; 6: 325-331.
- (157) Baidas SM, Winer EP, Fleming GF, et al. Phase II evaluation of thalidomide in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2710-2717.
- (158) Chintagumpala M, Blaney SM, Bomgaars LR, et al. Phase I and pharmacokinetic study of thalidomide with carboplatin in children with cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4394-4400.
- (159) Mall JW, Philipp AW, Mall W, Pollmann C. Long-term survival of a patient with small-cell lung cancer (SCLC) following treatment with thalidomide and combination chemotherapy. *Angiogenesis* 2002; 5: 11-13.
- (160) Stroud M. Thalidomide and cancer cachexia: old problem, new hope? *Gut* 2005; 54: 447-448.
- (161) Franks ME, Macpherson GR, Figg WD. Thalidomide. *Lancet* 2004; 363: 1802-1811.
- (162) Lepper ER, Smith NF, Cox MC, Scripture CD, Figg WD. Thalidomide metabolism and hydrolysis: mechanisms and implications. *Curr Drug Metab* 2006; 7: 677-685.
- (163) Eriksson T, Bjorkman S, Roth B, Høglund P. Intravenous formulations of the enantiomers of thalidomide: pharmacokinetic and initial pharmacodynamic characterization in man. *J Pharm Pharmacol* 2000; 52: 807-817.
- (164) Goosen C, Laing TJ, du PJ, Goosen TC, Flynn GL. Physicochemical characterization and solubility analysis of thalidomide and its N-alkyl analogs. *Pharm Res* 2002; 19: 13-19.
- (165) Krenn M, Gamcsik MP, Vogelsang GB, Colvin OM, Leong KW. Improvements in solubility and stability of thalidomide upon complexation with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *J Pharm Sci* 1992; 81: 685-689.

- (166) Eriksson T, Bjorkman S, Roth B, Fyge A, Hoglund P. Enantiomers of thalidomide: blood distribution and the influence of serum albumin on chiral inversion and hydrolysis. *Chirality* 1998; 10: 223-228.
- (167) Reist M, Carrupt PA, Francotte E, Testa B. Chiral inversion and hydrolysis of thalidomide: mechanisms and catalysis by bases and serum albumin, and chiral stability of teratogenic metabolites. *Chem Res Toxicol* 1998; 11: 1521-1528.
- (168) Teo SK, Colburn WA, Tracewell WG, et al. Clinical pharmacokinetics of thalidomide. *Clin Pharmacokinet* 2004; 43: 311-327.
- (169) Schumacher H, Smith RL, Williams RT. The metabolism of thalidomide: the fate of thalidomide and some of its hydrolysis products in various species. *Br J Pharmacol* 1965; 25: 338-351.
- (170) Ando Y, Fuse E, Figg WD. Thalidomide metabolism by the CYP2C subfamily. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1964-1973.
- (171) Lu J, Helsby N, Palmer BD, et al. Metabolism of thalidomide in liver microsomes of mice, rabbits, and humans. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 310: 571-577.
- (172) Teo SK, Sabourin PJ, O'Brien K, Kook KA, Thomas SD. Metabolism of thalidomide in human microsomes, cloned human cytochrome P-450 isozymes, and Hansen's disease patients. *J Biochem Mol Toxicol* 2000; 14: 140-147.
- (173) Ando Y, Price DK, Dahut WL, Cox MC, Reed E, Figg WD. Pharmacogenetic associations of CYP2C19 genotype with in vivo metabolisms and pharmacological effects of thalidomide. *Cancer Biol Ther* 2002; 1: 669-673.
- (174) Chung F, Lu J, Palmer BD, et al. Thalidomide pharmacokinetics and metabolite formation in mice, rabbits, and multiple myeloma patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5949-5956.
- (175) Eriksson T, Bjorkman S, Roth B, Bjork H, Hoglund P. Hydroxylated metabolites of thalidomide: formation in-vitro and in-vivo in man. *J Pharm Pharmacol* 1998; 50: 1409-1416.
- (176) Lu J, Palmer BD, Kestell P, et al. Thalidomide metabolites in mice and patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1680-1688.
- (177) Eriksson T, Bjorkman S, Roth B, Fyge A, Hoglund P. Stereospecific determination, chiral inversion in vitro and pharmacokinetics in humans of the enantiomers of thalidomide. *Chirality* 1995; 7: 44-52.
- (178) Chaurasia CS. In vivo microdialysis sampling: theory and applications. *Biomed Chromatogr* 1999; 13: 317-332.
- (179) De Lange EC, de Boer AG, Breimer DD. Methodological issues in microdialysis sampling for pharmacokinetic studies. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 45: 125-148.
- (180) Stenken JA. Methods and issues in microdialysis calibration. *Anal Chim Acta* 1999; 379: 337-358.

