

**Charakterisierung pharmakokinetischer und
pharmakodynamischer Aspekte der Anwendung von
Glucocorticoiden in der Herzschrittmachertherapie anhand von
ex-vivo und *in-vitro* Modellen**



Dissertation

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

vorgelegt von

Martin Haas

aus Zellingen

Würzburg 2015

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am:

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit wurde 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.

Bislang aus der Dissertation hervorgegangene Publikationen:

Posterbeitrag:

Haas, M., Högger P.:

Pharmacokinetic ex-vivo model for investigation of dissolution rate and tissue binding of drug releasing vascular medical devices

Chem SystM 2014, Chemie Symposium der Studierenden Mainfrankens, Würzburg

Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Frau Prof. Dr. Petra Högger danke ich sehr für die Möglichkeit in ihrem Arbeitskreis promovieren und dabei an diesem interessanten, wie praxisnahen Thema arbeiten zu dürfen. Ihre allzeit offene Tür ermöglichte weitreichende Diskussionen rund um diese Arbeit und bot stets wertvolle Hilfestellung. Für ihr mir entgegengebrachtes Vertrauen – sei es im Rahmen der verantwortungsvollen Lehrtätigkeiten in der Klinischen Pharmazie oder als Vertretung im Auslandseinsatz – möchte ich mich ganz besonders bedanken.

Für die Bereitstellung der Untersuchungsgegenstände und weiteren Equipments rund um das Thema Herzschrittmacher sowie der Gewebeproben, wodurch es mir überhaupt erst möglich war an diesem Thema zu arbeiten, möchte ich der Firma BIOTRONIK danken. Die verlässliche und unkomplizierte Zusammenarbeit ist dabei vor allem auf Dr. Ralf Bock, Dr. Christian Schnittker und Erik Trip zurückzuführen.

Hervorheben möchte ich insbesondere auch die Mitarbeiter der Institutswerkstatt um Herrn Georg Walter – Karl Vollmuth, Matthias Völker und Leon Kalikstein. Vor allem Letztgenannter trug durch seine hervorragende handwerkliche Arbeit maßgeblich zur Realisierung des Gewebebindungsmodells bei. Auch Matthias Völker möchte ich explizit erwähnen, beratschlagte er mich doch jederzeit bei Fragen zum Thema Elektrizität und half diverse Kontakte zu prüfen.

Kerstin Paprotka vom Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Würzburg gilt Dank für die Überlassung der Fibroblasten. Für die Hilfe bei den NMR-Messungen danke ich Sarah Wehle und Johannes Wiest. Alle anderen bei Messungen jeglicher Art behilflichen Personen seien freilich ebenfalls nicht vergessen.

Allen aktuellen respektive ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises Högger darf ich für die enorm schöne Zeit während diesem vergangenen Lebensabschnitt danken – und das gilt nicht nur aus der Retrospektive (in Reihenfolge des Erscheinens): Dr. Beatrice Trammer, Dr. Daniel Baumann, Dr. Klaus Uhlenhut, Roswitha Scheblein, Dr. Frederic Vollmers, Melanie Mulek, Lisa Schaaf, Steffen Jeßberger, Maike Scherf-Clavel, Dr. Jianbo Xiao, Hui Cao, Stoyan Dirimanov, Andreas Pospiech und Linda Volpp. Vielen Dank für viele Diskussionen von A wie Abseits bis Z wie (Umwelt-)Zone.

Dr. Armin Welker sei ein besonderer Dank für die zwar aufwendige, aber wirklich hervorragende und ziemlich spaßige Zusammenarbeit als vorübergehende Zwei-Mann-Mannschaft in der Klinischen Pharmazie gespendet. Nicht weniger erfreut, darf ich hier auch Lisa Schaaf und Steffen Jeßberger herausgreifen – ein an Zuverlässigkeit mustergültiges Team, das nicht nur für einen Besuch im Stadion zu gebrauchen ist.

Meiner Familie und Freunden, vor allem Gabriela Segerer und Dr. Simon Vogel danke ich für die moralische Unterstützung und Motivation während der Promotion, letzterem auch für seinen Beitrag zur Korrekturlesung. Hierfür möchte ich auch meinem Bruder Andreas und meiner lieben Christina meinen Dank aussprechen.

Dir, Christina, sei zumal sehr gedankt für dein unermessliches Vertrauen in uns.



<ohne Titel> M.Haas 2014, 14,8 x 10,5 cm, Aquarell

A	Einleitung	15
1	Grundlagen der Herzschrittmachertherapie und der Anwendung von Glucocorticoiden	16
1.1	Anatomie des Herzens	16
1.1.1	Grundlegender Aufbau des menschlichen Herzens	16
1.1.2	Schichten der Herzwand	18
1.1.3	Erregungsbildung, Erregungsleitung und Herzaktion	18
1.2	Grundlagen zur Herzschrittmachertherapie	20
1.2.1	Indikationen für die Herzschrittmachertherapie	20
1.2.2	Wesentliche Geräteeigenschaften und Funktionen eines Herzschrittmachers	21
1.2.3	Systemauswahl und Schrittmachercode	24
1.2.4	Implantation eines Herzschrittmachers	25
1.2.5	Reizschwelle und Grenzfläche zwischen Elektrode und Herzgewebe	26
1.3	Glucocorticoide in der Herzschrittmachertherapie	28
1.4	Pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften der in der Herzschrittmachertherapie eingesetzten Glucocorticoide	30
1.4.1	Struktur-Wirkungsbeziehung	30
1.4.2	Glucocorticoid-Wirkung und Wirkmechanismus	31
1.4.3	Pharmakokinetische Eigenschaften	33
2	Ziele der Arbeit.....	36
B	Allgemeiner Teil.....	39
1	Charakterisierung und Vergleich der Freisetzung der Glucocorticoide aus der Polymermatrix	40
1.1	LTSC – Das Freisetzungssystem einer Herzschrittmacherelektrode	40
1.2	Fragestellung.....	45
1.3	Bestimmung des Glucocorticoid-Gehaltes der LTSC.....	45
1.4	Freisetzung der Glucocorticoide in Methanol.....	47
1.5	Ergebnisse und Diskussion der Freisetzungsversuche in Methanol.....	48
2	Charakterisierung des Freisetzungsverhaltens der Glucocorticoide aus der Polymermatrix in Humanplasma	54
2.1	Fragestellung.....	54
2.2	Bestimmung der Aufnahmekapazität des Humanplasmas für Glucocorticoide.....	56
2.2.1	Entwicklung und Versuchsprinzip des Dialyseverfahrens	57
2.2.2	Ergebnisse und Diskussion	60
2.3	Freisetzung der Glucocorticoide in Humanplasma.....	64
2.4	Ergebnisse der Freisetzungsversuche in Humanplasma	67
2.5	Diskussion der Freisetzungsversuche in Humanplasma.....	71
3	Charakterisierung der lokalen Gewebebindung der Glucocorticoide an der Schnittstelle zwischen Herzgewebe und Herzschrittmacherelektrode.....	78
3.1	Fragestellung.....	78
3.2	Entwicklung und Prinzip des <i>ex-vivo</i> Modells zur Bestimmung der lokalen Gewebebindung an das Herzgewebe	82
3.2.1	Entwicklung des Modellaufbaus	82
3.2.2	Versuchsprinzip des Gewebebindungsmodells.....	86
3.3	Ergebnisse	88
3.3.1	Ergebnisse der Gewebebindungsversuche.....	88
3.3.2	Untersuchung der unspezifischen Bindung an Kunststoffmaterialien und der Bindung an die Kollagen-Matrix.....	94
3.4	Diskussion der Gewebebindungsversuche	95

3.5	Schlussfolgerung der pharmakokinetischen Untersuchungen zum Einsatz von Glucocorticoiden in der Herzschrittmachertherapie	100
4	<i>In-vitro</i> Versuche zur Stimulation von Endothelzellen mittels externem Herzschrittmachersystem.....	102
4.1	Fragestellung	102
4.2	Versuchsprinzip und Entwicklung	104
4.3	Ergebnisse der Elektrostimulationsversuche	109
4.3.1	Ergebnisse nach 24 Stunden und einer bipolaren Elektrode	109
4.3.2	Ergebnisse nach 24 und 48 Stunden mit zwei unipolaren Elektroden	111
4.4	Diskussion.....	113
5	<i>In-vitro</i> Vergleich der Bioaktivitäten der eingesetzten Glucocorticoide nach Freisetzung aus der Polymermatrix.....	118
5.1	Fragestellung	118
5.2	Versuchsprinzip.....	120
5.2.1	Bioaktivitäts-Assay mit Freisetzung aus LTSC	121
5.2.2	Bioaktivitäts-Assay mit inkrementeller Glucocorticoid-Zugabe	125
5.3	Ergebnisse	127
5.3.1	Freisetzung aus LTSC im Zellkulturmodell	127
5.3.2	Inhibition der IL-6 Sekretion nach 24 und 48 Stunden	128
5.3.3	Inhibition der MMP-9 Sekretion nach 24 und 48 Stunden.....	131
5.4	Diskussion.....	133
6	Einfluss von Glucocorticoiden auf die Zellproliferation der humanen Zelllinien EA.hy926 und IMR-90	138
6.1	Fragestellung	138
6.2	Versuchsprinzip.....	139
6.3	Ergebnisse	142
6.4	Diskussion.....	144
6.5	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Zellwachstums in Umgebung der Freisetzungsmatrix.....	147
6.6	Schlussfolgerung der pharmakodynamischen Untersuchungen zum Einsatz von Glucocorticoiden in der Herzschrittmachertherapie	150
7	Abbauprodukte von Dexamethason und Beclomethason unter Langzeitinkubation in humanem Blutplasma und verschiedenen Puffersystemen	151
7.1	Identifizierung unerwarteter Substanzen mittels LC/MS und Magnetresonanzspektroskopie	151
7.1.1	Identifizierung des BDP-Abbauprodukts	152
7.1.2	Identifizierung des DXA-Abbauproduktes	156
7.2	Stabilität von Beclomethason in humanem Blutplasma und verschiedenen Puffersystemen	157
7.2.1	Versuchsprinzip.....	159
7.2.2	Ergebnisse und Diskussion der Stabilitätsuntersuchungen	159
7.3	Herstellung von Referenzsubstanzen für die Analytik.....	165
7.3.1	9,11-Epoxy-Beclomethason	165
7.3.2	17-Oxo-Dexamethason	167
C	Experimenteller Teil	177
1	Charakterisierung und Vergleich der Freisetzung der Glucocorticoide aus der Polymermatrix.....	178
1.1	Verwendete Arbeitsmittel	178
–	Substanzen und Reagenzien	178
–	Material und Geräte	179
1.2	Stammlösungen und Standards zur Kalibrierung.....	180

–	Stamm- und Kalibrierlösungen	180
–	Kalibrierstandards	180
1.3	Bestimmung des Glucocorticoid-Gehalts der LTSC	180
1.3.1	Untersuchungsgegenstände	180
1.3.2	Ermittlung des Collar-Gewichts und Berechnung des absoluten Soll-Gehalts.....	181
1.3.3	Extraktion der Collar zur Gehaltsanalyse	182
1.3.4	Probenaufarbeitung	182
1.3.5	Quantifizierung mittels HPLC/UV und Auswertung	182
1.4	Freisetzung der Glucocorticoide in Methanol	183
1.4.1	Untersuchungsgegenstände	183
1.5	Versuchsdurchführung	183
1.6	Extraktion des Restgehalts der untersuchten Collar	184
1.7	Quantifizierung mittels HPLC/UV und Auswertung	184
2	Charakterisierung des Freisetzungsverhaltens der Glucocorticoide aus der Polymermatrix in Humanplasma	185
2.1	Verwendete Arbeitsmittel	185
–	Substanzen und Reagenzien	185
–	Material und Geräte.....	186
2.1.1	Untersuchungsgegenstände	187
2.1.2	Stammlösungen und Standards zur Kalibrierung.....	187
–	Stamm- und Kalibrierlösungen	187
–	Kalibrierstandards	187
2.2	Versuchsdurchführung	188
–	Vorbereitung der LTSC	188
–	Vorbereitung des Freisetzungsmediums.....	188
–	Freisetzung der Glucocorticoide und Ziehung der Proben.....	188
2.3	Probenaufarbeitung.....	189
2.4	Extraktion des Restgehaltes der untersuchten Collar	189
2.5	Quantifizierung mittels HPLC/UV und Auswertung	190
2.6	Kontrolle der Qualität des verwendeten Humanplasmas	190
2.6.1	Kontrolle des pH-Werts	190
2.6.2	Kontrolle des Proteingehaltes mittels Bradford-Assay	190
2.7	Bestimmung der Aufnahmekapazität für Glucocorticoide in Humanplasma	191
2.7.1	Durchführung der Bestimmung	191
2.7.2	Probenaufarbeitung, Quantifizierung und Auswertung.....	191
3	Charakterisierung der lokalen Gewebebindung der Glucocorticoide an der Schnittstelle zwischen Herzgewebe und Herzschritmacherelektrode.....	192
3.1	Verwendete Arbeitsmittel	192
–	Substanzen und Reagenzien	192
–	Material und Geräte.....	193
3.1.1	Untersuchungsgegenstände	193
3.1.2	Stammlösungen und Standards zur Kalibrierung.....	194
–	Stamm- und Kalibrierlösungen	194
–	Kalibrierstandards	194
3.1.3	Spezialanfertigungen.....	195
3.2	Versuchsdurchführung	198
–	Vorbereitung des Schafsherzgewebes.....	198
–	Herstellung des Kollagen-Gels.....	198
–	Vorbereitung der Versuchsanlage	199
–	Versuchsablauf und Probenentnahme	200
3.3	Probenaufarbeitung	201
3.4	Quantifizierung mittels HPLC/UV und Auswertung	201
3.5	Bestimmung der unspezifischen Bindung der Glucocorticoide an das Material des Modellaufbaus	201

4	<i>In-vitro</i> Versuche zur Stimulation von Endothelzellen mittels externem Herzschrittmachersystem.....	203
4.1	Verwendete Arbeitsmittel und Zellkulturmaterialien	203
–	Substanzen und Reagenzien	203
–	Zelllinien	203
–	Material und Geräte	204
4.2	Routinemethoden der Zellkultur	205
–	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	205
–	Kultivierung, Subkultivierung und Mediumwechsel	205
–	Zellzählung mit Vitalitätstest.....	206
4.3	Schrittmachermodell zur elektrischen Reizung für <i>in-vitro</i> Versuche	206
4.4	Durchführung der Versuche zur elektrischen Reizung.....	211
4.5	Bestimmung ausgewählter Entzündungsmediatoren und des Wachstumsfaktors VEGF mittels Sandwich-ELISA	213
5	<i>In-vitro</i> Vergleich der Bioaktivitäten der eingesetzten Glucocorticoide nach Freisetzung aus der Polymermatrix.....	215
5.1	Verwendete Arbeitsmittel	215
5.2	Glucocorticoid-Stammlösung	215
5.3	Vergleich der Bioaktivitäten von DXA, GCX und BDP nach Freisetzung aus LTSC.....	215
5.3.1	Durchführung des Bioaktivitätsvergleichs bei inkrementeller Aufdosierung der Glucocorticoide	215
5.3.2	Durchführung des Bioaktivitätsvergleichs bei direkter Freisetzung der Glucocorticoide aus LTSC	217
–	Freisetzungsmedium	217
–	Durchführung	217
5.3.3	Bestimmung der Entzündungsmediatoren IL-6 und MMP-9	218
6	Einfluss von Glucocorticoiden auf die Zellproliferation der humanen Zelllinien EA.hy926 und IMR-90	219
6.1	Verwendete Arbeitsmittel	219
–	Substanzen und Reagenzien	219
–	Material und Geräte	219
6.2	Stammlösungen	220
6.3	Durchführung des Wachstumsversuchs	220
6.3.1	Bestimmung der Zellzahl mittels CyQuant® Assay.....	221
6.4	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von IMR-90 Fibroblasten in direkter Umgebung Steroid-freisetzender Collar im Vergleich zu Placebo-Collar	222
6.4.1	Vorbereitung der Zellen.....	222
6.4.2	Fluoreszenzmikroskopie	223
7	Identifizierung und Herstellung der Abbauprodukte 17-Oxo-Dexamethason und 9,11-Epoxy-Beclomethason.....	224
7.1	Verwendete Arbeitsmittel	224
–	Substanzen und Reagenzien	224
–	Material und Geräte	225
7.2	Identifizierung der unbekanntenen Abbauprodukte in Humanplasma als 17-Oxo-Dexamethason und 9,11-Epoxy-Beclomethason	226
7.2.1	Bestimmung der Molekülmassen mittels LC/MS.....	226
–	Geräteangaben LC/MS	226
–	Messbedingungen.....	226
–	Probenaufarbeitung.....	228
7.2.2	Bestätigung der Strukturen mittels NMR.....	228
–	Geräteangaben NMR	229
–	Probenvorbereitung.....	229
7.3	Herstellung von 17-Oxo-Dexamethason	229
7.4	Herstellung von 9,11-Epoxy-Beclomethason	230

7.5	Stabilität von Beclomethason in humanem Blutplasma und verschiedenen Puffersystemen	231
7.5.1	Verwendete Puffer.....	231
7.5.2	Durchführung der Stabilitätsuntersuchungen	231
7.5.3	Quantifizierung mittels HPLC/UV und Auswertung	232
8	Validierung der chromatographischen Analysemethoden	233
8.1	HPLC-Methoden.....	233
8.1.1	Geräteangaben HPLC.....	233
8.1.2	HPLC-Methode für Messungen nach direkter Injektion methanolischer Lösungen	233
–	Messbedingungen	233
–	Analysesequenz	234
–	Auswertung der Chromatogramme	235
8.1.3	HPLC-Methode für Messungen nach Probenaufarbeitung aus humanem Blutplasma und Schafsherzgewebe	235
–	Messbedingungen	236
–	Auswertung der Chromatogramme	236
8.2	Methodenvalidierung für Messungen nach Direktinjektion aus Methanol	237
8.2.1	Selektivität	238
8.2.2	Linearität und Arbeitsbereich.....	238
8.2.3	Präzision und Richtigkeit	240
8.2.4	Bestimmungsgrenze.....	241
8.3	Methodenvalidierung für Messungen nach Probenaufarbeitung aus Humanplasma.....	242
8.3.1	Selektivität	242
8.3.2	Linearität und Arbeitsbereich.....	243
8.3.3	Präzision und Richtigkeit	244
8.3.4	Bestimmungsgrenze.....	245
8.3.5	Extraktionseffektivität	245
8.3.6	Stabilität.....	247
8.4	Methodenvalidierung für Messungen nach Probenaufarbeitung aus Schafsherzgewebe	249
8.4.1	Selektivität	249
8.4.2	Linearität und Arbeitsbereich.....	250
8.4.3	Präzision und Richtigkeit	251
8.4.4	Bestimmungsgrenze.....	251
8.4.5	Extraktionseffektivität	252
D	Tabellarischer Anhang.....	255
1	Charakterisierung und Vergleich der Freisetzung der Glucocorticoide aus der Polymermatrix	256
2	Charakterisierung des Freisetzungsverhaltens der Glucocorticoide aus der Polymermatrix in Humanplasma	259
2.1	Ergebnisse der Freisetzungsversuche	259
2.2	Bestimmung der Aufnahmekapazität für Glucocorticoide in Humanplasma	263
3	Charakterisierung der lokalen Gewebbindung der Glucocorticoide an der Schnittstelle zwischen Herzgewebe und Herzschrittmacherelektrode.....	265
4	<i>In-vitro</i> Versuche zur Stimulation von Endothelzellen mittels externem Herzschrittmachersystem.....	270
4.1	Stimulation mit einer bipolaren Elektrode über 24 Stunden	270
4.2	Stimulationsversuche mit 2 unipolaren Elektroden über 48 Stunden	272
5	<i>In-vitro</i> Vergleich der Bioaktivitäten der eingesetzten Glucocorticoide nach Freisetzung aus der Polymermatrix.....	274

5.1	Vergleich mit inkrementeller Dosiszugabe	274
5.2	Vergleich mit Freisetzung aus LTSC.....	275
5.3	<i>In-vitro</i> Freisetzung der Glucocorticoide aus LTSC	276
6	Einfluss von Glucocorticoiden auf die Zellproliferation der humanen Zelllinien EA.hy926 und IMR-90	278
7	Abbauprodukte von Dexamethason und Beclomethason unter Langzeitinkubation in humanem Blutplasma und verschiedenen Puffersystemen	282
7.1	¹ H-NMR-Daten	282
7.2	Stabilitätsuntersuchungen zu BOH	284
7.2.1	Bildung und Verlust von 9,11-Epoxy-BOH aus BOH in Humanplasma	284
7.2.2	Bildung von 9,11-Epoxy-BOH aus BOH in verschiedenen Puffersystemen	285
8	Eigenschaften ausgewählter Glucocorticoide	287
E	Zusammenfassung	291
F	Abkürzungsverzeichnis	299
G	Literaturverzeichnis	303

A Einleitung

1 Grundlagen der Herzrhythmus- und der Anwendung von Glucocorticoiden

1.1 Anatomie des Herzens

Zur Anatomie des menschlichen Herzens sei lediglich ein Überblick zum anschaulichen Verständnis der Herzrhythmus-therapie gegeben. Für eine ausführliche Beschreibung des Organs und weiterführende Informationen zu diesem Thema sei auf entsprechende Tertiärliteratur verwiesen, aus der auch die Informationen in den folgenden Abschnitten 1.1.1 bis 1.1.3 entnommen wurden [1-3].

1.1.1 Grundlegender Aufbau des menschlichen Herzens

Das menschliche Herz ist ein Hohlmuskel, der zu etwa zwei Dritteln nach links der Medianebene, also der den Körper in der Vertikalen genau in eine linke und rechte Hälfte teilenden Ebene, verschoben im Brustraum liegt. In seiner Größe entspricht es in etwa der Faust des jeweiligen Menschen und wiegt für gewöhnlich 250 bis 300 g. Es besteht aus vier Hohlräumen, jeweils einem Vorhof auf der rechten und der linken Seite (*Atrium dextrum* und *Atrium sinistrum*) und einer rechten beziehungsweise linken Kammer (*Ventrikulus dexter* und *Ventrikulus sinister*, siehe Abb. 1). Die Kammerscheidewand stellt die Trennwand zwischen der rechten und der linken Kammer dar und bildet zusammen mit der Vorhofscheidewand die Gesamtheit der Herzscheidewand. Der jeweils untere Teil der konisch geformten Kammern liegt an der Herzspitze (*Apex cordis*). Das apikale Ende des Herzens zeigt in etwa schräg nach links unten vorne. Das obere Ende ist die Herzbasis (*Basis cordis*) und wird vor allem durch die Rückwand des linken Vorhofs ausgemacht. Die Vorderseite des Herzens beim Blick auf die Brust wird im Wesentlichen durch den rechten Vorhof und die rechte Kammer gebildet. Dem Blutfluss aus der venösen Einstrombahn folgend beginnt das Herz mit dem rechtem Vorhof. Das sauerstoffarme venöse Blut strömt über die obere und die untere Hohlvene (*Vena cava superior* beziehungsweise *inferior*) aus dem venösen Blutkreislauf in den hinteren Teil des rechten Vorhofs ein, der sich nach vorne hin (ventral) fortsetzt und mit dem rechten Herzohr eine Art Aussackung, auch Blindsack genannt, besitzt. Über die Trikuspidalklappe, eine dreiteilige Segelklappe, ist der Vorhof mit der rechten Herzkammer verbunden. Die Kammer lässt sich in eine Einflusssbahn, über die das Blut aus dem rechten Vorhof in die Kammer gelangt, und eine Ausflusssbahn gliedern. Der letztere glattwandige Teil der Kammer führt das Blut in Richtung des Lungenkreislaufs, demgegenüber die Kammer durch die Pulmonalklappe getrennt ist.

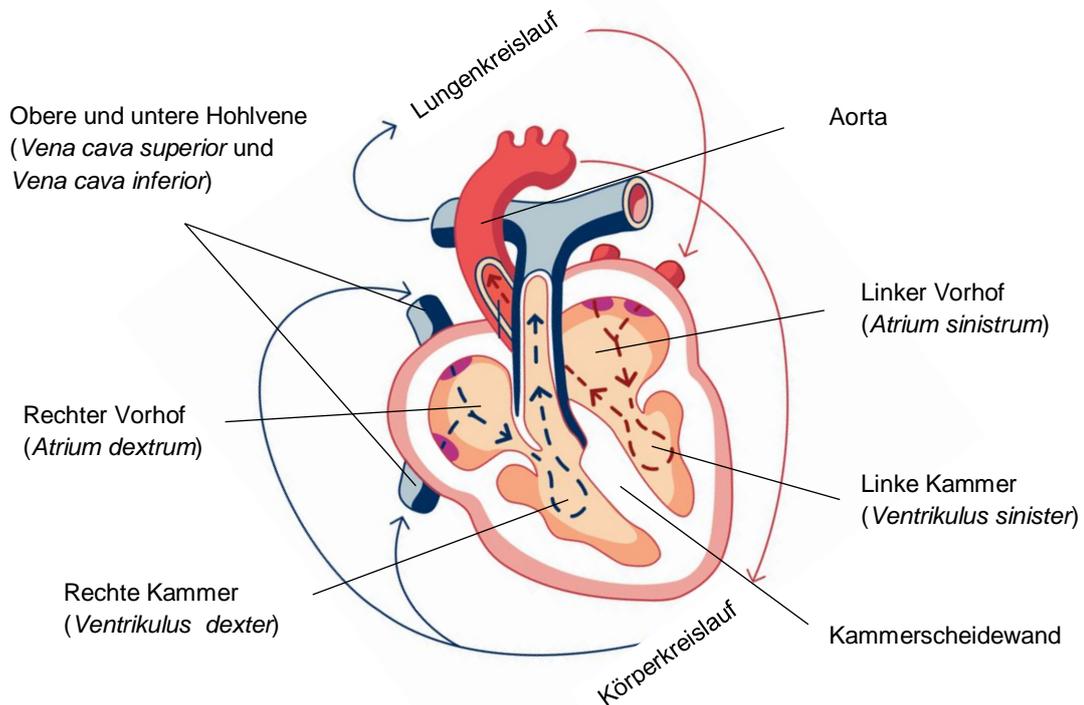


Abb. 1: Schematischer Aufbau des menschlichen Herzens. Bildmaterial aus [4] mit freundlicher Genehmigung von BIOTRONIK.

Nach dem Gasaustausch gelangt das Blut nun aus dem Lungenkreislauf über zwei Lungenvenen (jeweils eine Vene pro Lungenseite) ohne eine Klappe passieren zu müssen in den linken Vorhof, der ähnlich dem rechten Vorhof einen Blindsack als Herzohr besitzt. Der linke Vorhof mündet über die Bikuspidalklappe, einer zweigliedrigen Segelklappe, in die konisch geformte linke Herzkammer. Wie die rechte Kammer erfolgt auch hier eine Untergliederung in eine Einflussbahn und eine Ausflussbahn. Während Erstere analog der rechten Kammer mit der den Vorhof abtrennenden Herzklappe beginnt und durch das Trabekelwerk eine zerklüftete Erscheinung zeigt, ist die Ausflussbahn wiederum glattwandig. Sie führt letztlich entlang der Kammerscheidewand zur Aortenklappe, nach deren Passage das Blut das Herz wieder nach oben gerichtet in die Aorta verlässt und über den Aortenbogen, der die Lungenvene (*Truncus pulmonalis*) überkreuzt, wieder dem Körperkreislauf zugeführt wird.

Der zentrale Bindegewebskörper des Herzens ist das Herzskelett in dem die Trikuspidalklappe, die Bikuspidalklappe und die Aortenklappe liegen und aneinander grenzen. Auch die vierte Klappe, die Pulmonalklappe, liegt mit den anderen auf einer Ebene, ist jedoch nicht im Herzskelett verankert. Diese Ebene wird deshalb auch Ventilebene genannt.

1.1.2 Schichten der Herzwand

Das gesamte Organ ist im Perikard, einem serösen Beutel (Herzbeutel), gelagert. Die Wände des Herzens selbst sind aus drei Schichten aufgebaut. Das Epikard, das von einer dünnen Bindegewebsschicht (Mesothel) und einer breiten Schicht aus Fettgewebe überzogen ist, bildet die äußere Schicht und umgibt den Herzmuskel (Myokard) in Richtung des Herzbeutels. Das Myokard bildet den wesentlichen Teil der Herzwand. Es kann selbst wiederum in Bereiche des Vorhofmyokards und Kammermyokards, sowie in äußere (subepikardiale) und innere (subendokardiale) Schichten unterteilt werden. Nach innen, luminal, wird das Myokard vom Endokard abgeschlossen. Das Endokard stellt die Fortsetzung der inneren Gefäßwandschichten dar und besteht somit aus einer Endothelzellschicht und einer dünnen Bindegewebsschicht [5, 6].

Trotz der durch das Myokard unwillkürlich ausgeübten Bewegung, besteht es wie die Skelettmuskulatur aus quergestreiften Muskelfasern. Die Dicke der Muskelschicht in den entsprechenden Bereichen wird letztlich durch den Grad der Beanspruchung bestimmt. So ist die Muskulatur an den Vorhöfen deutlich schwächer ausgeprägt, als an den Kammern und an der linken Kammer wiederum in etwa dreimal so stark wie an der rechten Kammer.

1.1.3 Erregungsbildung, Erregungsleitung und Herzaktion

Das Herz führt seine Pumpen-Funktion durch den wiederholten Ablauf von Systole und Diastole aus, was im Wesentlichen einer wechselnden volumetrischen Verkleinerung und Vergrößerung der Kammern und der Vorhöfe entspricht, die durch eine Lageänderung der Ventilebene hervorgerufen wird.

Die Systole beschreibt die Phase, in der sich die Kammern kontrahieren und beginnt mit der isovolumetrischen Anspannung des Kammermyokards. Erst wenn der durch die Wandspannung erzeugte Druck in den Kammern den Druck in der Aorta und im Lungenkreislauf übersteigt, kommt es zur Volumenkontraktion und dem Auswurf des Blutes aus den Kammern in Richtung Körper- und Lungenkreislauf. Die Segelklappen zwischen den Vorhöfen und den Kammern verhindern dabei den Rückstrom in die Vorhöfe. Die Volumenkontraktion kommt dadurch zustande, dass durch die Kontraktion des Kammermyokards die Ventilebene am Herzskelett in Richtung der Herzspitze gezogen wird. Entsprechend vergrößert sich dabei gleichzeitig das Volumen der Vorhöfe, wodurch eine Sogwirkung auf das venöse Blut ausgeübt wird und sich der rechte Vorhof mit Blut aus dem Körperkreislauf füllt und der linke Vorhof mit dem nun sauerstoffangereicherten Blut aus dem Lungenkreislauf.

In der Diastole entspannt sich die Kammermuskulatur zunächst isovolumetrisch, also ohne dass sich dabei sofort das Volumen der Kammern ändert. Durch den Auswurf des Blutes und der fehlenden Spannung des Myokards kommt es zum Druckabfall in den

Kammern, was das Schließen der Aorten- und Pulmonalklappen bewirkt, sobald der Druck in den Kammern unter das Niveau in der Aorta und im Lungenkreislauf abfällt. Die in der Systole zur Herzspitze hin gezogene Ventilebene kehrt anschließend in ihre Ausgangsposition zurück, wodurch sich das Volumen der Kammern wieder vergrößert und das Volumen der bereits mit Blut gefüllten Vorhöfe kleiner wird. Sobald der Druck in den Vorhöfen den in den Kammern übersteigt kommt es zur passiven Füllung der Kammern, indem das Blut aus den Vorhöfen durch die sich dem Druckverlauf folgend öffnenden Segelklappen in die Kammern strömt. Da dies lediglich durch die Lageänderung der Ventilebene in der Entspannungsphase des Kammermyokards geschieht, könnte man den Vorgang auch damit beschreiben, dass sich die Kammer über das Blut in den Vorhöfen stülpt. Erst am Ende dieser passiven Kammerfüllungsphase kommt es durch eine anschließende Kontraktion der Vorhofmuskulatur zu einem aktiven Vorgang, bei dem ein kleiner Teil des in den Vorhöfen verbliebenen Restvolumens in die Kammern getrieben wird.

Diese konzertierte Herzaktion wird durch eine unwillkürliche Erregungsbildung und Weiterleitung des Reizes durch spezielle Muskelzellen gewährleistet. Der primäre physiologische Schrittmacher des Herzens ist der Sinusknoten, der in etwa in der Nähe des rechten Herzhohls an der Einmündungsstelle der oberen Hohlvene liegt und als Ruhepuls etwa 60 bis 80 Schläge pro Minute generiert. Von hier aus breitet sich die Erregung über die Vorhofmuskulatur aus und läuft erneut im Atrioventrikular-Knoten (AV-Knoten) an der Grenze der Vorhöfe zu den Kammern zusammen (*siehe Abb. 2*). Die weitere Erregungsleitung erfolgt abwärts des AV-Knotens durch das Herzskelett hindurch über die His-Bündel. Mit Beginn der Kammercheidewand teilt sich das Erregungsleitungssystem in einen rechten und einen linken Schenkel (auch Tawara-Schenkel genannt), die sich beiderseits zur Herzspitze hinunter in einem Geflecht feiner peripherer Bahnen fortsetzen und anschließend rückläufig in Richtung der Herzbasis ziehen (Purkinje-Fasern). Alle Teile dieses Systems sind zwar nicht nur in der Lage die Erregung weiterzuleiten, sondern auch selbst einen Reiz auszulösen, der Sinusknoten besitzt jedoch die höchste Frequenz und hindert damit im gesunden Herz eine Erregungsbildung in den weiteren Teilen, welche nach Weiterleitung des vom Sinusknoten ausgelösten Reizes selbst für eine gewisse Zeit lang nicht mehr erregbar sind (Refraktärzeit). Die Reihenfolge der Kontraktion der Herzmuskulatur ist wichtig für einen ökonomischen Herzschlag mit optimaler Hämodynamik. Je nachdem welcher Teil dieses Erregungssystems gestört ist kann mit einem passenden Herzschrittmachersystem therapeutisch eingegriffen werden (*siehe Abschnitt 1.2.3*).

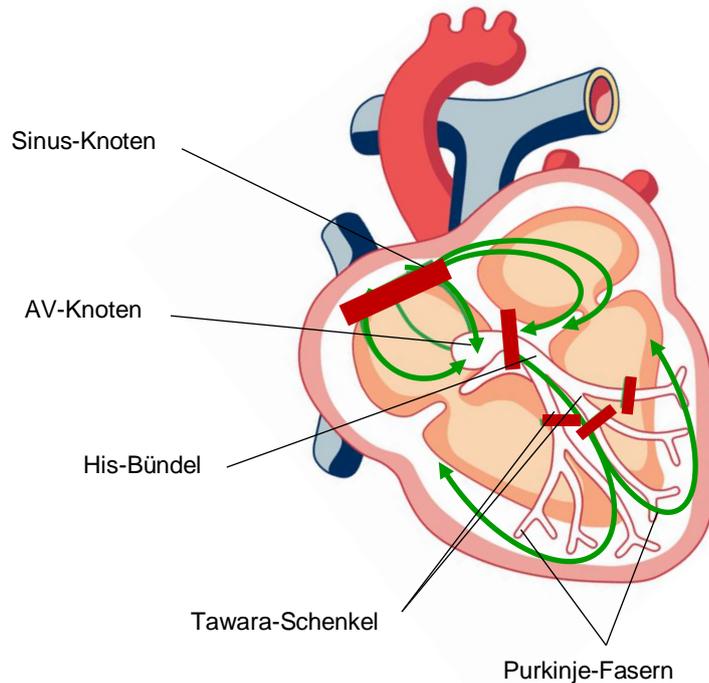


Abb. 2: Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystem des Herzens. Die grünen Pfeile deuten die vom Sinus-Knoten ausgehenden Ausbreitungsrichtungen an. Zunächst findet eine konzertierte Depolarisation der Vorhöfe statt, wonach sich die Erregung über den AV-Knoten in Richtung der Herzspitze und das nachfolgende Leitungssystem über die Kammern ausbreitet. Durch die Refraktärzeit des Vorhofmyokards wird ein Kreisen der vom Kammermyokard rückläufigen Erregung mit Folge arrhythmischer Herz­­tätigkeit vermieden. Die roten Balken deuten die Stellen des Erregungs- und Leitungssystems an, die häufig von Störungen betroffen sind. Bildmaterial verändert nach [4] mit freundlicher Genehmigung von BIOTRONIK.

1.2 Grundlagen zur Herzschrittmachertherapie

1.2.1 Indikationen für die Herzschrittmachertherapie

Eine permanente Herzschrittmachertherapie ist in der Regel bei symptomatischen bradykarden Rhythmusstörungen indiziert, also bei pathologisch verlangsamtem Herzschlag, der beispielsweise mit Symptomen wie Schwindel, Synkopen oder einer angehenden Herzinsuffizienz einhergeht [7, 8]. Zusätzlich muss Klarheit über den kausalen Zusammenhang der Symptome und der Bradykardie herrschen und ein persistierender Zustand, dem nicht durch eine vorübergehende Therapie beizukommen ist, ebenso sichergestellt sein, wie der Ausschluss einer Verursachung durch eine (unerwünschte) Arzneimittelwirkung [7, 8].

Es sei angemerkt, dass prinzipiell zwischen einer temporären und einer

permanenten Schrittmachertherapie zu unterscheiden ist, welche sich neben der Therapiedauer vor allem durch den Grad der Invasivität des Eingriffs und der erforderlichen Indikationsstellungen unterscheiden [8, 9]. Die permanente Schrittmachertherapie stellt dabei die wohl häufigste Form zur künstlichen Erregung des Herzens dar [9], so wurden in den Jahren 2006 bis 2008 alleine in Deutschland etwa 70 000 Geräte pro Jahr neu implantiert [8]. Da sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit implantierbaren Systemen befasst, die für eine dauerhafte Anwendung meist bis an das Lebensende eines Patienten bestimmt sind, beziehen sich alle folgenden Informationen auf die permanente Schrittmachertherapie, insofern nicht vereinzelt anders angemerkt.

Die häufigsten Indikationen zur permanenten Schrittmachertherapie sind das Sinus-Knoten-Syndrom, bestehend aus Sinusarrest, Sinusbradykardie, Brady-Tachy-Syndrom und chronotroper Insuffizienz, sowie Störungen der weiteren Teile des Erregungsbildungs- und Leitungssystems, beispielsweise atrioventrikuläre und faszikuläre Leitungsstörungen oder kongenitale und erworbene AV-Blockierungen (Grad II und III) [10, 11]. Seltener sind das Karotissinussyndrom, vasovagale Synkopen, hypertrophe obstruktive Kardiomyopathien, oder bradykarde Herzrhythmusstörungen nach einer Herzoperation [10]. Die genaue Wahl des zu implantierenden Systems und die entsprechende Programmierung des Geräts sind abhängig von patientenindividuellen Parametern wie der genauen Art der zugrundeliegenden kardialen Erkrankung und der Häufigkeit, mit der die bradykarden Störung beim Patienten auftritt [7]. Eine kurze Erläuterung zur Systemauswahl findet sich in Abschnitt 1.2.3, aufgrund der Komplexität und des Umfangs dieses Themenbereichs sei des Weiteren auf entsprechende Leitlinien und weiterführende Literatur verwiesen [7, 9, 10, 12].

1.2.2 Wesentliche Geräteeigenschaften und Funktionen eines Herzschrittmachers

Ein Herzschrittmacher soll die endogene unwillkürliche Schrittmacherfunktion des Myokards ersetzen, indem er seinen externen elektrischen Stromimpuls auf das Herzgewebe übertragen und damit eine Depolarisation einiger Herzmuskelzellen hervorrufen soll [9]. Diese soll sich wie eine körpereigene Erregung über den intakten Teil des Erregungsleitungssystems des Herzens ausbreiten und zu einer vollständigen Kontraktion des Herzens bei möglichst physiologischer Hämodynamik führen [9]. Um diese Funktion auszuüben und den Patienten in seiner Lebensqualität möglichst wenig zu beeinflussen, bedarf es neben der Impulsabgabe selbst auch einer Wahrnehmungsfunktion, um auf die Restfunktion des Herzens reagieren zu können und eine Frequenzanpassung der Impulsabgabe je nach Grad der körperlichen Anstrengung vornehmen zu können [9]. Zudem ist eine Steuereinheit essentiell, die die Eingangssignale der Wahrnehmungsfunktion verarbeitet und die Impulsabgabe des Schrittmachers somit

den jeweiligen körperlichen Ansprüchen anpasst [9, 10].

Ein Schrittmachersystem besteht im Wesentlichen aus zwei übergeordneten Bauteilen. Dies sind der eigentliche Impulsgeber, der die Batterie und die Steuereinheit in einem biokompatiblen Gehäuse aus Titan beinhaltet (siehe Abb. 3), sowie die Schrittmacherelektrode, auch Sonde genannt (siehe Abb. 4, in der Arbeit werden fortwährend die Begriffe Elektrode oder Schrittmacherelektrode verwendet).

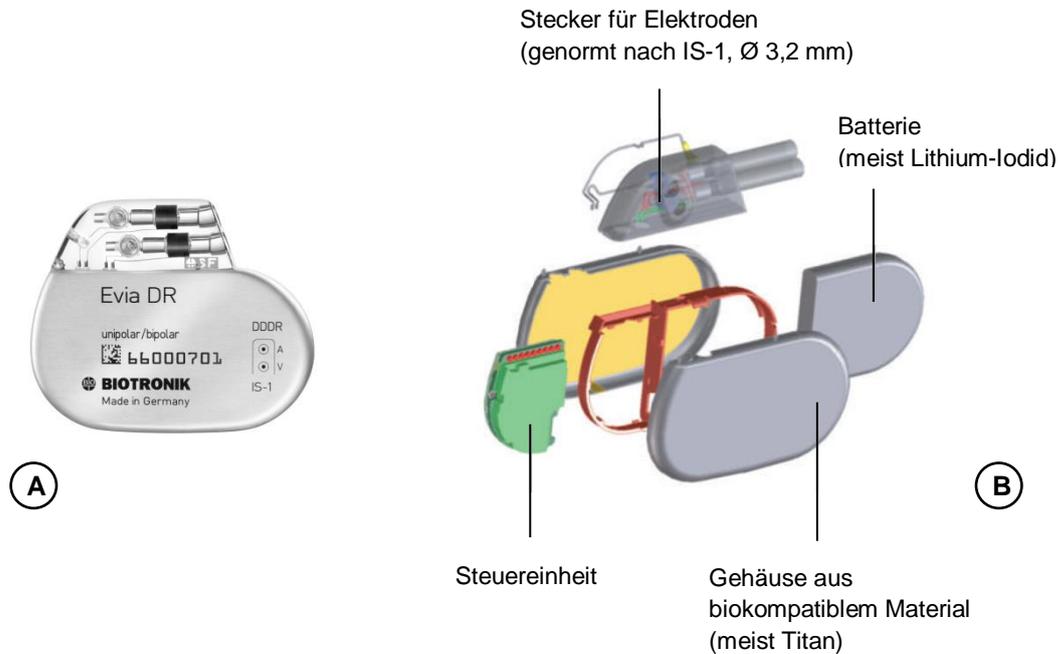


Abb. 3: Impulsgeber eines Herzschrittmachersystems (A) und seine einzelnen Bauteile in Explosionszeichnung (B). Bildmaterial aus [4] mit freundlicher Genehmigung von BIOTRONIK.

Als Energiequelle wird üblicherweise eine Lithium-Iodid-Batterie eingesetzt, da diese sehr langlebig ist, eine geringe Selbstentladung aufweist und dadurch über einen Zeitraum von 5 bis 15 Jahren hinweg sicher eingesetzt werden kann [9, 10]. Wie lange die Batterie genau durchhält ist dabei vor allem von der Einstellung des Schrittmachers abhängig [10].

Über eine genormte Steckverbindung (Norm IS-1) werden die Schrittmacherelektroden an den Impulsgeber angeschlossen. Neben dem dazu passenden Steckkopf, besteht eine Elektrode aus einem mit Silikon oder Polyurethan isolierten Leitungsdraht und der Elektrodenspitze, die im Herz verankert wird und den elektrischen Impuls letztlich auf das Herzgewebe überträgt [9, 10]. Der Verankerung der Elektroden kommt dabei besondere Wichtigkeit zu, da diese dafür sorgen soll, dass der Kontakt der Elektrodenspitze zu der Stelle im Herzen an der der elektrische Impuls Übertragung werden soll sicher gewährleistet wird. Je nach genauem Implantationsort wählt man dafür entweder eine aktive Fixierung mittels einer Schraubwende (siehe Abb. 4 A), die ähnlich einem Korkenzieher vom Chirurgen bei der Implantation über einen am Stecker der Elektrode zu bedienenden Mechanismus in das Gewebe hineingedreht wird, oder die

passive Fixierung mittels Widerhaken (*siehe Abb. 4 B*). Letztere besitzt den Vorteil, dass die Verletzung des Gewebes bei der Implantation geringer ausfällt, kann jedoch nicht an glattwandigen, sondern nur an Stellen im Herz mit einer Struktur aus Sehnen und Bändern eingesetzt werden, an der sich die Widerhaken verfangen können, beispielsweise dem Bandapparat zum Öffnen und Schließen der Segelklappen (Trabekelwerk) [9, 10]. Daneben gibt es noch die sogenannten J-Elektroden, deren Leitung auf den letzten Zentimetern J-förmig gebogen ist und vor allem im rechten Vorhof eingesetzt werden, wo sie im Herzohr implantiert werden sollen (*nicht abgebildet*).



Abb. 4: Spitzen von Herzschrittmacherelektroden mit aktiver (A) und passiver (B) Fixierung. Die aktive Fixierung mittels Schraubwendel wird ähnlich einem Korkenzieher vom Chirurgen bei der Implantation über einen am Stecker der Elektrode zu bedienenden Mechanismus in das Gewebe hineingedreht und kommt an glattwandigen Implantationsstellen zum Einsatz. Über die passive Fixierung kann eine Elektrode an Stellen im Herz implantiert werden, die über eine Struktur verfügen an der sich die Widerhaken verfangen können, beispielsweise an den Sehnen und Bändern zum Öffnen und Schließen der Segelklappen in den Herzkammern [9, 10]. Bildmaterial mit freundlicher Genehmigung von BIOTRONIK.

Der Kontakt der Elektrode, der bei einem Herzschrittmacher den elektrischen Impuls überträgt, ist die Kathode, die sich an der äußersten Spitze der Elektrode im Herzen befindet (auch *Tip* genannt). Die Anode zum Schließen des Stromkreises ist entweder das Gehäuse des Impulsgebers oder ein zweiter ringförmiger Kontakt etwa 10 bis 25 mm oberhalb der Kathode (auch *Ring* genannt). Die erstgenannte Variante entspricht der Verwendung von unipolaren Elektroden, letztere bipolaren Elektroden. Da die unipolaren Elektroden vor allem hinsichtlich ihrer Wahrnehmungsfunktion wesentlich stör anfälliger als bipolare Elektroden sind, werden heutzutage meist bipolare Systeme implantiert, vor allem im Vorhof [7, 10].

Der für die vorliegende Arbeit besonders interessante Teil eines Herzschrittmachersystems ist das Freisetzungssystem für Glucocorticoide. Ebenfalls an der Elektrodenspitze direkt hinter der Kathode gelegen, wird es meist in Form einer

Silikon-Matrix als monolithisches Freisetzungssystem angebracht. Dieses sitzt entweder in Form eines Stopfens direkt hinter einer porösen Kathode oder umgibt die Außenseite der Elektrodenspitze hinter der Kathode in Form eines Hohlzylinders (*siehe Abb. 4*) [13]. Zweck der Glucocorticoid-Freisetzung ist es für ein niedriges Niveau der Reizschwelle zur Erregung des Herzens zu sorgen (*nähere Erläuterung in Abschnitt 1.2.5*).

1.2.3 Systemauswahl und Schrittmachercode

Prinzipiell unterscheidet man zwischen sogenannten Einkammerschrittmachern und Zweikammerschrittmachern [10]. Diese Bezeichnung kann zunächst missverstanden werden, da der Begriff „Kammer“ in diesem Fall nicht nach Atrium und Ventrikel differenziert. Ein Einkammerschrittmacher besitzt daher eine einzige Elektrode entweder im rechten Atrium oder im rechten Ventrikel, während Zweikammersysteme mit zwei Elektroden ausgestattet sind, um an beiden Stellen im Herzen eine aufeinander abgestimmte Erregung auszulösen. Daneben gibt es für den Einsatz in der kardialen Resynchronisationstherapie auch biventrikuläre Schrittmacher, die jeweils eine Elektrode im rechten und im linken Ventrikel besitzen und wahlweise zusätzlich im rechten Vorhof [10]. Hiermit soll versucht werden durch Synchronisation des linken und rechten Ventrikels die Hämodynamik dergestalt zu verbessern, dass die Auswurfleistung des Herzens optimiert wird.

Zur prägnanten Beschreibung eines Schrittmachersystems wird der drei- bis fünfstellige NBG-Schrittmachercode verwendet (auch NASPE/BPEG-Code genannt, *siehe Tab. 1*) [7]. Dabei beschreibt der erste Buchstabe den Ort der Stimulation, der zweite den Wahrnehmungsort und der dritte definiert die Betriebsart, also die Reaktion des Schrittmachers auf ein wahrgenommenes körpereigenes elektrisches Signal. Die weiteren Stellen weisen auf eine vorhandene Frequenzadaption hin und charakterisieren eine Stimulation beider Vorhöfe oder Kammern [7, 9]. Die Auswahl des für einen Patienten passenden Schrittmachersystems richtet sich nach der im individuellen Fall vorliegenden Störung des endogenen Erregungsbildungs- und Leitungssystem. Beispielsweise schlägt die Leitlinie zur Herzschrittmachertherapie [7] für die Behandlung des Sinus-Knoten-Syndroms ohne AV- und intraventrikuläre Leitungsstörungen die Implantation eines Einkammersystems mit Erregung und Wahrnehmung im Vorhof, Inhibition der Impulsabgabe bei Wahrnehmung einer körpereigenen Erregung und wahlweiser Frequenzadaption vor. Als NBG-Code ausgedrückt entspricht dies dem Code AAI(R).

Tab. 1: NBG- beziehungsweise NASPE/BPEG-Schrittmachercode zur Beschreibung eines Schrittmachersystems. Der drei- bis fünfstellige Code verweist mit dem ersten Buchstaben auf den Ort der Stimulation, der zweite zeigt den Wahrnehmungsort an, der dritte definiert die Betriebsart. Die weiteren Stellen weisen auf eine vorhandene Frequenzadaption hin und charakterisieren eine Stimulation beider Vorhöfe oder Kammern. Tabelle nach [7, 9].

I	II	III	IV	V
Ort der Stimulation	Ort der Wahrnehmung	Betriebsart	Frequenzadaption	Multifokale Stimulation
0= keine	0= keine	0= keine	0= keine	0= keine
A= Atrium	A= Atrium	T= getriggert	R= Frequenzadaption	A= Atrium
V= Ventrikel	V= Ventrikel	I= inhibiert		V= Ventrikel
D= Dual (A+V)	D= Dual (A+V)	D= Dual (T+I)		D= Dual (A+V)
S= Single (A oder V)	S= Single (A oder V)			

Liegt bei einem Patienten hingegen zusätzlich eine gestörte Überleitung der Erregung von den Vorhöfen zur Kammer vor, sollte ein DDD-System implantiert werden, also eine Elektrode im rechten Atrium und Ventrikel mit entsprechender Inhibierung und Triggerung einer Impulsabgabe je nachdem wo und ob ein körpereigener Reiz wahrgenommen wurde.

Ob der Komplexität der indikationsbezogenen Schrittmachertherapie sei für tiefergehende Informationen auf die entsprechende Leitlinien verwiesen [7].

1.2.4 Implantation eines Herzschrittmachers

Im Gegensatz zu einer temporären Therapie, die auf verschiedenen Wegen möglich ist – unter anderem durch transkutane oder ösophagale Stimulation, sowie über die passagere intrakardiale Stimulation mit vorübergehender Platzierung einer Elektrode im Herzen und Stimulation mittels externem Schrittmacher – und wenn überhaupt nur einen minimalinvasiven oder vorübergehenden Eingriff erfordert [9], geht die permanente Herzschrittmachertherapie mit der dauerhaften Implantation des Schrittmachersystems einher. Die Implantation der Schrittmacherelektroden erfolgt meist über den Zugang durch die *Vena cephalica*, einer unter der Haut liegenden Vene am Übergang von rechtem Oberarm zu Schulter, durch welche die Schlüsselbeinvene (*Vena subclavia*) erreicht werden soll (*siehe Abb. 5*). Durch diese wird die Elektrode weiter in die obere Hohlvene (*Vena cava superior*) vorgeschoben und die rechte Herzseite erreicht [14]. Vorhofelektroden werden meist im rechten Herzhohr nahe dem Sinus-Knoten in der Herzwand verankert, wofür in der Regel Elektroden mit aktiver Fixierung oder J-Elektroden verwendet werden. Die Platzierung von Elektroden in der rechten Herzkammer erfolgt in der Herzspitze und unter Einsatz passiver Fixierung, die sich dort im Trabekelwerk

verfangen soll [14]. Der Impulsgeber wird oftmals auf der rechten, zum Teil auch auf der linken Seite der Brust in einer subkutanen Tasche auf dem großen Brustmuskel (*Muskulus pectoralis major*) untergebracht [14].

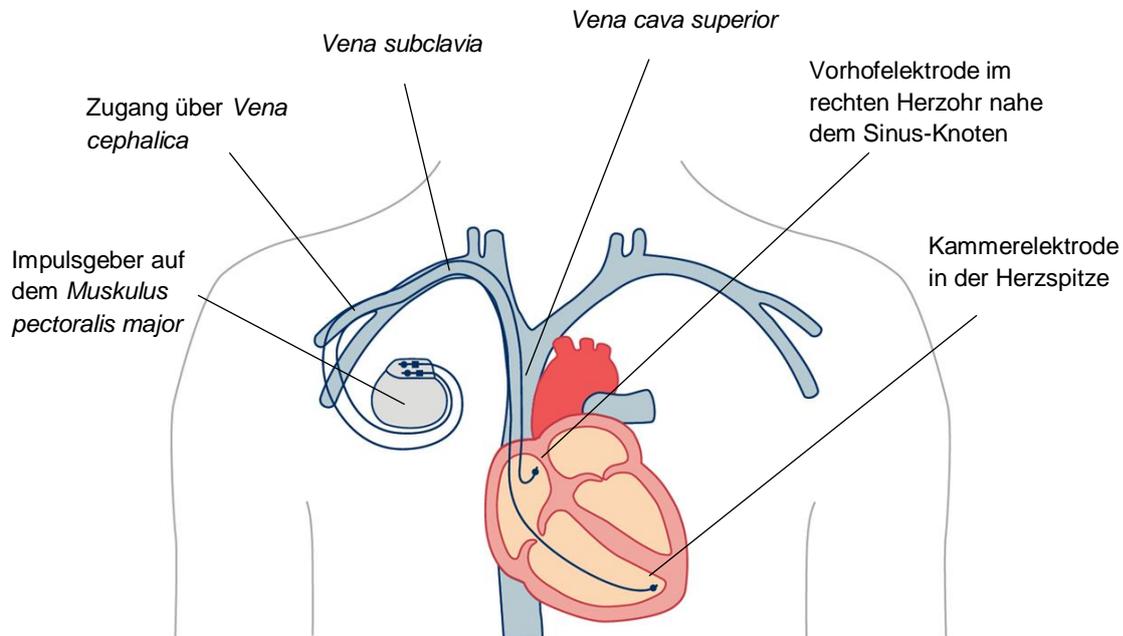


Abb. 5: Lage eines Zweikammer-Schrittmachersystems nach Implantation. Neben Zweikammer-Systemen sind auch Systeme mit einer Elektroden im Vorhof oder Kammer üblich, sowie biventrikuläre Systeme. Die Implantation des Impulsgebers auf dem rechtsseitigen *Muskulus pectoralis major* stellt eine häufige Variante dar, es werden jedoch auch Implantationen auf der linken Seite vorgenommen [14]. Bildmaterial aus [4] mit freundlicher Genehmigung von BIOTRONIK.

1.2.5 Reizschwelle und Grenzfläche zwischen Elektrode und Herzgewebe

Unter Abschnitt 1.2.2 wurde bereits darauf hingewiesen, dass Glucocorticoide in der Herzschrittmachertherapie dazu eingesetzt werden, um die Reizschwelle während der gesamten Betriebsdauer des Geräts auf einem niedrigen Niveau zu halten. Unter der Reizschwelle versteht man die mindestens vom Schrittmacher abzugebende Energie, die gerade noch zu einer konstanten Depolarisation der Zellen des Myokards außerhalb dessen Refraktärzeit führt [10, 13]. Die vom Herzschrittmacher abgegebene Energie lässt sich nach *Fml. 1* beschreiben, wonach die Impulshöhe im Quadrat eingeht, sowie die Impulsdauer und die Impedanz des Gesamtsystems aus Herzschrittmacher und Herzgewebe [10].

$$\text{Fml. 1} \quad E = U^2 \cdot t / R$$

Mit:

E= Energieabgabe [μ J]

U= Impulshöhe (Spannung) [V]

t= Zeit [ms]

R= Impedanz des Gesamtsystems aus Herzschrittmacher und Herzgewebe [k Ω]

Demnach müssen Impulshöhe und -dauer aufeinander abgestimmt werden, um den Ladungsverbrauch des Gerätes zu minimieren. Der Begriff Rheobase beschreibt die niedrigste Impulshöhe, die bei einer unendlich langen Impulsdauer noch eine Erregung des Herzens auslöst, während die Impulsdauer beim doppelten Wert der Rheobase als sogenannte Chronaxie bezeichnet wird. Die aus empirischer Sicht günstigste Einstellung der Impulshöhe und -dauer für einen möglichst niedrigen Energieverbrauch liegt in der Nähe der Chronaxie. Bei modernen Elektroden liegt die optimale Einstellung der Schrittmacherparameter zwischen 1,5 und 2,5 Volt bei einer Impulsdauer von 0,2 bis 0,6 Millisekunden, wobei hier bereits ein Sicherheitspuffer für die Impulshöhe um das doppelte und für die Impulsdauer um das Dreifache der Reizschwelle berücksichtigt ist [10, 13]. Die Reizschwelle selbst liegt demnach <1 Volt [15].

Innerhalb der ersten ein bis zwei Wochen nach Implantation eines Schrittmachersystems wird ein starker Anstieg der Reizschwelle beobachtet, der innerhalb der folgenden Monate wieder etwas zurück geht und sich auf einem Plateau einpendelt, welches jedoch chronisch über dem Reizschwellenniveau unmittelbar nach der Implantation bleibt [13, 16]. Es wird davon ausgegangen, dass die Ursache für den Reizschwellenanstieg in einer lokalen Entzündung des Gewebes an der Implantationsstelle der Elektrode liegt [13, 16] und praktisch einer klassischen Immunreaktion auf die Implantation eines Fremdkörpers entspricht. Nach einer akuten Entzündungsphase von einigen Tagen als Reaktion auf das Trauma des Gewebes nach der Implantation mit Ödembildung und Ablagerung von Fibrin an der Elektrode folgt dabei für gewöhnlich eine etwa zwei bis vier Wochen lange chronische Entzündungsphase. Diese ist durch die Einwanderung von Makrophagen gekennzeichnet, die auf der Elektrodenoberfläche anhaften und zu sogenannten mehrkernigen Riesenzellen (FBGCs, *foreign body giant cells*) differenzieren, sowie durch den Beginn einer gesteigerten Fibroblastenproliferation. Dies führt letztlich im Anschluss an die chronische Entzündungsphase zu Vernarbung der Implantationsstelle durch übermäßige Bindegewebsbildung und der Formierung einer fibrösen Kapsel, die die Elektrodenspitze einhüllt [16-18]. Da sich die Elektrodenoberfläche gegenüber nicht stimulierbarem Gewebe vergrößert – man spricht in diesem

Zusammenhang auch von virtueller Elektrodenoberfläche – und damit die für eine erfolgreiche Stimulation des Herzens aufzubringende Energie erhöht, resultiert dies in einem Anstieg der Reizschwelle [16, 18]. In der Regel wird bei Elektroden mit aktiver Fixierung nach der Implantation ein stärkerer Anstieg der Reizschwelle beobachtet als bei passiver Fixierung, da die Gewebeverletzung durch die Schraubelektrode intensiver ist [19].

1.3 Glucocorticoide in der Herzschrittmachertherapie

Glucocorticoide werden in der Herzschrittmachertherapie eingesetzt, um den Reizschwellenanstieg nach der Implantation (*siehe voriger Abschnitt 1.2.5*) möglichst gering zu halten und somit eine möglichst energiesparende Einstellung der Schrittmacherparameter wählen zu können. Zudem ermöglicht die Wirkung der Glucocorticoide einen Einsatz kleinerer Elektroden, was aufgrund höherer Impedanz bei kleinerer Elektrodenoberfläche ebenfalls zu einer Energieersparnis führt [15]. Dies verlängert letztlich die Einsatzzeit eines Geräts und verzögert die Notwendigkeit eines Austauschs des Schrittmachers. Die pharmakologische Glucocorticoid-Wirkung unterstützt somit lediglich die rein physikalische Funktion des Herzschrittmachers und ändert nichts an der Einordnung des Gesamtsystems als Medizinprodukt [20].

Der Einsatz der Glucocorticoide zu diesem Zweck ist in erster Linie empirisch begründet. Gegenüber Schrittmachern ohne Glucocorticoid wird bei solchen Systemen mit Glucocorticoid-Freisetzung sowohl ein verminderter Anstieg der Reizschwelle nach Implantation als auch eine niedrigere Plateau-Phase über viele Jahre hinweg beobachtet [19, 21-27]. In der Literatur zum Themengebiet der Herzschrittmacher wird nahezu ausnahmslos von Steroid-Freisetzung gesprochen. Der Begriff Steroid ist jedoch aus pharmazeutisch-chemischer Sicht wesentlich zu weit gefasst, zumal sich die Glucocorticoid-Anwendung in der Herzschrittmachertherapie aktuell ohnehin auf den Einsatz von Dexamethason (DX) als Dexamethasonphosphat (DXP) oder -acetat (DXA) und mit wenigen Ausnahmen auf Beclomethasondipropionat (BDP) beschränkt [15, 28, 29].

Die Verabreichung erfolgt mittels eines Freisetzungssystems, das an der Elektrodenspitze angebracht ist (*siehe auch Abschnitt 1.2.2*). Dafür haben sich im Wesentlichen zwei Varianten etabliert. Zum einen mittels einer Art Stopfen aus Silikon, der das Glucocorticoid enthält und sich direkt hinter der Kathode im Inneren der Elektrodenspitze befindet. Die Kathode muss dazu aus porösem Material gefertigt sein, um eine Freisetzung zu gewährleisten. Aufgrund der Positionierung des Freisetzungssystems im Inneren der Elektrodenspitze ist diese Variante jedoch auf passiv zu fixierende Elektroden beschränkt [28]. Zum anderen ist die Verwendung einer Glucocorticoid-haltigen Polymer-Matrix üblich, die außen an der Elektrodenspitze angebracht ist. Da die Matrix die Elektrodenspitze hinter der Kathode ringförmig umgibt, wird dieses System auch *Collar*

(engl. Kragen) genannt und ist zudem auch mit einer aktiven Fixierung kompatibel. Gelegentlich kommt auch eine Ionenaustausch-Membran zum Einsatz [28], was jedoch die Auswahl an einzusetzenden Glucocorticoiden praktisch auf das als Natrium-Salz eingesetzte DXP beschränkt. Üblicherweise wird eine Dosis von <1 mg verwendet, die über einen langen Zeitraum langsam freigesetzt werden und lokal am Implantationsort wirken soll [15].

Die genauen Hintergründe der Glucocorticoid-Wirkung zur Senkung der Reizschwelle sind bislang nicht eindeutig geklärt. In der Regel wird hierfür deren antiinflammatorische Aktivität verantwortlich gemacht, die zu einer dünneren Bindegewebskapsel um die Elektrodenspitze führen soll als bei einer Elektrode ohne Glucocorticoid und damit zu einer kleineren virtuellen Oberfläche der Elektrode [16]. In histologischen Untersuchungen nach Elektrodenexplantation konnten sowohl im Hund als auch im Menschen bislang nur ansatzweise, jedoch nicht eindeutig dünner ausgeprägte Bindegewebskapseln bei Glucocorticoid-Freisetzung beobachtet werden [18, 30, 31]. Die dabei auch tendenziell geringere Ansammlung von Immunzellen wie Mastzellen und Leukozyten in dem sich neu gebildeten fibrotischen Gewebe an der Elektrodenspitze unterstützt indes die Theorie, dass die antiinflammatorische Wirkung zur Reizschwellenabsenkung führt [18, 31]. Daneben wird auch eine Stabilisierung des Membranpotenzials der Zellen in der fibrösen Kapsel [16] und eine leichtere Erregbarkeit des Herzgewebes durch die Glucocorticoid-Gabe diskutiert [32].

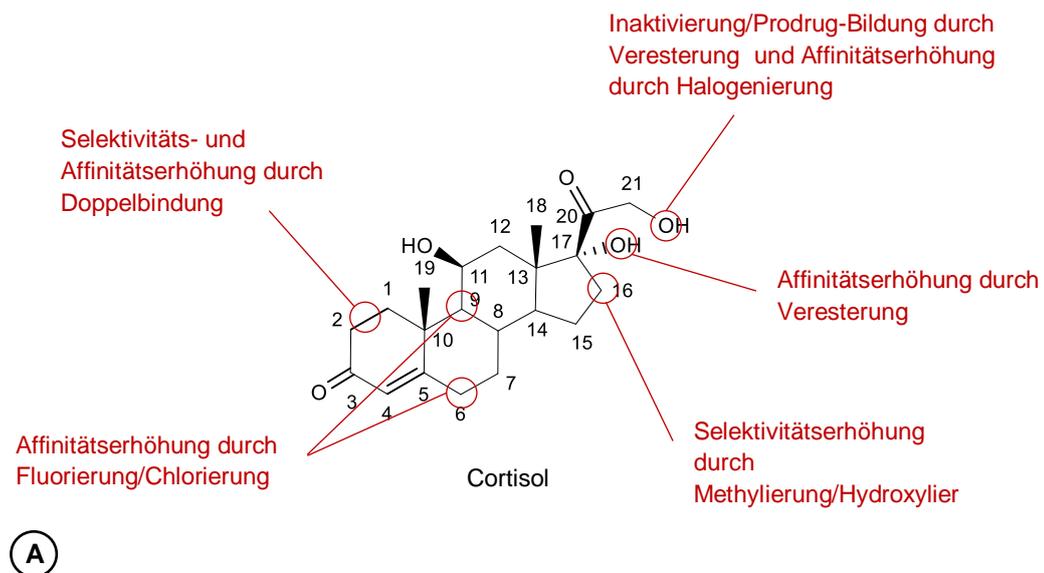
Erfahrungen mit anderen Arzneistoffen als Glucocorticoiden zur Beeinflussung der Reizschwelle in der Herzschrittmachertherapie sind rar und wenig dokumentiert. Tierversuche mit cis-Hydroxy-Prolin und Tunicamycin, die beide die Bindegewebsbildung inhibieren sollten, zeigten ebenso wie Heparin und interessanterweise auch die nicht-steroidalen Antiphlogistika Diclofenac und Ibuprofen nicht den gewünschten Effekt [16, 33]. Erfolge wurden bislang nur mit Glucocorticoiden erzielt. Eine interessante Publikation dazu stammt bereits aus dem Jahr 1969 von Preston und Judge [34], die den Einfluss einiger systemisch applizierter Arzneistoffe auf die Reizschwelle untersuchten. Dabei zeigten sie für Methylprednisolon eine deutliche und rasche Absenkung der Reizschwelle, während diese bei Einsatz des Mineralcorticoids Aldosteron den gegenteiligen Verlauf zeigte und stark anstieg. Auch Sympathomimetika wie Epinephrin führten durch eine erleichterte Erregbarkeit des Herzgewebes zu einer Erniedrigung der Reizschwelle bei systemischer Gabe, β -Blocker wie Propranolol hingegen zu einer Aufhebung dieses Effekts [34]. Zur Behandlung des sogenannten *Exit-Blocks*, einer Situation in der das Herzgewebe eine ungewöhnlich hohe Reizschwelle aufweist und keine erfolgreiche Stimulation mittels Herzschrittmacher mehr erzielt wird [34], wurde die systemische Gabe von Prednisolon bereits 1965 erfolgreich eingesetzt [35] und führt zu einer raschen Aufhebung der lebensbedrohlichen Erregungsblockade. Der Einsatz Glucocorticoid-freisetzender Elektroden hat den *Exit-Block* jedoch zu einem mittlerweile eher selten auftretendem Problem gemacht [16, 26].

1.4 Pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften der in der Herzschrittmachertherapie eingesetzten Glucocorticoide

1.4.1 Struktur-Wirkungsbeziehung

Der Begriff Steroide umfasst alle Moleküle, deren Grundstruktur auf den C-17 Körper Gonan zurückzuführen ist [36]. Dies trifft jedoch auf ein sehr großes Spektrum an unterschiedlich pharmakologisch wirksame Substanzen zu, von Vitaminen (Vitamin D₂) über die Aglykone der Herzglykoside (Digoxigenin) bis hin zu den weiblichen und männlichen Sexualhormonen sowie den weiteren wichtigen Hormonen der Nebennierenrinde, den Mineralcorticoiden und Glucocorticoiden. Das Steroid-Grundgerüst Gonan besteht aus einem Ringsystem aus vier Gliedern, davon drei Sechsringe und ein Fünfring, die mit Ausnahme des ersten Ringpaars aus zwei Sechsringen (Ring A und B) stets in trans-Konfiguration miteinander verknüpft sind [36, 37].

Das körpereigene Glucocorticoid ist das Cortisol (*siehe Abb. 6 A*). Es wird in der Nebennierenrinde in der *Zona fasciculata* und *reticularis* ausgehend von Cholesterol gebildet und über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse über einen negativen Rückkopplungsmechanismus reguliert [36]. Die synthetischen Glucocorticoide sind Derivate des Cortisols, mit dessen gezielter Abwandlung eine Erhöhung der Selektivität zwischen Glucocorticoid-Rezeptor und Mineralcorticoid-Rezeptor sowie eine Erhöhung der Rezeptoraffinität erzielt werden soll, mit der eine stärkere antiinflammatorische Wirkung einhergeht. Für lokal einzusetzende Substanzen soll zudem eine verminderte systemische Verfügbarkeit erreicht werden. Wichtige Strukturmerkmale hierfür sind die Keton-Strukturen an C-3 und C-20, die Hydroxyl-Gruppe an C-11 und die Halogenierungen, meist Fluorierung und zum Teil Chlorierung, an den Positionen C-6 und C-9. Die größte Variabilität entfällt jedoch auf das Substitutionsmuster am Fünfring (Ring D), die vor allem die lokale Verfügbarkeit gegenüber der systemischen steigern [37]. Die Veränderungen dort betreffen die Methylierung oder Hydroxylierung in Position C-16 sowie Veresterungen an den Hydroxylgruppen an C-17 und C-21. Während Ester an C-17 die Affinität zum Glucocorticoid-Rezeptor steigern, sind Ester an C-21 wie bei Dexamethasonacetat oder -phosphat und Beclomethasondipropionat (*siehe Abb. 6 B*) meist Prodrugs, deren Wirkform der C-21 Alkohol darstellt. Bei jüngeren Glucocorticoiden wie Mometason- und Fluticasonfuroat ist die Seitenkette an C-21 durch Halogenierung weiter abgewandelt, was eine deutliche Steigerung der Affinität zum Glucocorticoid-Rezeptor mit sich bringt.



(A)

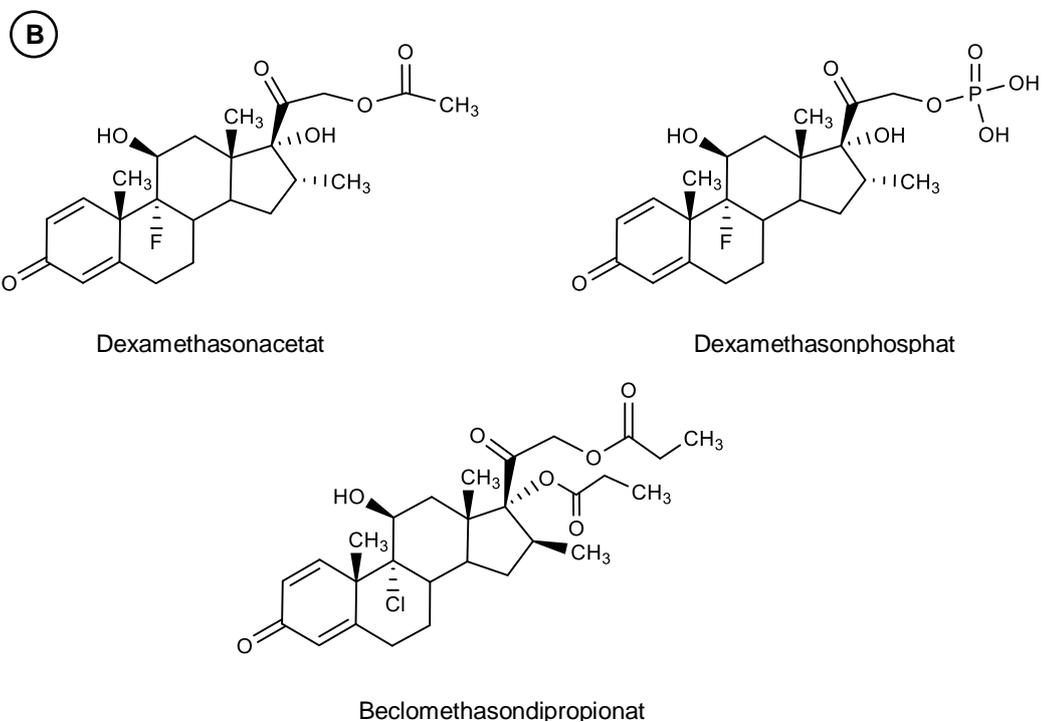


Abb. 6: Molekülstrukturen des körpereigenen Glucocorticoids Cortisol (A) und der in der Herzschrittachertherapie bislang eingesetzten synthetischen Glucocorticoide (B). Auf Grundlage des Cortisols sind einige wichtige Strukturabwandlungen synthetischer Glucocorticoide illustriert, die zu einer Erhöhung der biologischen Aktivität am Glucocorticoid-Rezeptor und einer erhöhten Selektivität gegenüber dem Mineralcorticoid-Rezeptor führen [37].

1.4.2 Glucocorticoid-Wirkung und Wirkmechanismus

Von den vielfältigen Wirkungen der Glucocorticoide, unter anderem auf den Energiestoffwechsel – auch die Namensgebung beruht auf der induktiven Wirkung auf die Gluconeogenese, zusammengesetzt mit ihrem Ort der Entstehung, der Nebennierenrinde –

und die Zellen des Stütz- und Bindegewebes [36], ist in allererster Linie die Wirkung auf das Immunsystem von therapeutischem Interesse [36, 38]. Eingesetzt werden sie vor allem zur Bekämpfung starker akuter und chronischer Entzündungen sowie zur Eindämmung von allergischen Erkrankungen. In der Wirkweise unterscheiden sich die verschiedenen Glucocorticoide prinzipiell nicht voneinander, lediglich die Stärke der biologischen Aktivität variiert zwischen den einzelnen Substanzen und korreliert mit deren relativen Rezeptoraffinität.

Beim molekularen Wirkmechanismus unterscheidet man hauptsächlich zwischen den spezifischen Glucocorticoid-Wirkungen, die durch Eingriff auf Genom-Ebene stattfinden und die Hauptwirkungen ausmachen, sowie den unspezifischen nicht-genomischen Effekten. Mit dem Eintritt der spezifischen Wirkungen ist aufgrund der genomischen Wirkweise erst im Verlauf von Stunden zu rechnen, hält jedoch aus dem gleichen Grund auch lange Zeit über die Dosisgabe hinaus an [36]. Glucocorticoide wirken durch Bindung an ihren spezifischen Rezeptor. Man unterscheidet dabei zwischen den Rezeptor-Typen I und II [36]. Typ I ist der sogenannte Mineralcorticoid-Rezeptor, der aus physiologischer Sicht in erster Linie dem Mineralcorticoid Aldosteron zugänglich ist, obwohl das endogene Glucocorticoid Cortisol eine weit höhere Affinität zu diesem Rezeptor-Typ als Aldosteron besitzt. Aufgrund der Variation der Rezeptorverteilung je nach Art des Gewebes und der gewebespezifischen Inaktivierung des Cortisols durch das Enzym 11- β -Hydroxysteroiddehydrogenase wird jedoch eine durch Cortisol hervorgerufene übermäßige mineralcorticoide Wirkung vermieden. Die Glucocorticoid-Wirkung entfaltet sich über den Rezeptor-Typ II, den Glucocorticoid-Rezeptor. Er liegt im Zytoplasma der Zellen an weitere Proteine assoziiert vor, den Hitzeschockproteine HSP-90 und HSP-70 sowie dem Immunophilin. Nach Aufnahme eines Glucocorticoids in den Intrazellulärraum einer Zelle bindet es dort an seinen Rezeptor, von welchem daraufhin die drei assoziierten Proteine dissoziieren und somit die Rezeptorregion zur Bindung an die DNA frei gibt. Der Komplex aus Glucocorticoid und Rezeptor dimerisiert daraufhin und wandert in den Zellkern, wo er an spezifische DNA-Sequenzen bindet, entweder an sogenannte *glucocorticoid responsive elements* (GRE) oder *negative glucocorticoid responsive elements* (nGRE) [36]. Während des durch die Bindung an GREs zur Induktion der Transkription von mRNA und entsprechend erhöhter Proteinsynthese kommt, beispielsweise des antiinflammatorischen Lipocortins, führt die Bindung an nGREs hingegen zu einer Transkriptionshemmung. Außerdem wirken die Glucocorticoide über eine indirekte Hemmung der Gentranskription, indem der Glucocorticoid-Rezeptor-Komplex proinflammatorische Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (*nuclear transformation factor-kappa B*) blockiert und damit die Expression einer Reihe von Zytokinen wie Interleukin-6 und Interleukin-8 oder der Cyclooxygenase eingedämmt wird [36, 39]. Zu den spezifischen Glucocorticoid-Wirkungen zählt auch die Verminderung der Zahl von Immunzellen wie Monozyten und basophilen beziehungsweise neutrophilen Leukozyten [36].

Die unspezifischen, nicht-genomischen Glucocorticoid-Wirkungen werden für die

schnell einsetzenden Effekte nach Glucocorticoid-Gabe verantwortlich gemacht, die vor allem in akuten Therapiesituationen beobachtet werden können, in denen hohe Glucocorticoid-Dosen eingesetzt werden, beispielsweise bei der i.v.-Gabe in Schockzuständen. Die nicht-genomischen Effekte lassen sich einteilen in Interaktionen mit der Zellmembran, über den zytosolischen Glucocorticoid-Rezeptor vermittelte Effekte und solche, die über einen noch zur Diskussion stehenden membranständigen Glucocorticoid-Rezeptor hervorgerufen werden sollen [39]. Die Interaktion mit Zellmembranen soll durch Interkalation erfolgen, wodurch die Permeabilität der Membran beeinflusst wird, was auch den Austausch von Calcium- und Natrium-Ionen betrifft [39]. Die rasche Wiederherstellung der Erregbarkeit des Herzens durch systemische Gabe von Prednisolon beim in der Herzschrittmachertherapie problematischen *Exit-Block* (siehe Abschnitt 1.3), könnte womöglich auf diese Form der unspezifischen Glucocorticoid-Wirkungen zurückzuführen sein.

Welche der Glucocorticoid-Wirkungen hauptsächlich zu dem dauerhaften niedrigen Reizschwenniveau in der Herzschrittmachertherapie beiträgt ist bislang ungeklärt und lässt sich auch durch die Geschwindigkeit des Wirkeintritts kaum einordnen, da der Reizschwellenanstieg nicht abrupt, sondern über einen Zeitraum mehrerer Tage erfolgt [16] (siehe Abschnitt 1.3).

1.4.3 Pharmakokinetische Eigenschaften

Bei der oralen Bioverfügbarkeit der Glucocorticoide herrschen einige Unterschiede. So werden ältere synthetische Substanzen wie Prednisolon oder Dexamethason zu 60 - 100 % resorbiert, wohingegen jüngere Glucocorticoide, die in erster Linie für den topischen Einsatzzweck entwickelt wurden wie Ciclesonid oder Mometasonfuroat, dank eines hohen First-Pass-Effekts praktisch keine nennenswerte orale Verfügbarkeit mehr aufweisen [36, 40, 41]. Bei pulmonaler und intranasaler Verabreichung stellt dies ein wichtiges Sicherheitsmerkmal dar, da hier meist ein beträchtlicher Anteil der Dosis vom Patienten bei der Applikation in die Atemwege verschluckt wird und somit unerwünschte systemische Nebenwirkungen vermieden werden [41, 42]. Für eine systemische Anwendung sind diese Glucocorticoide jedoch weniger zu gebrauchen. Dies liegt womöglich unter anderem an deren sehr hohen Bindung an Plasmaproteine, die nicht selten weit über 90 % betragen kann und den frei vorliegenden und somit wirksamen Dosisanteil stark einschränkt. Neben der geringen oralen Verfügbarkeit soll aus diesem Grund auch die hohe Plasmaproteinbindung zu einer erhöhten Sicherheit topisch applizierter Substanzen beitragen [42]. Eine nicht ganz so stark ausgeprägte Proteinbindung, die jedoch mit etwa 60 bis 70 % noch immer als hoch einzustufen ist, zeigen die älteren Glucocorticoide. Im Gegensatz zu Cortisol binden synthetische Glucocorticoide dabei kaum an das Cortisol-bindende Globulin (CBG), sondern

hauptsächlich an Albumin.

Der Metabolismus der Substanzen findet vor allem in der Leber und zum Teil in der Niere unter Hydroxylierung in Position C-6 sowie Sulfatierung und Glucuronidierung statt [43], wonach die nun gegenüber den Ausgangssubstanzen besser wasserlöslichen Metabolite überwiegend renal ausgeschieden werden [36]. Die Tatsache, dass es sich bei den meisten Glucocorticoiden und insbesondere bei den modernen Substanzen um sogenannte *high-extraction-drugs* handelt, die auch nach systemischer Verabreichung oder unerwünschter Aufnahme in den systemischen Kreislauf bei der ersten Leberpassage weitestgehend abgebaut werden, dürfte indes ein maßgeblicher Aspekt sein, der zur Sicherheit einer Glucocorticoid-Therapie beiträgt.

Viele pharmakokinetische Unterschiede synthetischer Glucocorticoide werden in hohem Maße durch ihre physikochemischen Eigenschaften mitbestimmt. Eine wichtige Größe stellt hier die Lipophilie der Substanzen dar, mit der weitere Parameter wie die Löslichkeit und die Gewebeaffinität zusammenhängen und somit größtenteils die Verfügbarkeit eines Glucocorticoids am Wirkort determiniert. So schränkt eine hohe Lipophilie die Löslichkeit einer Substanz in den wässrigen physiologischen Flüssigkeiten ein, was vor allem bei intranasaler Verabreichung zur Therapie der allergischen Rhinitis ein Dosis-limitierender Faktor für sehr lipophile Glucocorticoide ist und hier deutliche Unterschiede in der Pharmakokinetik zwischen den Substanzen bemerkbar sind [44]. Gleichzeitig schlägt sich eine hohe Lipophilie aber auch in einer ausgeprägten Diffusion des Arzneistoffs in das Zielgewebe und durch die Membran der Zielzelle nieder und erhöht damit die Chance zur Aktivierung des zytosolischen Glucocorticoid-Rezeptors [41, 42]. Zudem ist mit zunehmender Lipophilie Glucocorticoide eine hohe Affinität und lange Verweilzeit im Zielgewebe assoziiert, weshalb bei der topischen Gabe eine verlängerte Wirkdauer aufgrund einer Art Depot-Effekt diskutiert wird [42]. Eine weitere durch die Lipophilie determinierte Eigenschaft ist die relative Rezeptoraffinität, die als Maß für die Potenz eines Glucocorticoids herangezogen wird und gut mit dem logP-Wert korreliert [45].

Prinzipiell muss bei der Diskussion der pharmakokinetischen Eigenschaften der Glucocorticoide große Rücksicht auf die Art der Applikation und den therapeutischen Verwendungszweck genommen werden, also ob eine lokale oder eine systemische Wirkung beabsichtigt ist beziehungsweise letztere aus Sicherheitsgründen möglichst weitestgehend vermieden werden soll. Beispielsweise sollte ein ideales Glucocorticoid für die topische Anwendung eine hohe Lipophilie mit ausgeprägter Gewebeaffinität und langer Geweberetention und hoher Rezeptoraffinität aufweisen, bei gleichzeitig niedriger systemischer Verfügbarkeit durch einen hohen First-Pass-Effekt und eine hohe Plasmaproteinbindung [41, 42]. Für die Anwendung in der Schrittmachertherapie müssen dies jedoch nicht zwingend ebenfalls die besten Voraussetzungen sein, da die Anwendung zwar lokal beabsichtigt ist, die Freisetzung jedoch bereits systemisch stattfindet. Eine hohe Plasmaproteinbindung würde hier somit den für eine Diffusion ins Zielgewebe zur Verfügung stehenden und damit wirksamen Anteil möglicherweise sehr einschränken. Eine

hohe Gewebeaffinität ist hingegen auch dort sicherlich von großem Vorteil, um eine Umverteilung freigesetzten Arzneistoffs an den Wirkort zu erreichen. Der Sicherheitsaspekt dürften hingegen vor allem eine Frage der Freisetzungsgeschwindigkeit sein und damit auch von der Formulierung abhängen, ist aber aufgrund der sehr geringen Gesamt-Dosis in der Freisetzungsmatrix wahrscheinlich ohnehin vernachlässigbar. Eine Kumulation im Gewebe, die aus der kontinuierlichen Freisetzung und langer Geweberetention resultieren könnte, wäre eventuell ebenfalls von Vorteil und könnte zu einer hohen Wirkung durch hohe Glucocorticoid-Konzentrationen am Wirkort führen. In der Herzschrittmachertherapie gibt es diesbezüglich aufgrund der sehr limitierten Auswahl verschiedener eingesetzter Substanzen jedoch keinen großen Erfahrungsschatz. Einige dieser Aspekte werden daher im Kontext der späteren Abschnitte der Arbeit wieder aufgegriffen und diskutiert.

2 Ziele der Arbeit

Wie die eigenen Literaturrecherchen während der Erstellung der Arbeit immer wieder unter Beweis stellten, ist der Einsatz von Glucocorticoiden in der Herzschrittmachertherapie im Vergleich zu den meisten anderen Anwendungen dieser im Allgemeinen sehr gut untersuchten Arzneistoffklasse bislang nur wenig charakterisiert. Während die Wirkung selbst als ausreichend bewiesen angesehen werden kann, lassen sich die Hintergründe, sowohl zur Pharmakokinetik in dieser speziellen Applikationsform, als auch zu den pharmakodynamischen Prozessen, die der Glucocorticoid-Wirkung in Bezug auf die Verhinderung des Reizschwellenanstieges in der Herzschrittmachertherapie unterliegen, auf Untersuchungen nur weniger Autoren zurückführen.

Ziel war es deshalb das Spektrum an Informationen zu diesem Anwendungsgebiet zu erweitern und erstmals das in der Herzschrittmachertherapie standardmäßig eingesetzte Dexamethasonacetat (DXA) mit dem vereinzelt eingesetzten Beclomethasondipropionat (BDP) und einem weiteren potentiell einsetzbaren Glucocorticoid X (GCX), dessen genaue Identität aus Patentgründen in der Arbeit nicht offengelegt werden kann, bezüglich der genannten pharmakokinetischen Aspekte zu vergleichen. Zu diesem Zweck sollte zunächst die Glucocorticoid-Freisetzung aus der vorliegenden Applikationsform unter zunehmend physiologischen Bedingungen simuliert werden, um einige pharmakokinetische Aspekte der Applikationsform zu charakterisieren und sollte schließlich in dem Entwurf eines neuen *ex-vivo* Modells zur Untersuchung der Gewebebindung für derartige Applikationsformen münden (*Abschnitte 1 bis 3 im Allgemeinen Teil B*).

Anschließend sollte untersucht werden, wie sich die Freisetzungskinetik der drei Glucocorticoide auf deren Bioaktivität auswirken würde. Gewissermaßen als Vorversuch hierzu, lag die Zielsetzung jedoch zunächst darin zu untersuchen, ob die elektrische Schrittmacherstimulation selbst als potentieller pathologischer Reiz für eine lokale Entzündungsreaktion an der Grenzfläche zwischen Elektrodenspitze und Herzgewebe in Frage kommen würde. Anhand eines neu zu entwerfenden *in-vitro* Schrittmachermodells sollte dadurch überdies ein neuer Beitrag zur Untersuchung der Annahme geleistet werden, dass die antiinflammatorische Wirkung der Glucocorticoide für niedrige Reizschwellen verantwortlich sei (*Abschnitt 4 im Allgemeinen Teil B*).

Im Anschluss war beabsichtigt die antiinflammatorischen Aktivitäten der drei Glucocorticoide unter Einbezug der Daten aus den pharmakokinetischen Untersuchungen zu vergleichen. Insofern sich die elektrische Schrittmacherstimulation als Entzündungsreiz herausstellen würde, sollte dabei auf das entwickelte *in-vitro* Schrittmachermodell zurückgegriffen werden. Als alternativer Ansatzpunkt zu Einschätzung des Glucocorticoid-Effekts auf die Reizschwellenentwicklung sollte außerdem die Zellproliferation unter der Arzneistoff-Exposition untersucht werden (*Abschnitte 5 und 6 im Allgemeinen Teil B*).

B Allgemeiner Teil

1 Charakterisierung und Vergleich der Freisetzung der Glucocorticoide aus der Polymermatrix

1.1 LTSC – Das Freisetzungssystem einer Herzschrittmacherelektrode

Als grundlegende Voraussetzung zur Charakterisierung der Glucocorticoid-Freisetzung aus der Matrix einer Herzschrittmacherelektrode (LTSC, *lead tip with steroid eluting collar*), muss zunächst das Freisetzungssystem selbst näher definiert und beschrieben werden.

Der Begriff LTSC bezeichnet dem Namen nach die komplette Elektrodenspitze inklusive der Freisetzungsmatrix. In dieser Arbeit wurden zur Charakterisierung der Freisetzung keine vollständig aufgebauten Elektroden verwendet, sondern lediglich der für die Freisetzung relevante Teil des Elektrodenaufbaus. Dieser bestand aus der aufgrund ihrer Form als *Collar* (engl. „Kragen“ beziehungsweise „Halsband“) bezeichneten Freisetzungsmatrix, die auf den reinen Silikon-Mantel der Elektrodenspitze montiert war (siehe Abb. 7). Zur Vereinfachung wird bereits die aus diesen zwei Teilen bestehende Anordnung innerhalb der Arbeit stets als LTSC bezeichnet.

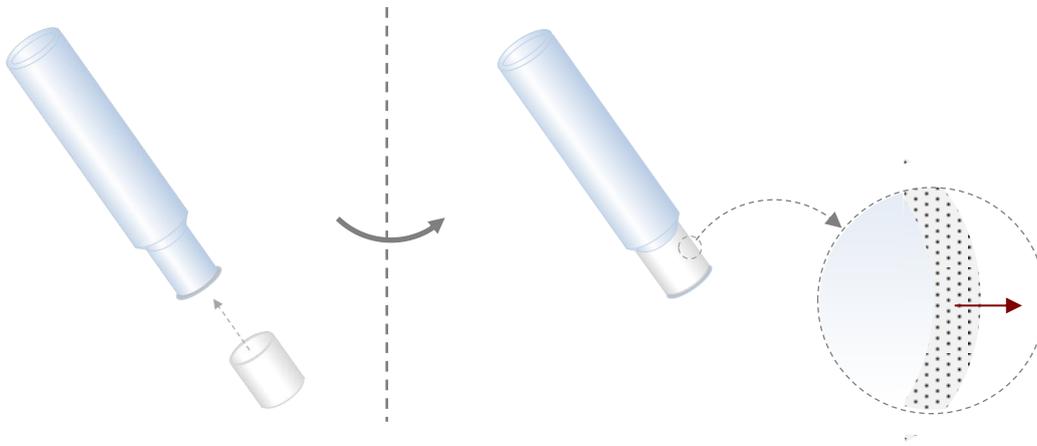


Abb. 7: Schemazeichnung der für das Freisetzungssystem relevanten Teile der Elektrodenspitze. Die Freisetzungsmatrix selbst wird als Collar bezeichnet und ist auf den Silikon-Mantel der Elektrodenspitze montiert. In der Regel wird die vollständige Elektrodenspitze als LTSC (*lead tip with steroid eluting collar*) bezeichnet, zur Vereinfachung wird innerhalb der Arbeit allerdings bereits die Anordnung aus dem Silikon-Mantel und dem Collar LTSC genannt. Der Collar besitzt die Form eines dünnwandigen Hohlzylinders ($\sim 0,25$ mm Wandstärke, $\sim 3,61$ mm² Außenfläche) und ist durch die Montage auf dem Silikon-Mantel an der Innenseite für das Freisetzungsmittel unzugänglich. Die Matrix entspricht der Einteilung nach Higuchi [46] damit einer planaren Geometrie, bei welcher der darin dispergierte Arzneistoff nur eindimensional aus der Matrix diffundieren kann (roter Pfeil) und die Oberfläche zum Akzeptorkompartiment hin die Dicke der Matrix deutlich übersteigt. Die Beladung der Collar mit Glucocorticoiden betrug 33 % DXA beziehungsweise 20 % GCX oder BDP und sollte somit stets weit über der Sättigungskonzentration der Matrix gelegen haben.

Gewünscht ist eine kontinuierliche und über einen Zeitraum von mehreren Jahren anhaltende Arzneistofffreisetzung für die lokale Wirkung am Implantationsort der Herzschrittmacherelektrode im Herzen [16]. Bei dem betrachteten Gesamtsystem handelt es sich um ein Medizinprodukt [20] (*siehe auch Abschnitt 1.2.2*), da mit der Glucocorticoid-Gabe alleine kein primäres therapeutisches Ziel verfolgt wird. Eine orale Medikation wird lediglich im akuten Notfall eines sog. *Exit-Blocks* eingesetzt, um die Erregbarkeit des Herzgewebes wieder herzustellen [16, 34, 47]. Die Inzidenz dieser Komplikation der Schrittmachertherapie ist jedoch mit der Einführung der Glucocorticoid-freisetzenden Elektroden stark gesunken [13, 16] und eine orale Glucocorticoid-Gabe wäre für die Dauertherapie mit dem Ziel einer Reizschwellenabsenkung aufgrund der hohen Potenz der Glucocorticoide und dem damit einhergehenden Potential für unerwünschte Nebenwirkungen eine weit übertriebene Maßnahme. Der relevante Wirkort dürfte sich in der Herzschrittmachertherapie auf einen sehr kleinen Radius um die Spitze der Elektrode lokal beschränken und sollte damit bei gezielter Applikation nur sehr geringe Arzneistoffmengen erforderlich machen. Da ein invasiver Eingriff durch die Implantation des Schrittmachers mit samt Elektrode ohnehin erfolgt, der Applikationsmodus als solcher also keinen zusätzlichen Umstand darstellt, und auch etwaige Biokompatibilitätsprobleme im Zusammenhang mit dem Freisetzungssystem [48] im Zuge der Implantation des gesamten Schrittmachersystems in den Hintergrund treten, bietet sich der Einsatz einer im Herz implantierbaren Freisetzungsmatrix an. Zwar ist man eigentlich durch die lokale Therapie bestrebt eine nennenswerte systemische Verfügbarkeit hochpotenter Arzneistoffe zu umgehen, da die Vermeidung damit verbundener unerwünschter Nebenwirkungen wesentlich zur Effektivität der Therapie beiträgt, wie dies beispielsweise bei pulmonaler Anwendung zur Asthmatherapie oder für die Behandlung der allergischen Rhinitis mit der intranasalen Anwendung verfolgt wird [41, 49]. In dem vorliegenden Fall sollte durch die systemische Gabe allerdings kaum ein Nachteil entstehen, da die Glucocorticoid-Konzentrationen ob der geringen Dosis im Blutkreislauf trotz Umgehung der ersten Leberpassage äußerst gering ausfallen sollten. Mit einer Beeinträchtigung der Effektivität durch unerwünschte systemische Nebenwirkungen sollte demnach nicht zu rechnen sein. Ganz im Gegenteil macht die hohe Potenz der Glucocorticoide in Kombination mit der lokalen Applikation den Einsatz sehr geringer Arzneistoffdosen überhaupt erst möglich, was hier unter anderem eine Voraussetzung für diese Applikationsform darstellt, schließlich ist der Platz an der Elektrodenspitze für ein Freisetzungssystem äußerst beschränkt [48]. Auch durch die Umgehung metabolischer, zum Wirkstoffverlust führender Prozesse führt die direkte Freisetzung am Wirkort zur Dosisminimierung – wobei einschränkend erwähnt werden muss, dass dies nicht zwingend auf den Einsatz von Prodrugs wie es DXA zutreffen muss.

Passend zur permanenten Schrittmachertherapie kann durch die Wahl des optimalen Freisetzungssystems die Glucocorticoid-Freisetzung kontrolliert über einen langen Zeitraum erfolgen [50]. Wie lange eine Freisetzung womöglich aufrechterhalten

werden kann soll Diskussionsgegenstand der folgenden Abschnitte der Arbeit sein, die Frage, inwieweit eine jahrelange Freisetzung tatsächlich nötig wäre, wird dagegen an späterer Stelle noch einmal aufgegriffen (*siehe Abschnitt 4.1*). Implantate zur Arzneimittelapplikation kommen auch auf anderen Therapiegebieten zum Einsatz, wobei deren Freisetzungsdauer sehr unterschiedlich ausfällt. Implantate in der Augenheilkunde, beispielsweise das Ocusert[®]-System zur Glaukom-Therapie, oder Antibiotika-freisetzende Zahnimplantate werden in der Regel über eine bis etwa vier Wochen eingesetzt [48, 51]. Vaginalringe oder intrauterine Implantate zur Kontrazeption bieten Freisetzungen zwischen einem Monat bis zu einem Jahr, Levonorgestrel-haltige Hautimplantate sogar über ein Jahr hinaus [48, 52]. In Bezug auf ihr Einsatzgebiet dürften kardiovaskuläre Stents zur Verhinderung von Restenosen dem LTSC wohl die ähnlichsten Implantate darstellen. Auch hier wird die Funktion des Implantats, in diesem Fall der Stent, durch die lokale Arzneimittelapplikation unterstützt, wobei die Freisetzung im Blutstrom erfolgt und über einen langen Zeitraum anhalten muss [53, 54]. Die Dauer der Freisetzung und die Freisetzungsrate hängen unter anderem von den physiko-chemischen Eigenschaften des zu applizierenden Arzneistoffs, beispielsweise der Löslichkeit im umgebenden Medium oder der Molekülgröße, und von der Art der verwendeten Freisetzungsmatrix selbst ab.

Insofern es sich nicht um ein aktives System handelt, ist die Freisetzung ein durch Diffusion getriebener Vorgang, welcher über die Art der Formulierung unterschiedlich gesteuert werden kann. Bei dem vorliegenden LTSC handelt es sich um ein monolithisches Freisetzungssystem, bei dem der freizusetzende Arzneistoff homogen in einer Silikon-Matrix verteilt vorliegt. Das Freisetzungssystem war nicht mit einer äußeren Membran überzogen, wie dies bei Reservoir-Systemen der Fall ist und welche das Freisetzungsverhalten zusätzlich modifizieren würde. Nähere Angaben zur Zusammensetzung der Matrix waren zwar nicht bekannt, jedoch konnte aufgrund der mit 20 bis 33 % (m/m) sehr hohen Arzneistoffbeladung davon ausgegangen werden, dass die sehr lipophilen Glucocorticoide nicht im Polymer gelöst waren, sondern darin als gleichmäßig dispergierte Feststoff-Partikel weit über der Löslichkeitsgrenze vorlagen. Dies ließ auch das weiße Aussehen der Matrix vermuten, da diese in Placebo-LTSC mit arzneistofffreier Matrix farblos war. Die Polymermatrix war dünnwandig und hohlzylindrisch geformt und war durch die Montage auf den Silikonschlauch der eigentlichen Elektrodenspitze nur an seiner äußeren Oberfläche für das Freisetzungsmedium zugänglich. Die Oberfläche war mit $\sim 3,61 \text{ mm}^2$ etwa um den Faktor 15 größer als die Dicke der Matrix von $\sim 0,25 \text{ mm}$. Der Einteilung nach Higuchi et al. [46] folgend, ließ es sich somit als granulöser Körper planarer Geometrie betrachten (*siehe Abb. 7*). Mechanistisch lässt sich die Arzneistofffreisetzung aus derlei System damit beschreiben, dass zunächst das Herauslösen von Feststoff-Partikel aus der Matrixoberfläche erfolgt. Dadurch bilden sich zusätzliche Poren, die wiederum die tiefer in der Matrix gelegenen Partikel zugänglich machen. Mit zunehmender Freisetzungsdauer entsteht so eine Art Kapillarsystem, in das Lösungsmittel eindringt, den Arzneistoff löst und dieser letztlich durch Diffusion im Medium

durch das poröse System nach außen freigesetzt wird. Da zu Beginn des Freisetzungsvorgangs die Partikel noch leicht zugänglich sind, der Diffusionsweg mit zunehmender Freisetzungsdauer jedoch immer länger und durch das Porensystem gewundener wird, nimmt die Geschwindigkeit nach einer anfänglich Bolus-artigen Freisetzung proportional zur Freisetzungsdauer immer weiter ab [50, 55].

Die passive Diffusion membrangesteuerter Systeme, bei denen sich die Freisetzung aufgrund des mit Arzneistoff gesättigten Reservoirs im Inneren und des steilen Konzentrationsgradienten über eine relativ dünne Membran praktisch nach einer Kinetik nullter Ordnung verhält [50], wird durch das Fick'sche Gesetz beschrieben. In einem monolithischen System wie dem hier Vorliegenden bleibt diese vergleichsweise scharfe und konstante Trennlinie jedoch nicht wie eine Membran konstant an einem Ort, sondern wandert vielmehr mit zunehmender Zeit in die Matrix ein. Es bildet sich damit ein immer breiter werdender Bereich zwischen den Fronten aus gesättigter Matrix (beziehungsweise Feststoff) und der Oberfläche des Freisetzungssystems, an welcher perfekte Sink-Bedingungen im Freisetzungsmedium herrschen [55]. So bildet sich eine mit der Zeit wachsende Diffusionsschicht aus. Dies beschreibt die Gesetzmäßigkeit nach Higuchi [46], nach der ein linearer Zusammenhang der freigesetzten Arzneistoffmenge mit der Quadratwurzel aus der entsprechenden Freisetzungsdauer herrscht (*siehe Fml. 2*).

$$\text{Fml. 2} \quad M_t = k \cdot t^{1/2} \quad [46, 56]$$

Mit:

M= Arzneistoffmenge, die über die Zeit freigesetzt wird

k= Freisetzungskonstante

t= Zeit

Dem Quadratwurzel-Gesetz nach Higuchi liegt prinzipiell das erste Fick'sche Gesetz zu Grunde und es kombiniert dieses mit der sich über die Zeit verbreiternden Diffusionsschicht (*siehe Fml. 3*). Dabei wird davon ausgegangen, dass an der einwandernden Front zum ungelösten Arzneistoff stets ein gesättigter Zustand in der Matrix und Sink-Bedingungen im Medium vorliegen [56]. Für poröse Freisetzungssysteme, bei denen der Arzneistoff ungelöst in einer festen Matrix eingebettet ist, muss zudem berücksichtigt werden, dass der Diffusionskoeffizient hier nicht das Diffusionsverhalten des Arzneistoffes in der Freisetzungsmatrix beschreiben kann, da es sich nicht um eine flüssige oder gasförmige Matrix handelt, in der der Arzneistoff gelöst vorliegt [50]. Um der Porösität und der Diffusion durch das entstehende Kapillarsystem Rechnung zu tragen, fließen nach Higuchi [46] der Diffusionskoeffizient im Medium sowie der Porositätsfaktor und die Tortuosität der Matrix in die Berechnung der Freisetzungsrates ein.

$$\text{Fml. 3} \quad M_t / A = [(D_\varepsilon / \tau) \cdot (2c_M - \varepsilon \cdot c_s) \cdot t \cdot c_s]^{1/2} \quad [46]$$

Mit:

Q= Arzneistoffmenge, die über die Zeit freigesetzt wird

A= Oberfläche der Matrix gegenüber dem Freisetzungsmedium

c_s= Löslichkeit des Arzneistoffes in der Freisetzungsmatrix

c_M= Arzneistoffkonzentration in der Matrix

t= Zeit

D_ε= Diffusionskoeffizient des Arzneistoffes im Medium

ε= Porositätsfaktor

τ= Tortuosität

Die Freisetzungskonstante k setzt sich demgemäß nach *Fml. 2* und *Fml. 3* wie folgt zusammen (*siehe Fml. 4*).

$$\text{Fml. 4} \quad k = A \cdot [(D_\varepsilon / \tau) \cdot (2c_M - \varepsilon \cdot c_s) \cdot t \cdot c_s]^{1/2} \quad [46, 56]$$

Die Freisetzungskinetik eines LTSC sollte sich somit unter den genannten Voraussetzungen anhand der Gesetzmäßigkeit nach Higuchi hinreichend beschreiben lassen, insbesondere da im systemischen Blutkreislauf zum einen von perfekten Sink-Bedingungen ausgegangen werden kann und die Matrix eine hohe Arzneistoffbeladung aufwies. Zusätzlich sollte jedoch gerade bei Herzschrittmacherelektroden beachtet werden, dass das elektrische Feld des Schrittmachers einen maßgeblichen Einfluss auf die Arzneistofffreisetzung nehmen kann [55]. Dies kann in Zusammenhang mit der Verwendung von Dexamethasonphosphat (DXP), dem meist als Natrium-Salz zum Einsatz kommenden Phosphorsäureester von Dexamethason (DX), eine Rolle spielen. Da die Glucocorticoide in den eigenen Untersuchungen allesamt als neutrale Ester eingesetzt wurden, konnte eine elektrische Beeinflussung hier jedoch weitestgehend ausgeschlossen werden.

Die drei in dieser Arbeit untersuchten Glucocorticoide Dexamethasonacetat (DXA), Beclomethasondipropionat (BDP) und Glucocorticoid X (GCX) waren in gleichartige Polymermatrices eingearbeitet, die aus dem Silikon-Typ Silastic® 7-6860 bestanden, einem biokompatiblen zwei-Komponenten Silikon aus Dimethyl- und Methyl-vinyl-siloxan im Verhältnis 1:1 [57]. Diese wurden von der Firma BIOTRONIK angefertigt und zu Untersuchungszwecken zur Verfügung gestellt. Die untersuchte DXA-haltige Matrix wird bereits in Verbindung mit dem Elektrodentyp Siello T (passive Fixierung) der Firma

BIOTRONIK in der klinischen Praxis eingesetzt. Die untersuchten GCX- und BDP-haltigen Matrices existieren bislang nur als Testobjekte.

1.2 Fragestellung

Die Abschnitte 1 bis 3 der Arbeit befassen sich schwerpunktmäßig mit dem Vergleich der Freisetzung der drei Glucocorticoide DXA, GCX und BDP aus dem Matrix-System. Dabei soll auch aufgegriffen werden, inwieweit die beschriebene Modell-Vorstellung auf die Freisetzungskinetik der vorliegenden Applikationsform zutrifft. Es wurde damit begonnen den Einfluss der Polymermatrix auf die Glucocorticoid-Freisetzung zu vergleichen, worauf in den weiteren Abschnitten unter Hinzunahme möglichst physiologischer Einflussfaktoren aufgebaut wurde.

Ziel war es somit sich der vorliegenden Applikationsform auf experimentellem Weg zu nähern und zunächst die Freisetzungskinetik der Substanzen aus der Polymermatrix zu vergleichen, möglichst ohne dem Akzeptormedium dabei eine differenzierende Rolle zukommen zu lassen. Grundvoraussetzung für die Versuche war zudem die Kenntnis über den genauen Glucocorticoid-Gehalt der LTSC. Deshalb wurden zu vorerst Gehaltsanalysen der Freisetzungsmatrices unternommen und mit den Herstellerangaben zur Arzneistoffbeladung der Matrices in [%] (m/m) verglichen.

1.3 Bestimmung des Glucocorticoid-Gehaltes der LTSC

Nach Angaben des Herstellers war die Freisetzungsmatrix zu 33 % (m/m) mit DXA beladen, wohingegen die Beladung mit GCX und BDP 20 % (m/m) betrug. Die zulässigen Gehaltsschwankungen waren auf ± 15 % des nominellen Gesamtgehalts festgelegt. Laut Hersteller wurden die Matrices mit unterschiedlich starken Glucocorticoid-Dosen hergestellt, da diese Gehalte die jeweils maximal möglichen Beladungen darstellten, mit denen noch eine stabile Formulierung mit gleichförmigem Gehalt zu erreichen waren.

Zur Gehaltsanalyse wurden die reinen Collar (*siehe auch Abb. 7*) nach einer Standardarbeitsanweisung von BIOTRONIK extrahiert und mittels HPLC vermessen. Zusätzlich wurden die Collar vor der Analyse gewogen, um zum Abgleich mit der HPLC-Analyse Kontrolle deren nominelle Beladung zu berechnen (*für nähere Informationen zur Durchführung der Gehaltsanalyse siehe 1.3 im Experimentellen Teil C*).

Die Ergebnisse der Gehaltsanalysen lagen alle innerhalb der vorgegebenen Spezifikation von ± 15 % bezogen auf den nominellen Gesamtgehalt. Die DXA-Collar enthielten $267 \pm 8 \mu\text{g}$ (CI 95 %, n= 10), was einer Beladung von $32,8 \pm 0,9$ % entsprach (*siehe Abb. 8*). GCX-Collar waren mit $166 \pm 6 \mu\text{g}$ GCX zu $18,5 \pm 0,6$ % mit Arzneistoff beladen, BDP-Collar mit $151 \pm 2 \mu\text{g}$ BDP zu $19,3 \pm 0,2$ %. Alle drei Freisetzungsmatrices

besaßen gleichförmigen Gehalt, angezeigt durch die engen Konfidenzintervalle. Zudem lag kein Gehalt eines analysierten Collars außerhalb des spezifizierten Bereichs.

Für die späteren Gewebefixationsversuche (*siehe Abschnitt 3*) wurden andere Chargen der DXA und GCX enthaltenden Collar eingesetzt, deren Gehalte sich auf 261 µg (31,8 %) DXA und 150 µg (19,7 %) GCX beliefen. Letztere Angaben zu den Arzneistoffgehalten wurden von BIOTRONIK beigesteuert.

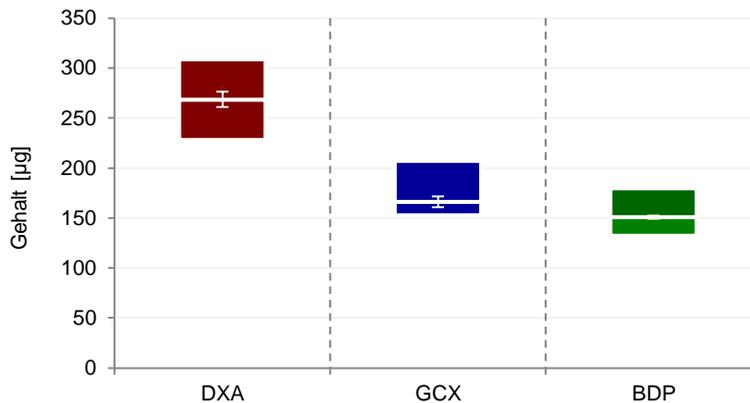


Abb. 8: Mittlere Gehalte der Freisetzungsmatrices an DXA, GCX oder BDP. Alle Gehalte lagen innerhalb der Spezifikation von $\pm 15\%$ bezogen auf den nominellen Gesamtgehalt von 33 beziehungsweise 20 % (m/m) an DXA beziehungsweise GCX und BDP eines Collars. Die Rechtecke stellen die obere und untere Grenze des spezifizierten Bereichs dar, die waagerechte Linie den gemessenen Gehalt. Abweichungen CI 95 %, n= 10.

Der Gehalt der Freisetzungsmatrices kann gleichsam als gesamte applizierte Dosis betrachtet werden. Dies stellt aber aufgrund der gewünschten, über Jahre hinweg verzögerten Freisetzung freilich keine akute Dosis dar, wie es beim Einsatz von Glucocorticoiden in anderen Applikationsformen der Falls ist. Der Vergleich mit der intranasalen Anwendung macht beispielhaft deutlich, wie niedrig die eingesetzten applizierten Dosen bei der Herzschrittmachertherapie sind. Je Sprühstoß werden bei intranasaler Anwendung $\sim 50\ \mu\text{g}$ Glucocorticoid appliziert [58]. Die tägliche Dosis entspricht dort somit je nach Anzahl der Sprühstöße, meist zwei bis vier am Tag, bereits mehr als der Hälfte des gesamten Gehalts eines Collars, der über einen Zeitraum von vielen Jahren freigesetzt werden soll. Noch weit höhere Dosen kommen bei einer dermalen Glucocorticoide-Therapie zum Einsatz. Hier werden sogar bei einmaliger Anwendung teilweise Dosen im Bereich von wenigen Milligramm aufgetragen.

1.4 Freisetzung der Glucocorticoide in Methanol

Im Gegensatz zu transdermalen Freisetzungssystemen, für welche das Ph.Eur.8.5 in seinem Kapitel 2.9.4 einen eigenen Freisetzungstest als Methode vorschlägt oder alternativ auf die Methoden in Kapitel 2.9.3 verweist, werden dort für parenterale Implantate keine konkreten Angaben für einen Freisetzungstest gemacht. Möglicherweise wären das Korb-Modell oder die Durchflusszelle für eine Freisetzung passende Apparaturen gewesen, da es allerdings bereits eine Standardarbeitsanweisung seitens des Herstellers gab, wurde sich in der Durchführung der eigenen Versuche an dieser orientiert.

So wurden die Versuche zur Charakterisierung der Freisetzungskinetik und deren Vergleich zwischen den drei Glucocorticoiden in einem konventionellen Schüttler-Modell durchgeführt. Zur Vermeidung des Risikos etwaiger Adsorptionseffekte der lipophilen Glucocorticoide an Gefäßoberflächen, die nicht nur die gemessenen Konzentrationen verfälscht hätte, sondern auch einen Einfluss auf die Freisetzung an sich hätte nehmen können, wurden Glasgefäße als Freisetzungsbhälter eingesetzt. Physiologische Bedingungen spielten in diesen Versuchen noch keine Rolle. Vielmehr sollte ein Akzeptormedium zum Einsatz kommen, welches möglichst keinen differenzierenden Einfluss auf die Freisetzung nehmen sollte und in dem sich die Glucocorticoide weitgehend ähnlich verhalten. Aus diesem Grund wurde die Freisetzung in 25 mL Methanol bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Löslichkeit von DXA und BDP in Methanol war nach Ph.Eur.8.5 als löslich einzustufen (33 - 100 mg/mL, *siehe auch Abschnitt 8 im Tabellarischen Anhang in Teil D*), GCX als schwer löslich (1 - 10 mg/mL) [59, 60]. Zwar lässt diese Einteilung einen Einfluss des Lösungsmittels auf die Freisetzung von GCX vermuten, im Vergleich dazu sind die Löslichkeitsunterschiede in alternativen Lösungsmitteln wie Ethanol (96 %) oder Dichlormethan nach Ph.Eur.8.5 von leicht bis schwer löslich allerdings als noch höher einzustufen. Einzig in Wasser gelten alle Glucocorticoide gleichermaßen als praktisch unlöslich. Jedoch täuscht diese nach unten offene Skala über die sehr deutlichen Unterschiede in der Wasserlöslichkeit hinweg. So liegt diese, Literaturangaben zu folge, in einer Spannweite von $<0,1 \mu\text{g/mL}$ bis $100 \mu\text{g/mL}$ [61-63] und hätte demzufolge selbst bei Verwendung eines Volumens von 1000 mL, wie in den meisten Freisetzungsmoellen des Ph.Eur.8.5 üblich, keine Sink-Bedingungen in Bezug auf den vollen Gehalt der Freisetzungsmatrices gewährleistet. Bei einem Volumen von 25 mL bot Methanol hingegen zu jeder Zeit perfekte Sink-Bedingungen für alle drei Substanzen, da selbst eine vollständige Freisetzung des schwer löslichen GCX lediglich zu einer Konzentration von $6,6 \cdot 10^{-3} \text{ mg/mL}$ geführt hätte. Bei einer Konzentration von 1 mg/mL in Methanol konnte zudem eine rasche Auflösung aller drei Glucocorticoide beobachtet werden.

Zur Freisetzung wurden LTSC, um ein Aufschwimmen zu verhindern, mit einem Sinker aus Edelstahl beschwert in 25 mL Methanol gegeben und bei Raumtemperatur für 24 Stunden bei 180 U/min geschüttelt. Probenzug erfolgte nach 30, 60, 90, 180, 360, 720

und 1440 Minuten und ermöglichte die Aufnahme eines detaillierten Freisetzungssprofils gerade zu Beginn des Prozesses. Nach Ablauf der Versuchsdauer wurden die Untersuchungsgegenstände dem Freisetzung-Container sofort entnommen und anschließend zur Kontrolle des Freisetzungsvorgangs die Restgehalte der Matrices, ebenso wie alle gezogenen Proben, mittels HPLC/UV analysiert (für eine ausführliche Beschreibung der Versuchsdurchführung siehe Abschnitt 1.5 im Experimentellen Teil C).

1.5 Ergebnisse und Diskussion der Freisetzungsversuche in Methanol

Die Freisetzungsversuche zeigten deutliche Unterschiede zwischen den drei getesteten Substanzen. Nach 24 Stunden konnte für DXA mit $248 \pm 3 \mu\text{g}$ eine Freisetzung aus dem Matrixsystem von $92,9 \pm 1,0 \%$ festgestellt werden, was durch die Analyse des Restgehaltes von $5 \pm 3 \%$ bestätigt wurde. Dabei war dem noch merklich ansteigenden Freisetzungssprofil nach zu urteilen der Prozess nach 24 Stunden noch nicht abgeschlossen, so dass bei längerer Versuchsdauer mit einer annähernd vollständigen Entleerung der Matrix zu rechnen gewesen wäre (siehe Abb. 9). BDP wurde dagegen mit $103 \pm 7 \mu\text{g}$ zu $68,3 \pm 4,7 \%$ aus den LTSC freigesetzt, GCX mit $21 \pm 1 \mu\text{g}$ zu $12,4 \pm 0,4 \%$. Auch für diese beiden Glucocorticoide passten die gefundenen Restgehalte von $29,4 \pm 3,2 \%$ beziehungsweise $86,5 \pm 3,8 \%$ für BDP beziehungsweise GCX zu den Analyseergebnissen der Freisetzung. Wie bei DXA nahm die Steigung der Kurven zwar mit zunehmender Freisetzungsdauer ab, zeigte aber dennoch an, dass die Freisetzung nach 24 Stunden noch nicht abgeschlossen war.

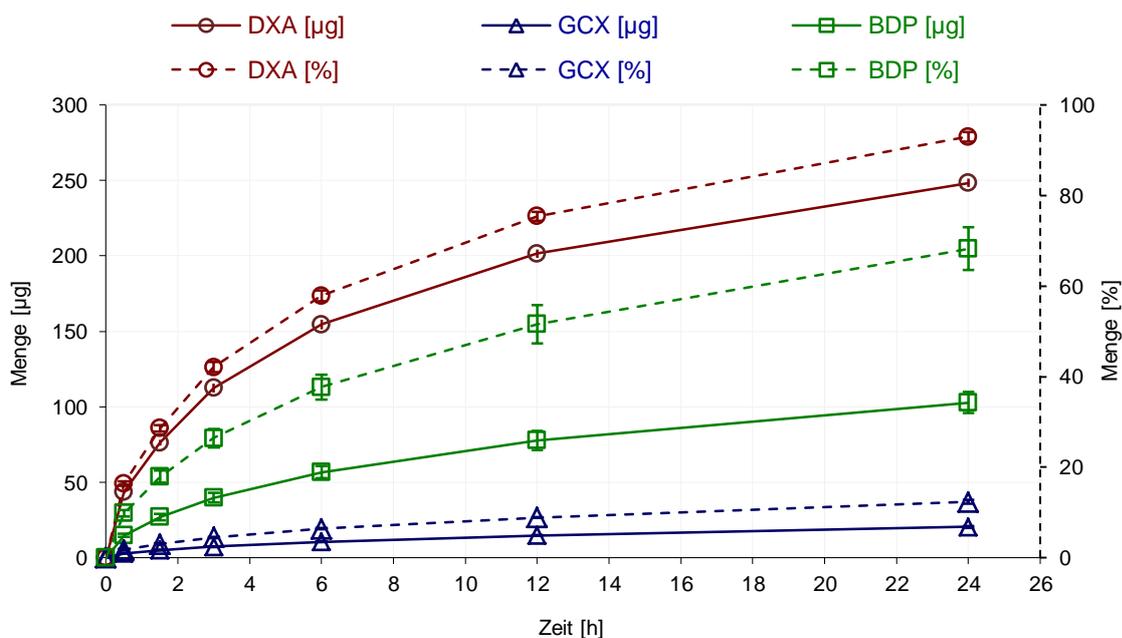


Abb. 9: Profile der Freisetzungen von DXA, GCX und BDP aus LTSC in 25 mL Methanol über 24 Stunden bei Raumtemperatur als absolute Freisetzung in $[\mu\text{g}]$ (linke Y-Achse, durchgezogene Linie) und in $[\%]$ des Gesamtgehalts (rechte Y-Achse, gestrichelte Linie). Abweichungen CI 95 %, $n=6$.

Um die eingangs unter Abschnitt 1.1 modellhaft beschriebene Freisetzungskinetik auf die experimentell ermittelten Freisetzungsdaten anzuwenden und die Modellvorstellung zu überprüfen, wurden die freigesetzten Arzneistoffmengen nach *Fml. 2* gegen die Quadratwurzel der Zeit aufgetragen (*siehe Abb. 10*). Die Steigungen der Geraden entsprachen somit der Freisetzungskonstante k . Die Freisetzung aller drei Glucocorticoide verhielten sich linear nach dem Quadratwurzelgesetz, dabei lag die Freisetzungskonstante für DXA bei $55,6 \pm 1,9 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$ ($R^2 = 0,99$, $n = 6$, CI 95 %), für BDP bei $21,8 \pm 0,7 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$ ($R^2 > 0,99$) und für GCX bei $4,2 \pm < 0,1 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$ ($R^2 > 0,99$). Das Freisetzungsverhalten aus der Polymermatrix ließ sich diesen Daten nach zu urteilen anhand der Modellvorstellung nach Higuchi [46] korrekt beschreiben. Jedoch wiesen Siepmann et al. [56] bereits drauf hin, dass dies trotz eines linearen Zusammenhangs zwischen Freisetzungsmenge und der Quadratwurzel der Zeit nicht auf jedes Freisetzungssystem zutrifft, da die Higuchi-Gleichung nur unter der Voraussetzung einiger modellhafter Grundannahmen als Beschreibung zulässig sei. Wie im ursprünglichen Modellansatz, in dem von der Diffusion eines in einer dünn aufgetragenen Salbe fein dispergierten Arzneistoffs in die darunter liegende Hautschicht ausgegangen wurde [64], konnten allerdings auch im vorliegenden Freisetzungssystem als gegeben betrachtet werden. So war die Arzneistoffbeladung wesentlich größer, als dessen Löslichkeit in der Matrix und das Akzeptormedium bot perfekte Sink-Bedingungen. Auch eine mit der Matrix-Dicke verglichen sehr große Kontaktfläche und schnellere Diffusion im Medium [56] lag der Collar-Geometrie nach vor und von einer homogenen und feinen Dispersion der Glucocorticoide in der Matrix konnte mikroskopischen Aufnahmen zufolge ausgegangen werden [65]. Nicht ausgeschlossen werden konnten jedoch strukturelle Veränderungen der Silikon-Polymere durch Quellung, die in Abhängigkeit des verwendeten Lösungsmittels und ihrer genauen Zusammensetzung unterschiedlich stark ausfallen kann [66]. Wie stark die eventuelle Quellung des Materials in Methanol ausfiel, einem polaren und hydrophilen Lösungsmittel, war unklar. In Humanplasma als dem physiologischen Akzeptormedium dürfte dieser Effekt aufgrund der hohen Hydrophobizität des Silikons allerdings sicherlich eine geringe Rolle im Freisetzungsprozess spielen. Da auch Roseman et al. [67] den Freisetzungsprozess von Steroiden, in diesem Fall verschiedene Derivate des Progesterons, aus einer Silikon-Matrix anhand des Quadratwurzelgesetzes nach Higuchi beschrieben, konnte wohl trotz der genannten Einschränkung von einer korrekten Charakterisierung der Freisetzungskinetik nach *Fml. 3* ausgegangen werden.

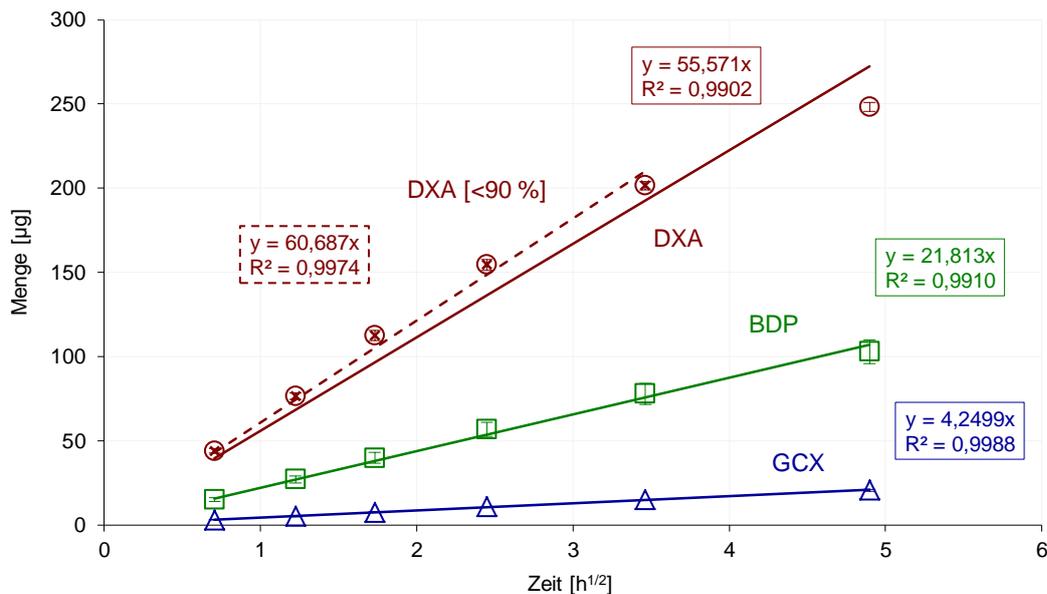


Abb. 10: Kinetik der Freisetzung der Glucocorticoide DXA, GCX und BDP aus LTSC. Die freigesetzte Menge stand in linearem Zusammenhang mit der Quadratwurzel der Zeit. Dies bestätigte die Modellvorstellung einer Freisetzungskinetik nach Higuchi [46] wie unter Abschnitt 1.1 beschrieben. Die leichte Abweichung von der Linearität der Messung von DXA nach 24 Stunden war möglicherweise dadurch zu erklären, dass die Matrix nach einer Freisetzung von >90 % des Gesamtgehaltes bereits deutlich an Arzneistoff zu verarmen begann und damit der nach Higuchi geforderte Zustand einer weitaus übersättigten Matrix nicht mehr vorgelegen haben mag. Unter Berücksichtigung aller Messwerte, die eine DXA-Freisetzung <90 % anzeigten, wurde wie bei GCX und BDP eine Linearität mit einem Korrelationskoeffizienten >0,99 erhalten (gestrichelte Linie). Abweichungen CI 95 %, n= 6.

Der augenscheinlich leicht von der Linearität abweichende Messpunkt zur DXA-Freisetzung nach 24 Stunden konnte womöglich damit erklärt werden, dass die Matrix zu diesem Zeitpunkt bereits zu >90 % entleert war und bei einer an Arzneistoff zu stark verarmten Matrix die Voraussetzung einer weiten Übersättigung des Systems nicht mehr gegeben war. Wurde dieser letzte Messpunkt aus der linearen Regression entnommen, konnte mit $60,7 \pm 1,2 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$ neben einer höheren Freisetzungskonstante auch ein höherer Korrelationskoeffizient von $R^2 > 0,99$ erhalten werden (siehe Abb. 10).

Für die Geschwindigkeiten der Glucocorticoid-Freisetzung ergab sich die Reihenfolge DXA > BDP >>> GCX. Diese stand somit zwar in etwa in Einklang mit deren literaturbekannten Löslichkeiten im Medium (siehe Abb. 11 links), jedoch zeigte sich insgesamt nur eine mäßige Korrelation von $r = 0,92$ (Korrelation nach Pearson, Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov gegeben). In Anbetracht der Tatsache, dass die Konzentrationen im Medium nach 24 Stunden weit unter der Sättigungslöslichkeit in Methanol lagen (mindestens um den Faktor 10^3) und den damit verbundenen perfekten Sink-Bedingungen, war ein limitierender Einfluss des Methanols zudem nicht anzunehmen.

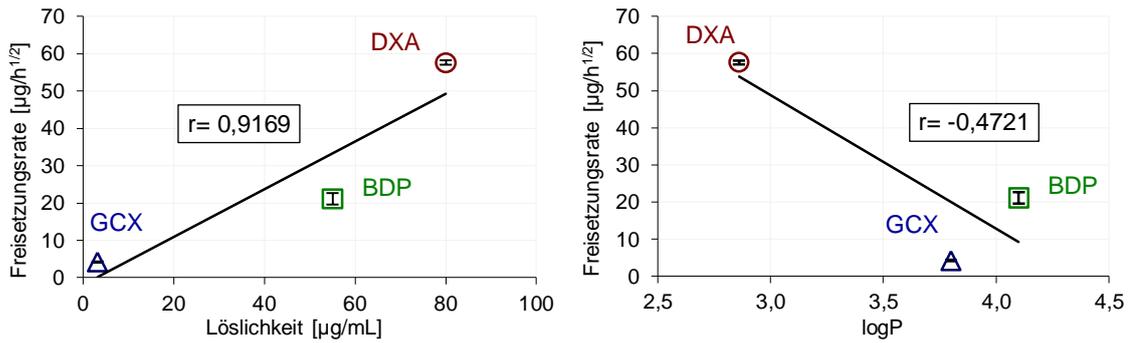


Abb. 11: Zusammenhang zwischen Löslichkeit (links) beziehungsweise logP-Wert (rechts) der Glucocorticoide und der Freisetzungsrates. Die Geschwindigkeiten der Glucocorticoid-Freisetzung stand zwar in etwa in Einklang mit der Löslichkeit im Medium, jedoch zeigte sich insgesamt nur eine mäßige Korrelation von $r = 0,92$ (Korrelation nach Pearson 0,9169, Daten nach Kolmogorov-Smirnov normalverteilt). Auch eine eindeutige Korrelation der Freisetzungsrates mit dem log-P-Wert war nicht gegeben, da BDP eine deutlich höhere Freisetzungsrates zeigt als das weniger lipophile GCX. Der Korrelationskoeffizient für den negativen Zusammenhang zwischen der Freisetzungsrates und dem logP-Wert betrug nur $r = -0,47$ (Korrelation nach Spearman -0,4721, Daten nach Kolmogorov-Smirnov nicht normalverteilt).

Mehrere Variablen können einen Einfluss auf die Freisetzungskinetik der drei Glucocorticoide nehmen. Adsorptionseffekte und Affinitäten der Substanzen zu einem Material können in Abhängigkeit ihrer Molekülstruktur unterschiedlich stark ausgeprägt sein, was man sich schließlich bei chromatographischen Verfahren oder der Festphasenextraktion zu Nutze macht. Auch bei der kontrollierten Arzneistofffreisetzung aus einer implantierbaren oder lokal angewendeten Matrix über eine lange Dauer spielt dieses Prinzip eine Rolle [67]. So werden im vorliegenden Applikationssystem lipophile Arzneistoffe aus diesem Grund in einer Silikon-Matrix dispergiert, die selbst ebenfalls stark hydrophile Eigenschaften aufweist [68]. Dadurch ist zum einen das Eindringen der wässrigen physiologischen Lösungsmittel, wie beispielsweise Humanplasma oder wässrige Filme auf Schleimhäuten, in die Poren der Matrix zum Lösen des dispergierten Feststoffes erschwert, zum anderen wird die Verteilung des im Medium gelösten Wirkstoffes aus den Matrix-Poren ins freie Lösungsmittel durch die Affinität der lipophilen Substanzen zur Matrix verzögert. Für den Vergleich von DXA, GCX und BDP konnte man demnach erwarten, dass sich deren Freisetzung in Übereinstimmung mit ihren logP-Werten – dem dekadischen Logarithmus aus dem Verhältnis der Verteilung eines Stoffes zwischen n-Octanol und Wasser – verhalten sollte. In der Gesamtschau aus allen drei Substanzen zeichnete sich dies nur ansatzweise ab, wie auch die niedrige Korrelation von $r = -0,47$ zeigte (Korrelation nach Spearman, Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov nicht gegeben, siehe Abb. 11 rechts). DXA mit dem niedrigsten logP-Wert besaß zwar die höchste Freisetzungskonstante, der negative Zusammenhang zwischen Freisetzungsrates und logP setzte sich bei Betrachtung von GCX und BDP jedoch nicht fort, zeigte ersteres doch eine weit langsamere Freisetzung aus dem LTSC als das eigentlich lipophilere BDP [44, 69]. Die Affinität zur Matrix durch lipophile Wechselwirkungen schien somit nicht alleine

einflussnehmend zu sein.

Auch Interaktionen mit der Silikon-Matrix durch einzelne in den Molekülen unterschiedliche funktionelle Gruppen könnten zur Erklärung der beobachteten Freisetzungsdifferenzen diskutiert werden. Unterschiede zwischen den drei getesteten Arzneistoffen bestanden in erster Linie in deren Halogenierungsmustern an den Positionen C-6 und C-9 sowie unterschiedlichen Estern an C-17 und C-21. Bezogen auf deren physikochemische Eigenschaften tragen diese Variationen allerdings vor allem zu der deutlich höheren Lipophilie von GCX und BDP gegenüber DXA bei. Aus pharmakodynamischer Sicht sind die strukturellen Unterschiede zudem für die entsprechenden Affinitäten zum Glucocorticoid-Rezeptor verantwortlich, wobei diese wiederum mit dem logP-Wert korreliert, insofern es sich nicht wie bei DXA und BDP um ein C-21 Prodrug handelt [45].

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Freisetzungsgeschwindigkeit ist die Porengröße der Matrix [67], welche als Porositätsfaktor ϵ auch in die Higuchi-Gleichung eingeht (*siehe Fml. 3*). Da durch die Auflösung der Feststoffpartikel der in der Matrix dispergierten Substanzen Freiräume während des Freisetzungsprozesses entstehen, ist die Partikelgröße der Arzneistoffe wiederum ein Einflussfaktor für die Porengröße und damit ein Parameter für die Freisetzungsgeschwindigkeit, der bereits während des Herstellungsprozesses des Freisetzungssystems berücksichtigt werden muss. Die Partikelgrößenverteilung der eingearbeiteten Arzneistoffe lag bei $\leq 5 \mu\text{m}$ zu mindestens $\geq 85 \%$ und $\leq 20 \mu\text{m}$ zu mindestens $\geq 99 \%$, so dass hierbei kaum unterschiedliche Ausgangsbedingungen vorlagen. Soweit bekannt, wurden die hier untersuchten Collar in einem Spritzguss-Verfahren hergestellt. Prozessparameter lagen indes nicht vor, womit eine Beurteilung der Beeinflussung der Arzneistoffe durch das Verfahren selbst schwer fällt. Ein kritischer Parameter ist sicherlich die Temperatur während des Schmelzprozesses, da dies neben chemischen Stabilitätsproblemen auch zu Änderungen der Modifikationen der Arzneistoffe führen kann [70]. Ersteres schien im vorliegenden Freisetzungssystem kein Problem darzustellen, wie die eigenen Gehaltsuntersuchungen und Angaben des Herstellers nahelegten. Informationen zur Arzneistoffmodifikation im Polymer lagen dagegen nicht vor, wären zur Beurteilung der experimentell ermittelten Freisetzungsgeschwindigkeiten jedoch interessant gewesen, da Unterschiede in diesem Charakteristikum die Lösungsgeschwindigkeit deutlich beeinflussen können. So strebt man beispielsweise zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit schwer wasserlöslicher Arzneistoffe meist einen amorphen Zustand in der Freisetzungsmatrix an, da dies die Lösungsgeschwindigkeit zum Teil erheblich beschleunigt, wobei bei derlei Formulierungen darauf geachtet werden muss, dass der amorphe Zustand thermodynamisch instabil ist und die Stoffe somit zu Re-Kristallisation neigen, was wiederum die Freisetzungseigenschaften fortlaufend beeinflussen kann [71]. Betrachtet man die Schmelzpunkte der drei verwendeten Substanzen (*siehe Abschnitt 8 im Tabellarischen Anhang in Teil D*), fällt auf, dass BDP mit 117-120 °C einen wesentlich niedrigeren

Schmelzpunkt besitzt als DXA (263 °C) und GCX (>200 °C) [72], aber zumindest die seitens des Herstellers des Polymers vorgeschlagene Verfahrenstemperatur für Silastic® 7-6860 bei 165 °C liegt [57]. Die genauen Verfahrensparameter für die Collar-Herstellung mögen zwar davon abweichend gewesen sein, anders als bei DXA und GCX war eine Überschreitung des Schmelzpunktes bei BDP jedoch höchstwahrscheinlich und konnte damit, je nach weiterer Parameter wie Aushärtung und Abkühlung des fertigen Polymergemisches, entsprechenden Einfluss auf die Modifikation des BDP nehmen. Auch eine Beeinflussung der Größe der letztlich im Polymer dispergierten Partikel durch den Schmelzprozess sollte in Betracht gezogen werden. Hinzu kommen auch Lösungsprozesse während der hohen Temperatur im Herstellungsvorgang, die zu Änderungen der Arzneistoffmodifikation führen könnten [70]. Dies sollte vor allem für DXA beachtet werden, da es laut seiner Monographie im Ph.Eur.8.5 Polymorphie zeigt. Unterschiedliche Arzneistoffmodifikationen beziehungsweise Modifikationsänderungen während des Herstellungsverfahrens könnten daher eine weitere Erklärung für die beobachteten logP-Wert unabhängigen Unterschiede in der Freisetzungsgeschwindigkeit sein und bedürfte weiterer Abklärung bei näherer Kenntnis des Herstellungsprozesses aus pharmazeutisch technologischer Sichtweise.

Mit den gezeigten Freisetzungsversuchen in Methanol wurden erstmals mehrere Glucocorticoide hinsichtlich ihrer Freisetzung aus der Polymermatrix einer Herzschrittmacheelektrode beziehungsweise eines LTSC grundsätzlich und möglichst ohne differenzierenden Einfluss eines komplex zusammengesetzten physiologischen Freisetzungsmediums miteinander verglichen. Die Freisetzungskinetik konnte unter den gegebenen Voraussetzungen bezüglich der Geometrie der LTSC anhand des Quadratwurzel-Gesetzes nach Higuchi beschrieben werden. Die unterschiedlichen Freisetzungskonstanten als Maß für die Freisetzungsgeschwindigkeiten der Glucocorticoide stellten sich dabei als weitgehend unabhängig von deren logP-Werten heraus, was ob der hydrophoben Silikon-Matrix zu vermuten gewesen wäre. Eine mögliche Erklärung für die relativ gesehen langsame Freisetzungsgeschwindigkeit des GCX mag in dessen Molekülstruktur zu finden sein und auf eine chemische Interaktion mit der Matrix schließen lassen. Ein anderer plausibler Ansatzpunkt wäre die Beeinflussung der Lösungsgeschwindigkeit durch Veränderungen der Arzneistoffmodifikation während des Herstellungsprozesses der Silikon-Matrix und würde vor allem eher auf eine vergleichsweise rasche Freisetzung des BDP hinweisen.

2 Charakterisierung des Freisetungsverhaltens der Glucocorticoide aus der Polymermatrix in Humanplasma

2.1 Fragestellung

Nachdem im vorigen Abschnitt 1 das Freisetzungssystem als solches beschrieben wurde, war es nun das Ziel die physiologischen Einflussfaktoren in die Betrachtung mit einzubeziehen. Dies sollte eine genauere Vorstellung davon liefern, mit welchen Freisetzungsraten unter physiologischen Verhältnissen in den ersten Tagen nach der Applikation eines Schrittmachersystems zu rechnen sein könnte und damit sowohl Rückschlüsse auf die potentielle Freisetzungsdauer zulassen, als auch auf lokale Arzneistoffkonzentrationen. Dabei sollten, wie bereits zuvor, die drei Glucocorticoide DXA, GCX und BDP in ihrem Freisetzungsverhalten untereinander verglichen werden.

In-vitro Untersuchungen zur Freisetzung von Glucocorticoiden aus LTSC (*lead tip with steroid eluting collar, siehe Abschnitt 1.1*) wurden bislang kaum durchgeführt. Im Wesentlichen beschränkten sich die derzeitig literaturbekannten Versuche auf die Untersuchungen von Herrlich et al. [73], der die Freisetzung von DXA aus einer Silikonmatrix, ähnlich der in dieser Arbeit verwendeten, mit der von DXP in wässrigem Phosphatpuffer über vier Wochen verglich. Semmling et al. [65] untersuchten die Freisetzung von DXA zunächst in Bezug auf das Medium unter grundsätzlich ähnlichen Bedingungen und zogen in einer weiteren Versuchsreihe zur Simulation eines Gewebekompartiments ein Hydrogel mit ein, in welches die Freisetzungsmatrix eingebettet wurde. Je nach gewähltem genauen Versuchsaufbau wurden in beiden Untersuchungen Freisetzungen zwischen ~8 % nach 28 Tagen und ~20 % bereits nach neun Tagen Versuchsdauer festgestellt, was eine Beurteilung der in einem physiologischen Kontext zu erwartenden Freisetzungsraten schwierig macht. Die Verwendung von isotonischem Phosphatpuffer als Akzeptormedium berücksichtigte physiologische Bedingungen in erster Linie in Bezug auf die Osmolarität, den pH-Wert von 7,4 und Wasser als Lösungsmittel bei einer Temperatur von 37 °C. In einigen Punkten folgte diese Herangehensweise damit den Empfehlungen des Ph.Eur.8.5 unter 5.17.1 und Leitlinien zur Durchführung von Freisetzungsversuchen [74, 75], wobei sich die dortigen Angaben meist nur auf die Simulation von Medien zur Freisetzung aus oral zu applizierenden Arzneiformen beziehen. Ein einfacher wässriger Phosphatpuffer mit den oben genannten Charakteristika spiegelt das tatsächliche physiologische Freisetzungsmedium, also humanes Blutplasma, dennoch wohl nur unzureichend wider. So besteht Humanplasma zu einem Anteil von 50 - 70 mg/mL aus gelösten Proteinen, was ~8 % des gesamten Massenanteil entspricht. Etwa ~2 % entfallen auf Salze und organische Verbindungen und der Rest auf Wasser als Lösungsmittel. Die Plasmaproteine sind eine diverse Substanzgruppe, die unter Einbezug verschiedener post-translationaler Modifikationen wie Glykosylierungen wahrscheinlich aus

mehreren Hunderttausend verschiedenen Proteinen besteht [76]. Der mit ~70 % beziehungsweise 35 bis 50 mg/mL mit Abstand größte Teil der Proteine entfällt dabei auf Albumin, darüber hinaus stellen Antikörper, allen voran IgG (~10 %), eine weitere große Subgruppe dar.

Glucocorticoide sind als praktisch unlöslich in Wasser zu betrachten, zeigen allerdings eine ausgeprägte Plasmaproteinbindung (PPB), die bei den modernen Vertretern dieser Substanzklasse, wie beispielsweise Ciclesonid, >99 % betragen kann [49]. Dem Proteinanteil in Humanplasma als Freisetzungsmedium kommt daher eine wichtige Bedeutung als zweites Kompartiment im Akzeptormedium neben dem Lösungsmittel Wasser zu. An Plasmaproteine gebundene Glucocorticoide liegen zwar nicht frei vor, aufgrund der Protein-Affinität der Substanzen und der Reversibilität der Bindung, stehen der frei gelöste und der proteingebundene Anteil jedoch in einem Gleichgewicht. Den Plasmaproteinen kommt daher ein lösungsvermittelnder Effekt zu, der einen Einfluss auf die Freisetzungsgeschwindigkeit nehmen kann [58]. Zusätzlich wirken sich weitere Plasmabestandteile wie Phospholipide mit emulgierenden Eigenschaften auf die tatsächliche Löslichkeit der praktisch wasserunlöslichen Arzneistoffe im Plasma aus.

Auch das Ph.Eur.8.5 erlaubt die Modifikationen eines wässrigen Freisetzungsmediums, wenn es die speziellen Anforderungen der untersuchten Applikationsform erfordern und verweist insbesondere bei der Untersuchung von schwer löslichen Substanzen auf geringfügigen Zusatz von Tensiden als Lösungsvermittler. Als Medien zur Simulation der Flüssigkeit im oberen Dünndarm und im Magen werden dort beispielsweise verschiedene konkrete Vorschläge mit Zusätzen an Lecithin und Natrium-Taurocholat vorgeschlagen, um Freisetzungsbedingungen im Gastrointestinaltrakt für orale Arzneiformen bei unterschiedlichen Nahrungssituationen adäquat zu simulieren [77]. Derartige Vorschläge zur Simulation physiologischer Verhältnisse von Humanplasma sind an gleicher Stelle nicht zu finden. Inwiefern es das Ziel sein muss die *in-vivo* Bedingungen möglichst genau abzubilden hängt indes auch vom Zweck der Freisetzungsversuche ab. In der Regel ist dies entweder die Qualitätskontrolle zur Herstellung gleichbleibender Chargen eines Arzneimittels innerhalb gesetzter Grenzen oder eine pharmakokinetische Charakterisierung der Arzneiform [74, 75]. Für ersteres ist es vor allem essentiell, dass die gewählte Methode die Unterschiede zwischen verschiedenen Chargen ausreichend genau darstellen kann, um daran die Einhaltung der für die gleichbleibende Qualität aufgestellten Kriterien beurteilen zu können. Darüber hinaus sollte eine reproduzierbare Ausführung der Methode als Routinetätigkeit gegeben sein, worauf auch die Konventionen in den Arzneibüchern abzielen, die neben den empfohlenen Medien auch entsprechende Apparaturen für verschiedene Arzneiformen umfassen. Gleichwohl ist zu beachten, dass man dazu angehalten ist die Empfehlungen jeweils an die durch den Applikationsmodus gegebenen Bedingungen anzupassen. Ist der

Zweck, wie in dieser Arbeit, die pharmakokinetische Charakterisierung, ist ein weit höherer Aufwand zur Imitation physiologischer Zustände als in Routineuntersuchungen gerechtfertigt [74, 75], da es das Ziel ist grundsätzliche Erkenntnisse zur Entwicklung beziehungsweise Weiterentwicklung der vorliegenden Arzneiform zu gewinnen.

Eine Anpassung des Mediums an die lokalen Gegebenheiten einer systemischen Freisetzung sollte aus oben genannten Überlegungen heraus allen voran den hohen Proteinanteil einbeziehen. Eine Verwendung eines mit Albumin versetzten Puffers erschien, wie auch spätere Zellkulturversuche zeigen sollten (*siehe Abschnitt 5*), jedoch nicht als ausreichende Simulation der *in-vivo* Verhältnisse, da dies der Komplexität der Zusammensetzung des Humanplasmas nicht gerecht würde und auch Stabilitäts- und Metabolisierungseffekte außer Acht gelassen hätte. Ein Abbau der Substanzen zu besser wasserlöslichen Abkömmlingen als es die Ausgangsstoffe sind, vermochte möglicherweise einen zusätzlichen Einfluss auf die Freisetzung zu haben und würde zudem die *in-vivo* Bedingungen wesentlich besser abbilden [78]. Dies schien angesichts des bis zu 100-fachen Unterschieds in den literaturbekannten Wasserlöslichkeiten der beiden Prodrugs DXA und BDP im Vergleich zu ihren Metaboliten plausibel [72] (*siehe auch Abschnitt 8 im Tabellarischen Anhang in Teil D*).

Nahe lag es daher Humanplasma als FreisetzungsmEDIUM einzusetzen und die Versuche somit als *ex-vivo* Ansatz durchzuführen. Den nach Ph.Eur.8.5 kritischen und die Qualität eines Mediums betreffenden Parametern, wie ein konstanter pH-Wert, gleichbleibende Zusammensetzung, mikrobieller Befall und in erster Linie der Einhaltung von Sink-Bedingungen über die gesamte Versuchsdauer wurde bei der Durchführung Rechnung getragen und gegebenenfalls kontrolliert. Wert wurde insbesondere auf die Löslichkeitsverhältnisse in Humanplasma gelegt, da Literaturangaben hierzu praktisch nicht zu finden waren.

2.2 Bestimmung der Aufnahmekapazität des Humanplasmas für Glucocorticoide

Ein wichtiges Kriterium zur korrekten Durchführung eines Freisetzungsversuchs ist im Allgemeinen die Gewährleistung von Sink-Bedingungen [75, 78]. Dies mittels Einsatz entsprechend hoher Mengen des ursprünglich als Spenderplasma gedachten Humanplasmas in einer Größenordnung um 1000 mL oder über mehrfachen Wechsel des Mediums während der gesamten Versuchsdauer sicherzustellen, wäre in den eigenen Tests zur Freisetzung von Glucocorticoiden aus LTSC schon aus ethischen Gründen nicht tragbar gewesen. Vielmehr musste sich auf die Verwendung weniger Milliliter Humanplasma beschränkt werden, was angesichts der geringen Dosierung in der vorliegenden Arzneiform (*siehe Abschnitt 1.3*) und der zu erwartenden langsamen Freisetzung auch möglich schien. Eine experimentelle Kontrolle war mangels vorliegender

Literaturdaten aber dennoch angezeigt. Aus diesem Grund wurden Versuche unternommen die Kapazität von Humanplasma zur Aufnahme der drei untersuchten Glucocorticoide DXA, GCX und BDP zu bestimmen.

An dieser Stelle soll bewusst nicht von Löslichkeit gesprochen werden, da dieser Begriff die Sättigungslöslichkeit einer reinen Substanz in einem ebenfalls reinen Medium beschreibt, also streng genommen die maximale Substanzmenge, die in einem reinen Medium ohne weitere Zusätze bei definierter Temperatur und Druck tatsächlich frei gelöst vorliegen kann [79]. Die echte Löslichkeit in Humanplasma wäre damit wohl der reinen Wasserlöslichkeit ähnlich. Dabei von Löslichkeit zu sprechen wäre aber schon aufgrund des Wesens des Plasmas als komplexes Vielstoffgemisch nicht korrekt. Mit den eigenen Versuchen wurde deshalb untersucht, welche Substanzmengen von Humanplasma insgesamt in nicht-partikulärer Form aufgenommen werden konnte, was neben dem tatsächlich gelösten Anteil auch den Abbau der freigesetzten Arzneistoffe zu Stoffderivaten unterschiedlicher Wasserlöslichkeit mit einbezog, sowie die Bindung aller entstandenen Substanzen an Plasmaproteine. Im weiteren Verlauf wird daher (wie in der Überschrift dieses Abschnitts bereits vorweg genommen) von der Aufnahmekapazität von Humanplasma für die untersuchten Glucocorticoide gesprochen.

Definitionsgemäß beziehen sich Sink-Bedingungen nach Ph.Eur.8.5 auf die Löslichkeit einer Substanz in einem Medium. Sie werden als gegeben angesehen, wenn das Volumen des Mediums die Sättigungslöslichkeit um mindestens das Drei- bis Zehnfache übersteigt. In der Praxis wird auch von Sink-Bedingungen gesprochen, wenn löslichkeitsbeeinflussende Additive wie Tenside zu einem Medium zugegeben werden [74]. Da Proteine die Aufnahmekapazität des Humanplasmas als Medium im Sinne eines zweiten Kompartiments erhöhen, sollte die Bindung der Glucocorticoide an Plasmaproteine bei der Beurteilung vorliegender Sink-Bedingungen in Humanplasma einbezogen werden.

2.2.1 Entwicklung und Versuchsprinzip des Dialyseverfahrens

Der Versuch die maximale Aufnahmekapazität des Humanplasmas für Glucocorticoide zu bestimmen kommt, den im vorangestellten Abschnitt 2.2 dargelegten Begriffsklärungen zum Trotz, aus praktischer Sichtweise einer Löslichkeitsbestimmung gleich. Die am weitesten verbreitete Methode dazu ist die Schüttelmethode, bei der die Substanz deren Löslichkeit bestimmt werden soll, im Überschuss als Feststoff zum Medium gegeben und geschüttelt oder gerührt wird, bis sich ein Gleichgewicht zwischen überschüssigem Feststoff und Substanz in Lösung eingestellt hat, meist über 24 Stunden. Der gelöste Anteil wird aus einer Probe des Mediums bestimmt und dabei auf die vorige Abtrennung des ungelösten Feststoffes geachtet. Eine vollständig einheitliche Vorgehensweise für die Löslichkeitsbestimmung hat sich indes bislang nicht durchgesetzt. Die Abtrennung der

ungelösten Partikel wird meist durch Filtration mittels engmaschigem Filter erreicht, andere Methoden sind Sedimentation oder Zentrifugation [79-81].

Die einfache Schüttelmethode eignete sich für die hier angestrebte Untersuchung nicht, da zum einen die Eigenschaften der Glucocorticoide zur Aggregatbildung mit der Folge verzögerten in Lösung Gehens und deren stark ausgeprägte Neigung zur Adsorption an Filtermaterialien problematisch waren [58, 82]. Die zuverlässige Abtrennung mikropartikulären Feststoffes mittels gängiger Filter stellt zusätzlich ein generelles Problem dieser Methode dar und scheint oftmals zu einer Überschätzung der tatsächlichen Löslichkeit zu führen [81]. Insbesondere jedoch die Verwendung von Humanplasma als Medium brachte Hürden bei der Versuchsdurchführung mit sich, die vor allem in der zuverlässigen Abtrennung des überschüssigen und ungelösten Feststoffes nach Gleichgewichtseinstellung lagen. So eignete sich dazu weder eine Filtration des Mediums, da das Plasma die zur Abtrennung kleiner Partikel nötigen engmaschigen Filter mit Porengrößen zwischen 0,1 und 0,45 μm , also gängige Sterilfilter-Einheiten, sofort verschließt und eine Filterblockade die Folge ist. Eine Sedimentation ist aufgrund des sehr langen Absetzens der Partikel als äußerst unpraktisch zu bewerten, was, wie bei der Filterblockade, auf die hohe Viskosität des Mediums zurückzuführen ist. Dieses zeitliche Problem könnte mittels Zentrifugation behoben werden, führte dieses Verfahren nicht schon bei niedrigen Umdrehungszahlen zur Phasentrennung des Vielstoffgemisches Humanplasma, wobei sich vor allem eine separate Lipidphase abzeichnete. Eine einfache Gewinnung einer homogenen Probe aus dem nach Zentrifugation resultierenden Überstand war damit kaum möglich.

Die aufgeführten Unwägbarkeiten führten dazu, dass die Wahl der Methode auf die Dialyse fiel, die ebenfalls ein bekanntes Verfahren zur Löslichkeitsbestimmung darstellt [82, 83]. Dies brachte den Vorteil, dass eine Abtrennung des partikulären Feststoffes durch das Verfahren selbst von vornherein gegeben war. Mit der Wahl eines MWCO (*molecular weight cutt-off*) der Dialysemembran von 300 kDa wurde der Porengrößenbereich der Ultrafiltration adressiert, der eine Diffusion der Plasmaproteine, allen voran des ~66 kDa großen Albumins, über die Membran zulassen [84, 85] und dabei dennoch bei einer Porengröße von $<0,1 \mu\text{m}$ für eine zuverlässige Abtrennung ungelöster Partikel sorgen sollte (*siehe Abb. 12*). Die Glucocorticoide, die im Inneren der Dialyseeinheit aus den ungelösten Feststoffpartikeln in Lösung gingen und an Plasmaproteine banden, standen so über die Membran im Austausch mit dem Plasma im äußeren Dialysegefäß mit samt dessen Glucocorticoid-freien Proteinen. Ein Gleichgewichtszustand, der bei nach wie vor vorhandenem überschüssigem Feststoff im Inneren der Dialyseeinheit der Plasmasättigung entsprach, konnte so innerhalb weniger Tage erreicht werden und die Bestimmung der maximalen Aufnahmekapazität des Humanplasmas für Glucocorticoide aus dem Humanplasma im äußeren Dialysegefäß direkt bestimmt werden.

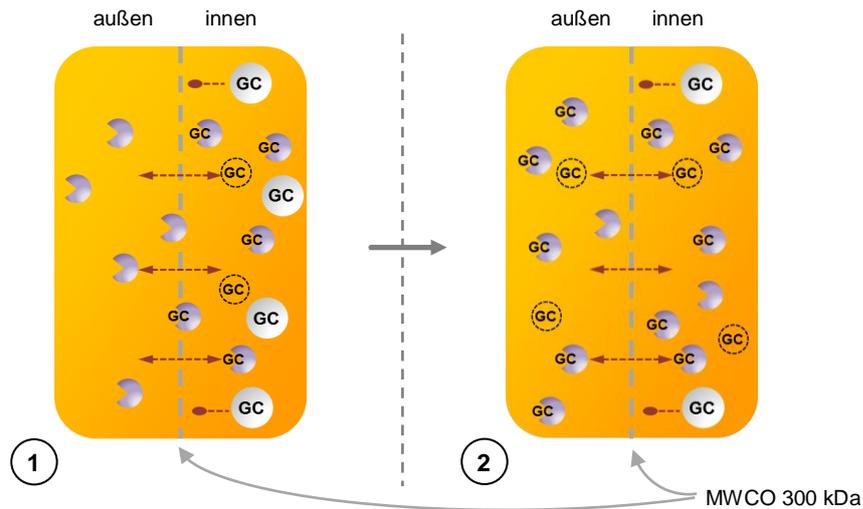


Abb. 12: Schema des Versuchsprinzips zur Bestimmung der Aufnahmekapazität des Humanplasmas mittels Dialyse. Der MWCO (*molecular weight cut-off*) der Dialysemembran wurde mit 300 kDa so gewählt, dass gelöste Glucocorticoide (GC, farbloser Kreis) und Plasmaproteine (violette Kreissegment) die Membran passieren konnten, ungelöste Feststoffpartikel (GC, weißer Kreis) jedoch zurückgehalten wurden. Durch den Austausch proteingebundener Glucocorticoide sollte so eine rasche Gleichgewichtseinstellung auf beiden Seiten der Membran erfolgen und nach Probenzug aus dem Plasmakompartiment auf der Außenseite der Membran keine zusätzliche Abtrennung ungelöster Feststoffpartikel nötig sein, da sich letzteres vor allem aufgrund der hohen Viskosität des Humanplasmas als schwierig herausstellte. Lagen also zu Beginn des Dialyseverfahrens (1) die Glucocorticoide in gelöster, proteingebundener und fester Form ausschließlich auf der Innenseite vor, sollte über die Dialysezeit von wenigen Tagen ein Austausch der gelösten und insbesondere der an das ~66 kDa große Albumin gebundenen Arzneistoffe mit dem Plasma auf der Außenseite erfolgen. Die Einstellung eines Fließgleichgewichts zwischen den beteiligten Substanzen auf beiden Seiten (2) sollte aufgrund des nach wie vor überschüssigen Feststoffes auf der Innenseite sogleich die Plasmasättigung bedeuten.

Die Verwendung vorgefertigter Dialyseeinheiten des Typs Float-A-Lyzer[®] G2 ermöglichte die Einwaage des Feststoffes direkt in den Dialyseschlauch und erlaubte den Einsatz kleiner Substanzmengen sowie eines geringen Volumens des Humanplasmas von wenigen Millilitern (*siehe Abb. 13*). Um die Einwaage der kleinen Mengen an Glucocorticoid zu erleichtern und um eine rasche Aggregatbildung der Glucocorticoide nach Zugabe des Humanplasmas zu vermeiden, wurden diese ausgehend von einer zuvor hergestellten 5 % Verreibung in Glucose zugegeben. Ein zusätzlicher Einfluss der Glucose als ohnehin im Plasma vorkommender Substanz auf die Löslichkeit der Glucocorticoide wurde nicht vermutet. Nach Auffüllen der Dialyseeinheit mit Humanplasma wurde diese verschlossen und der Feststoff durch kurzes Schütteln im Medium verteilt, bevor sie in das äußere Dialysegefäß eingebracht wurde, das bereits mit Glucocorticoid-freiem Humanplasma befüllt war. Die gesamte Anordnung wurde sodann bei konstanten 37 °C bis zur Einstellung eines Gleichgewichtes der Glucocorticoid-Konzentration auf beiden Seiten der Dialysemembran gerührt (*für eine ausführliche Beschreibung der Versuchsdurchführung siehe auch Abb. 13 und Abschnitt 2.7 im Experimentellen Teil C*).

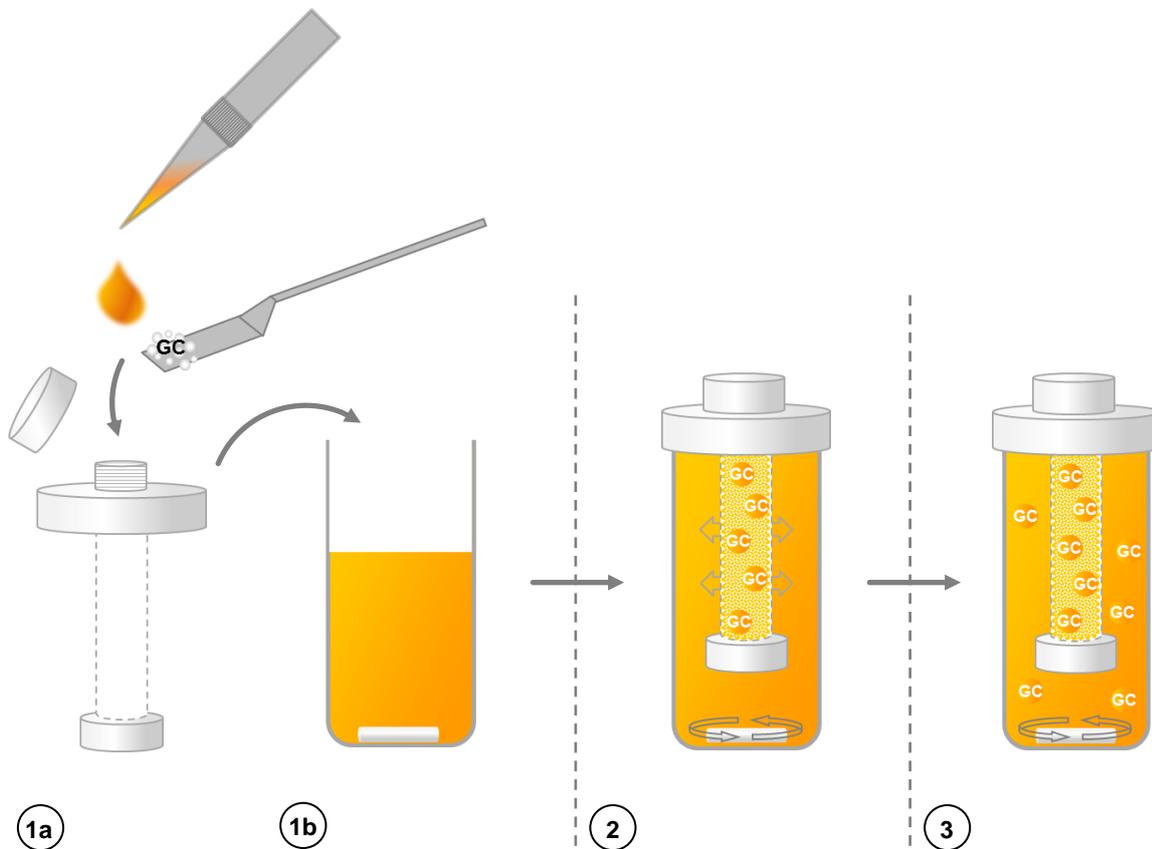


Abb. 13: Schema der Versuchsanordnung zur Bestimmung der Aufnahmekapazität des Humanplasmas für Glucocorticoid mittels Dialyse. Die Dialyseeinheit (1a, „Float-A-Lyzer G2“) wurde mit Humanplasma befüllt, welches zuvor mit Glucocorticoid gesättigt wurde. In das Dialysegefäß (1b) wurden Glucocorticoid-freies Humanplasma und ein Magnetrührstab vorgelegt. Anschließend wurde die Dialyseeinheit mit dem Gefäß zusammengeführt (2), mittels Schraubkappe und Parafilm zur Verhinderung von Verdunstungsverlusten abgedichtet und mit der Inkubation bei 37 °C unter stetiger Rührbewegung mittels Magnetrührer begonnen. Dabei diffundierten aus der gesättigten Dialyseeinheit gelöste und an Plasmaproteine gebundene Glucocorticoide in das Humanplasma im Dialysegefäß. Die Porengröße der Membran der Dialyseeinheit war mit 300 kDA so gewählt, dass eine Permeation für Plasmaproteine gegeben war, jedoch möglichst nicht für ungelösten Feststoff. Der ungelöste Überschuss an Arzneistoff in der Dialyseeinheit gewährleistete eine ständig gesättigte Lösung und Proteinbindung im Inneren, so dass sich die Glucocorticoid-Konzentration beziehungsweise Proteinbindung auf der Außenseite mit zunehmender Versuchsdauer ebenfalls der Sättigung und damit der Einstellung eines Fließgleichgewichtes näherte (3). Die Messung erfolgte sodann anhand von Proben aus dem Plasma des Dialysegefäßes nach drei (DXA und BDP) beziehungsweise fünf (GCX) Tagen Inkubation und bildete die maximale Aufnahmekapazität des Mediums ab, die sich im Wesentlichen aus der Wasserlöslichkeit und der Plasmaproteinbindung zusammensetzen sollte. Für alle Versuche wurde ein Humanplasma-Pool aus drei Spendern verwendet.

2.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Untersuchung der Aufnahmekapazität des Humanplasmas ergab für DXA nach drei Tage langer Inkubationszeit $40,2 \pm 4,8 \mu\text{g/mL}$ ($n=3$, CI 95 %). Der Wert setzt sich zusammen aus den beiden Abbauprodukten DX und 17-Oxo-DX, die im Humanplasma

innerhalb dieses Zeitraums aus DXA entstanden (*für weitere Informationen zu 17-Oxo-DX siehe Abschnitte 2.3 und 7*). Erwartungsgemäß machte DX mit $37,5 \pm 4,4 \mu\text{g/mL}$ den größten Teil der Gesamtkonzentration aus, wohingegen kein DXA analysiert wurde (*siehe Abb. 14*).

Die aus all seinen Abbauprodukten zusammengesetzte Gesamtkonzentration des nach drei Tagen aufgenommenen BDP lag bei $10,7 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$. Hierbei wurden vor allem BOH und B-17-P mit $4,7 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$ und $3,9 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$ nachgewiesen, daneben auch geringe Mengen an B-21-P, BDP und 9,11-Epoxy-BOH (*für weitere Informationen zu 9,11-Epoxy-BOH siehe Abschnitte 2.3 und 7*).

Die Aufnahmekapazität des Humanplasmas wurde für GCX mit $1,3 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ nach drei Tage langer Dialyse gemessen und zeigte nach zwei weiteren Tagen mit $1,6 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ keinen signifikanten weiteren Anstieg der Plasmakonzentration. Abbauprodukte wurden für GCX nicht beobachtet.

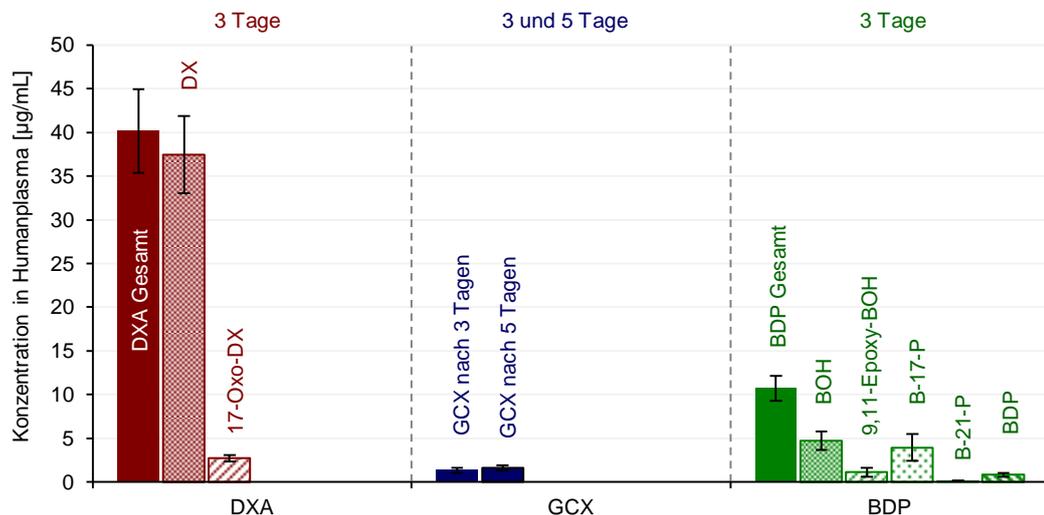


Abb. 14: Ergebnisse der Messungen der Aufnahmekapazität von Humanplasma für die Glucocorticoide DXA, GCX und BDP. Während DXA und BDP erwartungsgemäß während der drei Tage langen Dialyse zu verschiedenen Abkömmlingen der Muttersubstanzen abgebaut wurden, welche die Aufnahmekapazität maßgeblich bestimmten, wurden für GCX keine Abbauprodukte beobachtet werden. Die Kapazität von $1,6 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ ging damit ausschließlich auf die Aufnahme von GCX selbst zurück. DXA wurde insgesamt zu $40,2 \pm 4,8 \mu\text{g/mL}$ aufgenommen, wobei mit $37,5 \pm 4,4 \mu\text{g/mL}$ größtenteils DX gemessen wurde. Für BDP konnte ein Gesamtwert von $10,7 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$ ermittelt werden, setzte sich jedoch in erster Linie aus $4,7 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$ BOH und $3,9 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$ B-17-P zusammen. Abweichungen CI 95 %, n= 6.

Aufgrund der Instabilität von DXA und BDP im Humanplasma konnte selbst nach einer Dialysedauer von drei Tagen nicht von einer Einstellung eines vollständigen Fließgleichgewichts zwischen beiden Seiten der Dialysemembran für diese beiden Substanzen ausgegangen werden. Eine Gleichgewichtseinstellung, und damit die Aufnahmekapazität für DXA und BDP, war daher in jedem Fall im Zusammenhang mit

deren Abbau zu den verschiedenen, in der Regel erheblich besser wasserlöslichen Abkömmlingen zu beurteilen. Die Aufnahmekapazität hing also von dem Ausmaß ab, in dem die Ausgangssubstanzen abgebaut wurden und aus den entstandenen Derivaten wiederum neue Substanzen gebildet wurden. Letztlich ist sie damit ein stark zeitabhängiger Prozess, dessen Endzustand durch die Art der unternommenen Versuche nicht abgebildet werden konnte. Dazu hätte es wohl weit längerer Versuchszeiten als der gewählten drei Tage bedurft, was in erster Linie den langsamen Reaktionen zu den späten Abbauprodukten 17-Oxo-DX und 9,11-Epoxy-BOH geschuldet gewesen sein dürfte (*auf die Entstehung dieser beiden Substanzen soll an späterer Stelle noch ausführlicher eingegangen werden, siehe dazu Abschnitte 2.3 bis 2.5 und Abschnitt 7*). Ob des ständigen Abbaus wurden die Ausgangssubstanzen DXA und BDP somit fortwährend aus der Lösung entfernt, was wohl eine andauernde Auflösung weiteren Feststoffs dieser Prodrugs zuließ. Selbst kleine Mengen DXA waren nicht nachweisbar, da das Prodrug rasch zu seiner aktiven Form DX umgesetzt wurde. Dies ließ den Schluss zu, dass eine mangelnde Aufnahmekapazität oder Löslichkeit von DXA keine Rolle als limitierender Faktor für einen Freisetzungsversuch in Humanplasma spielen sollte. BDP konnte zwar in einiger Menge nachgewiesen werden, die Vielzahl der Abbauprodukte und deren hohes Vorkommen legten aber dennoch den gleichen Schluss nahe wie für DXA. Demnach sollte die schnell verlaufende Metabolisierung unter Esterspaltung, für die *in-vivo* Halbwertszeiten zwischen $0,1$ und $0,5 \text{ h}^{-1}$ beobachtet wurden [49, 86], Anlass dazu geben, dem BDP selbst keine entscheidende einschränkende Rolle für einen Freisetzungsversuch beizumessen. Ob seiner Stabilität in Humanplasma stellte sich die Beurteilung der Aufnahmekapazität von GCX weit weniger komplex dar und hing nicht von weiteren Reaktionen ab. Die Werte nach drei und fünf Tagen Dialysedauer unterschieden sich nicht signifikant, weshalb von einer Einstellung des Fleißgleichgewichtes über die Dialysemembran auszugehen war. Die Stabilität mag auch ein Grund für die, gegenüber den beiden anderen Glucocorticoiden, weit niedrigere maximale Plasmakonzentration gewesen sein. Diese waren aber noch immer weit über der Wasserlöslichkeit von GCX angesiedelt [44], was auf einen starken Einfluss der Plasmaproteine als zusätzliches Akzeptorkompartiment hindeutete. Insgesamt ließ sich für GCX eine eindeutigere Einschätzung von Sink-Bedingungen in den nachfolgenden Freisetzungsversuchen vornehmen, als für DXA und BDP.

Da die Höhe der gelösten Menge für DXA und BDP eine Momentaufnahme des Ausmaßes der Metabolisierung zu sein schien, hätte eine Analyse weiterer Proben nach fünf Tagen Dialysedauer hier voraussichtlich keinen weiteren Erkenntnisgewinn zur Beurteilung von Sink-Bedingungen in den nachfolgenden Freisetzungsversuchen bedeutet. Auf eine längere Versuchsdurchführung mit beiden Substanzen wurde deshalb verzichtet. In Bezug auf die Gesamtsummen aller Abbauprodukte für DXA und BDP und unter Vernachlässigung der oben geschilderten, der Metabolisierung geschuldeten Auflösung weiteren Feststoffs, durfte dennoch sicherlich in etwa von gleichen Mengen der Glucocorticoide auf beiden Seiten der Dialysemembran ausgegangen werden und die

Versuchszeit somit als ausreichend bewertet werden. Diese Einschätzung wird durch die Ergebnisse von GCX und durch literaturbekannte Versuchsanordnungen unterstützt, bei denen bereits nach ein bis zwei Tagen von einer Gleichgewichtseinstellung zwischen beiden Seiten der Dialysemembran ausgegangen wird [80, 82]. Die Äquilibrationszeit gilt auch bei andersartigen Löslichkeitsversuchen als kritischer Einflussfaktor [81] und ist sicherlich nicht als nachteiliger Aspekt des Dialyseverfahrens anzusehen. Dass die gewählte Porengröße der Dialysemembran für eine gute Abtrennung ungelösten Feststoffes sorgte war anzunehmen, da andernfalls hohe Mengen DXA beziehungsweise BDP nachzuweisen gewesen wären und die gemessenen Werte zudem nur geringe Schwankungsbreite zeigten. Der MWCO von 300 kDa ließ dennoch, wie geplant, eine Diffusion der Plasmaproteine zu. Dies belegten die Werte für GCX, die deutlich über dessen reiner Wasserlöslichkeit lagen [44]. Unsicher blieb indes, ob es einer Fraktion großer Proteine nicht möglich war die Membran zu passieren. Gemäß diesem Fall würden die ermittelten Ergebnisse allerdings zu einer Unterschätzung der tatsächlichen Aufnahmekapazitäten führen und Sink-Bedingungen in den Freisetzungsversuchen somit im Zweifelsfall eher ablehnen lassen.

Das primäre Ziel des Versuchs die Aufnahmekapazität des Humanplasmas für die drei Substanzen DXA, GCX und BDP zu testen, um Sink-Bedingungen als Grundvoraussetzung für die korrekte Durchführung der nachfolgenden Freisetzungsversuche beurteilen zu können, wurde aufgrund der geschilderten Überlegungen erreicht. Gerade die Ergebnisse zu GCX belegen den funktionierenden Versuchsaufbau. Generell bleibt festzuhalten, dass die Ergebnisse der eigenen Versuche schon aufgrund interindividueller Unterschiede in der Zusammensetzung des aus Spenderblut gewonnen Humanplasmas freilich nicht als feste Größen zu bewerten sind. So ist wohl trotz der Verwendung eines Plasma-Pools aus mindestens drei Spendern (*siehe Abschnitt 2.7 im Experimentellen Teil C*) mit einer gewissen Variabilität des Mediums zu rechnen. Da derartige Untersuchungen in Humanplasma nach derzeitigem Kenntnisstand ein Novum darstellen, können sie dennoch wichtige Anhaltspunkte für die Durchführung von *ex-vivo* Freisetzungsversuchen mit humanem Plasma liefern oder als Grundlage für die Entwicklung weiterer Versuchsansätze zur Einschätzung vorliegender Versuchsbedingungen hilfreich sein. Darüber hinaus belegten die Ergebnisse im Einklang mit früheren Erkenntnissen [58], dass die Anwesenheit von Proteinen in einem Medium einen Einfluss auf die Löslichkeitsverhältnisse nehmen kann, was bei der Simulation von *in-vivo* Verhältnissen berücksichtigt werden sollte. Die Beurteilung von Sink-Bedingungen in den Freisetzungsversuchen in Humanplasma kann naturgemäß erst im Kontext der Freisetzungsversuche selbst diskutiert werden (*siehe Abschnitt 2.5*).

2.3 Freisetzung der Glucocorticoide in Humanplasma

Wie unter Abschnitt 2.1 einleitend erläutert, lag das Ziel der Versuche darin, durch die Verwendung von Humanplasma als Medium die *in-vivo* vorherrschenden Bedingungen für die Freisetzung der Glucocorticoide aus LTSC möglichst gut zu simulieren. Ob der limitierten Verfügbarkeit des Humanplasmas und des ethischen Umgangs mit demselben, wurden die Freisetzungsversuche in nur 25 mL Medium durchgeführt und auch auf einen vollständigen Mediumwechsel während des Versuchs verzichtet. In Form entsprechender Vorversuche wurde den Löslichkeitsverhältnissen aus diesem Grund besondere Aufmerksamkeit zuteil (*siehe voriger Abschnitt 2.2*). Als Versuchsdauer wurden 28 Tage festgelegt um einen ausreichenden Zeitraum für eine initiale Freisetzung aus der Polymermatrix bis zur Bildung einer fibrösen Hülle um die Elektroden Spitze abzugreifen, die *in-vivo* je nach Patient interindividuell wohl in einem Zeitraum von ein bis vier Wochen nach der Implantation entsteht (*für nähere Informationen hierzu siehe auch 1.2.5 der Einleitung in Teil A und Abschnitt 4.1*). Um einen mikrobiellen Befall des Mediums während dieser langen Versuchszeit zu verhindern, wurde das Plasma steril eingesetzt und generell auf die strikte Einhaltung aseptischer Bedingungen während der gesamten Versuchsdurchführung geachtet. Zusätzlich wurden dem Medium Penicillin und Streptomycin zugesetzt und im Laufe der Versuchszeit kontinuierlich erneuert (*siehe Abb. 15*). Da die ständige Auffrischung der Antibiose eine merkliche Verdünnung des Humanplasmas bedeutet hätte und ein gleichbleibendes Medium über die Versuchszeit somit nicht gegeben gewesen wäre, wurde das Humanplasma von Beginn an im Verhältnis 4+1 mit antibiotikahaltigem Phosphatpuffer bei pH 7,4 verdünnt. Zu den sieben zuvor festgelegten Probenzeitpunkten nach einem, zwei, fünf, zehn, 15, 21 und 28 Tagen wurde das entnommene Volumen durch frisches Medium ersetzt, welches sogleich die entsprechende Antibiotikadosis für den 25 mL großen Ansatz enthielt. Dies gewährleistete fortwährend konstantes Volumen und Zusammensetzung des Mediums aus vier Teilen Humanplasma und einem Teil Puffer inklusive Antibiotika. Die Auffrischung des Mediums hatte außerdem den Nebeneffekt, dass während der Versuchsdauer somit zumindest etwa 30 % des Mediums ausgetauscht wurden.

Kontrolliert wurden zu jedem Probenzeitpunkt über den gesamten Versuchszeitraum der pH-Wert und der Gesamtproteingehalt des Mediums, da diese, wie bereits unter Abschnitt 2.1 erläutert, als für die Freisetzung kritische Parameter erachtet wurden. Die Kontrolle des Proteingehaltes wurde mittels Bradford-Assay durchgeführt, welcher auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine durch einen bislang nicht genau geklärten Bindungsmodus vor allem an die Aminosäure Arginin beruht. Die Proteinbindung verursacht eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 zu 595 nm, wodurch die Proteinmenge photometrisch quantifiziert werden kann [87]. Vorteilhaft an dieser Methode ist, neben der einfachen Durchführung, das geringe nötige Probenvolumen und die damit verbundene Möglichkeit den Test im

96-Well-Format durchführen zu können, was die gleichzeitige Bearbeitung einer Vielzahl von Proben zulässt [88]. Der Assay ist darüber hinaus sensitiver als andere bewährte Methoden wie der Lowry-Assay und wird anders als der Biuret-Assay, auf dem der Lowry-Assay beruht, wenig durch die Anwesenheit von Phospholipiden gestört [89]. Zweck der Kontrolle war indes nicht die exakte Bestimmung des absoluten Proteingehalts des Humanplasmas, sondern die relative Gleichheit des Proteingehaltes von Anfang bis Ende des Versuchs.

Da Humanplasma als biologisches Produkt in seiner Zusammensetzung naturgemäß einigen Schwankungen unterworfen ist, wurde ein Plasmapool von drei verschiedenen Spendern gebildet, um Variationen des Mediums zwischen verschiedenen Wiederholungen des Freisetzungsversuchs weitestgehend ausschließen zu können. Generell wurde darauf geachtet, dass innerhalb eines Versuchsansatzes für alle drei zu untersuchenden Glucocorticoide auf denselben Plasmapool zurückgegriffen wurde, was zusätzlich gleiche Voraussetzungen für alle drei Substanzen sicherstellte. Als Apparatur wurde ein Orbitalschüttler gewählt, der durch Schütteln bei 100 U/min für eine stetige Konvektion des gesamten in Glaskolben untergebrachten Mediums sorgte und zur Temperierung aller Ansätze auf physiologische 37 °C vollständig im Inkubator betrieben werden konnte. Die LTSC wurden zu Beginn der Inkubationszeit mit einem Stift aus Edelstahl beschwert zum Medium gegeben, um ein Aufschwimmen der Silikonmatrices zu verhindern (*siehe Abb. 15*). Der Glucocorticoid-Gehalt des Mediums wurde anhand der gezogenen Proben mittels HPLC analysiert und dabei die Verdünnung durch die Erneuerung des Mediums rechnerisch berücksichtigt. Zudem wurde der Restgehalt der verwendeten LTSC ermittelt, um die gemessenen Freisetzungen auf Plausibilität zu prüfen (*für eine ausführliche Beschreibung der Versuchsdurchführung siehe Abschnitt 2.2 im Experimentellen Teil C*).

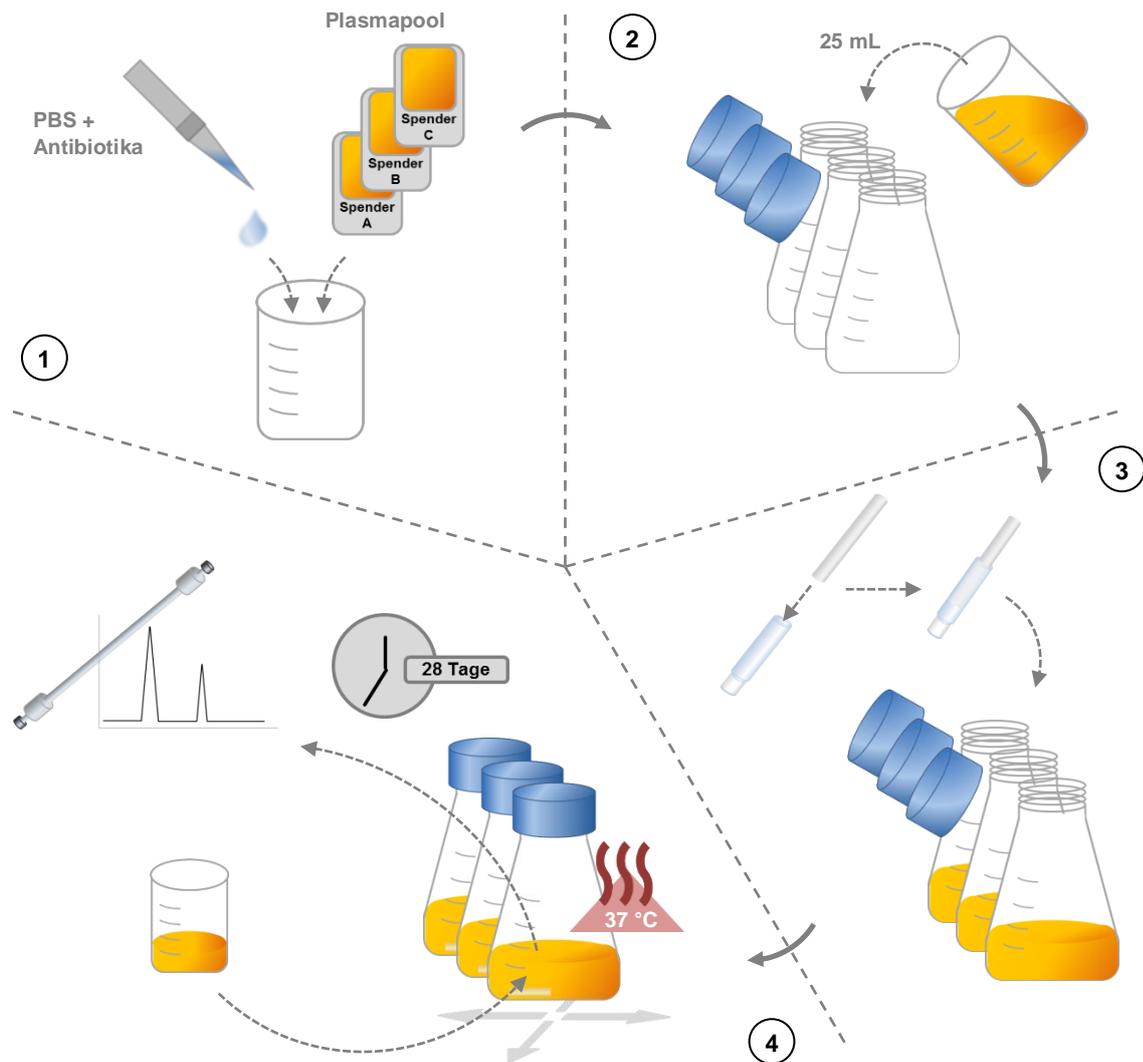


Abb. 15: Schema des Ablaufs der Freisetzung in humanem Plasma. Das als Medium verwendete Humanplasma wurde aus drei verschiedenen Spenderplasmen gepoolt und im Verhältnis 4+1 mit antibiotikahaltigem Phosphatpuffer (PBS) gemischt (1). Innerhalb eines Ansatzes wurden für alle Glucocorticoide 25 mL desselben Plasmapools eingesetzt (2). Die LTSC wurden vor ihrer Zugabe zum FreisetzungsmEDIUM mit einem Sinkern aus Edelstahl versehen, um ein Aufschwimmen der Untersuchungsgegenstände zu verhindern (3). Die Freisetzung wurde sodann über 28 Tage bei 37 °C im Inkubator unter Schütteln auf einem Orbitalschüttler durchgeführt, wobei Proben jeweils nach einem, zwei, fünf, zehn, 15, 21 und 28 Tagen gezogen wurden und das entnommene Volumen durch frisches antibiotikahaltiges Medium ersetzt wurde (4). Dies gewährleistete zum einen die Aufrechterhaltung der Antibiose und sorgte zum anderen für den Austausch von etwa 30 % des Mediums. Die Freisetzung wurde vollständig unter aseptischen Bedingungen durchgeführt, um weithin einem mikrobiellen Befall des Mediums vorzubeugen. Die Analyse des Glucocorticoid-Gehaltes der gewonnenen Proben erfolgte mittels HPLC, ebenso wie die Analyse des Restgehaltes der Polymermatrices nach Ablauf der 28 Tage langen Versuchszeit. Das Medium wurde für gleichbleibende Freisetzungsbedingungen anhand des Proteingehaltes und des pH-Wertes über die gesamte Versuchszeit kontrolliert (nicht dargestellt). Sink-Bedingungen wurden in einem separaten Versuch überprüft (siehe Abschnitt 2.2).

2.4 Ergebnisse der Freisetzungsversuche in Humanplasma

Nach 28 Tagen wurden $8,8 \pm 1,6 \mu\text{g}$ ($n=6$, CI 95 %) DXA aus der Polymermatrix der Herzschrittmacherelektrode freigesetzt, entsprechend $3,3 \pm 0,6 \%$ des Gesamtgehalts (für Informationen zum Glucocorticoid-Gehalt der LTSC siehe auch Abschnitt 1.3). Auffällig war dabei, dass nach einem Tag mit $3,7 \pm 0,4 \mu\text{g}$ beziehungsweise $1,4 \pm 0,2 \%$ des Gesamtgehalts bereits etwas weniger als die Hälfte des letzten Messwerts nach 28 Tagen erreicht war. Im Freisetzungsprofil konnte innerhalb der zweiten Versuchshälfte dementsprechend kaum noch ein Anstieg beobachtet werden und schien auf ein allmähliches Abflachen der Freisetzung hinzuweisen (siehe Abb. 16).

Die Freisetzung der zweiten Testsubstanz GCX begann mit $2,0 \pm 0,3 \mu\text{g}$ nach einem Tag, entsprechend $1,2 \pm 0,3 \%$ des Gesamtgehalts, verglichen mit DXA langsamer. Am Ende der Versuchszeit konnten allerdings $10,8 \pm 0,5 \mu\text{g}$ GCX verzeichnet werden und überstieg die freigesetzte Masse an DXA sowohl absolut, als auch mit $6,5 \pm 0,3 \%$ in Bezug auf den Gesamtgehalt der Polymermatrix. Zudem zeigte das Profil im Gegensatz zu den DXA enthaltenden LTSC eine deutlich anhaltende Freisetzung über den letzten Messpunkt hinaus an.

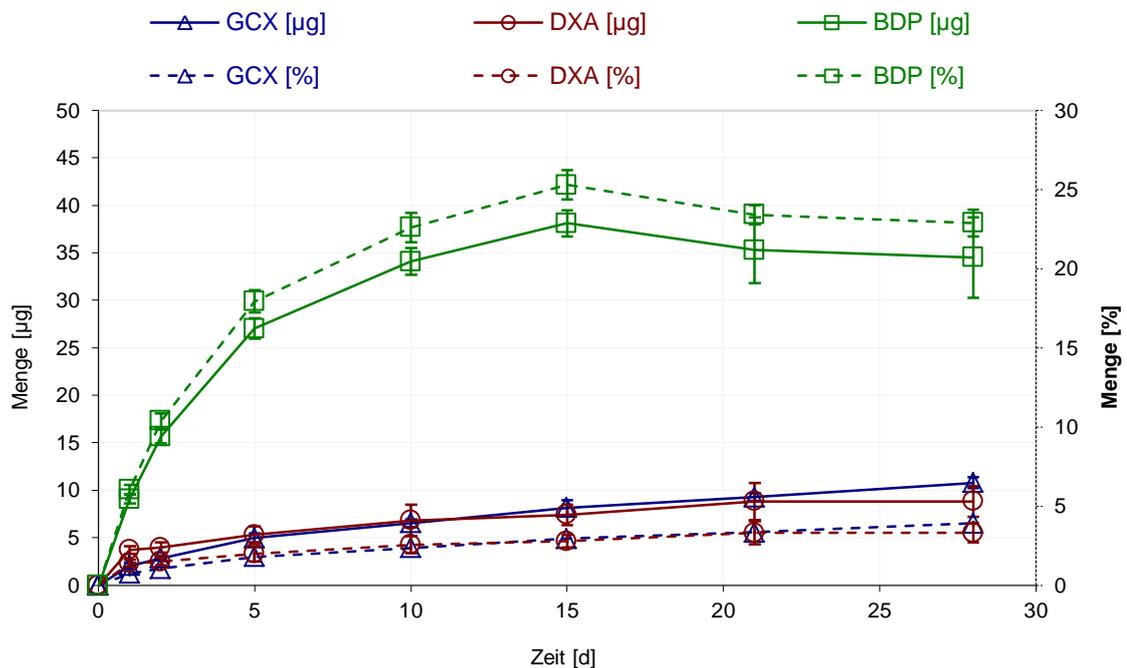


Abb. 16: Freisetzungsprofile der drei untersuchten Glucocorticoide DXA, GCX und BDP in Humanplasma über 28 Tage. Dargestellt sind die absolut freigesetzte Dosis in 25 mL Medium (linke y-Achse, durchgezogene Linie) und die prozentuale Menge des Gesamtgehaltes der Polymermatrix (rechte y-Achse, gestrichelte Linie). Während GCX über die gesamte Versuchszeit stabil war, wurden von DXA und BDP mehrere Abbauprodukte analysiert. Für DXA und BDP stellen die gezeigten Kurven daher jeweils die Summe aus allen gemessenen Abbauprodukten und den Ausgangssubstanzen dar. Abweichungen 95 % CI, $n=6$.

Lagen die absolut freigesetzten Mengen für DXA und GCX noch in vergleichbarer Höhe, so zeigte sich überraschenderweise eine demgegenüber wesentlich höhere Freisetzung für BDP in Humanplasma. Nach 28 Tagen Freisetzungsdauer wurden insgesamt $34,5 \pm 4,2 \mu\text{g}$ freigesetzten BDP gemessen, in Bezug auf den Gesamtgehalt somit $22,9 \pm 0,8 \%$. Dies stellte allerdings nicht den maximalen gemessenen Wert dar. Das Freisetzungsprofil zeigte nach 15 Tagen bereits eine Freisetzung von $38,1 \pm 1,4 \mu\text{g}$ beziehungsweise $25,3 \pm 0,9 \%$ an und fiel danach wieder ab (*siehe Abb. 16*). Schon zu Beginn des Versuchs konnten nach einem Tag $9,1 \pm 0,5 \mu\text{g}$ an aus der Matrix freigesetztem BDP und damit $6,0 \pm 0,3 \%$ des Gesamtgehalts ermittelt werden, was in etwa bereits den maximalen Messwerten an DXA oder GCX entsprach. Das abfallende Freisetzungsprofil des BDP deutete auf eine Instabilität der Substanz unter Bildung eines Abbauproduktes hin, das sich der Erfassung mittels HPLC entzog.

Die Analysen der Restgehalte aller eingesetzten LTSC bestätigten die gemessenen Werte. $98,0 \pm 1,4 \%$ des Gesamtgehaltes an DXA konnten noch aus der Polymermatrix nach Ablauf des Versuchs extrahiert werden und belegte damit die marginale Freisetzung der Substanz. Gleiches galt für GCX, von dem noch $92,4 \pm 2,4 \%$ in den LTSC gefunden wurden. Die dagegen hohe Freisetzung des BDP spiegelte sich in einem Restgehalt der Untersuchungsgegenstände von nur noch $58,9 \pm 1,6 \%$ wieder. Die Differenz des gefundenen Restgehalts zu dem anhand der Freisetzung zu erwartenden Wert betrug damit $\sim 18 \%$ des Gesamtgehalts und passte zu dem Verdacht eines durch die HPLC-Analyse nicht erfassten Abbauproduktes. Dies konnte schon durch die abfallende Freisetzungskurve in der zweiten Hälfte des Versuchs gemutmaßt werden.

Die dargelegten Werte beziehen sich in den Fällen des DXA und des BDP auf die insgesamt freigesetzten Mengen der als Prodrug eingesetzten Arzneistoffe und spiegeln daher jeweils die Summen aller den Substanzen zuzuordnenden Abbauprodukte wieder. Die Gesamte Menge gefundenen DXA bestand somit aus Dexamethason (DX) sowie überraschenderweise aus einem weiteren Abbauprodukt, das als 17-Oxo-Dexamethason (17-Oxo-DX) identifiziert wurde (*siehe Abb. 17*). Letzteres nahm über die gesamte Versuchszeit hinweg deutlich zu und machte einen immer größer werdenden Anteil an der Gesamtmenge freigesetzten DXA aus. Zur Quantifizierung des Abbauproduktes war es erforderlich die Reinsubstanz für einen Einsatz als Referenzsubstanz zur Verfügung zu haben. Diese wurde daher zusätzlich in Eigenarbeit hergestellt (*für nähere Informationen zu Identifikation und Herstellung des 17-Oxo-DX siehe Abschnitt 7*). Nur kleine, aber konstante Mengen an nicht abgebautem DXA wurden zu den jeweiligen Zugzeitpunkten analysiert, was für eine noch messbar andauernde Freisetzung auch am Ende der Versuchszeit sprach, die rein anhand der gesamten Freisetzungsprofile (*siehe Abb. 16*) nicht einwandfrei festzustellen war.

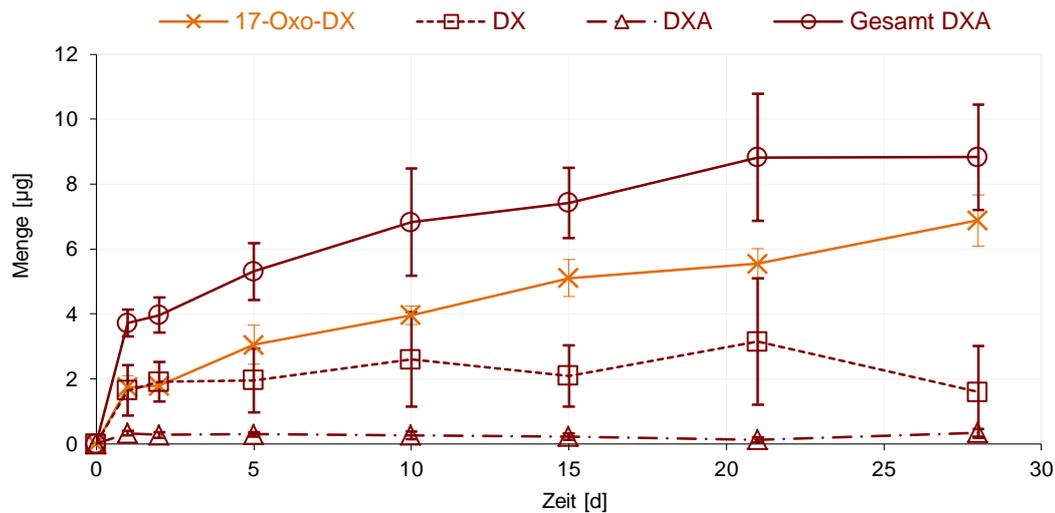


Abb. 17: Freisetzungsprofil von DXA, aufgeschlüsselt nach allen gemessenen Abbauprodukten und der Ausgangssubstanz. Neben DX wurde mit 17-Oxo-DX ein weiteres Abbauprodukt analysiert, dessen Entstehung zuvor nicht in Humanplasma beobachtet worden war (für Identifizierung siehe Abschnitt 7). Dargestellt sind die absolut freigesetzte Dosis in 25 mL Medium. Abweichungen 95 % CI, n= 6.

Für BDP wurde zunächst ein Abbau zu seiner Wirkform Beclomethason-17-propionat (B-17-P) und den Metaboliten Beclomethason-21-propionat (B-21-P) und Beclomethason (BOH) erwartet [90]. Die HPLC-Analyse zeigte indes bereits zu Beginn, vor allem schon nach zwei Tagen, dass in erster Linie ein weiterer literaturbekannter Abkömmling des BDP, das 9,11-Epoxid des Beclomethasons (9,11-Epoxy-BOH) [91], im Plasma vorlag (siehe Abb. 18). Zu diesem Zeitpunkt machte dieses bereits $76,3 \pm 0,6$ % der insgesamt freigesetzten Menge an BDP aus, während lediglich $10,0 \pm 0,2$ % auf BOH und $13,7 \pm 0,1$ % auf BDP entfielen. Die beiden Monoester B-17-P und B-21-P lagen zu allen Zeitpunkten unterhalb der Bestimmungsgrenze. Wie auch für das 17-Oxo-DX angemerkt, wurde hier gleichfalls die Reinsubstanz für einen Einsatz als Referenzsubstanz in Eigenarbeit hergestellt (für nähere Informationen zu Identifikation und Herstellung des 9,11-Epoxy-BOH siehe Abschnitt 7). Im Maximum des Freisetzungsprofils nach 15 Tagen lag der Anteil des 9,11-Epoxy-BOH an den insgesamt infolge der BDP-Freisetzung gemessenen Substanzen gar bei $94,4 \pm 1,0$ %. Der Kurvenverlauf des gesamten Freisetzungsprofils deckte sich praktisch mit der Analyse des Epoxids, was die sinkenden Plasmakonzentrationen miteinschloss (siehe Abb. 18) und einen Hinweis darauf gab, dass dies auf die Instabilität dieses Abbauproduktes zurückzuführen sein konnte. Letzteres wurde zur Bestätigung auch noch einmal in einem separaten Versuch beobachtet (für nähere Informationen zur Stabilität von 9,11-Epoxy-BOH siehe Abschnitt 7.2).

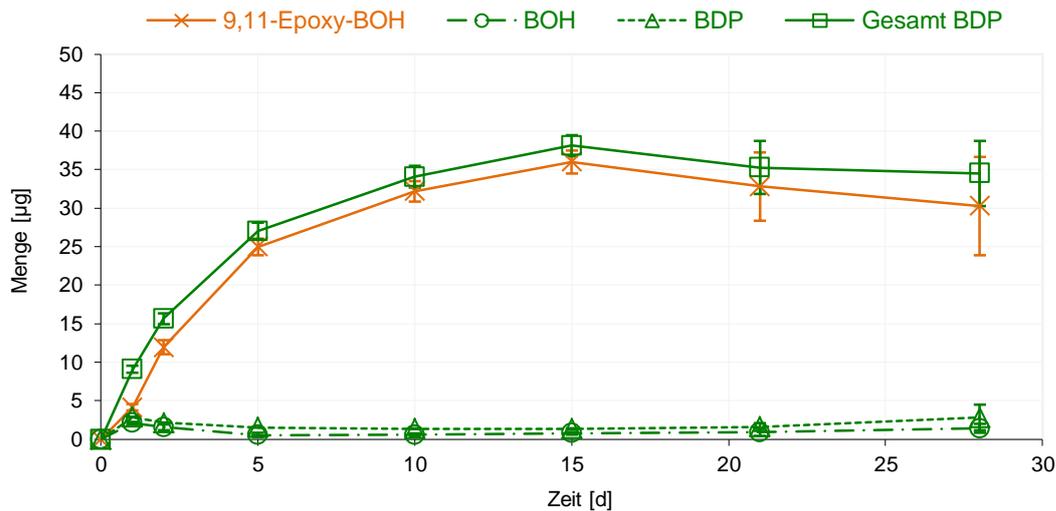


Abb. 18: Freisetzungsprofil von BDP, aufgeschlüsselt nach allen gemessenen Abbauprodukten und der Ausgangssubstanz. Neben BOH und BDP wurde das Epoxid des BOH, das 9,11-Epoxy-BOH, analysiert (für Identifizierung siehe Abschnitt 7). Dieses trat in derart großer Menge auf, dass dessen Entstehung das vollständige Freisetzungsprofil annähernd widerspiegelte. Die sinkenden Plasmaspiegel nach 15 Tagen gehen vermutlich auf eine Instabilität des Epoxids zurück. Dargestellt sind die absolut freigesetzte Dosis in 25 mL Medium. Abweichungen 95 % CI, n= 6.

Bei Auftragung der freigesetzten Gesamtmengen gegen die Quadratwurzel der Zeit nach dem Gesetz von Higuchi [46] (siehe auch Abschnitte 1.1 und 1.5) wurde für die Freisetzung von DXA eine Geschwindigkeitskonstante k von $0,39 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$ ($R^2 = 0,93$, $n = 6$, CI 95 %) berechnet (siehe Abb. 19). Eine leicht höhere Konstante von $0,42 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$ ($R^2 > 0,99$) ergab sich für die Freisetzung von GCX. Während der Korrelationskoeffizient R^2 von $> 0,99$ für GCX eine gute Anpassung an die lineare Regression belegte, zeigte sich diese für DXA mit einem R^2 von $0,93$ demgegenüber weniger passend und spiegelte damit die hohe initiale Freisetzung des Arzneistoffes wieder. Mit einem Wert von $2,26 \pm 0,08 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$ konnte für BDP die mit Abstand höchste Freisetzungsrates berechnet werden. Diese Rate wurde unter Einbezug lediglich der Messwerte bis zehn Tage der Freisetzungsdauer erhalten, da eine Hinzunahme der späteren Werte nach 15, 21 und 28 Tagen aufgrund der vermuteten Instabilität des 9,11-Epoxy-BOH zu einer sehr starken Verzerrung des Ergebnisses geführt hätte. Auch der berechnete Wert war schließlich bereits durch den Abbau der Substanz beeinflusst und unterschätzte wohl somit die Freisetzungskonstante für BDP ohnehin. Die lineare Regression zeigte bei Einschluss der ersten vier Messpunkte einen R^2 von $> 0,99$. Der Einflussnahme des Abbaus des instabilen Epoxids auf die Messwerte geschuldet, war jedoch generell fraglich, inwiefern diese Auswertung für BDP eine korrekter Freisetzungskinetik darstellen konnte.

Für den Vergleich mit den späteren Versuchen im Gewebebindungsmodell (siehe Abschnitt 3) wurden zusätzlich die Freisetzungsrates anhand der Messwerte nach einem, zwei und fünf Tagen Freisetzungsdauer berechnet. Diese ergaben sich für DXA zu

$0,54 \pm 0,07 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$ ($R^2= 0,94$), für GCX zu $0,44 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$ ($R^2= 0,98$) und für BDP zu $2,34 \pm 0,12 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$ ($R^2= 0,99$).

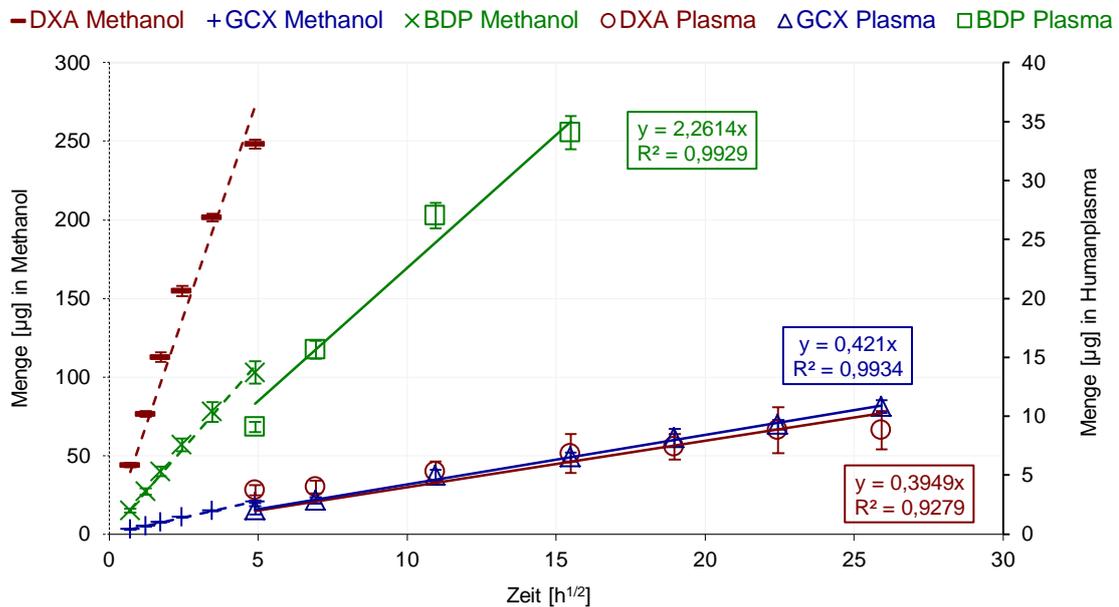


Abb. 19: Freisetzungskinetik nach dem Quadratwurzelgesetz nach Higuchi [46] in Humanplasma (rechte y-Achse, durchgezogene Linie). Zusätzlich ist zum Vergleich die Kinetik der Freisetzung in Methanol (linke y-Achse, gestrichelte Linie) dargestellt (siehe Abb. 10 in Abschnitt 1.4). Der Korrelationskoeffizient zeigte eine gute Anpassung an die lineare Regression für GCX, weniger jedoch für DXA und spiegelte damit dessen hohe initiale Freisetzung wider. Für BDP wurden aufgrund der sinkenden Plasmaspiegel nach 15 Tagen lediglich die ersten vier Messwerte für die Berechnung der Freisetzungsrates berücksichtigt. Ob diese Auswertung für BDP eine korrektere Freisetzungskinetik darstellen konnte war indes fraglich, da der Abbau des instabilen Epoxids die Messwerte beeinflusste. Abweichungen 95 % CI, n= 6.

Die pH-Kontrolle zeigte einen pH-Wert von $7,9 \pm 0,1$ zu allen Zugzeitpunkten über den gesamten Versuchszeitraum. Der mittels Bradford-Assay ermittelte Proteingehalt betrug $56,6 \pm <0,1 \text{ mg/mL}$ in allen Humanplasma-Ansätzen von Beginn bis Ende des Freisetzungsversuchs.

2.5 Diskussion der Freisetzungsversuche in Humanplasma

Ex-vivo Freisetzungsversuche in humanem Blutplasma wurden nach derzeitigem Kenntnisstand zur Untersuchung der Glucocorticoid-Freisetzung aus der Polymermatrix eines Schrittmachersystems hier erstmals durchgeführt. Unter weitgehend physiologischen Verhältnissen konnte so die Freisetzungsrates aus dem Applikationssystem in den ersten Tagen nach Elektrodenimplantation eingeschätzt und dabei die Freisetzung der drei Glucocorticoide DXA, GCX und BDP aus gleichartigen Freisetzungssystemen verglichen werden.

Literaturbekannte Daten zur *in-vivo* Freisetzung von DXA, GCX oder BDP lagen nicht vor. Einzige Untersuchungen zur Freisetzung von Dexamethasonphosphat (DXP), einem weiteren Prodrug des DX, waren dokumentiert, bei denen die Glucocorticoid-Restgehalte explantierter Elektroden aus Tierversuchen im Hund und in wenigen Fällen aus Patienten gemessen wurden [92]. Nach Extrapolation der Messwerte schlugen die Autoren einen Restgehalt nach einer Nutzungsdauer von zehn Jahren von ~20 % der ursprünglichen Dosis in der Polymermatrix vor, wobei schon nach nur drei bis fünf Wochen lediglich ~60 % der applizierten Dosis in der Matrix verblieben, also ~40 % während der initialen Nutzungsdauer freigesetzt wurden. Die Ergebnisse der eigenen Versuche legten eine wesentlich langsamere Freisetzung als die Literaturdaten nahe, auch wenn man bei Extrapolation der Freisetzung anhand der eigenen ermittelten Raten nach *Fml. 5* ebenfalls auf eine Freisetzung von ~80 % nach zehn Jahren käme.

$$\text{Fml. 5} \quad Q = k \cdot t^{1/2}$$

Mit:

Q= Arzneistoffmenge, die über die Zeit freigesetzt wird

k= Freisetzungskonstante [$\mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$]

t= Zeit [h]

Eine derartig weite Extrapolation über den Versuchszeitraum hinaus ist allerdings wenig aussagekräftig, auch weil die eigenen Versuche unter *ex-vivo* Bedingungen ohnehin nur für eine initiale Freisetzungsdauer entworfen waren. Ein Vergleich der eigenen Ergebnisse mit den Langzeitdaten aus der Literatur ist somit kritisch zu betrachten, da mit dem Einwachsen der Elektrodenspitze unter Ausbildung einer fibrösen Kapsel um die Matrix eine Veränderung der Freisetzungsbedingungen einhergeht (*siehe Abschnitt 1.2.5 der Einleitung in Teil A*), die im eigenen Versuch nicht abgebildet wurde. Diese Veränderung macht sich in den Literaturdaten wahrscheinlich durch die deutliche Verlangsamung des Freisetzungsprozesses bemerkbar, so wurde hier nach 100 Wochen, also rund zwei Jahren, noch mit ~40 % Restgehalt an DXP gerechnet [92]. Die initiale Freisetzung innerhalb eines vierwöchigen Zeitraums könnte indes, trotz der verglichen mit den Literaturwerten langsameren Freisetzungsrates, anhand der eigenen gut einschätzbar gewesen sein. Ein direkter Vergleich mit den Literaturdaten war zwar auch hier nicht zu ziehen, da das dort verwendete DXP eine wesentlich höhere Wasserlöslichkeit als das DXA im eigenen Versuch aufwies. So zeigten bereits die *in-vitro* Daten zum Vergleich zwischen DXP und DXA von Herrlich et al. [73] eine deutlich schnellere Freisetzung des Phosphorsäureesters des DX um etwa das Sechsfache. Unter Berücksichtigung dieses Löslichkeitsunterschieds schienen die eigenen ermittelten Werte jedoch eine realistische

Einordnung der Freisetzungsrates für DXA geben zu können.