- (181) Leegsma-Vogt G, Janle E, Ash SR, Venema K, Korf J. Utilization of in vivo ultrafiltration in biomedical research and clinical applications. *Life Sci* 2003; 73: 2005-2018.
- (182) Bungay PM, Morrison PF, Dedrick RL. Steady-state theory for quantitative microdialysis of solutes and water in vivo and in vitro. *Life Sci* 1990; 46: 105-119.
- (183) Stenken JA, Topp EM, Southard MZ, Lunte CE. Examination of microdialysis sampling in a well-characterized hydrodynamic system. *Anal Chem* 1993; 65: 2324-2328.
- (184) Hsiao JK, Ball BA, Morrison PF, Mefford IN, Bungay PM. Effects of different semipermeable membranes on in vitro and in vivo performance of microdialysis probes. *J Neurochem* 1990; 54: 1449-1452.
- (185) Lonroth P, Jansson PA, Smith U. A microdialysis method allowing characterization of intercellular water space in humans. *Am J Physiol* 1987; 253: 228-231.
- (186) Snyder KL, Nathan CE, Yee A, Stenken JA. Diffusion and calibration properties of microdialysis sampling membranes in biological media. *Analyst* 2001; 126: 1261-1268.
- (187) Sun L, Stenken JA. Improving microdialysis extraction efficiency of lipophilic eicosanoids. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 33: 1059-1071.
- (188) Ao X, Stenken JA. Water-soluble cyclodextrin polymers for enhanced relative recovery of hydrophobic analytes during microdialysis sampling. *Analyst* 2003; 128: 1143-1149.
- (189) Carneheim C, Stahle L. Microdialysis of lipophilic compounds: a methodological study. *Pharmacol Toxicol* 1991; 69: 378-380.
- (190) Khramov AN, Stenken JA. Enhanced microdialysis recovery of some tricyclic antidepressants and structurally related drugs by cyclodextrin-mediated transport. *Analyst* 1999; 124: 1027-1033.
- (191) Ward KW, Medina SJ, Portelli ST, et al. Enhancement of in vitro and in vivo microdialysis recovery of SB-265123 using Intralipid and Encapsin as perfusates. *Biopharm Drug Dispos* 2003; 24: 17-25.
- (192) Stahle L, Arner P, Ungerstedt U. Drug distribution studies with microdialysis. III: Extracellular concentration of caffeine in adipose tissue in man. *Life Sci* 1991; 49: 1853-1858.
- (193) Lonroth P, Jansson PA, Fredholm BB, Smith U. Microdialysis of intercellular adenosine concentration in subcutaneous tissue in humans. *Am J Physiol* 1989; 256: 250-255.
- (194) Stahle L, Segersvard S, Ungerstedt U. A comparison between three methods for estimation of extracellular concentrations of exogenous and endogenous compounds by microdialysis. *J Pharmacol Methods* 1991; 25: 41-52.
- (195) Brunner M, Joukhadar C, Schmid R, Erovic B, Eichler HG, Muller M. Validation of urea as an endogenous reference compound for the in vivo calibration of microdialysis probes. *Life Sci* 2000; 67: 977-984.

- (196) Eisenberg EJ, Eickhoff WM. A method for estimation of extracellular concentration of compounds by microdialysis using urea as an endogenous recovery marker in vitro validation. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1993; 30: 27-31.
- (197) Hashimoto Y, Murakami T, Kumasa C, Higashi Y, Yata N, Takano M. In-vivo calibration of microdialysis probe by use of endogenous glucose as an internal recovery marker: measurement of skin distribution of tranilast in rats. *J Pharm Pharmacol* 1998; 50: 621-626.
- (198) Schwalbe O, Buerger C, Plock N, Joukhadar C, Kloft C. Urea as an endogenous surrogate in human microdialysis to determine relative recovery of drugs: analytics and applications. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 41: 233-239.
- (199) Strindberg L, Lonnroth P. Validation of an endogenous reference technique for the calibration of microdialysis catheters. *Scand J Clin Lab Invest* 2000; 60: 205-211.
- (200) Bouw MR, Hammarlund-Udenaes M. Methodological aspects of the use of a calibrator in in vivo microdialysis-further development of the retrodialysis method. *Pharm Res* 1998; 15: 1673-1679.
- (201) Boughton BJ, Sheehan TM, Wood J, et al. High-performance liquid chromatographic assay of plasma thalidomide: stabilization of specimens and determination of a tentative therapeutic range for chronic graft-versus-host disease. *Ann Clin Biochem* 1995; 32: 79-83.
- (202) Eriksson T, Bjorkman S, Fyge A, Ekberg H. Determination of thalidomide in plasma and blood by high-performance liquid chromatography: avoiding hydrolytic degradation. *J Chromatogr* 1992; 582: 211-216.
- (203) Murphy-Poulton SF, Boyle F, Gu XQ, Mather LE. Thalidomide enantiomers: Determination in biological samples by HPLC and vancomycin-CSP. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006; 831: 48-56.
- (204) Liu P, Muller M, Grant M, Obermann B, Derendorf H. Tissue penetration of cefpodoxime and cefixime in healthy subjects. *J Clin Pharmacol* 2005; 45: 564-569.
- (205) Tomaselli F, Dittrich P, Maier A, et al. Penetration of piperacillin and tazobactam into pneumonic human lung tissue measured by in vivo microdialysis. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 55: 620-624.
- (206) Tomaselli F, Maier A, Matzi V, Smolle-Juttner FM, Dittrich P. Penetration of meropenem into pneumonic human lung tissue as measured by in vivo microdialysis. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2228-2232.
- (207) Hamrin K, Rosdahl H, Ungerstedt U, Henriksson J. Microdialysis in human skeletal muscle: effects of adding a colloid to the perfusate. *J Appl Physiol* 2002; 92: 385-393.
- (208) Huang YJ, Liao JF, Tsai TH. Concurrent determination of thalidomide in rat blood, brain and bile using multiple microdialysis coupled to liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 2005; 19: 488-493.
- (209) Rekharsky MV, Inoue Y. Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins. *Chem Rev* 1998; 98: 1875-1918.

- (210) Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 10-30.
- (211) Krebs in Deutschland. Saarbrücken: Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut (RKI), 2006: 110.
- (212) Artinian V, Kvale PA. Update in screening of lung cancer. *Respirology* 2005; 10: 558-566.
- (213) Henschke CI, Yankelevitz DF, Libby DM, Pasmantier MW, Smith JP, Miettinen OS. Survival of patients with stage I lung cancer detected on CT screening. *N Engl J Med* 2006; 355: 1763-1771.
- (214) Spira A, Ettinger DS. Multidisciplinary management of lung cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 379-392.
- (215) Lee D, Heymach JV. Emerging antiangiogenic agents in lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2006; 7: 304-308.
- (216) Jain RK. Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Res* 1988; 48: 2641-2658.
- (217) Massarelli E, Herbst RS. Use of novel second-line targeted therapies in non-small cell lung cancer. *Semin Oncol* 2006; 33 Suppl 1: 9-16.
- (218) Sridhar SS, Shepherd FA. Targeting angiogenesis: a review of angiogenesis inhibitors in the treatment of lung cancer. *Lung Cancer* 2003; 42 Suppl 1: 81-91.
- (219) Yano S, Matsumori Y, Ikuta K, Ogino H, Doljinsuren T, Sone S. Current status and perspective of angiogenesis and antivascular therapeutic strategy: non-small cell lung cancer. *Int J Clin Oncol* 2006; 11: 73-81.
- (220) Anscher MS, Garst J, Marks LB, et al. Assessing the ability of the antiangiogenic and anticytokine agent thalidomide to modulate radiation-induced lung injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 66: 477-482.
- (221) Merchant JJ, Kim K, Mehta MP, et al. Pilot and safety trial of carboplatin, paclitaxel, and thalidomide in advanced non small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2000; 2: 48-52.
- (222) Riedel RF, Crawford J, Dunphy F, Herndon li JE, Garst J, Kelley MJ. Phase II study of carboplatin, irinotecan, and thalidomide combination in patients with extensive stage small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006; in Press.
- (223) Teo SK, Colburn WA, Thomas SD. Single-dose oral pharmacokinetics of three formulations of thalidomide in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol* 1999; 39: 1162-1168.
- (224) Teo SK, Scheffler MR, Kook KA, et al. Effect of a high-fat meal on thalidomide pharmacokinetics and the relative bioavailability of oral formulations in healthy men and women. *Biopharm Drug Dispos* 2000; 21: 33-40.
- (225) Figg WD, Raje S, Bauer KS, et al. Pharmacokinetics of thalidomide in an elderly prostate cancer population. *J Pharm Sci* 1999; 88: 121-125.