Die gewählten Bedingungen wurden den Anforderungen an eine erfolgreiche Durchführung der Freisetzungsversuche gerecht. Der pH-Wert des Mediums zeigte sich über den kompletten Versuchszeitraum mit $7,9 \pm 0,1$ konstant, wenn auch höher als für Humanplasma erwartet. Jedoch wurde dieser Wert auch schon zu Versuchsbeginn in frischem Medium gemessen. Auch der Proteingehalt zeigte sich über 28 Tage hinfort gleichbleibend. Als wichtiges Kriterium waren überdies zu jedem Zeitpunkt Sink-Bedingungen gegeben, da die Arzneistoffkonzentrationen für alle drei Substanzen stets ausreichend weit von der Grenze der maximalen Aufnahmekapazität des Humanplasmas, die im Vorversuch ermittelt wurde (*siehe Abschnitt 2.2*), entfernt lagen. Diese lag für DXA weit über den $8,8 \pm 1,6 \mu\text{g}$ in 25 mL Medium und wurde auch für BDP und GCX, deren Grenzen laut den eigenen Untersuchungen um etwa das Siebenfache beziehungsweise etwa vierfach höher gelegen hätten, nicht erreicht. Eine Limitation der Freisetzung durch ein zu geringes Volumen des Mediums konnte folglich ausgeschlossen werden. Diese gegebenen Grundvoraussetzungen und die zuvor ausgeführte Einschätzung bezüglich der Freisetzung des DXA ließen somit erwarten, dass die durch die Freisetzungsversuche physiologische Bedingungen hinreichend dargestellt wurden, um die Freisetzung von GCX und BDP mit der des DXA vergleichen zu können und eine Einschätzung bezüglich der *in-vivo* freigesetzten Dosen geben zu können.

Auf die Frage nach der Notwendigkeit einer über Jahre hinweg andauernden Glucocorticoid-Anwendung soll an anderer Stelle eingegangen werden (*siehe Abschnitt 4*). Für den Zeitpunkt der akuten Gewebeverletzung mit einer entsprechenden Entzündungsreaktion direkt nach Implantation der Elektrode ließen sich im Freisetzungsversuch Dosen von $3,7 \pm 0,4 \mu\text{g}$ DXA, $2,0 \pm 0,3 \mu\text{g}$ GCX und $9,1 \pm 0,5 \mu\text{g}$ BDP nach 24 Stunden feststellen. Hier und in den folgenden Tagen spielt *in-vivo* eine Beeinflussung der Freisetzung durch das Einwachsen des Fremdkörpers sicherlich noch keine Rolle, weshalb die Dosen durchaus realistische Werte darstellen können. Gleichzeitig stellen diese, dem Quadratwurzelgesetz folgend, die maximalen innerhalb eines Tages freigesetzten Mengen dar. Aufgrund der kontinuierlichen Freisetzung und der Konvektion durch den hohen Blutstrom im Herz sind diese zwar keinesfalls im Sinne akut vorliegender Dosen zu betrachten. Ein dergestalt vereinfachter Vergleich der maximal vorliegenden Tagesdosen mit anderen Applikationsformen zeigt jedoch, wie niedrig die voraussichtlichen Dosen der Glucocorticoide hier einzustufen sind – schon zu Beginn der Freisetzung liegen diese wohl um mehr als das zehnfache unter dem Dosisbereich einer intranasalen oder pulmonalen Anwendung [58, 93].

Eine bessere Einschätzung der kontinuierlichen Freisetzung geben die Freisetzungsrates nach dem Quadratwurzelgesetz wider, vor allem für den Vergleich zwischen den drei getesteten Substanzen. Auffällig schien hier zunächst eine, verglichen mit DXA und GCX, sehr schnelle und umfangreiche Freisetzung des BDP aus der Silikonmatrix in Humanplasma. Die Gegenüberstellung der Freisetzungsrates im

physiologischen Medium mit denen aus den vorigen Versuchen, in welchen Methanol als Medium verwendet wurde, ließ indes auch darauf schließen, dass die Freisetzungsrates des DXA im Plasma verhältnismäßig niedrig angesiedelt war (*siehe Abb. 19*). So zeigte das Verhältnis der Freisetzungsrates in beiden Medien von BDP und GCX jeweils eine etwa zehnfach langsamere Freisetzungsrates in Humanplasma als in Methanol an – für BDP ergab sich ein Wert von 9,6 und für GCX von 10,1 für das Verhältnis der Freisetzungsrates aus Methanol zu Humanplasma – für DXA Betrag der Geschwindigkeitsunterschied in beiden Medien hingegen etwa das 141- bis 154-fache (*je nach zugrunde gelegter Rate, siehe Abb. 10 in Abschnitt 1.5*). Gleich welche Betrachtungsweise man einnahm, ob schnelle BDP- oder langsame DXA-Freisetzung in Humanplasma, war es schwierig eine fundierte Erklärung für die beobachteten Unterschiede zwischen den Freisetzungsrates der Glucocorticoide zu finden. Ein rascher Abbau zu hydrophileren Metaboliten als die jeweiligen Muttersubstanzen ließ sich nicht als alleinige sinnvolle und konsistente Erklärung anbringen, da die Geschwindigkeit des Abbaus unter Esterhydrolyse von DXA zu DX mit der des BDP zu seinen Monoestern B-17-P und B-21-P unter den *ex-vivo* Bedingungen in Humanplasma [90] wohl in etwa vergleichbar sein sollte. Literaturdaten zur Geschwindigkeit des DXA-Abbaus in Humanplasma lagen zwar nicht vor, jedoch ließ die hohe gemessene Konzentration an DX nach bereits einem Tag der Freisetzung einen schnellen Abbau des DXA annehmen (*siehe Abb. 17*). Auch eine begrenzte Löslichkeit im Plasma für DXA konnte ausgeschlossen werden, da dieses das hydrophilste der drei untersuchten Glucocorticoide war [44, 61] (*siehe auch Abschnitt 8 im Tabellarischen Anhang D*) und auch die eigenen Versuche zur Aufnahmekapazität in Humanplasma (*siehe Abschnitt 2.2*) dagegen sprachen.

Als eine mögliche Erklärung für die beobachteten Unterschiede in der Reihenfolge der Freisetzungsgeschwindigkeiten zwischen den *in-vitro* Versuchen in Methanol und den denen in Humanplasma mag diskutiert werden, dass die Lösungsgeschwindigkeit des niedrig schmelzenden BDP durch eine Modifikationsänderung infolge des Herstellungsverfahrens mittels Schmelzextrusion deutlich beschleunigt wurde, wie bereits unter Abschnitt 1.5 vermutet. Im wässrigen Lösungsmittel Humanplasma könnte dieser Aspekt besonders zum Tragen gekommen sein, da Glucocorticoide generell eine äußerst geringe Wasserlöslichkeit aufweisen.

Mit dieser obigen Vermutung in einem Summeneffekt resultierend, spielte möglicherweise auch der äußerst rasche Abbau des BDP über seine Monoester und BOH zum 9,11-Epoxy-BOH eine Rolle zur Erklärung der Freisetzungsgeschwindigkeit. Letzteres war wiederum selbst nicht stabil, entzog sich dabei allerdings der HPLC-Analyse. Eine so ausgeprägte Bildung des Epoxids und dessen Instabilität war auch anhand Literaturdaten [91, 94, 95] nicht zu erwarten gewesen und bot deshalb Anlass für eine weitere Stabilitätsuntersuchungen (*siehe Abschnitt 7.2*). Vermutlich hing der beobachtete Substanzverlust mit der Reaktivität der Epoxid-Struktur zusammen, was womöglich zu irreversibler Bindung an Proteinstrukturen geführt haben könnte. Inwiefern dieser

Abbauprozess ein Risiko für unerwünschte Nebenwirkungen darstellt, konnte derzeit auch mangels Literaturerfahrung nicht beurteilt werden und sollte womöglich Gegenstand weiterer Untersuchungen werden. Dies könnte auch für die üblichen Therapiegebiete, die intranasale und die pulmonale Anwendung, von Interesse sein, da eine Bildung des Epoxids selbst bei der kurzen Verweildauer des BDP auf der Nasenschleimhaut und der nachfolgenden Absorption des Arzneistoffes [58, 96] womöglich bereits in einiger Menge gebildet würde. Vermutlich lief die Bildung des 9,11-Epoxy-BOH hauptsächlich über BOH als Vorstufe, da ein Monoester des Epoxids nicht gefunden werden konnte (*siehe hierzu auch Abschnitt 7.2, insbesondere Abb. 53*). Intermediär war somit auch mit einer starken Bildung der Wirkform des BDP, dem B-17-P, zu rechnen. Bei der ermittelten hohen Freisetzungsrates für BDP könnte demnach der Glucocorticoid-Effekt innerhalb der ersten Tage bis wenige Wochen nach Applikation im Vergleich zu DXA als höher eingeschätzt werden, auch weil die Potenz des B-17-P mit einer relativen Rezeptoraffinität von 1345 deutlich über der des DX von 100 liegt [45]. Fraglich blieb die Langzeitwirkung einer BDP-Gabe, da der Restgehalt des LTSC nach 28 Tagen Versuchsdauer bereits auf $58,9 \pm 1,6$ % gesunken war. Anhand des Verlaufs des Freisetzungsprofils des BDP konnte aufgrund der Instabilität des Epoxids und dem damit abnehmenden Kurvenverlauf nur schlecht eine Extrapolation anhand des vierwöchigen Versuchszeitraums vorgenommen werden. Legt man einer Extrapolation nach *Fml. 5* die Freisetzungsrates für die Messwerte bis zu zehn Tagen Versuchsdauer zugrunde, ließ sich jedoch in guter Übereinstimmung mit der Restgehaltanalyse eine Freisetzung von ~40 % nach 28 Tagen berechnen. Eine Extrapolation über vier Wochen hinaus zeigte dabei eine Entleerung der Polymermatrix des LTSC auf ~70 % des ursprünglichen Gesamtgehalts bereits nach drei Monaten an. Eine auf Jahre angelegte Nutzungsdauer musste somit in Frage gestellt werden, insofern ein derart langer Glucocorticoid-Effekt erforderlich sein sollte, um die Reizschwelle dauerhaft auf niedrigem Niveau zu halten. Ob eine schnelle Freisetzung eines Glucocorticoids hoher Potenz, wie dem BDP, überhaupt einen Vorteil in Bezug auf eine weitere Absenkung der Reizschwelle im Vergleich zur Standardsubstanz DXA (*siehe Abschnitt 1.3 der Einleitung in Teil A*) bewirken würde oder ob dies eher im Sinn einer Überdosierung, verbunden mit suboptimaler Effektivität zu bewerten wäre, musste demnach offen bleiben.

Interessanterweise konnte nach einigen Tagen Inkubationszeit mit 17-Oxo-DX ein Abbauprodukt des DX im Humanplasma entdeckt werden, dessen Entstehung unter diesen Bedingungen bislang nicht beschrieben wurde. Das 17-Oxo-DX selbst schien wiederum im Plasma stabil zu sein, wie der weitere Verlauf des Freisetzungsprofils und der Abgleich mit dem Restgehalt zeigte. Angaben zur Glucocorticoid-Aktivität der Substanz konnten nicht gefunden werden. Aufgrund der fehlenden C-21 Seitenkette, die für die Affinität zum Glucocorticoid-Rezeptor wichtig ist, sollte jedoch kaum von einer signifikanten Aktivität ausgegangen werden (*für weitere Informationen zu 17-Oxo-DX siehe Abschnitt 7*).

Für GCX ließ sich im Vergleich zu dem in Schrittmacherelektroden standardmäßig eingesetzten DXA eine etwas langsamer einsetzende Arzneistofffreisetzung feststellen,

jedoch mit einem kontinuierlichen Verlauf bis zum Ende der Versuchszeit, der durch das Quadratwurzelgesetz nach Higuchi gut beschrieben wurde. Im Gegensatz zu DXA zeigte sich für GCX zudem ein noch sichtbar steigender Verlauf des Freisetzungsprofils nach 28 Tagen (*siehe Abb. 16*). Da sich das GCX durch eine vielfach höhere relative Affinität zum Glucocorticoid-Rezeptor als DX auszeichnet, also deutlich potenter als die Wirkform des DXA ist, sollte die geringere initial freigesetzte Dosis an GCX jedoch kaum von bedeutendem Nachteil sein [44, 45]. Zusätzlich interessant und für die tatsächliche Effektivität eines Einsatzes von GCX zur Unterstützung der Schrittmachertherapie bedeutend könnte dessen hohe Plasmaproteinbindung von >90 % sein. Diese spielt beim üblicherweise topischen Einsatz des GCX keine Rolle zur Beurteilung des freien und damit effektiv wirksamen Anteils des Arzneistoffs, sondern wird dort in der Regel als ein die Sicherheit der Therapie erhöhender Faktor nach unerwünschter Aufnahme in den systemischen Kreislauf betrachtet, die für GCX allerdings nur marginal gegeben scheint [49]. Durch die Applikation mit einer Herzschrittmacherelektrode erfolgt die Freisetzung allerdings bereits systemisch. Die hohe Bindung an Plasmaproteine wird den freien Anteil an GCX somit vermutlich deutlich einschränken und sich in der therapeutischen Wirkung gegenüber DX, das nur zu ~72 % gebunden DX wird, womöglich dergestalt bemerkbar machen, dass der Vorteil einer hohen Potenz des GCX weiter ausgeglichen würde. Natürlich würde dadurch gleichfalls das Risiko unerwünschter Glucocorticoid-Nebenwirkungen des hochpotenten GCX eingeschränkt, dies sollte jedoch ob der sehr geringen freigesetzten Dosen praktisch ohnehin kaum eine Rolle spielen. Die Bedeutung der Plasmaproteinbindung kann hierbei aufgrund der Art der Applikation, die gerade für GCX und BDP ungewöhnlich, da systemisch ist, hervorgehoben werden und wird in diesem Sinne auch an späterer Stelle im Zuge des pharmakodynamischen Vergleichs der drei Glucocorticoide noch einmal aufgegriffen (*siehe Abschnitt 5.1*). Im Vergleich zu DXA bleibt dennoch festzuhalten, dass für GCX anhand der ermittelten Freisetzungsdaten keine geringere Glucocorticoid-Wirkung in den ersten Tagen nach Implantation der Elektrode erwartet werden sollte, trotz einer initial langsameren Freisetzungsrates. Auf lange Sicht, über einen vierwöchigen Zeitraum hinaus, sollte aufgrund zu DXA ähnlichen, sogar leicht höheren gesamten Freisetzungsrates eventuell von einem stärkeren Glucocorticoid-Effekt ausgegangen werden können. Fraglich bleibt indes, ob sich dies auch in einer weiteren Absenkung der Reizschwelle bemerkbar machen würde, welches schließlich der eigentliche Grund der Glucocorticoid-Gabe ist. Gemessen an der Möglichkeit, dank ähnlicher Freisetzungsrates für GCX und DXA sowie der deutlich höheren Potenz des ersteren, eine geringere Arzneistoffdosis einsetzen zu können, als bislang für DXA üblich, könnte der Einsatz von GCX jedoch selbst bei gleicher Reizschwellenabsenkung von Vorteil sein.

Insgesamt gesehen war die langsame Freisetzung des DXA als Ergebnis des Freisetzungsversuchs unerwartet, da nicht nur dessen Wasserlöslichkeit und Aufnahmekapazität in Humanplasma als Medium eine höhere Rate im Vergleich zu GCX

und BDP hätten vermuten lassen. Auch die Ergebnisse der Freisetzungsversuche in Methanol hätten dies nicht erwarten lassen (*siehe Abschnitt 1.5*). Für GCX konnte eine freigesetzte Dosis in ähnlicher Höhe wie für DXA ermittelt werden, für BDP sogar eine weit höhere. Ausgehend von der bisher standardmäßigen Verwendung von DXA als erfolgreicher, die Funktion des Schrittmachers unterstützenden, pharmakologischen Maßnahme, legte der Vergleich der drei Glucocorticoide DXA, GCX und BDP in den eigenen Versuchen somit eine ebenfalls erfolgreiche Anwendung von GCX oder BDP zur Reizschwellenabsenkung für den initialen Zeitraum einiger Tage bis Wochen nach der Elektrodenimplantation nahe. Die zeitliche Einschränkung bezieht sich dabei vor allem auf die Verwendung von BDP, dessen Beurteilung zusätzlich aufgrund der starken Bildung des 9,11-Epoxy-BOH letztlich schwierig blieb.

Neben den Erkenntnissen zur Freisetzung konnten neue Aspekte der Stabilität von DXA und BDP unter Langzeitinkubation in humanem Plasma beobachtet werden. Auf die entsprechenden Abbauprodukte 17-Oxo-DX beziehungsweise 9,11-Epoxy-BOH, insbesondere auf deren Identifizierung und Stabilität von BOH und seinem Epoxid, wird in Abschnitt 7 weiter eingegangen.

3 Charakterisierung der lokalen Gewebefindung der Glucocorticoide an der Schnittstelle zwischen Herzgewebe und Herzschrittmacherelektrode

3.1 Fragestellung

Trotz der mit der Implantation der Herzschrittmacherelektrode verbundenen systemischen Verabreichung der Glucocorticoide, handelt es sich aus rein praktischer Sicht um eine lokale Anwendung der Arzneimittel. Dies ergibt sich auch aus der Klassifizierung des Herzschrittmachersystems inklusive des Glucocorticoid-freisetzenden Reservoirs – egal ob als Matrixsystem oder anderem Freisetzungssystem realisiert – als Medizinprodukt, also einer rein die physikalische Funktion des Geräts unterstützenden Maßnahme (*siehe auch Abschnitt 1.3 der Einleitung in Teil A*). Wie bei den üblichen topischen Glucocorticoid-Anwendungen in der Lunge, der Nase oder auf der Haut lässt sich damit der Wirkort entsprechend eingrenzen. Für eine effektive Therapie ist dabei die Diffusion des Arzneistoffs zum zytosolischen Glucocorticoid-Rezeptor im lokalen Zielgewebe entscheidend, sowie dessen dortige Aufenthaltsdauer [97]. Letzteres ist vor allem auch zur Vermeidung unerwünschter systemischer Nebenwirkungen relevant, da durch eine hohe Affinität des Arzneistoffs zum Gewebe eine rasche Diffusion in den systemischen Kreislauf mit der Folge entsprechend hoher Plasmaspiegel vermieden werden soll [41, 98]. In diesem Zusammenhang sollte auch den eingesetzten Glucocorticoid-Dosen Beachtung geschenkt werden. So werden in der Therapie der allergischen Rhinitis in der Regel ~50 µg je Sprühstoß [58] eingesetzt, in der Asthmatherapie selbst im niedrigen Dosisbereich bereits 80 bis mehr als 600 µg täglich [99] und bei dermalen Anwendung gar Dosisbereiche von 250 µg bis wenige Milligramm aufgetragen. Im Vergleich dazu liegt der Dosisbereich bei intrakardialer Anwendung, also bei Applikation mittels Herzschrittmacherelektrode, deutlich niedriger und weist aufgrund der kontinuierlichen und langsamen Freisetzung keine Plasmaspiegelschwankungen mit Spitzenspiegeln auf. Den eigenen Freisetzungsvorgängen zufolge sollte die maximal innerhalb 24 Stunden freigesetzte Dosis bei etwa 2 bis 10 µg zu Beginn der Freisetzung liegen und in der folgenden Zeit deutlich darunter (*siehe Abschnitte 2.4 und 2.5*). Die Retention der Glucocorticoide im Gewebe spielt für die Sicherheit der Arzneimitteltherapie auf den sonst üblichen lokalen Anwendungsgebieten daher eine sicherlich weit größere Rolle als bei der hier vorliegenden Applikationsform, zumal die Freisetzung dabei ohnehin bereits systemisch erfolgt und nicht erst durch Diffusion aus dem Zielgewebe in den Blutkreislauf bedarf. Ob der geringen Dosis dürfte das Nebenwirkungspotential bei der intrakardialen Applikation als vernachlässigbar einzustufen sein. Auch wurde von unerwünschten Glucocorticoid-Wirkungen durch diese Anwendungsform bislang nicht berichtet – wobei

einschränkend angemerkt sei, dass bei den entsprechenden Untersuchungen das Augenmerk in erster Linie auf der Sicherheit der Herzschrittmacherfunktion bei niedriger programmierter Impulshöhe lag, nicht auf der Arzneimittelanwendung. Zur Beurteilung der Effektivität einer intrakardialen Anwendung der Glucocorticoide steht aus pharmakokinetischer Sicht somit eher die Verteilung des Arzneistoffes zum Wirkort im Vordergrund und weniger dessen Rückweg, der Desorption mit Abgabe der Substanzen in den systemischen Kreislauf. Die Geweberetention spielt womöglich nur im Sinn einer Kumulation im Gewebe eine Rolle, die aufgrund dann lokal erhöhter Arzneistoffkonzentration zu einer verstärkten Wirkung führen könnte. Eine Verlängerung der Wirkdauer, wie bei der Bolus-artigen Verabreichung beispielsweise in der Asthatherapie gewünscht, ist durch die kontinuierliche Abgabe der Substanzen aus der Freisetzungsmatrix weniger relevant.

Bisherige Untersuchungen zur Affinität der Glucocorticoide zu Lungengewebe und nasaler Schleimhaut zeigten, dass Glucocorticoide hoher Lipophilie auch hohe Gewebeeaffinitäten aufwiesen [58, 97]. In proportionaler Weise korreliert die Lipophilie zudem mit zunehmender Potenz der Glucocorticoide, gemessen als relative Affinität zum Glucocorticoid-Rezeptor [45]. Für Substanzen mit hoher Rezeptoraffinität lässt dies bezüglich der therapeutischen Effektivität bei lokaler Anwendung also zusätzlich den Vorteil einer ausgeprägten Affinität zum Zielgewebe und einer langen Verweildauer erwarten, was bei Gabe von Einzeldosen wiederum potentiell die Wirkdauer verlängern beziehungsweise bei der kontinuierlichen Freisetzung zur Kumulation im Gewebe führen sollte. Für einige Glucocorticoide wird neben der Lipophilie auch eine reversible Konjugation an Lipide durch Esterbildung mit Fettsäureresten diskutiert, die in ähnlicher Weise wie die Geweberetention zu einer Art Depot-Bildung im Gewebe führen soll [49]. Ein bekanntes Beispiel dazu ist das Budesonid, für welches trotz eines niedrigeren $\log P$ -Werts eine längere Geweberetention *in-vivo* als für die lipophileren Fluticasonpropionat und BDP gezeigt wurde und an seiner freien Hydroxyl-Gruppe an Position C-21 Ester mit verschiedenen Fettsäureresten zu bilden scheint [100].

Neben der freigesetzten Dosis, wie sie mit den Versuchen in Humanplasma untersucht wurde (*siehe Abschnitt 2*), ist die Kenntnis über die Verteilung zwischen dem Freisetzungsmedium und dem Zielgewebe somit ein weiterer wichtiger Aspekt, der bei der Charakterisierung des lokalen Glucocorticoid-Einsatzes in der Herzschrittmachertherapie berücksichtigt werden muss. Insbesondere in der initialen Phase der Herzschrittmachertherapie könnte die Verteilung der freigesetzten Glucocorticoide in das Herzgewebe wichtig sein, da diese durch eine lokale Entzündung durch Gewebeverletzungen an der Implantationsstelle der Elektrode im Herzen gekennzeichnet ist [101], deren akute Behandlung für die Reizschwellenentwicklung vorteilhaft sein könnte. Erfahrungen aus der Therapie der allergischen Rhinitis zeigten, dass sich eine Symptomkontrolle durch die Glucocorticoid-Wirkung bereits nach einem bis zwei Tagen bemerkbar macht, nicht erst bei chronischer Behandlung [102]. Dies deckt sich mit den

Erfahrungen aus der dermalen Anwendung, bei der die Behandlungsdauer meist auf wenige Tage beschränkt werden sollte und bei einer akuten Hauterkrankung die Strategie empfohlen wird, kurzfristig stark wirksame Substanzen einzusetzen [36, 103]. Neben dem genomischen Mechanismus, der für die Hauptwirkungen verantwortlich ist und für welchen spürbare Auswirkungen innerhalb einiger Stunden bis weniger Tage aufgrund des benötigten Zeitrahmens für eine Beeinflussung der Gentranskription plausibel sind, werden dabei zusätzlich sehr kurzfristige Glucocorticoid-Effekte diskutiert. Diese sollen binnen einer halben Stunde eintreten und müssten daher unabhängig von der modulatorischen Wirkung auf Transkriptionsebene sein [104] (*siehe Abschnitt 1.4 der Einleitung in Teil A*).

Mit der Bildung einer fibrösen Kapsel um die Elektrodenspitze, an der sich das Freisetzungssystem befindet, sollte erst in der späteren entzündlichen Phase der Fremdkörperreaktion nach etwa zwei Wochen zu rechnen sein. Demgemäß sollte die primäre Freisetzung der Glucocorticoide zunächst in das die Elektrodenspitze umströmende Blutplasma erfolgen und sich der Arzneistoff anschließend von dort in das direkt umliegende entzündete Gewebe in Herzvorhof oder -kammer umverteilen, um dort seine Wirkung zu entfalten. Zum Teil sollte er allerdings auch sofort durch den Blutstrom abtransportiert und im systemischen Körperkreislauf verteilt werden, wo er dem weiteren ADME-Schema folgend (Absorption, Distribution, Metabolisierung, Elimination) von anderen Kompartimenten aufgenommen, metabolisiert und eliminiert wird (*siehe Abb. 20*).

Durch die Bildung fibrösen Gewebes als einer Art Kapsel um die Elektrodenspitze mit samt dem Freisetzungssystem verändern sich die Freisetzungsbedingungen im späteren Verlauf der Herzschrittmachertherapie [16]. Eine direkte Freisetzung in das umströmende Blutplasma kann dabei wohl als unwahrscheinlich angesehen werden, sondern erfolgt eher durch Diffusion in die neu gebildete Bindegewebskapsel, wo die Glucocorticoide antiinflammatorisch auf Immunzellen wirken und dadurch dauerhaft für eine niedrige Reizschwelle sorgen sollen [16]. Auf die Frage nach der Notwendigkeit einer antiinflammatorischen Glucocorticoid-Wirkung in diesem Stadium, welche bislang noch kaum untersucht zu sein scheint, wird an späterer Stelle eingegangen (*siehe Abschnitt 4.1*). Aus den dargelegten Gründen schien somit letztlich eine Betrachtung der Verteilung zwischen Plasma und entzündetem Gewebe vor allem für die ersten Tage der Freisetzung interessant.

Die Bindung der Glucocorticoide an Herzgewebe wurde bislang nicht untersucht. Da auch Untersuchungen zur Verteilung der Substanzen in das Gewebe nach kontinuierlicher Freisetzung in Humanplasma nicht bekannt waren, war es das Ziel die vorliegende Applikationsform in diesen Aspekten weiter zu charakterisieren. Dazu sollte, aufbauend auf den zuvor durchgeführten Freisetzungsversuchen in Humanplasma, ein *ex-vivo* Modell entwickelt werden, das die physiologische Umgebung an der Elektrodenspitze nach Implantation imitierte, dabei ein Gewebekompartiment in direkter Nähe zum Freisetzungssystem miteinbezog und eine Konvektion berücksichtigte, die einen ständigen Fluss über die Freisetzungsmatrix und das Gewebe simulierte.

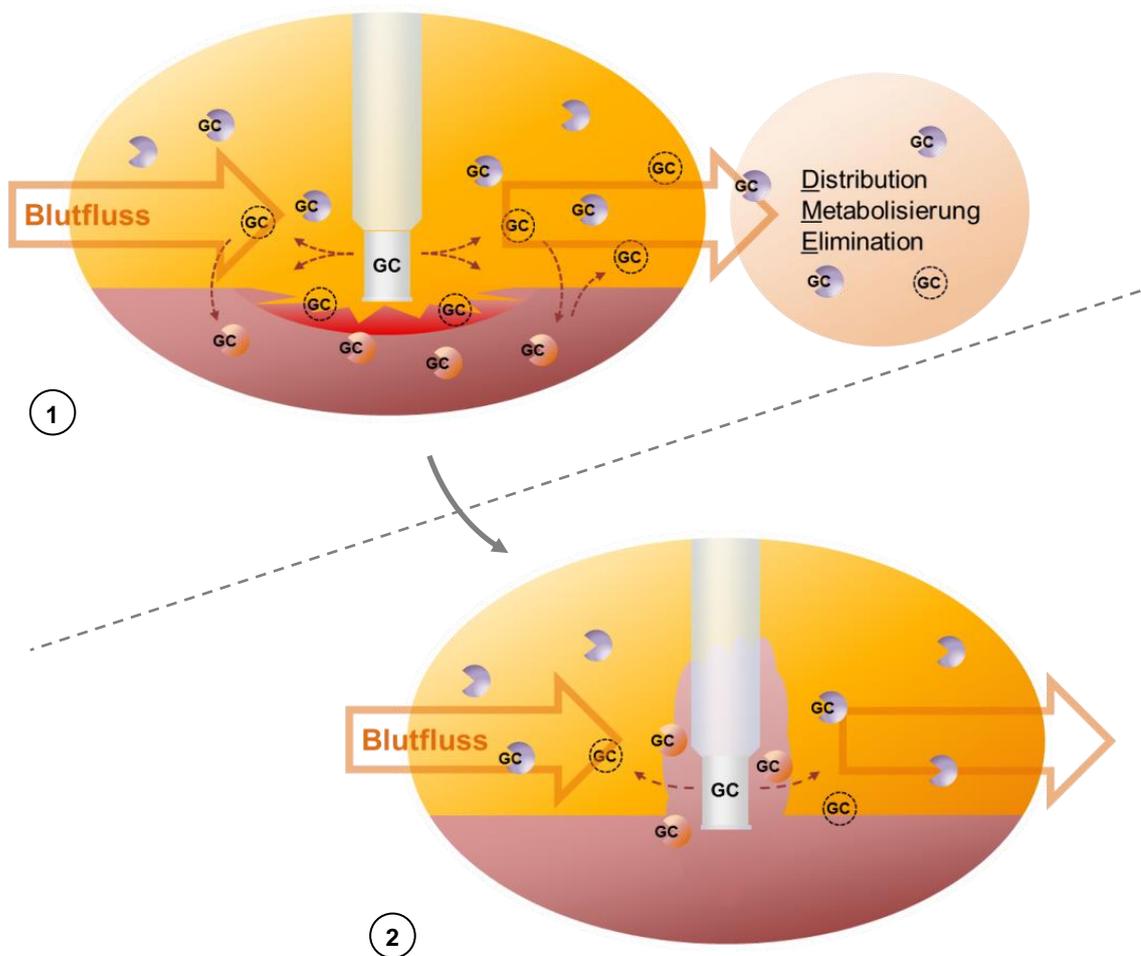


Abb. 20: Modellvorstellung der pharmakokinetischen Vorgänge an der Implantationsstelle einer Herzschrittmacherelektrode. Die primäre Freisetzung eines Glucocorticoids (GC) in den ersten Tagen nach der Implantation (1) sollte vorstellungsgemäß zunächst in das Blutplasma erfolgen, wo es an Plasmaproteine bindet (violette Segmente), sich frei vorliegender Arzneistoff (schwarze Kreise) teilweise in das Gewebe umverteilt und dort antiinflammatorisch wirkt. Ein großer Teil wird womöglich direkt durch den Blutstrom abtransportiert, um sich im Körper dem weiteren ADME-Schema folgend zu verteilen, metabolisiert und eliminiert zu werden. Die Überleitung frischen Bluts sorgt zudem für den Abtransport des aus dem Gewebe wieder in den systemischen Kreislauf diffundierenden Arzneistoffs und dessen dort entstandener Metabolite. Nach Einkapselung der Elektrodenspitze mit samt der Polymermatrix in eine fibröse Hülle als Immunreaktion auf den Fremdkörper (2) wird die Freisetzung wohl stark verlangsamt sein, da die Hülle als weitere Diffusionsschicht über der Polymermatrix liegen wird und der Lösungsvorgang durch die schlechte Erreichbarkeit des in der Matrix ungelösten Glucocorticoids erschwert ist. Die gängige Vorstellung ist bislang, dass es in dieser späteren Phase, die wohl die restliche Verweilzeit der Elektrode im Körper repräsentiert, vor allem in der Bindegewebskapsel antientzündlich auf Immunzellen wirken und dadurch dauerhaft für eine niedrige Reizschwelle sorgen soll [16].

3.2 Entwicklung und Prinzip des ex-vivo Modells zur Bestimmung der lokalen Gewebefreisetzung an das Herzgewebe

3.2.1 Entwicklung des Modellaufbaus

Das Modell sollte es ermöglichen, die Verteilung der Glucocorticoide in das Herzgewebe unmittelbar an der Implantations- beziehungsweise Kontaktstelle mit der Elektrodenspitze zu bestimmen und dabei Rücksicht auf möglichst physiologische Bedingungen für die Freisetzung der Substanzen aus der Polymermatrix – dem LTSC (*lead tip with steroid eluting collar, siehe Abschnitt 1.1*) – in den ersten Tagen nach Implantation der Elektrode zu berücksichtigen. Als Weiterentwicklung der Freisetzungsversuche in Humanplasma sollte dabei auch der vereinfachte Aufbau als Schüttelmodell (*siehe Abschnitt 2.3*) dergestalt ersetzt werden, dass die Konvektion im Modell mittels einem Kreislaufsystem gewährleistet würde, welches einen ständigen Fluss des humanen Plasmas um die Freisetzungsmatrix und über das Gewebekompartiment nachahmen sollte.

Grundlage für den Modellaufbau war die Entwicklung eines Gewebekompartiments, das die Oberfläche im Herzzinneren an der Grenzfläche zur Elektrodenspitze simulierte. Da es, wie zuvor beschrieben, das Ziel war eine prinzipiell lokale Glucocorticoid-Anwendung und Umverteilung zu untersuchen, wurde ein Kompartiment mit einer einseitig zum Medium hin durchgängigen Oberfläche von wenigen Quadratzentimetern gewählt. Die für eine Diffusion ins Gewebe zur Verfügung stehende Oberfläche sollte damit bewusst klein gehalten werden, anders als dies bei Verwendung einer Gewebesuspension oder eines Homogenats der Fall ist. Um dies zu erreichen wurde sich an der Herangehensweise von Baumann et al. [96] orientiert, die zur Untersuchung der Anwendung Glucocorticoid-haltiger Nasensprays ein Modell zur Simulation der Nasenschleimhaut entwarfen. In gleichmäßige Stücke geschnittenes Herzgewebe – es wurde auf atriales und ventrikuläres Herzgewebe aus dem Schaf zurückgegriffen – wurde somit in eine Gelmatrix eingebettet, die das Gewebe am Boden der verwendeten Schale fixierte, so ein Überleiten des Mediums ohne Aufschwimmen der Stücke ermöglichte und eine abgeschlossene Fläche schuf (*siehe Abb. 21 und Abschnitt 3.2 im Experimentellen Teil C*). Während Baumann et al. aufgrund erforderlicher mechanischer Belastbarkeit ein Gel mit einer Polyacrylamid-Matrix herstellten, wurde nun Kollagen als Matrix-Komponente eingesetzt, da dies als physiologische Hauptkomponente der Extrazellulärmatrix ohnehin ein Gewebestandteil war und als solches keinen zusätzlichen Einfluss auf die Verteilung der Glucocorticoide in die Gewebestücke im Sinn eines künstlichen Kompartiments erwarten ließ.

Als Probenschale zur Herstellung des Gewebe-Gels und als Basisgefäß für den Modellaufbau wurden 6-Well-Multischalen verwendet. Bei einem Durchmesser je Schale von ~37 mm betrug die rein geometrische Oberfläche des geschaffenen Gewebekompartiments ~1075 mm² (~10,8 cm²). In ein Gewebe-Gel dieser Abmessungen wurden 0,5 g einer homogenen Mischung aus Vorhof- und Kammergewebe eingearbeitet, um ein noch am Boden der Schale haftendes Gel zu erhalten. Wie groß die Fläche des zu

simulierenden Herzgewebes sein sollte, konnte mangels Informationen bezüglich der lokalen Entzündung nur eingeschätzt werden. Der gewählte Radius von ~18 mm um die Elektrodenspitze schien jedoch nicht als ausreichend. Es sei erwähnt, dass zur Vermeidung der Adsorption der Glucocorticoide an Kunststoffoberflächen der Probenschalen zwar die Verwendung von Glasgeräten als vorteilhaft zu erachten gewesen wäre, dieser Aspekt jedoch in Anbetracht des Einsatzes der weiteren nötigen Schlauchmaterialien als nachrangig bedacht wurde. Diese konventionellen Multischalen brachten überdies selbst den Vorteil, dass der Versuchsaufbau grundsätzlich auch für den Einsatz als Zellkulturmodell geeignet war – wofür er teilweise auch genutzt wurde (*siehe Abschnitte 4 und 5*). Zudem wurde damit einem Einsatz möglichst weit verbreiteter und leicht zugänglicher Gerätschaften Rechnung getragen, um die Reproduzierbarkeit der angewandten Methode nicht unnötig zu verkomplizieren, wie für die Entwicklung neuer Freisetzungsmethoden von Vereinigungen wie der FIP und AAPS übergreifend gefordert [74].

Bezüglich der Wahl des Freisetzungsmediums konnte auf die Erfahrungen aus den Versuchen in Humanplasma zurückgegriffen und ein Volumen von 25 mL eingesetzt werden, für das bereits erfolgreich Sink-Bedingungen bei den zu erwartenden freigesetzten Arzneistoffmengen gezeigt wurde (*siehe Abschnitte 2.2 bis 2.5*). Der Einsatz eines Volumens von 25 mL Medium erwies sich zudem als vorteilhaft, da hierdurch Probleme bei der Kompatibilität des Schafsherzgewebes mit dem humanen Plasma umgangen werden konnten. In Vorversuchen unter Verwendung des sich aus diesem Grund als zu gering herausstellenden Volumens von nur 5 mL zeigte sich eine vermutlich auf eine Gerinnungsreaktion zurückzuführende Aggregation des Plasmas auf dem Gewebe-Gel. Der Ursprung dessen war womöglich im Gewebe zu suchen, da das bezogene Humanplasma eigentlich nicht gerinnbar war. Die exakte Ursache blieb zwar unbekannt, war vermutlich jedoch auf eine immunologische Reaktion zurückzuführen. Bei ausreichender Verdünnung unter Einsatz eines entsprechenden Volumens Humanplasma stellte sich schließlich heraus, dass diese Interaktion augenscheinlich umgangen werden konnte. Ein Einsatz von Gewebe und Plasma der gleichen Spezies wäre prinzipiell zur Vermeidung von Inkompatibilitäten dennoch anzuraten.

Eine weitere Herausforderung bestand in der Simulation des Plasmaflusses über die Freisetzungsmatrix und Gewebeoberfläche. Das vollständige Volumen von 25 mL Humanplasma war dazu in ständiger Flussbewegung durch die Probenschale zu pumpen, in der sich das Gewebe-Gel und der LTSC befinden sollten. Eine Orientierungshilfe für den Einsatz einer solchen Flussmethode bot das Ph.Eur.8.5, das unter 2.9.3. eine Durchflusszelle als Freisetzungsmethode für orale Arzneiformen beschreibt. Da die eigene Versuchsanordnung nur einem Volumen von 25 mL Humanplasma Raum zu bieten hatte, genügte die Verwendung eines in seiner Länge angepassten inerten Schlauchs aus Fluorethylenpropylen (FEP) als Ersatz für ein Reservoir, welches üblicherweise zur Bevorratung des größten Teils des Freisetzungsmediums dient. Der FEP-Schlauch konnte

ohne Aufnahme von Luftblasen mit Humanplasma befüllt werden, war praktisch gasundurchlässig und überbrückte zugleich den Abstand der Probenschale zur Schlauchpumpe, die für die notwendige Konvektion sorgte (*siehe Abb. 21*). Zum Betrieb der peristaltisch arbeitenden Pumpe musste zusätzlich ein Pumpenschlauch aus flexiblem Material eingesetzt werden, da die allzu starren FEP-Schläuche für die Anwendung in derlei Pumpen nicht geeignet sind (*siehe auch Abschnitt 3.2 im Experimentellen Teil C*). Die das Gewebekompartiment enthaltenden Multischalen sollten selbst nur Raum zur Aufnahme weniger Milliliter des Mediums bieten, wodurch das Volumen in der Probenkammer, ähnlich der Durchflusszelle, in kurzer Zeit durch das Medium im Pumpenkreislauf ausgetauscht werden können sollte. Als Pumpleistung gibt das Ph.Eur.8.5 eine Spanne von 240 bis 960 mL/h, beziehungsweise Standardflussraten zwischen vier und 16 mL/min für die Durchflusszelle vor. Die zur Verfügung stehende Schlauchpumpe wurde daher bei 12 mL/min (720 ml/h) betrieben. Als nachteilig zu betrachten war, dass dies gleichzeitig ihrer maximalen Leistung entsprach (auch der maximal verwendbare Durchmesser des Pumpenschlauchs wurde ausgeschöpft) und deshalb keine Möglichkeit zur Variation zu schnellerer Umlaufgeschwindigkeit ermöglichte. Generell als kritisch zu betrachten ist zudem die Zuverlässigkeit eines konstanten Leistungsabrufs, wenn ein Geräts bei dessen maximaler Leistung betrieben wird. Die Pumpleistung wurde deshalb regelmäßig neu geprüft, ein Betrieb des Modells mit einer leistungsstärkeren Pumpe wäre jedoch empfehlenswert.

Zum Anschluss der Probenschale an das Schlauchsystem und die Pumpe wurde ein eigenes System entworfen, bestehend aus Schlauchanschlüssen aus rostfreiem Edelstahl und Adaptern aus Polytetrafluorethylen (PTFE) zum Aufsatz auf 6-Well-Multischalen. Nachdem in Vorversuchen gelegentlich eine Flotation des Gels auffiel, wurde dieses zusätzlich durch ein Sicherungsring aus rostfreiem Edelstahl, der auf den Rand des Gels aufgelegt wurde, in Position gehalten (*für eine Beschreibung aller Teile des Anschlusssystems siehe Abschnitt 3.1.3 im Experimentellen Teil C*). In diesem Punkt musste von der oben erwähnten ablehnenden Haltung gegenüber individuellen Spezialanfertigungen abgewichen werden, was jedoch der Verwendung der Multischalen zugunsten geschah.

Zur Temperierung des Mediums und der Probenschale auf 37 °C konnte der gesamte Versuchsaufbau in einem Inkubator üblicher Maße platziert werden, was zugleich für eine adäquate Temperaturkontrolle sorgte. Aufgrund der Verwendung von *ex-vivo* Material über bis zu fünf Tage hinweg und der damit verbundenen Notwendigkeit aseptische Bedingungen so weit als möglich aufrecht zu halten, wurde bei der Auswahl aller Materialien darauf geachtet, dass diese zur Sterilisation im Autoklaven bei 121 °C geeignet waren.

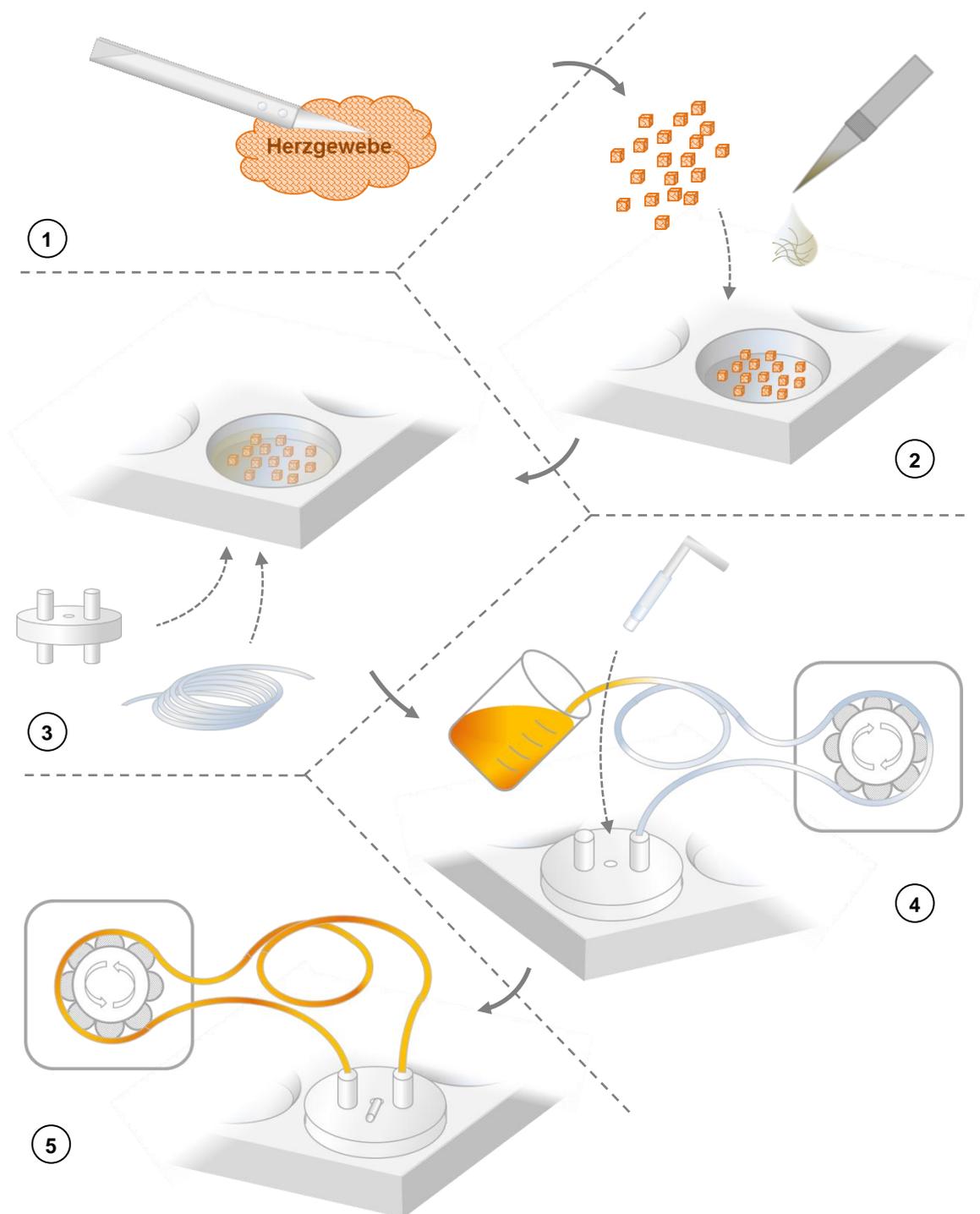


Abb. 21: Schritte des Aufbaus des *ex-vivo* Modells zur Bestimmung der lokalen Gewebefixierung der Glucocorticoide an das Herzgewebe an der Implantationsstelle einer Herzschrittmacherelektrode. Herzgewebe aus dem Schaf wurde in gleichmäßige kleine Stücke von ~1-2 mm Durchmesser geschnitten (1). Das Herzgewebe stammte aus Atrium und Ventrikel dreier verschiedener Schafe und wurde zur Vermeidung interindividueller Unterschiede gepoolt. Nach Verteilung von 0,5 g Gewebe in der Probenschale, einer 6-Well-Multischale, wurde dieses zur Fixierung und Bildung eines geschlossenen Kompartiments in ein Kollagen-Gel eingebettet (2). Um 25 mL Humanplasma als Freisetzungsmittel in einem Flusssystem über das Gewebekompartiment zu leiten, wurde mittels eines eigenen entworfenen Anschlusssystems ein Kreislauf aus einem Schlauchsystem an die Probenschale angeschlossen (3). Die Probenschale fasste selbst nur wenige Milliliter des Mediums, was einen raschen Austausch des Mediums über dem Gewebe-Gel gewährleistete. Das übrige Medium fand Platz im Schlauchsystem, das neben einem Pumpenschlauch aus einem inerten FEP-Schlauch bestand. Angetrieben wurde das Kreislaufsystem über eine Schlauchpumpe mit einem Fluss von 12 mL/min. (Fortsetzung nächste Seite)

Zur Befüllung des Modellsystems mit Medium wurde das Humanplasma mittels der Pumpe eingesogen (4) und der Kreislauf anschließend geschlossen. Mit Applikation des LTSC mittig auf dem Gewebe-Gel und Überführung des Aufbaus in einen 37°C warmen Inkubator startete der Versuch. Alle Arbeitsschritte von der Gewebepräparation, über die Herstellung des Gewebe-Gels bis einschließlich des Aufbaus der Versuchsanordnung wurden unter möglichst aseptischen Bedingungen durchgeführt, um einem mikrobiellen Befall während der anschließenden mehrtägigen Versuchsdurchführung zu vermeiden.

Insgesamt wurde bei der Versuchsentwicklung somit den Vorgaben des Ph.Eur.8.5 zum Betrieb einer Durchflusszelle insbesondere in Hinblick auf die Flussrate, die eingesetzten Materialien und der Temperatur Rechnung getragen. Anhand von Vorversuchen wurde vor allem bei der Auswahl der Schläuche auf den Einsatz möglichst inerten Materials geachtet, an welchem die Glucocorticoide eine nur geringe unspezifische Bindung zeigen sollten. Dies wurde in separaten Versuchen unter Einbezug aller verwendeten Bauteile für den vollständigen Versuchsaufbau überprüft (*siehe Abschnitt 3.5 im Experimentellen Teil C*).

Die Verwendung von Kollagen als Matrix zur Einbettung der Gewebestücke erwies sich nicht nur aufgrund seiner physiologischen Eigenschaften von Vorteil, sondern ermöglichte schließlich auch eine einfache Extraktion der Glucocorticoide aus dem Gewebe-Gel. Durch enzymatischen Verdau konnte dieses vom festen Zustand in eine flüssige Suspension feiner Gewebekomponenten überführt werden, was letztlich eine flüssig-flüssig Extraktion nach dem bereits zur Analyse des Humanplasmas etablierten Verfahren zuließ (*siehe Abschnitte 2.3 und 3.3 im Experimentellen Teil C*).

Nach Anfertigung des Gewebe-Gels aus gleichmäßig geschnittenen Gewebestücken und Kollagen wurde die Probenschale unter Zuhilfenahme der speziell angefertigten Anschlüsse mit dem Schlauchsystem und der Pumpe verbunden (*siehe Abb. 21*). Zur Befüllung des Systems mit dem Freisetzungsmittel wurde gepooltes und auf 37 °C vorgewärmtes Humanplasma (*siehe auch Abschnitt 2.3*) mit der Pumpe in das Schlauchsystem und die Probenschale gesogen. Das Kreislaufsystem wurde sodann geschlossen und der LTSC, nachdem er mit einem hakenförmigen Halterungsstift aus rostfreiem Edelstahl versehen wurde, in mittig und in senkrechter Haltung auf dem Gewebekompartiment positioniert. Mit der Applikation der Freisetzungsmatrix, der Inbetriebnahme der Pumpe und Überführung des Modellaufbaus in den 37 °C warmen Inkubator startete der Versuch. Alle Arbeitsschritte von der Gewebepräparation, über die Herstellung des Gewebe-Gels bis einschließlich des Aufbaus der Versuchsanordnung wurden unter möglichst aseptischen Bedingungen durchgeführt, um einem mikrobiellen Befall während der mehrtägigen Versuchsdurchführung zu vermeiden.

3.2.2 Versuchsprinzip des Gewebebindungsmodells

Für die Bindungsversuche wurde der Modellaufbau über eine Dauer von ein bis fünf Tage bei 37 °C im Inkubator betrieben und nach 24, 48 und 120 Stunden die Freisetzung in das

Humanplasma und die Bindung an das Gewebe gemessen (siehe Abb. 22). Bei der Festlegung der Zeitpunkte zur Probenentnahme wurde sich an den eigenen Freisetzungsversuchen in Humanplasma orientiert (siehe Abschnitt 2.3). Die Probenentnahme stellte zugleich das Ende eines Versuchsansatzes dar, da zur Analyse der Gewebekombindung das Gewebekompartiment freilich vollständig untersucht werden musste. Jedem Messpunkt lag folglich ein eigener Ansatz zugrunde.

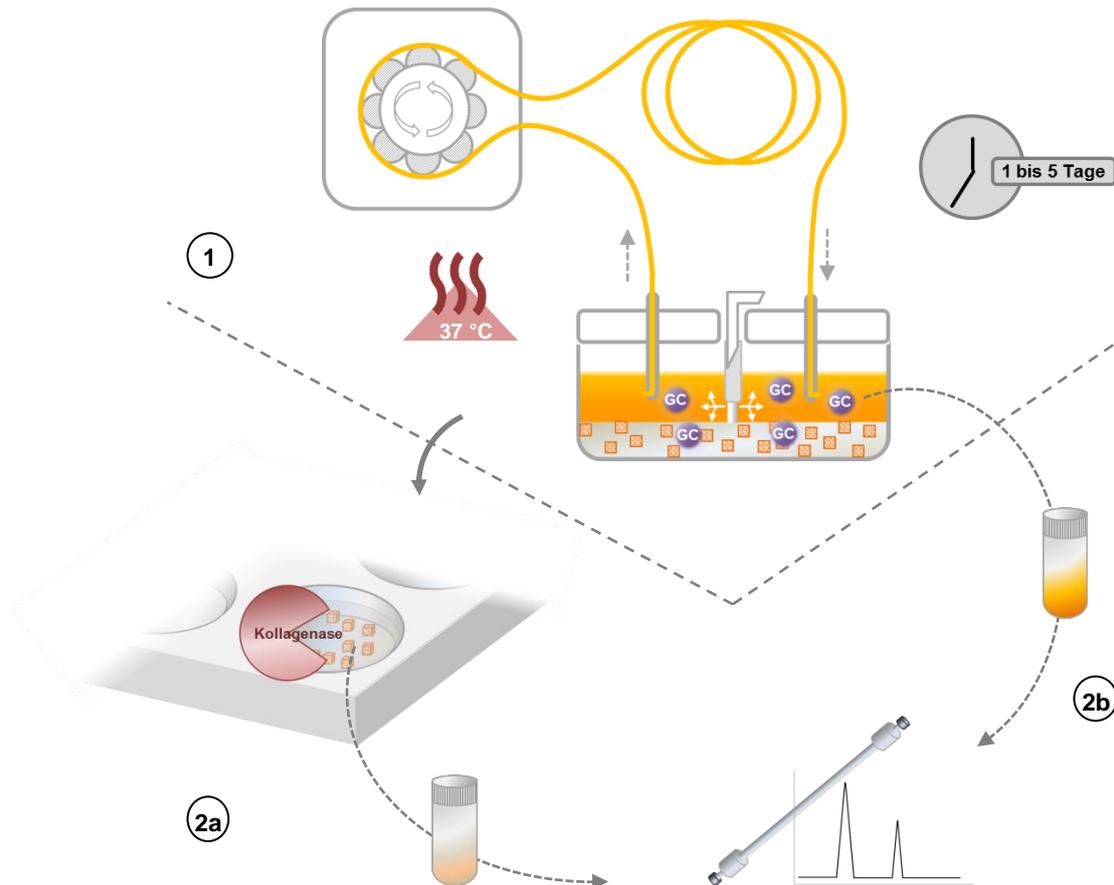


Abb. 22: Schematisches Versuchsprinzip des Gewebekombindungsmodells (für Informationen zum Versuchsaufbau siehe Abb. 21). Das *ex-vivo* Modell wurde für ein bis fünf Tage im Inkubator bei 37 °C betrieben, um die Freisetzung der Glucocorticoide aus dem LTSC und deren Umverteilung in das Herzgewebe an der Implantationsstelle zu simulieren (1). Zur Messung der Gewebekombindungs nach 24, 48 und 120 Stunden wurde der Versuch zu dem jeweiligen Zeitpunkt beendet, das Humanplasma vollständig entfernt und das Gewebe-Gel durch enzymatischen Verdau mittels einer Kollagenase-Lösung in eine flüssige Suspension feiner Gewebestücke überführt. Aus dieser wurden sodann Proben entnommen, die mittels flüssig-flüssig Extraktion und HPLC-Analyse auf ihren Glucocorticoid-Gehalt untersucht wurden (2a). Bevor das Plasma entfernt wurde, wurde zunächst eine Probe entnommen und der Glucocorticoid-Gehalt ebenfalls mittels flüssig-flüssig Extraktion und HPLC-Analyse bestimmt (2b). Die Versuche wurden zur Bestimmung der reinen Bindung an das Herzgewebe auch mit Gelen durchgeführt, die nur aus Kollagen bestanden, also kein Gewebe enthielten. Die Auswertung des rein an Gewebe gebundenen Glucocorticoid-Anteils erfolgte durch Bildung der Differenzen der Ergebnisse aus den Messungen mit Gewebe-Gelen und den Kollagen-Gelen.

Nach Ablauf der jeweiligen Versuchszeit wurden zunächst Proben aus dem Freisetzungsmedium entnommen und dieses anschließend vollständig aus der Anordnung entfernt. Die Oberfläche des in der Probenschale verbliebenen Gewebe-Gels wurde mit Phosphatpuffer gewaschen, um etwaige Plasmareste zu entfernen. Anschließend erfolgte der enzymatische Verdau durch Zugabe einer Kollagenase-Lösung zum Gewebekompartiment, bis dieses nach vier Stunden Inkubationszeit eine flüssige Suspension feiner Gewebestücke bildete (*siehe Abb. 22*). Proben wurden nach Einstellung der Gewebesuspension auf ein definiertes Volumen entnommen und die Glucocorticoid-Konzentrationen nach flüssig-flüssig Extraktion letztlich chromatographisch bestimmt.

Parallel zum geschilderten Ablauf wurden die Versuche mit einem reinen Kollagen-Gel bei gleicher Menge verwendeten Kollagens und ohne eingearbeitetes Gewebe durchgeführt, um den an Kollagen gebundenen Anteil der Glucocorticoide zu ermitteln. Dieser wurde bei der Auswertung der Gewebebindung durch Bildung der Differenz zwischen Gewebe-Gelen und Kollagen-Gelen berücksichtigt und damit der rein an das Gewebe gebundene Glucocorticoid-Anteil erhalten (*für eine ausführliche Beschreibung der Versuchsdurchführung und der speziell angefertigten Gerätschaften siehe Abschnitte 3.1.3 und 3.2 im Experimentellen Teil C*).

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Ergebnisse der Gewebebindungsversuche

Nach Freisetzung aus dem LTSC in Humanplasma und anschließender Umverteilung ins Gewebe wurden für DXA nach 24 Stunden insgesamt (Summe aus Ausgangssubstanz und Metabolite) 87 ± 37 ng ($n=3$, CI 95 %), nach 48 Stunden 203 ± 73 ng und nach 120 Stunden 530 ± 204 ng im Gewebe gemessen (*siehe Abb. 23*). Demgegenüber wurden mit insgesamt 251 ± 54 ng, 484 ± 64 ng und 906 ± 219 ng nach 24, 48 beziehungsweise 120 Stunden höhere Menge für BDP ermittelt. Das geringste Vorkommen im Gewebe zeigte GCX, das dort lediglich zu 14 ± 14 ng nach 24 Stunden, 25 ± 19 ng nach 48 Stunden und 149 ± 14 ng vorlag (*siehe Abb. 23*). Alle Ergebnisse beziehen sich auf eine mittlere Gewebemasse von 0,5 g (505 ± 2 mg) Gewebe, die in jedem Gewebe-Gel zum Einsatz kamen und stellten bereits die um die Kollagen-Matrix bereinigten Werte dar (*für Informationen zur Bindung an die Kollagen-Matrix siehe Abb. 29 in Abschnitt 3.3.2*).

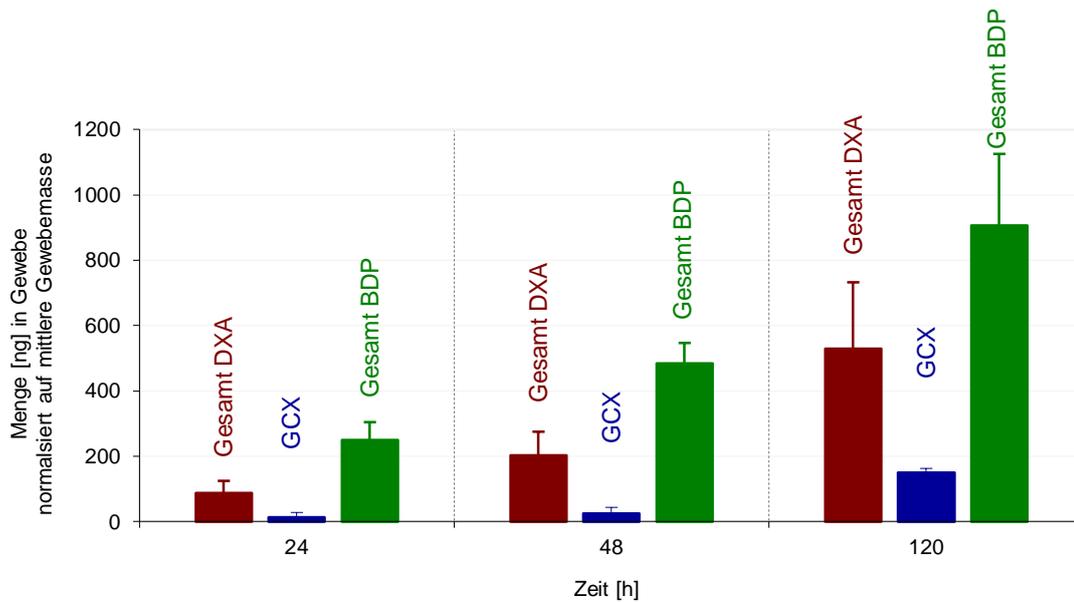


Abb. 23: Arzneistoffmengen, die zu den Messpunkten nach 24, 48 und 120 Stunden an das Herzgewebe gebunden waren. Die Werte wurden auf die mittlere eingesetzte Gewebemasse von 0,5 g (505 ± 2 mg) normiert und verstehen sich daher als die gesamten in dieser Gewebemasse gebundenen Mengen. Während sich GCX zu allen Messpunkten als stabil erwies, stellen die gezeigten Ergebnisse für DXA und BDP die Summe aus allen zugehörigen Metaboliten und den Ausgangssubstanzen dar. Die Ergebnisse wurden bereits durch Differenzbildung zu den Messungen aus reinen Kollagen-Gelen um die Bindung der Substanzen an die Kollagen-Matrix bereinigt (siehe Abschnitt 3.3.2). Abweichungen 95 % CI, n = 3.

Im Fall des DXA lag die komplette Menge zu allen drei Messzeitpunkten praktisch ausschließlich in seiner Wirkform DX im Gewebe vor (siehe Abb. 24). Dies deckte sich mit den Ergebnissen zu BDP dergestalt, dass auch hier keine Ausgangssubstanz mehr im Gewebe entdeckt werden konnte. Die Gesamtmenge des BDP ergab sich zunächst lediglich aus BOH und B-17-P, nach 48 Stunden trat erwartungsgemäß das 9,11-Epoxy-BOH auf, das bereits in den Freisetzungsversuchen in Humanplasma aufgefallen war, jedoch in weit geringerem Ausmaß als zuvor beobachtet (siehe auch Abschnitt 2.4). Insbesondere B-17-P, das C-17 Monopropionat und Wirkstoff des Prodrugs BDP, wurde mit 164 ± 59 ng nach 24 Stunden in deutlicher Menge im Gewebe analysiert. Waren nach 48 Stunden sogar 326 ± 62 ng des Wirkstoffs im Gewebe gebunden, waren es nach fünf Tagen hingegen nur noch 128 ± 39 ng. Somit wurde während der Versuchszeit ein zwischenzeitliches Maximum an gewebegebundenem B-17-P durchschritten. GCX zeigte sich unter den ex-vivo Bedingungen des Versuchs auch nach 120 Stunden stabil.

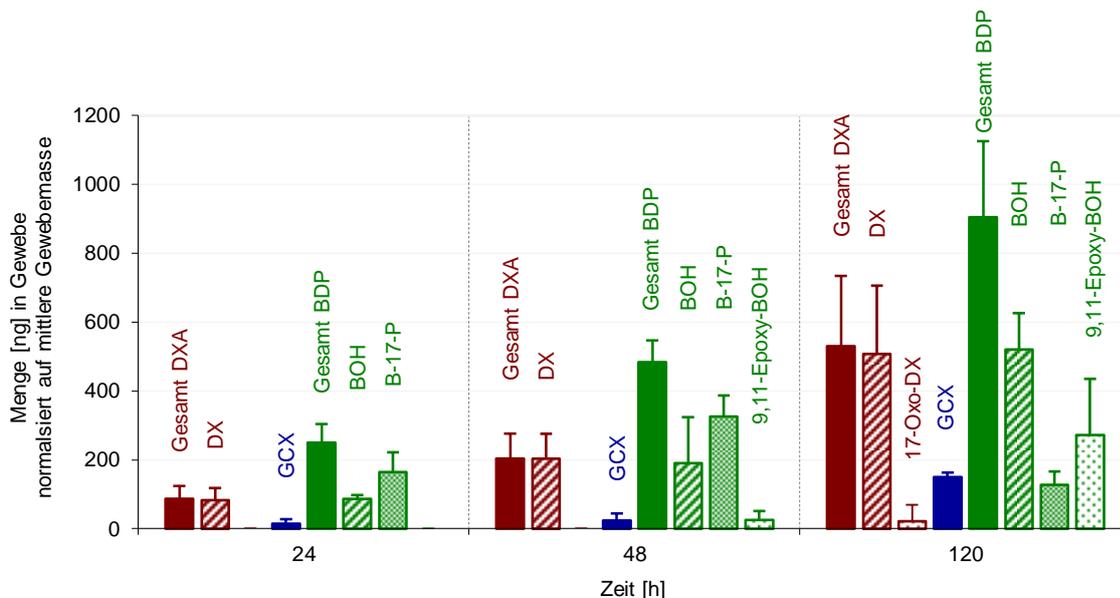


Abb. 24: Nach Metabolite aufgeschlüsselte Zusammensetzung der Gesamtmengen für DXA und BDP, die zu den Messpunkten nach 24, 48 und 120 Stunden an das Herzgewebe gebunden waren. Die Ergebnisse für die jeweiligen Gesamtmengen und GCX sind zum Vergleich noch einmal mit dargestellt. Auffällig waren die hohen messbaren Mengen an B-17-P und deren abfallendes Vorkommen im Gewebe zwischen 48 und 120 Stunden. DXA lag praktisch vollständig zu DX abgebaut im Gewebe gebunden vor. Alle Werte wurden auf die mittlere eingesetzte Gewebemasse von 0,5 g (505 ± 2 mg) normiert und verstehen sich daher als die gesamten in dieser Gewebemasse gebundenen Mengen. Die Ergebnisse wurden bereits durch Differenzbildung zu den Messungen aus reinen Kollagen-Gelen um die Bindung der Substanzen an die Kollagen-Matrix bereinigt (siehe Abschnitt 3.3.2). Abweichungen 95 % CI, n = 3.

Als Maß für die Verfügbarkeit der Arzneistoffe im als Wirkort angesehenen Gewebe innerhalb des Versuchszeitraums wurde die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve ($AUC = \text{area under the curve}$) berechnet. Dazu wurden die bereits aufgezeigten gewebegebundenen Substanzmengen, ausgedrückt als Massenkonzentrationen je Gramm Gewebe, gegen die Versuchszeit aufgetragen und die Fläche unter dem sich daraus ergebenden Kurvenverlauf von Anfang bis zum letzten Messpunkt nach fünf Tagen ermittelt. Für DXA ergab sich dabei insgesamt eine AUC von 2530 ± 269 ng/g · d, die sich von der AUC des reinen DX mit 2454 ± 248 ng/g · d nicht unterschied (siehe Abb. 25). Die AUC für das gesamte BDP war mit 5064 ± 328 ng/g · d zwar etwa doppelt so groß wie die des DXA, jedoch betrug die AUC des Wirkstoffs B-17-P nur 2000 ± 341 ng/g · d und lag damit niedriger als die des DX, was angesichts der zwischen 48 und 120 Stunden abfallenden gewebegebundenen Substanzmenge (siehe Abb. 24) plausibel schien. Innerhalb des fünftägigen Versuchszeitraums zeigte GCX die geringste AUC von 571 ± 73 ng/g · d.

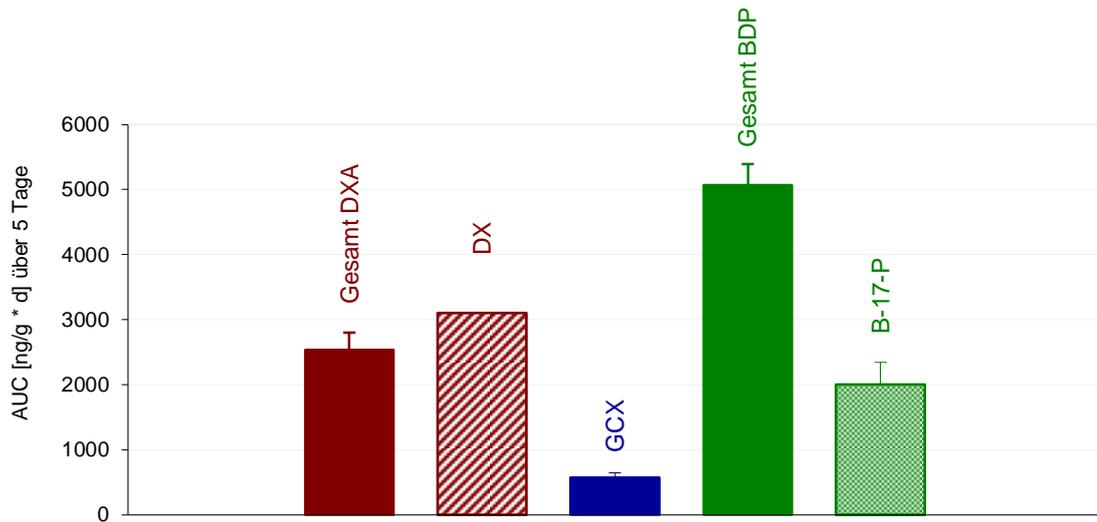


Abb. 25: Flächen unter den Konzentrations-Zeit-Kurven (AUC) für die gesamten Arzneistoffmengen und die jeweils zugehörigen Wirkformen. Die gewebegebundenen Substanzmengen wurden als Massenkonzentrationen je Gramm Gewebe ausgedrückt, gegen die Versuchszeit aufgetragen und die Fläche unter dem sich daraus ergebenden Kurvenverlauf von Anfang bis zum letzten Messpunkt nach fünf Tagen ermittelt. Die Darstellung in Form der AUC dient zur Verdeutlichung des Ausmaßes der Verfügbarkeit der Arzneistoffe im als Wirkort angesehenen Gewebe innerhalb des Versuchszeitraums. Abweichungen 95 % CI, n= 3.

Neben den an das Gewebekompartiment gebundenen Arzneistoffmengen wurden auch die Substanzmengen analysiert, die zu den drei Messzeitpunkten in Humanplasma vorlagen, in das die Glucocorticoide aus den LTSC freigesetzt wurden (*siehe Abb. 26*). Für DXA wurden hierbei insgesamt (Summe aus Ausgangssubstanz und Metabolite) 5463 ± 1240 ng nach 120 Stunden gemessen, für BDP insgesamt 11888 ± 2148 ng und für GCX 2191 ± 138 ng, ebenfalls jeweils nach 120 Stunden. Die hohe Freisetzung des BDP spiegelte damit die Ergebnisse wider, die schon die reinen Freisetzungsversuche in Humanplasma zeigten (*siehe Abb. 16 in Abschnitt 2*). Innerhalb des fünftägigen Zeitraums im Gewebebindungsmodell wurde auch DXA etwas stärker in das Freisetzungsmedium abgegeben als GCX, was mit den Verhältnissen in der initialen Phase der Freisetzungsversuche in Humanplasma übereinstimmte. Die Freisetzungsraten nach dem Quadratwurzelgesetz (*siehe Abschnitte 1.1 und 1.5*), die durch Auftragung der gesamten freigesetzten Arzneistoffmengen (Summe aus Menge in Plasma und Gewebe-Gel) gegen die Quadratwurzel aus der Zeit erhalten wurde, verdeutlichte dies, wie die Werte in *Tab. 2* zeigen.

B Allgemeiner Teil

Tab. 2: Freisetzungsraten von DXA, GCX und BDP aus den Versuchen im Gewebebindungsmodell. Zum Vergleich dieser Freisetzungsraten mit den Freisetzungsgeschwindigkeiten aus den Freisetzungsversuchen in Humanplasma (siehe Abschnitt 2.4) wurden die Freisetzungsraten aus jenen Versuchen zusätzlich für einen Betrachtungszeitraum von fünf Tagen berechnet.

Freisetzungsraten		
	Gewebebindungsmodell	Freisetzungsversuche in Humanplasma*
DXA	$0,58 \pm 0,08 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$	$0,54 \pm 0,07 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$
GCX	$0,18 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$	$0,44 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$
BDP	$1,07 \pm 0,16 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$	$2,34 \pm 0,12 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$

* für Betrachtungszeitraum von fünf Tagen

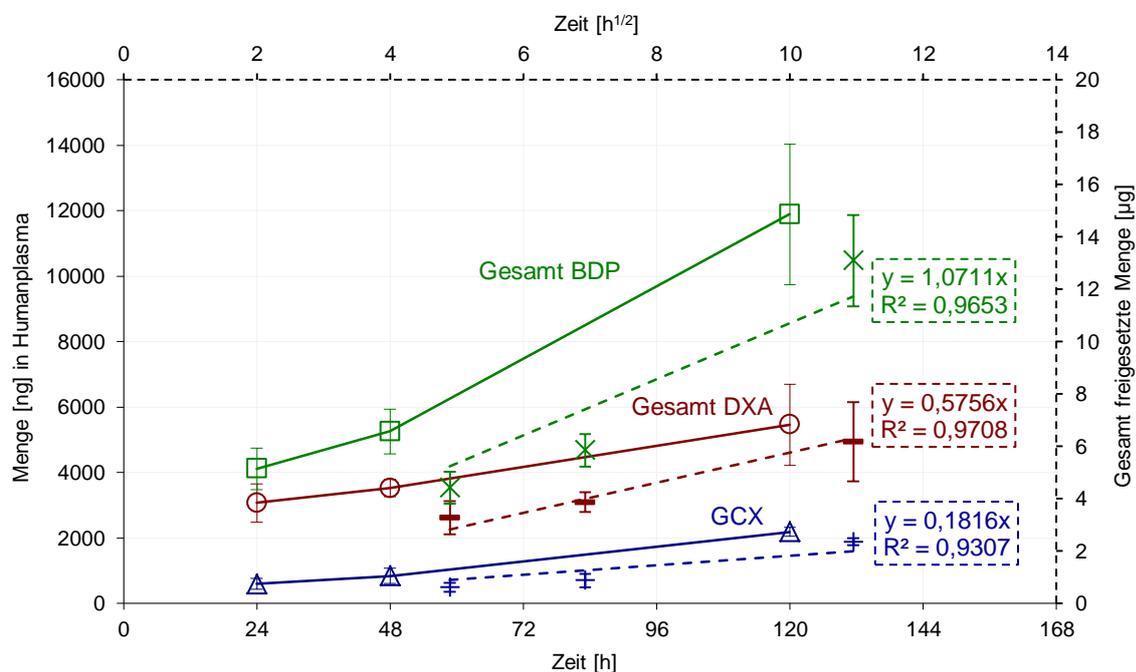


Abb. 26: Verlauf der zu den Messzeitpunkten nach 24, 48 und 120 Stunden in Humanplasma vorliegenden Arzneistoffspiegel für DXA, GCX und BDP (linke y-Achse, untere x-Achse, durchgezogene Linie). Die Ergebnisse für DXA und BDP stellen die Summe aus allen zugehörigen Metaboliten und den Ausgangssubstanzen dar, GCX war stabil. Wie in den Freisetzungsversuchen in Humanplasma (siehe Abb. 16 in Abschnitt 2) wurde die höchste Freisetzung für BDP gemessen, auch die initial gegenüber GCX erhöhte Freisetzung des DXA stimmte mit den reinen Freisetzungsversuchen überein. Die Freisetzungsraten veranschaulichen einen Vergleich zu den reinen Freisetzungsversuchen (siehe Abschnitt 2.4) und wurden durch Auftragung der gesamten freigesetzten Menge (Summe aus Menge in Plasma und Gewebe-Gel) gegen die Quadratwurzel der Zeit erhalten (rechte y-Achse, obere x-Achse, gestrichelte Linie). Abweichungen 95 % CI, n= 3.

Inwiefern sich die Glucocorticoide vom FreisetzungsmEDIUM Humanplasma in das Gewebekompartiment umverteilen, sollten die Beziehungen der AUC für die Arzneistoffkonzentration über die Versuchszeit im Gewebe mit der AUC der Arzneistoffkonzentration in Plasma veranschaulichen. Wie bereits für die

Gewebekonzentration geschildert, wurden hierfür zunächst die Konzentrationen aller drei Glucocorticoide im 25 mL umfassenden Freisetzungsmedium herangezogen und die Flächen unter den Konzentrations-Zeit-Kurven für die fünftägige Versuchszeit ermittelt. Diese betrug für DXA 738 ± 64 ng/mL · d, für GCX 225 ± 30 ng/mL · d und für BDP 1326 ± 122 ng/mL · d. Es konnte unabhängig vom untersuchten Glucocorticoide eine eindeutige positive und statistisch signifikante Korrelation der AUC im Gewebe mit der im Plasma mit einem Korrelationskoeffizienten nach Pearson von $r = 0,9712$ ($p < 0,01$) berechnet werden (siehe Abb. 27).

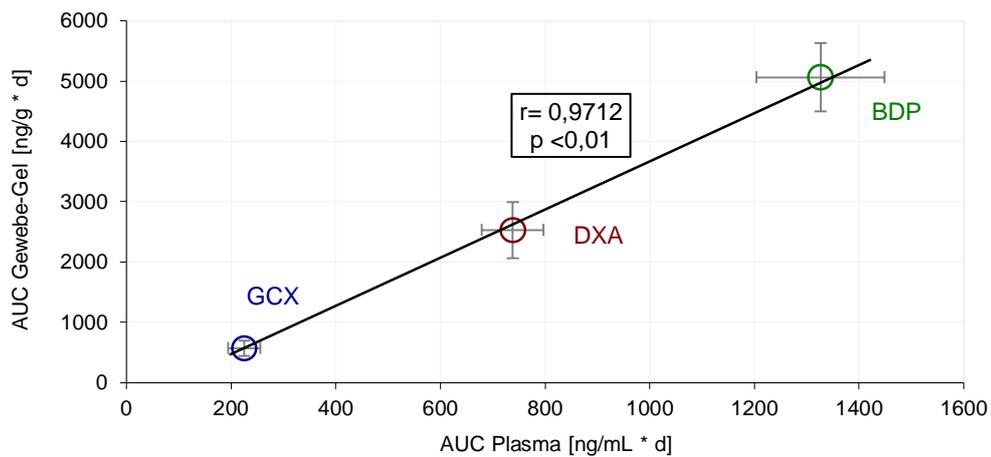


Abb. 27: Korrelation der Konzentrations-Zeit-Kurven (AUC) von DX, GCX und BDP im Gewebe und im Humanplasma. Die Verfügbarkeit der Glucocorticoide im Gewebe folgte demnach in erster Linie dem Konzentrationsgradienten vom Freisetzungsmedium in das Gewebekompartiment, weniger den mit der Lipophilie der Substanzen zusammenhängenden Gewebeeaffinität [97]. Zu berücksichtigen ist dabei, dass die AUC für DXA und BDP jeweils aus der Gesamtheit aller zugehörigen Abbauprodukte berechnet wurde (siehe auch Abb. 24), die weit weniger lipophil sind als DXA und BDP selbst. Korrelationskoeffizient nach Pearson $r = 0,9712$ (Daten nach Kolmogorov-Smirnov normalverteilt). Abweichungen CI 95 %, $n = 3$.

Bildete man den Quotienten aus der AUC für die Gewebe- zur der AUC der Plasmakonzentration, ergaben sich für DXA und BDP Verhältnisse mit Werten von 3,4 beziehungsweise 3,8. Für GCX wurde ein etwas niedrigerer Wert von 2,5 erhalten (siehe Abb. 28). Somit wurde GCX, bezogen auf die während des Versuchs im Humanplasma vorliegende Arzneistoffkonzentration, in geringstem Umfang in das Gewebe umverteilt, DXA und BDP insgesamt gesehen in etwa ähnlichem Umfang.

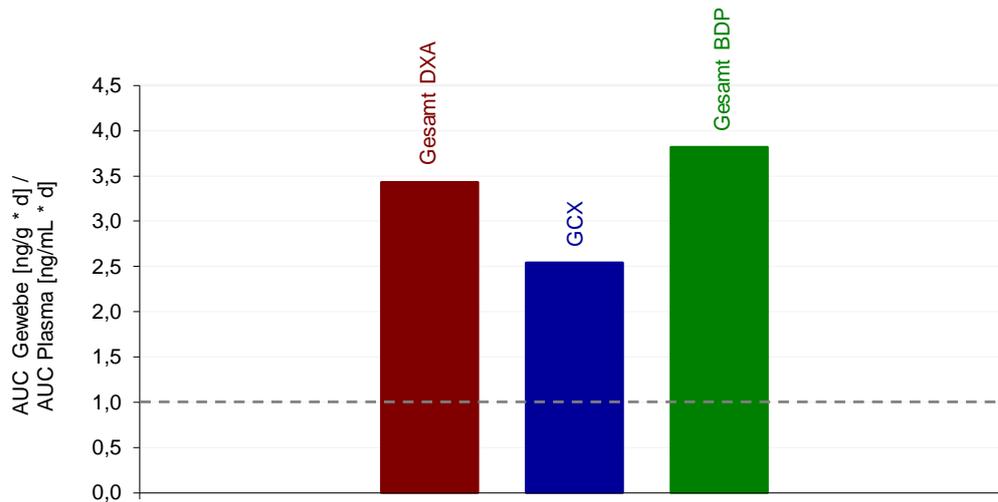


Abb. 28: Verhältnisse aus den Konzentrations-Zeit-Kurven (AUC) der Arzneistoffkonzentrationen in Herzgewebe zu den Arzneistoffkonzentrationen in Humanplasma. Wie für den an Gewebe gebundenen Arzneistoffanteil wurde zunächst für den im Humanplasma vorliegenden Teil die AUC berechnet. Der Bezug auf die während des Versuchs im Humanplasma vorliegenden Arzneistoffkonzentrationen veranschaulicht die starke Umverteilung der Glucocorticoide in das Gewebekompartiment (die gestrichelte Linie bei einem Verhältnis von 1,0 zeigt eine gleichmäßige Verteilung an).

3.3.2 Untersuchung der unspezifischen Bindung an Kunststoffmaterialien und der Bindung an die Kollagen-Matrix

Die unspezifische Bindung der drei getesteten Glucocorticoide an das Material des Modellaufbaus wurde unter Verwendung des vollständig aufgebauten Modells ohne jegliches Gel-Kompartiment durchgeführt (*für nähere Informationen zur Durchführung siehe Abschnitt 3.5*). Dabei zeigte sich für DXA eine Wiederfindung von $83 \pm 1 \%$, für GCX von $88 \pm 3 \%$ und für BDP von $89 \pm 10 \%$. Dies wurde bei der Auswertung in die Ergebnisse des Versuchs mit eingerechnet.

Neben der unspezifischen Bindung wurde auch die Bindung an die Kollagen-Matrix überprüft, indem die Versuche mit reinen Kollagen-Gelen ohne enthaltenes Herzgewebe durchgeführt wurden. Um das Ausmaß der Bindung an das 1,5 mL große Kollagen-Gel über den ganzen Versuchszeitraum zu veranschaulichen, wurde auch hier die Konzentrations-Zeit-Kurve für die Glucocorticoide im Kollagen-Gel berechnet, wie es bereits für das Plasma- und das reine Gewebe-Kompartiment getan wurde (*siehe voriger Abschnitt 3.3.1*). Zum Vergleich wurde diese auf die AUC der Glucocorticoide im Gewebe bezogen. Die AUC ergab sich jeweils zu $452 \pm 159 \text{ ng/mL} \cdot \text{d}$ für DXA, $32 \pm 43 \text{ ng/mL} \cdot \text{d}$ für GCX und $475 \pm 192 \text{ ng/mL} \cdot \text{d}$ für BDP im Kollagen-Gel. Die Verhältnisse der AUC in Kollagen zu Gewebe betragen schließlich 0,18 für DXA, 0,06 für GCX und 0,09 für BDP und zeigten damit für alle Arzneistoffe eine nur geringe Bindung der Arzneistoffe an die Gel-Matrix an (*siehe Abb. 29*).

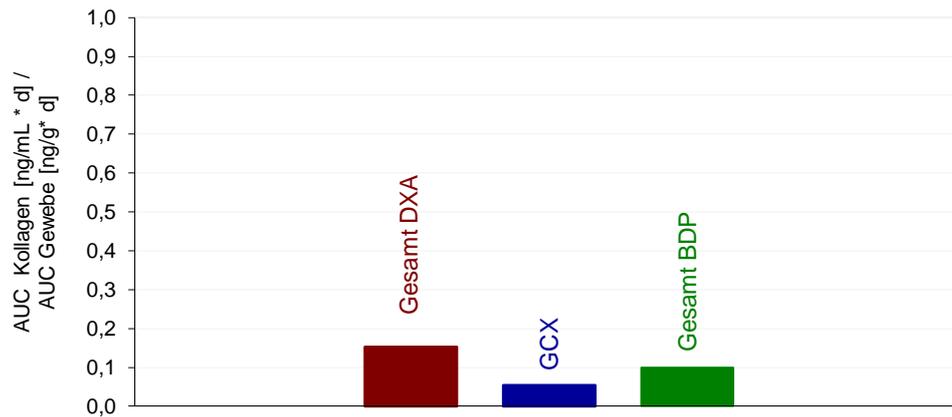


Abb. 29: Verhältnisse aus den Konzentrations-Zeit-Kurven (AUC) der Arzneistoffkonzentrationen im reinen Kollagen-Gel zu den Arzneistoffkonzentrationen im Herzgewebe. Wie für die an Gewebe gebundenen und im Plasma vorliegenden Arzneistoffanteile wurde zunächst die AUC für die an der Gel-Matrix gebundenen Glucocorticoide berechnet. Dafür wurden die Messergebnisse aus den reinen Kollagen-Gelen verwendet, die mitgeführt wurden, um den rein an das Herzgewebe gebundenen Glucocorticoid-Anteil ermitteln zu können. Das Verhältnis der AUC der Glucocorticoide im Kollagen-Gel zu der AUC im Gewebe veranschaulicht, dass die Arzneistoffe nur in geringem Ausmaß an die Matrix gebunden waren.

3.4 Diskussion der Gewebepbindungsversuche

Das entwickelte Modell stellt einen neuen Ansatz dar, mit dem die lokale Glucocorticoid-Dosis im Herzgewebe an der Implantationsstelle der Schrittmacherelektrode bestimmt werden kann. Es kombiniert dabei essentielle Aspekte dieser speziellen Applikationsform. Die grundlegenden Eigenschaften einer physiologischen Umgebung wurden mit der Verwendung humanen Plasmas und Herzgewebe aus dem Schaf durch *ex-vivo* Bedingungen simuliert. Ergänzt wurde dies durch die Einbettung des Gewebes in die Kollagen-Matrix. Dadurch wurde ein räumlich fixiertes Gewebe-Kompartiment geschaffen, auf dem die Freisetzungsmatrix der Schrittmacherelektrode gezielt appliziert werden konnte und es ermöglichte, das Humanplasma in einem permanenten Fluss über die so geschaffene Schnittstelle zwischen Elektrode und Gewebe zu leiten. So vermochte das Modell – der schematischen Beschreibung der pharmakokinetischen Vorgänge an der Elektrodenspitze in der akuten Phase nach Elektrodenimplantation in *Abb. 20* (*Abschnitt 3.1*) folgend – die dort angeführten Prozesse am Implantationsort zu adressieren. Dies umfasst die Freisetzung der Glucocorticoide aus der Polymermatrix sowie die Verteilungsvorgänge zwischen den verschiedenen beteiligten Kompartimenten – dem Plasmawasser als Lösungsmittel, den Plasmaproteinen und dem Gewebe. Eine *Clearance* der freigesetzten Glucocorticoide bezog das Modell zwar nicht mit ein, jedoch herrschten bei der als sehr niedrig einzustufenden Dosis im Humanplasma Sink-Bedingungen (*siehe Abschnitte 2.2 und 2.5*). Dies gewährleistete zumindest, dass eine Rückdiffusion der Arzneistoffe aus dem Gewebekompartiment in das Medium

stattfinden konnte. Der permanente Fluss sorgte außerdem, in Kombination mit den Sink-Bedingungen, für einen ständigen Verdünnungseffekt der lokal – in unmittelbarer Nähe zur Polymermatrix, direkt über dem Zielgewebe – erhöhten Glucocorticoid-Konzentrationen und ermöglichte damit gleichsam einen Abtransport der Substanzen aus dem Gewebe. So darf die Umverteilung auch unter den Modellbedingungen nicht als ein einseitig gerichteter Diffusionsprozess in das Gewebe angesehen werden.

Kritisch anzumerken bleibt, dass die Frage nach einer Korrelation der Modellergebnisse mit den tatsächlichen *in-vivo* Verhältnissen für diese Applikationsform derzeit nicht beantwortet werden konnte, was – wie eingangs des Kapitel bereits erwähnt (*siehe Abschnitt 3.1*) – der mangelnden Datenlage geschuldet war. Letzteres gab allerdings gleichzeitig überhaupt den Anlass zu den getätigten Untersuchungen. Somit sind die Ergebnisse des Versuchs zunächst für sich betrachtet als ein erster Schritt zur Untersuchung der Gewebefixierung unter den Bedingungen der Herzschrittmachertherapie zu bewerten. Indes darf als Qualitätsmerkmal gelten, dass durch die Wahl von *ex-vivo* Bedingungen und einer den Blutfluss imitierenden Konvektion bereits bei der Entwicklung des Modells versucht wurde den *in-vivo* Verhältnissen möglichst nahe zu kommen [78].

Hinsichtlich eines Vergleichs zwischen den drei untersuchten Glucocorticoiden konnten die Ergebnisse des neuen Modellansatzes als intern valide betrachtet werden. Diesen Schluss legte die Gegenüberstellung der Freisetzungsraten aus den Gewebefixierungsversuchen und den reinen Freisetzungsversuchen in Humanplasma (*siehe Abschnitt 2.4*) nahe. Trotz apparativ unterschiedlichen Aufbaus mit verschiedenen Konvektionsarten durch Schüttel- beziehungsweise Flussbewegung zeigte sich erneut für BDP insgesamt die umfangreichste Freisetzung. Bei Betrachtung der fünftägigen Freisetzungsphase war auch für DXA in den beiden unterschiedlichen Versuchsansätzen eine höhere Freisetzungsraten als für GCX zu beobachten. Erst bei der Versuchszeit von 28 Tagen wurde im reinen Freisetzungsversuch in Humanplasma eine leicht höhere Rate für GCX gegenüber DXA gemessen. Das Ausmaß der Freisetzung sowie die genauen Freisetzungsverhältnisse zwischen den Substanzen waren in beiden Versuchsansätzen allerdings teilweise unterschiedlich. So zeigte sich im Gewebefixierungsmodell für GCX und BDP jeweils eine um das ~2,4-fache beziehungsweise ~2,2-fache niedrigere Freisetzungsraten als im Freisetzungsversuch (für GCX $0,18 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$ vs. $0,44 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$ und für BDP $1,07 \pm 0,16 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$ vs. $2,34 \pm 0,12 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$). Für DXA hingegen konnte jeweils eine annähernd gleiche Freisetzungsraten ($0,58 \pm 0,08 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$ vs. $0,54 \pm 0,07 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$) gemessen werden. Dies mochte auf eine zu niedrig gewählte Flussrate hinweisen, da die Freisetzungsraten auch unter Sink-Bedingungen von der Stärke der Konvektion abhängt und gerade im Medium schlecht lösliche Substanzen hierauf sensibel reagieren [78]. Zwar sind definitionsgemäß alle drei Glucocorticoide als praktisch unlöslich in Wasser zu bezeichnen, jedoch besteht auch hier noch ein merklicher Unterschied zwischen DXA und den deutlich lipophileren GCX und BDP [44, 62, 72, 105]. Wie bereits

unter Abschnitt 3.2.1 erwähnt, wäre daher die Verwendung einer Pumpe höherer Leistung anzuraten, um die Durchflussrate anpassen zu können. Dennoch zeigten die Freisetzungsraten aus den Versuchen zur Gewebebindung und den Freisetzungsvorsuchen in Humanplasma prinzipiell ähnliche Verhältnisse unter den drei untersuchten Glucocorticoiden, wie die positive und statistisch signifikante Korrelation der Werte vermittelte (siehe Abb. 30). Insgesamt muss aber festgehalten werden, dass die Dosen von GCX und BDP in Relation zu DXA durch das Modell womöglich leicht unterschätzt wurden, was der niedrigen Flussrate geschuldet sein mochte.

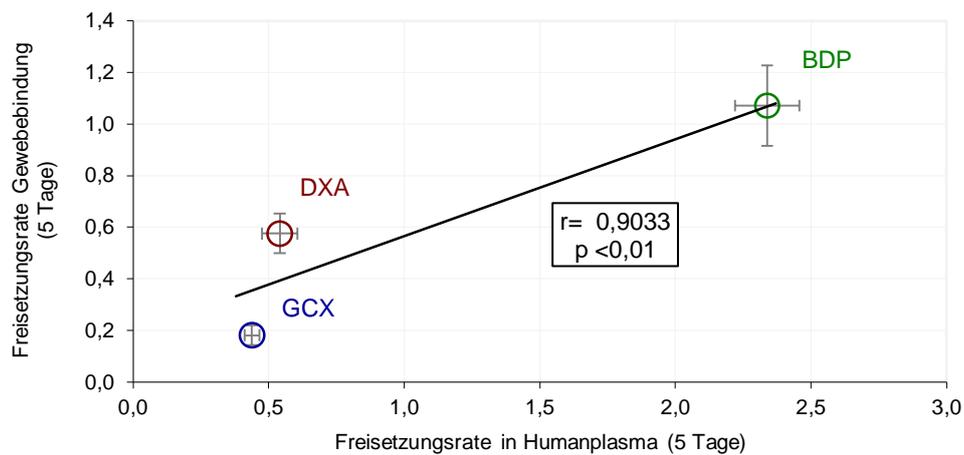


Abb. 30: Korrelation der Freisetzungsrates im Modell zur Bestimmung der Gewebebindung und in den reinen Freisetzungsvorsuchen in Humanplasma (siehe Abschnitt 2.4) über die Freisetzungsdauer von fünf Tagen für DXA, GCX und BDP. Trotz insgesamt niedrigerer Freisetzung der lipophilen GCX und BDP im Gewebebindungs- als im Freisetzungsvorsuch, jedoch ähnlicher Freisetzungsrates für DXA, zeigten die Versuche prinzipiell ähnliche Verhältnisse unter den drei untersuchten Glucocorticoiden, wie die positive und statistisch signifikante Korrelation der Werte belegte (Korrelation nach Pearson $r = 0,9033$, Daten nach Kolmogorov-Smirnov normalverteilt, $n = 3$).

Die Gewebebindung der Glucocorticoide ist in der Regel in starkem Maße von deren physikochemischen Eigenschaften, vor allem der Lipophilie abhängig [97]. So zeigen moderne Glucocorticoide hoher Lipophilie eine höhere Affinität und Verweildauer an Lungengewebe und der Nasenschleimhaut, aber auch in anderen Organen ist die Verfügbarkeit der Arzneistoffe durch dieses Charakteristikum in gleicher Weise beeinflusst [96, 106]. In den eigenen Versuchen konnte eine Umverteilung der Substanzen in das Herzgewebe jedoch nicht in ähnlich proportionaler Weise beobachtet werden. Die Verfügbarkeit im Herzgewebe korrelierte hingegen hochgradig mit der über die Zeit in das Humanplasma freigesetzten Dosis der Glucocorticoide (siehe Abb. 27 in Abschnitt 3.3.1). Die hohe freigesetzte Dosis des BDP im Plasma führte somit erwartungsgemäß auch zur höchsten Konzentration des Arzneistoffs im Gewebe über die Zeit, gefolgt von DXA, das jedoch wesentlich weniger lipophil als GCX ist. Augenscheinlich wurde die üblicherweise der Lipophilie der Substanzen folgende Gewebeaffinität also vom Konzentrationsgefälle

zwischen den Kompartimenten überstimmt und spielte für den Umverteilungsvorgang eher eine untergeordnete Rolle. Diese Einschätzung wird zusätzlich bei Betrachtung des Quotienten aus der AUC im Gewebe zur AUC im Plasma unterstützt, da sich GCX auch in Bezug auf dessen Verfügbarkeit im Plasma in geringstem Umfang unter den drei Glucocorticoiden ins Gewebe umverteilt. Während GCX einen Quotienten von 2,5 aufwies, konnte für DXA und BDP jeweils ein höherer Wert von 3,4 beziehungsweise 3,8 berechnet werden und stand damit für eine stärkere Umverteilung aus dem Humanplasma in das Gewebekompartiment für die beiden letztgenannten (*siehe Abb. 29 in Abschnitt 3.3.1*). Dabei ist zu berücksichtigen, dass die AUC für DXA und BDP sich jeweils aus der Gesamtheit aller zugehörigen Abbauprodukte zusammensetzte (*siehe auch Abb. 24*), die weit weniger lipophil sind als DXA und BDP selbst.

Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Bindung der Glucocorticoide an Plasmaproteine sein. Diese fällt bei GCX im Gegensatz zu dem nach Freisetzung ins Plasma praktisch vollständig als DX vorliegenden DXA vergleichsweise hoch aus [40, 44, 107]. Die Plasmaproteinbindung von BDP liegt mit ~87 % zwischen den Werten der beiden anderen Substanzen und dürfte insgesamt aufgrund des raschen Abbaus zu den weniger lipophilen B-17-P und BOH auch eher als geringer einzuschätzen sein als es dieser Wert vermittelt [41, 86]. Da nur der ungebundene Anteil zur Diffusion in das Zielgewebe zur Verfügung steht [49], vermindert eine hohe Affinität zu Plasmaproteinen die Verfügbarkeit im Gewebe. Die Plasmaproteinbindung gewinnt in den üblichen topischen Glucocorticoid-Anwendungen erst im Zuge des Abtransports unveränderten Arzneistoffs und dessen Metabolite an Relevanz, kommt es hier doch erst nach Diffusion einer Substanz aus den Zielgewebestrukturen der Haut oder der Atemwege in die Blutgefäße zu einer systemischen Exposition – den unerwünscht oral aufgenommenen Anteil bei der intranasalen oder pulmonalen Anwendung ausgenommen. Dabei wird eine hohe Bindung an Plasmaproteine für gewöhnlich als positiv bewertet, da dies zur Vermeidung unerwünschter systemischer Wirkungen beitragen soll [49]. Da dies im hier vorliegenden Sonderfall jedoch auch zu Einschränkung der Verfügbarkeit am Wirkort führen könnte, muss dieser Sachverhalt in diesem Fall zumindest ambivalent bewertet werden. Aufgrund der ohnehin sehr niedrigen Dosis, die unerwünschte Nebenwirkungen als unwahrscheinlich gelten lassen sollte, könnte dies aus pharmakokinetischer Sicht sogar als nachteilig anzusehen sein.

Da mit DXA und BDP zwei Prodrugs in die Untersuchung eingeschlossen wurden, ist die Betrachtung der Wirkstoffmengen im Zielgewebe relevant. Wenn auch durch die Verwendung von Humanplasma und Herzgewebe die metabolischen Prozesse in einem Organismus freilich nicht umfänglich darzustellen sind, kann die schnelle Umwandlung der Prodrugs unter Esterhydrolyse durch die biologische Restaktivität des *ex-vivo* Materials durchaus in gewissem Maße mit Daten aus *in-vivo* Untersuchungen in Einklang gebracht werden [86]. Für eine *in-vivo* Korrelation ist dies sicherlich zumindest als vorteilhafter zu bewerten als es ein rein künstlicher *in-vitro* Versuch gewesen wäre. Interessant zu

beobachten war die hohe Wiederfindung des B-17-P als Wirkform des BDP im Gewebe im Vergleich zum Plasma, was entweder auf einen stabilisierenden Effekt des Gewebes auf den Monoester oder lediglich als geringe metabolische Aktivität des verwendeten Humanplasmas und des Gewebes gewertet werden kann. Festzuhalten bleibt allerdings, dass die hohe AUC im Gewebe für das gesamte BDP aus der Summe aller seiner Abbauprodukte (*siehe Abb. 24 in Abschnitt 3.3.1*) im Wesentlichen eine zu hohe Einschätzung der Verfügbarkeit der eigentlichen Wirkform widerspiegelte. Gerade zum Messzeitpunkt nach fünf Tagen lag vornehmlich BOH im Gewebe vor, dessen relative Rezeptoraffinität mit einem Wert von 53 nur noch etwa die Hälfte von der des DX beträgt [45]. DX war im Gewebe deutlich besser konserviert als B-17-P, weshalb über den Zeitraum von fünf Versuchstagen eine höhere AUC im Gewebe für die Wirkform des DXA als für die des BDP berechnet werden konnte (*siehe Abb. 25 in Abschnitt 3.3.1*).

Weniger ausgeprägt als in den reinen Freisetzungsversuchen in Humanplasma zeigten sich die Bildung des 9,11-Epoxy-BOH und des 17-Oxo-DX (*siehe Abb. 24 in Abschnitt 3.3.1*). Die Ursache dessen wurde jedoch hier nicht näher untersucht.

Inwiefern sich die unterschiedliche Verfügbarkeit der Wirkstoffe im Gewebe letztlich klinisch bemerkbar machen würde, ließ sich anhand der Ergebnisse des Versuchs nicht beurteilen. Im Vergleich zur Standardsubstanz DXA ließen die Ergebnisse zu GCX und BDP jedoch nicht erwarten, dass diese eine geringere Wirkung zur Verhinderung des Reizschwellenanstiegs zeigen sollten. So könnten pharmakokinetische Nachteile wie eine geringere initiale Freisetzung und vor allem eine geringere Umverteilung an das Zielgewebe womöglich durch dessen höhere Potenz aufgefangen werden. BDP diffundierte sogar umfangreicher als DXA an den Wirkort, wonach auch für dieses Glucocorticoid, zumindest in der initialen Phase nach Elektrodenimplantation, voraussichtlich mit dem stärksten, mindestens aber einem ebenbürtigen klinischen Effekt gerechnet werden könnte. Aufgrund der ergiebigen Freisetzung zu Beginn, könnte sich jedoch eine mangelnde Langzeitwirkung des BDP als kritisch erweisen. Die Untersuchungen unter den *ex-vivo* Bedingungen des Modells ließen demnach für alle drei Substanzen eine hinreichende Verfügbarkeit erwarten, um die Funktion des Herzschrittmachers durch die pharmakologische Wirkung der Glucocorticoide zu unterstützen.

Das vorgestellte Modell zur Bestimmung der lokalen Bindung der Glucocorticoide an das Herzgewebe nach Implantation einer Herzschrittmacherelektrode wurde mit Blick auf die initiale Freisetzungs- und Umverteilungsphase entwickelt, da zu diesem Zeitpunkt mit Sicherheit eine Entzündung an der Implantationsstelle vorliegen sollte [108]. Für diesen Zeitrahmen konnten mit dem Modell erstmals Daten generiert werden, um die Umverteilungsverhältnisse in das Zielgewebe nach der direkten Freisetzung aus der Polymermatrix an der Elektrodenspitze in den systemischen Kreislauf einzuschätzen. Das Design des Modells sollte dabei einen Bezug zur *in-vivo* Situation herstellen. In der Langzeitbetrachtung sollten sich *in-vivo* die Freisetzungsbedingungen durch die fibröse Einkapselung der Elektrodenspitze jedoch merklich ändern. Dies wäre eventuell durch eine

Änderung des Modellansatzes zu berücksichtigen, bei dem die Polymermatrix in das Gewebekompartiment eingearbeitet würde, wie es mit einem rein artifiziellen Modell bereits versucht wurde [65]. Auf die Frage, inwiefern eine solche Langzeitverfügbarkeit der Glucocorticoide in der Herzschrittmachertherapie gewünscht und erforderlich ist, wird in den folgenden Abschnitten (*siehe insbesondere Abschnitt 4*) eingegangen.

3.5 Schlussfolgerung der pharmakokinetischen Untersuchungen zum Einsatz von Glucocorticoiden in der Herzschrittmachertherapie

Die pharmakokinetischen Untersuchungen umfassten zunächst Freisetzungsversuche in Methanol. Dabei konnte zum einen gezeigt werden, dass die Freisetzung mit den Modellvorstellungen zu einem dünnwandigen monolithischen Freisetzungssystem nach dem Quadratwurzelgesetz in Einklang stand und zum anderen nicht ausschließlich vom logP-Wert der Substanzen abhing. Die Freisetzungsgeschwindigkeit konnte in der Reihenfolge DXA > BDP >>> GCX festgehalten werden. Möglicherweise war die Freisetzung der Glucocorticoide aus der Matrix bereits durch den Verarbeitungsprozess des Polymers bei hohen Temperaturen beeinflusst, der zu unterschiedlichen Modifikationsänderungen der Substanzen führte. Auch Interaktionen funktioneller Gruppen der Arzneistoffe mit der Silikon-Matrix konnten eine Erklärung für den großen Unterschied zwischen BDP und GCX sein.

Die anschließenden Versuche zur Freisetzung der Glucocorticoide unter Simulation physiologischer Verhältnisse in Humanplasma und im neu entwickelten *ex-vivo* Modell, welches eine zusammenhängende Untersuchung der Freisetzung aus der Polymermatrix und der Diffusion der Arzneistoffe in das lokale Zielgewebe erlaubte, zeigten unabhängig voneinander jeweils für BDP die schnellste Freisetzung. Da für BDP auch die ausgiebigste Umverteilung in das Zielgewebe gemessen wurde, wäre für dieses initial auch mit der höchsten Wirkung zu rechnen, zumindest jedoch ebenbürtig zur Standardsubstanz DXA. Die im Vergleich zu DX weit höhere Potenz des B-17-P fördert diese Annahme zusätzlich. Auch für GCX könnte allerdings, trotz dessen geringerer Umverteilung im Vergleich zu den beiden anderen Glucocorticoiden, mit einer ausreichenden Effektivität zu rechnen sein, da diese Substanz ebenfalls weit potenter als DX ist. Die Langzeitwirkung für GCX sollte indes aufgrund seiner ähnlichen und konstanten Freisetzung im Vergleich zu DXA mindestens als ebenbürtig zu erwarten sein. Eine Extrapolation aus den eigenen Versuchen auf späte Zeitpunkte sollte jedoch mit großer Vorsicht bedacht werden, da sich die Freisetzungsbedingungen im weiteren Verlauf der Schrittmachertherapie durch die fibröse Einkapselung der Elektrodenspitze signifikant ändern sollten. Letzteres gilt freilich auch für BDP, dessen umfangreiche Freisetzung bereits zu Beginn sich im Langzeitverlauf als nachteilig erweisen könnte, da die Matrix bereits initial stark an Arzneistoff verarmt. Darüber hinaus findet wahrscheinlich nur eine geringere Akkumulation des potenten

Wirkstoffs B-17-P im Gewebe statt, da dieser weniger stabil ist als DX und GCX.

Neben dem pharmakokinetischen Vergleich von DXA, GCX und BDP konnte letztlich ein neuartiges *ex-vivo* Modell zur Untersuchung der Arzneistofffreisetzung und der Diffusion an das lokale Zielgewebe unter Berücksichtigung weitgehend physiologischer Verhältnisse entwickelt werden. Dieses Modell bietet überdies eine neue Möglichkeit zur Untersuchung weiterer Implantate als Schrittmacherelektroden.

4 *In-vitro* Versuche zur Stimulation von Endothelzellen mittels externem Herzschrittmachersystem

4.1 Fragestellung

Der Einsatz von Glucocorticoiden in der Herzschrittmachertherapie mittels lokalem Freisetzungssystem an der Elektroden Spitze beruht, wie es für die Arzneistoffe dieser Substanzklasse die Regel ist, aufgrund ihrer antiphlogistischen Wirkung [33]. Wie im einleitenden Teil der Arbeit bereits erörtert (*siehe Abschnitt 1.2.5 der Einleitung in Teil A*), gilt eine lokale Gewebeentzündung demnach als wahrscheinlichste Ursache des peakartigen Reizschwellenanstiegs nach Elektrodenimplantation [16, 31, 109]. Hierfür spricht vor allem die mit Glucocorticoiden erzielte Minderung des Reizschwellenanstieges innerhalb weniger Tage nach dem Eingriff selbst. Da mit Substanzen ohne antiinflammatorische Wirkung dies nicht erreicht wurde [33]. Der genaue Hintergrund der Glucocorticoid-Wirkung in Bezug auf die Reizschwellenentwicklung ist nach derzeitigem Kenntnisstand bislang ungeklärt [110]. Die Entzündung wird zum einen meist als Reaktion auf die Traumatisierung der Gefäßwand beziehungsweise des Herzgewebes verstanden [108], wobei der Grad der Verletzung dabei auch stark von der verwendeten Elektroden-Fixierung abhängt. Die aktive Fixierung mit einer Schraubwende führt im Allgemeinen zu höheren Reizschwellen als die passive Variante, bei der geringere Gewebeerletzungen erwartet werden [19]. Zum anderen – und für die chronische Entzündung wahrscheinlich ausschlaggebend – ist die Entzündung eine Reaktion auf die Elektrode als Fremdkörper, wie dies auch von Gelenkprothesen oder anderen Implantaten bekannt ist. Übersichtliche Darstellungen zu dieser Reaktion des Organismus auf Fremdkörper geben Coleman et al. [111] und Anderson et al. [17, 108]. Demnach wird die akute Phase nach Implantation analog zu einer klassischen Entzündungsreaktion mit Gewebeerletzung, nachfolgender Aktivierung des Komplementsystems und, je nach Schwere der Verletzung, der Gerinnungskaskade beschrieben. Nach Einwanderung Neutrophiler Zellen und Degranulation von Mastzellen sorgen chemotaktische Zytokine (z.B. Interleukine) für das Anlocken weiterer Immunzellen, vor allem Monozyten und Lymphozyten. Dies und das Auftreten phagozytotischer Zellen, Makrophagen, charakterisiert bereits den Übergang in die chronische Entzündungsphase. Vermittelt durch die Adsorption von Proteinen an die Oberfläche des eingebrachten Fremdkörpers, bleiben die Monozyten und Makrophagen an diesem haften. Die Makrophagen, die angetreten sind den Fremdkörper durch Phagozytose zu beseitigen, scheitern zwar zunächst an den Dimensionen des Implantats. Sie tragen jedoch über Umwege auch zur Vernarbung des Gewebes an der Implantationsstelle durch Bildung von Bindegewebe bei, indem sie durch weitere Chemotaxis zur Proliferation von Fibroblasten anregen. Sie spielen somit auch im Wundheilungsprozess eine wichtige Rolle. Die am Implantat anhaftenden Immunzellen

differenzieren in der weiteren Folge und beginnen sich zu mehrkernigen Riesenzellen (FBGCs, *foreign body giant cells*) zu vereinigen, die anschließend auf der Oberfläche des Fremdkörpers verweilen. Diese chronische Entzündungsphase dauert etwa zwei Wochen und bleibt auf die Implantationsstelle beschränkt [17]. Damit beginnt das Einwachsen des Fremdkörpers in eine fibröse Kapsel oder Hülle, was letztlich eine Reaktion auf die gescheiterte Beseitigung des den Organismus störenden Fremdenmaterials ist. Das Implantat soll auf diese Weise vom Rest des umliegenden Gewebes abgetrennt werden und dieses nicht weiter bei der Ausübung seiner Funktionen stören. Diese Art der Abkapselung stellt am Ende die Dauerform für das im Körper verweilenden Implantat dar und wird normalerweise nicht mehr als Entzündung betrachtet [111].

Im Fall einer Schrittmacherelektrode könnte dies bedeuten, dass der Zeitraum innerhalb der ersten Tage nach Implantation die entscheidende Phase für die Entwicklung der Reizschwelle sein könnte, da die Entzündung als Reaktion auf den operativen Eingriff beziehungsweise den Fremdkörper selbst nach etwa zwei bis drei Wochen zum Erliegen käme. Dies würde eine antiinflammatorische Glucocorticoid-Wirkung in den folgenden Jahren der Schrittmachertätigkeit überflüssig machen. Nach den bisherigen Annahmen, beruhend auf Untersuchungen zu Arzneistoff-Restgehalten explantierter Elektroden [92], und zu urteilen nach den Erkenntnissen aus den eigenen Freisetzungsversuchen (*siehe Abschnitte 2 und 3*), kann jedoch von einer jahrelangen Glucocorticoid-Exposition ausgegangen werden. Bei der Anwendung von Glucocorticoid-freisetzenden Elektroden können zwar über viele Jahre hinweg Reizschwellen gemessen werden, die stabil bei niedrigeren Werten liegen, als es mit Elektroden ohne Corticosteroid der Fall ist [16, 92, 112-114]. Inwiefern diese Beobachtung allerdings auf eine langjährige Glucocorticoid-Wirkung zurückzuführen ist oder ob eine Eindämmung der Entzündung in der initialen Phase bis hin zu etwa zwei oder drei Wochen für den Langzeiteffekt ausreichend wäre lässt sich nur vermuten. Nach aktuellem Kenntnisstand wurde eine derartige kurzfristige Glucocorticoid-Anwendung in diesem Zusammenhang bislang nicht untersucht. Einzig die Untersuchungen von Svensson et al. [25], die mit einer nur mit 30 µg Dexamethason beladenen Elektrode arbeiteten, könnten ob der geringen Dosis und des Einsatzes einer Ionenaustauschmembran als Freisetzungssystem – was wiederum, obwohl nicht näher beschreiben, auf das gut wasserlösliche Dexamethasonphosphat hinweist – als einen relativ kurz andauernden Glucocorticoid-Einsatz interpretiert werden. Dennoch konnte ein übermäßiger Reizschwellenanstieg erfolgreich vermieden und innerhalb des ersten Monats deutlich niedrigere Schwellen im Vergleich zu Glucocorticoid-freien Elektroden gezeigt werden. Das sich in der Folgezeit angleichende Reizschwellenniveau schrieben die Autoren den insgesamt sehr niedrigen Werten von <1 Volt zu [25].

Ein Herzschrittmachersystem mit samt Elektrode stellt allerdings nicht wie andere Implantate einen rein passiven Fremdkörper dar, sondern übt seine Funktion, den Sinusrhythmus des Herzens zu ersetzen oder zu unterstützen durch Abgabe eines permanenten elektrischen Stromimpulses aus – ist definitionsgemäß also ein aktives

Medizinprodukt [20]. Eine Elektrostimulation in dieser Form wurde bislang nicht hinreichend charakterisiert um ausschließen zu können, dass dies zu einer andauernden entzündlichen Reaktion des Gewebes an der Grenzfläche zur Elektrode führen könnte. Dies würde möglicherweise wiederum eine dauerhafte Glucocorticoid-Freisetzung notwendig machen, um die Reizschwelle auf dem beobachteten niedrigen Niveau zu halten, und könnte zu einer Erklärung des unterschiedlichen Reizschwellenniveaus in der Langzeitbetrachtung zwischen Elektroden mit und ohne Glucocorticoid beitragen.

Aus diesem Grund wurde der Frage, ob die für die Herzschrittmachertherapie typischen Stromimpulse zu einer lokalen Entzündung des Herzgewebes führen könnten und deshalb eine langjährige Glucocorticoid-Gabe notwendig machen würden, experimentell nachgegangen. Die Untersuchungen dienten zusätzlich als Grundlage für den Vergleich der Bioaktivitäten von DXA, GCX und BDP im nächsten Abschnitt der Arbeit (*siehe Abschnitt 5*). Sollte sich die elektrische Stimulation als proinflammatorisch erweisen, war es beabsichtigt, diesen pathologischen Reiz dort in einem *in-vitro* Versuch direkt für den Vergleich der Glucocorticoid-Wirkungen heranzuziehen.

4.2 Versuchsprinzip und Entwicklung

Der Versuch eine mögliche proinflammatorische Auswirkungen des Schrittmacherimpulses auf das zelluläre Gewebe, mit dem die Elektrode nach Implantation in Kontakt tritt, zu untersuchen, wurde *in-vitro* im Zellkultur-Modell angegangen. Die Grundidee bestand darin ein Schrittmachersystem aus Impulsgeber und originalen Elektroden in den Zellkulturansatz einzubringen, um in einem Monolayer gewachsene Endothelzellen dem elektrischen Reiz auszusetzen. Die Entscheidung auf Endothelzellen zurückzugreifen lag darin begründet, dass das endokardiale Gewebe im Allgemeinen als Fortsetzung der inneren Gefäßwand betrachtet wird und das Endokard an der Grenzfläche zur Elektrodenspitze hin somit mit einer dünnen Schicht aus diesem Zelltyp überzogen ist [1]. Darunterliegende Gewebsschichten bestehen aus elastischem Bindegewebe aus Kollagenfibrillen, Elastin und weiteren Bindegewebsbestandteilen wie bindegewebsbildenden Fibroblasten, an die die Myoblasten der quergestreiften Herzmuskulatur angrenzen und fortfolgend eingebettet sind [1, 5, 6] (*für weitere Informationen zur Anatomie des Endokards siehe auch Abschnitt 1.1 der Einleitung in Teil A*). Zudem sind Endothelzellen als Zellen des ersten Kontaktes in das akute Entzündungsgeschehen involviert und reagieren auf einen entzündungsauslösenden Reiz, wie einer Verletzung, zusammen mit Blutzellen mit der Aktivierung des Gerinnungssystems oder beispielsweise der Ausschüttung weiterer Entzündungsmediatoren und der Präsentation von Adhäsionsproteinen [115-117]. Da bereits im Arbeitskreis etabliert und aufgrund ihrer einfachen Handhabung als Zelllinie wurden letztlich EA.hy926 Zellen eingesetzt. Die Zelllinie ist eine Hybridisierung aus Endothelzellen der humanen

Nabelschnur (HUVECs, *human umbilical vein endothelial cells*) und menschlichen Lungenadenokarzinomzellen (A549) [118], die auf Reizung mittels Lipopolysaccharid (LPS), einem Pyrogen aus der Zellwand gram-negativer Bakterien, mit der Ausschüttung von Zytokinen der akuten Entzündung wie IL-6, IL-8 und MCP-1 reagieren [116, 119]. Eine LPS-Reizung ist auch bei anderen Zelllinien mit der Sekretion diverser Zytokine, beispielsweise MMP-9 oder Endothelin-1 verbunden [120-123] und wurde in den eigenen Versuchen als Positiv-Kontrolle zur Überprüfung einer erfolgreichen Entzündungsreaktion auf einen entsprechenden Reiz hin mitgeführt. Die Literaturangaben zur Ausschüttung von Zytokinen der eingesetzten EA.hy926 auf die LPS-Exposition sind zwar teilweise widersprüchlich, wie eigene Vorversuche zeigten liegt dies allerdings womöglich an der Herkunft, also dem Bakterienstamm, und der Fraktion des verwendeten LPS. So fiel eine IL-6 Ausschüttung in Test-Ansätzen mit LPS aus *E.coli*-Stämmen (*LPS aus Escherichia coli 111:04*) negativ aus. Die gleichen Ansätze zeigten auf LPS aus *Salmonella minnesota* hingegen eine deutliche Erhöhung der IL-6-Konzentrationen im Überstand.

Zur Simulation des Schrittmacherimpulses wurden Herzschrittmacherelektroden des Typs Siello T (BIOTRONK) eingesetzt, die über einen Adapter an einen eigens dafür konstruierten externen Impulsgeber angeschlossen wurden. Der Impulsgeber lieferte mit Gleichstrom (DC) Rechteckimpulse in der Höhe von 1 Volt und der Pulsbreite von 0,5 Millisekunden bei einer Frequenz von 1 Hertz. Diese Einstellung war fest programmiert und bildete beispielhaft die Parameter von Schrittmachern mit Glucocorticoid-freisetzenden Elektroden ab, die auch bei Einhaltung eines ausreichenden Sicherheitsfensters mit weniger als 2,5 Volt programmiert werden [27, 124]. Zur möglichst praxisnahen Simulation der Stromapplikation wurden die Elektroden mit deren Kathode an der Elektrodenspitze, also dem Stimulationskontakt oder auch *Tip* genannt, direkt mit den Endothelzellen in Berührung gebracht (*siehe Abb. 31*). Eine leichte Beschädigung der Zellschicht ließ sich, wenn überhaupt, zwar nur mit viel Vorsicht vermeiden. Die Versuchsanordnung führte jedoch auch dann noch über den Kontakt zum Zellkulturmedium zur Strom-Exposition und hätte wohl keinen Nachteil gegenüber bekannten Anordnungen gehabt, bei denen die Zellen meist in speziellen Schalen wachsen gelassen werden, welche über Elektroden oder Salzbrücken an den Stromgeber angeschlossen werden und ohnehin nur das Medium unter Spannung setzen. In andere Aufbauten wird ganz ohne Kontakt kapazitiv oder durch Induktion stimuliert [125]. Der direkte Einsatz der Elektroden im Zellkulturmedium barg einzig noch die Gefahr, dass sich Elektrodenmaterial ins Medium abscheiden konnte. Da dies jedoch Teil der Art der zu untersuchenden Stromapplikation war, wurde dies bewusst in Kauf genommen.

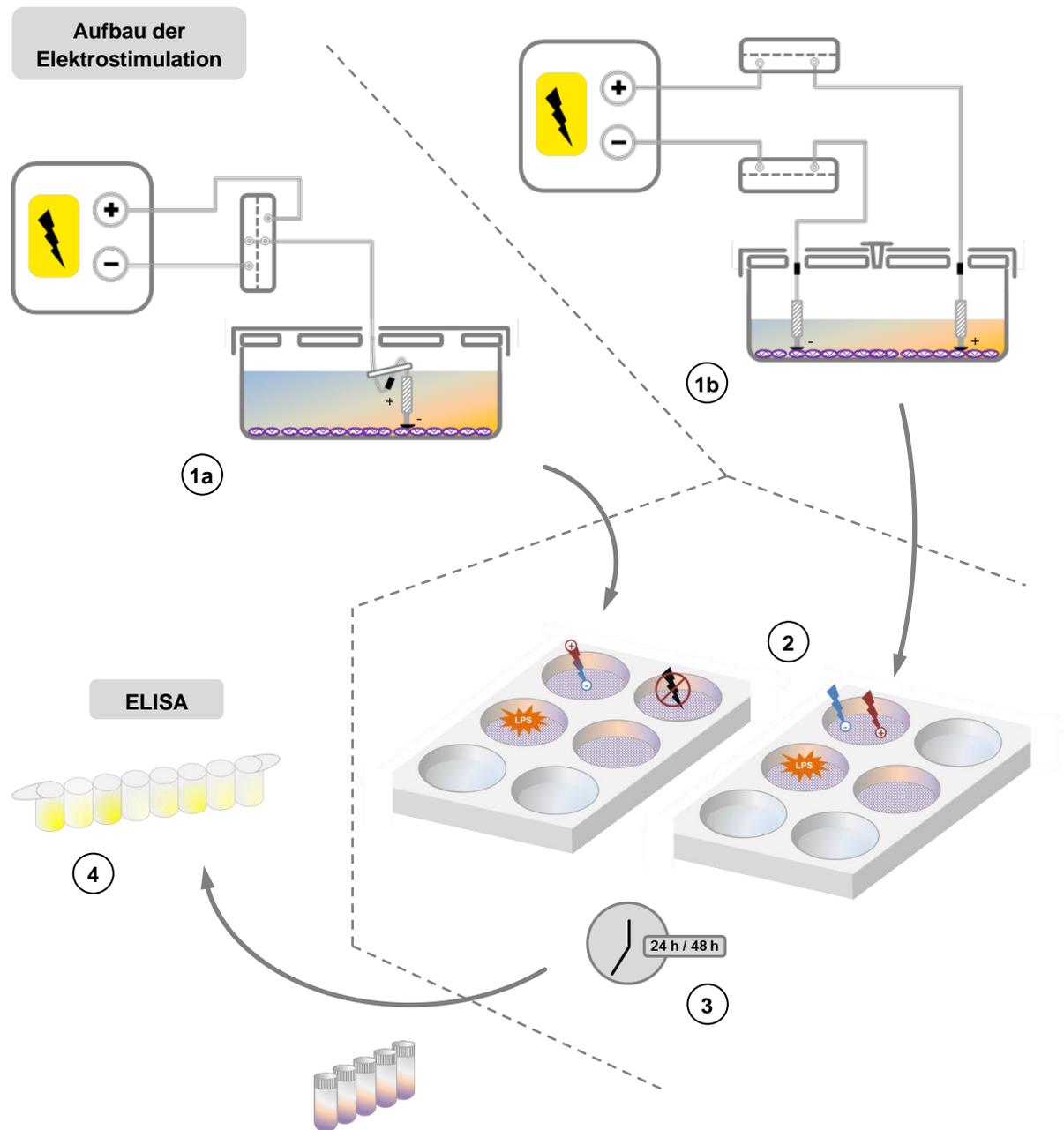


Abb. 31: Schematischer Versuchsaufbau zur elektrischen Stimulation von Endothelzellen (EA.hy926). (1a) zeigt die Stimulation mit einer bipolar geschalteten Elektrode (Variante A) bei der die Kathode an der Elektrodenspitze auf den Zellmonolayer platziert wurde. Da hierfür eine Benetzung der elektrodeneigenen Anode nötig war, wurde die Elektrode in einer Halterung S-förmig gebogen und 9 mL Zellkulturmedium eingesetzt. (1b) bildet die Anordnung mit zwei unipolar geschalteten Elektroden ab (Variante B), wobei der gleiche Elektrodentyp wie bei Variante A verwendet wurde, keine zusätzliche Halterung nötig war und 3 mL Zellkulturmedium zur Benetzung von Kathode und Anode genügten. Die unterschiedliche Schaltung der Elektrode bei gleichem Elektrodentyp war durch die Verwendung einer beziehungsweise zweier Adapter möglich, über welche die Elektroden an den Impulsgeber angeschlossen wurden. Dieser entsandte elektrische Rechteckimpulse mit 1 Volt, 0,5 Millisekunden und in einer Frequenz von 1 Hertz. Neben der Elektrostimulation in Variante A beziehungsweise B wurden Zellen zur Positiv-Kontrolle mit LPS zu einer Entzündungsreaktion gereizt und zweierlei Negativ-Kontrollen mitgeführt, von der eine lediglich aus dem Zellmonolayer aus EA.hy926 bestand, die andere aus dem Zellmonolayer und eine stromlose Elektrode (2). Letzteres diente zum Ausschluss einer Reaktion der Zellen auf das Elektrodenmaterial und wurde nur in Variante A durchgeführt. Alle Ansätze wurden bei 37 °C inkubiert, Variante A 24 Stunden lang, Variante B 48 Stunden lang (3). Nach 24 und gegebenenfalls 48 Stunden wurde die Überstände aller Ansätze auf IL-6, IL-8, MCP-1 und MMP-9 mittels ELISA untersucht (4). Außerdem wurde die Variante B auf VEGF getestet, ebenfalls mittels ELISA.

Ferner wurden sicherheitshalber zwei verschiedene Elektrodenanordnungen untersucht. In der ersten Variante (Variante A) wurde eine Elektrode verwendet und bipolar geschaltet, in der zweiten Variante (Variante B) wurden zwei Elektroden gleichen Typs unipolar an den Impulsgeber angeschlossen. Da der Stromkreis in Variante A durch beide Pole an *Tip* und *Ring* geschlossen wurde (bipolare Schaltung), mussten diese zuverlässig in Kontakt zum Medium stehen, wofür deren ursprünglich konstruktionsbedingter Abstand von etwa 14 mm allerdings zu groß war. Somit wurde eine zusätzliche Halterung eingesetzt, die durch Biegung der Elektrode zwischen *Tip* und *Ring* den Abstand zwischen beiden Polen auf etwa 4 mm verkürzte und beide Kontakte vollständig in das Medium eintauchen ließ (siehe Abb. 31, für Informationen zur Halterung auch Abschnitt 4 im Experimentellen Teil C). Variante B funktionierte ohne diese Halterung, schließlich wurde nur der *Tip* jeder Elektrode an den Impulsgeber angeschlossen und eine Elektrode diente als Gegenpol zur anderen (unipolare Schaltung), der Ring blieb ohne Funktion.

Die unterschiedlichen Varianten dienten dazu verschiedene Ausbreitungen des elektrischen Feldes in Abhängigkeit der relativen Lage von Kathode zu Anode zu berücksichtigen, da die Möglichkeit erwogen wurde, dass durch räumlich übereinander liegenden Pole, wie dies in Variante A mit einer einzigen Elektrode der Fall war, nur eine geringe Anzahl an Zellen vom elektrischen Feld erfasst würden und somit auf die Stimulation ansprechen konnten (siehe Abb. 32). Der Abstand beider Pole in Variante B lag bei etwa 20 mm, war also größer als in Variante A (~4 mm). Dies hatte wiederum Auswirkungen auf die elektrische Feldstärke E , die nach *Fml. 6* umgekehrt proportional zum Abstand L beider Pole ist. Die berechneten Feldstärken der Stromimpulse lagen demnach bei 250 mV/mm beziehungsweise 50 mV/mm für Variante A und B, die Spannung der Impulse war mit 1 Volt vorgegeben.

$$\text{Fml. 6} \quad E = U / L$$

Mit:

E = elektrische Feldstärke [mV/mm]

U = Spannung [mV]

L = Abstand von Kathode zu Anode [mm]

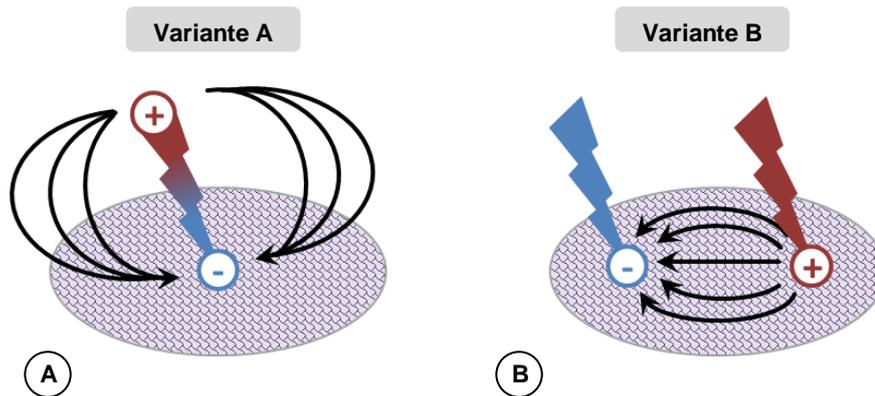


Abb. 32: Schematische Darstellung unterschiedlicher elektrischer Felder bei beiden untersuchten Elektrodenanordnungen. (A) zeigt die bipolare Verwendung einer Elektrode mit Anode an der Elektrodenspitze (*Tip*) und räumlich oberhalb gelegener Kathode (*Variante A*). Der *Tip* berührte den Zellmonolayer, der *Ring* lag im Modell im Abstand von etwa 4 mm schräg darüber. Der ursprünglich konstruktionsbedingte Abstand der Pole an *Tip* und *Ring* von etwa 14 mm wurde durch die Verwendung einer Halterung verkürzt und war für eine zuverlässige und vollständige Benetzung des Gegenpols nötig (*siehe auch Abb. 31*). (B) illustriert die elektrischen Feldlinien beim Einsatz zweier unipolar geschalteten Elektroden, bei der die Pole am Ring nicht angeschlossen wurden, sondern die zweite Elektrode den Gegenpol darstellte. Hierbei lagen beide Pole in einer Ebene auf dem Zellmonolayer.

Beide Varianten wurden in separaten Ansätzen untersucht. Wie bereits erwähnt wurde als Kontrolle einer positiven Entzündungsreaktion der Endothelzellen parallel eine Stimulation mittels LPS durchgeführt. Als Negativ-Kontrollen fungierten Zellen ohne weitere Zusätze und bei Variante A wurde zusätzlich das bloße Einbringen der Elektrode ohne Strom kontrolliert (*siehe Abb. 31*), um negative Materialeffekte ausschließen zu können. Der Zellmonolayer wurde in Variante A 24 Stunden lang bei 37 °C stimuliert, in Variante B 48 Stunden. Nach 24 und gegebenenfalls 48 Stunden wurden die Konzentrationen der Entzündungsmarker IL-6, IL-8, MCP-1 und MMP-9, sowie die des Wachstumsfaktors VEGF (*vascular endothelial growth factor*) mittels ELISA bestimmt. Die Untersuchung des VEGF sollte einen Hinweis darüber liefern, ob die Stromapplikation möglicherweise im Sinne eines die Wundheilung fördernden Prozesses zur vermehrten Zellproliferation anregte [126]. Nach Beendigung des Versuchs wurden die Zellen aller Ansätze geerntet und die Zellzahl unter dem Mikroskop mittels Hämocytometer bestimmt. Die Ergebnisse der ELISA-Messungen der Überstände wurden zur Normalisierung auf die Zellzahl bezogen (*für nähere Informationen zur Versuchsdurchführung und zu den ELISA-Messungen siehe Abschnitte 4.4 und 4.5 im Experimentellen Teil C*).

4.3 Ergebnisse der Elektrostimulationsversuche

4.3.1 Ergebnisse nach 24 Stunden und einer bipolaren Elektrode

Für die Elektrodenanordnung in Variante A wurden IL-6 und IL-8 in achtfacher ($n=8$), MMP-9 und MCP-1 in dreifacher Wiederholung ($n=3$) untersucht (siehe *Abb. 33*). Die Positiv-Kontrolle zeigte für alle Marker eine signifikant höhere Ausschüttung der Entzündungsmediatoren nach 24 Stunden im Vergleich zur Negativ-Kontrolle. IL-6 war mit $3,3 \pm 0,5$ pg/mL gegenüber der Basissekretion von $0,8 \pm 0,1$ pg/mL signifikant erhöht ($n=8$; 95 % CI; $p < 0,01$), ebenso wie IL-8 mit $70,1 \pm 9,7$ pg/mL vs. $21,6 \pm 7,6$ pg/mL ($p < 0,01$), MMP-9 mit $4,2 \pm 0,3$ pg/mL vs. $2,3 \pm 0,8$ pg/mL ($n=3$; $p < 0,01$) und MCP-1 mit $74,6 \pm 14,7$ pg/mL vs. $23,9 \pm 2,9$ pg/mL ($p < 0,01$). Die Stimulation mit dem Schrittmacherimpuls resultierte in einer IL-6 Konzentration von $0,9 \pm 0,1$ pg/mL und lag demnach auf dem Niveau der Negativ-Kontrolle ($p=0,30$). Auch IL-8, MMP-9 und MCP-1 waren mit Werten von $34,4 \pm 14,0$ pg/mL ($p=0,13$), $2,3 \pm 0,5$ pg/mL ($p=0,98$) beziehungsweise $22,2 \pm 3,8$ pg/mL ($p=0,55$) nicht signifikant vermehrt im Überstand zu finden. Eine Irritation der Zellen durch das Elektrodenmaterial konnte dadurch gleichfalls ausgeschlossen werden. Dementsprechend zeigten auch die Ansätze mit stromlosen Elektroden keinen Unterschied zur Basisausschüttung (IL-6 mit $0,8 \pm 0,1$ pg/mL, $p=0,88$; IL-8 mit $25,5 \pm 7,7$ pg/mL, $p=0,75$, MMP-9 mit $2,1 \pm 0,3$ pg/mL, $p=0,59$ und MCP-1 mit $21,9 \pm 4,3$ pg/mL, $p=0,74$).

B Allgemeiner Teil

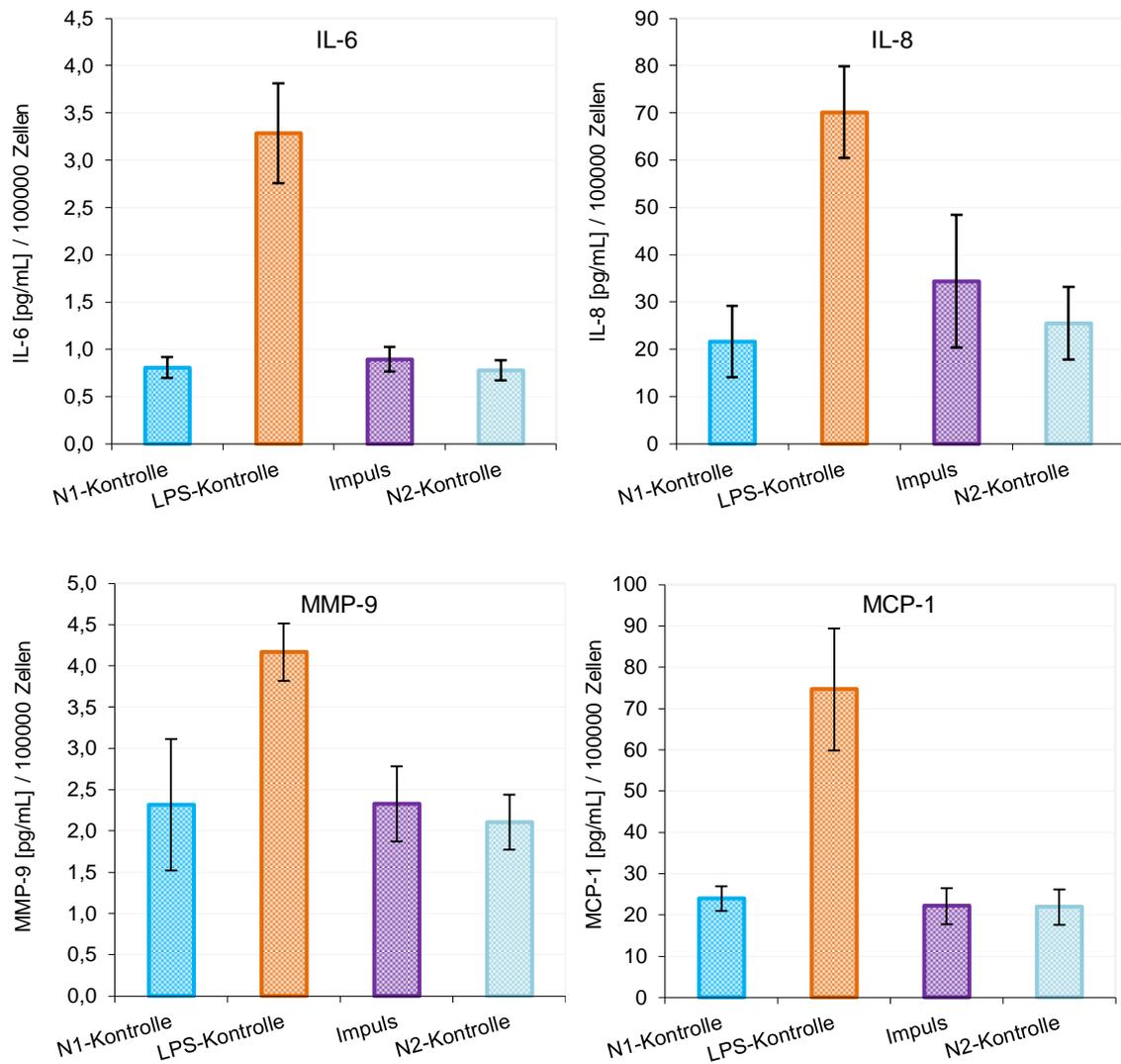
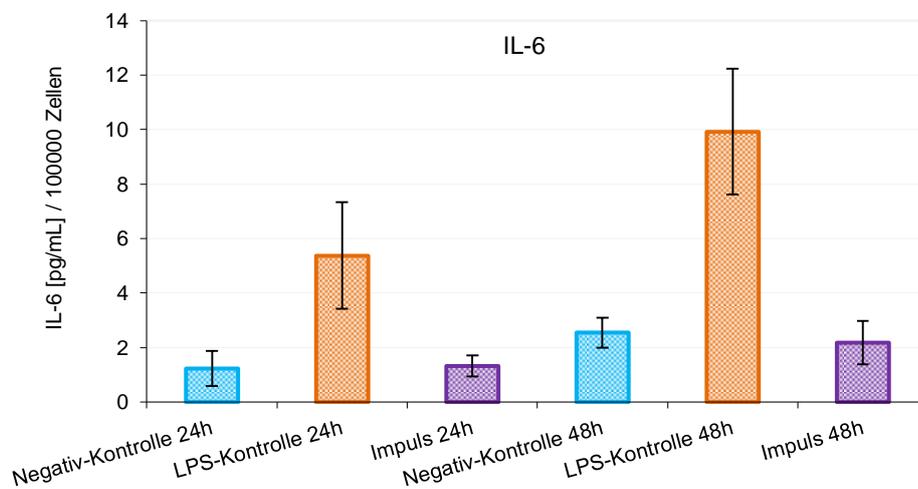


Abb. 33: Konzentrationen der Entzündungsmarker IL-6, IL-8, MMP-9 und MCP-1 nach 24 Stunden langer Stimulation von Endothelzellen EA.hy926 mit typischen Schrittmacherimpulsen, die über eine bipolare Schrittmacherelektrode (Variante A) des Typs Siello T (BIOTRONIK) appliziert wurden. Ein Zusatz von 5 $\mu\text{g/mL}$ LPS diente als Positiv-Kontrolle (*LPS-Kontrolle*) für die entzündliche Reizung der Zellen und war für alle Marker gegenüber der Basisexpression in der Negativ-Kontrolle (*N1-Kontrolle*), bestehend aus einem Zellmonolayer und Nährmedium, signifikant erhöht. Die Anwendung der schrittmachertypischen Stromimpulse (*Impuls*) zeigte für keinen gemessenen Marker eine signifikant stärkere Ausschüttung im Vergleich zur N1-Kontrolle. Eine ungewollte Reaktion auf das Material der Elektrode (*N2-Kontrolle*) konnte ausgeschlossen werden, da sich auch bei bloßem Einbringen einer stromlosen Elektrode in die Kulturschale zu dem Zellmonolayer keine statistisch signifikant veränderte Expression der Entzündungsmarker feststellen ließ. Abweichungen CI 95 %, $n = 8$ (IL-6 und IL8), $n = 3$ (MMP-9 und MCP-1).

4.3.2 Ergebnisse nach 24 und 48 Stunden mit zwei unipolaren Elektroden

Die Elektrostimulation mit dem Schrittmacherimpuls in Variante B, also bei unipolarer Schaltung zweier Elektroden (siehe Abb. 34), führte nach 24 Stunden zu einer Konzentration von $1,3 \pm 0,4$ pg/mL an IL-6 und damit wie bereits in Variante A nicht zu einer erhöhten Ausschüttung des Entzündungsmarkers gegenüber der Basisexpression der EAhy.926 von $1,2 \pm 0,7$ pg/mL ($n= 3$, CI 95 %, $p= 0,88$). Dies bestätigte sich für IL-8 mit $42,6 \pm 18,2$ pg/mL vs. $42,5 \pm 18,8$ pg/mL ($p= 0,99$) und für MMP-9 mit $4,8 \pm 0,5$ pg/mL vs. $4,5 \pm 0,4$ pg/mL, die nicht in signifikant erhöhter Konzentration im Überstand vorlagen ($p= 0,44$). Schließlich zeigte sich auch für MCP-1 nach 24 Stunden mit Konzentrationen von $164,6 \pm 24,7$ pg/mL vs. $189,4 \pm 24,6$ pg/mL keine wesentliche Differenz zwischen der Elektrostimulation und der Negativ-Kontrolle ($p= 0,32$). Die Positiv-Kontrolle zeigte demgegenüber für alle Entzündungsmarker deutlich erhöhte Werte und belegte damit abermals die prinzipielle Reizbarkeit der Endothelzellen (mit $5,4 \pm 2,0$ pg/mL für IL-6, $p= 0,03$; $138,8 \pm 19,3$ pg/mL für IL-8, $p < 0,01$; $13,0 \pm 3,3$ pg/mL für MMP-9, $p < 0,01$; $309,2 \pm 64,8$ pg/mL für MCP-1, $p= 0,02$).

Die Proben nach 48 Stunden Stimulationsdauer ergaben das gleiche Bild wie bereits 24 Stunden zuvor. Bei Elektrostimulation wurden $2,2 \pm 0,8$ pg/mL IL-6 gemessen, die Negativ-Kontrolle zeigte $2,6 \pm 0,6$ pg/mL ($p= 0,71$). Für IL-8 führte die Elektrostimulation zu $78,2 \pm 32,3$ pg/mL vs. $76,5 \pm 27,9$ pg/mL bei Basissekretion ($p= 0,95$), für MMP-9 zu $16,1 \pm 4,1$ pg/mL vs. $13,4 \pm 2,1$ pg/mL ($p= 0,41$) und für MCP-1 zu $286,2 \pm 76,5$ pg/mL vs. $331,6 \pm 74,5$ pg/mL ($p= 0,53$). Die Positiv-Kontrolle bewies auch nach 48 Stunden noch ein ausreichendes Ansprechen auf LPS als Entzündungsreiz, auch wenn die Erhöhung des MCP-1 gerade nicht statistisch signifikant war ($504,3 \pm 115,0$ pg/mL MCP-1, $p= 0,07$; $9,9 \pm 2,3$ pg/mL IL-6, $p= 0,04$; $267,0 \pm 36,0$ pg/mL IL-8, $p < 0,01$; $51,3 \pm 6,1$ pg/mL MMP-9, $p < 0,01$).



Fortsetzung nächste Seite

B Allgemeiner Teil

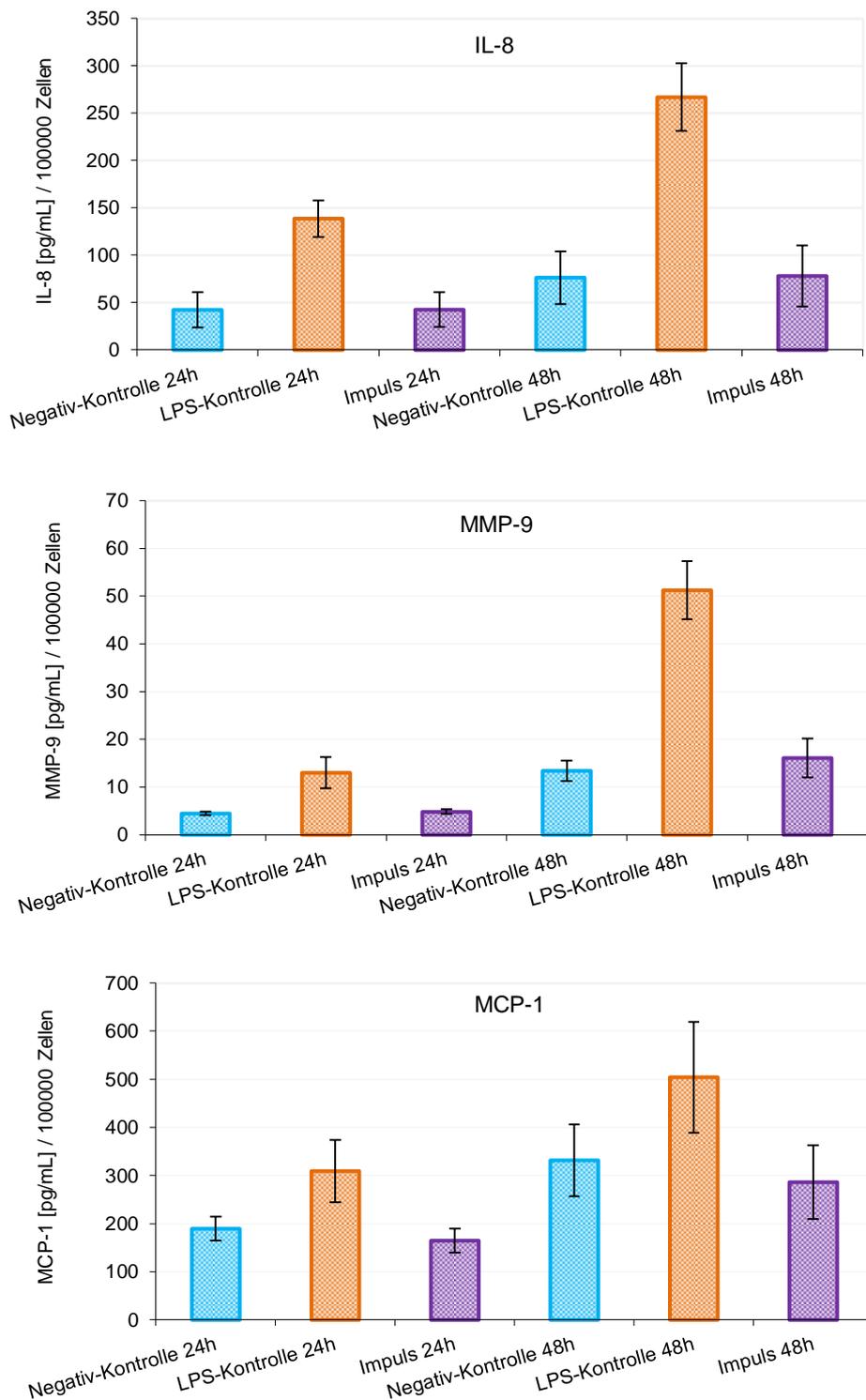


Abb. 34: Konzentrationen der Entzündungsmarker IL-6, IL-8, MMP-9 und MCP-1 nach 24 und 48 Stunden langer Stimulation von Endothelzellen EA.hy926 mit typischen Schrittmacherimpulsen, die über zwei Herzschrittmacherelektroden in unipolarer Schaltung (Variante B) des Typs Siello T (BIOTRONIK) appliziert wurden. Ein Zusatz von 5 µg/mL Lipopolysaccharid (LPS) diente als Positivkontrolle (*LPS-Kontrolle*) für die entzündliche Reizung der Zellen und war für alle Marker gegenüber der Basisexpression in der Negativkontrolle (*N1-Kontrolle*), bestehend aus einem Zellmonolayer und Nährmedium, signifikant erhöht. Die Anwendung der Schrittmachertypischen Stromimpulse (*Impuls*) zeigte für keinen gemessenen Marker eine signifikant stärkere Ausschüttung im Vergleich zur N1-Kontrolle. Abweichungen CI 95 %, n= 3.

Die Messungen des Wachstumsfaktors VEGF in den Überständen der elektrisch stimulierten Versuchsansätze in Variante B (siehe Abb. 35) ergaben nach 24 und 48 Stunden mit $6,1 \pm 3,6$ pg/mL und $9,7 \pm 5,4$ pg/mL zwar keine Erhöhung gegenüber der Negativ-Kontrolle, für welche $4,5 \pm 1,6$ pg/mL beziehungsweise $11,0 \pm 4,3$ pg/mL ermittelt wurden. Jedoch führte auch die Exposition mit LPS nicht zu einer verstärkten Sekretion des Wachstumsfaktors, da nach 24 Stunden Stimulationsdauer lediglich eine Konzentration von $6,9 \pm 2,3$ pg/mL VEGF und nach 48 Stunden von $11,4 \pm 5,8$ pg/mL VEGF gemessen wurde, was sich ebenso wenig von der Basissekretion unterschied ($n= 3$; $p= 0,61$ für 24 Stunden, $p= 0,92$ für 48 Stunden).

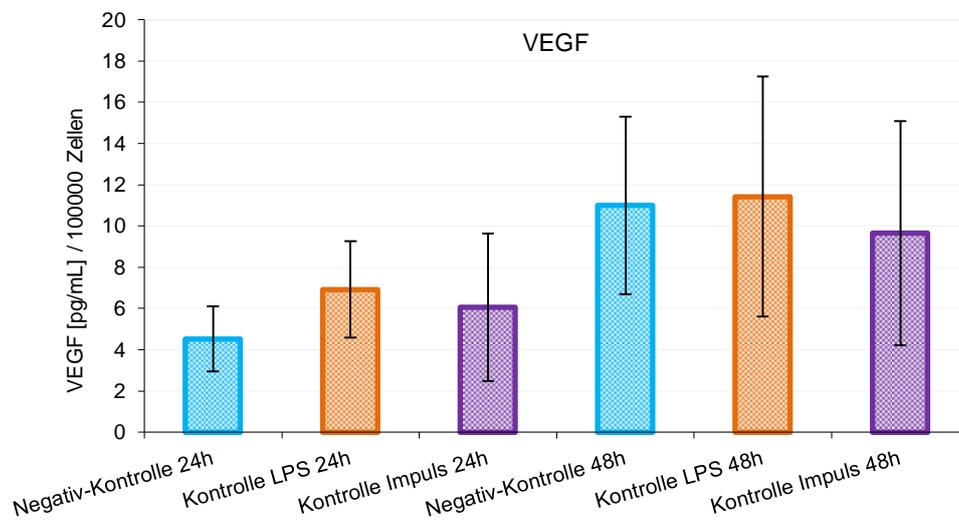


Abb. 35: Konzentrationen des Wachstumsfaktors VEGF nach 24 und 48 stündiger Stimulation über zwei Elektroden in unipolarer Schaltung (Variante B). Die Anwendung der schrittmachertypischen Stromimpulse (*Impuls*) zeigte für keinen gemessenen Marker eine signifikant stärkere Ausschüttung im Vergleich zur Basisexpression in der Negativ-Kontrolle (*N1-Kontrolle*), bestehend aus einem Zellmonolayer und Nährmedium. Da der Versuch für die Untersuchung der Expression von Entzündungsmarkern konzipiert war, wurde ein Ansatz mit Zusatz von $5 \mu\text{g/mL}$ Lipopolysaccharid (LPS) mitgeführt, der vormals als Positiv-Kontrolle fungierte (*LPS-Kontrolle*), dafür jedoch bei der Messung von VEGF nicht zu gebrauchen war. Eine signifikante Erhöhung gegenüber der N1-Kontrolle lag nicht vor. Abweichungen CI 95 %, $n= 3$.

4.4 Diskussion

Mit den geschilderten *in-vitro* Ansätzen wurden erstmal Zellkulturversuche unternommen, in denen Stromimpulse, wie sie für einen Herzschrittmacher charakteristisch sind, auf einen proinflammatorischen Einfluss auf Endothelzellen untersucht wurden. Für beide untersuchten Elektrodenanordnungen konnte keine statistisch signifikant erhöhte Ausschüttung der Entzündungsmarker IL-6, IL-8, MMP-9 und MCP-1 nach 24 und 48 Stunden langer Stimulation nachgewiesen werden, wohingegen die mitgeführte LPS-Stimulation eine prinzipielle Ansprechbarkeit der verwendeten Zelllinie EA.hy926 auf

einen inflammatorischen Reiz bewies. Diese Form der elektrischen Stimulation stellte daher im gewählten *in-vitro* Modell keinen Entzündungsreiz dar.

Die Zytokine IL-6, IL-8 und MCP-1 spielen nach Kaplanski et al. [127] wichtige Rollen im Verlauf einer Entzündung. Demnach führt die Freisetzung von vor allem IL-8 in der Frühphase zur Einwanderung neutrophiler Zellen und die nach einigen Stunden einsetzende und über mehrere Tage anhaltende MCP-1-Expression zu einer Anreicherung von Monozyten am Ort der Entzündung. IL-6 scheint eine regulierende Rolle dabei zu spielen, welcher Immunzelltyp im weiteren Verlauf einer Entzündung vornehmlich rekrutiert wird, indem es Endothelzellen zu weiterer IL-8 und MCP-1 Sekretion anregt [127]. Da der Nachweis einer Entzündungsreaktion über die beteiligten Zytokine also auch vom richtigen Zeitpunkt der Probenentnahme aus dem *in-vitro* Modell abhängen kann, wurden mehrere Marker untersucht, die in den verschiedenen Phasen von der akuten zur chronischen Entzündung in unterschiedlich hohem Maß auftreten können. Über die Probenzugzeitpunkte nach 24 und 48 Stunden wurde dies ebenfalls zu berücksichtigen versucht. Dass der gewählte Schrittmacherimpuls keinen proinflammatorischen Einfluss zeigte, lässt sich möglicherweise durch die spezielle Art der Stromanwendung begründen, denn in früheren *in-vitro* Untersuchungen zu Auswirkungen elektrischer Stimulation wurde durchaus eine Erhöhung von IL-6 und IL-8 festgestellt [126, 128]. Für Fibroblasten wurde dies beispielsweise sowohl auf mRNA-Ebene als auch durch direkten Nachweis der sekretierten Proteine mittels ELISA nach 4 und 6 Tagen gezeigt [128], bei HUVECs gelang dies für IL-8 schon innerhalb von 24 Stunden [126]. Die elektrischen Feldstärken lagen in diesen Versuchen mit 50 bis 200 mV/mm in einem zu den eigenen Versuchen vergleichbaren Bereich (*siehe Abschnitt 4.2*) und sollte somit nicht ausschlaggebend gewesen sein. Jedoch handelte es sich bei den literaturbekannten Modellen, in denen meist Wundheilungsprozesse betrachtet wurden, um kontinuierlich angelegte Spannungen, nicht um Impulse. Dass sich die Zellen in den eigenen Versuchen immer wieder nur für die Dauer der Impulse von 0,5 Millisekunden dem Stimulus ausgesetzt sahen und nicht dauerhaft unter Spannung standen, könnte letztlich für das Ausbleiben einer proinflammatorischen Reaktion entscheidend gewesen sein. Die Ausbreitung des elektrischen Feldes, die durch die beiden unterschiedlichen Varianten der Elektrodenanordnung berücksichtigt wurde, schien dagegen keinen Einfluss zu nehmen, wie die durchgeführten Versuche zeigten.

Yamazaki et al. [129, 130] gingen bereits der Frage nach, ob eine epikardiale elektrische Schrittmacherstimulation zu einer Entzündung des Herzgewebes führen würde und stellten bei ihren *in-vivo* Versuchen im Hund anhand Gewebeproben eine lokal erhöhte MMP-9 Aktivität im Epikardium fest. Für das Endokardium zeigten sie funktionelle Beeinträchtigungen, die möglicherweise auf Umbildungsprozessen (*Remodeling*) im Gewebe beruhten und durch die elektrische Stimulation hervorgerufen wurde. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde auch MMP-9 in die eigenen Untersuchungen eingeschlossen. Darüber hinaus erhöht die Matrixmetalloproteinase die Aktivierung von

IL-8 am Entzündungsort [131] und ergänzte für die eigenen Untersuchungen damit die Reihe der beobachteten Entzündungsmarker. Interessant war MMP-9 aber auch gerade aufgrund seiner Beteiligung am *Remodeling* als Antwort auf elektrische Beeinflussung [132], da Umbauprozesse im myokardialen Bindegewebe möglicherweise nicht nur zu funktionellen Beeinträchtigung des Endokards führen [130, 132], sondern mit lokaler Vernarbung des Gewebes im Stimulationsbereich [109] auch zur Bildung einer Bindegewebskapsel um den stimulierenden Kontakt der Herzschrittmacherelektrode herum beitragen könnte. Eine Erhöhung der MMP-9 Sekretion der Endothelzellen auf den elektrischen Stimulus hätte daher darauf hinweisen können, dass die Reizung direkt zu vermehrter Bindegewebsbildung führen könnte. MMPs stellen proteolytische Enzyme dar und bauen primär Extrazellulärmatrix ab [131], eine Änderung der Ausschüttung der Proteinase ließe somit auf eine Dysbalance im Gleichgewicht aus Kollagen beziehungsweise Extrazellulärmatrix Auf- und Abbau schließen [133]. *In-vitro* konnte diese Vermutung durch die eigenen Versuche nicht bestätigt werden und deutete in Übereinstimmung mit der Erkenntnis aus den Messungen von IL-6, IL-8 und MCP-1 nicht auf eine proinflammatorische Wirkung der Elektrostimulation hin.

Den Erkenntnissen aus den eigenen Untersuchungen nach zu urteilen scheint der permanente Schrittmacherimpuls demnach insgesamt zu schwach zu sein, um eine dauerhafte Entzündung zu unterhalten, geschweige denn wesentlich zu den literaturbekannten [16, 31, 108, 109] histologischen Veränderungen an der Grenzfläche von Elektrodenkontakt zu Endokard führen zu können. Natürlich können diese Erkenntnisse die eingangs des Kapitels aufgeworfene Frage, inwiefern ein antientzündlich wirkender Arzneistoff für die dauerhafte Reizschwellenabsenkung nach der initialen Phase von etwa zwei bis vier Wochen nach Implantation tatsächlich notwendig sein mag, nicht abschließend klären. Dennoch wäre jedenfalls aus dieser Perspektive eine Notwendigkeit einer über Jahre hinweg andauernden Glucocorticoid-Anwendung in der Herzschrittmachertherapie nicht gegeben.

Viele Veröffentlichungen, die zu Untersuchungen elektrischer Stimuli gefunden wurden, stammten aus dem Themengebiet der Wundheilungsprozesse. Endogene elektrische Felder sorgen beispielsweise für eine verstärkte und gerichtete Zellproliferation [134] und therapeutisch angewandt beschleunigen sie die Wundheilung [135]. Zhao et al. [136] konnten mit HUVECs auch *in-vitro* zeigen, dass diese sich der Länge nach parallel zum Verlauf eines permanenten elektrischen Feldes von 100 mV/mm ausrichteten und längliche Gestalt annahmen. Zudem beobachteten sie dabei eine Sekretion des endothelialen Wachstumsfaktors VEGF, weshalb sie für den elektrischen Stimulus *in-vivo* eine Rolle in der Angiogenese vermuteten. Dies bestätigten auch Nagasaka et al. [137], die bei elektrischer Stimulation der Skelettmuskulatur von Ratten eine erhöhte Ausschüttung des Wachstumsfaktors messen konnten. Diese Informationen führten zu der Überlegung, dass eine über VEGF vermittelte gesteigerte Endothelzellproliferation ebenfalls zum Einwachsen einer stimulierenden Herzschrittmacherelektrode beitragen könnte und damit

die Entwicklung der Reizschwelle negativ beeinflussen könnte. Auch von der Seite möglicher Glucocorticoid-Wirkungen aus betrachtet schien diese Überlegung sinnvoll, da diese sich bei entsprechender Dosis proliferationshemmend auswirken und somit zu einer Verringerung des Reizschwellenanstieges führen könnten. Diesem Aspekt wird sich allerdings in Abschnitt 6 der Arbeit näher gewidmet. Unter dem Mikroskop fiel während der eigenen Versuche keine spezifische Ausrichtung oder Formveränderung der verwendeten Endothelzellen EA.hy926 durch die Elektrostimulation auf. Die Zellen verblieben, den Kontrollen ohne Strom gleich, in ihrer typischen pflastersteinartigen Morphologie. Jedoch waren die Zellen während der Stimulation bereits zu einem dichten Monolayer gewachsen und damit zum allergrößten Teil nicht mehr in der Wachstumsphase, was die ausbleibende Reaktion erklären könnte. Zusätzlich wurde deshalb die VEGF-Sekretion ins Visier genommen, die aber genauso wenig eine Erhöhung gegenüber der Basisausschüttung in den Negativ-Kontrollen zeigte und die These einer negativen Beeinflussung der Reizschwelle durch den Schrittmacherimpuls selbst daher nicht stützte. Was die Beobachtungen und Untersuchungen bezüglich des Wachstumsverhaltens der Zellen angeht muss jedoch einschränkend darauf hingewiesen werden, dass die eigenen Versuche dazu anfänglich auch nicht konzipiert waren und die Untersuchung der Proben auf VEGF erst nachträglich ergänzt wurde. So mögen beispielweise Betrachtungsphase und -zeitraum oder die Verwendung FBS-haltigen (fetales Kälberserum) Mediums, das seinerseits bereits Wachstumsfaktoren enthielt, keineswegs optimal gewählt gewesen sein (*für nähere Informationen siehe auch Abschnitte 4 und 4.4 im Experimentellen Teil C*). Für eine Verbesserung solcher Untersuchungen wäre beispielsweise eine längere Versuchsdauer von mehr als 72 Stunden in der Wachstumsphase der Zellen bis zum dichten Monolayer vorzuschlagen. Zu diskutierende Limitationen des gewählten Versuchsaufbaus zur Untersuchung des proinflammatorischen Einflusses des Schrittmacherimpulses betreffen zum einen die Zelllinie EA.hy926, für die zwar mehrfach gezeigt wurde, dass sie die gewählten Zytokine sekretieren, dies aber, wie Vorversuche zeigten, scheinbar durchaus sehr vom gewählten Stimulus abhängen kann (*siehe Abschnitt 4.2*). Somit bleibt fraglich, ob die Sensitivität der Zelllinie zur Untersuchung des vergleichsweise schwachen elektrischen Reizes genügt. Eine Alternative könnten beispielsweise primäre HUVECs darstellen, deren Phänotyp nicht wie bei immortalisierten Zelllinien verändert ist. Auch Endothelzellen aus humaner Aorta (HAEC) wären denkbar, um die Charakteristika des Endothels großer Gefäße abzubilden. Zum anderen konnten die Stimulationsparameter des Impulsgebers nicht variiert werden sondern waren fest voreingestellt. Ein Vergleich mit veränderten Pulslängen oder Spannungen von bis zu 2,5 Volt, die noch immer im Bereich üblicher Schrittmacherpulshöhen liegen [124], wäre zusätzlich interessant gewesen und hätte bei Ansprechen der Zellen auf höhere Impulsstärken außerdem als weitere Versuchskontrolle dienen können.

Nichts desto trotz wurde anhand der gewählten Voreinstellungen erstmals explizit ein typischer Herzschrittmacherimpuls im *in-vitro* Modell auf seine proinflammatorische

Wirkung hin untersucht. Der Einsatz originaler Elektroden wurde bewusst gewählt, um die Applikation des Impulses bestmöglich zu simulieren und stellte darüber hinaus ein einfach durchzuführendes Modell dar, welches dem aktuellen Kenntnisstand nach ebenfalls ein Novum darstellte. Nach den Ergebnissen dieses Modellaufbaus zu urteilen wirkt sich der Schrittmacherimpuls nicht negativ im Sinne eines entzündungsfördernden Reizes auf das Gefäßendothel aus und führt womöglich auch nicht über Induktion erhöhter VEGF-Sekretion zur Steigerung des Zellwachstums der Endothelzellen.

5 ***In-vitro* Vergleich der Bioaktivitäten der eingesetzten Glucocorticoide nach Freisetzung aus der Polymermatrix**

5.1 **Fragestellung**

Die Potenz synthetischer Glucocorticoiden wird in der Regel über deren relative Rezeptoraffinität beschrieben. Für Dexamethason (DX) und einige andere moderne synthetische Glucocorticoide wie Mometasonfuroat, Fluticasonpropionat und Budesonid wurde *in-vitro* anhand der Expression des entzündungshemmenden CD163 – einem von Monozyten exprimierten membranständigen Rezeptor zur Bindung von Pathogenen an die Zelloberfläche der reifen Immunzellen [138, 139] – eine gute Korrelation der relativen Rezeptoraffinität und antiinflammatorischer Wirkung gezeigt [140]. Dennoch kann die relative Rezeptoraffinität nicht alleine als Kriterium zur Beurteilung der Wirksamkeit eines Glucocorticoids genügen. Genaugenommen sagt sie nur etwas über das Ausmaß der Rezeptorbesetzung bei gegebener Glucocorticoid-Konzentration aus und ist letztlich eine Frage der Dosis des Wirkstoffs am Wirkort, weshalb einer niedrigeren relative Rezeptoraffinität in der Regel mit einer höheren Dosis beizukommen ist [141]. Dabei ist zudem zu beachten, dass nur der freie Anteil der Dosis seine Wirkung entfalten kann, der durch anderweitige spezifische oder unspezifische meist reversible Bindungen nicht der Möglichkeit zur Rezeptorbesetzung beraubt wird. Ausschlaggebend dafür kann die Plasmaproteinbindung sein, in erster Linie an Serumalbumin [36]. Die Bindung an das Glucocorticoid-transportierende Plasmaprotein Transcortin – auch Corticosteroid bindendes Globulin genannt – spielt wegen seiner geringen Aufnahmekapazität praktisch keine Rolle für synthetische Glucocorticoide.

Die Plasmaproteinbindung gilt es in erster Linie bei den modernen und hochpotenten Stoffen mit hoher Lipophilie zu beachten, denn hier ist sie mit meist >90 % sehr viel stärker ausgeprägt als bei den weniger potenten Substanzen, wie beispielsweise DX oder Prednisolon (*für übersichtliche Informationen zu Eigenschaften einiger Glucocorticoide siehe auch Abschnitt 8 im Tabellarischen Anhang in Teil D*). Ein Unterschied in der Plasmaproteinbindung von nur 1 %, wie es Mometasonfuroat und Desisobutrylciclesonid (des-Cicle, Wirkform des Prodrugs Ciclesonid) mit 98 % und 99 % zeigen [49], bedeutet beispielsweise schon einen doppelt so hohen Anteil an freiem Mometasonfuroat im Vergleich mit des-Cicle [42]. Die systemische Wirksamkeit ist für Mometasonfuroat daher potentiell noch wesentlich höher, als es die relativen Rezeptoraffinitäten der beiden Substanzen (2200 für Mometasonfuroat, 1212 für des-Cicle [142, 143]) alleine hätten vermuten lassen. Dahingegen bedeutet ein 8 %iger Unterschied in der Plasmaproteinbindung von DX und Prednisolon, welche eine Plasmaproteinbindung von nur ~72 % und ~80 % zeigen [40, 107], lediglich einen 1,4-fach höheren freien Wirkstoffanteil für DX im Plasma. Der Potenzunterschied zwischen diesen

beiden relativ niedrig potenten Substanzen wird deshalb viel weniger durch die unspezifische Bindung an Plasmaproteine beeinträchtigt und ist eher durch die relative Rezeptoraffinität bestimmt, die sich mit 100 für DX und 10 für PR um den Faktor zehn unterscheidet [45]. Diese Beispiele sollen zeigen, dass eine eigentlich geringe Differenz in der relativen Rezeptoraffinität zwischen den nieder potenten und wenig an Proteine gebundenen Wirkstoffen so, trotz hohen Unterschieden in der Plasmaproteinbindung, dennoch einen großen Unterschied ausmachen können. Dahingegen kann bei den hochpotenten aber auch stark proteingebundenen Substanzen selbst eine Differenz in der relativen Rezeptoraffinität von etwa 1000 durch eine nur geringfügig differierende Plasmaproteinbindung sogar noch einmal annähernd verdoppelt werden, wie oben genanntes Beispiel mit Mometasonfuroat und des-Cicle zeigte. Bei umgekehrten Verhältnissen kann dies jedoch auch bedeuten, dass ein großer Potenzunterschied durch einen entsprechend hohen frei vorliegenden Dosisanteil im Plasma ausgeglichen werden kann, wie beispielsweise für den Vergleich von des-Cicle mit DX der Fall.

Natürlich ist diese isolierte Betrachtungsweise zu einfach gewählt, um die gesamte Effektivität der Glucocorticoid-Wirkung zu beurteilen. Zum Beispiel muss die Konzentration in direkter Rezeptorumgebung im Gewebe, also auch die Gewebbindung, in die Gesamtbetrachtung einbezogen werden [144] (*siehe hierfür auch die Versuche zur Bestimmung der Gewebbindung unter Abschnitt 3*). Zudem ist bei diesen Gegenüberstellungen von Plasmaproteinbindung und relativer Rezeptoraffinität zur Beurteilung der Wirkung zu beachten, dass dies nur systemisch vorliegende Glucocorticoide betrifft. Bei den lokalen Anwendungen – beispielsweise der pulmonalen, intranasalen oder auch der dermalen – bei denen die Substanzen üblicherweise zum Einsatz kommen, betrifft dies in der Regel nur den aus dem Zielgewebe ins Plasma diffundierten Teil der Dosis und, insofern ein Teil der Dosis verschluckt wird [41, 49], den oral verfügbaren. Die lokale Wirksamkeit der hochpotenten Glucocorticoide sollte demnach in diesen Anwendungsformen nicht durch die Plasmaproteinbindung kompromittiert werden. Da für eine effektive Wirkung zum anderen auch die Sicherheit der Arzneimitteltherapie ausschlaggebend ist, wird in der Regel sogar eine hohe Plasmaproteinbindung angestrebt. Es wird diskutiert, dass der bei pulmonaler Anwendung unerwünschte systemisch aufgenommene Dosisanteil der hochpotenten Corticosteroide durch eine hohe unspezifische Bindung an Plasmaproteine größten Teils der Diffusion zu den im Körper weit verbreiteten Glucocorticoid-Rezeptoren entzogen wird und so das Risiko unerwünschter systemischer Nebenwirkungen mindert [145], sich also positiv auf die Sicherheit auswirkt.

Der oben exemplarisch dargelegte vermeintliche Vorteil einer niedrigen Plasmaproteinbindung ist, wie andere pharmakokinetische Parameter auch, also immer im Kontext des beabsichtigten therapeutischen Zwecks und des betrachteten Applikationsmodus zu bewerten. In diesem Sinn ist der Einsatz der Glucocorticoide in der Herzschrittmachertherapie eher ungewöhnlich, da es sich gewissermaßen um eine

i.v.-Anwendung handelt bei der die Substanzen direkt im Blutstrom freigesetzt werden aber dennoch für die lokale Wirkung am Applikationsort bestimmt sind (*siehe auch Abschnitt 3.1*). Die systemische Exposition ist dabei hinsichtlich der Gefahr unerwünschter Nebenwirkungen dank der niedrigen freigesetzten Dosen wohl als unproblematisch einzuschätzen. Somit rückt hier der dargelegte Aspekt zu den Verhältnissen zwischen ungebundenem und wirksamem Dosisanteil zur Beurteilung der lokalen Effektivität der eingesetzten Substanzen in den Vordergrund. Die relativ geringe Plasmaproteinbindung des nieder potenten DX kann womöglich als vorteilhaft betrachtet werden, denn zum einen kann man den unterschiedlichen Rezeptoraffinitäten prinzipiell durch Anpassung der Dosis beikommen [144], zum anderen steht dadurch ein höherer freier Anteil für die Diffusion zum lokal entzündeten Herzgewebe zur Verfügung (*siehe Abschnitt 3*).

Es liegt also nicht auf der Hand, dass sich die höhere relative Rezeptoraffinität eines modernen Glucocorticoids in der Herzschrittmachertherapie auch in Form höherer Effektivität bemerkbar machen würde. Das Zusammenspiel aus applizierter beziehungsweise freigesetzter Dosis, freiem Anteil und Rezeptoraffinität wird zudem durch weitere Unterschiede wie der Prodrug-Aktivierung oder der Stabilität der Wirkstoffe ergänzt, was eine vergleichende Einschätzung der Effektivität der hier eingesetzten Glucocorticoide DXA, GCX und BDP zusätzlich erschwert. Auch anhand der Erfahrungen aus anderen Therapiegebieten ließ sich nur schwer eine Abschätzung vornehmen, da die Arzneistoffe nach derzeitigem Kenntnisstand momentan auf keinem gemeinsamen Therapiegebiet in gleicher Darreichungsform Anwendung finden. Daher wurde auf Grundlage der selbst generierten Daten aus den Freisetzungsversuchen (*siehe Abschnitt 2*), die bereits auf unterschiedliche Freisetzungskinetik und Arzneistoffdosis hinwiesen, auf experimentellem Weg versucht, die antiinflammatorische Aktivität der eingesetzten Glucocorticoide zu vergleichen und eine erste Einschätzung bezüglich der Effektivität im Applikationsschema während der Herzschrittmachertherapie vorzunehmen.

5.2 Versuchsprinzip

Als Erfolgsparameter für die Effektivität der Substanzen DXA, GCX und BDP wurde die Inhibition einer Entzündung gewählt, da die Theorie des Reizschwellenanstiegs durch eine lokale Gewebeentzündung am Implantationsort im Herzen mit nachfolgender Bildung einer fibrösen Einkapselung (*siehe Abschnitt 4.1 und Abschnitt 1.2.5 der Einleitung in Teil A*) den am meisten diskutierten Grund für die Reizschwellenerhöhung darstellt. Natürlich wäre der sinnvollste Erfolgsparameter die Messung der Reizschwelle unter Schrittmacherstimulation selbst gewesen, was allerdings nur *in-vivo* im Tierversuch oder eben im Patienten selbst möglich und schon alleine aus ethischen Gründen nicht realisierbar gewesen wäre. Somit wurde wie bei den Untersuchungen zum Einfluss der impulsartigen Elektrostimulation (*siehe Abschnitt 4*) ein Zellkulturmodell mit den Gefäßendothelzellen EA.hy926 zum

Vergleich der Bioaktivitäten der drei Glucocorticoide eingesetzt. Die Auswahl der Zelllinie beruhte in erster Linie auf der an voriger Stelle bereits ausgeführten Begründung, wonach das Endokard als Fortsetzung der inneren Gefäßwand angesehen wird [1] (*siehe Abschnitt 4.2*). Da der Herzschrittmacherimpuls sich in den Elektrostimulationsversuchen nicht als proinflammatorischer Stimulus auf die EA.hy926 Zellen erwies, musste die ursprüngliche Idee verworfen werden, diesen als Entzündungsreiz in den hier beschriebenen Assays einzusetzen. Die Reizung der Zellen zur Sekretion von Entzündungsmarkern erfolgte daher mit Lipopolysaccharid (LPS), das in den vorigen Versuchen bereits als Positiv-Kontrolle diente. Die Hemmung der durch LPS ausgelösten Entzündung wurde an den Konzentrationen von IL-6 und MMP-9 festgemacht. IL-6 auf der einen Seite stellt ein proinflammatorisches Zytokin dar, das sowohl in der akuten als auch in der chronischen Entzündungsphase vermehrt von den beteiligten Zellen ausgeschüttet wird [127] und daher als günstiger Entzündungsmarker für den Vergleich der Glucocorticoide erschien. Auf der anderen Seite wurde mit dem Entzündungsmarker MMP-9 eine Protease beobachtet, die an der Homöostase der Extrazellulärmatrix beteiligt ist [133]. Auch myokardiales *Remodelling* und kardiale Fibrosierung wird mit einer Erhöhung von MMP-9 in Verbindung gebracht [121]. Mit Blick auf die fibröse Einkapselung der Elektrodenspitze konnte die Stärke der Senkung der MMP-9 Sekretion möglicherweise einen Hinweis auf eine positive Reizschwellenentwicklung geben und war somit ebenfalls für einen Vergleich der Glucocorticoide interessant.

Ziel des Versuchsaufbaus war es die eigenen bisher erarbeiteten Erkenntnisse zur Pharmakokinetik der Arzneistoffe in der vorliegenden Applikationsform aufzugreifen und diese auf Grundlage dessen in ihrer Wirkung zu vergleichen. Exakt identische Bedingungen für eine Freisetzung der Glucocorticoide aus der Polymermatrix waren im Zellkulturmodell aufgrund der dazu nötigen tagelangen Exposition der Zellen mit Humanplasma als Freisetzungsmedium problematisch. Deshalb wurde eine Freisetzung in Gegenwart der Zellen unter möglichst ähnlichen Bedingungen durchgeführt (*siehe Abschnitt 5.2.1*) und deren Ergebnisse mittels eines zweiten experimentellen Versuchsaufbaus, in dem die Freisetzungsprofile aus den Humanplasmaversuchen durch inkrementelle Zugabe imitiert wurden (*siehe Abschnitt 5.2.2*), auf ihre Konsistenz hin überprüft.

5.2.1 Bioaktivitäts-Assay mit Freisetzung aus LTSC

Im ersten Ansatz wurden die Arzneistoffe DXA, GCX und BDP im Zellkulturmodell direkt aus der Polymermatrix (LTSC, *lead tip with steroid eluting collar*) über 48 Stunden hinweg freigesetzt. Von der Verwendung von Humanplasma als Freisetzungsmedium wie in den pharmakokinetischen Versuchen (*siehe Abschnitte 2 und 3*) wurde abgesehen, da eine tagelange Exposition der Zellen mit Humanplasma als problematisch angesehen wurde.

Eine langfristige Verwendung von Plasma als Zellkulturmedium wird im Allgemeinen als ungeeignet betrachtet [146], zudem wurde ein negativer Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Versuche durch die Verwendung dieses nicht standardisierten Mediums befürchtet.

Somit wurde ein FreisetzungsmEDIUM auf Basis des für die EA.hy926 Zellen üblichen Zellkulturmediums DMEM eingesetzt. Da normales Zellkulturmedium als Proteinbestandteil lediglich FBS enthält, musste zur Schaffung ähnlicher Freisetzungsbedingungen wie in Humanplasma (*siehe Abschnitt 2*) der Proteinanteil durch den Zusatz von BSA erhöht werden. Bereits das Ausmaß der Plasmaproteinbindung aller drei Substanzen sowie die Bestimmung der maximalen Aufnahmekapazität des Humanplasmas für DXA, GCX und BDP beschieden dem Proteinanteil im FreisetzungsmEDIUM einen maßgeblichen Einfluss auf die Freisetzung aus der Polymermatrix. Da das Aufnahmevermögen des Humanplasmas weit über der Wasserlöslichkeit der Stoffe lag, darf dem lösungsvermittelnden Effekt der Plasmaproteine eine erhebliche Beeinflussung der Freisetzung zugeschrieben werden, wie an voriger Stelle bereits ausführlich erläutert (*für nähere Informationen zur Aufnahmekapazität des Humanplasmas und Freisetzung siehe Abschnitte 2 und insbesondere 2.2*). Hinzu kommt, dass sich die Anwesenheit von Plasmaproteinen stabilisierend auf zur Degradation neigende Arzneistoffe auswirkt, wie eigene Stabilitätsversuche (*siehe Abschnitt 7.2*) zeigten, und daher auch auf die Prodrug-Aktivierung Einfluss nehmen kann. Der Gesamtproteingehalt des Mediums wurde deshalb auf 6 % aufgestockt und entsprach damit dem Anteil im humanen Blutplasma [85].

Das Volumen des Freisetzungsmediums war auf 9 mL beschränkt, denn das Fassungsvermögen der Zellkulturschalen (6-Well-Multischale) war damit soweit ausgeschöpft, dass gerade noch eine Schüttelbewegung ausgeführt werden konnte, ohne dass das Medium aus der Schale verschüttet wurde. Dies konnte jedoch gerechtfertigt werden, da bezugnehmend auf die bereits zuvor genannte Aufnahmekapazität von Humanplasma noch immer Sink-ähnliche Bedingungen anzunehmen waren [147, 148], auch wenn das Volumen gegenüber den Freisetzungsversuchen in Humanplasma nur 36 % betrug.

Nachdem die Endothelzellen zu konfluenten Monolayern gewachsen waren, wurde der Versuch mit Zugabe des Entzündungsstimulus LPS (5 µg/mL) gestartet. Die LTSC wurden unmittelbar im Anschluss daran appliziert, wobei sie mithilfe der bereits unter Abschnitt 3 beschriebenen Vorrichtung aus 6-Well-Adapter und Edelstahlhaken dergestalt in das Zellkulturmodell eingebracht wurden, dass sie etwa 2-3 Millimeter über dem Zellmonolayer im FreisetzungsmEDIUM hingen. Neben den Glucocorticoid-Ansätzen wurden eine Negativ-Kontrolle ohne LPS-Zusatz und mit normalem DMEM als Zellkulturmedium sowie eine Positiv-Kontrolle identischer LPS-Konzentration wie in den Glucocorticoid-Ansätzen mitgeführt. Letztere bekam zusätzlich einen Placebo-LTSC appliziert, welcher aus dem Silikonmantel des LTSC und der Freisetzungsmatrix ohne

Glucocorticoid bestand und lediglich gewährleisten sollte, dass kein zusätzlicher Einfluss des Schlauchmaterials auf die Zellen ausgeübt wurde. Die Positiv-Kontrolle enthielt ebenfalls das modifizierte Freisetzungsmedium. Daher wurde zur Überprüfung eines den Versuch störenden Einflusses auf die Endothelzellen durch den hohen BSA-Gehalt eine weitere Kontrolle mit modifiziertem Zellkulturmedium angesetzt (BSA-Kontrolle, *siehe Abb. 36*). Zur Gewährleistung konstanter Konvektion wurde die gesamte Multiwellschale bei 37 °C über die 48 Stunden lange Versuchsdauer auf einem Wippschüttler inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Entnahme der ersten Proben aus jedem Überstand, nach 48 Stunden wurde jeweils eine zweite entnommen. Alle Proben wurden letztlich per ELISA auf die Konzentrationen der Zytokine IL-6 und MMP-9 hin untersucht, die Zellen eines jeden Ansatzes nach Ende des 48 Stunden dauernden Versuchs gezählt und die Ergebnisse aus den ELISA-Messungen auf die Zellzahl normiert. Zusätzlich wurde zu den Probezugszeitpunkten die Konzentrationen von DXA, GCX und BDP mittels HPLC gemessen, um die Freisetzung zu kontrollieren (*für nähere Informationen zu Versuchsdurchführung, Herstellung des Freisetzungsmediums und ELISA-Messungen siehe Abschnitte 5.3.2 und 5.3.3 im Experimentellen Teil C*).

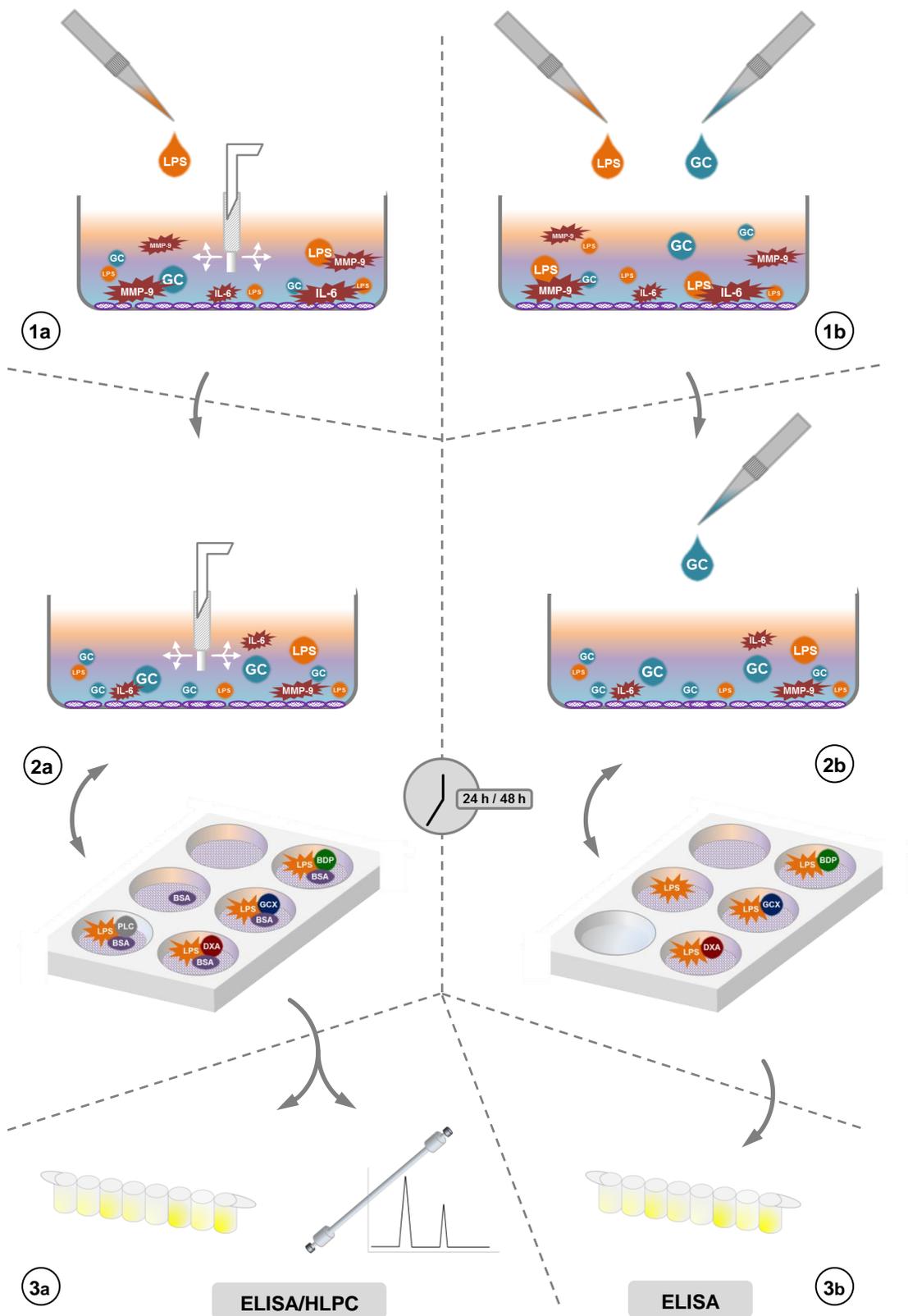


Abb. 36: Schematischer Versuchsablauf der Bioaktivitäts-Assays mit inkrementeller Glucocorticoid-Zugabe und direkter Freisetzung aus LTSC. Die Versuche wurden mit Monolayern aus EA.hy926 Endothelzellen durchgeführt, die mittels LPS (5 µg/mL) entzündlich stimuliert wurden. Anhand der Ausschüttungen von IL-6 und MMP-9 wurde die Wirkung der drei Glucocorticoide DXA, GCX und BDP verglichen. (Fortsetzung nächste Seite)

Die Substanzen wurden zur Berücksichtigung der freigesetzten Dosierungen zum einen direkt aus LTSC ins Zellkulturmedium über 48 Stunden freigesetzt (1a und 2a). Dazu wurde das Zellkulturmedium mit BSA modifiziert, um den Plasmaproteinanteil des humanen Blutplasmas zu imitieren (*siehe Abschnitte 2 und 2.1*). Um ein ausreichendes Volumen an Freisetzungsmedium zu schaffen, wurden 9 mL des modifizierten Zellkulturmediums verwendet. Zum anderen wurden die Glucocorticoide in einem zweiten Versuchsansatz dergestalt zu den Ansätzen gegeben, dass durch inkrementelle Aufdosierung über 24 Stunden die unterschiedlichen Freisetzungsprofile für DXA, GCX und BDP aus den Versuchen in Humanplasma (*siehe Abschnitt 2*) nachgebildet wurde (1b und 2b). Dazu wurden die entsprechenden Dosierungen anhand der experimentell ermittelten Freisetzungsraten nach dem Quadratwurzelgesetz für die Zeitpunkte nach einer, zwei, vier, acht, zwölf und 24 Stunden intrapoliert (*siehe auch Abb. 37*). Neben den Glucocorticoid-Ansätzen wurde in beiden Versuchsaufbauten eine Negativ-Kontrolle ohne weitere Zusätze und eine Positiv-Kontrolle, der zur Reizung ebenfalls LPS zugesetzt wurde, mitgeführt. Im Aufbau mit direkter Freisetzung aus LTSC war auch das Zellkulturmedium der Positiv-Kontrolle mit BSA modifiziert und erhielt zudem einen Placebo-LTSC ohne Glucocorticoid (PLC), der einen Einfluss des Schlauchmaterials des LTSC ausschließen sollte. Um einen eventuellen Einfluss des hohen BSA-Gehalts zu kontrollieren wurde zusätzlich eine weitere Negativ-Kontrolle, die das übliche Zellkulturmedium DMEM ohne BSA-Zusatz enthielt mitgeführt. In beiden Varianten des Assays wurden den Überständen nach 24 und 48 Stunden Proben entnommen und mittels ELISA deren IL-6 und MMP-9 Gehalt ermittelt (3a und 3b). Die Proben der direkten Freisetzung wurden zudem mittels HPLC auf die Konzentrationen der jeweiligen Glucocorticoide untersucht (3a).

5.2.2 Bioaktivitäts-Assay mit inkrementeller Glucocorticoid-Zugabe

Im zweiten Ansatz erfolgte die Freisetzung der Arzneistoffe nicht direkt aus der Polymermatrix der LTSC, sondern wurde durch inkrementelle Aufdosierung der Glucocorticoide über einen Zeitraum von 24 Stunden simuliert und der gesamte Versuch anschließend weitere 24 Stunden fortgeführt. Anhand der Freisetzungsraten nach dem Quadratwurzelgesetz aus den Versuchen in Humanplasma (*siehe Abschnitt 2*) wurden die Konzentrationen interpoliert, in denen DXA, GCX und BDP nach einer, zwei, vier, acht, zwölf und 24 Stunden langer Freisetzung im Medium vorlagen (*siehe Fml. 7*). An den sechs Zeitpunkten wurden die Substanzen dem Zellkulturüberstand dergestalt schrittweise zugesetzt, dass dies die unterschiedlichen Freisetzungsprofile von DXA, GCX und BDP bestmöglich nachbildete (*siehe Abb. 37*).

$$\text{Fml. 7} \quad C = (K_D \cdot t^{1/2}) / V \cdot 1000$$

Mit:

C= Konzentration im Freisetzungsmedium [ng/mL]

K_D= Freisetzungsrates nach Quadratwurzelgesetz [$\mu\text{g} \cdot \text{h}^{1/2}$]

t= Zeit [h]

V= Volumen des Freisetzungsmediums [mL] (25 mL in Freisetzungsvorsuchen unter Abschnitt 2)

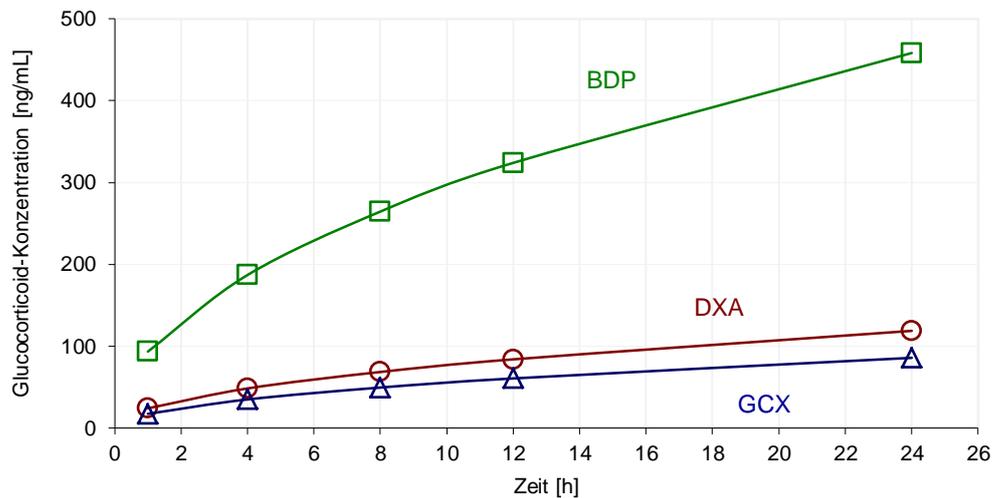


Abb. 37: Profil der inkrementellen Dosierungen der drei Glucocorticoide DXA, GCX und BDP über 24 Stunden während des Bioaktivitäts-Assays. Die Berechnungen nach dem Quadratwurzelgesetz und den Freisetzungsraten aus den Versuchen in Humanplasma (siehe Abschnitt 2) führten zu Endkonzentrationen von 119 ng/mL DXA, 86 ng/mL GCX und 458 ng/mL BDP nach 24 Stunden. Die Endkonzentrationen wurden durch Zugaben in sechs Dosierungsschritten zu einer, zwei, vier, acht und zwölf Stunden im Zellkulturmedium aufgebaut, deren resultierende Konzentrationen ebenfalls interpoliert wurden. Da die Konzentrationsberechnungen auf den experimentell ermittelten Freisetzungsraten im Humanplasma beruhte, wurden dadurch die unterschiedlichen Freisetzungsprofile für die Glucocorticoide simuliert (für weitere Informationen zum Dosierungsschema siehe Abschnitt 5.3.1 im Experimentellen Teil C).

Da die Glucocorticoid-Wirkung, die größtenteils auf Gentranskriptionsebene stattfindet [36], in vollem Umfang erst mit einigen Stunden Verzögerung einsetzt, wurde auf eine weitere Arzneistoffzugabe innerhalb der zweiten 24 stündigen Versuchshälfte verzichtet.

Der Ablauf des Versuchs glich in weiten Teilen der oben beschriebenen Variante mit direkter Freisetzung aus LTSC (siehe Abschnitt 5.2.1 und Abb. 36). Da weder LTSC verwendet, noch der Proteinanteil des Freisetzungsmittels durch BSA-Zugabe erhöht werden musste, genügte jedoch das Mitführen einer einzigen Negativ-Kontrolle. Die erste Glucocorticoid-Dosis wurde eine Stunde nach Zugabe des LPS-Stimulus ($5 \mu\text{g/mL}$) zugesetzt, die weiteren Dosen wie beschrieben nach zwei, vier, acht, zwölf sowie 24 Stunden. Die zu imitierenden Freisetzungsraten aus den Versuchen in Humanplasma lagen bei $0,6066 \mu\text{g/h}^{1/2}$, $0,4384 \mu\text{g/h}^{1/2}$ und $2,3383 \mu\text{g/h}^{1/2}$ für DXA, GCX und BDP (siehe Abschnitt 2). Demnach betragen die berechneten Endkonzentrationen für die Aufdosierung nach 24 Stunden 119 ng/mL DXA, 86 ng/mL GCX und 458 ng/mL BDP (siehe Fml. 7). Aus den Überständen der Glucocorticoid-Ansätze und aller Kontrollen wurde nach 24 Stunden eine erste und nach 48 Stunden eine zweite Probe entnommen, die letztlich alle mittels ELISA auf den Gehalt an IL-6 und MMP-9 hin untersucht wurden (für nähere Informationen zur Versuchsdurchführung, Dosierungsschema und ELISA-Messungen siehe Abschnitte 5.3.1 und 5.3.3 im Experimentellen Teil C).

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Freisetzung aus LTSC im Zellkulturmodell

Die Konzentrationen der Glucocorticoide DXA, GCX und BDP, die aus LTSC ins Zellkulturmedium abgegeben wurden, wurden nach 24 und 48 Stunden mittels HPLC erfasst. Die nachgewiesenen und quantifizierten Metaboliten der Substanzen wurden summiert und die Ergebnisse wurden als Gesamt-Arzneistoffkonzentrationen ausgedrückt, um sie besser mit der inkrementellen Aufdosierung des zweiten Versuchsaufbaus vergleichen zu können. Denn letztlich ist die Konzentration am Wirkort für den Effekt entscheidend, nicht die absolute freigesetzte Dosis. Genau genommen sind es zwar die Wirkstoffkonzentrationen – nicht die Arzneistoffkonzentrationen – am Wirkort, Angaben zu den aus Prodrugs entstandenen Wirkstoffen müssen aber mit Vorsicht betrachtet werden, da die zellulären Wirkstoffkonzentrationen nicht mit den im Überstand gemessenen übereinstimmen müssen.

Für DXA wurden nach 24 Stunden 337 ± 23 ng/mL ($n=3$; CI 95 %) und nach 48 Stunden 342 ± 19 ng/mL freigesetzter Arzneistoff ermittelt (siehe Abb. 38).

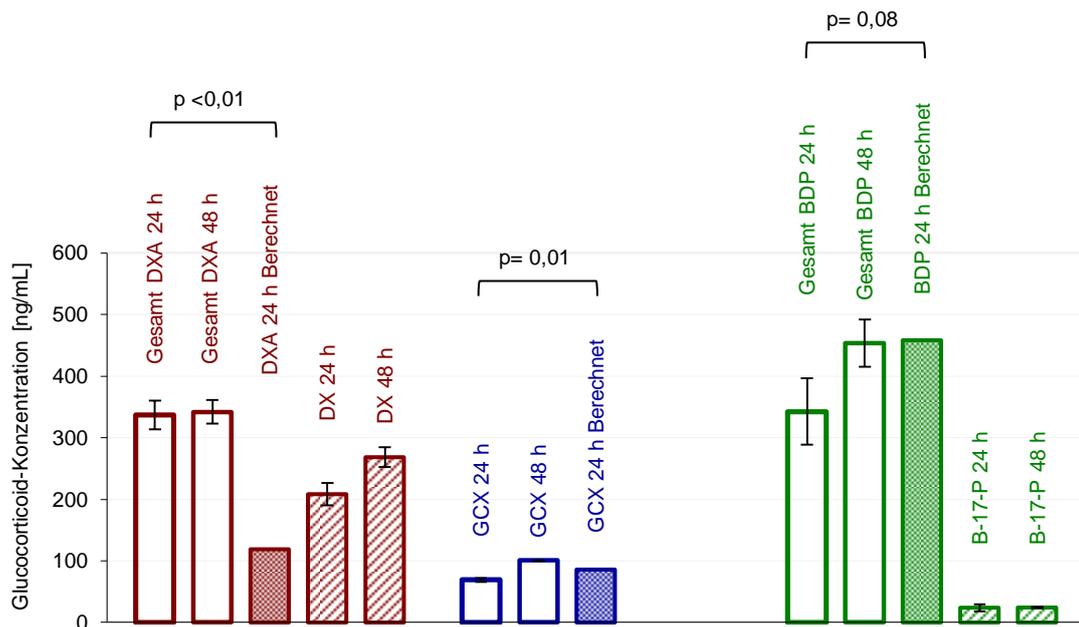


Abb. 38: Freisetzungen von DXA, GCX und BDP aus den arzneistoffhaltigen LTSC im Zellkulturmodell, jeweils als Gesamt-Arzneistoffkonzentration (Summe aller zugehörigen Abbauprodukte und der Ausgangssubstanz). Zum Vergleich sind jeweils die nach den Freisetzungsraten der Versuche in Humanplasma für 24 Stunden berechneten Werte mit aufgetragen. Die Abbildung zeigt für DXA und BDP zusätzlich die im Medium gemessenen Konzentrationen der jeweiligen Wirkstoffe DX beziehungsweise B-17-P. Auffallend war der große Unterschied zwischen der Konzentration des B-17-P und der Gesamtkonzentration für BDP. B-17-P wurde weiter zu BOH abgebaut (nicht abgebildet) und kumulierte daher nicht im Zellkulturmedium. Im Gegensatz dazu lag DXA größtenteils als DX vor, das aufgrund seiner Stabilität im Medium kumulierte. Abweichungen CI 95 %, $n=3$, t-Test α 0,05.

Verglichen mit dem nach der Freisetzungsrates aus den Versuchen in Humanplasma (*siehe Abschnitt 2.3*) intrapolierten Wert von 119 ng/mL für eine 24 stündige Freisetzung stellte dies eine fast dreifach höhere Konzentration dar ($p < 0,01$). Dahingegen wurden 69 ± 5 ng/mL und 101 ± 0 ng/mL GCX nach 24 und 48 Stunden in den Überstand abgegeben und damit nur geringfügig weniger als der für 24 Stunden berechnete Wert von 86 ng/mL GCX ($p = 0,01$). BDP wurde mit 342 ± 54 ng/mL und 454 ± 38 ng/mL nach 24 und 48 Stunden Versuchsdauer im Medium nachgewiesen. Dies war zwar aus statistischer Sicht mehr als die berechneten 458 ng/mL ($p = 0,08$) nach 24 Stunden, lag jedoch in der gleichen Größenordnung. Für die Wirkform des Prodrugs DXA wurden 208 ± 18 ng/mL und 268 ± 16 ng/mL nach 24 und 48 Stunden gemessen. B-17-P, der Wirkstoff des BDP, wurde nach 24 und 48 Stunden gleichbleibend mit 24 ± 6 ng/mL und 24 ± 1 ng/mL nachgewiesen.

5.3.2 Inhibition der IL-6 Sekretion nach 24 und 48 Stunden

Die IL-6 Konzentration im Versuchsansatz mit Freisetzung aus LTSC (*siehe Abb. 39 A*) betrug für die Positiv-Kontrolle nach 24 Stunden $9,34 \pm 1,03$ pg/mL ($n = 3$; CI 95 %) und zeigte so die Stimulierbarkeit der Endothelzellen, deren Basissekretion in der Negativ-Kontrolle nur $0,91 \pm 0,06$ pg/mL betrug ($p < 0,01$). $1,50 \pm 0,02$ pg/mL IL-6 wurden in der BSA-Kontrolle von den Zellen sekretiert, was zwar gegenüber der Basissekretion eine Erhöhung darstellte ($p < 0,01$), jedoch bei Betrachtung der absoluten Differenz im Vergleich mit der Stimulation mit LPS praktisch nur eine irrelevante Steigerung war. Die Analyse der DXA-, GCX- und BDP-Proben ergab nach 24 stündiger Freisetzung im Mittel jeweils $6,04 \pm 0,31$ pg/mL, $5,34 \pm 0,36$ pg/mL und $5,47 \pm 0,39$ pg/mL. Somit wurde die Ausschüttung von IL-6 zwar von allen Glucocorticoiden vermindert (vs. LPS $p < 0,01$), jedoch lag kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Substanzen vor ($p = 0,17$).

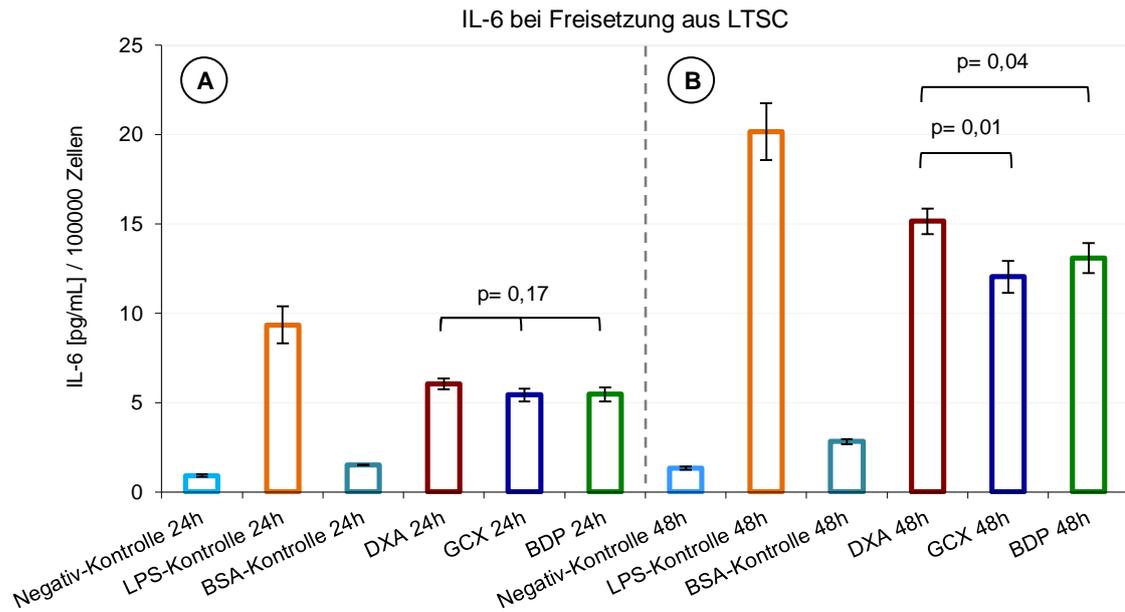


Abb. 39: Inhibition der IL-6 Sekretion nach Freisetzung aus LTSC nach 24 Stunden (A) und nach 48 Stunden (B). Der Entzündungsreiz (LPS) wurde durch alle Glucocorticoide nach 24 Stunden gleichermaßen eingedämmt, nach 48 Stunden war die Wirkung durch GCX und BDP hingegen etwas stärker ausgeprägt als bei DXA-Behandlung. Eine Vollständige Unterdrückung der Entzündung konnte nicht beobachtet werden. Der BSA-Zusatz zum Zellkulturmedium zeigte zwar einen signifikanten, aber nur sehr niedrigen Einfluss auf die IL-6 Sekretion durch die EA-hy926 Zellen. Abweichungen 95 % CI n= 3, ANOVA α 0,05.

Am Ende des Inhibitionsversuchs nach 48 Stunden (*siehe Abb. 39 B*) zeigte sich dagegen eine etwas stärkere Reizhemmung durch GCX ($12,04 \pm 0,90$ pg/mL) und BDP ($13,09 \pm 0,83$ pg/mL) gegenüber DXA ($15,14 \pm 0,73$ pg/mL) (vs. GCX $p= 0,01$, vs. BDP $p= 0,04$). LPS-, Negativ- und BSA-Kontrolle ($20,16 \pm 1,60$ pg/mL, $1,33 \pm 0,09$ pg/mL und $2,81 \pm 0,14$ pg/mL) zeigten nach der längeren Versuchsdauer eine weiter erhöhte Reizbarkeit der Zellen in untereinander gleichen Verhältnissen wie nach 24 Stunden.

Bei inkrementeller Aufdosierung zur Simulation der Freisetzungsprofile aus den Freisetzungsversuchen in Humanplasma zeichnete sich nach 24 Stunden das gleiche Ergebnis ab wie bei der direkten Freisetzung mit Applikation der arzneistoffhaltigen LTSC (*siehe Abb. 40 A*). Zwischen DXA ($0,9 \pm 0,1$ pg/mL), GCX ($0,8 \pm 0,1$ pg/mL) und BDP ($0,8 \pm 0,1$ pg/mL) war kein signifikanter Unterschied in der Hemmung der IL-6 Ausschüttung auszumachen ($p= 0,32$), jedoch war die Sekretion des Entzündungsmarkers gegenüber den $1,2 \pm 0,2$ pg/mL der LPS-Kontrolle insgesamt erniedrigt ($p= 0,01$). Die zelluläre Basissekretion lag bei $0,4 \pm 0,1$ pg/mL und zeigte somit ein Ansprechen auf den LPS-Reiz ($p < 0,01$). Nach 48 Stunden (*siehe Abb. 40 B*) war nur noch ein Trend zu einer leichten Hemmung der IL-6 Sekretion durch die Glucocorticoide vorhanden, war aber für keine Substanz signifikant verschieden zur LPS-Kontrolle (BDP vs. LPS $p= 0,07$).

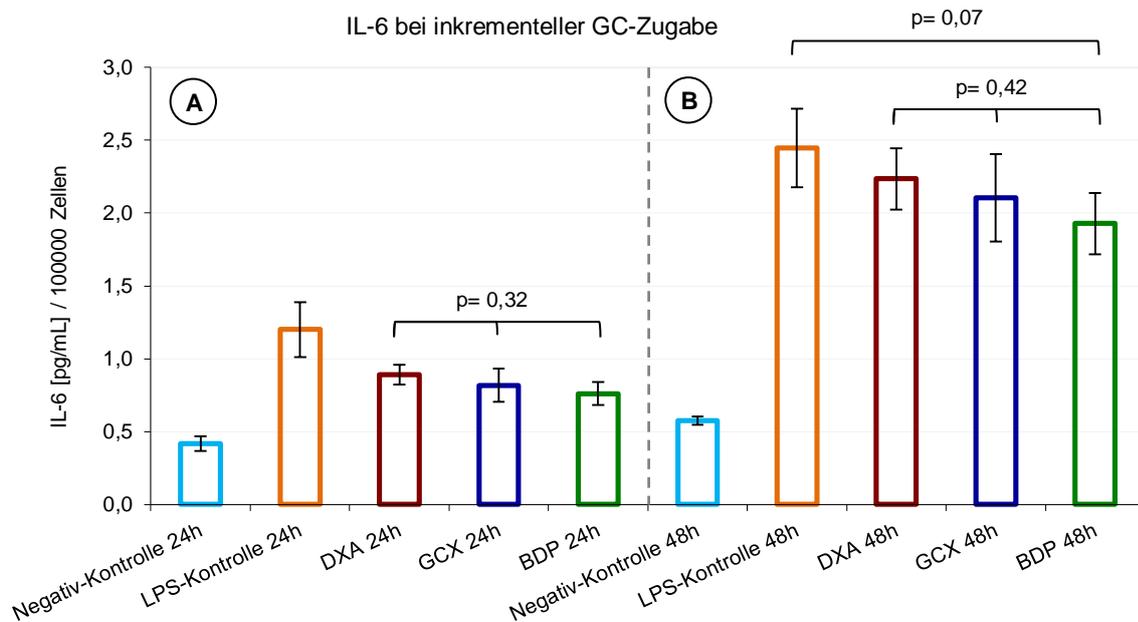


Abb. 40: Inhibition der IL-6 Sekretion nach inkrementeller Aufdosierung zur Simulation der Freisetzungsprofile aus den Freisetzungsversuchen in Humanplasma nach 24 Stunden (A) und nach 48 Stunden (B). Eine Eindämmung des Entzündungsreizes (LPS) konnte nur nach 24 Stunden beobachtet werden, nicht mehr nach 48 Stunden. Hier war lediglich noch ein Trend zu geringerer IL-6 Sekretion zu erkennen. Die mangelnde Wirkung nach 48 Stunden kann womöglich dadurch erklärt werden, dass der letzte Dosisschritt bereits nach 24 Stunden erfolgte und zwischen den beiden Messzeitpunkten keine weitere Aufdosierung mehr stattfand. Die ohnehin nur eindämmende Wirkung der Glucocorticoide konnte somit mit der vorhandenen Dosis wohl nicht über die letzten 24 Stunden des Versuchs gegenüber dem LPS-Reiz aufrechterhalten werden, der die Zellen mit zunehmender Versuchsdauer weiter zur IL-6 Ausschüttung stimulierte. Abweichungen 95 % CI n= 3, ANOVA α 0,05.

Insgesamt gesehen erwies sich in beiden Versuchsvarianten keines der Glucocorticoide in Bezug auf die antiinflammatorische Wirkung überlegen, trotz sehr unterschiedlicher Dosen zwischen DXA, GCX und BDP. Lediglich nach 48 Stunden konnte der von LPS ausgehende Entzündungsreiz durch GCX und BDP etwas stärker eingedämmt werden als durch DXA. Die Ergebnisse aus dem Ansatz mit inkrementeller Aufdosierung zeigten zu diesem Zeitpunkt keine signifikant antiinflammatorische Wirkung und wurden bei dieser Beurteilung nicht mit einbezogen. Die fehlende Wirkung kann dadurch erklärt werden, dass der letzte Dosierungsschritt bereits nach 24 Stunden erfolgte und die Glucocorticoid-Wirkung wohl nicht über die restlichen 24 Stunden der Versuchsdauer für eine signifikante Reduzierung der IL-6 Sekretion ausreichte, schließlich war die Wirkung meist ohnehin nur eindämmend. Eine Hemmung bis auf Niveau der Basissekretion, also eine weitest gehende Unterdrückung des Entzündungsreizes, war mit keiner Substanz zu erreichen.