- (226) Galmarini CM, Galmarini FC. Multidrug resistance in cancer therapy: role of the microenvironment. *Curr Opin Investig Drugs* 2003; 4: 1416-1421.
- (227) Presant CA, Wolf W, Waluch V, et al. Association of intratumoral pharmacokinetics of fluorouracil with clinical response. *Lancet* 1994; 343: 1184-1187.
- (228) Masson E, Zamboni WC. Pharmacokinetic optimisation of cancer chemotherapy. Effect on outcomes. *Clin Pharmacokinet* 1997; 32: 324-343.
- (229) Muller M, Mader RM, Steiner B, et al. 5-fluorouracil kinetics in the interstitial tumor space: clinical response in breast cancer patients. *Cancer Res* 1997; 57: 2598-2601.
- (230) Chu J, Gallo JM. Application of microdialysis to characterize drug disposition in tumors. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 45: 243-253.
- (231) Jain RK. Barriers to drug delivery in solid tumors. *Sci Am* 1994; 271: 58-65.
- (232) Jain RK. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 46: 149-168.
- (233) Zhou Q, Gallo JM. In vivo microdialysis for PK and PD studies of anticancer drugs. *Aaps J* 2005; 7: 659-667.
- (234) Murdter TE, Linder A, Friedel G, et al. Pharmakokinetik von Cyclophosphamid, Adriamycin und Adriamycin-Prodrug (HMR 1826) im ex-vivo-isolierten perfundierten humanen Lungenresektionsmodell (IHLP). *Pneumologie* 2000; 54: 494-498.
- (235) Murdter TE, Friedel G, Backman JT, et al. Dose optimization of a doxorubicin prodrug (HMR 1826) in isolated perfused human lungs: low tumor pH promotes prodrug activation by beta-glucuronidase. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301: 223-228.
- (236) Bohnenstengel F, Friedel G, Ritter CA, et al. Variability of cyclophosphamide uptake into human bronchial carcinoma: consequences for local bioactivation. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; 45: 63-68.
- (237) Qu Y, Van der Gucht E, Massie A, Vandenbussche E, Vandesinde F, Arckens L. In vivo microdialysis in the visual cortex of awake cat. III: histological verification. *Brain Res Brain Res Protoc* 2001; 7: 52-60.
- (238) Ault JM, Riley CM, Meltzer NM, Lunte CE. Dermal microdialysis sampling in vivo. *Pharm Res* 1994; 11: 1631-1639.
- (239) Davies MI, Lunte CE. Microdialysis sampling for hepatic metabolism studies. Impact of microdialysis probe design and implantation technique on liver tissue. *Drug Metab Dispos* 1995; 23: 1072-1079.
- (240) Georgieva J, Luthman J, Mohring B, Magnusson O. Tissue and microdialysate changes after repeated and permanent probe implantation in the striatum of freely moving rats. *Brain Res Bull* 1993; 31: 463-470.
- (241) Mathy FX, Denet AR, Vroman B, et al. In vivo tolerance assessment of skin after insertion of subcutaneous and cutaneous microdialysis probes in the rat. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2003; 16: 18-27.