5.3.3 Inhibition der MMP-9 Sekretion nach 24 und 48 Stunden

Die Messungen der MMP-9 Konzentrationen in den Zellkulturüberständen ergab ein ähnliches Bild wie die vorangestellten Messungen des IL-6. Die Behandlungen mit DXA, GCX und BDP führten zu $0,9 \pm 0,2$ pg/mL, $0,8 \pm 0,2$ pg/mL und $1,0 \pm 0,4$ pg/mL MMP-9 nach 24 Stunden und ließen wiederum keine Unterschiede beobachten (siehe Abb. 41 A) ($n=3$; CI 95 %; $p=0,23$). Alle Substanzen waren jedoch in der Lage die durch Stimulation mittels LPS hervorgerufene MMP-9 Sekretion von $2,3 \pm 0,9$ pg/mL praktisch bis auf das Basisniveau der BSA-Kontrolle von $0,6 \pm 0,3$ pg/mL zurückzudrängen ($p=0,43$). Der BSA-Zusatz selbst schien verglichen mit der Negativ-Kontrolle ohne BSA ($0,4 \pm 0,3$ pg/mL) nur zu einer nicht-signifikanten Steigerung der MMP-9 Sekretion zu führen ($p=0,38$). Diese Beobachtung setzte sich nach 48 Stunden fort (siehe Abb. 41 B), als Werte von $1,0 \pm 0,2$ pg/mL und $1,8 \pm 1,2$ pg/mL für die Negativ- und die BSA-Kontrolle aufgenommen wurden ($p=0,36$). Dies bestätigte somit, dass keine proinflammatorische Beeinflussung von der hohen BSA-Konzentration ausging und ebenfalls als Negativ-Kontrolle im Versuch dienen konnte.

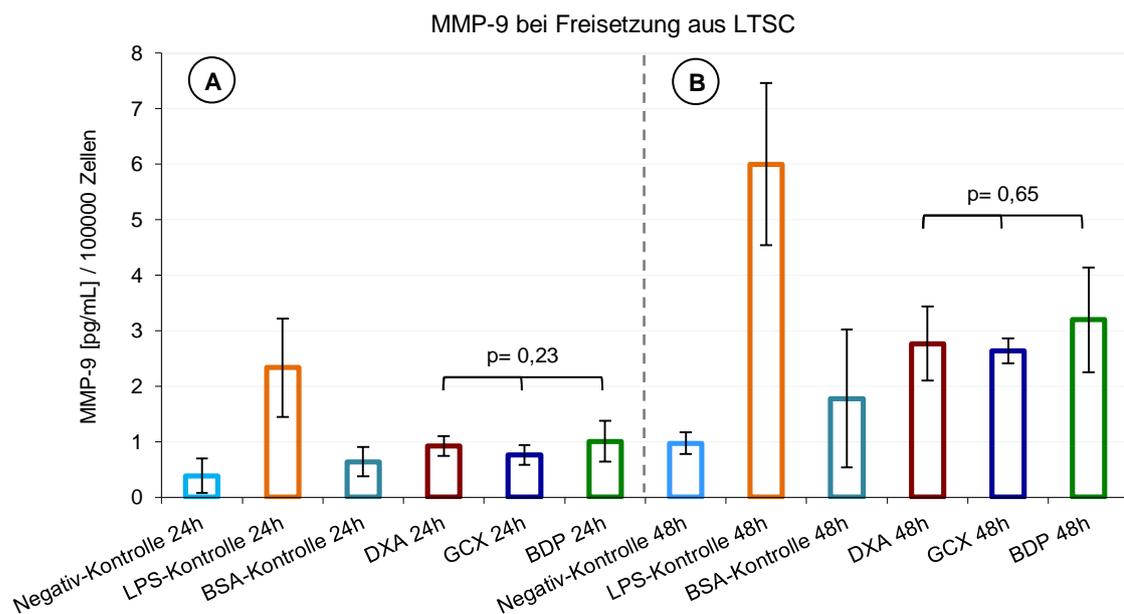


Abb. 41: Inhibition der MMP-9 Sekretion nach Freisetzung von DXA, GCX und BDP aus LTSC nach 24 Stunden (A) und 48 Stunden (B). Keine Substanz erwies sich in ihrem hemmenden Effekt als überlegen, weder zum ersten, noch zum zweiten Probenzeitpunkt. Dabei wurde die MMP-9 Konzentration jedoch von allen Arzneistoffen auf das Niveau der BSA-Kontrolle abgesenkt ($p=0,43$) und damit praktisch vollständig unterdrückt. Selbst nach 48 Stunden war dies noch konsistent. Die MMP-9 Werte lagen nur tendenziell über dem der BSA-Kontrolle. Abweichungen 95 % CI $n=3$, ANOVA $\alpha 0,05$.

Die antiinflammatorische Wirkung der Glucocorticoide zeigte sich auch nach 48 Stunden (siehe Abb. 41 B), wobei die MMP-9 Sekretionen in den behandelten Ansätzen mit $2,8 \pm 0,7$ pg/mL bei DXA, $2,6 \pm 0,2$ pg/mL bei GCX und $3,2 \pm 0,9$ pg/mL bei BDP

gegenüber der BSA-Kontrolle tendenziell, aber nicht signifikant erhöht waren ($p=0,36$). Die Unterdrückung von LPS ausgehenden Entzündungsreizes konnten alle Arzneistoffe gleichermaßen erreichen ($p=0,65$), womit sich alleine durch die Wirkung keine Überlegenheit einer der Substanzen zeigte. Die maximale MMP-9 Konzentration, die in der LPS-Kontrolle bei $6,0 \pm 1,5$ pg/mL lag, konnte im Umkehrschluss durch die Wirkung aller Substanzen gleichermaßen deutlich reduziert werden ($p < 0,01$ für GC vs. LPS-Kontrolle).

Mit Werten von $5,8 \pm 1,3$ pg/mL, $5,2 \pm 0,9$ pg/mL und $4,1 \pm 0,8$ pg/mL für DXA, GCX und BDP stützte die experimentelle Simulation der Freisetzung in der zweiten Versuchsvariante die bisherigen Beobachtungen (siehe Abb. 42 A), da auch hier kein signifikanter Unterschied der Hemmwirkungen zwischen den Glucocorticoiden nach 24 Stunden vorlag ($p=0,23$). Alle minderten die LPS-Reizung ($9,9 \pm 2,0$ pg/mL) deutlich, so dass ein Unterschied zur Basissekretion ($3,3 \pm 0,7$ pg/mL) nur noch tendenziell, nicht aber statistisch gegeben war ($p=0,06$).

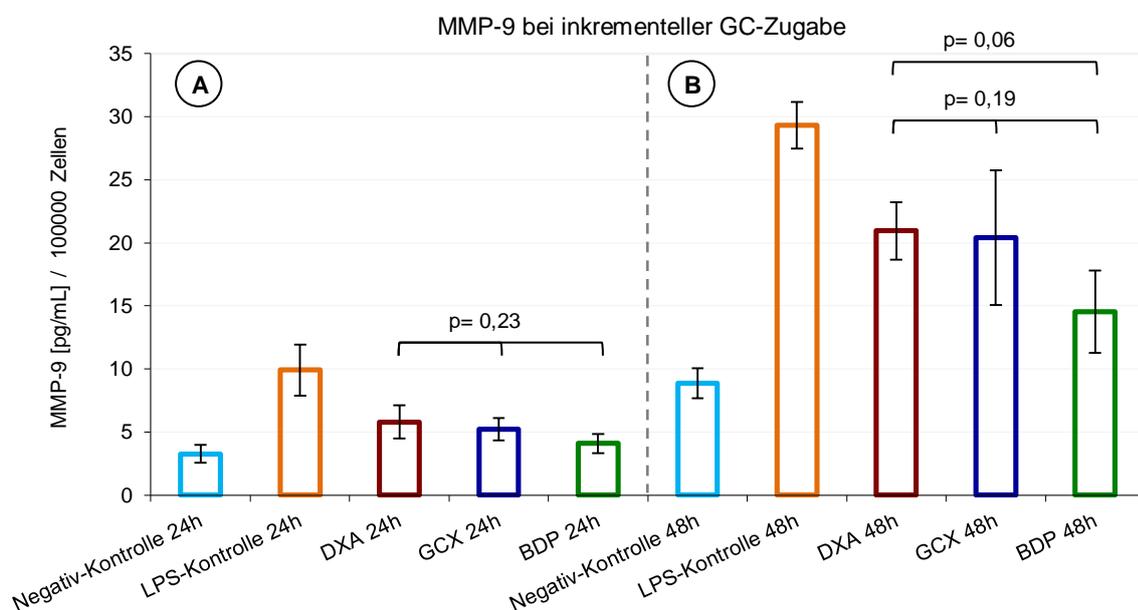


Abb. 42: Inhibition der MMP-9 Sekretion nach inkrementeller Aufdosierung zur Simulation der Freisetzungsprofile aus den Freisetzungsversuchen in Humanplasma nach 24 Stunden (A) und nach 48 Stunden (B). Die Ergebnisse aus dem Versuch mit direkter Freisetzung wurden bestätigt, da sich auch hier keine Überlegenheit eines Glucocorticoids abzeichnete, lediglich eine Tendenz zu einer stärkeren MMP-9 Sekretion durch BDP fiel auf, war aber nicht statistisch signifikant. Wurde MMP-9 nach 24 Stunden von allen Substanzen noch bis auf Niveau der BSA-Kontrolle gesenkt ($p=0,06$), konnte dies nach 48 Stunden nicht mehr beobachtet werden (GC vs. BSA-Kontrolle $p=0,01$). So fiel die Stärke der MMP-9 Hemmung zwar insgesamt geringer aus als bei der direkten Freisetzung aus LTSC, der Vergleich zwischen den Substanzen zeigte dennoch das gleiche Ergebnis gleicher Effektivität. Abweichungen 95 % CI $n=3$, ANOVA $\alpha=0,05$.

Diese Tendenz setzte sich letztlich auch nach 48 Stunden fort (siehe Abb. 42 B). Die MMP-9 Ausschüttung bei Behandlung mit DXA, GCX oder BDP war mit Konzentrationen von $20,9 \pm 2,3$ pg/mL, $20,4 \pm 5,3$ pg/mL und $14,5 \pm 3,3$ pg/mL jeweils geringer als in der LPS-Kontrolle ($29,3 \pm 1,8$ pg/mL), eine Absenkung auf das Niveau der Negativ-Kontrolle

($8,9 \cdot 1,2 \text{ pg/mL}$) erfolgte jedoch mit keiner Substanz mehr ($p= 0,01$). Genauso wenig konnte am Ende des Versuchs ein signifikanter Unterschied zwischen ihnen erkannt werden ($p= 0,19$), wenn auch für BDP ein nicht signifikanter Trend zu stärkerer Inhibition der MMP-9 Sekretion gegenüber DXA auffiel ($p= 0,06$).

5.4 Diskussion

Literatur zu einem Vergleich verschiedener Glucocorticoide oder anderer Arzneistoffe in der vorliegenden Anwendungsform konnte nur spärlich gefunden werden und scheint wenig vorhanden. Der Grund dafür liegt aller Wahrscheinlichkeit nach darin, dass bis dato – mit Ausnahme weniger BDP freisetzender Elektroden-Typen – ausschließlich Elektroden mit DX, eingesetzt als Essigsäure- (DXA) oder Phosphorsäureester (DXP, Dexamethasonphosphat), auf dem Markt verfügbar waren (*siehe auch Abschnitt 1.3 der Einleitung in Teil A*). Bisherige Untersuchungen konzentrierten sich daher in der Regel auf den Vergleich von DXA oder DXP freisetzenden Herzschrittmacherelektroden mit solchen ohne Glucocorticoid-Freisetzung oder verglichen die Anwendung im Atrium mit der im Ventrikel [19, 25-27, 112, 149]. Zur Anwendung von BDP lagen keinerlei Daten vor. Brewer et al. [33] berichteten immerhin von einem Vergleich verschiedener Arzneistoffe bei lokaler Freisetzung aus einer Polymermatrix und deren Effekt auf die Bildung einer fibrösen Kapsel um die Elektrodenspitze im Tierversuch, wobei auch hier als einziges Glucocorticoid DXP getestet wurde. Preston und Judge [34] berichteten interessanterweise bereits 1969, neben diversen anderen Arzneistoffen, von gegensätzlichen Effekten von Gluco- und Mineralcorticoiden auf die Erregbarkeit des Herzgewebes bei systemischer Verabreichung, wobei Mineralcorticoide eine Erhöhung der Reizschwelle bewirkten, Glucocorticoide hingegen zu der bekannten Absenkung derselben führten. Daher unterstützten die Autoren eine Behandlung mit Prednisolon beim sogenannten *Exit-Block*, wenn ein normaler Schrittmacherimpuls aufgrund ungewöhnlich hoher Reizschwellen nicht zur Erregung des Myokards führt. Hinweise auf einen theoretischen Vergleich von Prednisolon mit DX bei lokaler Freisetzung an der Elektrodenspitze konnten in den Beiträgen von Mond zu den Veröffentlichungen von Kusumoto und Goldschlager [13] und bei Singaray et al. [150] entdeckt werden. In beiden Veröffentlichungen wird eine höhere Effektivität von DX gegenüber Prednisolon aufgrund unterschiedlicher Plasmaproteinbindung thematisiert. Wie eingangs des Kapitels (*siehe Abschnitt 5.1*) bereits für eben dieses Beispiel erläutert sollte dabei jedoch wohl eher die relative Rezeptoraffinität als die Plasmaproteinbindung die entscheidende Rolle spielen. Experimentelle Untersuchungen zu diesem Vergleich zweier Glucocorticoide wurden indes in beiden Literaturstellen nicht aufgeführt. Auch Singaray et al. [150] untersuchten mit ihrem Vergleich von DXA und DXP lediglich verschiedene Prodrugs des DX.

So wurden mit den durchgeführten *in-vitro* Versuchen erstmals mehrere

verschiedene Glucocorticoide unter Berücksichtigung der für die Herzschrittmachertherapie relevanten Dosierungen in ihrer antiinflammatorischen Wirkung miteinander verglichen. Beim Einsatz der berechneten Dosen aus den Freisetzungsversuchen in Humanplasma reagierten die Zellen auf jegliche untersuchte Glucocorticoid-Behandlung mit gleicher Ausschüttung von IL-6 oder MMP-9. Zudem zeigte sich eine wenig ausgeprägte Hemmwirkung bezüglich beider Entzündungsmarker nach 48 stündiger Inkubation. Zu diesem Zeitpunkt lag kein statistisch signifikanter Unterschied in der IL-6 Sekretion zwischen den mit Glucocorticoiden behandelten Ansätzen und der LPS-Kontrolle mehr vor und der Versuch zeigte nur noch eine tendenzielle Entzündungshemmung durch die Arzneistoffe an. Dieser Umstand hing womöglich damit zusammen, dass der letzte Dosierungsschritt bereits nach 24 Stunden erfolgte und in den folgenden Stunden kein weiterer Konzentrationsanstieg für DXA, GCX und BDP mehr erfolgte. Ein zusätzlicher Dosisschritt 36 Stunden nach Versuchsbeginn hätte womöglich auch am Versuchsende eine ausgeprägte Hemmwirkung erkennen lassen. Bei direkter Freisetzung der Glucocorticoide stiegen deren Konzentrationen, wie die HPLC-Messungen zeigten (*siehe Abb. 38 in Abschnitt 5.3.1*), hingegen weiter an, was demzufolge zu einer stärkeren Sekretionshemmung von IL-6 und MMP-9 als beim inkrementellen Zusatz führte.

Für GCX und BDP konnten die Profile der Freisetzungen in Humanplasma (*siehe Abschnitt 2.3*) tatsächlich gut reproduziert werden, nicht so allerdings für DXA, dessen Konzentration von 337 ± 23 ng/mL die berechneten 119 ng/mL fast um das dreifache überstieg (*siehe Abb. 38 in Abschnitt 5.3.1*). Das um den BSA-Anteil modifizierte Freisetzungsmedium im Zellkulturversuch schien somit kein hinreichender Ersatz für Humanplasma als Freisetzungsmedium gewesen zu sein, da die Konzentrationsverhältnisse nicht zwischen allen Glucocorticoiden korrekt wiedergespiegelt wurden. Die zu hohe DXA-Freisetzung lag womöglich an dessen geringerer Lipophilie und der damit verbundenen besseren Löslichkeit im wässrigen Zellkulturmedium, wohingegen sich GCX und BDP hierin stärker ähnelten und weniger in ihrer Freisetzung beeinflusst waren.

Die beschriebenen Limitationen in den jeweiligen Versuchsaufbauten illustrierten zum einen potentielle Fallstricke von *in-vitro* Inhibitionsversuchen bezüglich zeitlicher Planung von Arzneistoffzugabe und Simulation physiologischer Verhältnisse und stellten zum anderen die Bedeutung des mitgeführten Kontroll-Versuchs hervor. Die Ergebnisse beider vorliegender Versuche müssen daher in jedem Fall gemeinsam betrachtet und bewertet werden.

Die Ergebnisse der IL-6 und MMP-9 Bestimmungen zeigten für DXA, GCX und BDP nach 24 und 48 Stunden insgesamt gesehen eine gleichwertige antiinflammatorische Wirkung in den eingesetzten Arzneistoffdosen. Eine Nivellierung eventuell vorhandener Unterschiede zwischen den Glucocorticoiden durch eine zu schwache Reizung der Zellen war unwahrscheinlich, da eine vollständige Unterdrückung der Sekretion der Entzündungsmarker unter Modell-Bedingungen in der Regel nicht beobachtet wird. So lag

beispielweise die Hemmung verschiedener Zytokin-Sekretionen in *ex-vivo* Versuchen mit den hochpotenten Glucocorticoiden Mometasonfuroat und Fluticasonfuroat in einem Bereich von etwa 40 bis 90 % der entsprechenden Positiv-Kontrollen [151]. Zwischen den beiden in ähnlichen Konzentrationen wie in den eigenen Untersuchungen eingesetzten Glucocorticoide konnten dort dennoch unterschiedliche inhibitorische Effekte gezeigt werden. Zudem konnte beobachtet werden, dass das Ausmaß der Glucocorticoid-Wirkung abhängig vom gewählten Versuchsaufbau und der zeitlichen Abstimmung auf den eingesetzten Entzündungsstimulus war [151], was den obigen Hinweis auf die zeitliche Planung derartiger Versuche unterstreicht.

Die unter den Glucocorticoiden vergleichbare Wirkung wurde trotz zum Teil sehr unterschiedlicher Potenzen der jeweiligen Wirkstoffe beobachtet, wobei vor allem die niedrige relative Rezeptoraffinität des DX im Vergleich zu den beiden anderen Substanzen auffällt. Mit den vorliegenden Dosisunterschieden alleine konnte dies nicht zusammenhängen, da BDP mindestens in gleicher, meist sogar in weit höherer Konzentration als DXA vorlag beziehungsweise zugegeben wurde. Eine Rolle mag das Ausmaß der Aktivierung der Prodrugs zu ihren Wirkformen gespielt haben, die in den Überständen des Versuchs bei direkter Freisetzung mit erfasst wurde (*siehe Abb. 38 in Abschnitt 5.3.1*). Deren gemessene Konzentrationen im Freisetzungsmittel sollten jedoch wie unter *Abschnitt 5.3.1* bereits erwähnt mit Vorsicht betrachtet werden. Da B-17-P rasch weiter zu BOH abgebaut wird, kumulierte dieses im Gegensatz zu weitestgehend stabilen DX im Medium nicht. Dies könnte zum Ausgleich der Potenzunterschiede beider Substanzen beigetragen haben. Prozesse wie die Diffusion der Substanzen an den Wirkort und lokale Metabolisierungsvorgänge rücken beim Einsatz von Prodrugs verstärkt in den Fokus, da bei einer lokalen Anwendung die Aktivierung in der Regel im Zielgewebe erfolgt und damit abhängig von der dortigen enzymatischen Aktivität ist [49, 90, 152]. Die Aktivierung des Ester-Prodrugs BDP soll im Lungengewebe beispielsweise bereits mit einer Halbwertszeit von einigen Minuten erfolgen [90]. Zu den metabolischen Vorgängen zur Aktivierung der Glucocorticoide DXA oder BDP im Herzgewebe liegen nach derzeitigem Kenntnisstand keine Daten vor. Einen diesbezüglichen Hinweis können möglicherweise die eigenen Untersuchungen zur Bestimmung der Gewebbindung geben, bei denen Herzgewebe in einem *ex-vivo* Modell eingesetzt wurde (*siehe Abschnitt 3*). Es sei jedoch einschränkend erwähnt, dass die Versuche nicht mit Rücksicht auf die Bestimmung der Aktivierung der Prodrugs entwickelt wurden.

Das verglichen mit DX wesentlich potentere GCX zeigte sich zumindest unter den gewählten Versuchsbedingungen als stabil. Nimmt man dies und weitere Einflussfaktoren wie die Plasmaproteinbindung zusammen, hätte man einen vergleichsweise stärker ausgeprägten Effekt für diese Substanz erwarten können, obwohl die Konzentration an GCX bei direkter Freisetzung nur etwa bei einem Drittel der DX-Konzentration lag. Nur nach 48 Stunden zeigte sich eine etwas niedrigere IL-6 Sekretion der Endothelzellen als bei Behandlung mit DXA und BDP (*siehe Abb. 39*). Dies stellt nicht die Korrelation hoher

relative Rezeptoraffinität mit starkem antiinflammatorischem Effekt [98] in Frage, zeigt jedoch, dass die tatsächliche Effektivität immer in Bezug auf das Anwendungsgebiet bewertet werden muss [49].

Dass sich die MMP-9 Ausschüttung durch alle Glucocorticoiden generell als besser beeinflussbar erwies als die IL-6 Sekretion, unterstützte die aufgestellte Vermutung einer starken Beeinflussung der Extrazellulärmatrix-Homöostase durch die lokale Glucocorticoid-Behandlung. Inwieweit sich dies auf die Bildung der fibrösen Kapsel um die Elektrodenspitze, also auf die Fremdkörperabwehrreaktion, auswirkt und welchen Anteil dies an einer Reizschwellenabsenkung hat, bedarf allerdings näherer Abklärung.

Inwieweit Ergebnisse aus *in-vitro* Versuchen auf *in-vivo* Bedingungen übertragen werden können ist keine leicht zu beantwortende Frage und die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen erlauben sicherlich nur eine nähere Einschätzung der tatsächlich vorliegenden Verhältnisse. Anhaltspunkte dafür, dass diese durchaus in die richtige Richtung deuten können, liefert der Vergleich von Singarayar et al. [150] zwischen DXA und DXP. Zwar wurden hier keine unterschiedlichen Wirkstoffe untersucht, allerdings vermuteten die Autoren in Abhängigkeit des eingesetzten Prodrugs von DX beträchtliche Dosisunterschiede aufgrund zu erwartender Differenzen in der Freisetzungskinetik zwischen DXA und DXP gerade zu Beginn der Applikation. Dies bestätigten auch die *in-vitro* Freisetzungsdaten von Herrlich et al. [73], die eine etwa sechs- bis siebenfach höhere Freisetzung von DXP gegenüber DXA innerhalb eines Monats ermittelten. Nichtsdestoweniger wurden mit DXP und DXA gleiche Ergebnisse bei der Reizschwellenentwicklung erhalten [150].

Neben den bereits angesprochenen Limitationen bei der Simulation der Freisetzungsverhältnisse, die jedoch durch den doppelten Versuchsaufbau abgefangen wurden, und der Aktivierung von Prodrugs, was als generelle Einschränkung von *in-vitro* Versuchen angesehen werden muss, kann auch die maximal 48 Stunden lange Versuchsdauer als Manko angesehen werden. So wird ein Unterschied im Peak-artigen Anstieg der Reizschwelle zwischen Herzschrittmacherelektroden mit und ohne Glucocorticoid üblicherweise in einem Zeitraum von etwa einer Woche beobachtet [16] und die Langzeitentwicklung der Reizschwelle in der Regel über mehrere Jahre verfolgt [26, 92]. Wie in vorigen Kapiteln der Arbeit bereits erläutert, ist womöglich eine Notwendigkeit der Glucocorticoid-Wirkung über einen derart langen Zeitraum und der Einfluss der nach Jahren nur noch geringen freigesetzten Glucocorticoid-Dosen auf die Reizschwelle allerdings zu diskutieren (*siehe unter anderem Abschnitte 2.1, 3.1 und insbesondere 4.1*). So könnte ob der schnell abnehmenden Freisetzungsgeschwindigkeit und der fibrösen Einkapselung der Elektrodenspitze gerade die initiale Entzündungsphase und deren Eindämmung durch die Glucocorticoid-Wirkung die weitreichendsten Auswirkungen auf die Entwicklung des Reizschwellenverlaufs haben und die Wahl des vergleichsweise sehr kurzen Versuchszeitraums gleichwohl rechtfertigen. Zudem setzt der antiinflammatorische Effekt der Glucocorticoide DXA, GCX und BDP üblicherweise bereits nach einigen Stunden

ein, was einen längeren Versuch unnötig erscheinen ließ und außerdem unter den Bedingungen des eingesetzten Zellkulturmodells für eine wochenlange Dauer schwer zu realisieren gewesen wäre.

Der erstmalig durchgeführte *in-vitro* Vergleich zwischen DXA, GCX und BDP zur lokalen antiinflammatorischen Effektivität nach Freisetzung aus einer Herzschrittmacherelektrode mit Corticosteroid-freisetzender Polymermatrix lässt insgesamt auf gleichwertige entzündungshemmende Effektivität schließen und damit ebenfalls einen gleichwertigen Effekt auf die Eindämmung des Reizschwellenanstiegs nach Implantation der Schrittmacherelektrode erwarten. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den wenigen bereits vorhandenen Untersuchungen dieser Applikationsform, beispielsweise zum Vergleich von DXA und DXP [150]. Der Einsatz moderner, hochpotenter Glucocorticoide wie GCX scheint auch bei geringerer Freisetzungsrate und damit verbunden niedrigerer Dosis eine wirksame Alternative zur bisherigen Standardsubstanz DXA darzustellen. Gleiches trifft prinzipiell auch auf den Einsatz von BDP zu, wobei sich dessen vergleichsweise schnelle Freisetzung (*siehe auch Abschnitte 2.3 und 3.3*) als Nachteil erweisen könnte, insofern eine Präsenz der Glucocorticoide in der Langzeitbetrachtung für die Stabilisierung der Reizschwelle auf niedrigem Niveau wichtig sein sollte. So zeigte BDP trotz der höheren Dosis keine höhere messbare Wirkung gegenüber dem Standard DXA. Zusätzlich bleibt im Fall des BDP zu berücksichtigen, dass dessen Wirkform B-17-P instabil ist und zu praktisch unwirksamen Metaboliten abgebaut wird und im Zielgewebe kaum eine Kumulation oder eine Art Depot-Wirkung erwartet werden kann.

6 Einfluss von Glucocorticoiden auf die Zellproliferation der humanen Zelllinien EA.hy926 und IMR-90

6.1 Fragestellung

Die Entzündung mit Vernarbung beziehungsweise Bildung einer fibrösen Hülle als Immunreaktion des Körpers auf einen Fremdkörper, wie unter Abschnitt 4.1 beschrieben, ähnelt strukturell stark den Prozessen der normalen Wundheilung, wie sie Broughton et al. [153] in ihrem Review anschaulich beschreiben. Demnach geht nach einer anfänglich vor allem durch Ausschüttung von Zytokinen und Makrophagenmigration gekennzeichneten Entzündungsphase die Ausheilung der Verletzung nach einigen Tagen in eine proliferative Phase über, die bis etwa zwei Wochen nach Beginn des Heilungsprozesses andauert und in welcher das Wachstum von Endothelzellen und Fibroblasten zur Ausbildung neuer Blutkapillaren und Extrazellulärmatrix im Vordergrund steht. Somit herrscht durchaus eine zeitliche Kohärenz dieser proliferativen Phase mit dem Reizschwellenanstieg unter Herzschrittmachertherapie.

Glucocorticoide in hohen Konzentrationen verzögern die Wundheilung [154] und haben einen proliferationshemmenden Effekt auf verschiedene Zelltypen. Dies äußert sich beispielsweise in Hautatrophien bei systemischer und häufiger noch unter lokaler Glucocorticoid-Therapie mit Einschränkung des Wachstums der Zellen der Epidermis [36]. Für Endothelzellen der Hornhaut des Auges wurde ebenso von einer proliferationshemmenden Wirkung durch Dexamethason (DX) berichtet, wie auf Zellen der dermalen Papille, die das Haarwachstum beeinflussen, oder das Endothel der kleinen Blutgefäße der Haut [155-157]. Die Wachstumshemmung scheint je nach betrachtetem Zelltyp stark konzentrationsabhängig zu sein. So erkannten Bourcier et al. [158] bei Einsatz niedriger DX-Konzentrationen *in-vitro* eine Förderung des Zellwachstums von Keratozyten, bei Exposition mit höheren Konzentrationen des Glucocorticoids jedoch wiederum eine inhibitorische Wirkung. Die Autoren verweisen zudem auf weitere derartige Beobachtungen in verschiedenen *in-vitro* Untersuchungen. Auch der Einsatz von Glucocorticoiden, im speziellen DX, bei der Behandlung von Keloiden – einem in Wundheilung und Narbenbildung auftretenden gutartigen Tumor der Haut, charakterisiert durch Bindegewebewucherung über die Grenzen der ursprünglichen Narbe hinaus – wird mit einer hemmenden Wirkung auf das übermäßige Wachstum von Fibroblasten in Verbindung gebracht [159]. Analog dazu erscheinen die Untersuchungen von Beule et al. [160], die im Tiermodell einen positiven Effekt lokaler Behandlung mit DX auf die Heilung verwundeter Nasenschleimhaut infolge einer Operation feststellen konnten. Gegenüber Placebo beobachteten sie eine geringere Bindegewebsbildung bei dennoch gleicher Dicke der neu gebildeten Epithelzellschicht.

Bis dato gibt es wenige histologische Untersuchungen der nahen

Elektrodenumgebung nach Explantation von Herzschrittmacherelektroden, teilweise nur aus Tierversuchen. Hierbei schien die Bindegewebekapsel um Glucocorticoid-freisetzende Elektroden dünner ausgeprägt, als bei solchen ohne Glucocorticoid, jedoch wurde kein Unterschied in Bezug auf die Anzahl an Fibroblasten im fibrösen Gewebe um die Elektrodenspitze beobachtet [18, 31] (*weitere Informationen finden sich auch in Abschnitt 1.2.5 der Einleitung in Teil A*). Radovsky et al. [18] fanden eine geringere Anzahl Immunzellen wie Leukozyten und Mastzellen in der Elektrodeneinkapselung bei Glucocorticoid-Anwendung. Sie vermuteten eine dünner ausgeprägte Bindegewebekapsel in der Umgebung Glucocorticoid-freisetzender Elektroden durch den antiinflammatorischen Effekt des Arzneistoffs, mit der eine Eindämmung der Fibroblasten-Aktivität einhergehen soll. Inwiefern freigesetztes DX durch einen direkten Effekt auf die Proliferation von Fibroblasten die Dicke der Bindegewebekapsel und damit die Reizschwellenentwicklung beeinflusst, kann anhand dessen nicht eindeutig beantwortet werden. Aufgrund des bekannten konzentrationsabhängigen Effekts von Glucocorticoiden auf das Wachstum verschiedener Zellarten, sowie den Analogien von Fremdkörperreaktion und Wundheilung, erschien ein solcher Zusammenhang allerdings plausibel. Um erste Hinweise zu bekommen, ob die Konzentrationen an DXA, GCX beziehungsweise BDP nach Freisetzung aus Herzschrittmacherelektroden in Bereichen liegen konnten, in denen die Glucocorticoide die Zellproliferation hemmen, wurden Zellproliferationsversuche mit Fibroblasten und Endothelzellen unternommen.

6.2 Versuchsprinzip

Da die Bestimmung der Zellzahl zu den Routineaufgaben beim Arbeiten in der Zellkultur gehört, wurden dementsprechend vielfältige Varianten entwickelt, um Zellzählungen mit hinreichender Genauigkeit und möglichst verträglichem Arbeitsaufwand durchzuführen. Die klassische Methode durch mikroskopische Zählung mittels Hämozytometer ist zwar genau, jedoch bei großen Versuchsansätzen mit hohem Aufwand verbunden. Alternativen bieten sich in Messungen mittels Durchflusszytometrie [161] und der metabolischen Aktivität, beispielsweise mit dem MTT-Assay, bei dem das gelbe Tetrazolium-Salz 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenylterazoliumbromide (MTT) in den Mitochondrien lebender Zellen zu einem violetten Formazan umgesetzt wird [162], oder durch Messung des ATP-Gehalts der Zellen mittels Biolumineszenz-Assay [163]. Während die Durchflusszytometrie sicherlich ein sehr genaues und praktikables Verfahren darstellt, bleibt die Zellzahlbestimmung durch Messung metabolischer Aktivitäten auf die Erfassung lebender Zellen beschränkt. Solche Verfahren sind überdies anfällig für Verfälschungen, da die Aktivität des gesamten Zellkulturansatzes stark von äußeren Bedingungen abhängt. Für Versuche, in denen stoffwechselaktive Substanzen zum Einsatz kommen, sind derlei Verfahren daher für die Bestimmung des Zellwachstums als ungeeignet anzusehen und

finden eher Einsatz zur Messung der Zellvitalität [164-166]. Die Erfassung des zellulären Gehaltes an Nukleinsäuren aus DNA und RNA bietet eine Möglichkeit die Zellproliferation unabhängig von der metabolischen Aktivität zu erfassen und ist somit weit weniger anfällig für äußere Beeinflussung. Eine weit verbreitete Methode dazu ist die Markierung von DNA und RNA mittels Fluoreszenzfarbstoffen wie Hoechst 33258, Propidiumiodid, DAPI oder CyQuant GR. Nach Lyse wird der Zellkulturansatz kurz mit dem jeweiligen Farbstoff inkubiert, wobei sich die planaren Moleküle als Interkalatoren zwischen die Basenpaare der Nukleinsäure schieben und hernach der Gesamtgehalt an DNA und RNA fluorimetrisch quantifiziert werden kann [165, 167]. Der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen vermeidet die Nachteile in der Handhabung und Entsorgung der Proben, mit denen der radioaktive ³H-Thymidin-Inkorporations-Assay behaftet ist, bei dem die Tritium-markierte Nukleinsäure Thymidin von den Zellen bei der DNA- beziehungsweise RNA-Synthese verwertet wird [168]. Der Farbstoff CyQuant GR wurde als sehr sensitiv im Einsatz mit verschiedenen Zellarten und als gut geeignet für den Einsatz im 96-Well-Format [165] beschrieben, daher wurde er für die eigenen Proliferationsversuche verwendet.

Untersucht wurde das Zellwachstum der humanen Endothelzellen EA.hy926 und der humanen Fibroblasten IMR-90 unter dem Einfluss der Glucocorticoide DXA, GCX und BDP. Die Vorgehensweise war dabei angelehnt an dem unter Abschnitt 5.2.2 beschriebenen Versuch, bei dem die Glucocorticoide inkrementell unter Nachahmung der jeweiligen Freisetzungprofile zu den Zellkulturansätzen gegeben wurden. In einem Vorversuch wurde zunächst die geeignete Aussaatdichte für eine Beobachtung des Zellwachstums über sieben Tage hinweg bestimmt, die Zellen dann für den Proliferations-Assay in entsprechender Dichte in 96-Well-Platten ausgesät und für ein bis sieben Tage in 200 µL (Ausgangsvolumen) Vollmedium bei 37 °C wachsen gelassen. Währenddessen wurde von Beginn an und alle weiteren 24 Stunden zur selben Uhrzeit bis zum Anbruch des siebten Versuchstages eine Glucocorticoid-Tagesdosis zu den Zellen gegeben, so dass die resultierenden Konzentrationen im Überstand über die Zeit die Freisetzungprofile der Glucocorticoide aus den Versuchen in Humanplasma abbildeten (*siehe Abschnitt 2 und Abb. 43*).

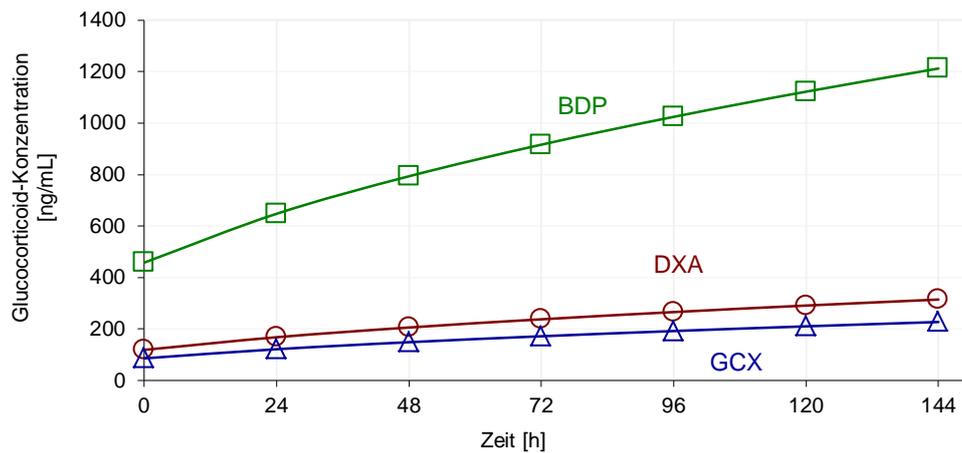


Abb. 43: Profil der inkrementellen Dosierungen der drei Glucocorticoide DXA, GCX und BDP über sieben Tage während der Proliferations-Assays. Die Berechnungen nach dem Quadratwurzelgesetz und den Freisetzungsraten aus den Versuchen in Humanplasma (siehe Abschnitt 2) führten zu Endkonzentrationen von 315 ng/mL DXA, 227 ng/mL GCX und 1212 ng/mL BDP nach 144 Stunden. Die Endkonzentrationen wurden durch Zugaben in sieben Dosierungsschritten nach jeweils 24 Stunden im Zellkulturmedium aufgebaut, wobei die erste Dosis gleich zu Beginn des Versuchs ($t=0$ h) zugesetzt wurde und die letzte daher zu Beginn des siebten Versuchstages nach 144 Stunden. Da die Konzentrationsberechnungen auf den experimentell ermittelten Freisetzungsraten im Humanplasma beruhte, wurden damit die unterschiedlichen Freisetzungsprofile für die Glucocorticoide simuliert (für weitere Informationen zum Dosierungsschema siehe Abschnitt 6.3 im Experimentellen Teil C).

Die Berechnung der jeweils erforderlichen Konzentrationen erfolgte nach *Fml. 7* (siehe Abschnitt 5.2.2) für alle 24 stündigen Inkremente bis zu 168 Stunden. Die maximalen Konzentrationen lagen am Ende der Versuchszeit bei 315 ng/mL für DXA, für 227 ng/mL GCX und 1212 ng/mL für BDP. Den ebenfalls mitgeführten Negativ- und Positiv-Kontrollen wurde kein Glucocorticoid beigemengt. Letzteren wurde jedoch täglich 2-Methoxyestradiol (2ME) zu einer Endkonzentration von 10 μ M als Proliferationsinhibitor zugesetzt – ein A-Ring Metabolit des Estradiols, der bereits als potenter Inhibitor der Angiogenese und der Zellproliferation von Tumor- und Endothelzellen beschrieben wurde [169-171]. Täglich wurde das Fortschreiten des Zellwachstums aufgenommen, indem alle 24 Stunden bis zum Ablauf der sieben Tage langen Versuchszeit die Inkubation einiger Ansätze durch Verwerfen des Mediums und Einfrieren bei -80 °C abgebrochen wurde. Zuletzt wurde die Zellzahl aller Ansätze gemeinsam nach Zellyse durch langsames Auftauen und kurzer Inkubation mit fluoreszenzfarbstoffhaltigem Lysepuffer fluorimetrisch bestimmt (siehe Abb. 44, für nähere Informationen zur Versuchsdurchführung, Dosierungsschema und Fluoreszenzmessung siehe Abschnitt 6 im Experimentellen Teil C).

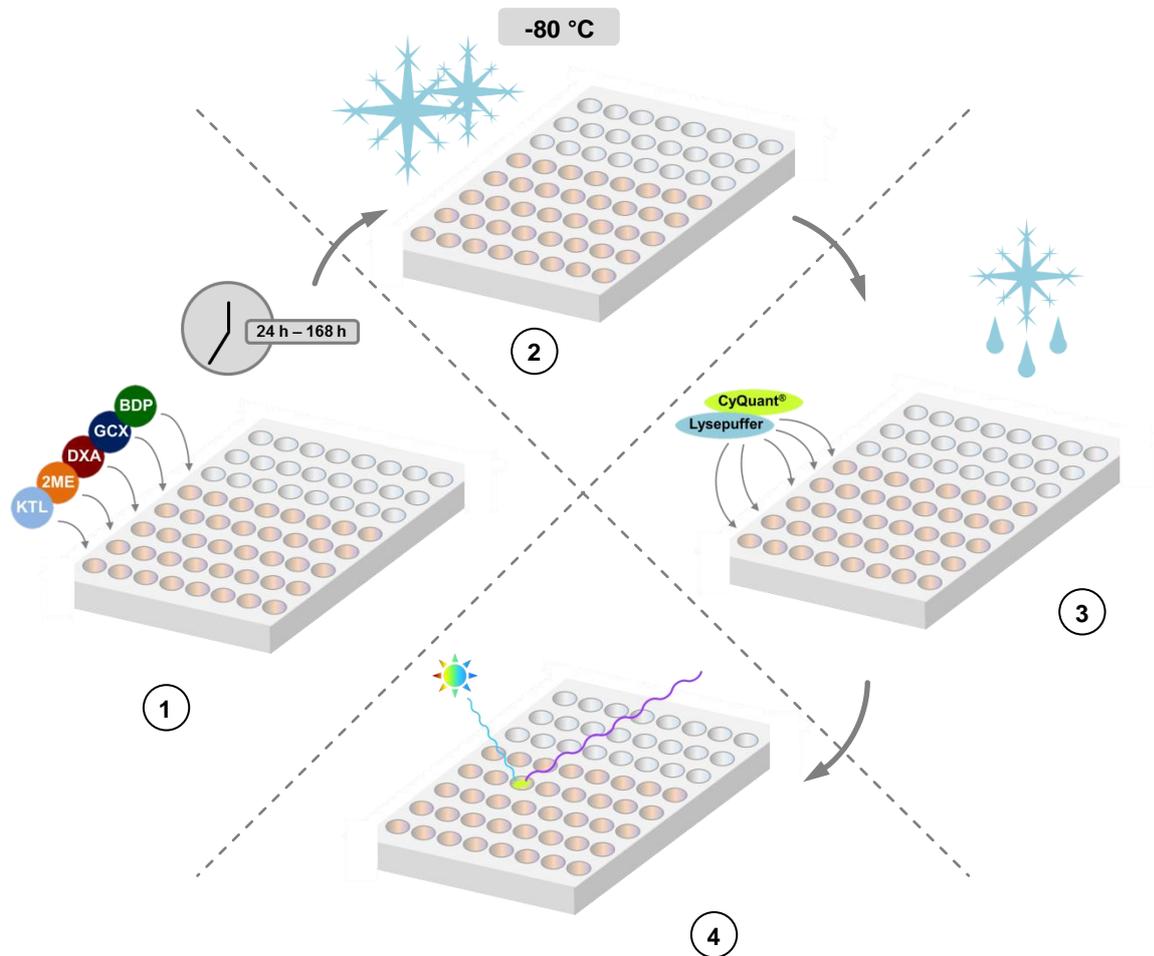


Abb. 44: Schematischer Versuchsablauf der Proliferations-Assays mit EA.hy926 Endothelzellen und IMR-90 Fibroblasten unter dem Einfluss von DXA, GCX oder BDP. Die Aussaatdichte der Zellen wurde so gewählt, dass das Zellwachstum über einen Zeitraum von sieben Tagen hinweg beobachtet werden konnte. Nach Aussaat wurden die Zellen ein bis sieben Tage lang bei 37 °C inkubiert. (1) Von Beginn an und alle weiteren 24 Stunden wurden DXA, GCX oder BDP zu den Ansätzen gegeben. Die inkrementellen täglichen Dosiszugaben bildeten dabei die Freisetzungprofile aus den Versuchen in Humanplasma (siehe Abschnitt 2) ab. Zeitgleich wurden Negativ-Kontrollen (KTL) zur Prüfung des normalen Zellwachstums mitgeführt sowie Positiv-Kontrollen, denen täglich 2-Methoxyestradiol (2ME) in einer Endkonzentration von 10 µM im Überstand als Proliferationsinhibitor zugesetzt wurde. (2) Nach jeweils 24 Stunden wurden das Wachstum einiger Ansätze abgebrochen, indem das Medium verworfen und die Zellkulturansätze als Proben bei -80 °C tiefgefroren wurden. (3) Durch langsames Auftauen auf Raumtemperatur und kurzer Inkubation mit Fluoreszenzfarbstoff enthaltendem Lysepuffer wurden die Zellen aller Ansätze nach Ablauf der kompletten Versuchszeit aufgeschlossen und (4) die Zellzahlen fluorimetrisch bestimmt.

6.3 Ergebnisse

In den getesteten Konzentrationen zeigten weder DXA, GCX noch BDP über den kompletten Versuchszeitraum gesehen einen antiproliferativen Einfluss auf die Endothelzellen EA.hy926 (siehe Abb. 45). DXA bewirkte tendenziell eher ein verstärktes Wachstum der Zellen gegenüber der Negativ-Kontrolle, das sich aber nicht durchgängig

über sieben Tage hinweg abzeichnete. Der maximale Wert von $+32,6 \pm 10,7 \%$ ($n=8$; 95 % CI) lag nach sechs Tagen (144 Stunden) und einer Konzentration von 292 ng/mL DXA im Überstand vor. Am Versuchsende waren die Zellen um $+10,9 \pm 8,0 \%$ mehr gewachsen als ohne DXA-Behandlung. Gleiches gilt für GCX, das nach sechs Tagen zu $+37,2 \pm 16,0 \%$ und am Ende zu $+9,3 \pm 7,1 \%$ mehr Zellen als in der Negativ-Kontrolle führte. Für BDP ließ sich keine Tendenz über den sieben Tage langen Beobachtungszeitraum ableiten. Das 2-Methoxyestradiol hemmte die Zellproliferation dagegen effektiv, so dass die Zellzahl der Positiv-Kontrolle am Ende bei $-83,3 \pm 1,4 \%$ der Negativ-Kontrolle lag.

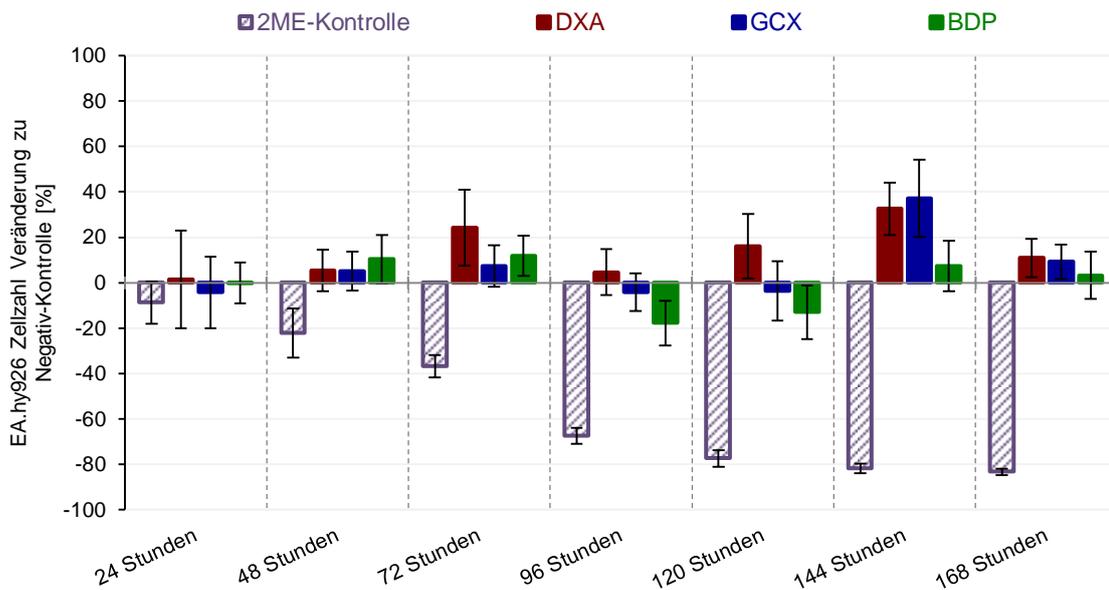


Abb. 45: Veränderungen der Zellzahlen (EA.hy926) in [%] gegenüber der Negativ-Kontrolle zu den jeweiligen Probenentnahmezeitpunkten (alle 24 Stunden bis zu sieben Tage). Über die gesamte Versuchszeit betrachtet, zeigte sich kein antiproliferativer Einfluss der Glucocorticoide DXA, GCX und BDP in den Konzentrationen, in denen sie nach Freisetzung in Humanplasma (siehe Abschnitt 2) zu erwarten waren. Für DXA und GCX lag, wenn überhaupt, eine Tendenz zu leichter Wachstumsförderung vor. Die Positiv-Kontrolle 2-Methoxyestradiol (2ME) zeigte dagegen eine eindeutige Inhibition des Zellwachstums über die komplette Versuchszeit. Reihenfolge der Balken je Messzeitpunkt gleicht der Legende. Abweichungen CI 95 %, $n=8$.

Das Zellwachstum lag für die Negativ-Kontrolle nach sieben Tagen bei $505 \pm 45 \%$ gegenüber der Zellzahl bei Aussaat. Dies entsprach einer Verdopplungszeit von 72 Stunden, wobei die Zellen am Ende der Versuchszeit nach mikroskopischer Beurteilung noch nicht vollständig zur Konfluenz gewachsen waren.

Die IMR-90 Fibroblasten wuchsen unter Exposition mit DXA, GCX oder BDP in gleichem Maß, wie die Zellen der Negativ-Kontrolle (siehe Abb. 46). Bis nach 96 Stunden zeigte sich mit $+40,3 \pm 16,6 \%$ für DXA, $+30,6 \pm 18,6 \%$ für GCX und $+48,9 \pm 13,5 \%$ für BDP eine leicht erhöhte Proliferation, die sich jedoch in der Folgezeit nicht fortsetzte. 2-Methoxyestradiol hemmt das Zellwachstum auch hier erfolgreich.

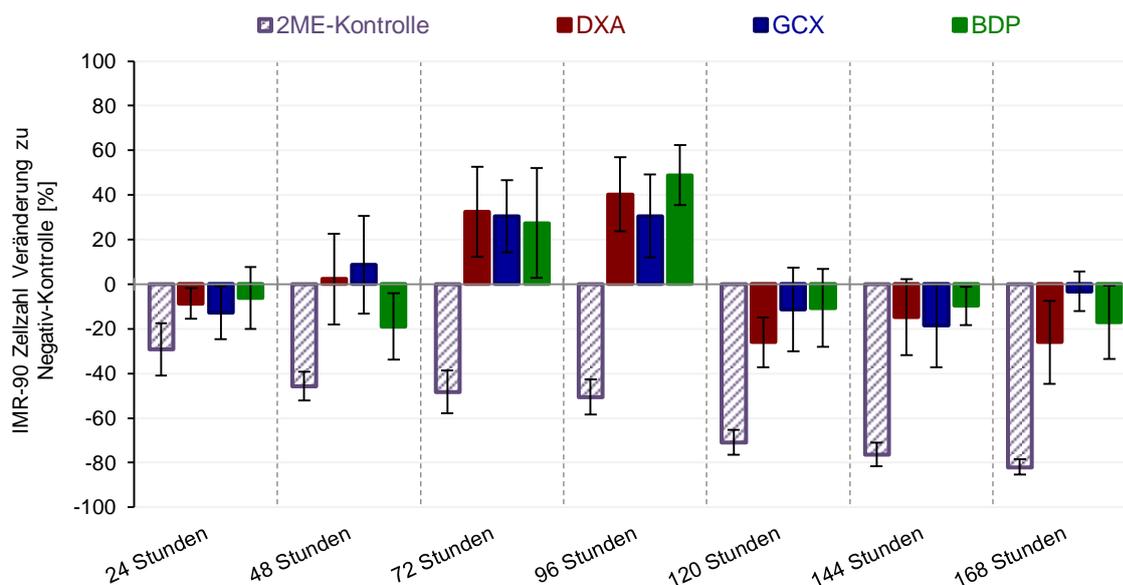


Abb. 46: Veränderungen der Zellzahlen (IMR-90) in [%] gegenüber der Negativ-Kontrolle zu den jeweiligen Probenentnahmezeitpunkten (alle 24 Stunden bis zu sieben Tage). Über die gesamte Versuchszeit betrachtet zeigte sich kein antiproliferativer Einfluss der Glucocorticoide DXA, GCX und BDP in den Konzentrationen, in denen sie nach Freisetzung in Humanplasma (*siehe Abschnitt 2*) zu erwarten waren, eher lag eine tendenzielle Wachstumsförderung vor. Die Positiv-Kontrolle 2-Methoxyestradiol (2ME) zeigte dagegen eine eindeutige Inhibition des Zellwachstums über die komplette Versuchszeit. Reihenfolge der Balken je Messzeitpunkt gleicht der Legende. Abweichungen CI 95 %, n= 8.

6.4 Diskussion

Mit den beschriebenen Proliferations-Assays wurde ein erster Beitrag geleistet, das Zellwachstum unter Glucocorticoid-Einfluss im Kontext der Herzschrittmachertherapie zu untersuchen. Dies sollte Erkenntnisse darüber liefern, ob Glucocorticoide den Reizschwellenanstieg direkt über die Proliferation der Endothelzellen und Fibroblasten modulieren könnten. Da beide Zellarten in der proliferativen Phase der Wundheilung beziehungsweise der Fremdkörperreaktion stark wachsen [153] und diese Phase mit dem Zeitraum zusammenfällt, in dem der Anstieg der Reizschwelle üblicherweise beobachtet wird [16], lag eine derartige Vermutung nahe.

Anhand der Simulation der Freisetzung von DXA, GCX und BDP in Humanplasma konnte in den durchgeführten Versuchen keine Inhibition des Zellwachstums der Endothelzelllinie EA.hy926 und IMR-90 Fibroblasten beobachtet werden. Zeitweise zeigte sich sogar eher eine Tendenz zu mäßig erhöhter Proliferation, die sich jedoch nicht vollständig über sieben Tage hinweg durchsetzte. Während die Veränderungen der Zellzahl der EA.hy926 gegenüber der Negativ-Kontrolle insgesamt bei allen drei Substanzen inkonstant waren (*siehe Abb. 45*), zeigten die IMR-90 Fibroblasten nach

120 Stunden eine deutlich abgefallene Proliferation verglichen mit den Werten nach 96 Stunden. War zunächst noch ein deutlich gesteigertes Zellwachstum zu beobachten, fiel dies später etwas unter das Niveau der Negativ-Kontrolle ab, wenn auch nicht signifikant (siehe Abb. 46). Dass dieser Sachverhalt mit der Glucocorticoid-Konzentration zusammenhing erschien wenig plausibel, da die simulierten Freisetzungsraten während der Versuchszeit erstens nicht zu einem größenordnungsumspannenden Konzentrationsanstieg führte und zweitens der Einschnitt für alle drei Substanzen zeitlich einheitlich zu beobachten war. Letzteres ließ eher vermuten, dass die Behandlungszeit ein ausschlaggebender Faktor dafür gewesen sein könnte, wie es auch bei Hettmannsperger, der allerdings mit der mikrovaskulären Endothelzelllinie HDMEC arbeitete, für eine Betamethason-Behandlung den Anschein machte [157]. Dementsprechend wäre ein zeitabhängiger antiproliferativer Effekt auch mit den Endothelzellen im eigenen Versuch zu erwarten gewesen. Die Inkonsistenz der Ergebnisse ließ letztlich keinen klaren Schluss aus den Versuchen zu und bedarf zukünftig weiterer und genauerer Abklärung.

Mit dem einfach gewählten Versuchsaufbau wurde der Themenaspekt der Proliferationshemmung nur angeschnitten. In Anbetracht der Erkenntnisse tat sich beispielsweise die Frage auf, ob die Phänotypen der Zelllinien die entsprechenden Charakteristika primärer Zellen hinreichend widerspiegeln, um den Glucocorticoid-Einfluss auf deren Wachstumsverhalten zu prüfen, was allerdings ein prinzipielles Problem beim Arbeiten mit Zelllinien darstellt [116, 172, 173]. Sicherlich schmälert das durch die Immortalisation per se veränderte Wachstumsverhalten der Zelllinien die Aussagekraft der Versuche [174]. Für eine genauere Untersuchung wäre somit eine gezielte Auswahl oder die Testung mehrerer Endothelzell- oder Fibroblasten-Typen anzustreben. Dies lässt sich auch daraus ableiten, dass die Konzentrationen, in denen bislang für DX ein antiproliferativer Effekt gezeigt wurde, abhängig von der im jeweiligen *in-vitro* Versuch eingesetzten Zellart sehr unterschiedlich ausfiel und mehrere Größenordnungen von 10^{-8} bis 10^{-4} M umspannte [156, 158, 159, 175-177]. In den eigenen Versuchen lagen die Konzentrationen mit $0,2 \cdot 10^{-6}$ bis $2,5 \cdot 10^{-6}$ M für DXA, GCX und BDP somit allerdings in einem Bereich, in dem durchaus mit einer Wachstumshemmung gerechnet werden konnte. Für GCX und BDP, beziehungsweise deren im Vergleich zu DX um ein vielfaches potenteren Wirkformen, galt diese Vermutung besonders, da die antiproliferative Wirkung vermutlich über den Glucocorticoid-Rezeptor vermittelt wird [159, 178].

Für den Mechanismus dieser antiproliferativen Wirkung wird einerseits angenommen, dass der Übergang des Zellzyklus von der G1- in die S-Phase unterbunden wird, möglicherweise durch Hemmung der Expression der Thymidin-Kinase [177]. Andererseits wird auch eine indirekte Hemmung der Zellproliferation über verminderte Expression von Wachstumsfaktoren wie VEGF oder PEDF diskutiert [159, 179]. So wurde auch ein antagonistischer Effekt auf die Stimulation mit Wachstumsfaktoren gezeigt, welcher wiederum durch Mifepriston, ein Glucocorticoid-Rezeptor Antagonist, aufgehoben

wurde und somit auf die Vermittlung des Effektes über den Glucocorticoid-Rezeptor hinwies [178]. In Versuchen mit Endothelzellen und Fibroblasten in Co-Kultur könnte somit beispielsweise untersucht werden, ob sich die in der Schrittmachertherapie üblichen Glucocorticoid-Konzentrationen auf die VEGF-Expression der Endothelzellen auswirken und wie dies wiederum das Wachstum der Fibroblasten beeinflusst [159]. Die Messung der Expression von Wachstumsfaktoren auf RNA-Ebene und die wechselseitige Beeinflussung verschiedener Zellarten stellen deshalb potentiell interessante Parameter für weiterführende Untersuchungen dar, die Aufschluss über eine Proliferationshemmung der Glucocorticoide in der Schrittmachertherapie geben könnten.

Eine Nebenwirkung der lokalen Glucocorticoid-Therapie ist die Gewebeatrophie [36]. Inwiefern dieser unerwünschte Effekt in Erscheinung tritt ist vom Applikationsort und der applizierten Dosis abhängig, welche genauen Ursachen einer Atrophie unterliegen hingegen von der Gewebeart. Bei intranasaler Anwendung der hoch potenten Glucocorticoide Mometasonfuroat und Fluticasonpropionat wurde selbst unter Langzeittherapie zur Behandlung der allergischen Rhinitis keine Atrophie der Nasenschleimhaut beobachtet [102]. Dahingegen gilt die großflächige Hautatrophie bei der kutanen Langzeitanwendung als häufige Nebenwirkung, deren Ursachen in der Proliferationshemmung von Keratinozyten und Fibroblasten sowie in der Inhibition der Kollagensynthese liegt [180, 181] und ebenso als Grund für Beeinträchtigungen der Wundheilung gilt [154]. Eine gehemmte Proteinsynthese beziehungsweise Proteolyse der Extrazellulärmatrix und von Myofibrillen ist auch die Ursache von Muskelatrophien unter systemischer Langzeitanwendung von Glucocorticoiden oder in schweren Stresssituationen, die mit hohen endogenen Cortisol Plasmaspiegeln verbunden sind [182]. Neben einer proliferationshemmenden Wirkung kann die Beeinflussung der Kollagensynthese durch Glucocorticoide vermutlich eine entscheidende Rolle für die Ausbildung der fibrösen Hülle um die Spitze einer Herzschrittmacherelektrode spielen. Umso mehr, da ein Eingriff in die Kollagensynthese durch Glucocorticoide auch *in-vitro* bereits ermittelt wurde [183, 184]. Untersuchungen der Kollagensynthese, der Sekretion von Prokollagen oder entsprechend exprimierter mRNA könnten das Spektrum an vielversprechenden Ansatzpunkten erweitern, um die Plausibilität der Theorie zu prüfen, dass die Höhe der Reizschwelle über das Ausmaß der Fibrosierung an der Elektrodenspitze beeinflusst würde. Insofern sich dies als zutreffend erweisen würde, könnte die Kollagensynthese beispielsweise als Parameter dienen, anhand dem Glucocorticoide hinsichtlich ihres Potentials für den Einsatz in der Herzschrittmachertherapie verglichen werden könnten. Wie bereits erwähnt bleibt allerdings zu beachten, dass der Zusammenhang zwischen dem Grad der Fibrosierung an der Elektrodenspitze und niedriger Reizschwelle nicht geklärt ist und ebenso Gegenstand weiterer Untersuchungen werden muss.

6.5 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Zellwachstums in Umgebung der Freisetzungsmatrix

Um noch einen weiteren Blick auf die Zellproliferation an der Spitze einer Glucocorticoid-freisetzenden Herzschrittmacherelektrode zu werfen, wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Endothelzellen EA.hy926 und der IMR-90 Fibroblasten gemacht, die in der Umgebung DXA-freisetzender Polymermatrix (*Collar*) wuchsen (*für nähere Beschreibung eines Collars siehe Abschnitt 1.1 und Abschnitt 1.3.1 im Experimentellen Teil C*). Die Collar wurden dazu in einem Kollagen-Gel eingebettet, um ihn am Boden der Zellkulturschale zu fixieren. Nach Überschichtung des Gels mit Zellkulturmedium wurden die Zellen auf dem Gel ausgesät, welches ihnen eine gute Wachstumsgrundlage bot (*siehe Abb. 47*). Nach Heranwachsen bis zur Konfluenz, wurden sie mit Fluoreszeindiaceetat und Propidiumiodid für die Fluoreszenzmikroskopie angefärbt. Als Kontrolle wurden Placebo-Collar ohne Glucocorticoid eingesetzt, mit denen des Weiteren in gleicher Weise verfahren wurde, wie mit DXA-Collar.

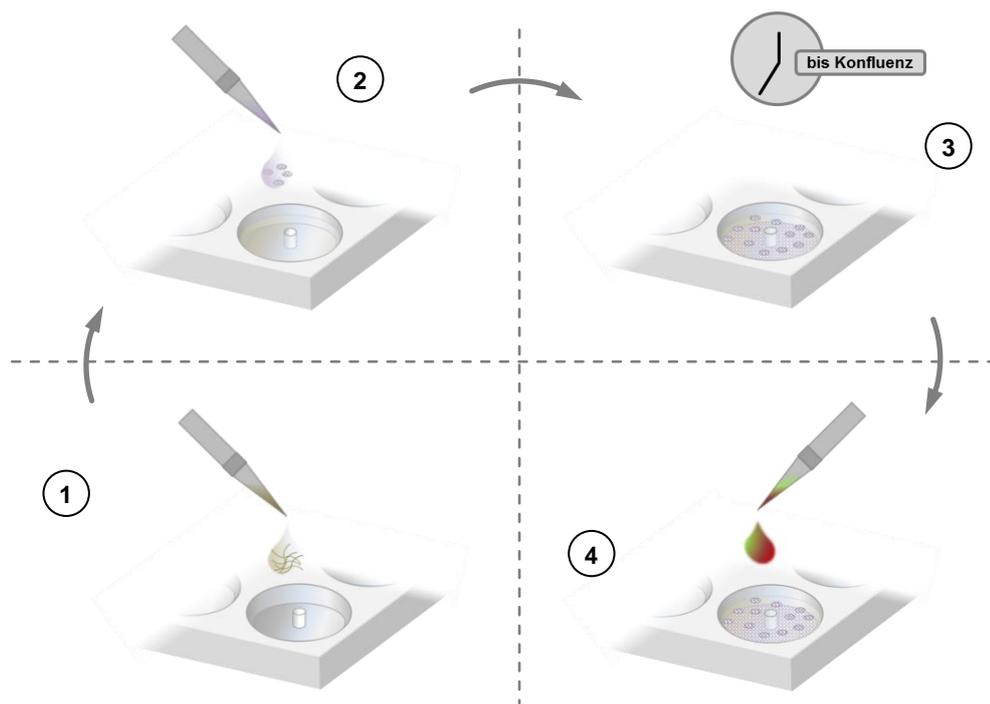


Abb. 47: Schematische Vorbereitung des *in-vitro* Versuchs zur Beobachtung des Zellwachstums in der Umgebung eines DXA-haltigen Collars. (1) Der zylindrische Collar wurde senkrecht stehend in der Zellkulturschale platziert und zur Fixierung gegen Aufschwimmen in ein Kollagen-Gel gegossen. (2) EA.hy926 Endothelzellen oder IMR-90 Fibroblasten wurden auf die Kollagenmatrix ausgesät und (3) bis zur Konfluenz wachsen gelassen. (4) Anschließend wurden die Zellen mit Fluoreszeindiaceetat und Propidiumiodid für die Fluoreszenzmikroskopie angefärbt.

Für ein dreidimensionales Zellwachstum erwies sich das Kollagen-Gel als zu fest, so dass die Zellen nicht in dieses einzudringen vermochten. Die feste Konsistenz war jedoch nötig, da der Collar sonst nicht fixiert wurde und ob seiner geringen Materialdichte und seines kleinen Hohlraums in der Mitte, in welchen aufgrund der Oberflächenspannung des Mediums keine Flüssigkeit eintrat, auf dem Zellkulturmedium schwamm. Die Zellen wuchsen somit in erster Linie auf der Gel-Oberfläche.

Fluoreszeindiacetat wird von lebenden Zellen aufgenommen und durch Esterasen zu Fluoreszein hydrolysiert, welches in den Zellen akkumuliert und zu grüner Fluoreszenz angeregt werden kann. Das nach Anregung rotes Licht emittierende Propidiumiodid passiert hingegen nur geschädigte Zellwände und markiert daher sterbende und tote Zellen [185]. Dies sollte einen Hinweis darauf liefern, ob das Zellwachstum in der Umgebung nahe der Grenzschicht zur Polymermatrix durch die Glucocorticoid-Freisetzung gestört war. Durch ein erhöhtes Aufkommen toter Zellen bei Verum- gegenüber Placebo-Collar oder anhand einer dort geringer ausfallenden Dichte lebender Zellen war ein Glucocorticoid-Einfluss möglicherweise zu erkennen.

Die Anfärbung der Endothelzellen mit Propidiumiodid zeigte eine höhere Anzahl toter Zellen in Umgebung DXA-freisetzender Collar, als in der eines Placebo-Collars (*siehe Abb. 48*), diese lagen allerdings nicht in unmittelbarer Nähe zur Freisetzungsmatrix. In den Aufnahmen der Fibroblasten konnte kein augenscheinlicher Unterschied erkannt werden. Die Anfärbung mit Fluoreszeindiacetat zeigte bei beiden Zellarten überall gleichmäßig konfluent gewachsene Zellen (*keine Abbildung*). Inwieweit die wenigen abgestorbenen Zellen auf die Freisetzung von DXA aus dem Collar zurückging, war ob der Entfernung zum Collar fragwürdig. Da der Collar nahezu vollständig in das Kollagen-Gel eingebettet und die Diffusion des Arzneistoffs dadurch retardiert war, waren in dieser Entfernung zur Freisetzungsmatrix eher keine Glucocorticoid-Konzentrationen zu erwarten gewesen, die zu einer derartigen Wirkung hätten führen können. Ohnehin war es das Ziel des Versuchs die Zellen in unmittelbarer der Nähe der Grenzschicht zur Freisetzungsmatrix zu betrachten, da nur hier mit relevanten Konzentrationen an DXA gerechnet wurde. Jedoch wurde in keiner Aufnahme eine erhöhte Fluoreszenz in den Regionen nahe dieser Grenzschicht gegenüber weiter entfernt gelegenen Bereichen oder gegenüber der Placebo-Kontrolle erkannt. Diese Beobachtung deckte sich somit mit den Ergebnissen der Proliferationsversuche (*siehe Abschnitt 6.3*).

Für weitere Versuche dieser Art könnte, in Analogie zu den Ausführungen unter Abschnitt 6.4, eine Anfärbung des von Fibroblasten sekretierten Kollagens an der Grenzschicht zur Polymermatrix interessant sein, wofür freilich eine andere Methode zur Fixierung des Collars in der Zellkulturschale verwendet werden müsste. Abstand genommen werden sollte allerdings auch von der Verwendung von Fibrin als eine Art Klebstoff, da dieses die Fibroblastenproliferation zu fördern scheint [186] und damit das Versuchsergebnis verfälschen würde. Eventuell bietet hier sich in der Verwendung von Hydrogelen für dreidimensionale Zellkultur ein vielversprechender Ansatz [187].

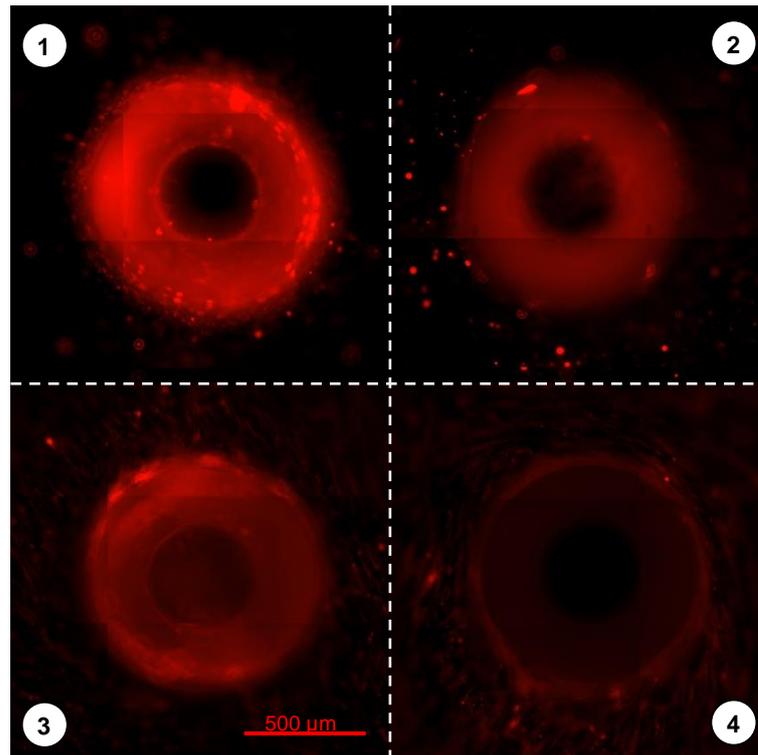


Abb. 48: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit Propidiumiodid gefärbten Zellen, die in der Umgebung DXA-haltigen Collar (Freisetzungsmatrix) wuchsen. Die Collar waren in ein Kollagen-Gel eingebettet, um sie am Boden der Zellkulturschale zu fixieren und ein Aufschwimmen im Überstand zu verhindern. Zum Vergleich wurden Aufnahmen von Placebo-Collar ohne DXA unter den gleichen Bedingungen gemacht. (1) EA.hy926 Endothelzellen in Umgebung eines Placebo- und (2) eines DXA-haltigen Collars. (3) IMR-90 Fibroblasten in Umgebung eines Placebo- und (4) eines DXA-haltigen Collars. Die Silikonmatrix der Collar wurde stark durch Propidiumiodid gefärbt, weshalb vor allem die transparenten Placebo-Collar stark fluoreszierten. DXA-haltige Collar erschienen dunkler, da sie aufgrund des Arzneistoffgehalts nicht transparent waren. Die Aufnahmen der Endothelzellen ließen augenscheinlich etwas mehr tote Zellen in der erweiterten Umgebung eines DXA-haltigen Collars vermuten, als in Umgebung eines Placebo-Collars. In den Aufnahmen der Fibroblasten konnte kein Unterschied ausgemacht werden. In der unmittelbaren Umgebung zum DXA-haltigen Collar konnte weder für die Fibroblasten, noch für die Endothelzellen ein Unterschied bezüglich der Anzahl toter Zellen erkannt werden. Bei allen Aufnahmen wurde das Hintergrundrauschen gefiltert. Aufnahme 10x Vergrößerung.

6.6 Schlussfolgerung der pharmakodynamischen Untersuchungen zum Einsatz von Glucocorticoiden in der Herzschrittmachertherapie

Die unterschiedlichen pharmakokinetischen Voraussetzungen wirkten sich in den eigenen Untersuchungen nicht in deutlich unterscheidbaren antiinflammatorischen Aktivitäten aus. Die *in-vitro* Versuche ließen damit nicht auf einen Vorteil von GCX oder BDP gegenüber der Standardsubstanz DXA schließen. Insofern die antiinflammatorische Wirkung zur Absenkung der Reizschwelle in der Schrittmachertherapie maßgeblich sein sollte, könnten demzufolge auch gleichwertige klinische Effekte zu erwarten sein. Dass die Entzündung an der Grenzfläche von Elektrodenspitze und Herzgewebe womöglich lediglich als mild eingestuft und eine schwere Verlaufsform dieses pathologischen Geschehens infolge der Schrittmacherimplantation als unwahrscheinlich eingeschätzt werden kann, unterstützt diese Annahme. Auch auf anderen Therapiegebieten, wie beispielsweise der Behandlung der allergischen Rhinitis, bleibt bislang zu diskutieren, ob eine unterschiedliche Effektivität der Glucocorticoide nicht in erster Linie nur theoretischer Natur ist, da eine Überlegenheit einer speziellen Substanz klinisch bislang nicht eindeutig nachweisbar war [41]. Womöglich hängt der Nachweis unterscheidbarer Effektivität zwischen modernen hoch potenten Glucocorticoiden und älteren Substanzen dabei jedoch von der Schwere der Verlaufsform der allergischen Entzündung ab und in der klinischen Untersuchung somit letztlich an der Auswahl eines passenden Patientenkollektivs [102].

Auch ein antiproliferativer Effekt der Glucocorticoide auf Fibroblasten und Endothelzellen konnte bei den freigesetzten Dosen nicht erkannt werden. Eine Beeinflussung der Dicke der fibrösen Kapsel an der Elektrodenspitze über die Hemmung des Zellwachstums beteiligter Zelltypen durch die Glucocorticoide scheint daher unwahrscheinlich. Untersuchungen einer potentiellen Inhibition der Kollagensynthese von Fibroblasten könnten ein zukünftiger Ansatzpunkt sein, um zu prüfen, ob Glucocorticoide womöglich dennoch über eine Verringerung der virtuellen Elektrodenoberfläche zu einer erniedrigten Reizschwelle führen könnten.

Wie in der Einleitung dieser Arbeit angesprochen (*siehe Abschnitt 1.2.5 in der Einleitung in Teil A*), könnte auch die Untersuchung eines Einflusses hoher lokaler Glucocorticoid-Konzentrationen auf die zelluläre Erregbarkeit ein lohnenswertes Ziel sein. So könnten Glucocorticoide zu einer Veränderung des Ionentransports über die Zellmembran führen. Die in dieser Arbeit gemessenen Konzentrationen der ins Gewebe diffundierten Glucocorticoide könnten auch für derlei Untersuchungen eine gute Grundlage darstellen.

Derweil zeigten eigene Untersuchungen, dass von einer inflammatorischen Reizung durch den elektrischen Schrittmacherimpuls selbst nicht auszugehen sein sollte. Dies ließ damit die Frage nach einer dauerhaft notwendigen antiinflammatorischen Glucocorticoid-Wirkung offen.

7 Abbauprodukte von Dexamethason und Beclomethason unter Langzeitinkubation in humanem Blutplasma und verschiedenen Puffersystemen

Während der Freisetzungsversuche in humanem Blutplasma (*siehe Abschnitt 2*) wurde in den Chromatogrammen der Proben aus Ansätzen mit Dexamethasonacetat (DXA) und Beclomethasondipropionat (BDP) jeweils ein unerwarteter Substanzpeaks beobachtet. Der zusätzliche Peak aus DXA-Proben zeigte sich bei einer Retentionszeit von 5,9 Minuten, der aus BDP-Proben bei 4,2 Minuten. Beide Peaks traten bereits nach einem bis zwei Tagen Inkubationszeit auf, wobei gerade die unbekannte Substanz in den BDP-Ansätzen in sehr großem Ausmaß zu entstehen schien (*für nähere Informationen zu den Inkubationsbedingungen und dem Auftreten der Substanzen siehe Abschnitte 2.3 bis 2.5*). Da die Flächen beider Peaks über die Dauer dieser Langzeitinkubation fortweg zunahmen und ein selektives Vorkommen in den Proben des jeweiligen Glucocorticoids festgestellt werden konnte, war von einem Ursprung der unbekannten Substanzen aus DXA beziehungsweise BDP selbst auszugehen. Die Hydrolysen der Ester an C-17 beziehungsweise C-21, welche in beiden Ausgangssubstanzen gemäß deren Prodrug-Charakter aufzufinden sind, laufen vergleichsweise rasch innerhalb Minuten bis weniger Stunden ab. Dies legen die Halbwertszeiten von ca. 30 Minuten für den C-21 Ester und ungefähr drei Stunden für die Ester-Gruppe an C-17 des BDP nahe [86]. Ein Rückschluss auf den direkten Vorläufer des jeweiligen unbekanntes Stoffes konnte somit nicht gezogen werden, da die frühesten Probenentnahmen erst nach 24 und 48 Stunden erfolgten.

Im Folgenden wird die Identifizierung der Substanzen erläutert und deren Herstellung zur Verwendung als Referenzsubstanz für die Analyse mittels HPLC-UV dargestellt. Da das Degradationsprodukt der BDP-Ansätze in solch unerwartet großen Mengen auftrat, wie in den Freisetzungsversuchen beobachtet, wurden nach Aufklärung der Identität zusätzlich Stabilitätsversuche mit Beclomethason (BOH) durchgeführt, um Hinweise auf die Ursache des Abbauprozesses zu finden.

7.1 Identifizierung unerwarteter Substanzen mittels LC/MS und Magnetresonanzspektroskopie

Zur Aufklärung der Identitäten der unbekanntes Substanzen wurden die Molekülmassen in LC/MS-Messungen ermittelt und ¹H-NMR-Spektren aufgenommen (*für Informationen zu Methodik siehe Abschnitt 7.2 im Experimentellen Teil C*). Der Abgleich der Daten aus den aufgenommenen Spektren mit literaturbekanntes Informationen gab schließlich Aufschluss

über die Identität der vorliegenden Substanz. Aufgrund der geringen Substanzmengen, die aus den Versuchen zur Verfügung standen, wurde hiervon zunächst keine weitere Bestätigung mittels ^{13}C -Spektrum unternommen.

7.1.1 Identifizierung des BDP-Abbauprodukts

Für BDP wurde bereits in früheren Untersuchungen [91, 94] festgestellt, dass sich unter den Einflüssen humanem Blutplasmas diverse Abbauprodukte und Metaboliten bilden. Die bereits angesprochenen hydrolytischen Veränderungen, sind größtenteils erwünscht, da sie zur Aktivierung des Prodrugs BDP beziehungsweise zur Inaktivierung des eigentlichen Wirkstoffs Beclomethason-17-propionat (B-17-P) führen. Sie werden in erster Linie durch enzymatischen Abbau durch unspezifische Esterasen hervorgerufen [90]. Daneben wurde mit dem 9,11-Epoxy-Beclomethason (9,11-Epoxy-BOH) ein weiterer Abkömmling der Muttersubstanz entdeckt, der in humanem Blutplasma erst bei langen Inkubationszeiten in signifikanten Mengen entstehen [91, 94]. Nicht eindeutig geklärt ist bis dato, inwiefern dabei von Metabolismus gesprochen werden kann oder ob dies größtenteils einer chemischen Instabilität des Ausgangsmoleküls unter den im humanen Blutplasma herrschenden Bedingungen zugeschrieben werden muss.

9,11-Epoxide moderner synthetischer Corticosteroide sind als Vorstufen in der Synthese durchaus gebräuchlich. Viele dieser Arzneistoffe – neben Beclomethason-Estern beispielsweise auch Triamcinolon, Betamethason, Dexamethason (DX) oder Mometasonfuroat – sind mit einer $9\alpha,11\beta$ -Halohydrin-Funktion ausgestattet, weshalb man sich bei deren Synthese ein einheitliches Verfahren zu Nutze machen kann. Das 9,11-Epoxid stellt dabei eine Zwischenstufe in diesen Prozessen dar [188] (*siehe Abb. 49*). Die Bildung des Epoxids läuft bei der Synthese in der Regel über die Vorstufe des Bromohydrins (9 α -bromo-11- β -hydroxy-Corticosteroid) ab, wobei das Bromid an Position C-9 eine gute Abgangsgruppe für eine intramolekulare Substitutionsreaktion mit der Hydroxyl-Gruppe in Position C-11 darstellt und unter basischen Bedingungen rasch das 9,11-Epoxid entsteht. Zur Einführung eines Chlorid- oder eines Fluorid-Substituenten an Position C-9 wird der Ring anschließend mit der entsprechenden Halogenwasserstoffsäure wieder geöffnet [188-190]. Chlorierte Substanzen neigen unter leicht basischen Bedingungen bereits zu Re-Zyklisierung, von fluorierten Molekülen ist dies hingegen nicht bekannt. So wurden entsprechende Instabilitäten bei Mometasonfuroat und BDP schon in Phosphatpuffer bei physiologischem pH-Wert von 7,4 und, wie bereits erwähnt, in humanem Plasma beobachtet [91, 94, 98]. Dies legte nahe, dass es sich bei dem zusätzlich beobachteten Peak aus den BDP-haltigen Humanplasmaproben möglicherweise um das 9,11-Epoxid des BOH handelte.

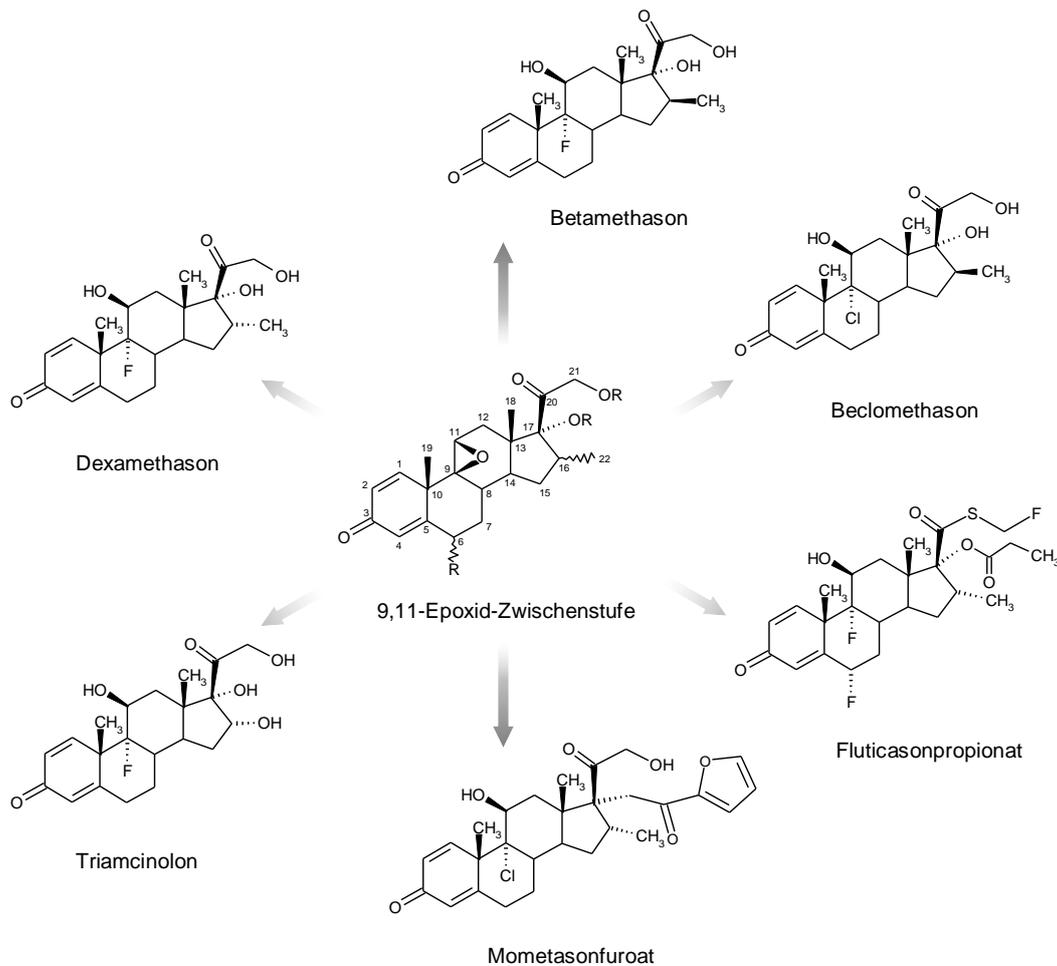


Abb. 49: Beispiele für synthetische Corticosteroide mit $9\alpha,11\beta$ -Halohydrin-Funktion und das 9,11-Epoxid als deren potentielle Synthesezwischenstufe. Etablierte Syntheseprozesse über das Epoxid bestehen für Dexamethason, Betamethason, Beclomethason (beziehungsweise dessen 17,21-dipropionsäureester) und Mometasonfuroat [188-190].

Zur Aufklärung wurden die Massenspektren des BOH und des unbekannten Peaks aus der gleichen gesammelten Probe, die den Freisetzungsversuchen in Humanplasma entstammte, aufgezeichnet (siehe Abb. 50). Der unbekannte Peak bei der Retentionszeit von 6 Minuten zeigte im ESI-positiven Messmodus ein Masse-Ladungs-Verhältnis von 373 m/z $[M+H]^+$ und somit eine Massendifferenz von 36 zu den 409 m/z $[M+H]^+$ des Beclomethason bei 5,4 Minuten. Die Massenpeaks bei 395 m/z beziehungsweise 431 m/z stellten die Natrium-Addukte $[M+Na]^+$ dar. Die Differenz von 36 Masseneinheiten zwischen dem postulierten Edukt BOH und seinem Produkt entsprach formal der Eliminierung von HCl, wie es zur intramolekularen Substitutionsreaktion zur Bildung des 9,11-Epoxy-BOH passte. Die gleiche Beobachtung zur Massendifferenz machten bereits Valotis et al. [98] für das MF und dessen entsprechende Epoxidierung.

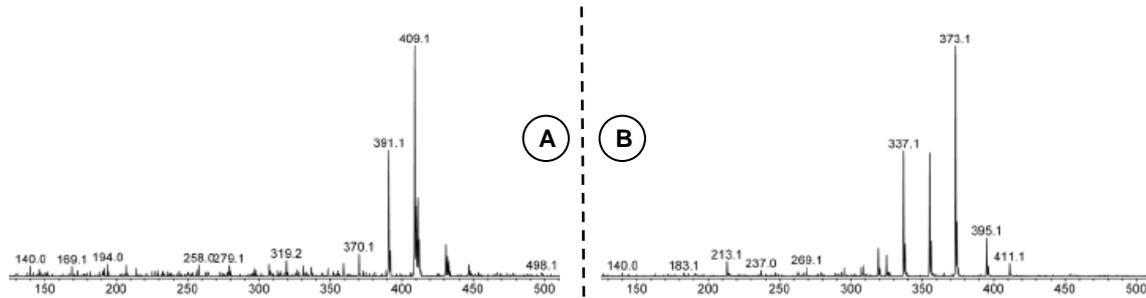


Abb. 50: Massenspektren von BOH (A) und 9,11-Epoxy-BOH (B) aus den gesammelten Proben der Freisetzungsvorversuche in Humanplasma. Das Massenspektrum des bis dato unbekanntes Abbauproduktes zeigte mit 373 m/z $[M+H]^+$ eine um 36 Masseneinheiten geringere Masseladungszahl, als die 409 m/z $[M+H]^+$ von BOH. Zusätzlich waren die jeweiligen Natrium-Addukte mit 431 m/z $[M+Na]^+$ beziehungsweise 395 m/z $[M+Na]^+$ zu erkennen.

Zur Bestätigung der massenspektrometrischen Analyse wurden von BOH und – nach Isolation aus den Humanplasmaproben – dem 9,11-Epoxyd 1H -NMR-Spektren aufgenommen (siehe Abb. 51). Hier sei das Augenmerk auf die beiden Signale der Protonen der CH-Gruppe und der Hydroxylgruppe an Position C-11 gelenkt. In der Ausgangssubstanz BOH wies das Proton der CH-Gruppe eine Verschiebung von 4,34 ppm auf, im Spektrum des Abbauproduktes war dieses zu 3,18 ppm hin verschoben und war somit zum Teil vom Signal des restlichen Wassers verdeckt. Das Proton der Hydroxylgruppe, das bei BOH bei 5,38 ppm auffindbar war, fehlte im Abbauprodukt aufgrund des daraus gebildeten Epoxids erwartungsgemäß. Da Foe et al. [91] bei ihren Stabilitätsuntersuchungen bereits die gleichen Veränderungen aufzeigten, konnte von der Identität des Abbauproduktes als 9,11-Epoxy-BOH ausgegangen werden.

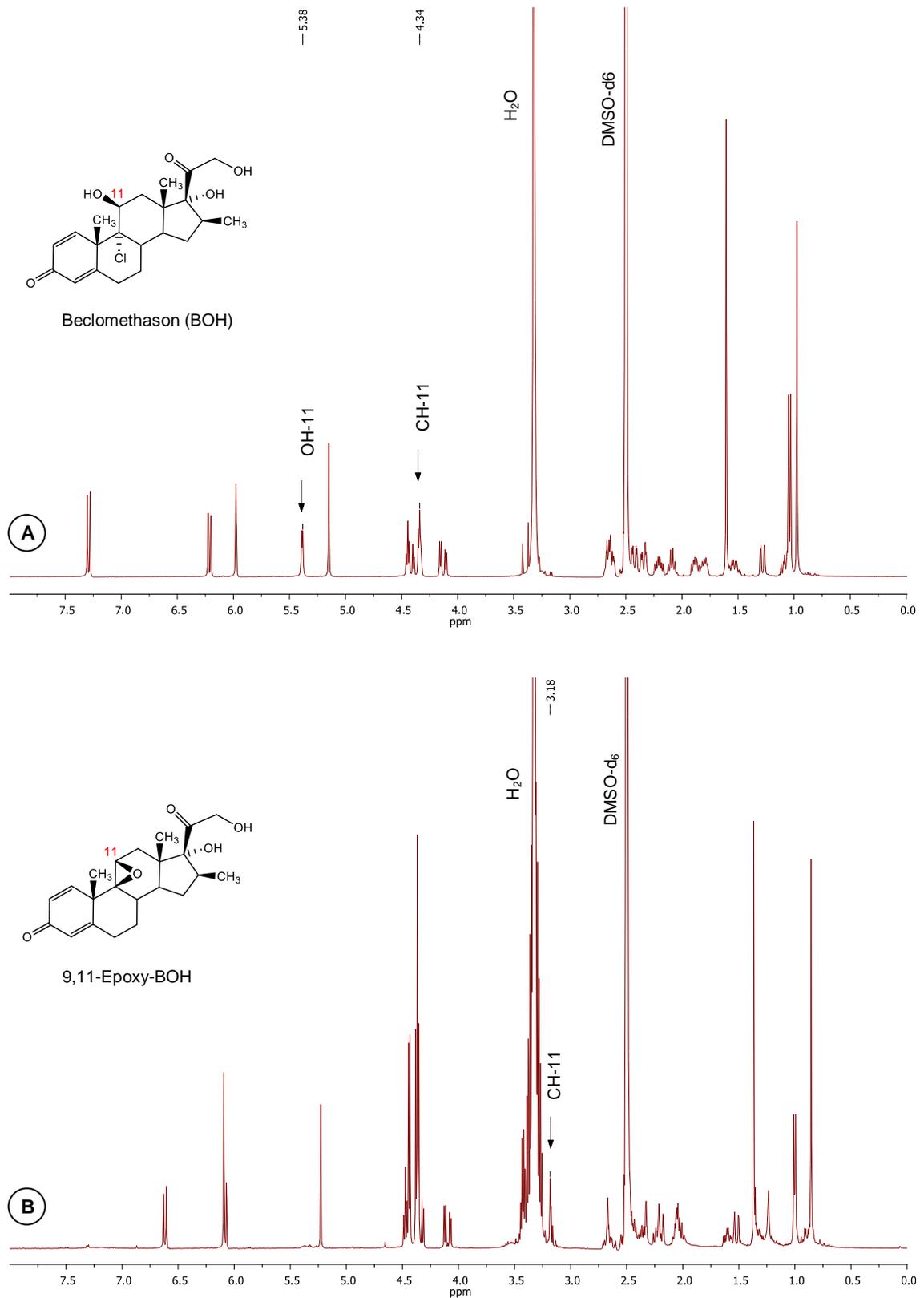


Abb. 51: ^1H -NMR-Spektren (aufgenommen in DMSO-d_6) von BOH (A) und 9,11-Epoxy-BOH (B) nach Isolation aus Humanplasma. Das Signal des Protons der CH-Gruppe in Position C-11 war von 4,3 ppm bei BOH nach 3,2 ppm bei 9,11-Epoxy-BOH verschoben. Das Signal der OH-Gruppe an Position C-11 bei 5,38 ppm fehlte im Abbauprodukt aufgrund des daraus gebildeten Epoxids.

7.1.2 Identifizierung des DXA-Abbauproduktes

Die Bildung eines 9,11-Epoxids konnte aufgrund des einleitend erwähnten Sachverhalts zur Stabilität fluorierter synthetischer Corticosteroide ausgeschlossen werden. Die massenspektrometrische Analyse der gesammelten Humanplasmaproben aus den Freisetzungsversuchen (siehe Abschnitt 2) zeigte für den entsprechenden Peak im HPLC-Chromatogramm ein Masseladungsverhältnis von 333 m/z [M+H⁺], also eine Differenz von 60 Masseneinheiten zu DX, welches 393 m/z [M+H⁺] aufwies (siehe Abb. 52). Die Natrium-Addukte beider Stoffe waren mit 355 m/z [M+Na⁺] beziehungsweise 415 m/z [M+Na⁺] ebenfalls zu sehen.

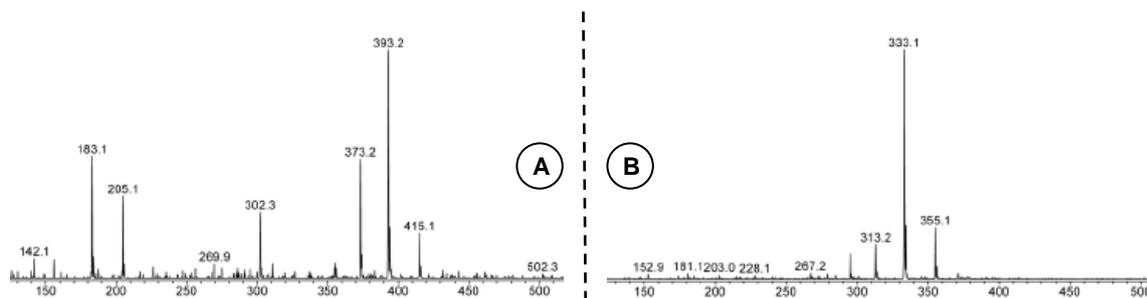


Abb. 52: Massenspektren von DX (A) und seinem Degradationsprodukt (B) in Humanplasma. Die Masseladungszahlen von 393 m/z [M+H⁺] des DX und 333 m/z [M+H⁺] des Abbauproduktes zeigten eine Differenz von 60 Masseneinheiten. Die Natrium-Addukte sind mit 415 m/z [M+Na⁺] beziehungsweise 355 m/z [M+Na⁺] zu erkennen. Die Massendifferenz entspricht der Molekülmasse von Ethen-1,2-diol und somit der C-20-Seitenkette des DX.

Ein Plasmametabolit des DX der Molekülmasse 332 g/mol konnte bis dato nicht in der bestehenden Literatur gefunden werden. Jedoch beschrieben Gentile et al. [191] in ihrer Charakterisierung des Lebermetabolismus von Dexamethason eine Abspaltung der Dihydroxyaceton-Seitenkette bei Inkubation mit Lebermicrosomen, bevor es über das Cytochrom P450 Isoenzym CYP-3A4 zu einer Hydroxylierung in Position 6 kommen soll. Ein Abgang der Seitenkette als Ethen-1,2-diol entsprach einer Massendifferenz von 60 g/mol und einer formalen Oxidation des C-17 zu einem Keton. Die Beobachtungen aus den Massenspektren legten daher die Bildung des 17-Keto-Steroids 17-Oxo-Dexamethason (17-Oxo-DX) durch Abspaltung der Seitenkette nahe. Diese Annahme schien plausibel, da auch Tomlinson et al. [43] von einer solchen Abspaltung durch Metabolismus in humaner Niere berichteten. Auch in alkalischer Lösung war ein derartiger Abbau bereits bekannt [192, 193].

Auf diesen Aspekt und den dazu postulierten Reaktionsmechanismus soll später noch eingegangen werden, ebenso wie auf die Bestätigung der Molekülstruktur des im Humanplasma gefundenen 17-Oxo-DX mittels NMR (siehe Abschnitt 7.3.2), die zu diesem Zeitpunkt – den geringen Substanzmengen aus den Proben der Freisetzungsversuche geschuldet – noch nicht durchgeführt werden konnte.

7.2 Stabilität von Beclomethason in humanem Blutplasma und verschiedenen Puffersystemen

Da das 9,11-Epoxy-BOH bei der Langzeitinkubation während der Freisetzungsversuche in großem Ausmaß auftrat und nach 28 Tagen gar einen Anteil von ~90 % aller BDP-verwandten Analyten in den Humanplasmaproben ausmachte (*siehe Abschnitt 2.4*), wurde der Blick nun auf die Stabilitätseigenschaften der Substanz gerichtet. Bisherige Untersuchungen in Humanplasma wurden zumeist nur über einige Stunden durchgeführt [91]. Deren primäres Ziel war es jedoch nicht die Entstehung des 9,11-Epoxids zu untersuchen, vielmehr wurden hier die gesamte Abbau-Route und dabei entstehende Nebenprodukte betrachtet. Berücksichtigt man die Halbwertszeiten von BDP und seinen Monoestern, konnte dazu ein solch kurzer Betrachtungszeitraum als ausreichend erachtet werden. Dagegen wurde mit den eigenen Anstrengungen nunmehr verfolgt das Auftreten des 9,11-Epoxy-BOH näher zu beleuchten.

Während der Freisetzungsversuche in Humanplasma konnte zu Beginn, also nach 24 und 48 Stunden, noch deutliche Mengen BOH nachgewiesen werden, die in der Folgezeit wieder abnahmen und sich dann auf ein in etwa konstantes Niveau einpendelten. Das 9,11-Epoxy-BOH wurde ebenfalls bereits nach 24 Stunden erkannt und etablierte sich darauf als Hauptanalyt, wobei auch hier nach 15 Tagen Versuchszeit eine Abnahme der Plasmakonzentration zu verzeichnen war. Zudem konnten über die Dauer der Freisetzung hinweg auch immer relativ konstante Konzentrationen an BDP erkannt werden, welches offenbar fortweg aus dem Matrixsystem freigesetzt wurde. Die Monoester des BOH konnten praktisch zu keinem Zeitpunkt der Probennahmen quantifiziert werden (*für nähere Informationen zu den Ergebnissen der Freisetzungsversuche siehe Abschnitt 2.4*).

Der geschilderte Verlauf des Auftretens der Analyten, gerade zu Beginn der Freisetzung, ließ darauf zurückschließen, dass die Bildung des Epoxids wohl vornehmlich aus BOH erfolgen musste. Wäre die Entstehung aus dem 21-Monoester der Hauptweg, wie von Foe et al. [91] für den Abbau in Humanplasma vermutet, hätte ein Nachweis von BOH nicht möglich gewesen sein sollen oder es hätte 9,11-Epoxy-Beclomethason-21-propionat aufgefunden werden müssen – und zwar mehr als BOH – da hierbei die HCl-Elimination schneller als die Esterhydrolyse hätte ablaufen müssen. Da Letzteres doch als eher unwahrscheinlich einzuschätzen war und außerdem überhaupt kein Monoester des Epoxids zu den Zeitpunkten der Probenentnahmen gefunden wurde, blieb letztlich der Weg über BOH als naheliegendster Hauptabbauweg übrig. Das bislang vorgeschlagene Schema zum BDP-Abbau konnte demnach wie in *Abb. 53* dargestellt modifiziert werden.

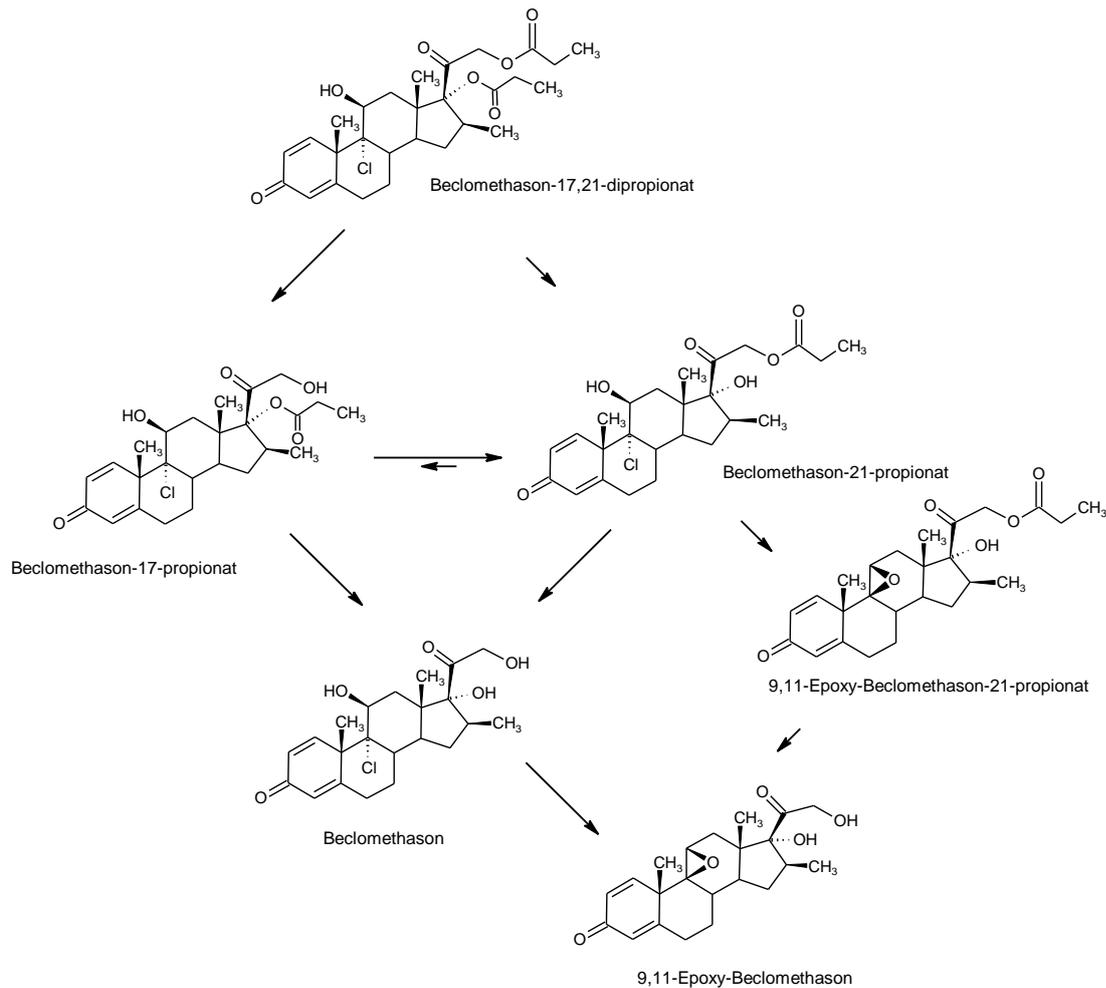


Abb. 53: Modifiziertes Schema des Abbauwegs von BDP zu 9,11-Epoxy-BOH nach Foe et al. [91]. Die Entstehung des 9,11-Epoxy-BOH als vorläufiges Endprodukt der Abbaureaktion dürfte hauptsächlich über BOH erfolgen. Ein Epoxid des 21-Propionsäuremonoesters konnte während der eigenen Versuche nicht entdeckt werden. Dies und die dagegen gut messbaren Konzentrationen an BOH ließen darauf schließen, dass im vorliegenden Versuchsaufbau der geschwindigkeitsbestimmende, also langsamste, Schritt des Abbaus die HCl-Elimination sein musste.

Auf Grundlage der vorigen Überlegungen wurden Stabilitätsversuche ausgehend von BOH unternommen, in denen die Geschwindigkeiten der Entstehung von 9,11-Epoxy-BOH in humanem Blutplasma und in verschiedenen Puffersystemen ermittelt und anschließend miteinander verglichen wurden. Dies sollte Hinweise darauf geben, ob vor allem enzymatische Katalyse im Humanplasma die Reaktion propagierte oder andere Einflüsse, wie beispielsweise der pH-Wert, für den Abbau ausschlaggebend waren. Zudem wurde die Stabilität des Epoxids selbst betrachtet, um die während der Freisetzung beobachtete Konzentrationsabnahme zu untersuchen.

7.2.1 Versuchsprinzip

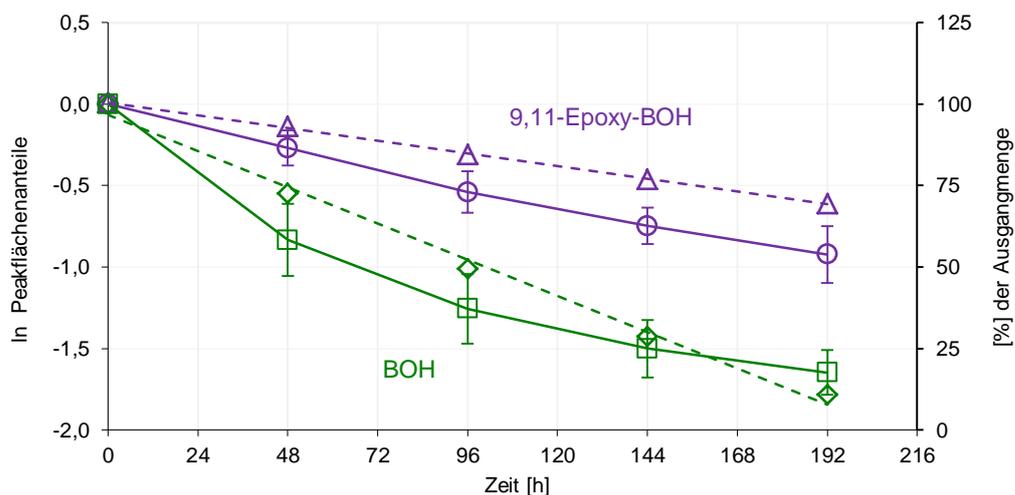
Analog zu den Freisetzungsversuchen (*siehe Abschnitt 2*) wurde BOH in Humanplasma bei 37 °C im Brutschrank über eine Dauer von bis zu acht Tagen unter Schütteln inkubiert, wobei zu Beginn und alle weiteren 48 Stunden Proben entnommen und mittels HPLC auf BOH und 9,11-Epoxy-BOH hin untersucht wurden. Die lange Versuchsdauer wurde gewählt, da es sich auch bei den Freisetzungsversuchen um Langzeitversuche handelte und sich die Geschwindigkeit der Abbaureaktion bei einer langen Versuchsdauer genauer erfassen ließ. Zusätzlich wurde in einem gleich garteten separaten Versuch der Zeitraum innerhalb der ersten acht Stunden näher betrachtet, um Daten bezüglich der Kurzzeitstabilität zu erhalten. Eine Stabilitätsuntersuchung von 9,11-Epoxy-BOH wurde ebenfalls über acht Tage hinweg durchgeführt.

Um Rückschlüsse ziehen zu können, inwieweit eine enzymatische Restaktivität im Humanplasma zum Abbau zu 9,11-Epoxy-BOH führte oder ob weitere Plasmabestandteile die Abbaureaktion maßgeblich beeinflussten, wurden zusätzlich Stabilitätsuntersuchungen in verschiedenen artifiziellen Puffersystemen unternommen. Durch die Zusammensetzung der Puffer wurde sich in einigen wesentlichen Bestandteilen schrittweise dem humanen Blutplasma angenähert [85]. Außerdem wurden leichte Änderungen des pH-Werts berücksichtigt, da die kommerziell erhältlichen Puffer teilweise leicht unterschiedliche Werte von 7,2 bis 7,6 aufwiesen. Somit wurden die Versuche in physiologischem Phosphatpuffer (PBS), in *Hank's Buffered Saline Solution* (HBSS) – hauptsächlich ein Carbonat-Puffer, der zusätzlich Glucose, Magnesiumsulfat und Calciumsulfat enthielt – und in BSA-haltigem (6 %) HBSS unternommen. Daneben wurde ein reiner Carbonat-Puffer eingesetzt, welchem, dem PBS gleich, NaCl und KCl zugesetzt war. Die Durchführung erfolgte analog zu den Ansätzen in Humanplasma bei 37 °C, jedoch über 24 Stunden, wobei Proben zu Beginn sowie bereits nach zwei, vier, sechs und 24 Stunden entnommen wurden (*für nähere Informationen zur Versuchsdurchführung siehe Abschnitt 7.2 im Experimentellen Teil C*).

7.2.2 Ergebnisse und Diskussion der Stabilitätsuntersuchungen

Im acht Stunden dauernden Versuch wurde eine Rate von $-0,0129 \text{ h}^{-1}$ für den Abbau von BOH ermittelt. Es ist hierbei allerdings einschränkend zu erwähnen, dass der Versuch nur ein einziges Mal unternommen wurde. Der Ansatz lieferte nur sehr ungenaue Werte und ist dementsprechend eher als Vorversuch für die acht Tage lange Untersuchung zu betrachten. Ob des ergiebigen Abbaus bei langer Versuchszeit, konnte die Degradationsgeschwindigkeit während der achttägigen Untersuchung in Humanplasma mit höherer Genauigkeit durchgeführt werden und zeigte eine Abnahme von BOH auf unter 10 % der Ausgangsmenge am Versuchsende (*siehe Abb. 54*). Auf Basis einer Kinetik erster Ordnung für die Abbaureaktion, was *in-vivo* für viele Arzneistoffe als

Eliminationskinetik zutrifft [194], konnte eine Geschwindigkeitskonstante von $-0,0093 \text{ h}^{-1}$ berechnet werden und entsprach einer Halbwertszeit von etwa 75 Stunden. Beide Ergebnisse aus Kurz- und Langzeituntersuchung lagen somit in einer vergleichbaren Größenordnung und bestätigten die Reproduzierbarkeit der gefundenen Geschwindigkeit. Der Korrelationskoeffizient von $>0,99$ bestätigte zudem das gewählte Kinetik-Modell. Neben 9,11-Epoxy-BOH konnte anhand der Auswertung der HPLC-Chromatogramme kein weiteres Produkt der Degradationsreaktion gefunden werden.



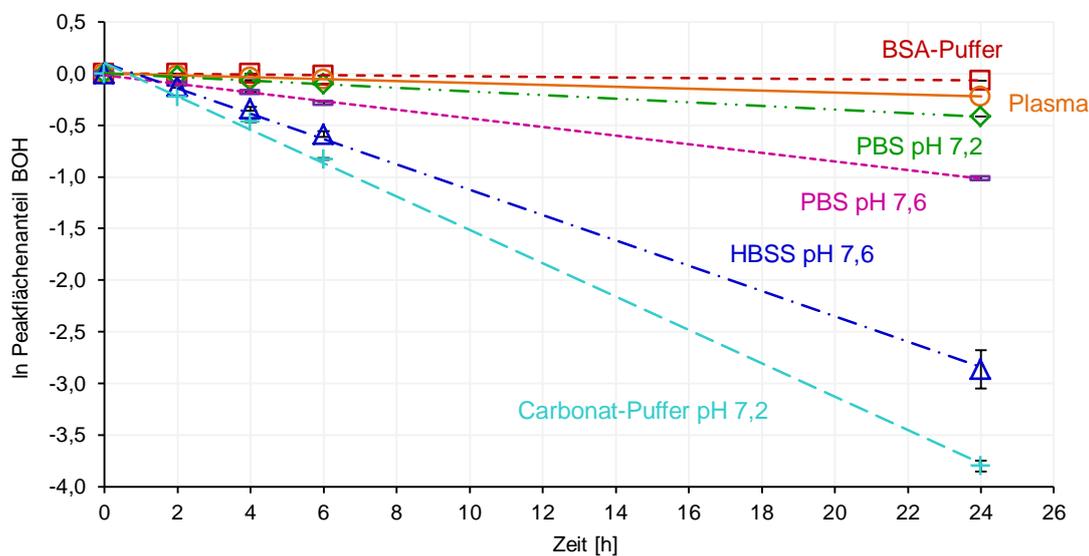
Substanz	Geradengleichung	R ²
BOH	$Y = -0,0093 \cdot X - 0,0654$	0,9932
9,11-Epoxy-BOH	$Y = -0,0033 \cdot X + 0,0087$	0,9995

Abb. 54: Abbau von BOH und 9,11-Epoxy-BOH während der Inkubation in Humanplasma bei 37 °C über acht Tage. Die Abnahme der Substanzmengen, ausgedrückt als prozentuale Anteile der zur jeweiligen Substanz zugehörigen Peakfläche im Chromatogramm (rechte y-Achse), zeigte einen exponentiellen Verlauf. Durch logarithmische Auftragung der Peakflächenanteile des BOH beziehungsweise des 9,11-Epoxy-BOH über die Zeit wurden die Abbauraten nach einer Reaktion erster Ordnung bestimmt ($R^2 > 0,99$) (linke y-Achse). Abweichungen CI 95 %, $n = 3$.

Es war jedoch nicht möglich einen entsprechend mengenmäßigen Umsatz von BOH zu 9,11-Epoxy-BOH in Humanplasma innerhalb der Versuchszeit zu erkennen. Denn auch das Epoxid selbst erwies sich als instabil, ganz so wie es die Freisetzungsversuche, während derer bereits ein Niedergang der Plasmakonzentration auffiel, vermuten ließen (siehe Abschnitt 2.4). Nach acht Tagen Inkubation in Humanplasma zeigte sich eine Abnahme auf ~50 % der Ausgangsmenge des Epoxids, resultierend in einer Abbaugeschwindigkeit von $-0,0033 \text{ h}^{-1}$ (siehe Abb. 54). Da die Entstehung eines weiteren Abbauprodukts nicht zu beobachten war, blieb die als am wahrscheinlichsten einzuschätzende Erklärung darin zu suchen, dass das vermeintlich reaktive Epoxid unspezifisch Addukte mit nukleophilen Partnern, wie beispielsweise Plasmaproteinen, im Medium bildete. Damit entzog es sich wohl der Erfassung durch die angewendete HPLC-Methode – eine Einschätzung, die sich mit der Vermutung von Valotis et al. [98] für

das Epoxid des Mometasonfuroat deckt. Eine Suche nach entsprechenden Addukten mittels LC/MS wäre anzustreben, um diese Vermutung zu überprüfen.

Die Neigung des BOH zur Epoxid-Bildung zeigte sich auch in den eingesetzten Puffer-Systemen, wie es bereits Foe et al. [91] bei ihren Stabilitätstests und Valotis et al. [98] für Mometasonfuroat in Phosphatpuffer beobachteten. Das Ausmaß des Abbaus war in den Puffern allerdings zum Teil sehr verschieden. War in PBS bei pH 7,2 (ursprünglicher pH des kommerziell erhältlichen Puffers) noch eine Abbaugeschwindigkeit von $-0,0174 \text{ h}^{-1}$ zu beobachten, die etwas über der in Humanplasma lag, so erreichte diese in HBSS bei pH 7,6 (ebenfalls voreingestellter pH-Wert) mit einem Wert von $-0,1225 \text{ h}^{-1}$ gar eine andere Größenordnung und führte innerhalb von 24 Stunden zu einem ~ 95 %igen Abbau von BOH (siehe Abb. 55).



Puffer	Geradengleichung	R ²
BSA 6 % in HBSS pH 7,2	$Y = -0,0029 \cdot X + 0,0043$	0,9713
Humanplasma pH 7,9	$Y = -0,0093 \cdot X - 0,0654$	0,9932
PBS pH 7,2	$Y = -0,0174 \cdot X + 0,0024$	0,9998
PBS pH 7,6	$Y = -0,0418 \cdot X - 0,0159$	0,999
HBSS pH 7,6	$Y = -0,1225 \cdot X + 0,0979$	0,9972
Carbonat-Puffer pH 7,2	$Y = -0,1615 \cdot X + 0,0998$	0,9981

Abb. 55: Abbaugeschwindigkeiten von BOH in den getesteten Puffer-Systemen bei Inkubation bei 37 °C über 24 Stunden. Die Abbauraten nach einer Reaktion erster Ordnung wurden durch logarithmische Auftragung der chromatographischen Peakflächenanteile des BOH über die Zeit bestimmt ($R^2 > 0,99$, außer für BSA-Puffer). Die Werte für Humanplasma wurden anhand der Ergebnisse der acht Tage langen Versuche mit Humanplasma (siehe Abb. 54) intrapoliert und zum Vergleich aufgetragen. Carbonat-Puffer und HBSS zeigten die schnellste Abbaureaktion unter den untersuchten Puffer-Systemen. Plasmaproteine wie Albumin hingegen schienen einen stabilisierenden Effekt zu haben, wie der langsame Abbau des BOH im BSA-haltigen HBSS-Puffer nahe legte. Abweichungen CI 95 %, n = 3.

Der leicht unterschiedliche pH-Wert in beiden Puffern schien dabei nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, wie die Versuche mit auf pH 7,6 eingestelltem PBS zeigten. Zwar war mit einer Konstanten von $-0,0418 \text{ h}^{-1}$ erwartungsgemäß eine erhöhte Abbaugeschwindigkeit gegenüber PBS mit pH 7,2 zu erkennen, diese reichte jedoch bei weitem nicht an die Verhältnisse in HBSS heran.

Dies bestätigte zum einen, dass bereits geringe Änderungen des pH-Werts die Stabilität von BOH merklich beeinflussen, zeigte aber in erster Linie, dass dies nicht der alleinige Ausschlag gebende Faktor für die Instabilität in nur leicht alkalischer Lösung war. Im Gegensatz zum reinen Phosphatpuffer PBS, dem zur Einstellung physiologischer Osmolarität nur noch NaCl und KCl zugesetzt war, bestand HBSS im Wesentlichen aus NaHCO_3 als Pufferkomponente und war in seiner Zusammensetzung zusätzlich um MgSO_4 , CaCl_2 und Glucose erweitert (*für eine detaillierte Auflistung der Pufferzusammensetzungen siehe Tab. 9 in Abschnitt 7.5.1 im Experimentellen Teil C*). Deshalb wurde der Stabilitätstest erneut mit einem auf pH 7,2 eingestellten Carbonat-Puffer wiederholt, dem lediglich noch NaCl und KCl zugesetzt wurden, die in allen bisher untersuchten Medien vorhanden waren. Der Puffer stellte somit gewissermaßen ein Pendant zu PBS auf Carbonat- anstatt Phosphat-Basis dar. Beobachtet wurde eine Abbaurate von $-0,1615 \text{ h}^{-1}$ und damit etwas höher als in HBSS, aber in vergleichbarer Größenordnung. Durch den Ausschluss aller weiteren Bestandteile und die Wahl des pH-Werts stellte sich damit schließlich der Anteil gelösten CO_2 beziehungsweise Hydrogencarbonats als hauptverantwortlich für die Instabilität heraus. So wurde BOH bereits innerhalb von 24 Stunden nahezu quantitativ zu seinem Epoxid umgesetzt (*siehe Abb. 56*). Wie schon zuvor in Humanplasma, konnte auch hier kein Auftreten von weiteren, BOH entstammenden, Nebenprodukten erkannt werden. Dies wurde letztlich durch das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des Ansatzes in HBSS zur Herstellung einer Referenzsubstanz nochmals bestätigt (*siehe Abschnitt 7.3.1*).

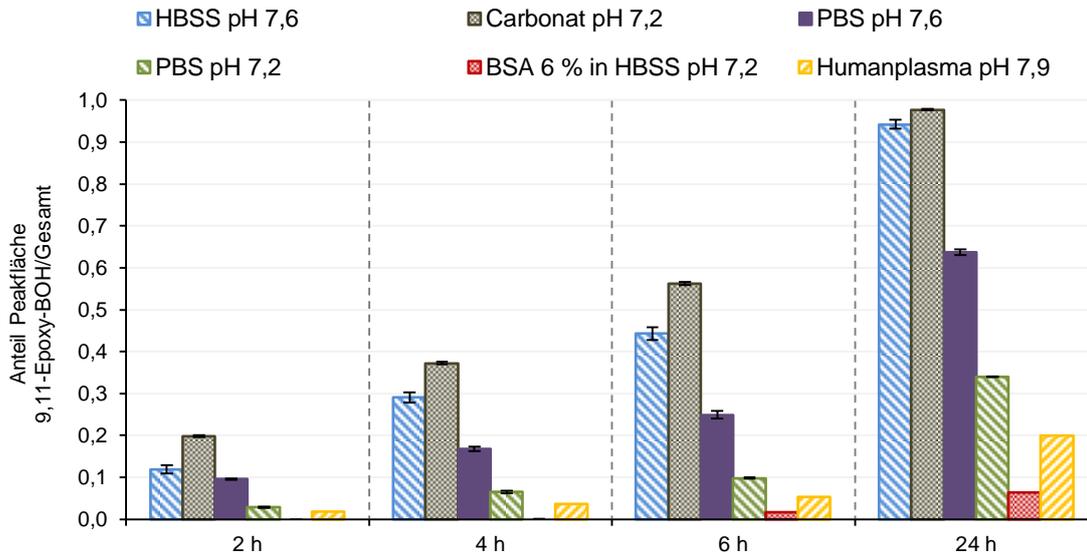


Abb. 56: Entstehung von 9,11-Epoxy-BOH durch Degradation von BOH in verschiedenen Puffer-Systemen und Humanplasma über 24 Stunden. Die Werte für Humanplasma wurden anhand der Abbaurrate von $-0,0093 \text{ h}^{-1}$ aus den acht Tage dauernden Stabilitätsversuchen berechnet.

Um sich bei der Zusammensetzung der Puffer-Systeme dem Humanplasma weiter zu nähern, welches schließlich ebenfalls in erster Linie durch CO_2 gepuffert ist, wurde der HBSS-Puffer mit BSA um einen Protein-Anteil zu 60 g/L erweitert. Dies verlangsamte die Abbaureaktion auf eine Rate von $-0,0029 \text{ h}^{-1}$ und lag damit wieder in einer zu Humanplasma vergleichbaren Größenordnung, sogar noch etwas darunter. Die etwas höhere Abbaurrate von $-0,0093 \text{ h}^{-1}$ in Humanplasma konnte möglicherweise mit der Basizität des Mediums zusammenhängen. So ergaben die Messung des pH-Werts im verwendeten Humanplasma anstatt des zu erwartenden pH 7,4 einen Wert von 7,9, der über die gesamte Versuchsdauer konstant blieb. Ein ähnliches Ansprechen auf entsprechend geringfügige pH-Änderungen zeigte bereits der Versuch mit PBS bei pH 7,2 und 7,6. Eine weitere Erklärung für den Geschwindigkeitsunterschied war sicherlich, dass alleine der Zusatz an BSA zu einem artifiziellen Puffer keine vollkommene Simulation der Zusammensetzung des komplexen Stoffgemisches Humanplasma sein konnte. Dennoch darf festgehalten werden, dass der Proteinzusatz die Verhältnisse im Medium deutlich im Sinne des Plasmas verschob. Dementsprechend fiel die Entstehung des Epoxids im BSA-haltigen Puffer nach 24 Stunden mit einem Peakflächenanteil im Chromatogramm $<0,1$ sehr gering aus (siehe Abb. 56).

Der stabilisierende Einfluss von BSA auf BOH dürfte aller Wahrscheinlichkeit nach auf dessen Plasmaproteinbindung zurückzuführen sein. Albumin bindet eine Vielzahl kleiner Moleküle, wie Arzneistoffe oder körpereigene Botenstoffe, für den Transport im Blut, hauptsächlich an den drei Subdomänen IIA, IIIA und IB des aus drei Domänen bestehenden und $\sim 66000 \text{ Da}$ großen Proteins [195, 196]. Für Steroide wird eine Bindung an der Subdomäne IB diskutiert. Zur Höhe der Plasmaproteinbindung des BOH konnten

keine genauen Angaben gefunden werden, sie dürfte sich allerdings in einer ähnlichen Größenordnung wie DX bewegen, da beide Moleküle sich strukturell nur in Bezug auf die Chlorierung an Position C-9 und die Stellung der C-22 Methylgruppe unterscheiden und ähnliche Lipophilie zeigen. Die ausgeprägte Plasmaproteinbindung verringerte den im Humanplasma beziehungsweise BSA-Puffer frei vorliegenden Anteil an BOH damit aller Wahrscheinlichkeit nach, sodass es einem nukleophilen Einfluss oder anderer katalytischer Prozesse entzogen wurde, die möglicherweise eine Epoxid-Bildung fördern.

Anhand der eigenen Untersuchungen konnte letztlich eine ausgeprägte Beteiligung enzymatischer Restaktivität im verwendeten Humanplasma weitestgehend ausgeschlossen werden, da allen voran die im Puffer und Plasma anwesenden Carbonat- beziehungsweise Bicarbonat-Ionen eine Epoxid-Bildung zu fördern schienen. Der leicht alkalische pH-Wert des Plasmas spielte demgegenüber wohl nur eine untergeordnete Rolle, wohingegen der hohe Proteinanteil sogar ein stark protektiver Faktor war.

Literaturbekannte Hinweise auf ähnliche Beobachtungen zu Einflüssen von Puffersalzen auf die Stabilität gelöster Stoffe geben Ahmad et al. [197], die einen katalytischen Effekt eines Carbonat-Puffers auf den photolytischen Abbau von Riboflavin in wässriger Lösung beschreiben. Inwieweit der Instabilität von BOH ein ähnlicher Reaktionsmechanismus unterlag, war allerdings mehr als fraglich, da der Abbau von Riboflavin über eine intermediäre Photoreduktion ablaufen soll. Glucocorticoide sind jedoch weder für ihre Photolabilität bekannt, noch fanden die eigenen Versuche unter Lichtexposition statt, sondern im dunklen Inkubator. Als Erklärung der Destabilisierung von BOH und Förderung der Epoxid-Bildung könnte vorgeschlagen werden, dass durch den nukleophilen Charakter der Hydrogencarbonat-Ionen oder des gelösten CO_2 das Proton der Hydroxylgruppe an C-11 des BOH stärker beeinflusst wird, als durch andere Pufferkomponenten und somit die intramolekulare Substitutionsreaktion, die zur Elimination des Chlorid-Substituenten an Position C-9 führt, begünstigt wird. Diese Erklärung mag durch die Untersuchungen von Hansen et al. [198] zur Degradation von Methotrexat in verschiedenen Puffern unterstützt werden. Interessanterweise nahm hier bei konstanten pH-Werten die Abbaugeschwindigkeit von Methotrexat proportional zur Ionenstärke der Puffer zu. Diese Beobachtung machten die Autoren auch in Carbonat-Puffer, wobei anders als in ihren sonstigen untersuchten Puffersystemen die Reaktionsgeschwindigkeit ab einer bestimmten Carbonat-Konzentration zu stagnieren schien. Die Daten aus den Untersuchungen zu Methotrexat ließen zwar nicht direkt auf die Reaktion mit BOH schließen und ließen auch keinen direkten Vergleich zwischen verschiedenen Puffersalzen zu, dennoch weisen diese Beobachtungen ebenfalls auf einen pH-unabhängigen stabilitätsbeeinflussenden Effekt hin, der bei verschiedenen Salzen unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Über den genauen Mechanismus und des Einflusses der dissoziierten Kohlensäure konnte derweil lediglich spekuliert werden. Bei pH 7,2, wie in den eigenen Versuchen im reinen Carbonat-Puffer, liegt das Verhältnis der Konzentrationen für das Säure-Base-Paar $(\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2)/\text{HCO}_3^-$ mit $3,45 \mu\text{M}$ zu $0,72 \mu\text{M}$ (*Berechnung nach*

Henderson-Hasselbalch mit pK_s (H_2CO_3) 6,52 klar auf der Seite des CO_2 und ist bei höherem pH (vgl. pH 7,6 im HBSS-Puffer) mit 3,85 μM zu 0,32 μM noch etwas weiter in diese Richtung verschoben. Die Abbaugeschwindigkeit lag im Carbonat-Puffer, also bei niedrigerem pH, jedoch über der in HBSS, was somit eher auf Hydrogencarbonat als einflussgebendes Molekül hinwies. Ob der deutlich höheren Konzentration an CO_2 in den Puffern konnte ein Einfluss dessen jedoch nicht ausgeschlossen werden. Auch der stagnierende Geschwindigkeitsanstieg, den Hansen et al. [198] ab einer Grenzkonzentration des Carbonat-Puffers von $\sim 0,1 \mu M$ bei 85 °C erkannten, könnte möglicherweise mit einer CO_2 -Sättigung der Lösung zusammenhängen. Eine genaue Berechnung der CO_2 -Löslichkeit unter den experimentellen Bedingungen schien zwar anhand der Angaben nicht ohne weiteres möglich [199], gemäß der geschilderten Überlegung wäre dies allerdings ein Hinweis auf CO_2 . Das Carbonat-Ion (CO_3^{2-}) selbst hingegen sollte bei diesem pH-Wert praktisch keine Rolle spielen. Untersuchungen in verschiedenen Puffern, beispielsweise mit entsprechenden Variationen der Ionenstärke bei verschiedenen pH-Werten können möglicherweise helfen den Einfluss des Carbonats auf die Stabilität von BOH weiter zu charakterisieren, der nach aktuellem Kenntnisstand hier erstmals beobachtet wurde. Für die Formulierung wässriger Zubereitungen für die intranasale Anwendung von BDP könnte dies womöglich hilfreich sein, ebenso wie für die Stabilität weiterer wässriger Arzneistoffformulierungen.

7.3 Herstellung von Referenzsubstanzen für die Analytik

Eine direkte Isolierung der identifizierten Abbauprodukte aus dem überschüssigen Plasma der Freisetzungsversuche hätte nicht ausgereicht, um daraus analytische Standards für 17-Oxo-DX und 9,11-Epoxy-BOH zu gewinnen. Daher wurde versucht die beiden Abbauprodukte auf anderem Weg aus deren Muttersubstanzen herzustellen.

7.3.1 9,11-Epoxy-Beclo methason

Zur Herstellung des 9,11-Epoxy-BOH wurde sich zunächst an der klassischen Vorgehensweise unter alkalischen Bedingungen orientiert, wie Oliveto et al. [189] sie im Rahmen ihrer Entwicklungen eines Herstellungsverfahrens von C-16- α - und C-16- β -Corticosteroiden für die Firma Schering bereits 1959 beschrieben. Da das Ziel der eigenen Anstrengungen lediglich die Herstellung einer ausreichenden Menge des Epoxids war, um dieses als Referenzsubstanz zur Quantifizierung der unternommenen Freisetzungsversuche einzusetzen, wurde aus praktischen Gründen retrosynthetisch vom Arzneistoff BDP ausgegangen. Dabei wurde die Reversibilität der Chlorierung an Position C-9 ausgenutzt, die unter alkalischen Bedingungen wieder das gewünschte Epoxid

ergeben sollte, wie es auch beim Einsatz einer bromierten Vorstufe auf normalem Syntheseweg erhalten wird. Auf diese Weise war das 9,11-Epoxid bereits durch einen einzigen Abbauschritt zugänglich und ein wesentlich aufwendigeres Verfahren über mehrere Vorstufen konnte vermieden werden. Anleihen für die nähere Methodik wurden zudem bei Fu et al. [188] genommen, die Ansätze zur Prozessoptimierung des Verfahrens zeigten. Demnach wird das halogenierte Steroid in Dichlormethan und Methanol gelöst und durch langsame Zugabe von Natriumhydroxid unter ständiger Kühlung und unter Stickstoffatmosphäre in drei Stunden zu 97 % Epoxid schonend umgesetzt und dabei die Bildung weiterer Nebenprodukte vermieden. Im eigenen Ansatz wurde BDP als Edukt mit 16 Äquivalenten Natriumhydroxid fünf Stunden bei 0 bis 4 °C und unter Vernachlässigung der Stickstoffatmosphäre umgesetzt. Nach Aufreinigung des Ansatzes durch Neutralisation mit HCl, Ausschütteln und präparativer HPLC konnte bei einer Reinheit von >95 % allerdings nur eine Ausbeute von etwa 34 % erreicht werden. Anschließende Versuche die Ausbeute durch Verwendung stärkerer Basen wie Triethylamin oder Natriummethylat zu erhöhen, erbrachten nicht den erhofften Erfolg. Alle derartigen Ansätze wurden schließlich verworfen, da sich letztlich durch die bereits oben (*siehe Abschnitt 7.2*) beschriebenen Stabilitätsuntersuchungen eine vorteilhafte Lösung für das Problem ergab. So wurde sich die gezeigte Instabilität des BOH in HBSS-Puffer zu Nutze gemacht, um das Abbauprodukt 9,11-Epoxy-BOH in praktisch quantitativem Ausmaß und ausreichender Reinheit herzustellen.

Die Aufnahmen des Massenspektrums und des ¹H-NMR-Spektrums des Produktes dieser Abbaureaktion (*siehe Abb. 57*) belegten zum einen noch einmal die Beobachtung aus den Stabilitätsuntersuchungen und sicherten zum anderen die Qualität der gewünschten Substanz. Sowohl das Masseladungsverhältnis von 373 m/z [M+H⁺], als auch die Hochfeldverschiebung im ¹H-NMR-Spektrum, die auch die im Humanplasma entstandene Substanz zeigte (*siehe auch Abb. 51*), konnten bei dem Produkt in HBSS beobachtet werden und belegten damit die Übereinstimmung beider Moleküle als 9,11-Epoxy-BOH.

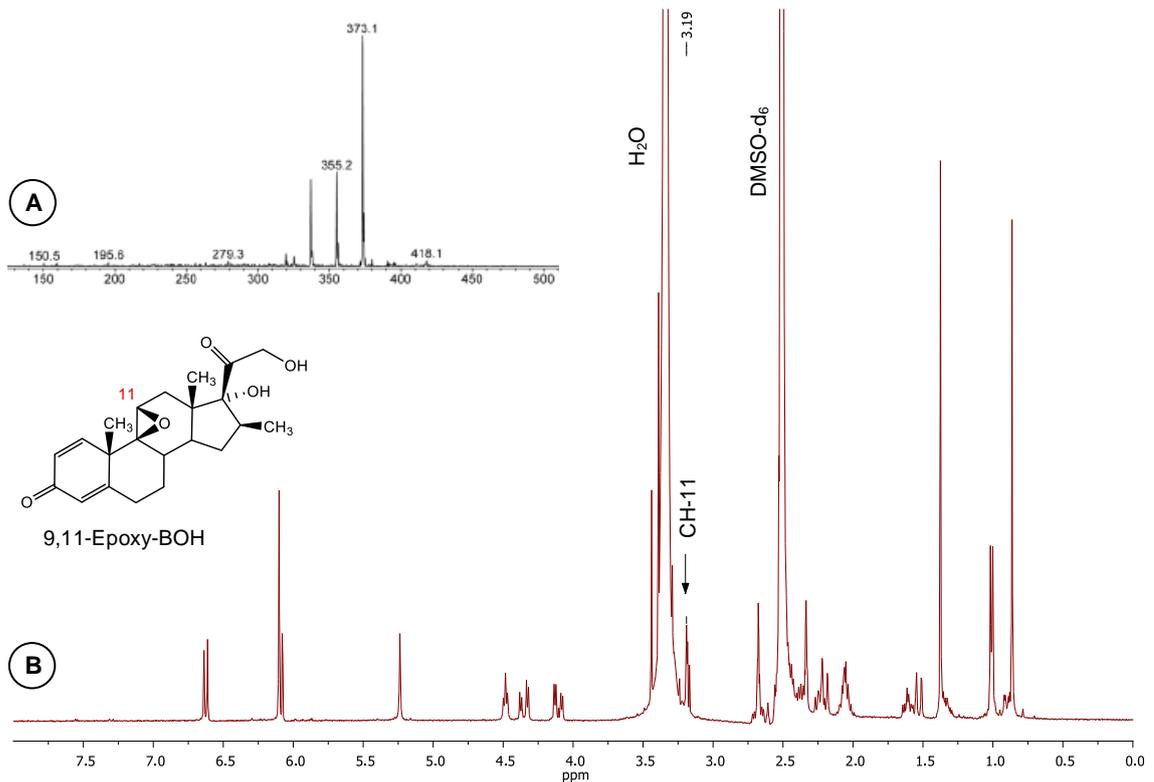


Abb. 57: Massenspektrum (A) und ¹H-NMR-Spektrum (B) des 9,11-Epoxy-BOH nach Degradation von BOH in HBSS-Puffer. Die Verschiebungen der Signale im NMR glichen denen, die auch nach der Abbaureaktion in Humanplasma beobachtet wurden und dafür auch von Foe et al. [91] bereits aufgezeigt wurden. Charakteristisch ist vor allem die Verschiebung des Protons an Position C-11. Das Massenspektrum zeigte, genau wie die in Humanplasma entstandene Substanz, eine Masseladungszahl von 373 m/z [M+H⁺]. Beide Spektren bestätigten, dass das entstandene Produkt die gleiche Qualität aufwies, wie das aus Humanplasma und somit 9,11-Epoxy-BOH war.

7.3.2 17-Oxo-Dexamethason

Zunächst wurde der Ansatz eines basischen Seitenkettenabbaus ausgehend von Dexamethason als Edukt, wie von Simons et al. [192] für weitere Corticosteroide beschrieben, verfolgt. Die Abspaltung der Dihydroxyaceton-Seitenkette am Kohlenstoffatom C-20 soll dabei über eine Retro-Aldolkondensation unter basischer Katalyse erfolgen (*siehe Abb. 58*). Le Pera et al. [193] schlagen für diese Reaktion praktisch denselben Mechanismus vor. Die Schlüsselrollen spielen hierbei die Deprotonierung der Seitenkette zum Enolat und die darauffolgende Deprotonierung der 17-Hydroxyl-Gruppe. Die Tautomerie der Seitenkette begünstigt anschließend eine Abspaltung der gesamten Seitenkette, indem die vormalige 17-Hydroxyl-Gruppe zum Keton oxidiert. Übrig bleibt, neben dem 17-Oxo-Steroid und der katalysierenden Base, die reduzierte Seitenkette als Ethen-1,2-diol.

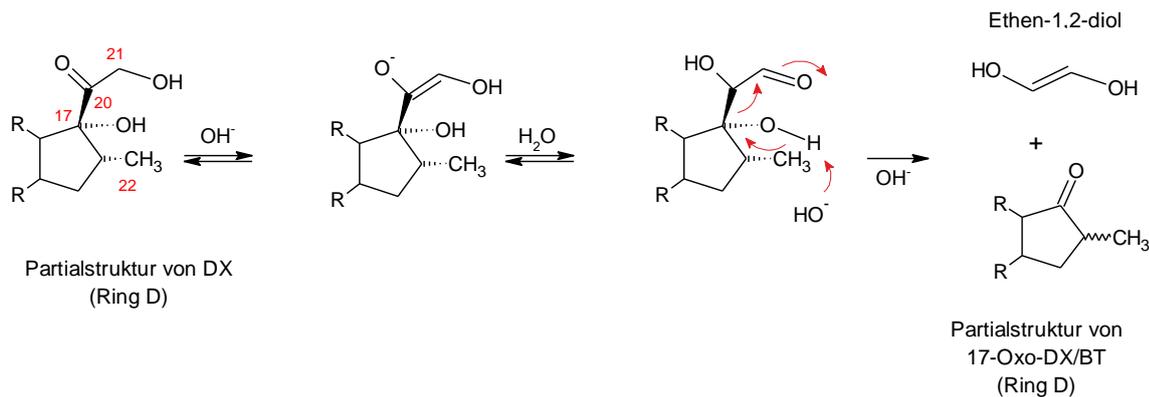


Abb. 58: Mechanismus der Seitenkettenabspaltung unter basischen Bedingungen, wie von Simons et al. beziehungsweise Le Pera et al. postuliert [192, 193]. Nach Bildung des Enolats an der Keto-Gruppe an C-20 von DX begünstigt die Tautomerie der Seitenkette von der Keto- zur Aldehyd-Form unter basischen Bedingungen die Bildung des C-17-Ketons in einer Retro-Aldolkondensation. Die C-20-Seitenkette wird dabei als Ethen-1,2-diol abgespalten.

Die Verwendung von 0,25 M KOH in Methanol lieferte nach 24 Stunden Reaktionszeit bei Raumtemperatur eine Ausbeute von 20-25 % 17-Oxo-DX. Die Verwendung von 1 N NaOH hingegen wurde aufgrund sehr geringer Ausbeute ebenso verworfen, wie der Einsatz von Natriummethylat in 1,4-Dioxan nach Le Pera et al. [193] sowohl bei Raumtemperatur als auch unter Reflux. Auch ein Austausch des Lösungsmittels gegen Dichlormethan zeigte keine Verbesserung.

Eine Abspaltung von Ethen-1,2-diol aus der vormaligen Dihydroxyaceton-Seitenkette in dieser Reaktion konnte nach Aufreinigung über eine Kieselgelsäule im Massenspektrometer mit einem Masse-Ladungs-Verhältnis von 333 m/z (332 g/mol) bestätigt werden. Auch die Aufnahme des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums belegte das Fehlen der entsprechenden dd-Signale der Protonen an C-21 bei 4,1 bis 4,5 ppm, wie es auch Pinto et al. [200] beschrieben. Jedoch konnten im Spektrum auch Abweichungen zu DX im Peakmuster im Hochfeld entdeckt werden (siehe Abb. 59).

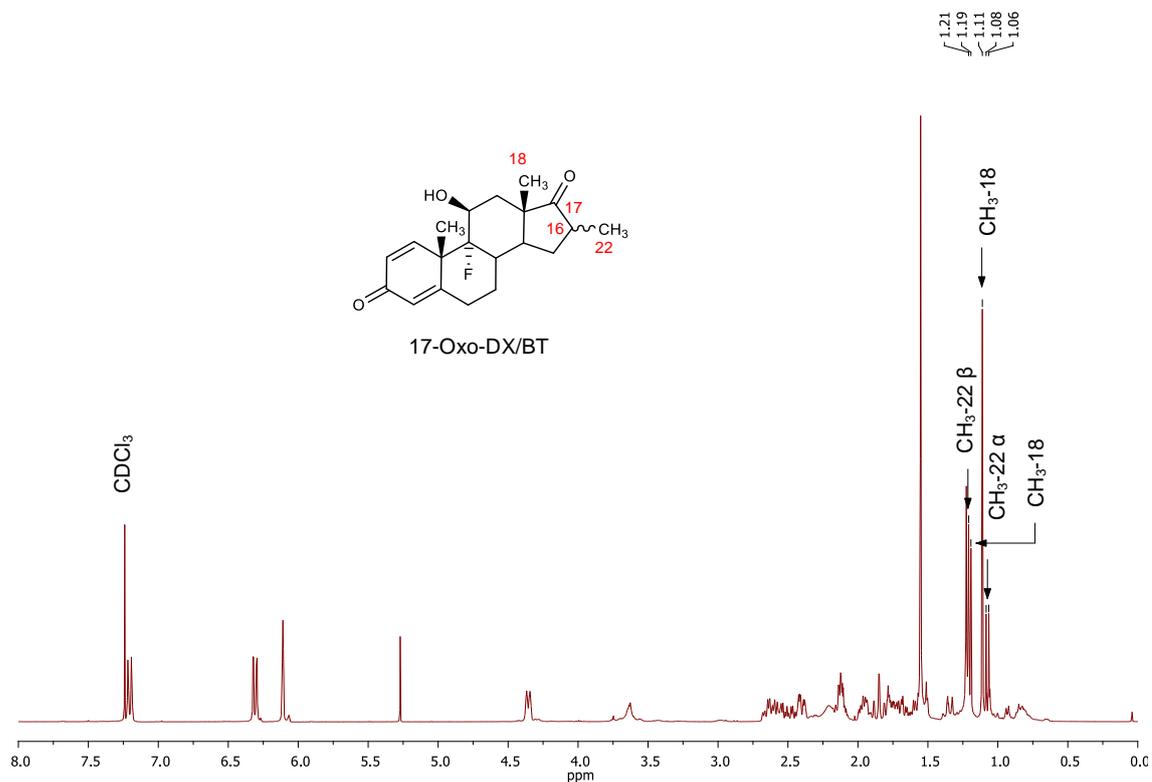


Abb. 59: ^1H -NMR-Spektrum des Produktes der alkalischen Abbaureaktion (0,25 M KOH in Methanol, RT, 24 h). Die Signale des C-21 der Dihydroxyaceton-Seitenkette (im DX 4,1 bis 4,5 ppm) sind nicht vorhanden und belegen den Erfolg der Abbaureaktion. Die Signale im Hochfeld wiesen auf das Vorliegen einer α - und β -Konfiguration des C-22 hin. Somit entstanden durch den alkalischen Abbau vermutlich sowohl 17-Oxo-DX (C-22 α), als auch sein Diastereomer 17-Oxo-Betamethason (17-Oxo-BT, C-22 β).

Abweichungen zeigten sich auch im ^{13}C -NMR-Spektrum. Zunächst stimmten hier die chemischen Verschiebungen gut mit den Angaben von Pinto et al. für das 17-Oxo-DX überein, was die Entstehung des gewünschten Produktes bestätigte. Des Weiteren ließen sich jedoch auch zusätzliche Peaks finden, die nach Pinto et al. [200] den Verschiebungen für 17-Oxo-Betamethason (17-Oxo-BT) entsprachen, also dem Diastereomer des eigentlich angestrebten Produktes 17-Oxo-DX. Beide unterscheiden sich strukturell lediglich in der Konfiguration der C-22 Methylgruppe an C-16, die im DX α -Stellung und im Betamethason (BT) β -Stellung einnimmt. Dieser Unterschied beider Substanzen trat an einigen Stellen in den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren durch diverse chemische Verschiebungen charakteristisch hervor. Im Protonen-Spektrum vor allem durch die Signale der Methylgruppen in den Molekülpositionen C-18 und C-22 im Hochfeld. Im Kohlenstoff-Spektrum sind die Signale der C-22-Methylgruppen in α - beziehungsweise β -Stellung ebenfalls auffällig, wie auch die des C-16, dem Träger der C-22-Methylgruppe. Für beide Positionen weist das Spektrum des 17-Oxo-BT eine klare Verschiebung ins Tieffeld auf. Im aufgenommenen ^{13}C -Spektrum des Produktes der Degradationsreaktion waren somit für diese Positionen jeweils beide von Pinto et al. [200] aufgeführten Werte von 43,6 ppm (16- β) und 38,9 ppm (16- α)

beziehungsweise 17,3 ppm (22- β) und 16,7 ppm (22- α) zu sehen (*siehe Abb. 60*) und belegen die Entstehung beider diastereomeren Substanzen.

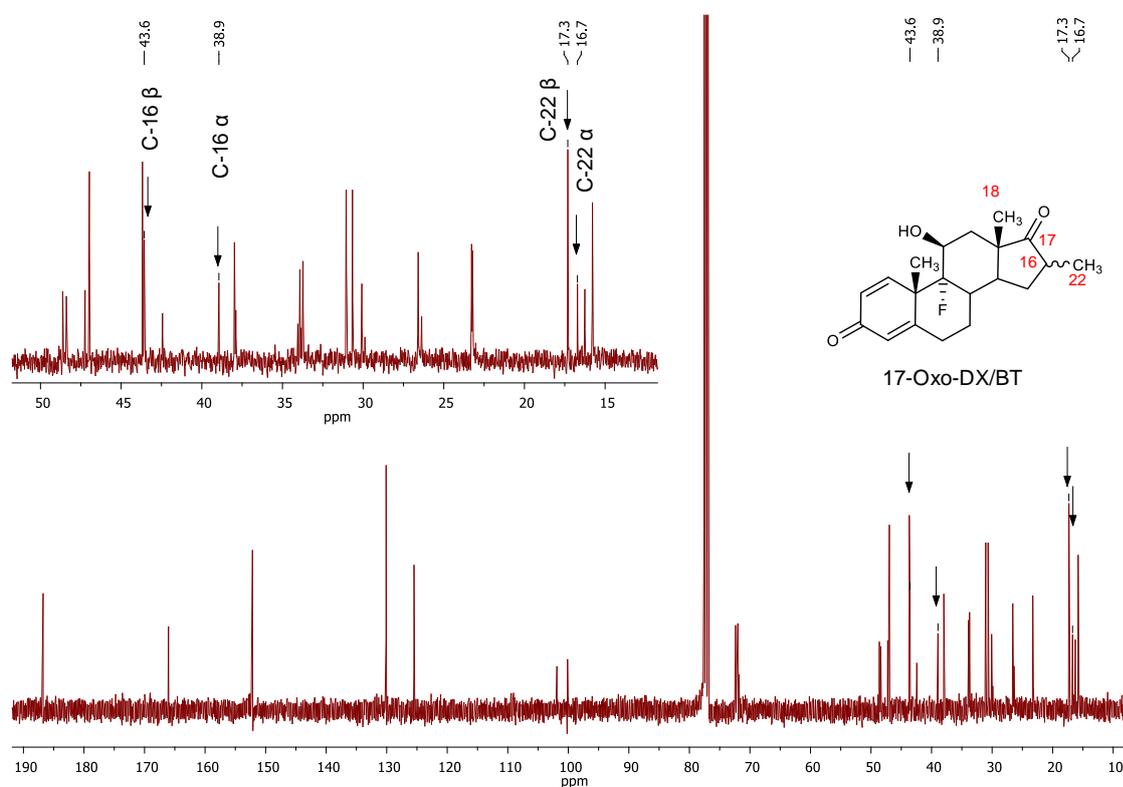


Abb. 60: ^{13}C -NMR-Spektrum (aufgenommen in CDCl_3) des Gemisches der beiden Diastereomere 17-Oxo-DX und 17-Oxo-BT, entstanden aus DX in alkalischer Abbaureaktion (0,25 M KOH in Methanol, RT, 24 h). Die chemischen Verschiebungen der für die unterschiedliche Konstitution der Moleküle entscheidenden Positionen C-16 (α/β) und C-22 (α/β) unterschieden sich im ^{13}C literaturgemäß (vgl. Pinto et al. [200]) deutlich bei den beiden Diastereomeren 17-Oxo-DX und 17-Oxo-BT. Für die weiteren Positionen waren im hohen Feld ebenfalls unterschiedliche Werte nachzuweisen, die Peaks der Atome im niedrigen Feld beider Diastereomere lagen praktisch deckungsgleich.

Die teilweise Umkehr der Stereochemie an C-16 rührt vermutlich von der Keto-Enol-Tautomerie des 17-Oxo-Steroids her (*siehe Abb. 61*). Die Keto-Form ist durch die Ringstruktur zwar relativ stabil und somit die bevorzugte tautomere Form. Unter den basischen Bedingungen der oben geschilderten Abbaureaktion wird jedoch wahrscheinlich durch Bildung des Enolats eine Änderung der Konformation an C-16 begünstigt. Nach Neutralisation des Reaktionsgemisches und Reprotonierung erhielt man demnach beide Isoformen des 17-Oxo-Steroids. Die Herstellung eines diastereomeren reinen Produkts wäre nach dieser Erklärung unter basischen Reaktionsbedingungen nicht möglich. Eine Oxidationsreaktion mit Cer(IV)sulfat in Eisessig, wie es Turnbull et al. [201] schon wesentlich früher beschrieben, wäre aufgrund der sehr sauren Lösung wohl ebenfalls ungeeignet, da auch hierbei die Bildung beider tautomerer Formen mit Folge einer Änderung der Stereochemie begünstigt würde.

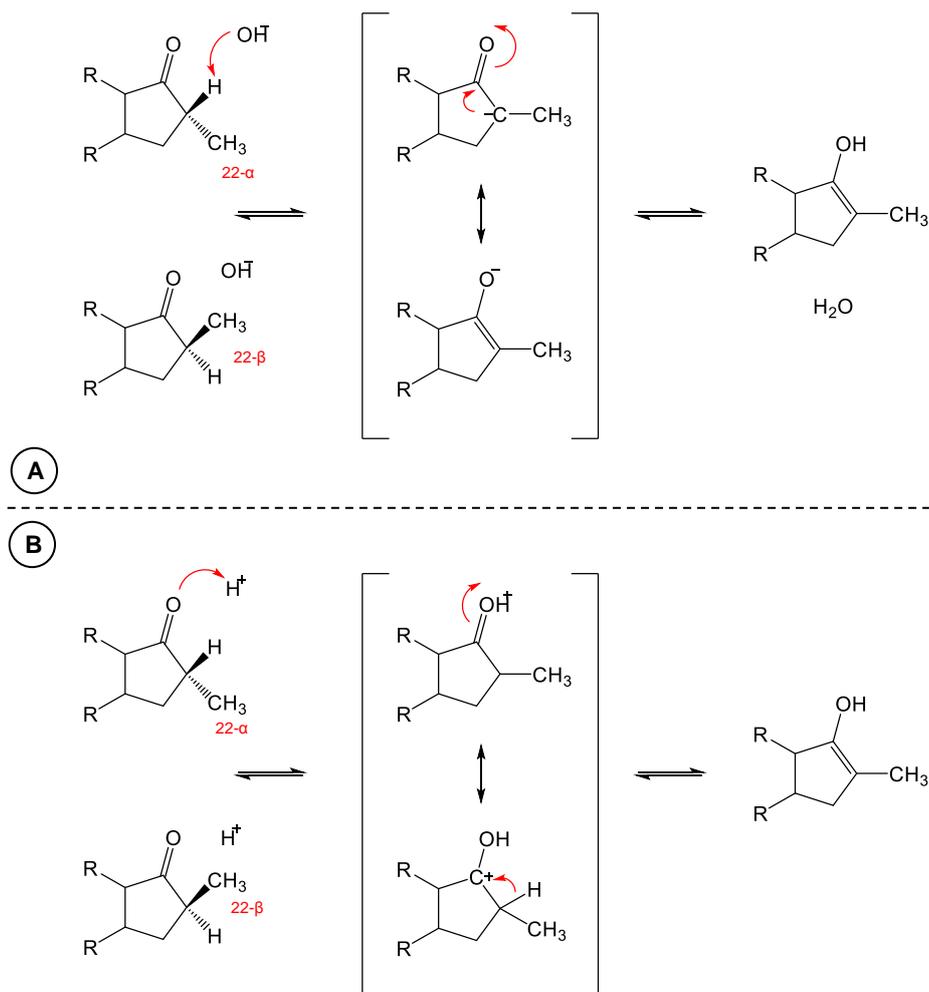


Abb. 61: Gleichgewicht zwischen der 16- α - und 16- β -Isoform von 17-Oxo-Steroiden in alkalischem (A) und saurem (B) Milieu. Eine Konversion der Stereochemie an C-16 wird sowohl in basischer, als auch in saurer Lösung katalysiert.

Ob es sich bei dem eigentlich beobachteten Produkt der Abbaureaktion in humanem Blutplasma um eine isomerenreine Substanz handelte war zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt. Die Vermutung, dass dem nicht so sei, lag jedoch nahe, denn das Freisetzungsmilieu wies einen leicht alkalischen pH-Wert von 7,8 auf (*siehe auch Abschnitt 2.4*). Für die Enolisierung des Cyclopentanonrings genügen üblicherweise schon schwach basische Lösungen, wobei hier das Tautomeren-Gleichgewicht noch sehr deutlich auf Seite der Keto-Form liegen sollte [202]. Die Geschwindigkeit, mit der die Umkehr der stereochemischen Verhältnisse erfolgt, läuft somit – die Enolisierung ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt – nur langsam ab. Letztlich blieb die Frage der Zusammensetzung des Substanzgemisches aus beiden Diastereomeren in Humanplasma ungewiss. Langsame Konversion des stereochemischen Zentrums an C-16 vorausgesetzt, war die Gemengelage erstens stark abhängig von der Reaktionszeit, zweitens waren die Bedingungen im Vielstoffgemisch Humanplasma nicht ausschließlich pH-abhängig. Es fanden sich zwar keine Literaturhinweise auf enzymatische Aktivitäten, die eine

Metabolisierung durch Seitenkettenabspaltung katalysieren, ein solcher Einfluss konnte aber dennoch ebenso wenig ausgeschlossen werden. Auch für Plasmaproteine wie Albumin, die einen wesentlichen Teil diesen wässrigen Mediums ausmachen und zu denen Glucocorticoide ein ausgeprägtes Bindungsverhalten aufweisen, konnte gezeigt werden, dass sie eine Einflussnahme auf die Reaktionskinetik ausüben können (*siehe auch Abschnitt 7.2.2*). Unter diesen Gesichtspunkten erschien eine direkte Isolation des 17-Oxo-Steroids aus humanem Plasma sinnvoll, womit der Qualität des Substanzgemisches am besten beizukommen war. Da die Stoffmengen in den Ansätzen der Freisetzungsversuche keine ausreichende Menge dazu zur Verfügung stellte, wurde dafür ein separater Ansatz gewählt (*für nähere Informationen zum Herstellungsprozess siehe Abschnitt 7.3 im Experimentellen Teil C*). Dieses Vorgehen eröffnete zudem die Möglichkeit zur Substanzeanalyse mittels NMR (*siehe Abb. 62 und Abschnitt 7.1 des Tabellarischen Anhangs in Teil D für weitere Signalzuordnung*).

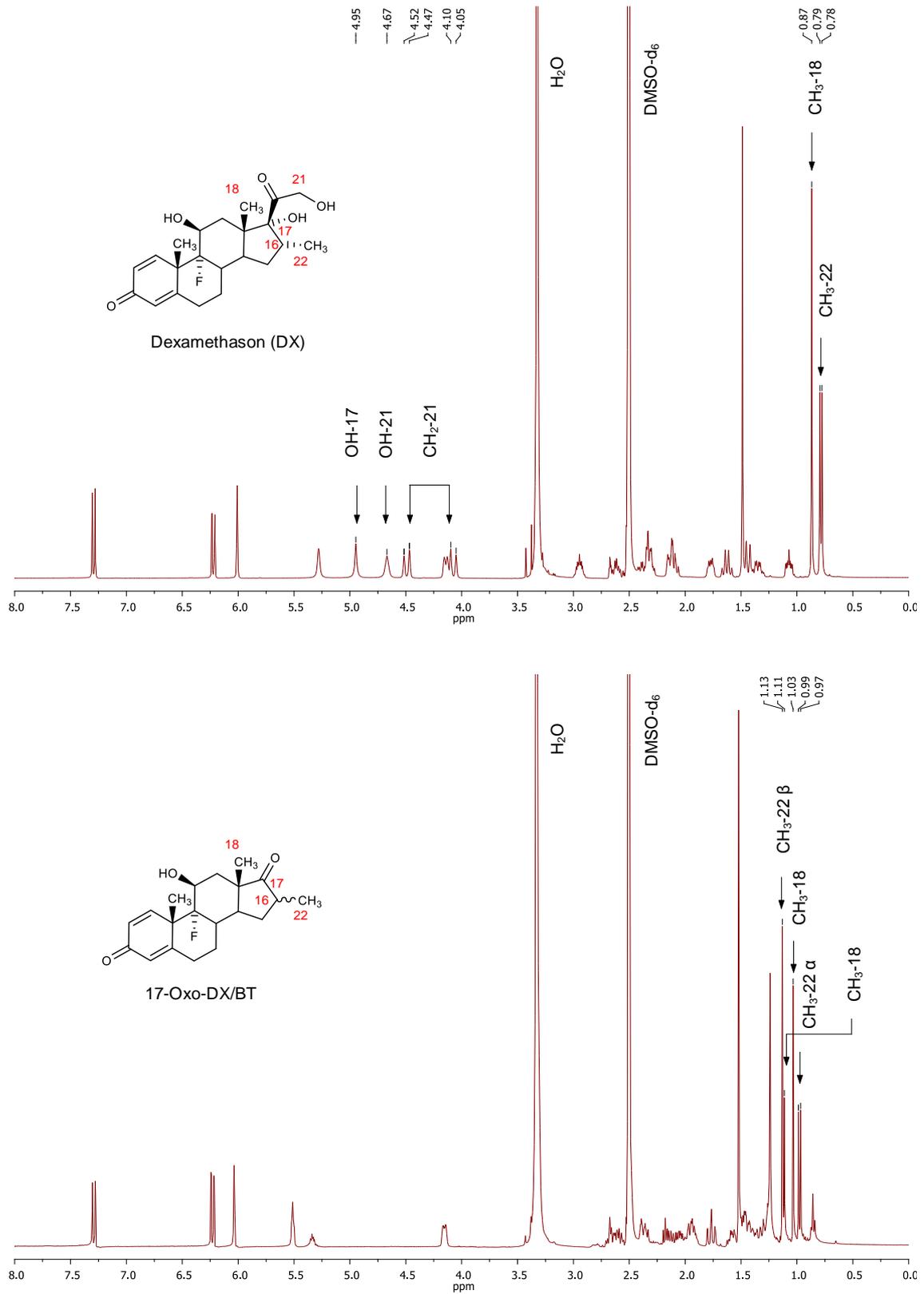


Abb. 62: $^1\text{H-NMR}$ Spektren von DX (oben) und dem Produkt des Abbau-Prozesses in humanem Blutplasma (unten). Die fehlenden Signale der Dihydroxyacetonsseitenkette ($\text{CH}_2\text{-21}$, OH-21 und OH-17) bestätigen die Abspaltung derselben. Die Signale im tiefen Feld weisen auf ein Gemisch aus den Diastereomeren 17-Oxo-DX und 17-Oxo-BT hin, wie es schon bei der Degradationsreaktion in alkalischer Lösung beobachtet werden konnte.

Der Vergleich des Spektrums mit dem des Edukts Dexamethason zeigte, dass die Degradationsreaktion in der Tat zu einem Verlust der Seitenkette führte. Darüber geben die fehlenden dd-Signale der Protonen an Position C-21 des Dexamethasons Aufschluss, wie es auch im Spektrum des Reaktionsproduktes in alkalischer Lösung in *Abb. 59* beobachtet werden konnte. Das NMR-Spektrum ergänzt somit das Ergebnis der massenspektrometrische Analyse und bestätigte die Identität als 17-Oxo-Steroid.

Es bleibt zu beachten, dass auch im Humanplasma das Gemisch der beiden Diastereomere entstand, so wie es auch der rein alkalische Reaktionsansatz zeigte, was vermutlich auf den in der Literatur vorgeschlagenen Mechanismus hinweist (*siehe Abb. 58*) [192, 193].

C Experimenteller Teil

1 Charakterisierung und Vergleich der Freisetzung der Glucocorticoide aus der Polymermatrix

1.1 Verwendete Arbeitsmittel

– Substanzen und Reagenzien

Substanz/Reagenz	Abkürzung	Bezugsquelle
Dexamethason-21-acetat	DXA	Pfizer (USA)
Glucocorticoid X (aus Gründen der Kooperation mit BIOTRONIK nicht näher beschriebenes Glucocorticoid)	GCX	GlaxoSmithKline (Greenford, UK)
Beclomethason-17,21-dipropionat	BDP	
Methanol HPLC-Grade	MeOH	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Acetonitril HPLC-Gradient-Grade	ACN	VWR International (Ismaning, Deutschland)
Tetrahydrofuran p.a.	THF	Fisher Scientific (Leicestershire, UK)
Essigsäure p.a.	-	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Milli-Q-Wasser	-	siehe Beschreibung im Text

Das Milli-Q-Wasser wurde der institutseigenen Wasseraufbereitungsanlage (Milli-Q® Reagent grade Water System, Firma Millipore, Schwalbach, Deutschland) entnommen, welche mit entsalztem Wasser aus der Demineralisationsanlage der Fakultät gespeist wurde.

– **Material und Geräte**

Gerätebezeichnung	Hersteller
Ultraschallbad Merck Eurolab USR 30	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kolbenhub-Pipette 0,1 – 1,0 mL Eppendorf Research®	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Kolbenhub-Pipette 1,0 – 5,0 mL Transferpipette® electronic	Brand (Wertheim, Deutschland)
Vollpipette (25 mL)	
Olivenkolben (5 mL) mit Schliff NS 14/23 und Glasstopfen	Witek Labortechnik (Wertheim, Deutschland)
Reagenzgläser (100 x 16 mm) mit Schliff NS 14/23 und Glasstopfen, Duran®	
HPLC-Vials (8 x 40 mm; 1 mL Shell), Klarglas	YMC (Dinslaken, Deutschland) und Waters (Milford, USA)
HPLC-Vials (8 x 40 mm, 700 µL, Total Recovery), Klarglas	
Stickstoffbegaser	Eigenkonstruktion Institutswerkstatt
Edelstahlstifte (10 x 1,2 mm)	
Vortex Reax 1	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Analysenwaage CPA225D-0CE	Sartorius Weighing Technology (Göttingen, Deutschland)
Weithals-Erlenmeyerkolben mit Schliff und Glasstopfen (50 mL, NS 29, SIMAX-Glas)	Kavalierglass (Prag, Tschechische Republik)
Plattformschüttler Heidolph Unimax 1010 DT	Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland)

1.2 Stammlösungen und Standards zur Kalibrierung

– Stamm- und Kalibrierlösungen

Stammlösungen der eingesetzten Glucocorticoide (DXA, GCX und BDP) wurden in der Konzentration 1 mg/mL hergestellt. Hierzu wurden je 5 mg Substanz an der Analysenwaage eingewogen und zu 5 mL in MeOH gelöst.

Ausgehend von den Stammlösungen wurden durch weiteres Verdünnen mit MeOH Kalibrierlösungen zu verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 0,4 bis 80 µg/mL hergestellt. Die Stamm- sowie Kalibrierlösungen wurden in Braunglasbehältnissen bei -25 °C unter Lichtausschluss gelagert. Vor Verwendung eingelagerter Lösungen wurden diese für mindestens 30 Minuten unter Lichtausschluss zum Equilibrieren auf Raumtemperatur stehen gelassen.

– Kalibrierstandards

Der erwartete Arbeitsbereich wurde auf 0,1 bis 10 µg/mL festgelegt. Zur Kalibrierung wurden Kalibrierstandards erstellt. Dazu wurden die Kalibrierlösungen (siehe oben) in einem HPLC-Vial mit MeOH im Verhältnis 1:4 verdünnt. Die Kalibrierstandards wurden zur Erstellung einer Regressionsgerade mittels HPLC/UV vermessen (*siehe Abschnitt 1.7*). Als Leerwert wurde reines MeOH mitgeführt. Alle Kalibrierstandards wurden stets frisch hergestellt.

1.3 Bestimmung des Glucocorticoid-Gehalts der LTSC

1.3.1 Untersuchungsgegenstände

Glucocorticoid	Collar-Typ	Soll-Gehalt [%] (m/m)
DXA	241	33 (± 15%)*
GCX	229	20 (± 15%)*
BDP	241	20 (± 15%)*

*(bezogen auf den Soll-Gehalt)

Die Collar wurden von der Firma BIOTRONIK zur Verfügung gestellt. Alle eingesetzten Collar-Typen sind Bauteile von Siello T Elektroden der Firma BIOTRONIK. Zur Gehaltsbestimmung wurden die Collar ohne weitere Beuteile einer Elektrode eingesetzt.

Unter der Bezeichnung Collar ist die arzneistoffhaltige Polymermatrix, welche an der Spitze einer Herzschrittmacherelektrode angebracht ist zu verstehen (*siehe auch Abschnitt 1.1 im Allgemeinen Teil B*). Die Matrix besitzt die Form eines weißen zu beiden Seiten hin geöffneten Hohlzylinders (*siehe Abb. 63*).

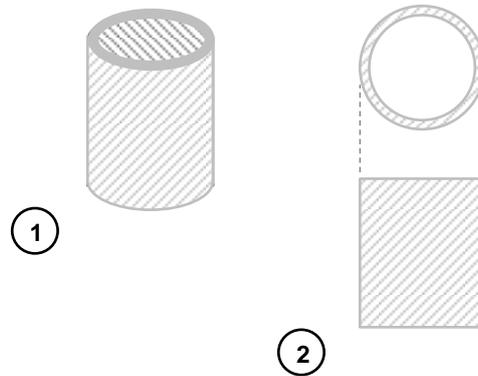


Abb. 63: Schematische drei- (1) und zweidimensionale (2) Ansichten eines Collars. Nicht Maßstabsgetreu, reale Höhe ca. 1,2 mm.

Der Soll-Gehalt sowie die zulässigen Abweichungen wurden den Herstellerangaben entnommen. Bei allen Freisetzungs- und Gewebefixierungsversuchen (*siehe Abschnitte 1.4.1, 2.1.1 und 3.1.1*) waren die Collar auf den Silikonmantel der Herzschrittmacherelektrode montiert und wurden dort somit als LTSC eingesetzt. Die Gehaltsbestimmung ist als Grundlage für diese Versuche zu verstehen.

1.3.2 Ermittlung des Collar-Gewichts und Berechnung des absoluten Soll-Gehalts

Zunächst wurde das Gewicht der zu extrahierenden Collar an der Analysenwaage ermittelt. Die Bestimmung erfolgte mit insgesamt 20 Collar, wobei immer zwei Stück gemeinsam gewogen wurden, um den Wägebereich der Analysenwaage nicht zu unterschreiten. Der halbe Mittelwert aus den zehn Einwaagen ergab das durchschnittliche Collar-Gewicht. Aus diesem wurde anhand des relativen Soll-Gehaltes laut Herstellerangabe (*siehe Abschnitt 1.3.1*) der absolute Soll-Gehalt in Milligramm berechnet und mit der nachfolgenden Gehaltsanalyse verglichen.

1.3.3 Extraktion der Collar zur Gehaltsanalyse

Die Extraktion der Collar erfolgte in Anlehnung an eine Methode der Firma BIOTRONIK, die zur Durchführung an die örtlichen Gegebenheiten angepasst wurde. Alle Arbeiten, ausschließlich des Pipettierens, wurden in Glasgeräten durchgeführt, um eine Adsorption der Glucocorticode an den Gefäßen weitestgehend zu vermeiden. Die zuvor zur Ermittlung des absoluten Soll-Gehalts eingewogenen Collar wurden paarweise in Reagenzgläser überführt und mit 5,0 mL THF versetzt. Direkt im Anschluss wurden die Reagenzgläser mit einem Glasstopfen verschlossen, die Proben 20 Minuten lang im Ultraschallbad behandelt und das THF anschließend vollständig in Olivenkolben überführt. Dieser Extraktionsschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt, während die THF-Phase des ersten Extraktionsschrittes bereits eingeeengt wurde (*siehe Abschnitt 1.3.4*). Nach dem zweiten Extraktionsschritt wurden das THF aus beiden Extraktionsschritten in den Olivenkolben vereinigt, die in den Reagenzgläsern verbliebenen Collar mit 1,0 mL THF nachgespült und dieses ebenfalls dem restlichen THF zugeführt. Während der Extraktion wurden die ursprünglich weißen Collar vollständig transparent.

1.3.4 Probenaufarbeitung

Die Proben wurden durch Verwendung eines etwa 40 °C warmen Wasserbads unter sanftem Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft. Die getrockneten Rückstände wurden je in 1,0 mL MeOH aufgenommen und durch einige Sekunden Schütteln auf dem Vortex in Lösung gebracht. 50 µL dieser Lösungen wurden in HPLC-Vials mit 950 µL MeOH zu einem 1,0 mL verdünnt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren durchmischt. Die fertigen Proben wurden mittels HPLC/UV quantifiziert.

1.3.5 Quantifizierung mittels HPLC/UV und Auswertung

Zur Quantifizierung der Proben wurde sich der Auftrennung mittels Hochdruckflüssigchromatographie und UV-metrischer Vermessung bedient. Angaben zur verwendeten Methode befinden sich in Abschnitt 8.1.2. Weitere Berechnungen zur Auswertung der Proben wurden mit Microsoft Excel[®] Version 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) durchgeführt.

1.4 Freisetzung der Glucocorticoide in Methanol

1.4.1 Untersuchungsgegenstände

Als Probenmaterial wurden LTSC (*lead tip with steroid eluting collar*) verwendet (passend zu Siello T Elektroden, BIOTRONIK, Berlin, Deutschland). Diese bestanden aus dem die spätere Elektrodenspitze einfassenden, transparenten Silikonschlauch auf dessen vorderes Ende ein Collar montiert war (siehe Abb. 64 und für Informationen zum Collar Abschnitt 1.3.1, für nähere Erläuterung siehe auch Abschnitt 1.1 im Allgemeinen Teil B).

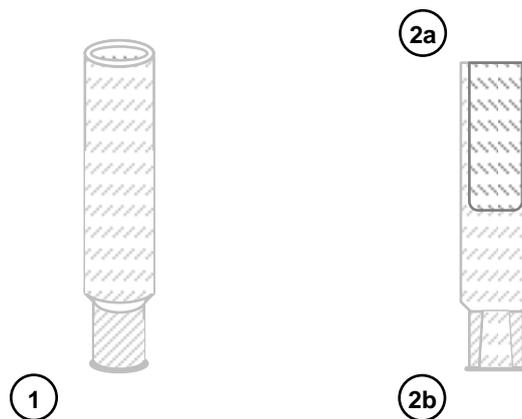


Abb. 64: Schematische dreidimensionale Ansicht (1) und Querschnitt (2) eines LTSC (= *lead tip with steroid eluting collar*), passend zu Siello T Elektroden (BIOTRONIK). Das obere Ende ist über etwa die halbe Länge des LTSC hohl (2a), am unteren Ende befindet sich der montierte *Collar* (2b). Nicht maßstabsgetreu, reale Höhe ca. 10 mm.

1.5 Versuchsdurchführung

Edelstahlstifte wurden als Sinker eingesetzt. Diese wurden dazu vorsichtig in das rückwärtige hohle Ende der zylindrisch geformten Silikonschläuche der LTSC geschoben (siehe Abb. 64). 50 mL Erlenmeyerkolben wurden über eine Vollpipette mit 25 mL MeOH befüllt, um Verdunstung zu vermeiden sofort mit einem Glasstopfen verschlossen. Daraufhin wurden die Erlenmeyerkolben in äquidistanten Positionen auf dem Plattformschüttler arretiert, der Schüttler auf eine Geschwindigkeit von 180 U/min (Stufe 4) eingestellt und gestartet. Im Folgenden wurden alle Erlenmeyerkolben nacheinander mit den LTSC inklusive Sinker zeitlich versetzt beschickt.

Probenzug aus allen Ansätzen erfolgte je nach 30 und 90 Minuten sowie 3, 6, 12 und 24 Stunden, wobei die Zeitabstände bei der Beschickung zwischen den Proben berücksichtigt wurden. Es wurden jeweils Proben von 1 mL Volumen gezogen und in HPLC-Vials (Fassungsvermögen 1000 μ L) überführt. Das entnommene Volumen wurde

direkt nach der Entnahme durch Zugabe von 1 mL MeOH ersetzt. Die Proben wurden zur Quantifizierung direkt mittels HPLC/UV vermessen. Nach Ziehen der letzten Probe wurden die LTSC sofort mit einer Pinzette aus den Erlenmeyerkolben entnommen. Zur Entfernung des restlichen MeOH wurden die LTSC vorsichtig mit einem fusselreien Zellstofftuch abgetrocknet, in Reagenzgläser überführt und mit einem Glasstopfen verschlossen. Die Untersuchungsgegenstände wurden bis zur Extraktion bei -20 °C unter Lichtausschluss gelagert.

1.6 Extraktion des Restgehalts der untersuchten Collar

Als Kontrolle der Freisetzungsversuche wurde bei allen eingesetzten LTSC der Restgehalt an Glucocorticoid untersucht. Die Extraktion und nachfolgende Probenaufarbeitung erfolgte wie bereits für die Bestimmung des Gesamtgehalts beschrieben (*siehe Abschnitte 1.3.3 und 1.3.4*).

1.7 Quantifizierung mittels HPLC/UV und Auswertung

Die HPLC-Methodik zur Quantifizierung der Proben ist unter Abschnitt 8.1.2 beschrieben. Die Berechnung der zu den entsprechenden Zugzeitpunkten freigesetzten Menge an Glucocorticoid und die weitere statistische Auswertung der Freisetzungsversuche wurden mit Microsoft Excel[®] Version 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) und Origin 8.6.0G (OriginLab Corporation, Northampton, USA) durchgeführt.

2 Charakterisierung des Freisetungsverhaltens der Glucocorticoide aus der Polymermatrix in Humanplasma

2.1 Verwendete Arbeitsmittel

Insofern im Folgenden nicht aufgeführt, wurden alle weiteren verwendeten Arbeitsmittel bereits im vorigen Abschnitt beschrieben (*siehe Abschnitt 1.1*).

– Substanzen und Reagenzien

Substanz/Reagenz	Abkürzung	Bezugsquelle
D-Glucose Monohydrat	-	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dexamethason	DX	
17-Oxo-Dexamethason	17-Oxo-DX	eigene Herstellung siehe Abschnitt 7.3
Beclomethason	BOH	
Beclomethason-17-propionat	B-17-P	Toronto Research Chemicals (North York, Canada)
Beclomethason-21-dipropionat	B-21-P	
9,11-Epoxy-Beclomethason	9,11-Epoxy-BOH	eigene Herstellung siehe Abschnitt 7.4
Amcinonid	AMC	
Dichlorvos (Pestanal®)	DCV	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Isotonischer Phosphatpuffer (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	PBS	
Humanplasma	-	Bayerisches Rotes Kreuz (Wiesentheid, Deutschland)
Diethylether p.a.	DEE	VWR International (Ismaning, Deutschland)
Diisopropylether p.a.	DIPE	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Bovines Serumalbumin	BSA	Gerbu Biotechnik (Heidelberg, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin (10000 U/mL bzw. µg/mL)	PenStrep	Biochrom (Berlin, Deutschland)

Steriles Humanplasma wurde vom Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuz erworben. Vor der weiteren Verwendung wurde Plasma von mindestens drei verschiedenen Spendern gepoolt und in Aliquots von 50 mL Volumen bei -40 °C unter Lichtausschluss gelagert. Vor dem Gebrauch wurde das Plasma auf Raumtemperatur aufgetaut. Der PBS wurde bereits steril und auf pH 7,4 eingestellt bezogen.

– **Material und Geräte**

Gerätebezeichnung	Hersteller
Brutschrank HeraCell	Kendro Laboratory Products (Hanau, Deutschland)
Autoklav Systec DX-90 2D	Systec Labor-Systemtechnik (Wettenberg, Deutschland)
Sterilbank HERAsafe® KS	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Mischrad (Ø 360 mm, Antrieb Heidolph-Rührgerät Typ 50111 RZR 1)	Eigenkonstruktion Institutswerkstatt und Heidolph Instruments Germany (Schwabach, Deutschland)
pH-Meter WTW Series inoLab pH720	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (Weilheim, Deutschland)
Erlenmeyerkolben mit Gewinde und Verschlusskappe aus Kunststoff (100 mL, SIMAX-Glas)	Kavalierglass (Prag, Tschechische Republik)
Kunststoff-Tubes (50 mL, steril)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Magnetrührer RCT basic IKAMAG® safety control	IKA®-Werke (Staufen, Deutschland)
Dialyseeinheiten Float-A-Lyzer® G2 (MWCO 300 kD, 1 mL)	Spectra/Por® (Rancho Dominguez, USA)
Parafilm M® (4" x 125')	Bemis Company (Neenah, USA)
Mörser und Pistill	Rosenthal (Selb, Deutschland)
Dialysiergefäße auf Basis von Präparatgläsern (15 mL)	Eigenanfertigung durch die Glasbläserwerkstatt des Instituts für organische Chemie

Erlenmeyerkolben, Edelstahlstifte, Pinzetten und Einmal-Pipettenspitzen wurden vor ihrer Verwendung im Autoklaven unter Wasserdampfdruck sterilisiert (Autoklavierprogramm „Festkörper 1“, Sterilisationszeit 20 min, Temperatur 121 °C).

2.1.1 Untersuchungsgegenstände

Als Probenmaterial wurden sterile LTSC verwendet (*siehe Abschnitt 1.4.1*). Zusätzlich zu den arzneistoffhaltigen wurden Placebo-LTSC ohne Glucocorticoid eingesetzt (passend zu Siello T Elektroden, BIOTRONIK, Berlin, Deutschland). Die Sterilisation mit Ethylenoxid wurde vorab von BIOTRONIK durchgeführt.

2.1.2 Stammlösungen und Standards zur Kalibrierung

– Stamm- und Kalibrierlösungen

Die Herstellung der Stammlösungen der eingesetzten Arzneistoffe (DXA, GCX und BDP) wurde bereits in einem vorigen Kapitel beschrieben (*siehe Abschnitt 1.2*). Zusätzlich wurden in gleicher Weise Stammlösungen aller zugehörigen Metaboliten, sowie des Internen Standards AMC in einer Konzentration von 1 mg/mL erstellt. Ausgehend von diesen Stammlösungen wurden durch weiteres Verdünnen mit MeOH Kalibrierlösungen im Konzentrationsbereich von 0,4 bis 80 µg/mL hergestellt. Die Kalibrierlösungen bestanden aus Mischungen aller zugehörigen Metabolite in gleicher Konzentration. Jeder Lösung wurde Interner Standard zugemischt, resultierend in einer Konzentration von 20 µg/mL.

Ferner wurde eine separate Lösung des Internen Standards der Konzentration 20 µg/mL in MeOH hergestellt, die zum Beimengen zu den Proben bestimmt war. Alle Lösungen wurden in Braunglasbehältnissen bei -25 °C unter Lichtausschluss gelagert und vor Gebrauch für mindestens 30 Minuten unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur zum Auftauen stehen gelassen.

– Kalibrierstandards

Zur Herstellung von Kalibrierstandards wurden sieben Aliquots zu 1 mL des Freisetzungsmediums bereitgestellt (*für Informationen zur Herstellung des Freisetzungsmediums siehe Abschnitt 2.2*). Ein Aliquot diente als Leerwert, diesem wurden 50 µL MeOH zugemischt. Den sechs weiteren Aliquots wurden 50 µL Kalibrierlösung zugesetzt. Vor dem Beimengen der Kalibrierlösungen wurde den Standardreihen zudem DCV in einer Konzentration von 50 µg/mL, ausgehend von einer Stammlösung von 1 mg/mL in Milli-Q-Wasser, zur Esterase-Inhibition zugefügt. Alle Kalibrierstandards wurden einige Sekunden auf dem Vortex gemischt.

Die Aufarbeitung der Kalibrierstandards wurde analog der Extraktion der entsprechenden Proben durchgeführt (*siehe Abschnitt 2.3*).

2.2 Versuchsdurchführung

Wie bei der Freisetzung in MeOH (*siehe Abschnitt 1.4.1*), wurden auch bei den Freisetzungen in Humanplasma die mit verschiedenen Glucocorticoiden beladenen LTSC in separaten Reagiergefäßen wiederholt nebeneinander untersucht. Alle Arbeiten, sofern nicht anders angegeben, wurden unter der Sterilbank durchgeführt.

– **Vorbereitung der LTSC**

Die Präparation der LTSC mit den Sinkern erfolgte wie bereits in einem vorigen Abschnitt beschrieben (*siehe Abschnitt 1.5*). Abweichend davon wurden die handwerklichen Tätigkeiten unter Zuhilfenahme steriler Pinzetten und unter der Sterilbank durchgeführt. Eine Berührung des Collars wurde dabei vermieden, um eine Beschädigung desselben auszuschließen, da diese die Freisetzungseigenschaften hätte beeinflussen können.

– **Vorbereitung des Freisetzungsmediums**

Das Freisetzungsmedium bestand zu vier Teilen aus humanem Blutplasma und zu einem Teil aus einer PBS/Antibiotika-Lösung. Alle Bestandteile wurden vor ihrer Verwendung im Brutschrank auf 37 °C erwärmt. Zur Herstellung der PBS/Antibiotika-Lösung wurden vorab 19 Teile PBS mit einem Teil Antibiotika (Penicillin 10000 U/mL und Streptomycin 10000 µg/mL) versetzt und auf dem Vortex gemischt. 5,0 mL dieser Lösung wurden in einen 100 mL Erlenmeyerkolben gegeben und anschließend mit 20,0 mL Humanplasma vermischt. Nach Verschluss der Kolben wurden diese zur Mischung der Bestandteile geschwenkt und bis zur Beschickung mit den Untersuchungsgegenständen im Brutschrank bei 37 °C temperiert. Die finale Konzentration der Antibiotika im Freisetzungsmedium betrug 250 U/mL Penicillin und 250 µg/mL Streptomycin.

– **Freisetzung der Glucocorticoide und Ziehung der Proben**

Die Freisetzung der Glucocorticoide erfolgte über einen Zeitraum von 28 Tagen bei 37 °C unter ständigem Schütteln. Um entsprechende Matrix-Proben für die anschließende HPLC-Analytik zu erhalten, wurden ein Erlenmeyerkolben ohne LTSC als Leerplasma mitgeführt sowie ein Weiter mit einem Placebo-LTSC. Zur Beschickung mit den Untersuchungsgegenständen wurden die temperierten Kolben aus dem Brutschrank entnommen. Nach Zugabe der LTSC wurden die Reagiergefäße mit verschlossen und in äquidistanten Positionen auf dem Plattformschüttler arretiert. Letzterer wurde zuvor im Brutschrank aufgestellt, der für den Versuchszeitraum von der CO₂-Versorgung getrennt

war. Die Schüttelgeschwindigkeit betrug 100 U/min.

In Zeitabständen von einem, zwei, fünf, zehn, 15, 21 und 28 Tagen wurden jeweils Proben zu 1,0 mL Volumen gezogen, in Reagenzgläser überführt und mit einem Glasstopfen verschlossen. Zur Kontrolle der Qualität des Freisetzungsmediums wurden aus dem Leer-Ansatz zweimal 0,5 mL als zusätzlich Proben zu jedem festgelegten Zugzeitpunkt entnommen. Das fehlende Volumen wurde durch jeweils frisch hergestelltes Medium direkt nach der Probenentnahme ersetzt. Nach Ablauf der Versuchszeit von 28 Tagen und ziehen der letzten Proben wurden alle LTSC aus dem Freisetzungsmedium entfernt. Letztgenanntes sowie die Lagerung der Proben erfolgte wie bereits zuvor beschrieben (*siehe Abschnitt 1.5*).

2.3 Probenaufarbeitung

Die eingefrorenen Proben wurden zunächst bei 37 °C im Brutschrank für 30 Minuten zum Auftauen stehen gelassen. Anschließend wurden diese in einem flüssig-flüssig-Extraktionsverfahren für die Vermessung mittels HPLC/UV aufgearbeitet. Jeder Plasmaprobe wurden 50 µL AMC (20 µg/mL) als Interner Standard zugesetzt und für einige Sekunden auf dem Vortex gemischt. Den Leerproben wurden anstelle der AMC-Lösung 50 µL MeOH zugesetzt.

Zur Extraktion der DXA-Proben wurde Diethylether, für GCX-Proben Diisopropylether eingesetzt. BDP-haltiges Plasma wurde mit einer Mischung aus einem Teil Diethylether und einem Teil Diisopropylether extrahiert. Alle Proben wurden mit 5 mL des Extraktionsmittels versetzt. Einer wenigen Sekunden langen Durchmischung auf dem Vortex folgten weitere 20 Minuten am Mischräd bei einer Geschwindigkeit von 35 U/min. Nach Ablauf der Zeit wurde die Plasmaphase zur Trennung bei -20 °C ausgefroren (etwa eine bis 1,5 Stunden, abhängig von der Zusammensetzung des Extraktionsmittels). Die noch flüssige Etherphase wurde vollständig abgenommen und in einem Olivenkolben unter sanftem Stickstoffstrom bei Raumtemperatur zur Trockne eingedampft. Nach Rekonstitution der Lösung durch Aufnahme in 100 µL MeOH wurde diese vollständig in ein HPLC-Vial überführt.

2.4 Extraktion des Restgehaltes der untersuchten Collar

Als Kontrolle der Freisetzungsversuche wurde bei allen eingesetzten LTSC der Restgehalt an Glucocorticoid untersucht. Die Extraktion erfolgte wie bereits für die Bestimmung des Gesamtgehalts beschrieben (*siehe Abschnitte 1.3.3 und 1.3.4*).

2.5 Quantifizierung mittels HPLC/UV und Auswertung

Angaben zur verwendeten Methode der chromatographischen Analyse der Humanplasma-Proben befinden sich in Abschnitt 8.1.3, die Methode zur Analyse des Restgehaltes ist Abschnitt 8.1.2 zu entnehmen. Weitere Berechnungen zur Auswertung der Freisetzungsversuche wurden mit Microsoft Excel® Version 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) und der Statistiksoftware Origin 8.6.0G (OriginLab Corporation, Northampton, USA) durchgeführt.

2.6 Kontrolle der Qualität des verwendeten Humanplasmas

Zur Kontrolle der Qualität des Freisetzungsmediums wurden der pH-Wert und der Proteingehalt des verwendeten Mediums fortwährend über den gesamten Versuchszeitraum von 28 Tagen kontrolliert.

2.6.1 Kontrolle des pH-Werts

Die pH-Werte wurden jeweils direkt nach Entnahme der Proben gemessen. Eine der aus den Leer-Ansätzen zusätzlich gewonnenen Proben zu 0,5 mL (*siehe Abschnitt 2.2*) wurde dazu auf Raumtemperatur abgekühlt und mittels pH-Meter und Micro-pH-Elektrode vermessen. Alle Messungen wurden nach Kalibrierung des Messsystems dreifach durchgeführt. Der Proteingehalt wurde anhand der zweiten 0,5 mL Probe mittels Bradford-Assay ermittelt. Die gefrorenen Proben wurden auf Raumtemperatur aufgetaut und im Verhältnis 1:100 mit PBS verdünnt.

2.6.2 Kontrolle des Proteingehaltes mittels Bradford-Assay

Der Proteingehalt wurde anhand der zweiten 0,5 mL Leerprobe mittels Bradford-Assay ermittelt. Bradford-Reagenz bestand aus 0,1 g/L Coomassie Brilliant Blue G-250, gelöst in 60 mL EtOH (96 % V/V), 100 mL Phosphorsäure (85 %) und dem auf 1000 mL fehlenden Volumen Milli-Q-Wasser. Die gefrorenen Proben wurden zunächst auf Raumtemperatur aufgetaut und im Verhältnis 1:100 mit Milli-Q-Wasser verdünnt. 5 µL Probe wurden in 200 µL Bradford-Reagenz auf einer 96-Well-Platte eingespült und vorsichtig mit der Pipette durchmischt. Die Kalibrierung erfolgte mit bovinem Serumalbumin (BSA) in einem Konzentrationsbereich von 0,2 bis 1,0 mg/mL. Für den Assay wurde die entsprechende Menge BSA, ausgehend von einer 1,0 mg/mL Stammlösung in PBS, dem Bradford-Reagenz auf gleiche Weise wie die Proben zugesetzt, wobei auf 5 µL fehlendes Volumen an BSA-Lösung durch Milli-Q-Wasser ersetzt wurde. Zusätzlich wurde ein

Leerwert bestehend aus reinem Milli-Q-Wasser mitgeführt. Leerwert, Proben und Kalibrierpunkte wurden sodann 10 Minuten bei Raumtemperatur zum inkubieren stehen gelassen und schließlich bei 600 nm auf dem Plattenlesegerät vermessen.

Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel[®] Version 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Bei Kalibrierpunkten und Proben wurde stets die Absorption des Leerwerts berücksichtigt und alle Messungen in dreifacher Ausführung durchgeführt.

2.7 Bestimmung der Aufnahmekapazität für Glucocorticoide in Humanplasma

2.7.1 Durchführung der Bestimmung

Um die Benetzung der Glucocorticoide mit dem Humanplasma zu erleichtern und einer Ausbildung größerer Klumpen, die den Lösungsvorgang der Arzneistoffe verzögert hätte, vorzubeugen, wurden Stammverreibungen zu 5 % (m/m) der Substanzen in D-Glucose Monohydrat hergestellt. Dazu wurden an der Analysenwaage 50 mg des jeweiligen Glucocorticoids eingewogen und in einen mit D-Glucose Monohydrat ausgekleideten Mörser überführt. 950 mg Glucose wurden abgewogen, zum Ansatz gegeben und dieser zur Durchmischung sorgfältig verrieben. Die fertige Stammverreibung wurde in ein 5 mL Präparateglas gefüllt und bis zur Verwendung unter Lichtausschluss im Kühlschrank bei +5 °C aufbewahrt.

Humanplasma wurde im Brutschrank auf 37 °C vorgewärmt. 30 mg der Verreibung, entsprechend 1,5 mg Glucocorticoid, wurden auf der Analysenwaage direkt in die Dialyseeinheiten eingewogen, diese anschließend mit 1,5 mL Humanplasma befüllt und nach Verschließen durch vorsichtiges Schütteln vermischt. Zuvor wurden die Dialysiergefäße bereits mit 11 mL Humanplasma befüllt und Magnetrührstäbe eingelegt. Nach Einhängen der Float-A-Lyzer[®] in die Gefäße wurde die Anordnung mit Parafilm M[®] abgedichtet und im Brutschrank bei 37 °C auf dem Magnetrührer (Geschwindigkeit Stufe 7) drei Tage lang gerührt (*siehe auch Abschnitt 2.2.1 im Allgemeinen Teil B*). Für GCX wurden die Versuche zusätzlich über einen Zeitraum von fünf Tagen durchgeführt. Nach Ablauf der Versuchszeit wurde 1,0 mL Plasma aus dem Dialysiergefäß als Probe gezogen und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C unter Lichtausschluss gelagert.

2.7.2 Probenaufarbeitung, Quantifizierung und Auswertung

Die Aufarbeitung der Proben und deren Quantifizierung erfolgten wie in den Abschnitten 2.3, 2.5 und 8.1.3 beschrieben. Abweichend vom bisherigen Aufbereitungsverfahren wurden, aufgrund deren hohen zu erwarteten Gehaltes, DXA-Proben vor Injektion in die HPLC-Anlage 30-fach und BDP-Proben vierfach mit MeOH verdünnt.

3 Charakterisierung der lokalen Gewebefindung der Glucocorticoide an der Schnittstelle zwischen Herzgewebe und Herzschrittmacherelektrode

3.1 Verwendete Arbeitsmittel

Insofern im Folgenden nicht aufgeföhrt, wurden alle weiteren verwendeten Arbeitsmittel bereits in vorigen Abschnitten beschrieben (*siehe Abschnitte 1.1 und 2.1*).

– Substanzen und Reagenzien

Substanz/Reagenz	Abkürzung	Bezugsquelle	
Methylprednisolon	MPR	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)	
Flunisolid	FLU		
Kollagen Typ I, hochkonzentriert (aus Rattenschwanzsehne, gelöst)	-	BD Bioscience (Bedford, USA)	
Natriumchlorid	NaCl	Chemikalienausgabe der Fakultät	
Kaliumchlorid	KCl		
Di-Natriumhydrogenphosphat Dodecahydrat	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O		
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄		
Natriumhydroxid	NaOH		
Ethanol 96 % (V/V)	EtOH		
Hank's Balanced Salt Solution (mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	HBSS		Biochrom (Berlin, Deutschland)
Kollagenase Typ II, lyophilisiert, aus <i>Clostridium histolyticum</i>	-		Gibco®, Life Technologies™ (Grand Island, USA)

Schafsherzgewebe wurde freundlicherweise von BIOTRONIK bereitgestellt und stammte von drei Tieren, die zuvor Teil einer Studie waren. Allen Schafen waren in der Studie Herzschrittmacher implantiert, die mit Placebo-LTSC ausgestattet waren. Eine Exposition der Tiere mit Glucocorticoiden fand daher nicht statt. Dennoch wurden die Gewebestücke vor Einsatz in den Bindungsversuchen auf DXA, GCX, BDP und deren Metabolite untersucht (*siehe Abschnitt 3.2 für Informationen zur weiteren Vorbereitung des*

Schafsherzgewebes und Abschnitte 3.3 und 3.4 für Analytik). Insgesamt standen mehrere Gewebestücke aus Atrium und Ventrikel eines jeden Schafs zur Verfügung.

– Material und Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Einmal-Skalpell Ratiomed® (Fig.21, steril)	Megro (Wesel, Deutschland)
Einmal-Spritzenvorsatzfilter Minisart® NML 0,2 µm (steril)	Sartorius Stedim Biotech (Göttingen, Deutschland)
Messzylinder aus Borosilikatglas, 10 (± 0,2) mL	Witeg Labortechnik (Wertheim, Deutschland)
Schlauchpumpe Gilson Minipuls II	Gilson (Middleton, USA)
Pumpenschlauch Tygon SI 3350 Pt (2 Stopper, ID 2,79 mm, WS 0,84 mm, Länge 381 mm)	IDEX Health & Science (Wertheim, Deutschland)
Silikonschlauch Tygon SI 3350 Pt (ID 2,79 mm, WS 0,84 mm, Länge 100 mm)	
Rotilabo®-FEP-Schlauch (ID 4,0 mm, WS 1,0 mm, Länge 1198 mm)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
6-Well-Multischale Nunclon™	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Schlauchanschluss für 6-Well-Multischale (siehe Abschnitt 3.1.3)	Eigenkonstruktion Institutswerkstatt
6-Well-Multischalen-Adapter (siehe Abschnitt 3.1.3)	
Halteungsstift für LTSC (Ø 1,2 mm, Federstahldraht) (siehe Abschnitt 3.1.3)	
Zentrifuge Centrifuge 5702	

Pipettenspitzen zum Umgang mit hochkonzentriertem Kollagen und zum Ausgießen der fertigen Gel-Mixtur wurden, um die Öffnung der Spitze zu vergrößern, mit einem Skalpell von der Spitze an um 10 mm gekürzt. Schläuche, Schlauchanschlüsse, Halteungsstifte und jegliches Verbrauchsmaterial wurden – insofern nicht ohnehin bereits in sterilem Zustand bezogen – vor Gebrauch autoklaviert (siehe Abschnitt 2.1).

3.1.1 Untersuchungsgegenstände

Als Probenmaterial wurden sterile LTSC verwendet (siehe Abschnitte 1.4.1 und 2.1.1). Abweichend zu den vorherigen Versuchen differierte die Charge der montierten Collar bei DXA- und GCX-LTSC. Die absoluten Gehaltsangaben zu diesen wurden deshalb, anders

als zu den Versuchen unter den Abschnitten 1.4 und 2, von BIOTRONIK geliefert (*siehe auch Abschnitt 1.3 im Allgemeinen Teil B*).

3.1.2 Stammlösungen und Standards zur Kalibrierung

– Stamm- und Kalibrierlösungen

Die Herstellung der Stammlösungen aller Analyte wurde bereits in vorigen Abschnitten beschrieben (*siehe Abschnitt 1.2 und 2.1.2*). Zusätzlich wurden in gleicher Weise Stammlösungen zu 1 mg/mL der Internen Standards MPR und FLU zubereitet. Durch weiteres Verdünnen mit MeOH wurden Kalibrierlösungen aller Substanzen im Konzentrationsbereich von 200 bis 8000 ng/mL hergestellt. Diese waren aus den jeweiligen Arzneistoffen und – insofern vorhanden – deren Metabolite in gleicher Konzentration zusammengesetzt, wobei den Lösungen zusätzlich Interne Standards in einer Konzentration von 4000 ng/mL beigemischt wurden. AMC und FLU wurden dabei als Interne Standards für GCX benutzt, für DXA, BDP und zugehörige Metabolite wurden MPR und AMC verwendet (*siehe auch Tab. 13 unter Abschnitt 8.1.3*). Ferner wurden separate Lösungen der Internen Standards zu 4000 ng/mL in MeOH hergestellt, welche zur Beimischung zu den Proben bestimmt war. Alle Lösungen wurden in Braunglasbehältnissen bei -25 °C unter Lichtausschluss gelagert und vor Gebrauch für mindestens 30 Minuten unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur zum Auftauen stehen gelassen.

– Kalibrierstandards

Zur Herstellung von Kalibrierstandards wurden sieben Aliquots zu 1 mL der jeweiligen Probenmatrix – also Freisetzungsmittel und Schafsherzgewebe – bereitgestellt (*für Informationen zur Herstellung des Freisetzungsmittels siehe Abschnitt 2.2*). Reine Probenmatrix aus Schafsherzgewebe wurde dadurch erzeugt, dass vorbereitetes Gewebe in ein Kollagen-Gel gegossen und anschließend direkt wieder durch Zugabe von Kollagenase verdaut wurde, genau wie für die Probengewinnung aus dem Gewebe-Gel nach Versuchsablauf beschrieben (*siehe Abschnitt 3.2*). 6 Aliquots wurden 50 µL an Kalibrierlösung zugesetzt, dem siebten 50 µL reines MeOH. Zuvor wurde der Probenmatrix zur Esterase-Inhibition zudem DCV in einer Konzentration von 50 µg/mL, ausgehend von einer Stammlösung von 1 mg/mL in Milli-Q-Wasser, zugefügt. Alle Kalibrierstandards wurden einige Sekunden auf dem Vortex gemischt. Die Aufarbeitung der Kalibrierstandards wurde analog der Extraktion der entsprechenden Proben durchgeführt (*siehe Abschnitte 2.3 und 3.3*).

3.1.3 Spezialanfertigungen

Die Spezialanfertigungen sind in den *Abb. 65* und *Abb. 66* dargestellt (*die Nummern in nachfolgender Beschreibung beziehen sich auf die jeweiligen Abbildungen*) .

6-Well-Multischalen-Adapter (*3 beziehungsweise 3a/b*) wurden aus PTFE gefertigt und dergestalt auf die Maße der verwendeten 6-Well-Multischalen (*5*) angepasst, dass sie die einzelnen Schalen fest verschlossen.

Schlauchanschlüsse (*2 beziehungsweise 2a/b/c*) zur Verbindung der Multischale mit einem System aus Schläuchen und Pumpe, bestanden aus rostfreiem Edelstahl und wurden über die beiden großen Bohrungen (\varnothing 6 mm) im 6-Well-Multischalen-Adapter auf die Multischale gesetzt. Ein Schlauchanschluss bestand aus Anschlussstellen für Zu- und Ableitung des Freisetzungsmittels an der oberen Seite sowie seitlich positionierten Ein- und Auslassöffnungen an der unteren Seite. Die seitliche Anordnung der Öffnungen sollte zum einen eine Verbesserung der Durchmischung der gesamten Kammer gewährleisten und somit tote Räume vermeiden. Zum anderen sollte es den Einfluss der Sogkraft auf das darunter befindliche Kollagen-Gel mindern und so einer ungewollten Ablösung desselben vom Boden der Schale vorbeugen. Um das Kollagen-Gel zusätzlich zu fixieren wurde ein schmaler Ring aus Edelstahl (*4*) auf den äußeren Rand des Gels aufgelegt.

Die Halterungsstifte (*1a*) für die LTSC (*1b*) beziehungsweise waren aus dem gleichen Federstahldraht beschaffen, wie die als Sinker eingesetzten Edelstahlstifte bei den Freisetzungsvorversuchen (*siehe Abschnitt 1*). In Abweichung zu Letztgenannten waren sie am oberen Ende um 90° zu einem Haken gebogen, um die Applikation und das Herausnehmen der LTSC zu erleichtern. Zur Aufnahme eines LTSC wurde ein Halterungsstift bis zum Anschlag in dessen hohles rückwärtiges Ende eingeführt und abschließend über die mittige Bohrung (\varnothing 2,5 mm) in Schlauchanschluss und 6-Well-Multischalen-Adapter appliziert.

Alle Spezialanfertigungen waren aus autoklavierbaren Materialien gefertigt und vor Gebrauch sterilisiert (*siehe Abschnitt 2.1*).

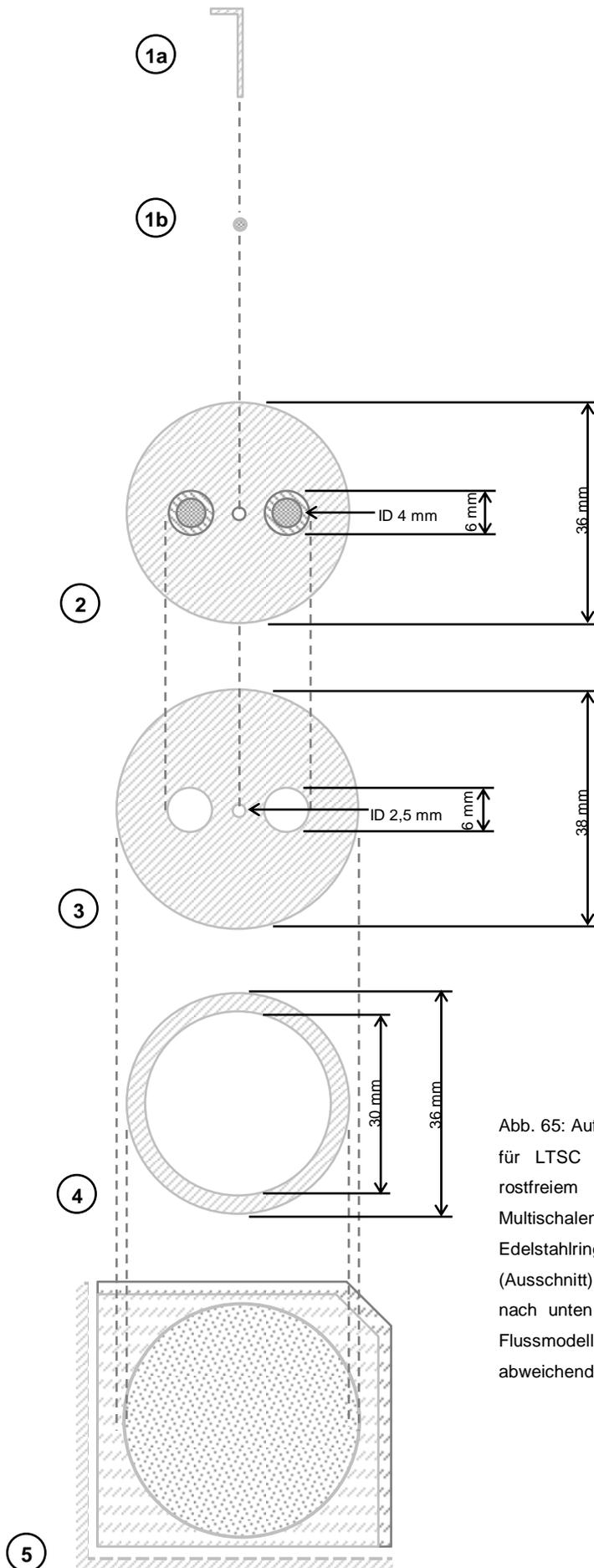


Abb. 65: Aufsichten von Halteringsstift (1a) für LTSC (1b), Schlauchanschluss aus rostfreiem Edelstahl (2), 6-Well-Multischalen-Adapter aus PTFE (3), Edelstahlring (4) und 6-Well-Platte (Ausschnitt) (5). Reihenfolge von oben nach unten entspricht der Anordnung im Flussmodell. Montagereihenfolge abweichend (siehe Text).

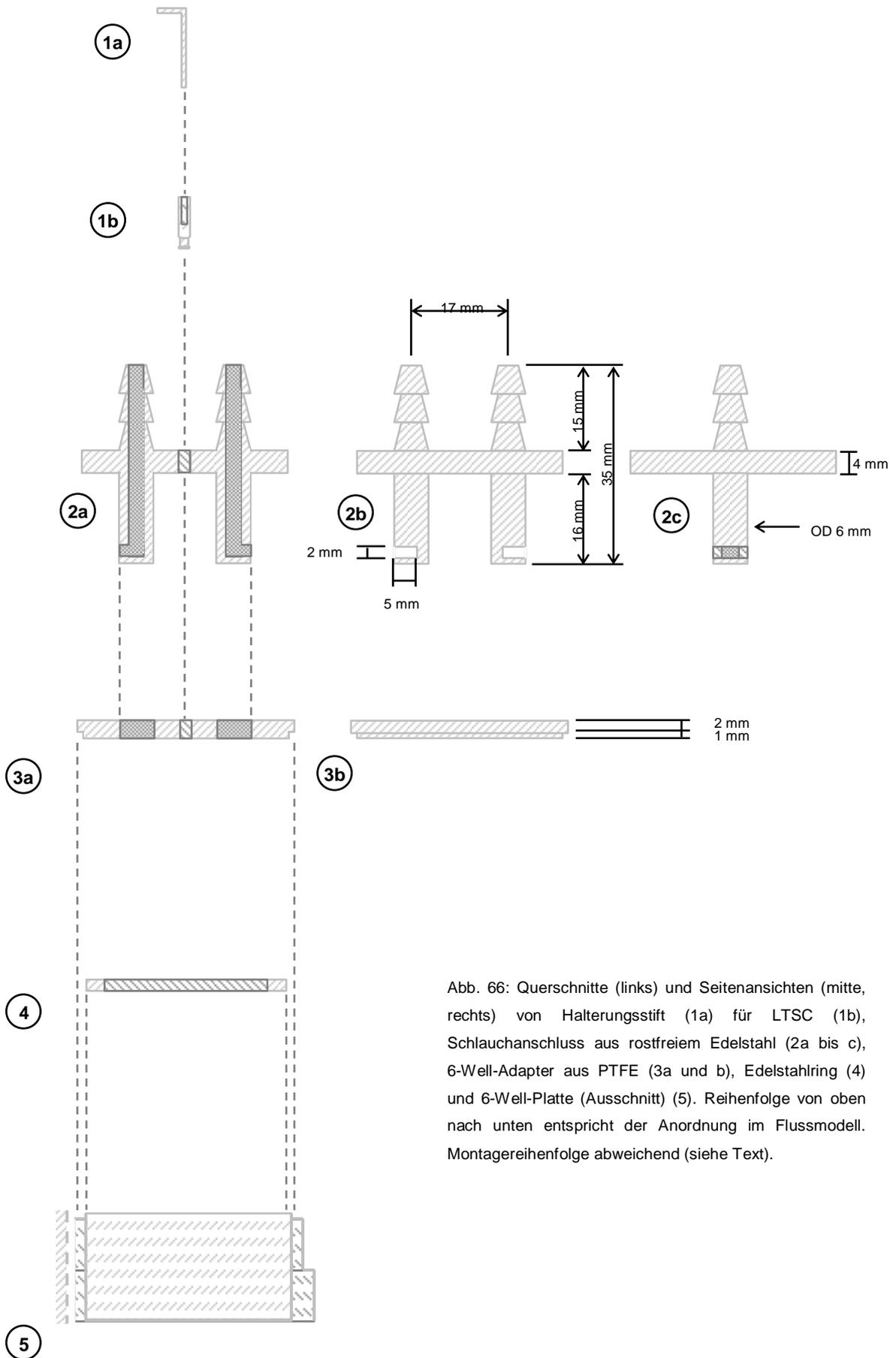


Abb. 66: Querschnitte (links) und Seitenansichten (mitte, rechts) von Halteringsstift (1a) für LTSC (1b), Schlauchanschluss aus rostfreiem Edelstahl (2a bis c), 6-Well-Adapter aus PTFE (3a und b), Edelstahlring (4) und 6-Well-Platte (Ausschnitt) (5). Reihenfolge von oben nach unten entspricht der Anordnung im Flussmodell. Montagereihenfolge abweichend (siehe Text).

3.2 Versuchsdurchführung

– Vorbereitung des Schafsherzgewebes

Bei -20 °C gelagertes Schafsherzgewebe wurde mit einem sterilen Skalpell unter der Sterilbank in Stücke von etwa 1 mm³ geschnitten. Das Gewebe wurde in gefrorenem Zustand zerkleinert und während des Prozesses ständig kühl gehalten, indem auf einer eisgekühlten Glasplatte als Schneidunterlage gearbeitet wurde. Die Glasplatte wurde vor Gebrauch mit 70 % EtOH desinfiziert. Gleiche Teile atriales und ventrikuläres Gewebe eines jeden Tiers wurden gepoolt, dreimal mit 25 mL sterilem PBS weitestgehend blutfrei gewaschen und auf der Analysenwaage Aliquots zu 0,5 g eingewogen. Die genaue Einwaage wurde notiert und bei der späteren Auswertung des Versuchs berücksichtigt (siehe Abschnitt 3.4). Diese wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

– Herstellung des Kollagen-Gels

Das Kollagen-Gel wurde mit sterilen Ausgangsmaterialien hergestellt. Vorab wurden dazu 1 N NaOH und zehnfacher PBS hergestellt. Letzterer setzte sich zusammen aus 1370 mM NaCl, 27 mM KCl, 81 mM Na₂HPO₄ und 15 mM KH₂PO₄, gelöst in Milli-Q-Wasser und mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Der zehnfache Puffer, die 1 N NaOH und reines Milli-Q-Wasser wurden anschließend durch Filtration bei einer Porengröße 0,2 µm sterilisiert.

Die Kollagenkonzentration eines fertigen Gels betrug 3 mg/mL, das Endvolumen 1,5 mL. Die genaue Zusammensetzung (siehe Tab. 3) richtete sich nach der Ausgangskonzentration des hochkonzentrierten Kollagens, welche zwischen den verwendeten Chargen differierte.

Tab. 3: Zusammensetzung des Kollagen-Gels.

Substanz	Mengenberechnung (Volumen)
10-fach PBS	Endvolumen/10
Kollagen (Konzentration Y mg/mL)	(Endvolumen · 3 mg/mL) / Kollagen Konzentration Y mg/mL
1 N NaOH	Kollagenvolumen · 0,023
Milli-Q-Wasser	q.s.

Die Herstellung erfolgte unter der Sterilbank. Um einer vorzeitigen Erstarrung der fertigen Mixtur vorzubeugen, wurden alle Substanzen während des Vorganges auf Eis gelagert und Pipettenspitzen auf +4 °C vorgekühlt. In ein Kunststoffröhrchen wurden zunächst zehnfacher PBS, 1 N NaOH und Milli-Q-Wasser vorgelegt und auf dem Vortex gemischt. Das Kollagen wurde anschließend vorsichtig hinzu pipettiert und die Lösung, ebenfalls unter Verwendung des Vortex, kurz vermengt. Nach etwa fünf bis zehn minütiger Lagerzeit auf Eis – dies war zum Zweck weitestgehender Befreiung der durch den Mischvorgang eingearbeiteten Luft abzuwarten – erfolgte das vorsichtige Pipettieren von 1,5 mL des klaren Gemenges in die Schale der Multi-Well-Platte. Dabei wurde darauf geachtet möglichst keine neuen Luftblasen zu generieren. Die Wenigen trotz aller Vorsicht entstandene Blasen verschwanden praktisch vollständig während der sich anschließenden Erstarrung der zähflüssigen Masse, die sich bei 37 °C über eine Stunde im Brutschrank vollzog. Das einzubettende Schafsherzgewebe wurde bereits vorab, nach zehn minütiger Auftauphase bei Raumtemperatur, in der Schale gleichförmig ausgebreitet. Für ein Vergleich-Gel entfiel Letztgenanntes, sodass ein reines Kollagen-Gel entstand.