- (242) Yoshioka M, Kikuchi A, Matsumoto M, Ushiki T, Minami M, Saito H. Evaluation of 5-hydroxytryptamine concentration in portal vein measured by microdialysis. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1993; 79: 370-376.
- (243) Sauernheimer C, Williams KM, Brune K, Geisslinger G. Application of microdialysis to the pharmacokinetics of analgesics: problems with reduction of dialysis efficiency in vivo. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1994; 32: 149-154.
- (244) De Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 490-511.
- (245) Kelly RF. Current strategies in lung preservation. *J Lab Clin Med* 2000; 136: 427-440.
- (246) Kawahara K, Kobayashi S, Takahashi T, et al. Efficacy of University of Wisconsin solution for canine lung preservation. *Transplant Proc* 1993; 25: 1599-1600.
- (247) Raymond PD, Ray MJ, Callen SN, Marsh NA. Heparin monitoring during cardiac surgery. Part 1: Validation of whole-blood heparin concentration and activated clotting time. *Perfusion* 2003; 18: 269-276.
- (248) Jang SH, Wientjes MG, Lu D, Au JL. Drug delivery and transport to solid tumors. *Pharm Res* 2003; 20: 1337-1350.
- (249) Bergenheim AT, Capala J, Roslin M, Henriksson R. Distribution of BPA and metabolic assessment in glioblastoma patients during BNCT treatment: a microdialysis study. *J Neurooncol* 2005; 71: 287-293.
- (250) Blochl-Daum B, Muller M, Meisinger V, Eichler HG, Fassolt A, Pehamberger H. Measurement of extracellular fluid carboplatin kinetics in melanoma metastases with microdialysis. *Br J Cancer* 1996; 73: 920-924.
- (251) Ekstrom PO, Andersen A, Saeter G, Giercksky KE, Slordal L. Continuous intratumoral microdialysis during high-dose methotrexate therapy in a patient with malignant fibrous histiocytoma of the femur: a case report. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; 39: 267-272.
- (252) Joukhadar C, Klein N, Mader RM, et al. Penetration of dacarbazine and its active metabolite 5-aminoimidazole-4-carboxamide into cutaneous metastases of human malignant melanoma. *Cancer* 2001; 92: 2190-2196.
- (253) Mader RM, Brunner M, Rizovski B, et al. Analysis of microdialysates from cancer patients by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 1998; 19: 2981-2985.
- (254) Mader RM, Schrolnberger C, Rizovski B, et al. Penetration of capecitabine and its metabolites into malignant and healthy tissues of patients with advanced breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 88: 782-787.
- (255) Muller M, Brunner M, Schmid R, et al. Interstitial methotrexate kinetics in primary breast cancer lesions. *Cancer Res* 1998; 58: 2982-2985.
- (256) Schuller J, Cassidy J, Dumont E, et al. Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; 45: 291-297.