– Vorbereitung der Versuchsanlage

Das Schlauchsystem der Apparatur bestand aus dem Pumpenschlauch, gefertigt aus Silikon mit glatter platinvernetzter Oberfläche, und einem FEP-Schlauch, der vor allem als Behälter für das Freisetzungsmittel fungierte. Dieses Schlauchsystem wurde in der später fertig aufgebauten Apparatur an einem Ende direkt über den Pumpenschlauch an die Multi-Well-Schale angeschlossen. Die andere Seite wurde über ein 100 mm langes Versatzstück eines Silikonschlauchs, gleicher Fertigung wie der Pumpenschlauch, verbunden. Letzteres war notwendig, da die starre Beschaffenheit des FEP-Schlauches einen direkten Anschluss nicht erlaubte. Zur Verbindung der Schläuche untereinander wurden keine Schlauchverbinder eingesetzt, sondern diese direkt aufeinander geschoben.

Vor der Versuchsdurchführung wurden alle verwendeten Kanäle der Schlauchpumpe auf den maximal erreichbaren Fluss von 12 mL/min (720mL/h) kalibriert. Nach Installation der Schläuche folgte die Messung des binnen 30 Sekunden geförderten Volumens Milli-Q-Wasser. Entsprechend das Fördervolumen auf einem Kanal nicht der maximal möglichen Leistung, wurde über die rückwärtige Einstellschraube der Druck auf den Schlauch dergestalt variiert, bis das Maximum erreicht war. Die Pumpe selbst war auf 25 U/min (Stufe 999) eingestellt. Dies entsprach der höchsten Umdrehungszahl. Die Volumenmessungen zur Kalibrierung erfolgten mittels eines 10 mL Messzylinders und wurden stets dreifach durchgeführt. Die Schläuche wurden passend zu den Kanälen, auf denen kalibriert wurde, nummeriert und nach dem Sterilisationsverfahren (*siehe Abschnitt 3.1*) unter der Sterilbank wieder auf denselben eingelegt. Die 6-Well-Multischale, die das fertige Kollagen-Gel enthielt, wurde daraufhin mit Adapter und Schlauchanschluss

versehen und das kurze Ende hinter der Schlauchpumpe mit der Probenschale verbunden.

Das Freisetzungsmedium wurde wie bereits unter Abschnitt 2.2 beschrieben zubereitet und bis zur Verwendung bei 37 °C temperiert. Zur Beschickung der Apparatur mit dem Freisetzungsmedium wurde dieses vollständig über das zweite, noch offene, Ende des Schlauchsystems eingesogen und danach der Kreislauf geschlossen (*für eine Erläuterung der Versuchsapparatur siehe auch Abb. 21 und Abb. 22 in Abschnitt 3.2 im Allgemeinen Teil B*). Etwa 7 mL der ständig zirkulierenden Flüssigkeit lagen in der Probenschale, während die restlichen 18 mL im Schlauchsystem Platz fanden. Luftblasen, die sich nach dem Aufbau möglicherweise im Schlauch befanden, konnten über die Probenschale entweichen, welche somit praktisch zugleich als Luftfalle diente.

– **Versuchsablauf und Probenentnahme**

Der Versuch startete mit der Applikation der LTSC. Diese wurden auf Halterungsstifte gezogen (*siehe Abschnitt 3.1.3*) und über die mittleren Bohrungen in den Schlauchanschlüssen, respektive in den 6-Well-Multischalen-Adaptern, in die Probenschale eingesetzt. Die gesamte Apparatur wurde sodann sofort in den Inkubator überführt und die Pumpe in Gang gebracht. Da die Apparatur als solche nicht vollkommen luftdicht gegenüber der Umgebung abgeschlossen war – was zur Vermeidung eventuellen Überdrucks im System auch nicht erwünscht war – und auch die Silikonschläuche eine gewisse Dampfdurchlässigkeit aufwiesen, musste von Zeit zu Zeit verdampftes Wasser ersetzt werden. Mehrmals täglich wurde der Flüssigkeitsstand in der Probenschale visuell überprüft und in der Regel nach 24 Stunden 1 mL Milli-Q-Wasser nachgefüllt. Das Volumen des Freisetzungsmediums wurde nach Ende des Versuchs notiert und floss in die spätere Auswertung der Analysenergebnisse ein.

Ein Versuch wurde über eine Dauer von ein, zwei oder fünf Tagen durchgeführt. Nach Ablauf der Versuchszeit wurden die LTSC unter der Sterilbank entnommen, das Freisetzungsmedium aus dem System gepumpt und in einem sterilen Kunststoffröhrchen mit Volumenmessskalierung aufgefangen. Restlicher Überstand in der Probenschale wurde abpipettiert, die Oberfläche des Gels zweimal mit 0,5 mL sterilem PBS gewaschen, alles mit dem übrigen Medium vereinigt und durch Schütteln gemischt. Zwei Proben des Freisetzungsmediums zu jeweils 1 mL wurden in Reagenzgläser überführt und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

Das trockengelegte und gewaschene Gel wurde zum Verdau mit 3 mL Kollagenase-Lösung überschichtet. Diese Lösung wurde vor Versuchsende in einer Konzentration von 5 mg/mL (500 U/mL) in HBSS frisch angesetzt und bis zur Verwendung auf 37 °C temperiert. Vormalig starr, war das Gel inklusive der Gewebestücke nach vier stündiger Inkubationszeit bei 37 °C und ständiger Schüttelbewegung auf dem Plattformschüttler praktisch vollständig zu einer fein dispergierten Suspension verflüssigt.

Übrige Agglomerate aus Geweberesten zerfielen beim anschließenden Durchmischen mittels Kolbenhubpipette und der Überführung in 15 mL Kunststoffröhrchen. Die Multi-Well-Schale wurde noch mit 0,5 mL PBS ausgewaschen und dieser mit dem restlichen verdauten Ansatz vereinigt. Das Volumen des Ansatzes wurde notiert und floss in die abschließende Auswertung der Analysenergebnisse mit ein. Nach abermaligem kräftigem Mischen wurden abschließend 2 Proben des verdauten Gels zu jeweils 1 mL in Reagenzgläser gefüllt und bei -20 °C bis zur Analyse gelagert.

3.3 Probenaufarbeitung

Die Aufarbeitung der gelagerten Proben erfolgte wie bereits unter Abschnitt 2.3 erläutert. Dies galt für beide Probenarten, also denjenigen aus dem Freisetzungsmedium und denen aus dem verdauten Gewebe-Gel, mit den einzigen Unterscheidungen, dass letztere Proben zur besseren Phasentrennung, nach der Extraktion am Mischrad, fünf Minuten lang bei 3.000 x g zentrifugiert wurden und dass als Interne Standards neben AMC auch MPR und FLU Verwendung fanden. Proben wurden 50 µL (200 ng/mL) des jeweils erforderlichen Internen Standards zugesetzt (*siehe auch Abschnitt 3.1.2*).

3.4 Quantifizierung mittels HPLC/UV und Auswertung

Die Analyse der Proben erfolgte mittels HPLC/UV, die Methode ist in Abschnitt 8.1.3 erläutert. Alle Messergebnisse wurden um das jeweils gemessene Volumen nach dem Verdauungsvorgang (*siehe Abschnitt 3.2*) berichtigt. Zur Berechnung der rein an das Gewebe gebundenen Glucocorticoide wurde die Differenz der Ergebnisse der Messungen aus den Gewebe-Gelen und den Vergleich-Gelen gebildet und auf das genaue Gewicht des jeweils eingesetzten Gewebe-Aliquots bezogen. Weitere Berechnungen zur Auswertung der Gewebebindungsversuche wurden mit Microsoft Excel[®] Version 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) und der Statistiksoftware Origin 8.6G (OriginLab Corporation, Northampton, USA) durchgeführt.

3.5 Bestimmung der unspezifischen Bindung der Glucocorticoide an das Material des Modellaufbaus

Die unspezifische Bindung der getesteten Glucocorticoide an das Material des Modellaufbaus wurde unter Einbezug aller Teile des Modells, mit dem die Arzneistoffe während des Versuchs in Kontakt traten, durchgeführt. Dies waren, neben der 6-Well-Multischale mit samt Anschlussystem, der als Reservoir dienende FEP-Schlauch, der Pumpenschlauch sowie das kurze Versatzstücke des Pumpenschlauchs über das der

FEP-Schlauch mit dem Anschluss der Schale verbunden wurde.

Als Medium wurden 28 mL Humanplasma vorbereitet, wie unter Abschnitt 2.2 beschrieben, und ausgehend von 1 mg/mL Stammlösungen zu 200 ng/mL mit DXA, GCX oder BDP versetzt. Die Versuchsanordnung wurde aufgebaut, wie unter Abschnitt 3.2 beschrieben, mit 25 mL Humanplasma befüllt und 24 Stunden lang bei 37 °C im Inkubator mit einer Flussrate von 12 mL/min (720 mL/h) betrieben. Aus dem Mehransatz des mit Glucocorticoiden versetzten Mediums wurden jeweils Proben zu 1 mL als Ausgangswert bei -20 °C bis zur Analyse zurückgelegt. Nach Ablauf der Versuchszeit wurden dem Medium im Modellaufbau ebenfalls Proben zu 1 mL entnommen und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Der Glucocorticoid-Gehalt aller Proben wurde sodann mittels HPLC (siehe Abschnitte 3.4 und 8.1.3) gemessen. Die unspezifische Bindung ergab sich aus der Differenz der Wiederfindung der Substanzen nach 24 Stunden zum Ausgangswert zum Zeitpunkt Null.

4 *In-vitro* Versuche zur Stimulation von Endothelzellen mittels externem Herzschrittmachersystem

4.1 Verwendete Arbeitsmittel und Zellkulturmaterialien

– Substanzen und Reagenzien

Substanz/Reagenz	Abkürzung	Bezugsquelle
Penicillin/Streptomycin (10000 U/mL bzw. µg/mL)	PenStrep	Biochrom (Berlin, Deutschland)
L-Glutamin (200 mM)	-	
Fetales Rinderserum	FBS	
Trypanblau Lösung 0,5% (m/V)	-	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natrium-Pyruvat (100 mM)	-	
Trypsin/EDTA 0,05/0,02 %	-	
nicht-essentielle Aminosäuren (100 mM)	NEA	
Lipopolysaccharid aus <i>Salmonella</i> <i>minnesota</i> Re595 (rough strains)	LPS	
Dulbecco´s Modified Essential Medium	DMEM	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Dimethylsulfoxid	DMSO	

– Zelllinien

Die Zelllinie IMR-90 (humane Lungenfibroblasten) wurden freundlicherweise vom Lehrstuhl für Mikrobiologie der Fakultät für Biologie an der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt und dort zuvor auf Mycoplasmenbefall negativ getestet.

– **Material und Geräte**

Bezeichnung	Hersteller
Inversmikroskop Nikon Eclipse TS100	Nikon (Düsseldorf, Deutschland)
Zentrifuge Kendro Megafuge 1.0 R	Kendro Laboratory Products (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge Microfuge 22 R	Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland)
Pipettierhilfe Accu-jet pro	Brand (Wertheim, Deutschland)
Einmal-Neubauerzählkammer C-Chip	Biochrom (Berlin, Deutschland)
6-Well-Platte Nunclon™	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Zellkulturflasche 75 cm ² EasyFlask®	
Serologische Pipettenspitzen 10 mL	
Zentrifugenröhrchen 15 mL	
Zentrifugenröhrchen 50 mL	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Schraubröhrchen, 2 mL	
CO ₂ -Inkubator HeraCell 240 i	
Plattenlesegerät Multiskan Ascent	Thermo Scientific
Siello T Elektroden als Placebo ohne Collar (<i>siehe Abschnitt 4.3</i>)	
6-fach Verteiler zum Anschluss von Siello T Elektroden (<i>siehe Abschnitt 4.3</i>)	BIOTRONK (Berlin, Deutschland)
Pulsgenerator (<i>siehe Abschnitt 4.3</i>)	
PVC-Messleitung mit 4 mm Bananen-Stecker	Voltcraft®, Conrad Electronic (Wollerau, Schweiz)
6-Well-Multischalen-Adapter als Elektrodenhalterung (<i>siehe Abschnitt 4.3</i>)	
Elektrodenspanne (<i>siehe Abschnitt 4.3</i>)	Eigenkonstruktion Institutswerkstatt

4.2 Routinemethoden der Zellkultur

Die nachfolgend beschriebenen Methoden wurden für die Endothelzelllinie EA.hy926 und die Fibroblastenlinie IMR-90 angewandt. Beide Linien wurden in Vollmedium kultiviert, bestehend aus DMEM mit 4,5 g/L Glucose und 3,7 g/L NaHCO₃, jedoch ohne Phenolrot. Zusätzlich wurden 100 U/mL Penicillin beziehungsweise 100 µg/mL Streptomycin, 1 mM NEA, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Na-Pyruvat sowie 10 % FBS hinzugefügt.

– Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden trypsinisierte Zellen gezählt und auf eine Konzentration von 1 bis 2 x 10⁶ Zellen/mL in Vollmedium eingestellt. Die Zellsuspension wurde anschließend zum gleichen Teil mit einer Mischung aus 80 % FBS und 20 % DMSO durchmischt und in Kryoröhrchen zu 1 mL aliquotiert. Zum Einfrieren mit einer Absenktemperatur von -1 °C/min wurden die Kryoröhrchen in einem mit Isopropanol befüllten Kunststoffbehälter (Nalgene[®] Cryo 1 °C Freezing Container) bei -80 °C für eine Dauer von 24 Stunden gekühlt. Die Langzeitlagerung erfolgte in einem Stickstofftank bei -196 °C.

Zum Auftauen wurden gefrorene Zellen direkt aus flüssigem Stickstoff entnommen und in einem Wasserbad bei 37 °C unter ständigem Schütteln erwärmt. Sobald die Zellsuspension frei von Eiskristallen war, wurden die Zellen sofort in auf 37 °C vorgewärmtem Medium ausgesät und innerhalb von 24 Stunden der erste Mediumwechsel vorgenommen, um das zelltoxische DMSO zu verdünnen.

– Kultivierung, Subkultivierung und Mediumwechsel

Bis zur Subkonfluenz (etwa 90 % Konfluenz) gewachsene Zellen wurden zur Ablösung vom Boden der Zellkulturflasche – nach Dekantieren des Überstandes und zweimaligem Spülen mit 5 mL sterilem, auf 37 °C vorgewärmtem PBS – mit ebenfalls zuvor auf 37 °C erwärmter Trypsin/EDTA-Lösung versetzt und für zwei bis drei Minuten im Brutschrank inkubiert. Bei der Zelllinie EA.hy926 wurden dazu 2,5 mL, bei den IMR-90 Zellen nur 1 mL der Trypsin-Lösung verwendet, wobei jeweils mit PBS auf 5 mL aufgefüllt wurde, um eine zuverlässige Benetzung der gesamten Zellschicht zu gewährleisten. Weitere mechanische Einflüsse wie Schlagen oder Schütteln der Flasche wurden vermieden. Zum Abbrechen des Verdauungsvorgangs wurden 5 mL Vollmedium zugesetzt, durch mehrmaliges auf und ab Pipettieren sorgfältig durchmischt und die Flächen der Zellkulturflasche gespült. EA.hy926 wurden zur Subkultivierung im Verhältnis 1:10 in eine neue Zellkulturflasche mit zuvor auf 37 °C temperiertem Vollmedium eingespült, IMR-90 im Verhältnis 1:3.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und unter 5 %iger CO₂ Atmosphäre zur Einhaltung eines konstanten pH-Werts des Kulturmediums. Letzteres

wurde in Abhängigkeit des Zellwachstums alle zwei bis drei Tage gewechselt, wofür altes Medium entfernt und durch frisches Medium gleichen Volumens ersetzt wurde.

– Zellzählung mit Vitalitätstest

Trypsinierte Zellen wurden in ein steriles 50 mL Zentrifugenröhrchen aus Kunststoff überführt und bei 1200 RPM (etwa 300 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das zurückbleibende Zellpellet mit frischem Medium gewaschen und resuspendiert. Zur Zellzählung mit Vitalitätstest wurde ein Teil der Zellsuspension entnommen, mit einem oder vier gleichen Teilen Trypanblau Lösung gemischt und in einer Neubauerkammer ausgezählt. Vier Felder der Zählkammer wurden durch Betrachtung unter dem Mikroskop mäanderförmig ausgezählt, wobei linke und obere Ränder zur Vermeidung von Doppeltzählungen ausgespart wurden. Die Zellzahl wurde nach *Fml. 8* berechnet.

$$\text{Fml. 8} \quad \text{Zellen/mL} = M \cdot V \cdot 10000$$

Mit:

M= Mittelwert der vier ausgezählten Felder

V = Verdünnungsfaktor aus verdünnen der Zellsuspension mit Trypanblau Lösung (zwei- oder fünffach)

Der Vitalitätstest erfolgte durch separate Zählung und Unterscheidung heller lebender Zellen, die durch den Farbstoff Trypanblau aufgrund intakter Zellwände nicht angefärbt wurden, von den dunkelblau gefärbten toten Zellen, deren defekte Zellwände der Anfärbung keine Barriere mehr waren.

4.3 Schrittmachermodell zur elektrischen Reizung für *in-vitro* Versuche

Für die *in-vitro* Versuche zur elektrischen Reizung wurde von der Firma BIOTRONIK ein eigens zu diesem Zweck angefertigter Pulsgenerator zur Verfügung gestellt. An diesen konnten zwei Verteiler angeschlossen werden, die beide im Stande waren jeweils bis zu sechs Elektroden mit Strom zu versorgen (*siehe Abb. 67 für genauen Aufbau eines Verteilers*). Der Pulsgenerator sendete elektrische Impulse in einer für implantierbare Schrittmacher üblichen Größenordnung aus. Die Impulshöhe betrug 1 V bei einer Impulsdauer von 0,5 ms und einer Periodendauer von einer Sekunde (also einer Frequenz von 1 Hz). Das Gerät war zusätzlich mit einer grünen LED als Betriebsleuchte, welche die Pulsfrequenz anzeigte, und einer roten LED Warnleuchte, die ein Unterschreiten des

voreingestellten Impedanzwiderstandes von 25Ω bei Betrieb von zwölf Elektroden zu jeweils 300Ω signalisierte.

Die eingesetzten Elektroden waren implantierbare Herzschrittmacherelektroden des Typs Siello T (siehe Abb. 68, Nummern im Text beziehen sich auf Abbildung), ausgestattet mit passiver Verankerung und Placebo-LTSC (3), sofern nicht explizit abweichend erwähnt. Die Elektroden konnten durch entsprechenden Anschluss der Verteiler an den Pulsgenerator entweder uni- oder bipolar verwendet werden. In bipolarer Verwendung (Elektrodenanordnung A) wurde der Kontakt an der Elektrodenspitze (*Tip*, 1) als Plus-Pol und der Kontakt oberhalb des LTSC (*Ring*, 2) als Minus-Pol geschaltet. Für den unipolaren Einsatz waren 2 Elektroden notwendig (Elektrodenanordnung B), wobei nur die *Tips* geschaltet wurden, davon einer als Plus- der andere als Minus-Pol. Der *Ring* blieb hierbei ohne Verwendung (für weitere Informationen zu Elektroden und deren Anordnungen siehe Abschnitt 4.2 im Allgemeinen Teil B und dortige Abb. 32).

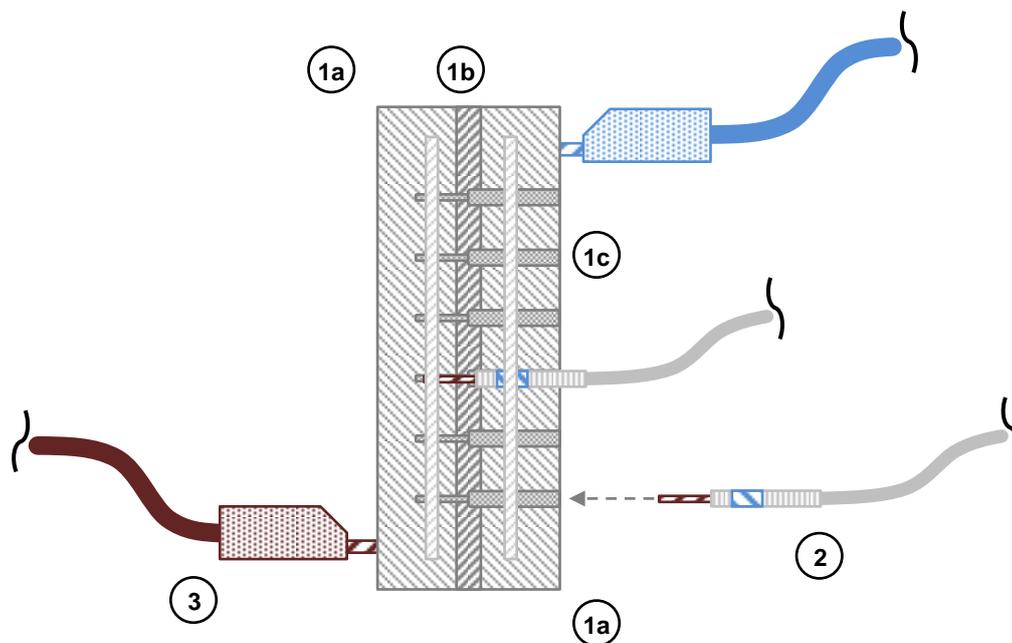


Abb. 67: Schema des Verteilers zum Anschluss der Siello T Elektroden an den Pulsgenerator. Der Verteiler bestand aus zwei Messingblöcken (1a), die durch eine Isolationsschicht (1b) nichtleitend verbunden waren. In Ausfräsungen auf den Blöcken (1c) konnten bis zu sechs Elektrodenstecker (2) eingelegt werden. Die Stecker wurden mittels Edelstahlschienen auf dem Verteiler fixiert und leitend mit den jeweiligen Polen verbunden. Über 4 mm Bananen-Stecker (3) wurde der Verteiler an den Pulsgenerator angeschlossen.

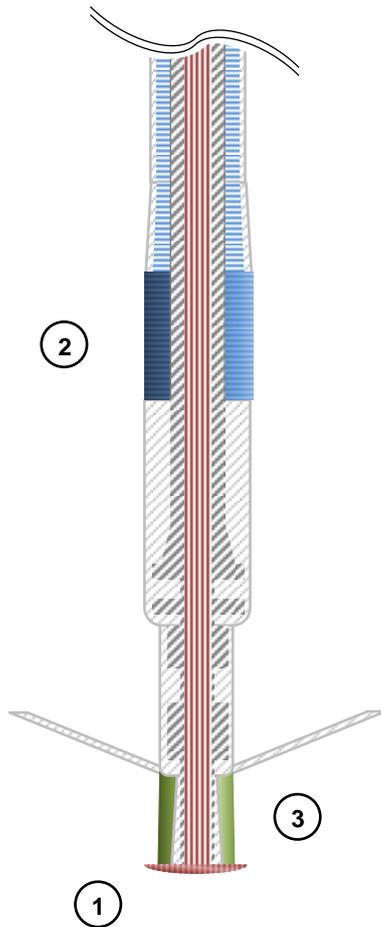


Abb. 68: Schematischer Querschnitt einer Siello T Elektrode, wie sie in den Zellkulturversuchen zum Einsatz kam. Die gesamte Elektrodenanordnung bestand aus Kontakten an *Tip* (1, rot, Kathode) und *Ring* (2, blau, Anode) und waren über konzentrisch verlaufende Leitungsbahnen (*Ring*, blau und *Tip*, rot) mit einem zwei-poligen Stecker verbunden (nicht dargestellt). Bei bipolarer Verwendung wurde der Stromkreis über das Zellkulturmedium, das beide Kontakte vollständig benetzte, geschlossen. *Tip* wurde als Stimulationskontakt (-) geschaltet, *Ring* als Gegenkontakt (+). Bei unipolarer Verwendung wurde der *Ring* nicht verwendet und stattdessen eine zweite Elektrode, deren *Tip* als Gegenkontakt geschaltet war, in den Versuch eingebracht. Der Teil unterhalb des *Ring* stellt den fertig montierten LTSC, mit dem Glucocorticoid-haltigen Collar (3, grün) am unteren Ende, dar. Auf den verwendeten Placebo-Elektroden waren keine Collar montiert. Schema nicht maßstabsgetreu.

Alle weiteren für den Versuchsaufbau notwendigen Spezialanfertigungen zeigen die untenstehenden *Abb. 69* und *Abb. 70*. Die Versuchsanordnung wird zusätzlich durch die schematische *Abb. 31* in Abschnitt 4.2 im Allgemeinen Teil B verdeutlicht.

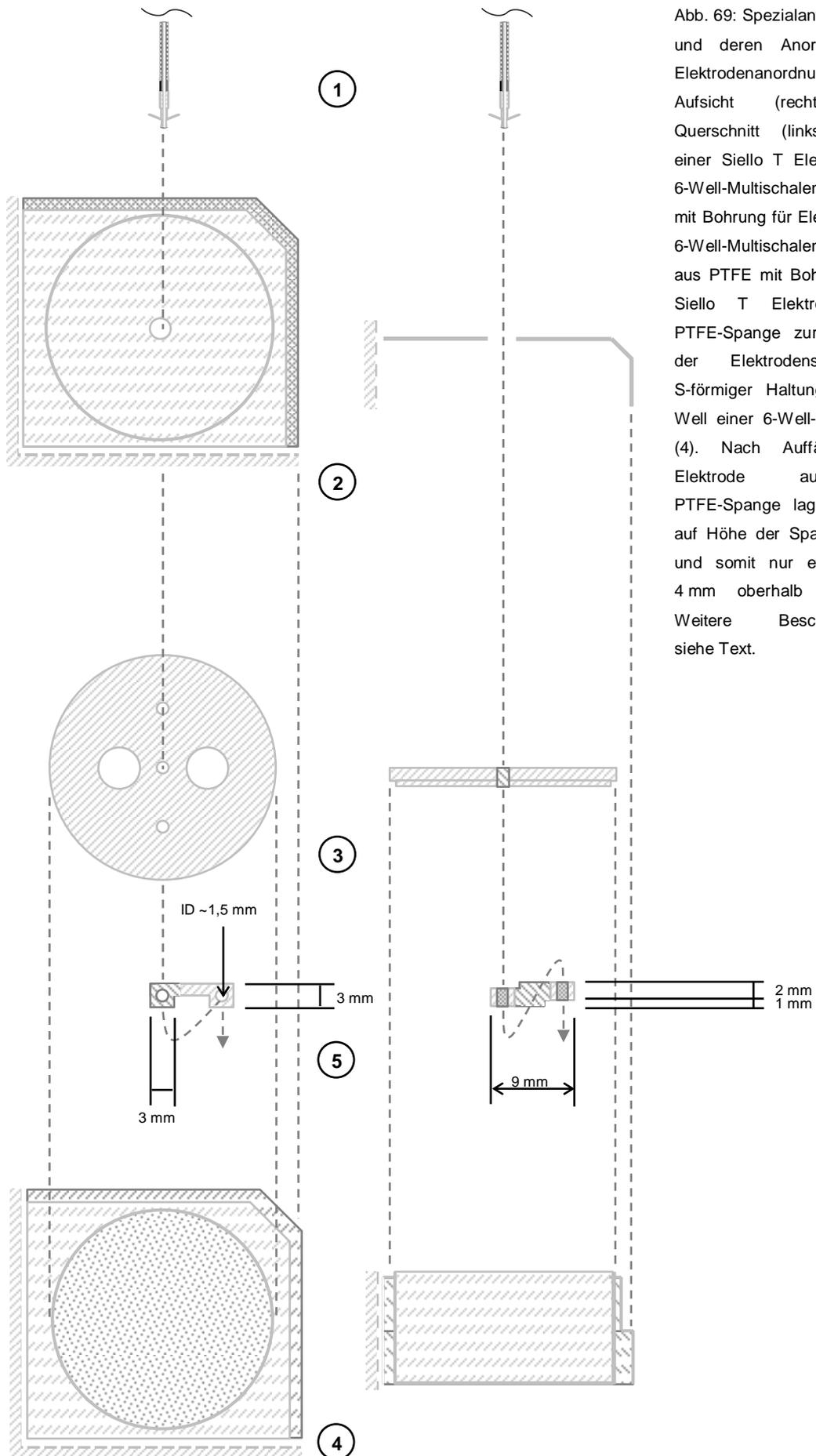


Abb. 69: Spezialanfertigungen und deren Anordnung für Elektrodenanordnung A in Aufsicht (rechts) und Querschnitt (links). Spitze einer Siello T Elektrode (1), 6-Well-Multischalen-Deckel mit Bohrung für Elektrode (2), 6-Well-Multischalen-Adapter aus PTFE mit Bohrungen für Siello T Elektroden (3), PTFE-Spange zur Fixierung der Elektrodenspitze in S-förmiger Haltung (5) und Well einer 6-Well-Multischale (4). Nach Auffädeln der Elektrode auf die PTFE-Spange lag der Ring auf Höhe der Spange selbst und somit nur etwa 3 bis 4 mm oberhalb des *Tip*. Weitere Beschreibungen siehe Text.

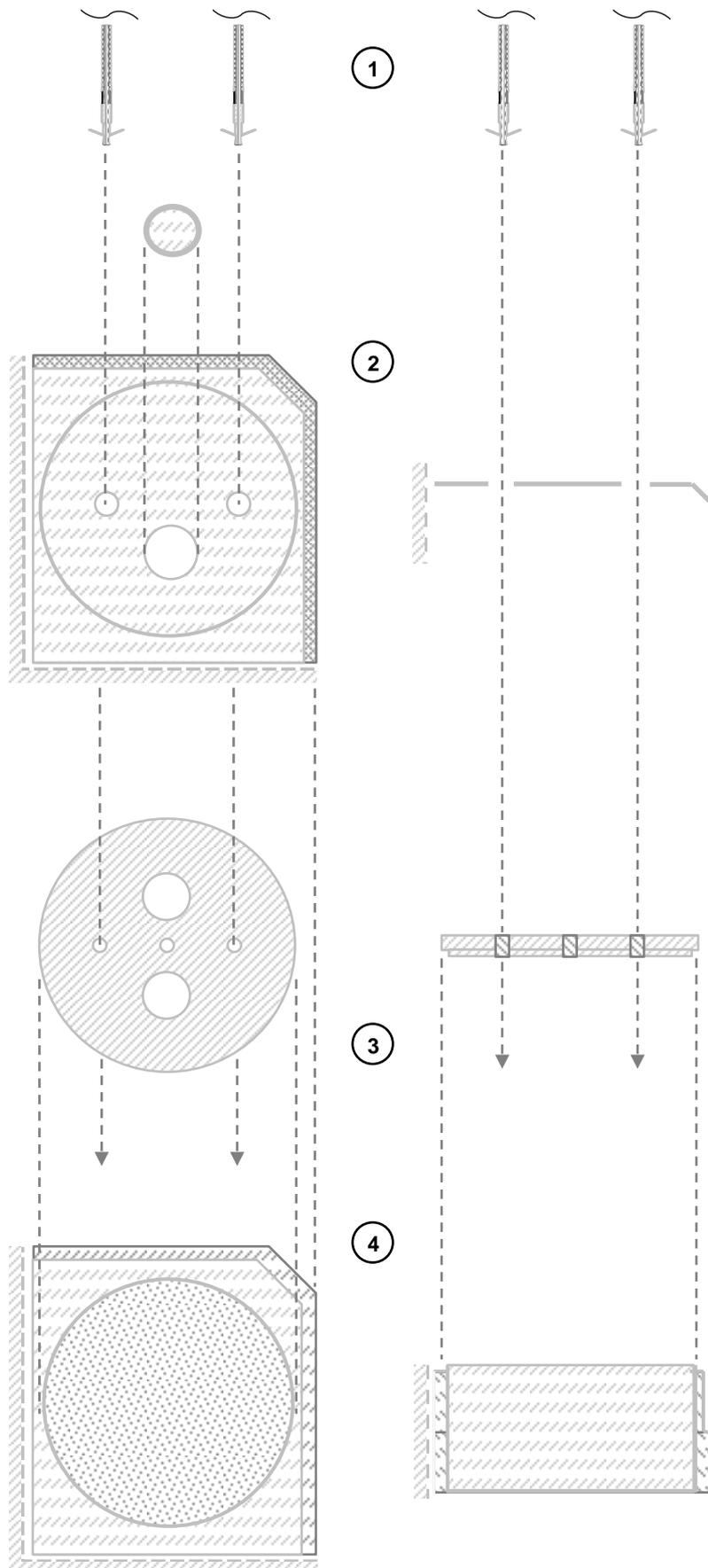


Abb. 70: Spezialanfertigungen und deren Anordnung für Elektrodenanordnung B in Aufsicht (rechts) und Querschnitt (links). Spitzen zweier Siello T Elektroden (1), 6-Well-Multischalen-Deckel mit Bohrung für Elektroden und Probenzug mit PP-Stopfen (nur Aufsicht) (2), 6-Well-Multischalen-Adapter aus PTFE mit Bohrungen für Siello T Elektroden (3) und Well einer 6-Well-Multischale (4). Nähere Beschreibungen siehe Text.

Als Halterung der Elektrode in der Zellkulturschale wurde der bereits für das Flussmodell aufgeführte 6-Well-Multischalen-Adapter aus PTFE verwendet (3, *Nummern beziehen sich auf Abb. 69 und Abb. 70*). Für Versuche mit Elektrodenanordnung A wurde die mittlere Bohrung (\varnothing 2,5 mm) zur Applikation der Elektroden verwendet. Zusätzlich wurden zwei weitere Bohrungen (\varnothing 2,5 mm) im Radius von 10 mm um den Mittelpunkt der Scheibe hinzugefügt, um das symmetrische Einbringen zweier Elektroden in Elektrodenanordnung B zu ermöglichen. Eine der beiden großen Bohrungen (\varnothing 6 mm) diente zum Ziehen von Proben (*relevant für Inhibitionsversuche, siehe jeweils Abschnitte 5 in diesem und im Allgemeinen Teil B*).

In Elektrodenanordnung A mussten beide Pole der Elektrode mit Zellkulturmedium benetzt sein, um den Stromkreis zu schließen. Um dies sicher gewährleisten zu können, wurde eine Spange aus PTFE entworfen (5, *nur in Abb. 69*), welche die Elektrodenspitze in einer S-förmigen Haltung fixierte. Der *Ring* nahm dadurch eine tief gelegene Position ein. Die Befüllung eines Wells der 6-Well-Multischale (4) mit 9 mL Medium genügte somit, um den Stromkreis zuverlässig zu schließen.

Die 6-Well-Multischale wurde zusätzlich mit einem Deckel (2) gegenüber der Umgebung im Inkubator abgeschlossen. Hierbei wurde ein Polycarbonat-Deckel einer 6-Well-Multischale dergestalt präpariert, dass dieser mit Bohrungen für die Applikation der Elektroden und zum Ziehen von Proben versehen wurde. Die dadurch verbleibende Öffnung über der Probenschale wurde wiederum mit einem Stopfen aus Polypropylen (2) verschlossen und konnte zum Probenzug abgenommen werden.

4.4 Durchführung der Versuche zur elektrischen Reizung

EA.hy926 Zellen wurden nach Zellzählung in einer Dichte von 3×10^5 Zellen/Well auf 6-Well-Platten ausgebracht und in 3 mL/Well Vollmedium bis zur Konfluenz kultiviert. Vor Einsatz in den Versuchen wurde das Medium abgesaugt, der Zellmonolayer mit zweimal mit 1 mL vorgewärmtem PBS gewaschen und wieder mit 3 mL/Well frischen Vollmediums befüllt.

Neben der eigentlichen Probe wurden eine Positiv-Kontrolle und zweierlei Negativ-Kontrollen mitgeführt. Als Positiv-Kontrolle wurden die Zellen mit dem Pyrogen LPS in einer Endkonzentration von 5 $\mu\text{g/mL}$ gereizt. Dies wurde ausgehend von einer Stammlösung der Konzentration 1 mg/mL in sterilem PBS zugesetzt. Der ersten Negativ-Kontrolle wurden keine weiteren Zusätze beigefügt und bestand somit lediglich aus dem Zellmonolayer mit Medium. Nach Zugabe des LPS zur Positiv-Kontrolle wurden alle Schalen mit weiteren 6 mL Vollmedium befüllt. Der Probe und der zweiten Negativ-Kontrolle wurden daraufhin Placebo-Elektroden, also voll funktionsfähige Elektroden ohne Collar (*siehe auch Abb. 68*), appliziert. Dazu wurden die Elektroden zuvor mit PTFE-Halterungen und -Spangen ausgerüstet, anschließend auf die Zellkulturschale

aufgesetzt und die Multi-Well-Platte zusätzlich mit dem Deckel verschlossen (*siehe auch Abb. 69 und Abb. 70*). Der *Tip*, an welcher sich der Plus-Pol der Elektrode befand, trat dabei mit dem Zellmonolayer in Berührung, wohingegen der oberhalb gelegene Minus-Pol am *Ring* frei im Medium hing und mit diesem vollständig benetzt war. Der hohe Füllstand der Zellkulturschalen war entscheidend dafür, dass eine Benetzung beider Pole der Elektroden stattfand und somit eine zuverlässige Stromversorgung gewährleistet wurde. Die Elektrode der Probe wurde über den Verteiler an den Pulsgeber angeschlossen (*für nähere Informationen zu Pulsgeber, Verteiler und Elektrode siehe Abschnitt 4.3*) und zusammen mit den Kontrollen gleichermaßen 24 Stunden lang bei 37 °C und einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die Elektrode der zweiten Negativ-Kontrolle wurde nicht an den Pulsgeber angeschlossen und diente lediglich zur Beobachtung einer Reizung, die möglicherweise bereits durch bloßes Einbringen der Elektrode als Fremdkörper und dadurch Beschädigung des Zellmonolayers hätte stattfinden können. Da die Placebo-Elektroden mehrfach verwendet werden mussten, jedoch mittels vorhandener Sterilisiertechniken nicht zu behandeln waren, wurden sie direkt vor Verwendung zur Desinfektion auf einer Länge über etwa 50 mm, von der Spitze an gemessen, für mindestens 15 Minuten in 70 % (V/V) Ethanol eingelegt und weitere 15 Minuten unter der Sterilbank trocknen gelassen.

Nach Ablauf der Versuchszeit von 24 Stunden wurden 1,5 mL der Überstände von Kontrollen und Probe in ein 2 mL Schraubröhrchen gefüllt, direkt auf Trockeneis gelegt und bis zur Analyse mittels ELISA bei -80 °C aufbewahrt. Der übrige Überstand wurde abgesaugt, die in den Schalen anhaftenden Zellen mit 750 µL Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und mittels Hämozytometer, unter Verwendung von Trypanblau-Lösung zur Kontrolle der Vitalität, ausgezählt (*für Trypsinierung und Zellzählung siehe Abschnitt 4.2*). Die erhaltene Zellsuspension wurde, genau wie die Proben, auf Trockeneis tiefgefroren und bei -80 °C eingelagert.

Die obige Versuchsdurchführung beschreibt den Aufbau mit einer bipolar geschalteten Elektrode, also Elektrodenanordnung A. Die Durchführung mit Elektrodenanordnung B geschah, bis auf folgende geringfügige Abweichungen, analog dazu. Den Schalen der Multi-Well-Platte wurden keine weiteren 6 mL Medium hinzugefügt und eine Montage der Elektroden auf PTFE-Spannen war ebenfalls nicht notwendig, da aufgrund der unipolaren Verwendung der Elektroden der Ring nicht mit Medium benetzt sein musste. Die Elektroden wurden, getrennt nach Polung über zwei separate Verteiler an den Pulsgeber angeschlossen, so dass der *Tip* einer Elektrode als Plus-Pol und der *Tip* der anderen als Minus-Pol geschaltet war.

4.5 Bestimmung ausgewählter Entzündungsmediatoren und des Wachstumsfaktors VEGF mittels Sandwich-ELISA

Für die Bestimmungen mittels Sandwich-ELISA aus Zellkulturüberständen wurde auf fertige ELISA-Kits zurückgegriffen. Die Kits für IL-6, IL-8, MMP-9, MCP-1 und VEGF stammten von RayBiotech.

Die Assays wurden nach Vorschriften des Herstellers durchgeführt und liefen wie nachfolgend in Kürze geschildert ab (*für die genaue Vorschrift sei auf die Herstellerangaben verwiesen*).

Die bei -80 °C gelagerten Proben wurden vor ihrem Einsatz in einem handwarmem Wasserbad rasch auf Raumtemperatur gebracht und in der Zentrifuge bei 1000 x g 30 Sekunden lang abgeschleudert, um grobe Zellfragmente abzutrennen. Insofern nötig, wurden die Proben mit Assay-Puffer weiter verdünnt, um Messwerte im Kalibrierbereich zu erhalten. Alle benötigten Reagenzien und Materialien wurden vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht, der einem Kit beiliegende lyophilisierte Standard, der biotinylierte Antikörper sowie das HRP-Streptavidin wurden zusätzlich vor Gebrauch in der Zentrifuge abgeschleudert. Zur Rekonstitution wurden der biotinylierte Antikörper und die Standardsubstanz in Assaypuffer gelöst, alle weiteren als Konzentrat vorliegenden Reagenzien wurden ebenfalls mit Assaypuffer auf die geforderte Konzentration eingestellt. Von der Stammlösung des Standards ausgehend wurde eine Verdünnungsreihe zur Kalibrierung erstellt, welche zusammen mit den Proben sodann auf die ELISA-Platte aufgetragen und für gewöhnlich bei Raumtemperatur 2,5 Stunden lang im Dunklen unter leichter Schüttelbewegung inkubiert wurde. Anschließend erfolgte ein Waschschrift, bei dem der Überstand verworfen und die Näpfe der ELISA-Platte viermal wiederholt mit Waschpuffer von überschüssigem und ungebundenem Reagenz gereinigt wurden. Hernach erfolgte die Zugabe des biotinylierten Antikörpers und einstündiger Inkubation unter gleichen Bedingungen, wie zuvor bereits erwähnt. Nach erneutem Waschschrift, wurde HRP-Streptavidin zugegeben und erneut für eine Dauer von 45 Minuten inkubiert. Ein letzter 30 Minuten langer Inkubationsschritt schloss sich an die Zugabe des TMB-Substrats an, welcher jedoch zunächst eine abermalige Waschprozedur der ELISA-Platte voraus ging. Nach Ablauf der Zeit wurde zum nun je nach Analytkonzentration mehr oder weniger blau gefärbten Überstand Stop-Lösung gegeben und die dabei nach gelb umschlagenden Überstände bei 450 nm auf dem Plattenlesegerät vermessen.

Die Auswertung der Messwerte erfolgte mit der Software Origin 8.6G (OriginLab Corporation, Northampton, USA) und Microsoft Excel[®] (Microsoft Office Professional Plus 2010, Microsoft Corporation, Redmond, USA). Anhand der Absorptionen der Standardreihe wurde eine Kalibrierfunktion erstellt, deren Kurvenanpassung eine 5-Parameter-Logistik-Funktion zugrunde lag. Anhand der Kalibrierfunktion und der gemessenen Absorptionen der Proben wurden die Konzentrationen derselben berechnet.

Alle Messwerte wurden abschließend auf die Zellzahl aus den jeweiligen Versuchen normiert und als pg/mL pro 100.000 Zellen ausgedrückt.

5 *In-vitro* Vergleich der Bioaktivitäten der eingesetzten Glucocorticoide nach Freisetzung aus der Polymermatrix

5.1 Verwendete Arbeitsmittel

Alle verwendeten Arbeitsmittel, außer dem Wippschüttler Mini Rocker-Shaker MR-1 (BioSan, Riga Lettland), wurden in einem der vorigen Abschnitte bereits erwähnt (*siehe insbesondere Abschnitt 4.1*).

5.2 Glucocorticoid-Stammlösung

Es wurden Stammlösungen der Konzentration 1,33 mg/mL DXA, GCX beziehungsweise BDP in DMSO hergestellt und dergestalt mit DMSO verdünnt, dass jeweils 10 µL der Verdünnungen den berechneten Tagesgesamtdosen von 119 ng/mL DXA, 86 ng/mL GCX beziehungsweise 458 ng/mL BDP entsprachen (*für Berechnung der Tagesgesamtdosis siehe Abschnitt 5.2 im Allgemeinen Teil B*). Die so hergestellten Verdünnungen wurden wiederum mit DMEM im Verhältnis 1:10 vermengt, womit 100 µL der Lösung den entsprechenden Tagesgesamtdosen entsprachen, die verteilt über den Versuchszeitraum inkrementell eingesetzt wurden (*siehe Tab. 4*).

Für die Kontrollen wurde eine DMSO-Verdünnung in DMEM hergestellt, welche den gleichen Gehalt an DMSO aufwies, wie die fertigen Glucocorticoid-Lösungen.

5.3 Vergleich der Bioaktivitäten von DXA, GCX und BDP nach Freisetzung aus LTSC

Zum Vergleich der Bioaktivitäten von DXA, GCX und BDP (beziehungsweise deren entsprechenden aktiven Metabolite) wurden Versuche auf zwei verschiedene Art und Weisen durchgeführt. Die Arzneistoffe wurden entweder inkrementell über 24 Stunden hinweg dosiert, um eine Freisetzung aus LTSC zu simulieren, oder es wurden LTSC eingesetzt, aus denen die Steroide direkt an den Überstand abgegeben wurde.

5.3.1 Durchführung des Bioaktivitätsvergleichs bei inkrementeller Aufdosierung der Glucocorticoide

Zellen der Zelllinie EA.hy926 wurden wie unter Abschnitt 4.4 beschrieben ausgesät und bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Konfluente Zellen wurden zweimal mit jeweils 1 mL auf

37 °C vorgewärmtem PBS gewaschen und anschließend mit 2,9 mL frischem Vollmedium überschichtet. Proben und Positiv-Kontrolle wurden LPS zu 5 µg/mL, ausgehend von einer Stammlösung zu 1 mg/mL in PBS, zugesetzt und durch vorsichtiges Schwenken der Zellkultur-Platte durchmischt. Das Medium für die Negativ-Kontrolle blieb frei von LPS, stattdessen wurde das entsprechende Volumen PBS zugegeben. Nach einer Stunde Inkubationszeit im Brutschrank wurde mit der Aufdosierung der Glucocorticoide bis zur entsprechenden Tagesgesamtosis begonnen. Weitere Zugaben erfolgten nach vier, acht, zwölf und 24 Stunden, so dass nach dem letzten Dosierungsschritt die gesamte Tagesdosis zur Verfügung stand (siehe Tab. 4, für Berechnung der benötigten Konzentrationen siehe Abschnitt 5.2.2 im Allgemeinen Teil B, für Lösungen der Glucocorticoide siehe Abschnitt 5.2). Den Kontrollen wurde an Stelle der Glucocorticoid-Lösung das gleiche Volumen an DMSO-Verdünnung in DMEM zugesetzt. Alle Ansätze enthielten somit zu jedem Zeitpunkt den gleichen Gehalt an DMSO, jedoch stets <1 %. Nach Zugabe der letzten Dosis, also 24 Stunden nach Beginn des Versuchs, wurden nach vorsichtigem Durchmischen Proben zu 1 mL gezogen. Die Glucocorticoid-Konzentrationen belieben somit durch den Probenzug unbeeinflusst. Weitere Proben zu 1 mL wurden nach 48 Stunden gezogen. Alle Proben wurden direkt auf Trockeneis tiefgefroren und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Nach Erhalt der letzten Probe wurden die Zellen abgelöst, gezählt (siehe Abschnitt 4.4) und wie die Proben tiefgefroren und eingelagert.

Tab. 4: Schema der inkrementellen Zugabe der Glucocorticoide DXA, GCX und BDP über 24 Stunden. Kontrollen wurde die entsprechende Menge an DMSO ohne Glucocorticoid zugegeben. Die Zugabe erfolgte ausgehend von den unter Abschnitt 5.2 beschriebenen Lösungen.

Zeit [h]	Volumen/Well		Glucocorticoid-Konzentrationen/Well		
	Zugabe [µL]	Gesamtvolumen [µL]	DXA [ng/mL]	GCX [ng/mL]	BDP [ng/mL]
0	0,0	2900,0	0	0	0
1	19,9	2919,9	24	18	94
4	20,1	2940,0	49	35	187
8	16,9	2956,9	69	50	265
12	13,1	2970,0	84	61	324
24	30,0	3000,0	119	86	458

5.3.2 Durchführung des Bioaktivitätsvergleichs bei direkter Freisetzung der Glucocorticoide aus LTSC

– Freisetzungsmedium

Das Freisetzungsmedium bestand aus frischem Vollmedium, welches um bovines Serumalbumin (BSA) in einer Endkonzentration von 50 bis 60 mg/mL erweitert wurde. Zu diesem Zweck wurden 15 g BSA in 250 mL frischem DMEM gelöst und durch einen Filter der Porengröße 0,22 μm sterilisiert. Weitere Zusätze zur Herstellung vollständigen Vollmediums wurden anschließend in den entsprechend erforderlichen Mengen zugegeben (siehe Abschnitt 4.2), so dass sich als Endvolumen schließlich 270 mL Freisetzungsmedium ergaben. Der Proteingehalt des Freisetzungsmediums wurde sodann mittels Bradford-Assay überprüft (siehe Abschnitt 2.6.2). Die Osmolalität des Mediums von ursprünglich 340 mosm/kg H_2O änderte sich durch den Protein-Zusatz um etwa 1 mosm/kg H_2O , womit ein dadurch entstandener Einfluss auf die Zellen praktisch ausgeschlossen werden konnte.

– Durchführung

Der Versuch bestand aus DXA-, GCX- und BDP-Proben, sowie Negativ-Kontrollen, Kontrollen für das Freisetzungsmedium und Positiv-Kontrollen. (Weitere Informationen zum Versuchsaufbau finden sich unter Abschnitt 5.2 im Allgemeinen Teil B)

Zellen der Zelllinie EA.hy926 wurden wie unter Abschnitt 4.4 beschrieben ausgesät und bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Nach Erreichen des konfluenten Zustands wurden die Zellen zweimal mit jeweils 1 mL 37 °C warmem PBS gewaschen und anschließend mit 9 mL frischem Medium überschichtet. Für die Negativ-Kontrolle wurde Vollmedium verwendet, für alle weiteren Kontrollen und Proben wurde das speziell für den Versuch angesetzte Freisetzungsmedium eingesetzt (siehe oben). Proben und Positiv-Kontrolle wurden LPS zu 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ausgehend von einer Stammlösung zu 1 mg/mL in PBS, zugesetzt und durch vorsichtiges Schwenken der Zellkultur-Platte durchmischt. Der Negativ-Kontrolle sowie der Kontrolle des Freisetzungsmediums wurde, anstatt des LPS, das entsprechende Volumen an reinem PBS zugegeben. Die Schalen der Positiv-Kontrolle und der Proben wurden mit 6-Well-Multischalen-Adapter versehen und anschließend, bereits zuvor mit Halterungsstiften ausgerüstete LTSC eingesetzt. Für die Positiv-Kontrolle wurde ein LTSC mit Placebo-Collar verwendet, die Collar der LTSC für die Proben enthielten jeweils das entsprechende Glucocorticoid (für weitere Informationen bezüglich verwendeter Collar und LTSC siehe Abschnitte 1.3.1 und 1.4.1).

Die 6-Well-Platte wurde verschlossen und im Brutschrank auf dem Wippschüttler (Frequenz 30 min^{-1} , Neigungswinkel $\pm 7^\circ$) bei 37 °C 48 Stunden lang inkubiert. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden 3 mL der Überstände entnommen und 1,5 mL davon

als Proben sofort auf Trockeneis tiefgefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80 °C. Entnommenes Volumen wurde durch frisches Voll- beziehungsweise FreisetzungsmEDIUM ersetzt. Nach 48 Stunden Inkubationszeit wurden erneut Proben zu 1,5 mL gezogen und wie beschrieben gefroren und eingelagert. Nach Versuchsende wurden die LTSC entfernt und bei -20 °C für etwaige Untersuchungen zurückgestellt. Die Zellen wurden daraufhin trypsiniert, gezählt (*siehe Abschnitt 4.2*) und ebenfalls bei -80 °C gefroren und gelagert.

5.3.3 Bestimmung der Entzündungsmediatoren IL-6 und MMP-9

Die Bestimmungen der Konzentrationen der Entzündungsmediatoren IL-6 und MMP-9 aus den Proben des vorangegangenen beschriebenen Versuchs wurden wie unter Abschnitt 4.5 beschrieben durchgeführt und ausgewertet.

6 Einfluss von Glucocorticoiden auf die Zellproliferation der humanen Zelllinien EA.hy926 und IMR-90

6.1 Verwendete Arbeitsmittel

Alle verwendeten Arbeitsmittel, insofern hier nicht gesondert aufgeführt, wurden in einem der vorigen Abschnitte bereits erwähnt (*siehe insbesondere Abschnitt 4.1*).

– Substanzen und Reagenzien

Substanz/Reagenz	Abkürzung	Bezugsquelle
2-Methoxyestradiol	-	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Fluoreszeindiacetat	-	
Propidiumiodid	-	
CyQuant® Cell Proliferation Assay Kit	-	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)

– Material und Geräte

Bezeichnung	Hersteller
96-Well-Platte Nunclon™	Nunc (Roskilde, Dänemark)
12-Well-Platte CELLSTAR®	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Tecan Infinite® 200 PRO NanoQuant mit i-control™ Micro Plate Reader Software (Version 1.10)	Tecan Group (Männedorf, Schweiz)
Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Kamera AxioCam MRm3	
Objektiv A-Plan 10x/0.25 Ph1	

6.2 Stammlösungen

Glucocorticoid-Stammlösungen der Konzentration 1,33 mg/mL in DMSO wurden auf Konzentrationen von 357 ng/mL DXA, 258 ng/mL GCX beziehungsweise 1375 ng/mL BDP mit DMEM weiter verdünnt. So führten identische Volumina jener Verdünnungen zu den, je nach Glucocorticoid, unterschiedlichen erforderlichen Konzentrationen in den Versuchsansätzen (*siehe Tab. 5*). 2-Methoxyestradiol wurde zu einer Konzentration von 1 mg/mL (3,3 mM) in DMSO gelöst und mit DMEM zehnfach weiter verdünnt. Für die Negativ-Kontrolle wurde eine Mischung von 10 % DMSO in DMEM hergestellt.

6.3 Durchführung des Wachstumsversuchs

Die Endothelzellen EA.hy926 wurden nach Zellzählung mittels Hämozytometer in einer Dichte von 1000 Zellen/Well auf 96-Well-Platten ausgesät und mit 200 µL Vollmedium versehen. IMR-90 Fibroblasten wurden in einer Dichte von 2500 Zellen/Well ausgesät. Positiv-Kontrollen wurde zu Beginn 2-Methoxyestradiol als Proliferationsinhibitor in einer Konzentration von 10 µM beigemischt und mit dem täglichen Mediumwechsel erneuert. Die Zugabe der Glucocorticoide DXA, GCX und BDP erfolgte, ausgehend von oben geschilderten Verdünnungen der Stammlösungen (*siehe Abschnitt 6.2*), nach dem in *Tab. 5* gezeigten Schema (*für Berechnung der benötigten Konzentrationen siehe Abschnitt 6.2 im Allgemeinen Teil B*). Negativ-Kontrollen wurde täglich und mengenmäßig den Positiv-Kontrollen entsprechend DMSO-haltiges Zellkulturmedium zugesetzt. Die Ansätze wurden sodann im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) für eine Dauer von ein bis sieben Tagen inkubiert.

Die Probennahme fand alle 24 Stunden statt, indem jeden Tag eine Platte mit den entsprechend lange inkubierten Zellen aus dem Brutschrank entnommen wurde. Das Zellkulturmedium wurde mit der Multikanalpipette abgenommen, restliches in den Schalen der 96-Well-Platte zurückgebliebenes Medium durch behutsames Umdrehen der Platte und sanftes Ausschlagen auf ein Zellstofftuch entfernt und die Platte mit samt der Zellen bei -80 °C bis zur Analyse mittels CyQuant[®] Assay eingefroren. Bei allen Ansätzen, die weiter inkubiert wurden, wurden 100 µL des Zellkulturmediums durch frisches Vollmedium ersetzt. Dies und die Zunahme des Gesamtvolumens des Überstands durch die Aufdosierung wurden bei allen Dosisberechnungen berücksichtigt. Die Entnahme der letzten Probe erfolgte nach 168 Stunden (sieben Tage).

Tab. 5: Schema der inkrementellen Zugabe der Glucocorticoide DXA, GCX und BDP über sieben Tage. Negativ- und Stimulations-Kontrolle wurde die der Positiv-Kontrolle entsprechende Menge an DMSO zugegeben. Die Zugabe erfolgte ausgehend von den unter Abschnitt 6.2 beschriebenen Lösungen.

Zeit [h]	Volumen/Well		Glucocorticoid-Konzentrationen/Well		
	Zugabe [μ L]	Gesamtvolumen [μ L]	DXA [ng/mL]	GCX [ng/mL]	BDP [ng/mL]
0	6,9	206,9	119	86	458
24	6,5	213,4	168	121	648
48	7,4	220,8	206	149	794
72	8,3	229,1	238	172	916
96	9,1	238,2	266	192	1025
120	9,9	248,1	291	210	1122
144	10,7	258,8	315	227	1212

6.3.1 Bestimmung der Zellzahl mittels CyQuant[®] Assay

Der Fluoreszenz-Assay wurde gemäß den Anweisungen im Handbuch des fertigen Kits durchgeführt, wie nachfolgend in Kürze geschildert.

Das 100-fache Konzentrat des Lyse-Puffers wurde mit Milli-Q-Wasser auf die geforderte Konzentration eingestellt und die DMSO-haltige Stammlösung des Fluoreszenzfarbstoffes CyQuant[®] GR mit dem fertigen Puffer wie gefordert im Verhältnis 1:400 verdünnt. Für alle Verdünnungsschritte wurde darauf geachtet Kunststoffgefäße zu verwenden, da der Farbstoff für gewöhnlich starke Adsorption an Glasoberflächen zeigt. Die Lösungen wurden vor ihrem Einsatz für den Assay frisch angesetzt. Die auf 96-Well-Platten tiefgefrorenen Zellen wurden sodann auf Raumtemperatur aufgetaut, mit 200 μ L der vorbereiteten Mischung aus Lyse-Puffer und CyQuant[®] GR Farbstoff versetzt und etwa drei Minuten lang im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Direkt im Anschluss wurde die Fluoreszenz bei 485 nm Anregungswellenlänge und 535 nm Emissionswellenlänge vermessen.

Zur Quantifizierung der Zellzahl wurde eine Standardkurve, basierend auf einer Zellsuspension bekannter Anzahl an EA.hy926 Zellen, erstellt. Dazu wurden eigens zu diesem Zwecke kultivierte Zellen, nach deren Ablösung durch Trypsinieren, mittels Hämozytometer ausgezählt (*siehe Abschnitt 4.2*) und 80.000 Zellen in ein Kryoröhrchen überführt. Nach Zentrifugation der Zellsuspension (200 x g, 5 min) wurde der Überstand

dekantiert und das zurückbleibende Zellpellet bei -80 °C bis zum Einsatz als Kalibrierstandard tiefgefroren. Nach Auftauen auf Raumtemperatur wurden die Zellen zur weiteren Zellyse mit 2 mL des CyQuant® GR haltigen Lyse-Puffers versetzt und durch kurzes Mischen auf dem Vortex resuspendiert. Die auf den Zusatz des Fluoreszenzfarbstoffs folgenden Schritte wurden zügig ausgeführt, um eine zu den Proben vergleichbare Inkubationszeit der Zellen mit Lyse-Puffer und Farbstoff von etwa drei Minuten gewährleisten zu können. Aus dieser Zellsuspension wurde eine Verdünnungsreihe von 200 bis 20.000 Zellen/Well erstellt, wobei auf 200 μL fehlendes Volumen mit der Mischung aus Lyse-Puffer und Fluoreszenzfarbstoff ergänzt wurde. Zusätzlich wurde ein Leerwert bestehend aus reinem Puffer-Farbstoff-Gemisch mitgeführt. Die Verdünnungsreihe wurde, wie die Proben, bei 485/535 nm vermessen. Zur Auswertung wurde die Fluoreszenz gegen die Zellzahl aufgetragen und eine lineare Kalibriergerade erstellt.

6.4 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von IMR-90 Fibroblasten in direkter Umgebung Steroid-freisetzender Collar im Vergleich zu Placebo-Collar

6.4.1 Vorbereitung der Zellen

Der hohlzylindrische Collar (passend zu Siello T Elektroden) wurde vorsichtig mit Pinzetten so in Schalen einer 12-Well-Platte gelegt, dass die Zylinderachse vertikal ausgerichtet war. Zur Fixierung des Collars und als Matrix für dreidimensionales Zellwachstum wurde ein Kollagen-Gel in die Zellkulturschale eingegossen. Die Herstellung des Kollagen-Gels erfolgte wie in Abschnitt 3.2 beschrieben. 500 μL der Gel-Mixtur wurden in eine Zellkulturschale gegossen. Eine gleichmäßige Bedeckung der Schale und Einbettung des Collars wurde dabei durch sorgsames Schwenken der Multischale erreicht, wobei darauf zu achten war, dass der Collar in seiner aufrechten Position stehen blieb. Kippte er dennoch auf die Seite, wurde er sofort mit einer Pinzette wieder aufgerichtet, bevor die allmähliche Erstarrung des Gels eine Korrektur nicht mehr zuließ. Nachdem das Kollagen nach etwa einstündiger Inkubationszeit bei 37 °C eine feste Konsistenz erreicht hatte, wurde das Gel zweimal mit 750 μL auf 37 °C vorgewärmtem, sterilem PBS gewaschen und anschließend IMR-90 Fibroblasten (5×10^4 Zellen/Well) in 750 μL Vollmedium ausgebracht. Die Zellen wurden kultiviert, bis sie in den vom Collar entfernt gelegenen Bereichen homogen konfluent gewachsen waren. Anschließend wurden die Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet.

6.4.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die konfluent gewachsenen Zellen wurden (EA.hy926 und IMR-90) mit Fluoreszeindiacetat und Propidiumiodid gefärbt. Von Fluoreszeindiacetat wurde eine 5 mg/mL Stammlösung in Aceton hergestellt, von Propidiumiodid eine 2 mg/mL Stammlösung in Milli-Q-Wasser. Zur Färbung der Zellen wurde zunächst das überstehende Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen vorsichtig mit 500 μ L PBS gewaschen. Anschließend wurden 500 μ L Färbelösung, bestehend aus 25 μ g/mL Fluoresceindiacetat und 200 μ g/mL Propidiumiodid in PBS, zu den Zellen gegeben und eine Minute lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbelösung wurde hernach wieder entfernt und 500 μ L PBS auf die Zellen gegeben, welche anschließend bereit für die mikroskopischen Aufnahmen waren.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Farbstoffe in einem Spektrum von 450 bis 490 nm angeregt und Emissionen im Spektrum von 500 bis 550 nm detektiert. Die Aufnahmen wurden mit der Software ZEN 2011 Version 1.0.1.0 (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet und bearbeitet.

7 Identifizierung und Herstellung der Abbauprodukte 17-Oxo-Dexamethason und 9,11-Epoxy-Beclomethason

7.1 Verwendete Arbeitsmittel

Insofern nachfolgend nicht aufgeführt, wurden alle verwendeten Arbeitsmittel bereits in vorigen Abschnitten beschrieben (*siehe insbesondere Abschnitte 1.1, 2.1 und 3.1*).

– Substanzen und Reagenzien

Substanz/Reagenz	Abkürzung	Bezugsquelle
Petrolether (Petroleumbenzin 40 bis 65)	-	Chemikalienausgabe der Fakultät
Essigsäureethylester p.a.	-	
Kieselgel 60 (Korngröße 0,04 bis 0,063)	-	
Calciumchlorid	CaCl ₂	
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	
Folien für Dünnschichtchromatographie (200x200 mm, Aluminium, Kieselgel 60, F ₂₅₄)	-	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Deutero-Chloroform	CDCl ₃	Euriso-Top (Saint-Aubin Cedex, Frankreich)
Deutero-Dimethylsulfoxid	DMSO-d ₆	
Hank´s Balanced Salt Solution (ohne Phenolrot)	HBSS	Biochrom (Berlin, Deutschland)

– **Material und Geräte**

Gerätebezeichnung	Hersteller
Glassäule für Säulenchromatographie mit Rundkolben (Gesamtlänge ~500 mm, Ø 15 mm)	
Erlenmeyerkolben (500 mL)	
Rundkolben (250 mL)	
Glaskammern für Dünnschichtchromatographie	Brand (Wertheim, Deutschland)
Reagenzgläser	
Exsikkator	
Rundfilter	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Rotationsverdampfer Rotavapor® RE111	Büchi (Flawil, Schweiz)
Schmelzpunktmessgerät Stuart™ Melting Point Apparatus SMP3	Bibby Scientific (Stone Staffordshire, UK)
Braunglas-Vials für LC/MS mit Schraubkappe und Septum	Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland)
NMR-Messröhrchen	Schott (Mainz, Deutschland)

7.2 Identifizierung der unbekannt Abbauprodukte in Humanplasma als 17-Oxo-Dexamethason und 9,11-Epoxy-Beclomethason

Die Identifizierung der unbekannt Substanzen unter den Peaks mit den Retentionszeiten 5,95 Minuten und 4,14 Minuten in DXA- beziehungsweise BDP-Proben aus den Freisetzungsversuchen in Humanplasma (*siehe Abschnitt 2*) geschah mittels LC/MS und $^1\text{H-NMR}$. Die Substanzen wurden als 17-Oxo-DX und 9,11-Epoxy-BOH identifiziert (*siehe Abschnitt 7.1 im Allgemeinen Teil B*).

7.2.1 Bestimmung der Molekülmassen mittels LC/MS

– Geräteangaben LC/MS

Geräteelement	Model
Degasser	1200 Series G1379B Degasser
Pumpe	1100 Series G1312A BinPump
Injektor/Autosampler	1100 Series G1329A ALS
Säulenofen	1100 Series G1330B ALSTherm
UV-Detektor	1100 Series G1315B DAD
Massenspektrometer	1100 Series G2445D LC/MSD Trap SL

Die Anlage bestand aus einer HPLC-Anlage, gekoppelt mit UV-Detektor und Massenspektrometer. Alle Bauteile sowie die Software ChemStation Version B.01.03 SR1 (204) zur Steuerung der Anlage entstammten der Firma Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Die Trap Software 5.3. Build 22.14 zur Auswertung der Spektren kam von Bruker Daltronik (Billerica, MA, USA).

– Messbedingungen

Die HPLC-Bedingungen wurden von der unter Abschnitt 8.1 beschriebenen Methode übernommen und Veränderungen vorgenommen, die eine adäquate Messung mit dem gekoppelten Massenspektrometer zuließen. Dazu wurde die Flussrate auf 1 mL/min verringert und die Gradientenelution entsprechend angepasst (*siehe Tab. 6*).

Tab. 6: Pumpeneinstellung der Agilent HPLC -Anlage zur Gradientenelution für DXA- und BDP-Proben zur Identifikation von 17-Oxo-DX und 9,11-Epoxy-BOH.

Zeit [min]	Flussrate [mL/min]	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]
0	1,0	60	40
3		60	40
16,5		25	75
20		25	75
21		60	40
26		60	40

Das Injektionsvolumen betrug 20 µL, Chromatogramme wurden mit dem UV-Detektor bei 254 und 239 nm aufgezeichnet. Aus den angepassten HPLC-Bedingungen ergaben sich die Tab. 7 in aufgeführten Retentionszeiten für die Analyten. Die Retentionszeiten wurden vor der Vermessung der Proben anhand Referenzsubstanzen bestimmt. Die Parameter des Massenspektrometers können Tab. 8 entnommen werden.

Tab. 7: Retentionszeiten der zu identifizierenden Analyten 17-Oxo-DX und 9,11-Epoxy-BOH, deren bekannte Vorläufersubstanzen DX und BOH sowie des Internen Standards AMC unter den Bedingungen der LC/MS-Messungen.

Analyt	Relative Retentionszeit	Retentionszeit [min]
DX	0,32	4,8
B	0,36	5,4
9,11-Epoxy-BOH	0,41	6,0
17-Oxo-DX	0,56	8,3
AMC	-	14,8

Tab. 8: Einstellungen des Massenspektrometers zur Detektion der Molekülmassen von 17-Oxo-DX und 9,11-Epoxy-BOH (ICC= Ion Charge Control).

Parameter	Einstellung
<i>Ionisation mode</i>	ESI (+)
<i>Drying gas flow</i>	10 mL/min
<i>Drying gas temperature</i>	350 °C
<i>Nebulizer</i>	50 psi
<i>Capillary Voltage</i>	3500 V
<i>Capillary Exit</i>	117,3 V
<i>Skimmer</i>	40 V
<i>Scan Range</i>	100 – 600 m/z
<i>Averages</i>	7 Spectra
<i>ICC</i>	Target 30000 Max. Accumulation Time 200 ms

– Probenaufarbeitung

Die Proben, die den Freisetzungsversuchen in Humanplasma entstammten, wurden extrahiert und nach Trocknung unter Stickstoffstrom in MeOH aufgenommen, wie bereits unter Abschnitt 2.3 beschrieben. Vor Analyse mittels LC/MS wurden die Proben noch einmal im Verhältnis 1:10 mit MeOH verdünnt.

7.2.2 Bestätigung der Strukturen mittels NMR

Zur Bestätigung der Molekülstruktur des 17-Oxo-DX wurden ¹H-NMR-Spektren der aus humanem Blutplasma isolierten Substanz (*siehe nachfolgender Abschnitt 7.3*) sowie des Ausgangsstoffs DX aufgenommen und verglichen.

Zur Bestätigung des 9,11-Epoxy-BOH wurde aus BOH eine ausreichende Menge der Substanz in humanem Plasma erzeugt (eine direkte Isolation der Stoffe aus den Proben der Freisetzungsversuche hätte nicht genügend Substanzmengen für eine NMR-Messung erbracht). Dabei wurde auf gleiche Weise verfahren wie für 17-Oxo-DX (*siehe Abschnitt 7.3*). Eine vollständige Abtrennung des BOH von seinem Abbauprodukt konnte, aufgrund ihrer sehr ähnlichen Retentionszeiten, durch präparative Säulenchromatographie nicht erreicht werden. So musste Verunreinigung des erhaltenen Produkts mit restlichem, nicht degradiertem BOH in Kauf genommen werden. Zusätzlich wurde zum Vergleich ein entsprechendes Spektrum des Edukts BOH aufgenommen.

– Geräteangaben NMR

Es wurde ein Avance 400 NMR-Spektrometer der Firma Bruker (Billerica, MA, USA) verwendet, welches über die Software Top Spin 3.0 (Bruker) gesteuert wurde. Die Datenauswertung wurde mit MestReNova Lite v5.2.5-5780 (Mestrelab Research S.L., Santiago de Compostela, Spanien) durchgeführt.

– Probenvorbereitung

Die trockenen Feststoffe wurden zur Analyse in DMSO-d₆ oder CDCl₃ in einer Endkonzentration von 0,5 bis 2,0 mg/mL aufgenommen und etwa 700 µL in ein NMR-Messröhrchen überführt.

7.3 Herstellung von 17-Oxo-Dexamthason

Die Gewinnung der analytischen Referenzsubstanz 17-Oxo-DX erfolgte durch Degradation von DXA in humanem Blutplasma, also auf gleichem Weg, wie auch das Auftreten der Substanz beobachtet worden war. Dazu wurde kristallines DXA als Reinsubstanz zu einer Konzentration von 0,25 mg/mL in das auf Humanplasma basierende Freisetzungsmittel (*siehe Abschnitt 2.2*) gegeben und für eine Dauer von 28 Tagen bei 37 °C im Brutschrank auf dem Magnetrührer gerührt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Ansatz im Erlenmeyerkolben zweimal auf dem Plattformschüttler 30 Minuten lang bei 360 U/min mit Diethylether im Mengenverhältnis 1:4 ausgeschüttelt, bei -25 °C zur Phasentrennung ausgefroren und die Etherphasen beider Extraktionsschritte vereinigt. Nach Dekantieren über Filterpapier wurde das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer verflüchtigt und der trockene Rückstand in 5 mL Mobiler Phase, bestehend aus zu gleichen Volumenanteilen vorgemischtem Essigsäureethylester und Petrolether, für die anschließende Aufreinigung mittels präparativer Säulenchromatographie aufgenommen. Zur Abtrennung der nach Extraktion im Ansatz verbliebenen Verunreinigungen wurde das gesamte Volumen des Ansatzes auf eine Kieselgelsäule (Packlänge 150 mm, Ø 15 mm) aufgetragen und mit eben erwähntem Fließmittel unter Ausübung leichten Drucks mit einem Halbgebläse chromatographiert (Flussgeschwindigkeit ~1 mL/min). Die gesammelten Fraktionen, jeweils etwa 5 mL, wurden zur Kontrolle des Trennerfolgs mittels Dünnschichtchromatographie (gleiche mobile Phase, wie für Säulenchromatographie) auf Vorhandensein des Analyten 17-Oxo-DX ($R_{f=}$ 0,35) und Abwesenheit der Hauptverunreinigung Dexamethason ($R_{f=}$ 0,13) untersucht. Die den Analyt enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt und der zurückbleibende kristalline Feststoff fünf Tage lang im Exsikkator über CaCl₂ getrocknet.

Die Reinheit des erhaltenen Produkts wurde schließlich mittels HPLC untersucht (für HPLC-Methode siehe Abschnitt 8.1.3), wobei eine Reinheit im Chromatogramm von >95 % ermittelt wurde. Die Ausbeute des Herstellungsprozesses an 17-Oxo-DX wurde nach Einwaage des gesamten erhaltenen Feststoffs und unter Berücksichtigung der Reinheit sowie der molaren Massen von Edukt und Produkt auf ~20 % berechnet. Die Schmelzpunktmessung ergab einen Wert von ~270 °C. Die Qualität des Produkts wurde zusätzlich durch die Retentionszeit von 5,95 Minuten im HPLC-Chromatogramm und durch das Masse-Ladungs-Verhältnis von 333 m/z ($M_r = 332$ g/mol) im Massenspektrum bestätigt (für Methodik zur Massenspektroskopie siehe Abschnitt 7.2.1).

7.4 Herstellung von 9,11-Epoxy-Beclomethason

Die analytische Referenzsubstanz 9,11-Epoxy-BOH wurde durch Degradation von BOH in HBSS-Puffer hergestellt. Ein Teil einer methanolischen BOH-Lösung zu 2 mg/mL wurden dazu mit 50 Teilen HBSS-Puffer gemischt und drei Tage lang bei 37 °C im Inkubator auf dem Magnetrührer gerührt.

Die Aufreinigung geschah durch wiederholtes Ausschütteln unter den gleichen Bedingungen, wie bereits für 17-Oxo-DX (siehe Abschnitt 7.3) beschrieben, und anschließender Entfernung des Ethers im Rotationsverdampfer. Weitere Aufreinigungsschritte entfielen, da die Umsetzung praktisch vollständig, also ohne rückständiges BOH, ablief und bei der Reaktionskontrolle im HPLC-Chromatogramm keine Nebenprodukte entdeckt wurden (für HPLC-Methode siehe Abschnitt 8.1.3). Das gesamte Verfahren lieferte eine Reinheit nach Peakfläche im Chromatogramm von >95 %. Nach einer fünf Tage langen Trocknung des ausgeschüttelten Feststoffs im Exsikkator über CaCl_2 konnte, unter Berücksichtigung der Reinheit, der molaren Massen von Edukt und Produkt und deren Einwaagen, eine Ausbeute von ~73 % erhalten werden. Der Schmelzpunkt der Substanz lag bei 210 °C, die Retentionszeit im HPLC-Chromatogramm bei 4,13 Minuten und das Masse-Ladungs-Verhältnis im Massenspektrum (für Methodik zur Massenspektroskopie siehe Abschnitt 7.2.1) bei 373 m/z ($M_r = 372$ g/mol). Zusätzlich wurde ein ^1H -Spektrum des Produkts aufgenommen und dieses zur Bestätigung des korrekten Degradationsproduktes mit dem Spektrum der aus humanem Blutplasma erhaltenen Substanz verglichen (siehe Abschnitt 7.2.2).

7.5 Stabilität von Beclomethason in humanem Blutplasma und verschiedenen Puffersystemen

7.5.1 Verwendete Puffer

Die verschiedenen Puffersysteme, in denen die Stabilität des BOH hinsichtlich seiner Neigung sein 9,11-Epoxid zu bilden untersucht wurde, sind in *Tab. 9* aufgeführt. Alle Puffer wurden, insofern nicht direkt als steriles Fertigprodukt bezogen, frisch hergestellt und vorab mit NaOH beziehungsweise HCl auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt.

Tab. 9: Zusammensetzung der verschiedenen Puffer. PBS wurde mit pH 7,2 und pH 7,6 eingesetzt. BSA= Bovines Serumalbumin, PBS= *Phosphat Buffered Saline*, HBSS= *Hank's Balanced Salt Solution*.

Zusammensetzung [g/L]	PBS pH 7,2/7,6	HBSS pH 7,6	HBSS mit 6 % BSA pH 7,2	Carbonat-Puffer pH 7,2
KCl	0.2	0.4	0.4	0.4
KH ₂ PO ₄	0.2	0.06	0.06	-
NaCl	8.0	8.0	8.0	8.0
Na ₂ HPO ₄	1.15	0.048	0.048	-
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	-	0.2	0.2	-
CaCl ₂	-	0.14	0.14	-
Glucose	-	0.1	0.1	-
NaHCO ₃	-	0.35	0.35	0.35
BSA	-	-	60.0	-

7.5.2 Durchführung der Stabilitätsuntersuchungen

Vorab wurde eine BOH-Lösung in MeOH zu 1 mg/mL hergestellt. Von dieser ausgehend, wurde den verschiedenen Puffern BOH in einer Endkonzentration von 1 µg/mL unmittelbar vor Versuchsbeginn zugesetzt. Direkt vor Beginn wurden zunächst Proben zu 100 µL als Ausgangswert gezogen und auf Trockeneis tiefgefroren. Die Pufferlösungen wurden sodann über eine Dauer von 24 Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach zwei, vier, sechs und 24 Stunden wurden jeweils weitere 100 µL aus allen Puffersystemen als Proben gezogen, welche direkt in ein HPLC-Vial gefüllt und ebenfalls auf Trockeneis tiefgefroren wurden. Aus BSA-Puffer wurden jeweils Proben zu 1 mL anstatt 100 µL entnommen, in ein Reagenzglas überführt und ebenfalls sofort auf Trockeneis tiefgefroren.

Die weitere Lagerung aller Proben bis zur Analyse erfolgte bei -20 °C.

Die Versuche in humanem Blutplasma wurden analog dazu durchgeführt. Für die Untersuchung der Stabilität des 9,11-Epoxy-BOH wurde dieses dem Humanplasma in gleicher Weise wie oben für BOH beschrieben zugegeben. Die Versuchsdauer wurde für die Langzeitstabilitätstests auf acht Tage verlängert und alle 48 Stunden 1 mL als Probe gezogen. Der Kurzzeitstabilitätstest wurde acht Stunden lang durchgeführt, wobei die Probenentnahme hier nach zwei, vier, sechs und acht Stunden erfolgte. Alle Proben wurden direkt nach Entnahme auf Trockeneis tiefgefroren und bei -20 °C gelagert.

7.5.3 Quantifizierung mittels HPLC/UV und Auswertung

Zur Analyse wurden alle Proben zunächst auf Raumtemperatur aufgetaut. Die Proben der verschiedenen Puffer-Ansätze, die nach dem Versuch in HPLC-Vials abgefüllt worden waren, wurden mit 100 µL MeOH versetzt und direkt per HPLC/UV wie unter Abschnitt 8.1.2 beschrieben vermessen. Die Proben aus BSA-Puffer wurden vor deren Analyse extrahiert, wie in Abschnitt 2.3 erläutert. Die Analyse mittels HPLC erfolgte wie unter Abschnitt 8.1.3 beschrieben.

Abweichend zu der Beschreibung unter den Abschnitten 8.1.2 und 8.1.3, wurden die Chromatogramme nach Peakflächenanteilen ausgewertet. Dazu wurden die prozentualen Anteile der Peakfläche von BOH an der Peakfläche des gesamten Chromatogramms berechnet. Unreinheiten im Chromatogramm, die nicht dem BOH oder einem Abbauprodukt dessen zuzuordnen waren, wurden anhand der als Ausgangswerte gezogenen Proben identifiziert. Zur Berechnung der Peakflächen in den Chromatogrammen der Proben zu den verschiedenen Messzeitpunkten wurden nur Peaks berücksichtigt, die BOH oder einem seiner Abbauprodukte zuzuordnen waren (*außer 9,11-Epoxy-BOH wurden keine weiteren Abbauprodukte festgestellt, siehe auch Abschnitt 7.2.2 im Allgemeinen Teil B*). Weitere Berechnungen zur Auswertung der Gewebebindungsversuche wurden mit Microsoft Excel[®] Version 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) und der Statistiksoftware Origin 8.6G (OriginLab Corporation, Northampton, USA) durchgeführt.

8 Validierung der chromatographischen Analysemethoden

Alle verwendeten Arbeitsmittel, ausschließlich der HPLC-Analyse, sind vorigen Abschnitten zu entnehmen (siehe Abschnitte 1.1, 2.1 und 3.1). Angaben zum verwendeten Humanplasma finden sich zusätzlich in Abschnitt 2.2, Angaben zum Schafsherzgewebe auch in Abschnitt 3.2. Die statistische Auswertung wurde mit Microsoft Excel[®] Version 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) und Origin 8.6G (OriginLab Corporation, Northampton, USA) durchgeführt.

8.1 HPLC-Methoden

8.1.1 Geräteangaben HPLC

Geräteelement	Model
Degasser	Inline-Degasser
Pumpe	1525 binary HPLC Pump
Injektor	717plus Autosampler
Detektor	2487 dual λ Absorbance Detector

Die Steuerung der HPLC-Anlage erfolgte über einen mit der Anlage vernetzten PC. Als Software wurde das Programm Breeze[®] Version 3.30 (Waters, Milford, USA) verwendet. Alle Hardware-Komponenten einschließlich der stationären Phase entstammten ebenfalls der Firma Waters.

8.1.2 HPLC-Methode für Messungen nach direkter Injektion methanolischer Lösungen

– Messbedingungen

Die Fließmittelzusammensetzung bestand aus einer Mischung aus 0,2 % (V/V) Essigsäure in Milli-Q-Wasser (Mobile Phase A) und ACN (Mobile Phase B). Als stationäre Phase diente die HPLC-Säule SunFire RP-C18 (150 x 4,6 mm, Partikel 5 μm , Poren 110 Å).

Die Trennung erfolgte in einem 13 Minuten langen Elutionsprogramm (siehe Tab. 10), bestehend aus einer initialen isokratischen Plateauphase über zwei Minuten, einem

anschließenden elf Minuten dauernden linearen Gradienten und einer erneuten, zwei Minuten umfassenden isokratischen Phase. Nach dem Elutionsprogramm wurden die Pumpen binnen einer Minute auf Startbedingungen zurückgestellt und weitere fünf Minuten reäquilibriert. Die Flussrate betrug durchgehend 1,5 mL/min. Der Autosampler wurde auf 10 °C temperiert, während die Stationäre Phase über den integrierten Säulenofen auf 30 °C erwärmt wurde. Es wurden 20 µL der Proben, respektive der Kalibrierstandards, auf die stationäre Phase aufgetragen, der eine Vorsäule (SecurityGuard RP-1, 4 x 3.0 mm, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) vorgeschaltet war. Die Detektion der Glucocorticoide erfolgte UV-metrisch mit einer Wellenlänge von 254 nm.

Tab. 10: Pumpeneinstellung zur Gradientenelution für Proben aus MeOH (Curve 6= linearer Gradient).

Zeit [min]	Flussrate [mL/min]	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]	Curve
0		60	40	-
2		60	40	6
11	1,5	25	75	6
13		25	75	6
14		60	40	6
19		60	40	6

– Analysesequenz

Die Analysesequenz wurde stets mit einer Leerprobe bestehend aus MeOH begonnen. Nach höchstens zehn aufeinanderfolgenden Proben wurden mehrere Spülschritte vollzogen, um eventuellen Verschleppungen vorzubeugen und kumulierte Matrix-Rückstände auf der Säule zu entfernen. Zunächst wurde eine Reinigung des Injektors über zehn Minuten durchgeführt, gefolgt von einer 15 Minuten langen Spülphase mit 100 % Mobiler Phase B und einem ebenso langen Reäquilibrierungsschritt. Zur Kontrolle des Reinigungserfolgs wurde nochmals eine Leerprobe bestehend aus reinem MeOH injiziert.

– Auswertung der Chromatogramme

Die Integration und Berechnung der Chromatogramme erfolgte mittels der Software Breeze[®] Version 3.30 (Waters). Als Systemeignungstest (SST) diente ein Kalibrierstandard mittlerer Konzentration. Eine Auswertung erfolgte nur, wenn die Auflösung R zwischen dem Peak des jeweiligen Analyten und dem Peak des Internen Standards $\geq 1,5$ war. Die Retentionszeiten (*siehe Tab. 11*) wurden bei jeder Analyse über den SST neu erfasst. Abweichungen um ± 5 % zwischen den einzelnen Chromatogrammen wurden toleriert.

Tab. 11: Retentionszeiten der Glucocorticoide bei Messung aus methanolischen Proben.

Analyt	Retentionszeit [min]
DXA	7,00
GCX	10,88
BDP	11,76

Die Quantifizierung erfolgte über externe Kalibrierung. Durch Auftragen der gemessenen Peakflächen der Kalibrierstandards gegen die jeweils zugehörigen Konzentrationen wurde eine Regressionsgerade erstellt und die Konzentrationen der Proben anhand dieser bestimmt.

8.1.3 HPLC-Methode für Messungen nach Probenaufarbeitung aus humanem Blutplasma und Schafsherzgewebe

Die im vorigen Abschnitt 8.1.2 beschriebene HPLC-Methode wurde für Messungen aus genannten biologischen Probenmatrizen modifiziert. Die Programmierung der Analysensequenzen erfolgte wie oben erklärt. Verfahren zur Probenaufarbeitung, sowohl aus Humanplasma als auch dem in Kollagen-Gel eingebetteten Schafsherzgewebe, können den Abschnitten 2.3 und 3.3 zu den entsprechenden Versuchen entnommen werden.

– Messbedingungen

Für die Messungen aus Humanplasma beziehungsweise Kollagen- und Gewebe-Gelen als Probenmatrix, wurde die Spülphase dergestalt verändert, dass vor dem Umspülen auf Startbedingungen die isokratischen Bedingungen mit 75 % Mobiler Phase B weitere fünf Minuten beibehalten wurden, um die Säule von lipophilem Restmaterial der Probenmatrix frei zu spülen (*siehe Tab. 12*).

Tab. 12: Pumpeneinstellung zur Gradientenelution für Proben aus Humanplasma und Schafsherzgewebe.

Zeit [min]	Flussrate [mL/min]	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]	Curve
0		60	40	-
2		60	40	6
11	1,5	25	75	6
18		25	75	6
19		60	40	6
24		60	40	6

– Auswertung der Chromatogramme

Die Retentionszeiten der Glucocorticoide differierten aufgrund der biologischen Matrices geringfügig von denen bei der Messung aus MeOH. Sie wurden bei jeder Analyse über eine Standardprobe als Systemeignungstest (SST) neu erfasst. Abweichung um $\pm 5\%$ zwischen den einzelnen Chromatogrammen wurden toleriert. Die Retentionszeiten der Analyte sowie die relativen Retentionszeiten gegenüber der jeweiligen Internen Standards können *Tab. 13* entnommen werden. Informationen zur Verwendung der Internen Standards finden sich in den Abschnitten 2.3 und 3.3.

Tab. 13: Retentionszeiten der Glucocorticoide bei Messung aus Humanplasma beziehungsweise Schafsherzgewebe und Relative Retentionszeiten gegenüber den verwendeten Internen Standards. AMC wurde in Freisetzungsversuchen eingesetzt, MPR und FLU zusätzlich bei der Bestimmung der Gewebefindung.

Analyt	Retentionszeit [min]	Relative Retentionszeit gegenüber Internem Standard		
		AMC	MPR	FLU
MPR	2,97	-	-	-
DX	3,25	0,31	1,09	-
BOH	3,60	0,34	1,21	-
9,11-Epoxy-BOH	4,12	0,39	1,38	-
FLU	4,38	-	-	-
17-Oxo-DX	5,94	0,57	2,00	-
DXA	7,02	0,67	-	-
B-17-P	7,72	0,74	2,60	-
B-21-P	8,52	0,81	-	-
AMC	10,50	-	-	-
GCX	10,98	1,05	-	2,51
BDP	11,75	1,12	-	-

Die quantitative Auswertung erfolgte mittels Internem Standard. Zur Erstellung einer Regressionsgeraden wurde das Verhältnis aus den gemessenen Peakflächen des Kalibrierstandards und des Internen Standards gebildet. Die resultierenden Quotienten wurden gegen die jeweilige Konzentration des Kalibrierstandards aufgetragen. Die Konzentrationen der Proben wurden anhand dieser Kalibriergeraden nach Berechnung der Flächenverhältnisse zum Internen Standard ermittelt.

8.2 Methodvalidierung für Messungen nach Direktinjektion aus Methanol

Die Methode wurde für DXA, GCX und BDP validiert. Für Vorgehensweise und Kriterien wurde sich an den Richtlinien der ICH [203], der EMA [204], von EURACHEM [205] sowie an einschlägiger Tertiärliteratur zu jenem Thema [206, 207] orientiert.

8.2.1 Selektivität

Selektivität beschreibt das Vermögen einer Methode unter entsprechend festgelegten Bedingungen den interessierenden Analyten in Gegenwart anderer Bestandteile einer Probenmatrix einwandfrei, also präzise und spezifisch, bestimmen zu können [205]. Auch wenn die Probenmatrix im vorliegenden Fall lediglich durch das Lösungsmittel definiert ist, so gilt dieses dennoch im Sinne eines Trägermaterials für den Analyten als Matrix, die noch immer weitere Bestandteile als Verunreinigungen enthalten kann. Von diesen muss der Analyt daher selektiv unterschieden werden können.

Die Prüfung erfolgte anhand entsprechender Beispielchromatogramme für jeden Analyten (siehe Abb. 71). Die drei Analyten von Interesse konnten spezifisch von Matrixkomponenten unterschieden werden.

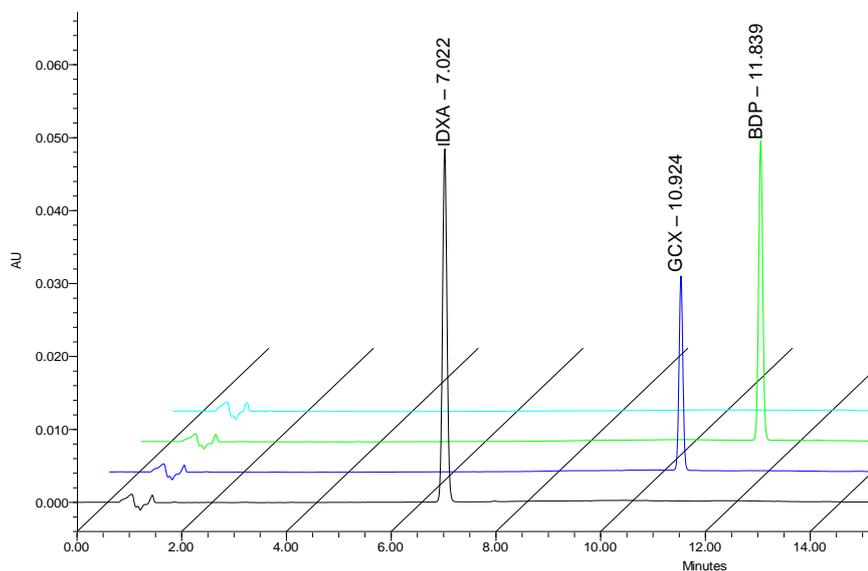


Abb. 71: Nachweis der Selektivität der HPLC-Methode. Beispielchromatogramme (Ausschnitte) aus den Gehaltsanalysen der Colla. DXA- (schwarz), GCX- (blau) und BDP-Probe (grün), Leerwert aus reinem MeOH (türkis, Reihenfolge von unten nach oben). Peaks für alle drei Analyten waren als selektiv zu beurteilen. Ihre Bestimmung wurde durch keine Matrixbestandteile beeinträchtigt.

8.2.2 Linearität und Arbeitsbereich

Zur Untersuchung des Zusammenhangs der Konzentration einer Probe und dem dazugehörigen Messsignal, wurde die Methode der Prüfung auf Linearität im gewählten Arbeitsbereich unterzogen. Dazu wurden Kalibriergeraden mit Punkten auf wenigsten sechs Konzentrationsniveaus und insgesamt sechsfacher Wiederholung ($n=6$) erstellt. Zusätzlich wurden Leerproben mitgeführt, welche nicht in die Berechnung der Kalibriergeraden einfließen. Alle Kalibrierstandards wurden wie unter Abschnitt 1.2

beschrieben hergestellt. Die Berechnung der Kalibrierfunktionen erfolgte durch lineare Regressionsanalyse, wie unter Abschnitt 8.1.2 ausgeführt, nach *Fml. 9*.

$$\text{Fml. 9} \quad Y = a \cdot X + b$$

Mit:

a= Steigung der Kalibriergeraden

b= y-Achsenabschnitt der Kalibriergeraden

Da der Korrelationskoeffizient lediglich die Güte der Anpassung des gewählten mathematischen Modells an die gemessenen Werte beschreibt [206], konnte dieser alleine nicht als Qualitätskriterium für den Nachweis der Linearität genügen. So wurde zusätzlich gefordert, dass die Richtigkeit von mindestens 50 % der einzelnen Messpunkte auf jedem Konzentrationsniveau wenigstens ± 15 % betrug, mit Ausnahme der unteren Grenze des Arbeitsbereichs, für welches eine Richtigkeit von ± 20 % ausreichend war [204]. Des Weiteren wurde auf Normalverteilung der Reststreuung der aufgenommenen Punkte mit dem Test nach Kolmogorov-Smirnov geprüft [205] und die relative Verfahrensstandardabweichung zur Beurteilung der Güte und Vergleichbarkeit der Kalibrierungen angegeben [206].

Die validierten Arbeitsbereiche waren für DXA 0,5 bis 10,0 $\mu\text{g/mL}$, für GCX 0,1 bis 5,0 $\mu\text{g/mL}$ und für BDP 0,1 bis 10,0 $\mu\text{g/mL}$. Die Kalibrierfunktionen erfüllten oben genannte Anforderungen und zeigten vergleichbar niedrige relative Verfahrensstandardabweichungen bei hohem Korrelationskoeffizienten (*siehe Tab. 14*). Für die Reststreuungen der Messwerte um die Kalibrierfunktionen konnte Normalverteilung nachgewiesen werden.

Tab. 14: Ergebnisse der Prüfung auf Linearität, relative VerfSD= Relative Verfahrensstandardabweichung, Abweichungen in Klammern CI 95 %, n= 6.

Analyt	Kalibrierfunktion	R ²	relative VerfSD [%]
DXA	Y= 21358 (± 154) X + 1971 (± 808)	0,9995	1,6
GCX	Y= 18190 (± 140) X + 210 (± 337)	0,9996	1,5
BDP	Y= 15674 (± 105) X + 246 (± 523)	0,9995	1,6

8.2.3 Präzision und Richtigkeit

Präzision und Richtigkeit der Methode wurden jeweils für *Intra-* und *Inter-Day*-Messungen durchgeführt. Dazu wurden sechs ($n=6$) wiederholte Messungen auf vier Konzentrationsniveaus vorgenommen, wobei das niedrigste Niveau der Bestimmungsgrenze (*siehe Abschnitt 8.2.4*) entsprach und die weiteren Konzentrationen den niederen, mittleren und oberen Teil des Arbeitsbereichs abdeckten. Für den Nachweis der Richtigkeit mussten alle Messwerte die bereits unter Abschnitt 8.2.2 geschilderten Kriterien erfüllen. Die Präzision galt als nachgewiesen, wenn der Variationskoeffizient (VK) an allen Punkten nicht mehr als $\pm 15\%$ betrug, mit Ausnahme der Bestimmungsgrenze, für die ein Wert von $\pm 20\%$ ausreichend war [204]. Die Methode entsprach den Vorgaben an Präzision und Richtigkeit in vollem Umfang (*siehe Tab. 15*).

Tab. 15: Ergebnisse der Prüfung auf Präzision (als Variationskoeffizient, oberer Wert) und Richtigkeit (als rückgerechnete Werte in [%], unterer Wert) bei Messungen aus MeOH auf vier Konzentrationsniveaus. $n=6$.

Präzision [VK]/Richtigkeit [%]				
DXA	0,5 µg/mL	1,0 µg/mL	5,0 µg/mL	7,5 µg/mL
Intraday	2,8 -7,7	0,6 -3,4	0,6 +2,3	0,3 +0,7
Interday	4,3 -12,5	7,0 -2,7	4,8 -4,9	6,1 -6,6
GCX	0,1 µg/mL	0,5 µg/mL	2,5 µg/mL	3,75 µg/mL
Intraday	2,3 -6,9	2,0 +3,3	0,5 +1,1	1,8 -6,8
Interday	5,1 -13,4	4,1 -1,1	5,5 -4,9	6,3 -8,0
BDP	0,1 µg/mL	0,5 µg/mL	5,0 µg/mL	7,5 µg/mL
Intraday	1,7 -16,3	2,2 -2,5	0,5 +1,0	0,1 -2,0
Interday	3,2 -17,9	2,2 -6,6	4,1 -5,8	5,2 -3,7

8.2.4 Bestimmungsgrenze

Auf eine exakte Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurde aus pragmatischen Gründen verzichtet, da diese für die praktische Arbeit keine Bedeutung hatte. Als Bestimmungsgrenze wurde deshalb das niedrigste Konzentrationsniveau der Kalibriergeraden angesehen, welches noch mit hinreichender Präzision und Richtigkeit bestimmt werden konnte [205], also die niedrigste Konzentration des verwendeten Arbeitsbereichs (*siehe Abschnitt 8.2.2*).

8.3 Methodenvalidierung für Messungen nach Probenaufarbeitung aus Humanplasma

Insofern unter den einzelnen Punkten nicht abweichend vermerkt, entsprachen die Vorgehensweise und die Vorgaben für nachfolgende Methodenvalidierung den bereits unter Abschnitt 8.2 beschriebenen. Die Validierung erfolgte für die drei Ausgangssubstanzen DXA, GCX und BDP und für deren bekannte Metaboliten DX, 17-Oxo-DX beziehungsweise 9,11-Epoxy-BOH, B-17-P, B-21-P und BOH. Für einige Analyten wurden zweierlei Arbeitsbereiche validiert (siehe Tab. 16). Kalibrierstandards und weitere Standardproben wurden hergestellt wie unter den Abschnitten 2.1.2 und 3.1.2 beschrieben.

8.3.1 Selektivität

Die Prüfung erfolgte anhand entsprechender Beispielchromatogramme separat für DXA-, GCX- und BDP-Proben (siehe Abb. 72). Innerhalb der Proben konnten alle Analyten spezifisch von Matrixkomponenten des Humanplasmas sowie untereinander unterschieden werden.

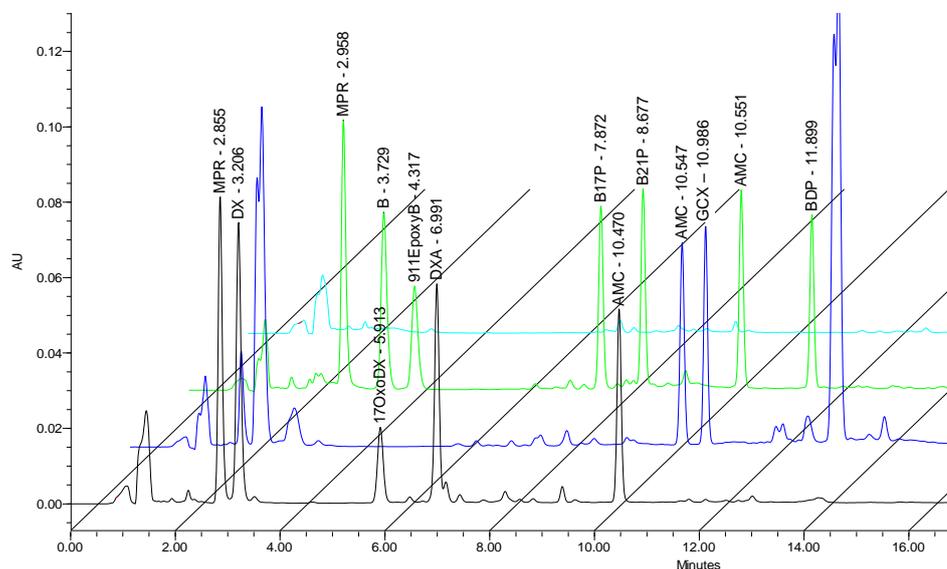


Abb. 72: Nachweis der Selektivität der HPLC-Methode. Beispielchromatogramme (Ausschnitte) aus den Freisetzungsversuchen in Humanplasma. DXA- (schwarz), GCX- (blau) und BDP-Probe (grün), Leerwert nach Extraktion aus reinem humanplasmahaltigem Freisetzungsmedium (türkis; Reihenfolge von unten nach oben). Die Peaks für alle Analyten waren als selektiv zu beurteilen. Die Bestimmung der Analyten wurde weder durch gegenseitige Störungen der Substanzen untereinander, noch durch die Probenmatrix beeinträchtigt.

8.3.2 Linearität und Arbeitsbereich

Im Arbeitsbereich von 10 bis 300 ng/mL wurden vier (n= 4) und im Arbeitsbereich von 20 bis 2000 ng/mL sechs (n= 6) Messpunkte auf mindestens sechs Konzentrationsniveaus aufgenommen. Bei letzterem Arbeitsbereich variierte die Spannweite für einzelne Analyten (siehe Tab. 16).

Tab. 16: Ergebnisse der Prüfung auf Linearität, relative VerfSD= Relative Verfahrensstandardabweichung, Abweichungen CI 95 %, n= 4 für Arbeitsbereich bis 300 ng/mL. n= 6 für Arbeitsbereich bis 2000 ng/mL.

Analyt	Arbeitsbereich [ng/mL]	Kalibrierfunktion	R ²	relative VerfSD [%]
DX	10 - 300	$Y = 4,6953 (\pm 0,1419) X + 0,0515 (\pm 0,0222)$	0,9996	6,3
	50 - 2000	$Y = 1,5498 (\pm 0,0229) X + 0,0471 (\pm 0,0217)$	0,9993	3,0
17-Oxo-DX	10 - 300	$Y = 1,6517 (\pm 0,0449) X + 0,0083 (\pm 0,0067)$	0,9994	4,5
	50 - 1500	$Y = 0,5687 (\pm 0,0105) X - 0,0008 (\pm 0,0078)$	0,9993	3,9
DXA	50 - 2000	$Y = 1,186 (\pm 0,0262) X + 0,0288 (\pm 0,0295)$	0,9998	4,6
GCX	10 - 300	$Y = 4,7599 (\pm 0,0547) X + 0,0864 (\pm 0,0085)$	0,9998	1,9
	50 - 2000	$Y = 0,9425 (\pm 0,0065) X + 0,0253 (\pm 0,0072)$	0,9997	1,5
BOH	10 - 300	$Y = 4,1196 (\pm 0,1007) X + 0,1304 (\pm 0,0161)$	0,9992	4,1
	20 - 2000	$Y = 1,1964 (\pm 0,0106) X + 0,0258 (\pm 0,0106)$	0,9998	2,1
9,11-Epoxy-BOH	10 - 300	$Y = 2,7055 (\pm 0,0592) X + 0,015 (\pm 0,0087)$	0,9999	3,6
	20 - 2000	$Y = 0,8099 (\pm 0,0072) X + 0,0057 (\pm 0,0066)$	0,9997	2,1
B-17-P	10 - 300	$Y = 4,8715 (\pm 0,0962) X + 0,0549 (\pm 0,0152)$	0,9994	3,3
	50 - 2000	$Y = 0,9413 (\pm 0,0090) X + 0,0222 (\pm 0,0095)$	0,9998	2,2
B-21-P	20 - 2000	$Y = 1,0003 (\pm 0,0077) X + 0,0233 (\pm 0,0074)$	0,9998	2,5
BDP	50 - 2000	$Y = 0,7865 (\pm 0,0093) X + 0,0141 (\pm 0,0100)$	0,9995	2,7

Die Berechnung der Kalibrierfunktionen erfolgte wie unter Abschnitt 8.1.3 erläutert. Alle Kalibriergeraden erfüllten die Anforderungen an eine lineare Methode (siehe Abschnitt 8.2.2) und zeigten vergleichbare Verfahrensstandardabweichungen bei hoher Korrelation von Messsignal zu eingesetzter Konzentration (siehe Tab. 16).

8.3.3 Präzision und Richtigkeit

Die Kriterien zum Nachweis der Präzision und Richtigkeit (*siehe Abschnitt 8.2.3*) wurden in beiden Arbeitsbereichen für alle Analyten erfüllt (*siehe Tab. 17 und Tab. 18*).

Tab. 17: Ergebnisse der Prüfung auf Präzision (als Variationskoeffizient, oberer Wert) und Richtigkeit (als rückgerechnete Werte in [%], unterer Wert) bei Messungen aus Humanplasma für den Arbeitsbereich zwischen 20 und 2000 ng/mL auf vier Konzentrationsniveaus. Das LLOQ betrug für BOH, 9,11-Epoxy-BOH und B-21-P 20 ng/mL, für alle anderen Analyten 50 ng/mL. n = 6.

		Präzision [V _K] und Richtigkeit [%]			
		LLOQ	500 ng/mL	1000 ng/mL	1500 ng/mL
DX	Intraday	6,4 -4,8	0,9 +1,9	2,3 +3,8	2,7 +2,7
	Interday	9,2 -12,0	2,9 +5,0	1,1 +1,6	2,8 +0,9
17-Oxo-DX	Intraday	7,1 +5,0	3,8 -4,2	2,1 -2,2	4,0 +0,9
	Interday	5,3 +14,6	2,8 -1,7	1,4 -2,1	4,0 +1,3
DXA	Intraday	7,6 -1,4	2,8 -2,4	2,7 +2,0	4,6 -0,2
	Interday	7,6 -0,7	2,6 -0,6	1,8 +1,4	4,6 +0,1
GCX	Intraday	1,8 -15,6	0,4 +2,3	0,6 +2,1	0,8 +0,6
	Interday	4,1 -18,9	0,8 +1,9	0,4 +1,9	0,5 +0,5
BOH	Intraday	2,7 -12,2	1,2 +1,2	1,3 +0,1	2,7 -1,6
	Interday	7,5 -17,7	1,1 -0,9	2,3 +0,7	2,0 -1,4
9,11-Epoxy-BOH	Intraday	6,4 -9,2	1,0 +1,0	1,7 +1,6	2,6 -1,9
	Interday	4,4 -6,6	0,3 +0,2	2,3 +2,0	2,4 -0,5
B-17-P	Intraday	3,1 -11,1	0,8 +4,6	1,8 +1,6	2,4 -0,7
	Interday	5,7 -12,3	0,5 +3,4	2,1 +1,0	2,0 +0,6
B-21-P	Intraday	4,0 -18,8	1,7 +2,7	2,4 +0,9	2,4 -1,2
	Interday	8,7 -7,3	2,9 +4,4	3,9 +3,0	2,9 +2,6
BDP	Intraday	2,4 -12,6	1,8 +4,5	2,8 +0,8	1,9 -2,1
	Interday	3,2 -8,8	2,2 +4,3	3,9 +3,8	4,1 +2,2

Tab. 18: Ergebnisse der Prüfung auf Präzision (als Variationskoeffizient, oberer Wert) und Richtigkeit (als rückgerechnete Werte in [%], unterer Wert) bei Messungen aus Humanplasma für den Arbeitsbereich zwischen 10 und 300 ng/mL auf vier Konzentrationsniveaus. Das LLOQ betrug für alle Analyten 10 ng/mL. n= 3.