- (257) Tegeder I, Brautigam L, Seegel M, et al. Cisplatin tumor concentrations after intra-arterial cisplatin infusion or embolization in patients with oral cancer. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 73: 417-426.
- (258) Lynch MJ, Grum CM, Gallagher KP, Bolling SF, Deeb GM, Morganroth ML. Xanthine oxidase inhibition attenuates ischemic-reperfusion lung injury. *J Surg Res* 1988; 44: 538-544.
- (259) Nezu K, Kushibe K, Tojo T, et al. Protection against lipid peroxidation induced during preservation of lungs for transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1994; 13: 998-1002.
- (260) De Perrot M, Fischer S, Liu M, et al. Prostaglandin E1 protects lung transplants from ischemia-reperfusion injury: a shift from pro- to anti-inflammatory cytokines. *Transplantation* 2001; 72: 1505-1512.
- (261) Fujino S, Nagahiro I, Yamashita M, et al. Preharvest nitroprusside flush improves posttransplantation lung function. *J Heart Lung Transplant* 1997; 16: 1073-1080.
- (262) Fehrenbach A, Wittwer T, Meyer D, et al. Nitroglycerin alters alveolar type II cell ultrastructure after ischemia and reperfusion. *J Heart Lung Transplant* 2001; 20: 876-888.
- (263) Wittwer T, Albes JM, Fehrenbach A, et al. Experimental lung preservation with Perfadex: effect of the NO-donor nitroglycerin on postischemic outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 125: 1208-1216.
- (264) Jheon S, Lee YM, Sung SW, et al. Pulmonary preservation effect of nitroglycerine in isolated rat lung reperfusion model. *Transplant Proc* 2004; 36: 1933-1935.
- (265) Karck M, Haverich A. Nifedipine and diltiazem reduce pulmonary edema formation during postischemic reperfusion of the rabbit lung. *Res Exp Med (Berl)* 1992; 192: 137-144.
- (266) Yokomise H, Ueno T, Yamazaki F, Keshavjee S, Slutsky A, Patterson G. The effect and optimal time of administration of verapamil on lung preservation. *Transplantation* 1990; 49: 1039-1043.
- (267) Sasaki S, Yasuda K, McCully JD, LoCicero J, 3rd. Calcium channel blocker enhances lung preservation. *J Heart Lung Transplant* 1999; 18: 127-132.
- (268) Wittwer T, Fehrenbach A, Meyer D, et al. Retrograde flush perfusion with low-potassium solutions for improvement of experimental pulmonary preservation. *J Heart Lung Transplant* 2000; 19: 976-983.
- (269) Toens C, Krones CJ, Blum U, et al. Validation of IC-VIEW fluorescence videography in a rabbit model of mesenteric ischaemia and reperfusion. *Int J Colorectal Dis* 2006; 21: 332-338.
- (270) Raabe A, Beck J, Gerlach R, Zimmermann M, Seifert V. Near-infrared indocyanine green video angiography: a new method for intraoperative assessment of vascular flow. *Neurosurgery* 2003; 52: 132-139.

- (271) Still J, Law E, Dawson J, Bracci S, Island T, Holtz J. Evaluation of the circulation of reconstructive flaps using laser-induced fluorescence of indocyanine green. *Ann Plast Surg* 1999; 42: 266-274.
- (272) PULSION Medical Systems. Produkte: IC-VIEW Technologie, IC-View Präsentation. Verfügbar unter: <http://www.pulsion.de>. Zugriff am: 2006/11/17
- (273) Surmann P. Titrations mit visueller Indikation. In: Von Bruckhausen F, Ebel S, Frahm AW, et al., Hrsg. *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*. Bd. 2. Heidelberg: Springer-Verlag, 1991: 347-357.
- (274) Tukey JW. A survey of sampling from contaminated distributions. In: Olkin I, Ghurye SG, Hoeffding W, Madow WG, Mann HB, Hrsg. *Contributions to probability and statistics: essays in honor of Harold Hotelling*. Stanford, Calif.: Stanford University Press, 1960: 448-485.
- (275) Braggio S, Barnaby RJ, Grossi P, Cugola M. A strategy for validation of bioanalytical methods. *J Pharm Biomed Anal* 1996; 14: 375-388.
- (276) Hartmann C, Smeyers-Verbeke J, Massart DL, McDowall RD. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J Pharm Biomed Anal* 1998; 17: 193-218.
- (277) Shah VP, Midha KK, Findlay JW, et al. Bioanalytical method validation--a revisit with a decade of progress. *Pharm Res* 2000; 17: 1551-1557.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Matthias Freiwald
Geburtstag	31. Januar 1977
Geburtsort	Würzburg

Ausbildung

September 1983 - Juli 1987	Grundschule Schillerschule, Würzburg
September 1987 - Juni 1996	Röntgen-Gymnasium in Würzburg: Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
November 1997 - Oktober 2001	Studium der Pharmazie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg: 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung: Sommer 1999 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung: Herbst 2001
November 2001 - April 2002	Praktische Ausbildung zum Apotheker in der Eulen-Apotheke, Würzburg
Mai 2002 - Oktober 2002	Praktische Ausbildung zum Apotheker am Institut für Biomedizinische und Pharmazeutische Forschung, Heroldsberg
November/Dezember 2002	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Erteilung der Approbation als Apotheker
Juni 2003 - Dezember 2006	Promotionsstudium am Institut für Pharmazie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Anleitung von Prof. Dr. Petra Högger

Berufstätigkeit

Dezember 2002 - Februar 2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biomedizinische und Pharmazeutische Forschung, Heroldsberg
März 2003 - Mai 2003	Angestellter Apotheker in der Eulen-Apotheke, Würzburg