		Präzision [V _K] und Richtigkeit [%]			
		LLOQ	60 ng/mL	100 ng/mL	200 ng/mL
DX	Intraday	13,4 -1,4	8,4 +5,9	3,9 +6,7	8,8 +6,5
	Interday	12,6 -13,6	1,4 +10,6	1,5 +7,7	3,6 +8,5
17-Oxo-DX	Intraday	6,7 +8,1	10,1 -3,6	2,0 +3,1	6,4 -2,3
	Interday	9,8 +12,7	11,5 +1,1	3,5 +6,2	7,5 +2,6
GCX	Intraday	4,7 -5,6	0,2 +3,5	0,2 -0,8	1,4 +1,3
	Interday	16,4 +12,6	2,4 +0,7	1,5 +0,7	0,5 +1,1
BOH	Intraday	12,2 +7,7	4,9 +7,4	1,5 +3,2	3,4 -1,8
	Interday	8,2 +10,1	10,0 +0,1	5,5 -0,5	4,9 -5,4
9,11-Epoxy-BOH	Intraday	14,5 -8,1	7,1 +2,4	5,7 +3,1	1,8 -0,4
	Interday	18,5 -0,1	7,2 +1,5	7,3 +4,4	3,0 +1,1
B-17-P	Intraday	2,0 -12,3	1,8 +0,1	4,5 +3,2	1,3 +2,0
	Interday	11,1 -20,0	4,6 -5,4	4,2 +4,7	1,5 +1,9

8.3.4 Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze wurde, wie bereits unter Abschnitt 8.2.4 beschrieben, in Übereinstimmung mit der unteren Grenze des gewählten Arbeitsbereichs (siehe Tab. 16 unter Abschnitt 8.3.2) gewählt.

8.3.5 Extraktionseffektivität

Da der HPLC-Analyse eine Probenextraktion aus biologischer Matrix vorausging, wurde zur Charakterisierung der Güte der gesamten Methode die Extraktionseffektivität ermittelt (siehe Tab. 19). Zum einen wurden zur Bestimmung Standardproben in den Konzentrationen 50, 500, 1000 und 1500 ng/mL erstellt (*Pre-spiked*). Zum anderen wurde die Substanz von Interesse in den gleichen Konzentrationen Matrixleerproben beigemischt, nachdem die reine Matrix extrahiert worden war (*Post-spiked*). Für alle Proben wurden

sechs (n= 6) wiederholte Messungen vorgenommen. Die Extraktionseffektivität wurde nach *Fml. 10* berechnet [205].

$$\text{Fml. 10} \quad E [\%] = A_{\text{prespiked}} / A_{\text{postspiked}} \cdot 100 \%$$

Mit:

$A_{\text{prespiked}}$ = Messsignal der Standardprobe mit vor Extraktion beigemengtem Analyt

$A_{\text{postspiked}}$ = Messsignal der Standardprobe mit nach Extraktion beigemengtem Analyt

E= Extraktionseffektivität

Die Extraktionseffektivität wurde nicht in die Berechnung der Analysenproben einbezogen, da die Kalibrierung ebenfalls nach erfolgter Extraktion der Kalibrierstandards aus der gleichen Matrix erfolgte.

Tab. 19: Ergebnisse der Bestimmung der Extraktionseffektivität bei Messungen aus Humanplasma im Bereich zwischen 20 und 2000 ng/mL auf vier Konzentrationsniveaus, ausgedrückt als Verhältnis von *Pre-* zu *Postspiked-Proben* in [%]. Abweichungen CI 95 %, n= 6.

	Extraktionseffektivität [%]			
	50 ng/mL	500 ng/mL	1000 ng/mL	1500 ng/mL
DX	92,1 (±10,8)	84,4 (±2,2)	84,6 (±2,3)	84,6 (±1,6)
17-Oxo-DX	81,8 (±12,6)	83,8 (±2,1)	88,1 (±1,1)	88,9 (±1,3)
DXA	87,1 (±6,4)	83,5 (±1,7)	88,1 (±0,8)	88,9 (±1,1)
GCX	96,2 (±1,2)	88,9 (±1,8)	95,6 (±5,2)	88,4 (±1,1)
BOH	94,8 (±10,4)	91,2 (±4,4)	92,0 (±3,7)	86,1 (±7,5)
9,11-Epoxy-BOH	94,2 (±5,7)	89,6 (±4,2)	91,5 (±3,7)	85,7 (±7,5)
B-17-P	92,6 (±4,7)	94,6 (±4,2)	96,5 (±3,9)	90,1 (±7,8)
B-21-P	81,0 (±4,5)	91,2 (±3,9)	93,7 (±4,5)	88,3 (±7,6)
BDP	82,1 (±2,5)	91,4 (±4,0)	92,8 (±5,0)	86,7 (±7,3)

8.3.6 Stabilität

Mit der Prüfung der Robustheit sollen wichtige variable Faktoren untersucht werden, die während der Durchführung der Analyse unter den gegebenen örtlichen Laborbedingungen einen entscheidenden Einfluss auf die Richtigkeit des Analysenergebnisses haben können [205]. Da insbesondere die Stabilität der Proben einen praxisrelevanten und kritischen Einflussfaktor darstellte, wurden verschiedene Lagerbedingungen [204] der Proben bezüglich Temperatur und Dauer vor und nach erfolgter Extraktion überprüft.

Zur Simulation des Einflusses der Probenlagerung vor Extraktion wurden Standardproben in einer Konzentration von 200 ng/mL erstellt, drei Monate lang bei -20 °C eingefroren, anschließend extrahiert und dem weiteren Analyseverfahren unterworfen. Die Simulation der Lagerung nach Extraktion erfolgte mit Standardproben der gleichen Konzentration, welche allerdings frisch extrahiert und anschließend trocken bei +4 °C drei Monate lang kühl gestellt wurden. Die Analyse wurde darauffolgend mit der Aufnahme in 100 µL MeOH fortgesetzt. Für alle Proben wurden sechs (n= 6) wiederholte Bestimmungen unternommen.

Zur Beurteilung wurden die Präzision und die Richtigkeit der gelagerten Proben bestimmt (siehe Tab. 20). Die Vorgaben standen in Einklang mit den unter Abschnitt 8.2.3 beschriebenen.

Tab. 20: Ergebnisse der Prüfung auf Stabilität bei Messungen aus Humanplasma. Ergebnisse ausgedrückt als Präzision mittels Variationskoeffizient (oberer Wert) und Richtigkeit über rückgerechnete Werte in [%] (unterer Wert). Standardproben der Konzentration 200 ng/mL. n= 6.

	Stabilität als Präzision [V _K] und Richtigkeit [%]	
	Probenlagerung drei Monate bei -20 °C vor Extraktion	Probenlagerung drei Monate bei +4 °C nach Extraktion
DX	5,0 -6,0	7,5 -16,0
17-Oxo-DX	4,7 +4,8	6,4 +15,8
DXA	5,3 -1,6	2,0 +5,7
GCX	2,0 -0,7	0,0 +12,1
BOH	3,1 +1,6	8,8 -10,1
9,11-Epoxy-BOH	4,6 -2,0	11,0 -14,5
B-17-P	3,3 -8,6	1,5 +5,5
B-21-P	4,8 -4,8	2,0 +8,0
BDP	3,7 -8,9	2,2 +4,5

Die Analysenproben konnten vor Extraktion bei -20 °C über einen Zeitraum von drei Monaten gelagert werden. Von einer drei Monate langen Lagerung bei +4 °C nach erfolgter Extraktion sollte abgesehen werden, wobei der Grenzwert für Richtigkeit für GCX- und BDP-Proben zwar knapp eingehalten, für DXA-Proben jedoch nicht eingehalten wurde.

8.4 Methodenvalidierung für Messungen nach Probenaufarbeitung aus Schafsherzgewebe

Insofern unter den einzelnen Punkten nicht abweichend vermerkt, entsprachen die Vorgehensweise und die Vorgaben für nachfolgende Methodenvalidierung den bereits unter den Abschnitten 8.2 und 8.3 beschriebenen. Die Methode wurde nicht für DXA, B17P und BDP validiert. Kalibrierstandards und weitere Standardproben wurden wie unter Abschnitt 3.1.2 beschrieben hergestellt.

8.4.1 Selektivität

Die Prüfung erfolgte anhand entsprechender Beispielchromatogramme separat für DXA-, GCX- und BDP-Proben (siehe Abb. 73). Innerhalb der Proben konnten alle Analyten spezifisch von Matrixkomponenten des Humanplasmas sowie untereinander unterschieden werden.

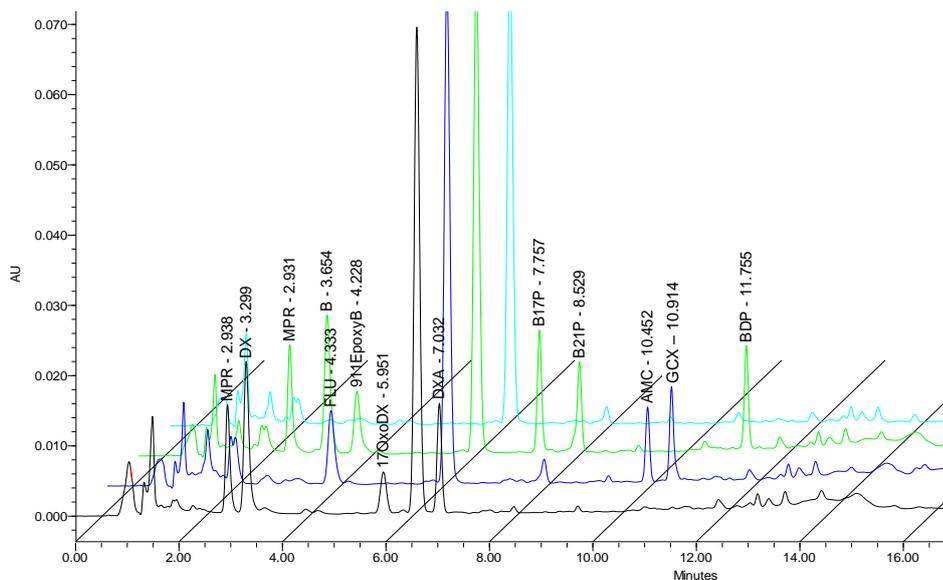


Abb. 73: Nachweis der Selektivität der HPLC-Methode. Beispielchromatogramme (Ausschnitte) aus den Versuchen zur Gewebefindung an Schafsherzgewebe. DXA- (schwarz), GCX- (blau) und BDP-Probe (grün), Leerwert nach Extraktion aus reinem Gewebe-Gel (türkis, Reihenfolge von unten nach oben). Peaks für alle Analyten waren als selektiv zu beurteilen. Die Bestimmung der Analyten wurde weder durch gegenseitige Störungen der Substanzen untereinander, noch durch die Probenmatrix beeinträchtigt.

8.4.2 Linearität und Arbeitsbereich

Der Arbeitsbereich wurde auf Analytkonzentrationen von 5 bis 300 ng/mL festgelegt. Die Bereiche variierten für einzelne Analyten (*siehe Tab. 21*). Auf jedem der sechs Konzentrationsniveaus wurden wenigstens vier ($n= 4$) Messpunkte aufgenommen. Die Berechnung der Kalibrierfunktionen erfolgte wie unter Abschnitt 8.1.3 erläutert.

Alle Kalibriergeraden erfüllten die Anforderungen an eine lineare Methode (*siehe Abschnitt 8.2.2*) und zeigten vergleichbare Güte bei hoher Korrelation des Messsignals mit den eingesetzten Analytkonzentrationen (*siehe ebenfalls Tab. 21*).

Tab. 21: Ergebnisse der Prüfung auf Linearität, relative VerfSD= relative Verfahrensstandardabweichung, Abweichungen CI 95 %, $n= 4$.

Analyt	Arbeitsbereich [ng/mL]	Kalibrierfunktion	R ²	relative VerfSD [%]
DX	10 - 300	$Y= 5,3183 (\pm 0,0430) X + 0,0238 (\pm 0,0067)$	0,9999	1,3
17-Oxo-DX	10 - 300	$Y= 1,7607 (\pm 0,0268) X + 0,0010 (\pm 0,0040)$	0,9991	2,5
GCX	5 - 200	$Y= 3,5861 (\pm 0,0798) X + 0,0445 (\pm 0,0076)$	0,9999	3,6
BOH	10 - 300	$Y= 5,1022 (\pm 0,2222) X + 0,1562 (\pm 0,0355)$	0,9999	7,2
9,11-Epoxy-BOH	10 - 300	$Y= 2,7798 (\pm 0,0383) X + 0,0048 (\pm 0,0056)$	0,9999	2,3
B-17-P	10 - 300	$Y= 3,4133 (\pm 0,0770) X + 0,0630 (\pm 0,0121)$	0,9997	3,7

8.4.3 Präzision und Richtigkeit

Die Kriterien zum Nachweis der Präzision und Richtigkeit (*siehe Abschnitt 8.2.3*) wurden für alle Analyten erfüllt (*siehe Tab. 22*).

Tab. 22: Ergebnisse der Prüfung auf Präzision (als Variationskoeffizient, oberer Wert) und Richtigkeit (als rückgerechnete Werte in [%], unterer Wert) für den Arbeitsbereich zwischen 5 und 300 ng/mL auf vier Konzentrationsniveaus. Das LLOQ betrug für GCX 5 ng/mL, für alle anderen Analyten 10 ng/mL. n= 3.

		Präzision [V _K] und Richtigkeit [%]			
		LLOQ	60 ng/mL	100 ng/mL	200 ng/mL
DX	Intraday	4,4 -7,4	3,9 +3,0	2,8 +1,0	0,5 +0,4
	Interday	2,0 -6,7	2,2 +5,6	2,3 +2,2	1,0 -0,3
17-Oxo-DX	Intraday	10,0 -2,3	1,9 -0,9	0,6 -1,2	2,2 -3,7
	Interday	11,7 +0,3	13,4 -12,4	8,3 -9,9	7,6 -9,9
GCX	Intraday	16,6 -14,4	5,0 -1,4	1,3 -1,8	3,7 +1,2
	Interday	11,2 -8,1	13,4 +13,3	8,8 +8,8	2,6 +4,1
BOH	Intraday	5,8 -5,6	1,0 +0,4	5,8 -3,6	4,5 -1,6
	Interday	4,9 -10,5	3,8 +2,8	4,8 -2,0	6,5 -4,2
9,11-Epoxy-BOH	Intraday	7,3 -0,7	2,0 -2,5	3,9 +0,2	1,6 -2,0
	Interday	19,4 -13,7	2,3 -0,1	1,4 +0,5	0,5 -1,2
B-17-P	Intraday	9,8 -17,3	3,6 -2,1	2,3 +2,8	2,9 -1,1
	Interday	8,1 -12,5	2,9 -1,6	2,6 +2,3	4,3 -2,8

8.4.4 Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze wurde, wie bereits unter Abschnitt 8.2.4 beschrieben, in Übereinstimmung mit der unteren Grenze des gewählten Arbeitsbereichs (*siehe Tab. 21 unter Abschnitt 8.4.2*) gewählt.

8.4.5 Extraktionseffektivität

In Ermangelung ausreichender Leermatrix wurde die Extraktionseffektivität, abweichend von der Bestimmung unter Abschnitt 8.3.5, über das Verhältnis der Steigungen der Kalibriergeraden ermittelt (siehe Tab. 23). Dazu wurde der Quotient der Steigung der Geraden bei Messung nach Extraktion und Messung nach direkter Injektion von Standardproben aus MeOH gebildet und prozentual nach *Fml. 11* ausgedrückt.

$$\text{Fml. 11} \quad E [\%] = a_{\text{extrahiert}} / a_{\text{direkt}} \cdot 100 \%$$

Mit:

$a_{\text{extrahiert}}$ = Steigung der Kalibrierfunktion mit extrahierten Standardproben

a_{direkt} = Steigung der Kalibrierfunktion mit methanolischen Standardproben nach direkter Injektion

E = Extraktionseffektivität

Tab. 23: Ergebnisse der Bestimmung der Extraktionseffektivität bei Messungen aus Schafsherzgewebe im Arbeitsbereich zwischen 5 und 300 ng/mL, ausgedrückt als Verhältnis der Steigungen der Kalibriergeraden nach Extraktion (obere Kalibrierfunktion) und direkter Injektion aus MeOH (untere Kalibrierfunktion). In [%] (± 95 % Konfidenzintervall). Sechs Kalibrierpunkte. $n = 3$.

	Kalibrierfunktionen (KI)	R ²	Extraktions- effektivität [%]
DX	Y= 5,3183 ($\pm 0,0430$) X + 0,0238 ($\pm 0,0067$) Y= 4,9219 ($\pm 0,0445$) X + 0,0149 ($\pm 0,0073$)	0,9999 0,9998	108
17-Oxo-DX	Y= 1,7607 ($\pm 0,0268$) X + 0,0010 ($\pm 0,0040$) Y= 1,6692 ($\pm 0,0195$) X - 0,0009 ($\pm 0,0031$)	0,9991 0,9996	105
GCX	Y= 3,5861 ($\pm 0,0798$) X + 0,0445 ($\pm 0,0076$) Y= 3,2274 ($\pm 0,0750$) X + 0,0086 ($\pm 0,0072$)	0,9999 0,9981	111
BOH	Y= 5,1022 ($\pm 0,2222$) X + 0,1562 ($\pm 0,0355$) Y= 3,7568 ($\pm 0,0439$) X + 0,0102 ($\pm 0,0076$)	0,9999 0,9995	136
9,11-Epoxy- BOH	Y= 2,7798 ($\pm 0,0383$) X + 0,0048 ($\pm 0,0056$) Y= 2,5466 ($\pm 0,0136$) X + 0,0017 ($\pm 0,0020$)	0,9999 0,9999	106
B-17-P	Y= 3,4133 ($\pm 0,0770$) X + 0,0630 ($\pm 0,0121$) Y= 2,8587 ($\pm 0,0374$) X + 0,0048 ($\pm 0,0059$)	0,9997 0,9994	119

Zur Berichtigung der Analysenergebnisse spielten die ermittelten Werte keine Rolle, da alle Kalibrierungen nach erfolgter Extraktion aus Leermatrix erfolgte.

D Tabellarischer Anhang

1 Charakterisierung und Vergleich der Freisetzung der Glucocorticoide aus der Polymermatrix

Tab. 24: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für Collar-Gewichte, absoluten und relativen (m/m) Gehalt. Angegebene Masse entspricht jeweils zwei Collar, da paarweise Einwaage (10x2 Stück/Collar-Typ). Angegebener Soll-Gehalt laut Hersteller für DXA 33 %, für GCX und BDP 20 %.

	Gewicht [mg]			Gehalt absolut [μg]			Gehalt relativ [%] (m/m)		
	DXA	GCX	BDP	DXA	GCX	BDP	DXA	GCX	BDP
1	1,59	1,80	1,57	257	172	147	32	19	19
2	1,60	1,74	1,57	259	169	150	32	19	19
3	1,57	1,80	1,57	263	176	151	34	20	19
4	1,66	1,80	1,59	286	175	151	34	19	19
5	1,67	1,82	1,53	282	171	148	34	19	19
6	1,60	1,82	1,55	283	174	153	35	19	20
7	1,68	1,79	1,59	261	154	157	31	17	20
8	1,63	1,79	1,54	261	160	150	32	18	20
9	1,64	1,86	1,55	250	161	148	31	17	19
10	1,64	1,78	1,53	268	151	152	33	17	20
Mittelwert	1,63	1,80	1,56	267	166	151	33	18	19
SD	0,037	0,031	0,022	12	9	3	1,5	1,0	0,4
CI (95 %)	0,023	0,019	0,014	7,6	5,6	1,7	0,9	0,6	0,2

Tab. 25: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für DXA nach Freisetzung aus LTSC in MeOH.

Zeit [min]	Freigesetztes DXA [µg]						Mittel wert	SD	CI (95 %)
	1	2	3	4	5	6			
30	46	43	41	45	44	44	44	1,6	1,3
90	78	74	73	79	77	77	76	2,3	1,9
180	113	108	108	117	115	114	112	3,8	3,0
360	155	150	149	159	158	156	155	4,0	3,2
720	205	198	197	204	204	202	201	3,2	2,6
1440	247	245	243	252	251	251	248	3,5	2,8
Rest	23	21	6	8	10	14	14	6,7	5,3

Tab. 26: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für GCX nach Freisetzung aus LTSC in MeOH.

Zeit [min]	Freigesetztes GCX [µg]						Mittel wert	SD	CI (95 %)
	1	2	3	4	5	6			
30	3	3	3	3	3	3	3	0,3	0,2
90	5	5	5	5	5	5	5	0,3	0,2
180	8	7	8	8	7	7	7	0,2	0,2
360	11	10	11	11	11	11	11	0,2	0,2
720	15	15	15	15	15	15	15	0,3	0,2
1440	20	20	20	21	21	21	21	0,8	0,6
Rest	143	148	147	137	133	155	144	7,8	6,2

Tab. 27: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für BDP nach Freisetzung aus LTSC in MeOH.

Zeit [min]	Freigesetztes BDP [µg]						Mittel wert	SD	CI (95 %)
	1	2	3	4	5	6			
30	15	17	15	13	16	14	15	1,4	1,1
90	26	31	28	23	28	26	27	2,6	2,1
180	38	44	40	34	43	40	40	3,8	3,0
360	53	63	56	49	62	58	57	5,2	4,1
720	73	90	77	66	82	78	78	7,9	6,3
1440	96	117	102	91	108	103	103	8,9	7,1
Rest	49	46	47	50	37	37	44	6,0	4,8

2 Charakterisierung des Freisetungsverhaltens der Glucocorticoide aus der Polymermatrix in Humanplasma

2.1 Ergebnisse der Freisetzungsversuche

Tab. 28: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für insgesamt freigesetztes DXA als Summe aller erfassten Analyten nach Freisetzung aus LTSC in Humanplasma.

Zeit [d]	Freigesetztes DXA [µg]						Mittelwert	SD	CI (95 %)
	1	2	3	4	5	6			
1	4,5	3,2	3,2	3,7	3,6	4,1	3,7	0,52	0,41
2	4,3	4,6	4,7	3,0	3,7	3,5	4,0	0,68	0,54
5	6,9	5,6	5,7	3,5	5,3	4,9	5,3	1,10	0,88
10	9,1	8,4	8,3	3,8	5,7	5,8	6,8	2,07	1,65
15	8,4	7,9	9,3	5,6	6,7	6,7	7,4	1,35	1,08
20	10,0	7,5	10,4	5,6	7,2	12,2	8,8	2,45	1,96
28	9,9	7,8	9,6	6,0	7,9	11,8	8,8	2,03	1,62
Rest	264	265	253	260	265	264	262	4,8	3,8

Tab. 29: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für die Analyten DX, 17-Oxo-DX und DXA nach Freisetzung von DXA aus LTSC in Humanplasma.

Zeit [d]	Nach Freisetzung analysiertes DX [µg]						Mittelwert	SD	CI (95 %)
	1	2	3	4	5	6			
1	3,0	0,7	0,4	1,9	1,7	2,3	1,6	0,97	0,78
2	2,4	2,7	2,6	1,0	1,4	1,3	1,9	0,76	0,61
5	4,0	2,9	0,9	0,8	1,5	1,7	2,0	1,23	0,98
10	4,4	4,2	4,0	0,4	1,0	1,4	2,6	1,82	1,46
15	3,3	2,7	3,5	1,2	1,3	0,7	2,1	1,18	0,95
20	4,3	1,7	4,2	0,6	1,1	6,9	3,1	2,44	1,95
28	2,6	0,5	0,8	0,2	0,6	4,8	1,6	1,77	1,42

Nach Freisetzung analysiertes 17-Oxo-DX [µg]									
	1	2	3	4	5	6	Mittelwert	SD	CI (95 %)
1	1,3	2,3	2,3	1,5	1,7	1,5	1,7	0,43	0,35
2	1,7	1,7	1,6	1,8	2,0	1,8	1,8	0,15	0,12
5	2,5	2,5	4,4	2,6	3,5	2,9	3,1	0,75	0,60
10	4,3	3,8	4,0	3,3	4,2	4,2	4,0	0,36	0,29
15	5,0	4,9	5,7	3,9	5,2	6,0	5,1	0,71	0,57
20	5,6	5,8	6,1	4,6	6,0	5,1	5,5	0,58	0,46
28	7,0	6,7	8,4	5,4	6,8	6,9	6,9	0,98	0,79
Nach Freisetzung analysiertes DXA [µg]									
	1	2	3	4	5	6	Mittelwert	SD	CI (95 %)
1	0,2	0,3	0,5	0,3	0,3	0,4	0,3	0,08	0,07
2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,3	0,4	0,3	0,12	0,09
5	0,4	0,2	0,4	0,2	0,3	0,4	0,3	0,08	0,07
10	0,4	0,3	0,2	0,0	0,4	0,2	0,3	0,14	0,11
15	0,2	0,3	0,1	0,4	0,3	0,0	0,2	0,13	0,10
20	0,1	0,0	0,1	0,3	0,1	0,2	0,1	0,10	0,08
28	0,3	0,5	0,3	0,4	0,5	0,1	0,3	0,16	0,13

Tab. 30: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für freigesetztes GCX nach Freisetzung aus in Humanplasma.

Zeit [d]	Freigesetztes GCX [µg]						Mittelwert	SD	CI (95 %)
	1	2	3	4	5	6			
1	2,4	2,2	2,6	1,8	1,7	1,5	2,0	0,43	0,34
2	3,1	2,9	3,3	2,8	2,6	2,4	2,9	0,33	0,26
5	5,2	4,8	5,5	5,6	4,5	4,2	5,0	0,57	0,46
10	6,3	6,3	7,4	6,8	6,4	6,1	6,5	0,48	0,38
15	7,5	7,7	8,4	10,0	7,8	7,6	8,2	0,95	0,76
20	8,9	9,1	10,2	9,6	9,0	9,0	9,3	0,51	0,40
28	10,5	10,5	12,0	11,1	10,3	10,3	10,8	0,68	0,54
Rest	146	150	153	157	160	156	154	5,0	4,0

Tab. 31: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für insgesamt freigesetztes BDP als Summe aller erfassten Analyten nach Freisetzung aus LTSC in Humanplasma.

Zeit [d]	Freigesetztes BDP [µg]						Mittelwert	SD	CI (95 %)
	1	2	3	4	5	6			
1	8,8	8,6	8,6	10,1	9,0	9,4	9,1	0,56	0,45
2	15,7	15,1	14,5	17,3	15,5	15,7	15,6	0,92	0,74
5	26,9	25,8	25,6	29,0	26,6	28,3	27,0	1,34	1,07
10	33,4	33,0	31,8	36,8	34,4	35,2	34,1	1,76	1,41
15	35,7	37,8	37,0	40,8	38,7	38,7	38,1	1,74	1,39
20	27,3	36,8	36,8	33,7	39,2	38,0	35,3	4,34	3,48
28	27,5	37,1	36,8	28,3	40,2	37,3	34,5	5,29	4,24
Rest	91	88	89	89	92	83	89	2,9	2,3

D Tabellarischer Anhang

Tab. 32: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für die Analyten BOH, 9,11-Epoxy-BOH und BDP nach Freisetzung von BDP aus LTSC in Humanplasma.

Zeit [d]	Nach Freisetzung analysiertes BOH [µg]						Mittelwert	SD	CI (95 %)
	1	2	3	4	5	6			
1	2,0	2,2	1,9	2,0	2,0	2,5	2,1	0,23	0,19
2	1,3	2,0	1,1	1,1	1,7	2,2	1,6	0,45	0,36
5	0,1	0,8	0,3	0,3	0,7	1,0	0,5	0,32	0,26
10	0,1	0,7	0,4	0,4	0,7	0,9	0,6	0,29	0,23
15	1,0	0,9	0,6	0,5	0,8	0,9	0,8	0,20	0,16
20	2,0	0,5	0,4	1,2	0,6	0,6	0,9	0,62	0,49
28	2,5	0,9	0,8	2,1	1,1	1,0	1,4	0,73	0,58
	Nach Freisetzung analysiertes 9,11-Epoxy-BOH [µg]						Mittelwert	SD	CI (95 %)
	1	2	3	4	5	6			
1	3,9	3,6	4,1	5,1	4,2	3,9	4,1	0,52	0,42
2	12,3	10,9	11,3	14,0	11,6	11,5	11,9	1,10	0,88
5	25,2	23,6	23,8	27,1	24,4	25,8	25,0	1,35	1,08
10	31,9	30,9	30,1	34,9	32,3	32,9	32,2	1,67	1,34
15	33,2	35,6	35,2	38,9	36,6	36,5	36,0	1,88	1,50
20	22,4	34,9	35,2	30,8	37,4	36,1	32,8	5,55	4,44
28	19,4	34,7	34,6	20,8	37,6	34,7	30,3	8,00	6,40
	Nach Freisetzung analysiertes BDP [µg]						Mittelwert	SD	CI (95 %)
	1	2	3	4	5	6			
1	2,9	2,9	2,7	3,0	2,9	2,9	2,9	0,10	0,08
2	2,2	2,2	2,1	2,1	2,2	2,1	2,1	0,06	0,05
5	1,5	1,5	1,4	1,5	1,6	1,5	1,5	0,04	0,03
10	1,3	1,3	1,3	1,4	1,4	1,3	1,3	0,05	0,04
15	1,5	1,3	1,3	1,3	1,4	1,3	1,3	0,07	0,06
20	2,8	1,3	1,2	1,7	1,3	1,3	1,6	0,63	0,50
28	5,5	1,5	1,4	5,4	1,5	1,5	2,8	2,06	1,65

2.2 Bestimmung der Aufnahmekapazität für Glucocorticoide in Humanplasma

Tab. 33: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen aufgeschlüsselt nach den Analyten DX, 17-Oxo-DX in Humanplasma.

	Plasmabindung für DXA [µg/mL]		
	DX	17-Oxo-DX	Gesamt
1	39,4	3,0	42,4
2	32,9	2,4	35,3
3	40,0	2,9	42,8
Mittelwert	37,5	2,7	40,2
SD	3,92	0,31	4,22
CI (95 %)	4,44	0,35	4,78

Tab. 34: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für GCX in Humanplasma.

	Plasmabindung für GCX [µg/mL]	
	3 Tage	5 Tage
1	1,6	1,4
2	1,1	1,9
3	1,3	1,6
Mittelwert	1,3	1,6
SD	0,27	0,27
CI (95 %)	0,31	0,31

D Tabellarischer Anhang

Tab. 35: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen aufgeschlüsselt nach den Analyten BOH, 9,11-Epoxy-BOH, B-17-P, B-21-P und BDP in Humanplasma.

	Plasmabindung für BDP [µg/mL]					Gesamt
	BOH	9,11- Epoxy- BOH	B-17-P	B-21-P	BDP	
1	5,8	1,6	2,8	0,2	0,7	11,1
2	4,4	0,8	5,4	0,1	1,1	11,8
3	4,0	0,9	3,6	0,1	0,7	9,3
Mittelwert	4,7	1,1	3,9	0,1	0,8	10,7
SD	0,92	0,46	1,34	0,04	0,21	1,26
CI (95 %)	1,05	0,52	1,52	0,05	0,24	1,43

3 Charakterisierung der lokalen Gewebefindung der Glucocorticoide an der Schnittstelle zwischen Herzgewebe und Herzschrittmacherelektrode

Tab. 36: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für DXA beziehungsweise dessen Abbauprodukte nach Freisetzung aus LTSC in Humanplasma und Verteilung in Gewebe-Gel beziehungsweise Kollagen-Gel.

		DXA-Abbauprodukte [ng/mL] in Humanplasma				
Zeit [d]	1	2	5		Gesamt	
	DX	DX	DX	17-Oxo-DX		
1	147	147	132	38	170	
2	113	145	253	12	266	
3	109	130	209	21	231	
Mittelwert	123	141	198	24	222	
SD	21	9	61	13	48	
CI (95 %)	24	10	69	15	55	
		in Gewebe-Gel				
Zeit [d]	1	2	5		Gesamt	
	DX	DX	DX	17-Oxo-DX		
1	53	97	54	26	80	
2	45	67	117	7	124	
3	36	55	146	17	163	
Mittelwert	45	73	106	16	122	
SD	9	22	47	10	41	
CI (95 %)	10	24	53	11	47	

Fortsetzung Tab.36

Zeit [d]	in Kollagen-Gel				
	1 DX	2 DX	DX	5 17-Oxo-DX	Gesamt
1	35	43	39	33	72
2	37	34	17	0	17
3	13	28	35	19	54
Mittelwert	29	35	30	17	47
SD	13	8	12	17	28
CI (95 %)	32	40	34	20	54

Tab. 37: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für GCX nach Freisetzung aus LTSC in Humanplasma und Verteilung in Gewebe-Gel beziehungsweise Kollagen-Gel.

Zeit [d]	GCX [ng/mL] in Humanplasma		
	1	2	5
1	25	25	82
2	18	34	92
3	29	45	88
Mittelwert	24	35	88
SD	6	10	5
CI (95 %)	7	11	6
Zeit [d]	in Gewebe-Gel		
	1	2	5
1	10	7	39
2	0	3	39
3	0	13	31
Mittelwert	3	8	37
SD	6	5	5
CI (95 %)	6	6	5

Fortsetzung Tab.37

Zeit [d]	in Kollagen-Gel		
	1	2	5
1	0	0	6
2	0	0	0
3	0	8	6
Mittelwert	0	3	4
SD	0	5	3
CI (95 %)	0	3	4

Tab. 38: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für BDP beziehungsweise dessen Abbauprodukte nach Freisetzung aus LTSC in Humanplasma und Verteilung in Gewebe-Gel beziehungsweise Kollagen-Gel.

Zeit [d]	BDP Gesamt [ng/mL] in Humanplasma											
	1				2				5			
	BOH	B-17-P	BDP	Gesamt	BOH	9,11-Epoxy-BOH	B-17-P	Gesamt	BOH	9,11-Epoxy-BOH	B-17-P	Gesamt
1	48	111	18	177	127	24	79	230	268	94	161	522
2	29	80	29	139	87	20	111	218	271	121	124	516
3	20	123	35	177	84	23	92	199	205	174	42	422
Mittelwert	32	105	28	165	99	22	94	216	248	130	109	487
SD	14	22	9	22	24	2	16	15	37	41	61	56
CI (95 %)	16	25	10	25	27	3	18	17	42	46	69	64

in Gewebe-Gel												
Zeit [d]	1				2				5			
	BOH	B-17-P	BDP	Gesamt	BOH	9,11-Epoxy-BOH	B-17-P	Gesamt	BOH	9,11-Epoxy-BOH	B-17-P	Gesamt
1	18	54	0	72	16	18	101	134	94	31	62	186
2	16	56	0	71	31	0	76	107	153	51	56	260
3	24	32	0	56	90	0	61	151	132	114	25	271
Mittelwert	19	47	0	67	45	6	79	131	126	65	48	239
SD	4	13	0	9	39	10	20	22	30	43	20	46
CI (95 %)	5	15	0	11	44	12	23	25	34	49	22	52
in Kollagen-Gel												
Zeit [d]	1				2				5			
	BOH	B-17-P	BDP	Gesamt	BOH	9,11-Epoxy-BOH	B-17-P	Gesamt	BOH	9,11-Epoxy-BOH	B-17-P	Gesamt
1	0	37	0	37	0	0	39	39	32	29	25	91
2	0	0	0	0	12	0	0	14	29	16	24	73
3	0	0	0	0	19	0	0	23	23	12	26	63
Mittelwert	0	12	0	12	10	0	13	25	28	19	25	76
SD	0	21	0	21	10	0	22	13	4	9	1	14
CI (95 %)	0	14	0	14	12	0	15	29	32	21	28	86

Tab. 39: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für die Bindekapazität des eingesetzten Schafsherzgewebes (0,5 g) für die Hauptanalyten DX, GCX und BOH.

	Bindekapazität des Schafsherzgewebes [µg/mL]		
	DX	GCX	BOH
1	2,7	7,5	4,2
2	2,8	7,5	4,1
3	2,8	7,5	4,1
Mittelwert	2,8	7,5	4,1
SD	0,06	0,01	0,03
CI (95 %)	0,07	0,01	0,04

Tab. 40: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für die unspezifische Bindung an Kunststoffmaterialien des Modellaufbaus für DXA, GCX und BDP.

	Unspezifische Bindung Wiederfindung [%]		
	DXA	GCX	BDP
1	83	85	81
2	84	89	89
3	82	91	98
Mittelwert	83	88	89
SD	1	3	8
CI (95 %)	1	3	10

4 *In-vitro* Versuche zur Stimulation von Endothelzellen mittels externem Herzschrittmachersystem

4.1 Stimulation mit einer bipolaren Elektrode über 24 Stunden

Tab. 41: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für IL-6, IL-8, MMP-9 und MCP-1 bei Stimulation mit einer bipolaren Elektrode über 24 Stunden. N1 und 2= Negativ-Kontrolle-1 und -2.

IL-6 [pg/mL]/100000 Zellen											
	1	2	3	4	5	6	7	8	Mittelwert	SD	CI (95 %)
N1	0,9	1,0	0,9	0,8	0,9	0,6	0,6	0,8	0,8	0,1	0,1
LPS	4,0	4,5	3,0	3,7	3,2	2,5	2,5	3,0	3,3	0,7	0,5
Strom	0,9	0,5	1,0	0,9	0,9	1,0	1,1	0,8	0,9	0,2	0,1
N2	0,8	0,8	0,6	0,7	0,7	1,1	0,9	0,7	0,8	0,1	0,1
IL-8 [pg/mL]/100000 Zellen											
	1	2	3	4	5	6	7	8	Mittelwert	SD	CI (95 %)
N1	21,5	18,6	11,8	9,3	8,0	36,4	35,7	31,7	21,6	11,0	7,6
LPS	70,6	60,6	66,0	57,2	48,4	92,0	83,2	82,9	70,1	14,0	9,7
Strom	21,8	32,0	17,2	16,2	13,5	73,2	47,1	53,9	34,4	20,2	14,0
N2	27,6	35,6	11,2	9,5	13,9	35,6	36,8	33,6	25,5	11,2	7,7
MMP-9 [pg/mL]/100000 Zellen											
	1	2	3	4	5	6	7	8	Mittelwert	SD	CI (95 %)
N1	3,0	2,4	1,6	-	-	-	-	-	2,3	0,7	0,8
LPS	3,8	4,3	4,4	-	-	-	-	-	4,2	0,3	0,3
Strom	2,8	2,1	2,1	-	-	-	-	-	2,3	0,4	0,5
N2	2,0	1,9	2,4	-	-	-	-	-	2,1	0,3	0,3

Fortsetzung Tab.41

	MCP-1 [pg/mL]/100000 Zellen								Mittel wert	SD	CI (95 %)
	1	2	3	4	5	6	7	8			
N1	24,5	26,2	21,1	-	-	-	-	-	23,9	2,6	2,9
LPS	74,2	87,8	61,8	-	-	-	-	-	74,6	13,0	14,7
Strom	25,4	23,2	17,9	-	-	-	-	-	22,2	3,8	4,3
N2	25,9	21,4	18,5	-	-	-	-	-	21,9	3,8	4,3

4.2 Stimulationsversuche mit 2 unipolaren Elektroden über 48 Stunden

Tab. 42: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für IL-6, IL-8, MMP-9, MCP-1 und VEGF bei Stimulation mit einer bipolaren Elektrode über 48 Stunden. N= Negativ-Kontrolle.

IL-6 [pg/mL]/100000 Zellen						
	1	2	3	Mittelwert	SD	CI (95 %)
N 24 h	0,6	1,1	2,0	1,2	0,6	0,7
LPS 24 h	3,5	5,0	7,7	5,4	1,7	2,0
Strom 24 h	-	1,0	1,7	1,3	0,4	0,4
N 48 h	-	2,1	3,0	2,6	0,5	0,6
LPS 48 h	-	7,9	12,0	9,9	2,0	2,3
Strom 48 h	-	1,5	2,9	2,2	0,7	0,8
IL-8 [pg/mL]/100000 Zellen						
	1	2	3	Mittelwert	SD	CI (95 %)
N 24 h	37,3	64,9	25,3	42,5	16,6	18,8
LPS 24 h	162,0	133,2	121,3	138,8	17,1	19,3
Strom 24 h	38,4	64,1	25,4	42,6	16,1	18,2
N 48 h	84,1	102,1	43,2	76,5	24,6	27,9
LPS 48 h	308,7	231,5	260,8	267,0	31,8	36,0
Strom 48 h	77,4	113,6	43,6	78,2	28,6	32,3
MMP-9 [pg/mL]/100000 Zellen						
	1	2	3	Mittelwert	SD	CI (95 %)
N 24 h	5,0	4,2	4,2	4,5	0,4	0,4
LPS 24 h	16,7	9,7	12,6	13,0	2,9	3,3
Strom 24 h	4,5	4,4	5,4	4,8	0,4	0,5
N 48 h	13,9	15,4	10,9	13,4	1,9	2,1
LPS 48 h	57,7	51,7	44,4	51,3	5,4	6,1
Strom 48 h	19,7	17,4	11,1	16,1	3,6	4,1

Fortsetzung Tab.42

MCP-1 [pg/mL]/100000 Zellen						
	1	2	3	Mittelwert	SD	CI (95 %)
N 24 h	217,4	186,3	164,5	189,4	21,7	24,6
LPS 24 h	336,2	229,6	361,9	309,2	57,3	64,8
Strom 24 h	188,8	169,1	135,9	164,6	21,8	24,7
N 48 h	424,6	283,2	286,8	331,6	65,8	74,5
LPS 48 h	590,1	361,6	561,2	504,3	101,6	115,0
Strom 48 h	380,5	225,5	252,4	286,2	67,6	76,5
VEGF [pg/mL]/100000 Zellen						
	1	2	3	Mittelwert	SD	CI (95 %)
N 24 h	5,3	2,6	5,7	4,5	1,4	1,6
LPS 24 h	6,9	4,4	9,5	6,9	2,1	2,3
Strom 24 h	10,2	2,5	5,5	6,1	3,2	3,6
N 48 h	11,4	6,1	15,4	11,0	3,8	4,3
LPS 48 h	14,5	4,2	15,6	11,4	5,1	5,8
Strom 48 h	12,9	2,9	13,2	9,7	4,8	5,4

5 *In-vitro* Vergleich der Bioaktivitäten der eingesetzten Glucocorticoide nach Freisetzung aus der Polymermatrix

5.1 Vergleich mit inkrementeller Dosiszugabe

Tab. 43: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für IL-6 und MMP-9 nach inkrementeller Glucocorticoid-Zugabe über 48 Stunden. N= Negativ-Kontrolle.

	IL-6 [pg/mL]/100000 Zellen			Mittelwert	SD	CI (95 %)
	1	2	3			
N 24 h	0,37	0,42	0,47	0,42	0,04	0,05
LPS 24 h	1,21	1,39	0,99	1,20	0,17	0,19
DXA 24 h	0,95	0,92	0,81	0,89	0,06	0,07
GCX 24 h	0,83	0,93	0,69	0,82	0,10	0,11
BDP 24 h	0,70	0,86	0,72	0,76	0,07	0,08
N 48 h	0,55	0,61	0,57	0,57	0,03	0,03
LPS 48 h	2,50	2,71	2,13	2,45	0,24	0,27
DXA 48 h	2,41	2,31	1,98	2,23	0,19	0,21
GCX 48 h	2,33	2,25	1,73	2,10	0,27	0,30
BDP 48 h	1,93	2,16	1,70	1,93	0,19	0,21
	MMP-9 [pg/mL]/100000 Zellen					
	1	2	3	Mittelwert	SD	CI (95 %)
N 24 h	4,10	3,17	2,55	3,27	0,64	0,73
LPS 24 h	12,13	9,84	7,76	9,91	1,78	2,02
DXA 24 h	4,41	7,24	5,76	5,80	1,16	1,31
GCX 24 h	5,50	4,16	5,99	5,22	0,77	0,88
BDP 24 h	3,30	4,93	4,07	4,10	0,67	0,76
N 48 h	9,51	9,67	7,39	8,86	1,04	1,18
LPS 48 h	31,09	27,16	29,75	29,33	1,63	1,85
DXA 48 h	23,36	18,45	21,01	20,94	2,01	2,27
GCX 48 h	26,32	14,76	20,19	20,42	4,72	5,34
BDP 48 h	10,52	15,80	17,27	14,53	2,90	3,28

5.2 Vergleich mit Freisetzung aus LTSC

Tab. 44: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für IL-6 und MMP-9 nach Glucocorticoid-Freisetzung aus LTSC in modifiziertes Zellkulturmedium DMEM über 48 Stunden. N= Negativ-Kontrolle. BSA= Freisetzungsmedium mit BSA.

	IL-6 [pg/mL]/100000 Zellen			Mittelwert	SD	CI (95 %)
	1	2	3			
N 24 h	0,91	0,98	0,84	0,91	0,05	0,06
LPS 24 h	9,36	10,45	8,22	9,34	0,91	1,03
BSA 24 h	1,49	1,53	1,48	1,50	0,02	0,02
DXA 24 h	6,41	5,94	5,77	6,04	0,27	0,31
GCX 24 h	5,88	5,24	5,16	5,43	0,32	0,36
BDP 24 h	5,90	5,45	5,05	5,47	0,35	0,39
N 48 h	1,38	1,40	1,23	1,33	0,08	0,09
LPS 48 h	20,71	21,54	18,22	20,16	1,41	1,60
BSA 48 h	2,98	2,77	2,70	2,81	0,12	0,14
DXA 48 h	14,92	14,49	16,02	15,14	0,65	0,73
GCX 48 h	13,14	11,69	11,29	12,04	0,80	0,90
BDP 48 h	13,63	13,60	12,05	13,09	0,74	0,83
	MMP-9 [pg/mL]/100000 Zellen					
	1	2	3	Mittelwert	SD	CI (95 %)
N 24 h	0,54	0,62	0,00	0,39	0,27	0,31
LPS 24 h	2,00	3,41	1,58	2,33	0,78	0,88
BSA 24 h	0,52	0,96	0,43	0,64	0,23	0,26
DXA 24 h	1,06	1,00	0,70	0,92	0,16	0,18
GCX 24 h	0,60	0,72	0,96	0,76	0,15	0,17
BDP 24 h	0,65	0,93	1,44	1,00	0,33	0,37
N 48 h	0,73	1,11	1,07	0,97	0,17	0,19
LPS 48 h	5,39	7,79	4,81	6,00	1,29	1,46
BSA 48 h	1,24	3,31	0,78	1,78	1,10	1,24
DXA 48 h	3,55	2,12	2,63	2,77	0,59	0,67
GCX 48 h	2,37	2,70	2,83	2,63	0,19	0,22
BDP 48 h	2,02	3,66	3,90	3,19	0,83	0,94

5.3 *In-vitro* Freisetzung der Glucocorticoide aus LTSC

Tab. 45: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für insgesamt freigesetztes DXA als Summe aller erfassten Analyten nach Freisetzung aus LTSC in Zellkulturmedium DMEM mit 6 % BSA.

	Freigesetztes DXA [ng/mL]			Mittelwert	SD	CI (95 %)
	1	2	3			
24	317	365	329	337	20	23
48	335	365	325	342	17	19

Tab. 46: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für die Analyten DX und DXA nach Freisetzung von DXA aus LTSC in Zellkulturmedium DMEM mit 6 % BSA. 17-Oxo-DX trat nicht auf.

	Nach Freisetzung analysiertes DX [ng/mL]			Mittelwert	SD	CI (95 %)
	1	2	3			
24	189	228	208	208	16	18
48	261	288	256	268	14	16
	Nach Freisetzung analysiertes DXA [ng/mL]			Mittelwert	SD	CI (95 %)
	1	2	3			
24	128	137	121	129	7	7
48	74	77	69	73	3	4

Tab. 47: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für insgesamt freigesetztes GCX als Summe aller erfassten Analyten nach Freisetzung aus LTSC in Zellkulturmedium DMEM mit 6 % BSA.

	Freigesetztes GCX [ng/mL]			Mittelwert	SD	CI (95 %)
	1	2	3			
24	70	72	65	69	3	4
48	100	101	101	101	0	1

Tab. 48: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für insgesamt freigesetztes BDP als Summe aller erfassten Analyten nach Freisetzung aus LTSC in Zellkulturmedium DMEM mit 6 % BSA.

	Freigesetztes BDP [ng/mL]			Mittelwert	SD	CI (95 %)
	1	2	3			
24	354	394	279	342	48	54
48	461	491	409	454	34	38

Tab. 49: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für die Analyten BOH, 9,11-Epoxy-BOH, B17P, B21P und BDP nach Freisetzung von BDP aus LTSC in Zellkulturmedium DMEM mit 6 % BSA.

	Nach Freisetzung analysiertes BOH [ng/mL]			Mittelwert	SD	CI (95 %)
	1	2	3			
24	43	46	30	40	7	8
48	139	151	114	135	15	17
	Nach Freisetzung analysiertes 9,11-Epoxy-BOH [ng/mL]			Mittelwert	SD	CI (95 %)
	1	2	3			
24	-	-	-	-	-	-
48	31	34	16	27	8	9
	Nach Freisetzung analysiertes B17P [ng/mL]			Mittelwert	SD	CI (95 %)
	1	2	3			
24	24	30	18	24	5	6
48	23	25	25	24	1	1
	Nach Freisetzung analysiertes B21P [ng/mL]			Mittelwert	SD	CI (95 %)
	1	2	3			
24	8	14	0	7	6	6
48	25	27	21	24	2	3
	Nach Freisetzung analysiertes BDP [ng/mL]			Mittelwert	SD	CI (95 %)
	1	2	3			
24	279	304	231	271	30	34
48	243	254	233	243	9	10

6 Einfluss von Glucocorticoiden auf die Zellproliferation der humanen Zelllinien EA.hy926 und IMR-90

Tab. 50: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für Zellzahlen nach inkrementeller Glucocorticoid-Zugabe über sieben Tage zu Endothelzellen EA.hy926 und Fibroblasten IMR-90 bei Aussaat von 1000 beziehungsweise 2000 Zellen/Ansatz. N= Negativ-Kontrolle. 2-ME= 2-Methoxyestradiol.

24 h	EA.hy926					IMR-90				
	N	2-ME	DXA	GCX	BDP	N	2-ME	DXA	GCX	BDP
1	1682	1184	874	1770	1161	2356	1764	2067	1938	2057
2	1839	1081	1558	1581	1563	2069	1184	1831	1708	2087
3	1429	1386	1678	1578	1638	1787	1537	1898	1547	1536
4	1303	1599	2069	1698	1426	2278	1070	2406	2522	2340
5	1165	1397	1977	1483	1408	1938	2015	1740	1577	1701
6	1752	1633	1919	1588	1767	2026	2032	2145	2371	1666
7	1530	1494	1174	812	1684	2350	1302	1884	1595	2878
8	1350	1217	976	1023	1395	2539	1397	1876	1891	2015
Mittelwert	1506	1374	1528	1442	1505	2168	1538	1981	1894	2035
SD	221	187	437	318	183	236	343	201	348	404
CI (95 %)	153	130	303	220	127	164	238	139	241	280
48 h	EA.hy926					IMR-90				
	N	2-ME	DXA	GCX	BDP	N	2-ME	DXA	GCX	BDP
1	1914	1395	1876	1856	1964	1869	1163	1581	1066	1599
2	2316	1470	2369	1889	2499	1938	825	1754	1778	1590
3	2104	1313	1750	2417	2784	1369	1045	1300	1789	1468
4	1926	1403	2366	2089	1984	1896	959	2791	1552	1156
5	2096	2282	2368	2503	1977	1538	822	1255	1700	768
6	1847	1612	2331	2272	2222	1598	866	2173	2842	1374
7	1762	1393	1849	1970	2404	1938	1186	1999	2491	1337
8	2147	1671	2083	1930	1945	1876	763	1493	2025	2074
Mittelwert	2014	1567	2124	2116	2223	1753	954	1793	1906	1421
SD	171	292	250	234	293	205	152	481	517	353
CI (95 %)	118	203	173	162	203	142	105	333	358	244

Fortsetzung Tab.50

72 h	EA.hy926					IMR-90				
	N	2-ME	DXA	GCX	BDP	N	2-ME	DXA	GCX	BDP
1	2136	1674	2539	2681	3048	1789	1421	2504	2846	1469
2	2607	1417	2347	2885	2832	1432	683	3183	2437	2484
3	2677	1835	2723	2501	2953	1925	898	2677	2704	1883
4	2335	1715	3622	2223	2653	1895	768	3551	1828	3019
5	2362	1385	3672	2980	2319	2056	831	2144	2546	3251
6	2340	1432	3649	3092	3183	2179	1216	2786	2680	1856
7	2270	1408	2416	2359	2411	2735	1030	2226	2146	3287
8	2879	1530	3397	2337	2515	1747	1319	1784	3355	2824
Mittelwert	2451	1549	3046	2632	2739	1970	1021	2607	2568	2509
SD	230	159	554	305	293	356	254	537	429	653
CI (95 %)	160	110	384	212	203	247	176	372	297	453
96 h	EA.hy926					IMR-90				
	N	2-ME	DXA	GCX	BDP	N	2-ME	DXA	GCX	BDP
1	3547	883	4582	3512	4285	2764	1414	3063	2699	2877
2	3140	1208	5017	3699	3876	1907	1275	2928	2668	3776
3	4051	1452	3989	4014	3474	2549	680	4003	3319	3973
4	4853	1302	3535	3938	2649	1456	876	3473	2959	3820
5	4822	1459	4319	4105	2926	3230	1190	4253	3740	2855
6	3871	1589	5120	4845	3757	2796	1109	2779	4183	3245
7	3683	1376	3940	3964	2946	2243	1257	2769	2633	3945
8	4645	1358	3627	3186	2912	1848	1481	3104	2339	3484
Mittelwert	4076	1328	4266	3908	3353	2349	1160	3296	3067	3497
SD	595	199	562	454	543	553	251	527	590	429
CI (95 %)	413	138	389	315	376	383	174	365	409	297

120 h	EA.hy926					IMR-90				
	N	2-ME	DXA	GCX	BDP	N	2-ME	DXA	GCX	BDP
1	5747	964	6028	3962	5483	2378	739	1779	4051	2280
2	4248	1080	4876	3355	3546	2883	723	2183	2155	1488
3	5847	933	3473	4695	4098	3177	1103	2612	3217	3885
4	3432	1186	6075	5124	3884	3125	701	2409	1480	2675
5	4150	518	6249	3514	2902	2661	903	3103	2287	2747
6	4426	1014	5322	5869	3348	2620	1289	2396	2489	3575
7	4477	1175	4945	3943	3807	3524	584	2041	2478	2201
8	3654	1256	4790	4237	4235	4036	1078	1532	3471	2958
Mittelwert	4498	1016	5220	4337	3913	3050	890	2257	2703	2726
SD	823	216	858	794	715	504	229	460	769	718
CI (95 %)	570	150	594	550	496	349	159	319	533	498
144 h	EA.hy926					IMR-90				
	N	2-ME	DXA	GCX	BDP	N	2-ME	DXA	GCX	BDP
1	4586	988	5879	7015	5310	2641	864	2573	1858	2910
2	3326	839	8462	8235	6313	4173	838	4036	3746	3273
3	5652	841	6487	6491	5712	4145	797	3722	2216	3377
4	6077	818	6719	7245	5859	3057	851	4143	1978	3234
5	3905	1049	7005	7158	6783	4636	742	3616	-	2770
6	7142	837	7882	10049	6576	3171	1491	2362	2815	3029
7	4372	1211	7677	5994	4592	3614	619	2100	4331	4228
8	7510	1171	6329	6234	4560	3420	650	2044	3613	3224
Mittelwert	5321	969	7055	7303	5713	3607	856	3075	2937	3256
SD	1424	150	822	1226	792	626	255	833	900	414
CI (95 %)	987	104	569	850	549	433	176	577	667	287

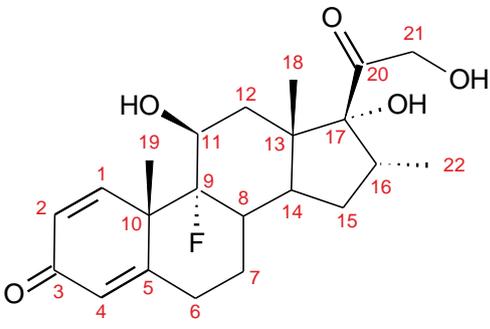
Fortsetzung Tab.50

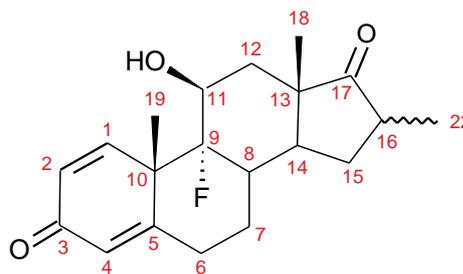
168 h	EA.hy926					IMR-90				
	N	2-ME	DXA	GCX	BDP	N	2-ME	DXA	GCX	BDP
1	8524	1009	7988	8240	9623	2531	591	1892	4976	5892
2	7395	1285	7182	7988	7254	7699	1157	2507	4577	3257
3	6075	1233	8430	7214	8236	4161	939	4167	4800	2311
4	6917	1143	8336	7458	6558	5567	918	5081	5104	3198
5	7198	1389	10127	8871	9111	6636	731	4506	3930	5057
6	8082	1381	8468	9892	8103	4269	684	3101	4396	3930
7	9181	1502	9350	8548	7471	4798	1234	5473	6044	4243
8	7487	1244	7603	8299	6427	3854	-	2495	4388	4894
Mittelwert	7607	1273	8436	8314	7848	4939	893	3653	4777	4098
SD	908	144	879	783	1069	1539	224	1245	592	1091
CI (95 %)	629	100	609	543	741	1066	166	863	411	756

7 Abbauprodukte von Dexamethason und Beclomethason unter Langzeitinkubation in humanem Blutplasma und verschiedenen Puffersystemen

7.1 ¹H-NMR-Daten

Tab. 51: Chemische Verschiebungen der charakteristischen Signale im ¹H-NMR-Spektrum von DX und 17-Oxo-DX/BT aus Humanplasma (DMSO-d₆). ^a = nur in 17-Oxo-DX. ^b = nur in 17-Oxo-BT.

Position	¹ H δ [ppm] (Multiplizität)		Struktur
	DX	17-Oxo-DX/BT	
1	7,3 (d)	7,3 (d)	 <p>Dexamethason (11β,16α)-9-Fluoro-11,17,21-trihydroxy-16-methylpregna-1,4-dien-3,20-dion</p>
2	6,22 (d)	6,24 (d)	
4	6,01	6,04	
11	4,14 (m)	4,14 (m)	
11-OH	5,28	5,51	
17-OH	4,95	-	
18	0,87	1,03 ^a /1,13 ^b	
19	1,49	1,52	
21	4,1/4,5	-	
21-OH	4,67	-	
22 α	0,78 (d)	0,97 (d) ^a	
22 β	-	1,11 (d) ^b	



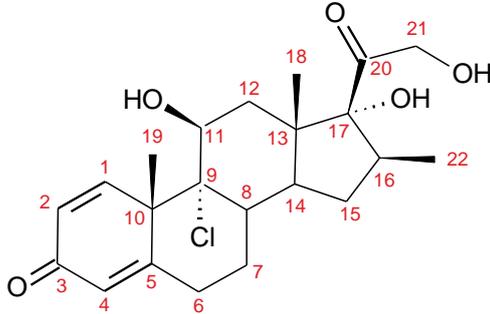
17-Oxo-Dexamethason/Betamethason

(11β)-9-Fluoro-11-hydroxy-16-methylpregna-1,4-dien-3,17-dion

¹³C-NMR (CDCl₃, aufsteigend nach Position C-1 bis C-22):

152,2 / 130,1 / 186,8 / 125,5 / 166,0 / 31,0 / 26,4 / 33,6-33,7 (d) / 100,1-101,9 (d) / 48,4-48,6 (d) / 72,0-72,4 (d) / 37,9 / 47,0 / 42,2 (C-14α) / 43,7 (C-14β) / 30,1 / 38,9 (C-16α) / 43,57 (C-16β) / C-17 außerhalb des Messbereichs / 15,8 / 23,2 (d) / 16,7 (C-22α) / 17,3 (C-22β) / C-20 und C-21 nicht vorhanden.

Tab. 52: Chemische Verschiebungen der charakteristischen Signale im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von BOH und 9,11-Epoxy-BOH.

Position	$^1\text{H } \delta$ [ppm] (Multiplizität)		Struktur
	BOH	9,11-Epoxy-BOH	
1	7,29 (d)	6,64 (d)	 <p>Beclomethason (11β,16β)-9-Chloro-11,17,21-trihydroxy-16-methylpregna-1,4-dien-3,20-dion</p>
2	6,22 (d)	6,08 (d)	
4	5,98	6,10	
11	4,34 (m)	3,19 (m)	
11-OH	5,39 (d)	-	
17-OH	4,95	5,24	
18	0,97	0,85	
19	1,61	1,38	
21	4,1/4,4 (dd)	4,14/4,33 (dd)	
21-OH	4,35	4,43	
22	1,04 (d)	1,01 (d)	

7.2 Stabilitätsuntersuchungen zu BOH

7.2.1 Bildung und Verlust von 9,11-Epoxy-BOH aus BOH in Humanplasma

Tab. 53: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für die prozentualen Peakflächenanteile von 9,11-Epoxy-BOH im HPLC/UV-Chromatogramm bei Inkubation von BOH in Humanplasma.

Zeit [d]	9,11-Epoxy-BOH aus BOH in Humanplasma					
	Peakflächenanteil 9,11-Epoxy-BOH [%]			Mittelwert	SD	CI (95 %)
	1	2	3			
2	53,0	36,4	35,6	41,7	8,02	9,07
4	73,7	57,7	57,0	62,8	7,70	8,72
6	84,1	70,9	70,2	75,1	6,37	7,21
8	89,4	79,1	78,6	82,4	4,95	5,60

Tab. 54: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für die prozentualen Peakflächenanteile von 9,11-Epoxy-BOH im HPLC/UV-Chromatogramm bei Inkubation von 9,11-Epoxy-BOH in Humanplasma.

Zeit [d]	Verlust 9,11-Epoxy-BOH in Humanplasma					
	Peakflächenanteil 9,11-Epoxy-BOH [%]			Mittelwert	SD	CI (95 %)
	1	2	3			
2	91,9	83,5	84,0	86,5	4,72	5,34
4	79,3	68,9	70,5	73,0	5,61	6,34
6	68,2	60,2	59,3	62,6	4,91	5,55
8	62,7	49,0	49,8	53,9	7,69	8,70

7.2.2 Bildung von 9,11-Epoxy-BOH aus BOH in verschiedenen Puffersystemen

Tab. 55: Einzel- und Mittelwerte mit Abweichungen für die prozentualen Peakflächenanteile von 9,11-Epoxy-BOH im HPLC/UV-Chromatogramm bei Inkubation von BOH in verschiedenen Puffern.

Zeit [h]	PBS pH 7,2					
	Peakflächenanteil 9,11-Epoxy-BOH [%]			Mittelwert	SD	CI (95 %)
	1	2	3			
2	2,8	2,8	3,0	2,9	0,11	0,13
4	6,3	6,3	6,9	6,5	0,32	0,36
6	9,7	9,8	10,0	9,8	0,13	0,15
24	34,0	34,0	34,1	34,0	0,09	0,10
Zeit [h]	PBS pH 7,6					
	Peakflächenanteil 9,11-Epoxy-BOH [%]			Mittelwert	SD	CI (95 %)
	1	2	3			
2	9,6	9,5	9,5	9,5	0,08	0,09
4	17,3	16,6	16,4	16,8	0,47	0,53
6	25,9	24,4	24,5	24,9	0,84	0,95
24	64,4	63,3	63,5	63,7	0,61	0,69
Zeit [h]	PBS pH 7,6					
	Peakflächenanteil 9,11-Epoxy-BOH [%]			Mittelwert	SD	CI (95 %)
	1	2	3			
2	11,1	11,7	12,8	11,9	0,85	0,97
4	28,3	28,6	30,3	29,1	1,11	1,26
6	43,6	43,5	45,9	44,3	1,36	1,53
24	94,6	95,3	95,0	95,0	0,34	0,38

Zeit [h]	Carbonat-Puffer pH 7,2					
	Peakflächenanteil 9,11-Epoxy-BOH [%]			Mittel wert	SD	CI (95 %)
	1	2	3			
2	9,6	9,5	9,5	9,5	0,08	0,09
4	17,3	16,6	16,4	16,8	0,47	0,53
6	25,9	24,4	24,5	24,9	0,84	0,95
24	64,4	63,3	63,5	63,7	0,61	0,69
Zeit [h]	HBSS mit 6 % BSA pH 7,2					
	Peakflächenanteil 9,11-Epoxy-BOH [%]			Mittel wert	SD	CI (95 %)
	1	2	3			
2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00
4	0,0	1,2	1,3	0,8	0,72	0,82
6	1,7	1,7	1,8	1,7	0,00	0,01
24	6,4	6,4	6,5	6,4	0,03	0,03

8 Eigenschaften ausgewählter Glucocorticoide

Tab. 56: Übersicht über einige physikochemische, pharmakodynamische und –kinetische Parameter ausgewählter Glucocorticoide. Werte in () berechnet nach Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 (© 1994-2015 ACD/Labs) [72]. k.A.= keine Angaben gefunden. Experimentelle Wasserlöslichkeit für FP, BDP, B-17-P bei 37 °C, sonst keine näheren Angaben in Literatur (vermutlich RT ~20 °C).

	CAS	M _r [g/mol]	Wasser- lösl. ⁵ [µg/mL]	logP ⁴ -	Smp ² [°C]	RRA ³ -	t _{1/2} ¹ [h]	V _d ¹ [L]	PPB ¹ [%]
DXA	1177-87-3	434,50	100 (10)	2,86 (2,7)	263	k.A..	k.A.	k.A.	k.A.
DXP⁷	312-93-6	472,44	(1200)	(<1) ⁶	233-235	k.A.	0,1	3,8	k.A.
DX	50-02-2	392,46	96 (35)	1,83 (2,03)	262-264	100	3,7- 4,6	66-82	68-75
BT	378-44-9	392,46	63 (35)	1,94 (2,0)	231-234	55	5,6	84	k.A.
17-Oxo-DX	1880-61-1	332,41	k.A.	(1,95)	240-242	k.A..	k.A.	k.A.	k.A.
17-Oxo-DX/BT	2285-53-2	332,41	k.A.	(1,95)	~ 270	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
BDP	5534-09-8	521,04	0,13 (0,63)	4,1 (4,1)	117-120	53	0,1- 0,5	20	87
B-17-P	5534-18-9	464,98	15,5 (2,2)	3,14 (3,5)	100-102	1345	2,7	424	k.A.
BOH	4419-39-0	408,92	(16)	(2,4)	234-237	76	k.A.	k.A.	k.A.
9,11-Epoxy-BOH	981-34-0	372,45	(340)	(1,0)	210-220	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
FP	80474-14-2	500,57	<0,1 (1,4)	3,8 (3,1)	272-273	1800	7,8	318	90
FF	397864-44-7	538,58	(0,75)	(3,4)	~ 300	2989	13,7	607	k.A.
MF	83919-23-7	521,43	<0,1 (2,1)	(3,6)	218-220	2200	4,5	332	98
Cicle	126544-47-6	540,69	<0,1 (0,36)	5,1 (5,3)	209-211	12	0,4	207	99
Des-Cicle	161115-59-9	470,60	7 (1,7)	(4,2)	258-261	1212	3,6- 5,1	1190	99
PR	50-24-8	360,44	272	1,4 (1,6)	235	10,4	3,0- 3,4	40-60	73-86
BUD	51333-22-3	430,53	14 (9,5)	2,18 (3,2)	226	935	2,3	189	88
FLU	3385-03-3	434,50	34-45 (43)	(2,0)	k.A.	180	1,6	126	80

¹ Pharmakokinetische Daten zu FP, MF, BDP, B-17-P Cicle und Des-Cicle aus [49, 86, 208], zu BT aus [209], zu FF aus [210] zu PR und DX aus [40] und [107], zu DXP aus [211] und zu BUD und FLU aus [37]; Übersicht über viele Arzneistoffe bei [107]; V_d normalisiert auf 70 kg Körpergewicht, wenn in Quelle kein anderer Bezugspunkt;

² Schmelzpunkt-Daten zu 17-Oxo-DX aus [200], zu 9,11-Epoxy-BOH aus [212], zu FF [44], zu Cicle [213] und zu PR aus [214]; Daten zu 17-Oxo-DX/BT und Des-Cicle aus eigener Messung; alle anderen aus [72]

³ RRA zu FF und MF aus [142], zu Cicle und Des-Cicle aus [143], alle anderen aus [45]

D Tabellarischer Anhang

⁴ logP-Daten zu Cicle aus [213], zu FP, B-17-P und BDP aus [106], zu BT aus [215], zu DX aus [216], zu DXA aus [69], zu PR aus [217] und zu BUD aus [218]

⁵ Daten zu Wasserlöslichkeit zu FP, MF, Cicle und Des-Cicle aus [62], zu B-17-P und BDP aus [63], zu BT aus [219], zu DX aus [220], zu DXA aus [61], zu PR aus [221], zu BUD aus [222] und zu FLU aus [223]

⁶ [72] gibt negativen Wert an

⁷ als Natrium-Salz

Tab. 57: Löslichkeitstabelle nach Ph.Eur.8.5 (bei 15 bis 25 °C). Alle Glucocorticoide nach Tab. 56 sind in Wasser als sehr schwer löslich bis praktisch unlöslich einzustufen.

Bezeichnung	Pro Substanz-Teil [g] benötigte Volumenteile Lösungsmittel [mL]	[mg/mL]
sehr leicht löslich (<i>very soluble</i>)	<1	>1000
leicht löslich (<i>freely soluble</i>)	1 - 10	100 - 1000
löslich (<i>soluble</i>)	10 - 30	33 - 100
wenig löslich (<i>sparingly soluble</i>)	30 - 100	10 - 33
schwer löslich (<i>slightly soluble</i>)	100 - 1000	1 - 10
sehr schwer löslich (<i>very slightly soluble</i>)	1000 - 10000	0,1 - 1
praktisch unlöslich (<i>practically insoluble</i>)	>10000	<0,1

E Zusammenfassung

Zusammenfassung

Glucocorticoide werden in der Herzschrittmachertherapie eingesetzt, um einen Anstieg der Reizschwelle nach der Implantation des Schrittmachers zu verringern und dauerhaft auf niedrigerem Niveau zu halten, als dies ohne Glucocorticoid-Behandlung der Fall wäre. Die Applikation der zu diesem Zweck eingesetzten Glucocorticoide Dexamethasonacetat (DXA) und Dexamethasonphosphat, in seltenen Fällen auch Beclomethasondipropionat (BDP), erfolgt dabei in der Regel mittels einem an der Elektroden Spitze angebrachten Matrixsystem, das für eine langsame lokale Freisetzung der Arzneistoffe an der Grenzfläche zwischen kathodischem Elektrodenkontakt und Herzgewebe sorgen soll. Diese Anwendungsform ist speziell, da trotz einer systemischen Freisetzung der Substanzen eine lokale Wirkung erzielt werden soll, welche die Funktion des Schrittmachers als Medizinprodukt unterstützen soll – aus pharmakokinetischer Sicht ein wichtiger Unterschied zu den üblichen topischen Glucocorticoid-Anwendungen.

Unter physiologischen Bedingungen wurde diese Applikationsform hinsichtlich der Arzneistofffreisetzung und anschließender Umverteilung mit Bindung der Glucocorticoide an das kardiale Gewebe bislang ebenso wenig untersucht, wie verschiedene Glucocorticoide in dieser Anwendung hinsichtlich ihrer Pharmakokinetik verglichen wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die pharmakokinetischen Vorgänge der drei Glucocorticoide DXA, BDP und des potentiell einsetzbaren Glucocorticoids GCX (dessen Identität aus patentgründen derzeit nicht offengelegt werden kann) untersucht.

Die Freisetzungssysteme enthielten, je nach Glucocorticoid, Arzneistoffdosen im Bereich von etwa 150 bis 260 µg. In einem *in-vitro* Freisetzungssystem in Methanol wurde zunächst bestätigt, dass sich die Freisetzungskinetik der untersuchten Matrizes gemäß den Modellvorstellung zu einem dünnwandigen monolithischen Freisetzungssystem nach dem Quadratwurzelgesetz beschreiben ließ. DXA wurde mit einer Freisetzungsrate von $55,6 \pm 1,9 \mu\text{g/h}^{1/2}$ in 24 Stunden annähernd vollständig freigesetzt, während die Rate für BDP bei $21,8 \pm 0,7 \mu\text{g/h}^{1/2}$ lag und nur für eine Freisetzung von etwa zwei Dritteln des Gesamtgehalts der Freisetzungsmatrix sorgte. GCX wurde gar mit nur $4,2 \pm <0,1 \mu\text{g/h}^{1/2}$ freigesetzt. Die ermittelten Freisetzungsraten (DXA > BDP >>> GCX) waren überraschenderweise nicht konsistent mit den logP-Werten der Substanzen. Dies wies darauf hin, dass nicht alleine die unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften der Substanzen zu den differierenden Freisetzungprofile führten, sondern wohl auch die Formulierung der Silikonmatrix einen starken Einfluss ausübte – eine wichtige Erkenntnis für die Weiterentwicklung derartiger Glucocorticoid-haltiger Matrixfreisetzungssysteme.

Vor allem während der bis zu 4 wöchigen Phase unmittelbar nach der Elektrodenimplantation ist die Matrix dem Blutstrom ausgesetzt, bevor sich als Reaktion des Organismus auf den implantierten Fremdkörper eine fibröse Hülle um die Elektroden Spitze bildet. Zur Annäherung an die physiologischen Freisetzungsverhältnisse in dieser initialen Phase, in nach dem Quadratwurzelgesetz die mengenmäßig stärkste Glucocorticoid-Freisetzung erfolgen sollte, wurden deshalb erstmals Freisetzungsversuche

in Humanplasma über 28 Tage durchgeführt. Mit einer Freisetzungsrate von $2,26 \pm 0,08 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$ wurde hier eine unerwartet starke Freisetzung von BDP beobachtet, wohingegen diese für DXA und GCX mit Raten von $0,39 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$ und $0,42 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$ deutlich langsamer ausfiel und sich kaum voneinander unterschied. Die Reihenfolge der Freisetzungsgeschwindigkeiten (BDP \gg GCX = DXA) unterschied sich somit unter physiologischen Bedingungen gänzlich von den *in-vitro* Bedingungen. Womöglich kamen im wässrigen Freisetzungsmedium Humanplasma dabei die Formulierungseinflüsse verstärkt zum Tragen, die sich bereits unter den *in-vitro* Bedingungen andeutenden. Ein zusätzlicher Einfluss mochte von der Bildung des 9,11-Epoxy-Belcomethasons als Abbauprodukt des BDP ausgegangen sein, welches unter den physiologisch angenäherten Bedingungen in hohem Ausmaß entstand. Dies führte zu einer Stabilitätsuntersuchung von Beclomethason in Humanplasma und verschiedenen Puffersystemen, bei welcher sich ein stabilitätsmindernder Einfluss von Carbonat-Puffersystemen herausstellte. Im Zuge der Freisetzungsversuche in Humanplasma wurde zudem erstmals die Entstehung von 17-Oxo-Dexamethason als Abbauprodukt von DXA beobachtet und durch Nachsynthese bestätigt. Für die Phase der Herzschrittmachertherapie, in der an der Grenzfläche zwischen Elektrode und Herzgewebe eine lokale und akute Entzündung infolge der Implantation der Schrittmacherelektrode auftritt und üblicherweise ein starker Anstieg der Reizschwelle zu beobachten ist, lieferten die Versuche in Humanplasma somit erstmals Daten zur Freisetzung verschiedener Glucocorticoide unter Einbezug angenäherter physiologischer Verhältnisse.

Für die korrekte Durchführung der Freisetzungsversuche ist das Vorliegen von Sink-Bedingungen essentiell. Da die praktische Löslichkeit von Glucocorticoiden in Humanplasma bislang nicht bekannt war, wurde die Aufnahmekapazität des Humanplasmas (Kombination aus Löslichkeit und Plasmaproteinbindung) für DXA, GCX und BDP untersucht. Sink-Bedingungen konnten für alle Substanzen sichergestellt werden, wobei gegenüber der reinen Wasserlöslichkeit eine deutlich höhere Aufnahmekapazität gezeigt werden konnte und den hohen Einfluss der Proteinbindung hervorhob.

Um die insgesamt herrschenden physiologischen Verhältnisse noch besser zu beschreiben und dabei die Umverteilung der Arzneistoffe nach Freisetzung aus dem Implantat an das Zielgewebe zu untersuchen, wurde ein neuartiges *ex-vivo* Modell entwickelt. Dies erlaubte eine Simulation der Arzneistofffreisetzung aus dem Implantat in Gegenwart eines Gewebekompartiments und berücksichtigte eine flussartige Konvektion des Mediums. Mit diesem Modell wurden Verhältnisse der AUCs der Glucocorticoide zwischen Gewebe und Humanplasma ermittelt, die mit Werten von 3,4 für DXA, 3,8 für BDP und 2,5 für GCX auf eine ausgeprägte Umverteilung aus dem Humanplasma in das Gewebe hinwiesen. Insgesamt schien damit aufgrund der raschen Freisetzung und Diffusion in das Gewebe eine Verwendung von BDP zur Bekämpfung einer lokalen akuten Entzündung unmittelbar nach der Implantation aus pharmakokinetischer Sicht vorteilhaft. Mit Blick auf einen jahrelangen Effekt konnte jedoch auch die langsame Freisetzung von

DXA und GCX mit deren sehr stabilen Wirkformen als vorteilhaft diskutiert werden. Die Versuche können letztlich bei der Auswahl eines möglichst idealen Glucocorticoids für die Herzschrittmachertherapie behilflich sein und bieten erstmals ein weitestgehend physiologisches Untersuchungsmodell für diese Applikationsform.

Inwiefern sich die unterschiedliche Pharmakokinetik der drei Glucocorticoide auch in pharmakodynamischer Sicht auswirken könnte, sollte schließlich im Zellkulturmodell untersucht werden. Zuvor wurde jedoch *in-vitro* getestet, ob sich der elektrische Schrittmacherimpuls selbst als Entzündungsreiz bemerkbar machen und damit einen Hinweis auf eine dadurch hervorgerufene dauerhafte Entzündung des Herzgewebes geben würde. Dazu wurde eigens ein Modell entworfen, das die Applikation des elektrischen Stimulus in einem Zellkulturansatz zuließ. Die Messung der Entzündungsmarker IL-6, IL-8, MMP-9 und MCP-1 ließ keine entzündliche Reizung der Zellen durch einen Schrittmacherimpuls in Höhe von 1 V und 0,5 ms Dauer erkennen. Anschließend wurde untersucht, ob sich die selbst ermittelten pharmakokinetischen Unterschiede der drei Glucocorticoide in der akuten Entzündungsphase nach Elektrodenimplantation *in-vitro* in unterscheidbaren biologischen Aktivitäten auswirken würden. Signifikante Unterschiede in der Inhibition der Sekretion der Entzündungsmarker IL-6 und MMP-9 konnten allerdings trotz der unterschiedlichen freigesetzten Dosen an DXA, GCX und BDP nicht beobachtet werden. Somit erwies sich keine der drei Substanzen, trotz unterschiedlicher pharmakokinetischer Voraussetzungen und Affinitäten zum Glucocorticoid-Rezeptor, als überlegen. In einem ersten Ausblick ließ dies für die klinische Anwendung von GCX und BDP – zumindest in der initialen Phase nach Elektrodenimplantation – einen zu DXA vergleichbaren Einfluss auf die Reizschwelle vermuten.

Neben einer antiinflammatorischen Wirkung wird auch eine Minderung des Reizschwellenanstieges durch eine bei Glucocorticoid-Exposition nur dünn ausgeprägte fibröse Kapsel an der Elektrodenspitze diskutiert. Als Beitrag zur Untersuchung der in der klinischen Praxis beobachteten Wirkung des DXA wurde daher abschließend geprüft, ob die freigesetzten Glucocorticoid-Dosen zu einer Proliferationshemmung von Endothelzellen und Fibroblasten führen konnten. Ein vermindertes Wachstum der Zelllinien EA.hy926 und IMR-90 unter den freigesetzten Glucocorticoid-Dosen konnte jedoch nicht beobachtet werden. Künftige Untersuchungen des Einflusses der Glucocorticoide auf die Synthese einzelner Bindegewebsbestandteile wie Kollagen könnten hierzu womöglich weitere Erkenntnisse liefern.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals erfolgreich die Pharmakokinetik dreier Glucocorticoide im Kontext der Herzschrittmachertherapie unter physiologischen Verhältnissen beschrieben und ein neuartiges *ex-vivo* Modell entwickelt, das zukünftig ein hilfreiches Werkzeug zur Untersuchung der Pharmakokinetik von kardiovaskulären Implantaten sein kann. Darauf aufbauend wurde zudem erstmalig die Pharmakodynamik dieser Glucocorticoide in der Herzschrittmachertherapie verglichen und begonnen, den Glucocorticoid-Effekt in der Herzschrittmachertherapie näher zu beleuchten.

Summary

In pacemaker therapy glucocorticoids are used to lower an increase in pacing threshold after implantation of the device and to keep this threshold at a permanent lower level compared to devices without drug release. For this purpose the glucocorticoids dexamethasone acetate (DXA), dexamethasone phosphate or occasionally beclomethasone dipropionate (BDP) are released from a matrix system, which is placed at the tip of the pacemaker lead, to ensure a retarded local drug release at the electrode-tissue interface. Despite systemically released, support of the medical device function is achieved by a local glucocorticoid action. This is an important pharmacokinetic difference to common topical applications of glucocorticoids.

Glucocorticoid release from a pacemaker lead's matrix system and subsequent distribution with binding to cardiac tissue has, to the best of our knowledge, not been investigated under physiological conditions yet, nor have several glucocorticoids in this application been compared to each other with respect to pharmacokinetics. For that reason these pharmacokinetic processes of the glucocorticoids DXA, BDP and the potentially applicable glucocorticoid GCX (whose identity currently cannot be revealed due to patent reasons) were examined in this thesis for the first time.

Drug release matrices contained different amounts of glucocorticoid. Overall drug load was between 150 and 260 μg , depending on the glucocorticoid used, and was highest for DXA (~33 %) but less for BDP and GCX (both ~19 %). *In-vitro* dissolution testing in methanol confirmed drug release kinetics according to square root law, as commonly assumed for thin-walled monolithic drug release systems. DXA was released nearly completely from the matrix system within 24 hours at a rate of $55.6 \pm 1.9 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$. The release constant for BDP of $21.8 \pm 0.7 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$ led to a dissolution of about 2/3 of the overall content. With a rate of $4.2 \pm <0.1 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$ dissolution of GCX was even far lower. Surprisingly, these dissolution rates (DXA > BDP >>> GCX) did not reflect the logP values of the glucocorticoids. This indicated a significant influence of the silicone matrix itself on drug release, which was on the contrary less dependent on the substances' differing physicochemical properties. These results could be very valuable for the development of other glucocorticoid containing release systems.

Especially in the first four weeks after pacemaker implantation the release system is exposed to the blood flow, while after this period a fibrous capsule is formed around the lead tip as reaction of the organism to the implanted device. To simulate these physiological conditions dissolution experiments in human plasma over 28 days were done. These showed an unexpected high release of BDP with a dissolution rate of $2.26 \pm 0.08 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$, whereas the dissolution rates of DXA and GCX of $0.39 \pm 0.03 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$ and $0.42 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{h}^{1/2}$, respectively, did not show any significant differences but were far lower compared to BDP. In contrast to the experiments in methanol the order of dissolution rates under physiological conditions was BDP >>> GCX = DXA. A possible explanation for this observation might be that the mentioned influences of the formulation became more

obvious when testing drug release in aqueous media. Maybe an additional effect supporting the fast dissolution of BDP was to the enhanced formation of 9,11-epoxy-beclomethasone under physiological conditions. This observation entailed stability tests of beclomethasone in human plasma and several buffer systems that revealed an augmented epoxide formation of this glucocorticoid in carbonate buffer-systems. Moreover, in the course of the dissolution tests the formation of 17-oxo-dexamethasone as a degradation product of DXA was observed in human plasma for the first time and was confirmed by following synthesis of this product. The experiments in human plasma provided new data for dissolution of glucocorticoids within the initial time period of pacemaker therapy under consideration of physiological conditions. This is important since a strong increase in the pacing threshold is observed typically within these first weeks after pacemaker implantation, while an acute inflammation wore off at the electrode-tissue interface.

Maintaining sink-conditions is a prerequisite for appropriate dissolution testing, but solubility in human plasma was unknown so far. Therefore, the loading capacity (combination of solubility and protein binding) of human plasma was examined for DXA, GCX and BDP. Sink-conditions were confirmed with these experiments showing a way higher loading capacity for all three substances than their solubility in water would have suggested, thus underlining the contribution of plasma protein binding to solubility.

To further imitate physiological conditions and to examine drug distribution to the target tissue, a novel *ex-vivo* model was developed which allowed simulation of drug release from the implanted device in the presence of a tissue compartment. In addition convection of the media imitating a blood flow was taken into account. With this model ratios of the AUCs in tissue and plasma of 3.4 for DXA, 3.8 for BDP and 2.5 for GCX were determined and thus suggested a distinct distribution of the substances from plasma into the tissue compartment. Overall, from a pharmacokinetic point of view the use of BDP seemed advantageous to fight an acute and initial inflammation after implantation due to its fast release and diffusion into tissue. On the other hand also the slow release of DXA and GCX, whose active principles are much more stable than that of BDP, might be beneficial to achieve a long lasting effect if desired. All these experiments might assist choosing the optimal glucocorticoid for support of a cardiac pacemaker. Furthermore, a novel model approximating physiological conditions was developed, which can serve as a suitable tool for the investigation of matrix release systems in an *ex-vivo* setting.

The unanswered question if these differences in the pharmacokinetic profiles of the glucocorticoids would translate into different pharmacodynamic effects was finally investigated in a cell culture model. However, firstly it needed to be clarified if the electric pacing impulse served as an inflammatory stimulus to cells *in-vitro* and thereby induced local inflammation due to electric pacing itself. For this purpose a special model was designed, allowing administration of an electric pacemaker stimulus within a cell culture set up. Measurements of the inflammatory markers IL-6, IL-8, MMP-9 and MCP-1 showed no

inflammatory response to a pacing impulse of 1 V and 0.5 ms *in-vitro*. Subsequently the impact of the pharmacokinetic differences on the biological activities of the glucocorticoids in the acute phase of inflammation after implantation of a pacemaker lead was investigated. All glucocorticoids inhibited the secretion of IL-6 and MMP-9, but no significant differences were to be seen between DXA, GCX and BDP. Despite different pharmacokinetic premises and affinities to the glucocorticoid receptor of DXA, GCX and BDP none of the compounds seemed to be superior regarding the inhibition of inflammation in the *in-vitro* model. For clinical practice this might suggest an equal impact on pacing threshold for GCX and BDP compared to the current standard DXA, at least in the acute phase after implantation.

The thickness of the fibrous capsule surrounding the lead tip seems to be an important factor influencing the threshold rise after pacemaker implantation. Glucocorticoid exposition is discussed to lead to a thinner sheath of connective tissue around the lead tip and thus to attenuate the threshold rise. Consequently, the antiproliferative activity of the released glucocorticoid doses on endothelial cells and fibroblasts was tested. However, no inhibition of cell growth was observed *in-vitro* with the cell lines EA.hy926 and IMR-90. Maybe future investigations of a glucocorticoid effect on the synthesis of components of connective tissue like collagen in the setting of pacemaker therapy might lead to further insight.

In this thesis pharmacokinetic aspects of DXA, GCX and BDP were successfully investigated for the first time in the context of pacemaker therapy under consideration of physiological conditions. Additionally, a novel and so far unique *ex-vivo* model was developed which can be a suitable tool for further pharmacokinetic experiments and support the development of cardiovascular implants or other implantable matrix release systems. Furthermore, the pharmacodynamic effects of DXA, GCX and BDP were compared to each other with regard to the prior gained pharmacokinetic insights and some aspects of the cause of glucocorticoid effects in cardiac pacemaker therapy were studied.

F Abkürzungsverzeichnis

Glucocorticoide

AMC	Amcinonid
B-17-P	Beclomethason-17-propionat
B-21-P	Beclomethason-21-propionat
BDP	Beclomethason-17,21-dipropionat
BOH	Beclomethason
9,11-Epoxy-BOH	9,11-Epoxy-Beclomethason
BT	Betamethason
BUD	Budesonid
Cicle	Ciclesonid
des-Cicle	Desisobutyrylciclesonid
DX	Dexamethason
DXA	Dexamethason-21-acetat
17-Oxo-DX	17-Oxo-Dexamethason
17-Oxo-DX/BT	Diastereomeregemisch aus 17-Oxo-Dexamethason/Betamethason
DXP	Dexamethason-21-phosphat
FF	Fluticason-17-furoat
FLU	Flunisolid
FP	Fluticason-17-propionat
GCX	Glucocorticoid X (aus Gründen der Kooperation mit BIOTRONIK nicht näher beschriebenes Glucocorticoid)
MF	Mometason-17-furoat
9,11-Epoxy-MF	9,11-Epoxy- Mometason-17-furoat
MPR	Methylprednisolon
PR	Prednisolon
TCA	Triamcinolonacetamid

Allgemeine Abkürzungen

A549	Humane Lungenepithelzelllinie
BSA	Bovines Serumalbumin
BV	Bioverfügbarkeit
CI	<i>Confidenz Intervall</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EA.hy926	Immortalisierte humane Endothelzelllinie, Hybrid aus HUVECs und A549
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbant assay</i>
FBS	Fetales Rinderserum
FEP	Fluorethylenpropylen
GC	Glucocorticoid
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HUVECs	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
IL	Interleukin
IMR-90	Humane Fibroblastenzelllinie
LPS	Lipopolysaccharid
LTSC	<i>Lead Tip with Steroid Eluting Collar</i> (Silikonmantel der Elektrodenspitze mit Freisetzungssystem für Glucocorticoide)
MCP	<i>Monocyte-Chemoattractant-Protein</i>
MeOH	Methanol
MMP	Matrixmetalloprotease
PPB	Plasmaproteinbindung
RRA	Relative Rezeptoraffinität
RT	Raumtemperatur
Smp	Schmelzpunkt
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
V_d	Verteilungsvolumen (<i>im Steady State</i>)
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

G Literaturverzeichnis

1. Fritsch, H., et al., *Taschenatlas der Anatomie - Band 2 - Innere Organe*. Vol. 11. 2013, Stuttgart: Thieme. ISBN: 978-3-13-4921113.
2. Paulsen, F. and J. Waschke, *Sobotta - Atlas der Anatomie des Menschen - Innere Organe*. Vol. 23. 2010, München: Elsevier. ISBN: 978-3-437440724.
3. Kirsch, J., *Taschenlehrbuch Anatomie*. 2011, Stuttgart: Thieme. ISBN: 978-3-131449917.
4. Biotronik SE & Co. KG. *Patientenbroschüre - Wissenswertes über Ihren Herzschrittmacher*. 2009
Abrufdatum: 26/06/2015; URL:
http://www.biotronik.com/sixcms/media.php/133/363426_B_1108_Pb_Herzschrittmacher_DE_04_klein.pdf.
5. Lannigan, R.A. and S.A. Zaki, *Ultrastructure of the normal atrial endocardium*. Br Heart J, 1966. 28(6): 785-795.
6. Brutsaert, D.L. and L.J. Andries, *The endocardial endothelium*. Am J Physiol, 1992. 263(4 Pt 2): 985-1002.
7. Lemke, B., B. Nowak, and D. Pfeiffer, *Leitlinien zur Herzschrittmachertherapie*. Z Kardiol, 2005. 94(10): 704-720.
8. Trappe, H.J. and J. Gummert, *Aktuelle Schrittmacher- und Defibrillatorentherapie*. Dtsch Arztebl Int, 2011. 108(21): 372-380.
9. Kramme, R., *Medizintechnik*. Vol. 4. 2011, Berlin, Heidelberg: Springer. ISBN: 978-3-642161865.
10. Morschhäuser, D. and W. Fischer, *Praxis der Herzschrittmacher-Nachsorge: Grundlagen, Funktionen, Kontrolle, Optimierung, Troubleshooting*. Vol. 2. 2013, Berlin: Springer. ISBN: 978-3-642352720.
11. Klein, N., et al., *Moderne Herzschrittmachertherapie*. Internist, 2006. 47(10): 1024-1033.
12. Fröhlig, G., et al., *Herzschrittmacher- und Defibrillator-Therapie: Indikation - Programmierung - Nachsorge*. Vol. 2. 2013, Stuttgart: Thieme. ISBN: 978-3-131171825.
13. Kusumoto, F.M. and N.F. Goldschlager, *Cardiac Pacing for the Clinician*. 2008, Boston, MA, USA. ISBN: 978-0-387727622.
14. Löhr, H., *Herzschrittmacherimplantation*. Chirurg, 2001. 72: 203-221.
15. Schuchert, A., *The effects of local steroid-elution on high-performance pacing leads*. Herzschr Elektrophys, 2001. 12: 141-147.
16. Mond, H.G. and K.B. Stokes, *The electrode-tissue interface: the revolutionary role of steroid elution*. Pacing Clin Electrophysiol, 1992. 15(1): 95-107.
17. Anderson, J.M., A. Rodriguez, and D.T. Chang, *Foreign body reaction to biomaterials*. Semin Immunol, 2008. 20(2): 86-100.
18. Radovsky, A.S. and J.F. Van Vleet, *Effects of dexamethasone elution on tissue reaction around stimulating electrodes of endocardial pacing leads in dogs*. Am Heart J, 1989. 117(6): 1288-1298.
19. Mond, H.G., W. Hua, and C.C. Wang, *Atrial pacing leads: the clinical contribution of steroid elution*. Pacing Clin Electrophysiol, 1995. 18(9 Pt 1): 1601-1608.
20. *Medizinproduktegesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 7. August 2002 (BGBl. I S. 3146), das zuletzt durch Artikel 16 des Gesetzes vom 21. Juli 2014 (BGBl. I S. 1133) geändert worden ist*.
21. Schwaab, B., et al., *Five-year follow-up of a bipolar steroid-eluting ventricular pacing lead*. Pacing Clin Electrophysiol, 1999. 22(8): 1226-1228.
22. Pirzada, F.A., L.J. Moschitto, and D. Diorio, *Clinical experience with steroid-eluting unipolar electrodes*. Pacing Clin Electrophysiol, 1988. 11(11 Pt 2): 1739-1744.
23. Anderson, N., et al., *Active Fixation Leads - Long-Term Threshold Reduction Using a Drug-Infused Ceramic Collar*. Pacing Clin Electrophysiol, 1991. 14(11): 1767-1771.
24. Wilson, A., et al., *Drug-eluting collar - a new approach to reducing threshold*. Pacing Clin Electrophysiol, 1990. 13(12 Pt 2): 1876-1878.
25. Svensson, O., et al., *Comparison of Threshold Values between Steroid and Nonsteroid Unipolar Membrane Leads*. Pacing Clin Electrophysiol, 1994. 17(11): 2008-2011.
26. Wiegand, U.K.H., et al., *Long-term superiority of steroid elution in atrial active fixation platinum leads*. Pacing Clin Electrophysiol, 2000. 23(6): 1003-1009.
27. Santini, M. and F. Deseta, *Do Steroid-Eluting Electrodes Really Have Better Performance Than Other State-of-the-Art Designs*. Pacing Clin Electrophysiol, 1993. 16(4): 722-728.
28. Mond, H.G. and D. Grenz, *Implantable transvenous pacing leads: The shape of things to come*. Pacing Clin Electrophysiol, 2004. 27(6): 887-893.
29. *Medtronic SelectSecure Lead Model 3830 - Summary of safety and efficacy data (SSED)*, M. Inc., Editor. 2005: Minneapolis, MN, USA.
30. Radovsky, A.S., et al., *Paired comparisons of steroid-eluting and nonsteroid endocardial pacemaker leads in dogs: electrical performance and morphologic alterations*. Pacing Clin Electrophysiol, 1988. 11(7): 1085-1094.
31. Dvorak, P., et al., *Histological findings around electrodes in pacemaker and implantable cardioverter-defibrillator patients: comparison of steroid-eluting and non-steroid-eluting electrodes*. Europace, 2012. 14(1): 117-123.

32. Benditt, D.G., et al., *Cellular electrophysiologic effects of dexamethasone sodium phosphate: implications for cardiac stimulation with steroid-eluting electrodes*. Int J Cardiol, 1989. 22(1): 67-73.
33. Brewer, G., et al., *Initial Screening of Bio-Active Agents with Potential to Reduce Stimulation Threshold*. Pacing Clin Electrophysiol, 1988. 11(4): 509-509.
34. Preston, T.A. and R.D. Judge, *Alteration of pacemaker threshold by drug and physiological factors*. Ann N Y Acad Sci, 1969. 167(2): 686-692.
35. King, D.H., et al., *Steroid-eluting endocardial pacing lead for treatment of exit block*. Am Heart J, 1983. 106(6): 1438-1440.
36. Hatz, H.J., *Glucocorticoide - Immunologische Grundlagen, Pharmakologie und Therapierichtlinien*. Medizinisch-pharmakologisches Kompendium. 1998, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. ISBN: 978-3-804714862.
37. Szefer, S.J., *Pharmacokinetics of intranasal corticosteroids*. J Allergy Clin Immunol, 2001. 108(1 Suppl): S26-31.
38. Strehl, C., C.M. Spies, and F. Buttgereit, *Pharmacodynamics of glucocorticoids*. Clin Exp Rheumatol, 2011. 29(5 Suppl 68): S13-S18.
39. Stahn, C. and F. Buttgereit, *Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2008. 4(10): 525-533.
40. Czock, D., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids*. Clin Pharmacokinet, 2005. 44(1): 61-98.
41. Derendorf, H. and E.O. Meltzer, *Molecular and clinical pharmacology of intranasal corticosteroids: clinical and therapeutic implications*. Allergy, 2008. 63(10): 1292-1300.
42. Rohatagi, S., et al., *Risk-benefit value of inhaled glucocorticoids: a pharmacokinetic/pharmacodynamic perspective*. J Clin Pharmacol, 2004. 44(1): 37-47.
43. Tomlinson, E.S., et al., *In vitro metabolism of dexamethasone (DEX) in human liver and kidney: the involvement of CYP3A4 and CYP17 (17,20 LYASE) and molecular modelling studies*. Biochem Pharmacol, 1997. 54(5): 605-611.
44. Högger, P., *Optimizing ICS Suspensions for nasal use*, in *Respiratory Drug Delivery*. 2014: Puerto Rico.
45. Würthwein, G., S. Rehder, and P. Rohdewald, *Lipophilicity and Receptor Affinity of Glucocorticoids*. Pharm Ztg Wiss, 1992. 137(4): 161-167.
46. Higuchi, T., *Mechanism of Sustained-Action Medication. Theoretical Analysis of Rate of Release of Solid Drugs Dispersed in Solid Matrices*. J Pharm Sci, 1963. 52(12): 1145-1149.
47. Stokes, K. and T. Church, *The Elimination of Exit Block as a Pacing Complication Using a Transvenous Steroid Eluting Lead*. Pacing Clin Electrophysiol, 1987. 10(3): 748-748.
48. Zaki, M.A.J., et al., *Implantable Drug Delivery System: A Review*. International Journal of PharmTech Research, 2012. 4: 280-292.
49. Derendorf, H., et al., *Relevance of pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids to asthma*. Eur Respir J, 2006. 28(5): 1042-1050.
50. Siepmann, J., R.A. Siegel, and M.J. Rathbone, *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*. 2012, New York, u.a.: Springer. ISBN: 978-1-461408802.
51. Saetone, M.F. and L. Salminen, *Ocular Inserts for Topical Delivery*. Adv Drug Deliver Rev, 1995. 16(1): 95-106.
52. Power, J., R. French, and F. Cowan, *Subdermal implantable contraceptives versus other forms of reversible contraceptives or other implants as effective methods of preventing pregnancy*. Cochrane Database Syst Rev, 2007(3): CD001326.
53. Silber, S., *When are drug-eluting stents effective? A critical analysis of the presently available data*. Z Kardiol, 2004. 93(9): 649-663.
54. Takahashi, H., D. Letourneur, and D.W. Grainger, *Delivery of large biopharmaceuticals from cardiovascular stents: a review*. Biomacromolecules, 2007. 8(11): 3281-3293.
55. Collins, R., *Mathematical modelling of controlled release from implanted drug-impregnated monoliths*. Pharm Sci Technol To, 1998. 1(6): 269-276.
56. Siepmann, J. and N.A. Peppas, *Higuchi equation: derivation, applications, use and misuse*. Int J Pharm, 2011. 418(1): 6-12.
57. DOW CORNING. *Product Information Healthcare - SILASTIC BioMedical Grad Liquid Silicone Rubbers (7-6830, 7-6840, Q7-4840, Q7-4850, 7-4860, 7-4870, 7-6860) Parts A and B*. 2006 Abruftdatum: 11/05/2015; URL: <http://www.dowcorning.de/DataFiles/090276fe8018c5d3.pdf>.
58. Baumann, D., C. Bachert, and P. Hogger, *Dissolution in nasal fluid, retention and anti-inflammatory activity of fluticasone furoate in human nasal tissue ex vivo*. Clin Exp Allergy, 2009. 39(10): 1540-1550.
59. Della Porta, G., et al., *Corticosteroid microparticles produced by supercritical-assisted atomization: process optimization, product characterization, and "in vitro" performance*. J Pharm Sci, 2006. 95(9): 2062-2076.
60. Reverchon, E., et al., *Beclomethasone Microparticles for Wet Inhalation, Produced by Supercritical Assisted Atomization*. Ind Eng Chem Res, 2010. 49(24): 12747-12755.
61. Fialho, S.L., et al., *Safety and pharmacokinetics of an intravitreal biodegradable implant of dexamethasone acetate in rabbit eyes*. Curr Eye Res, 2006. 31(6): 525-534.
62. Lexmuller, K., et al., *Differences in endogenous esterification and retention in the rat trachea between budesonide and ciclesonide active metabolite*. Drug Metab Dispos, 2007. 35(10): 1788-1796.

63. Högger, P. and P. Rohdewald, *Glucocorticoide receptors and fluticasone propionate*, in *Reviews in Contemporary Pharmacotherapy - Fluticasone Propionate in Asthma*. Vol. 9: 501-522.1998, Marius Press.
64. Higuchi, T., *Rate of Release of Medicaments from Ointment Bases Containing Drugs in Suspension*. J Pharm Sci, 1961. 50(12): 874-875.
65. Semmling, B., et al., *Examination of steroid release from screw-in pacing leads*. Biomed Tech (Berl), 2012. 57 Suppl 1: 273-276.
66. Chang, K.S., et al., *Free volume and alcohol transport properties of PDMS membranes: Insights of nano-structure and interfacial affinity from molecular modeling*. J Membrane Sci, 2012. 417: 119-130.
67. Roseman, T.J., *Release of steroids from a silicone polymer*. J Pharm Sci, 1972. 61(1): 46-50.
68. Kajihara, M., et al., *Novel method to control release of lipophilic drugs with high potency from silicone*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2003. 51(1): 11-14.
69. Li, J., J. Sun, and Z. He, *Quantitative structure-retention relationship studies with immobilized artificial membrane chromatography II: partial least squares regression*. J Chromatogr A, 2007. 1140(1-2): 174-179.
70. Crowley, M.M., et al., *Pharmaceutical applications of hot-melt extrusion: Part I*. Drug Dev Ind Pharm, 2007. 33(9): 909-926.
71. Lakshman, J.P., et al., *Application of melt extrusion in the development of a physically and chemically stable high-energy amorphous solid dispersion of a poorly water-soluble drug*. Mol Pharm, 2008. 5(6): 994-1002.
72. Chemical Abstracts Service - CAS. *SciFinder*. Abrufdatum: 11/02/2015 bis 14/02/2015; URL: <https://scifinder.cas.org/scifinder>.
73. Herrlich, S., et al., *Drug release mechanisms of steroid eluting rings in cardiac pacemaker lead electrodes*. Conference proceedings : 34th Annual International Conference of the IEEE EMBS, 2012. 2012: 681-684.
74. Siewert, M., et al., *FIP/AAPS guidelines to dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms*. AAPS PharmSciTech, 2003. 4(1): E7.
75. Brown, C.K., et al., *FIP/AAPS joint workshop report: dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms*. AAPS PharmSciTech, 2011. 12(2): 782-794.
76. Anderson, N.L. and N.G. Anderson, *The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects*. Mol Cell Proteomics, 2002. 1(11): 845-867.
77. Dressman, J.B. and C. Reppas, *In vitro-in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs*. Eur J Pharm Sci, 2000. 11 Suppl 2: S73-S80.
78. D'Souza, S.S. and P.P. DeLuca, *Methods to assess in vitro drug release from injectable polymeric particulate systems*. Pharm Res, 2006. 23(3): 460-474.
79. Larsson, J., *Methods for measurement of solubility and dissolution rate of sparingly soluble drugs*, in *Department of Chemical Engineering*. 2009, Lund University.
80. Andersson, J.T. and W. Schrader, *A method for measuring 1-octanol - Water partition coefficients*. Anal Chem, 1999. 71(16): 3610-3614.
81. Baka, E., J.E. Comer, and K. Takacs-Novak, *Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound*. J Pharm Biomed Anal, 2008. 46(2): 335-341.
82. Etzweiler, F., E. Senn, and H.W.H. Schmidt, *Method for Measuring Aqueous Solubilities of Organic-Compounds*. Anal Chem, 1995. 67(3): 655-658.
83. Li, C.Y., C.L. Zimmerman, and T.S. Wiedmann, *Solubilization of retinoids by bile salt/phospholipid aggregates*. Pharm Res, 1996. 13(6): 907-913.
84. Melin, T. and R. Rautenbach, *Membranverfahren: Grundlagen der Modul- und Anlagenauslegung*. Vol. 3. 2007, Berlin: Springer. ISBN: 978-3-540343271.
85. Klinke, R. and C. Bauer, *Physiologie: Zahlreiche Tabellen*. Vol. 5. 2005, Stuttgart: Thieme. ISBN: 978-3-137960053.
86. Daley-Yates, P.T., et al., *Beclomethasone dipropionate: absolute bioavailability, pharmacokinetics and metabolism following intravenous, oral, intranasal and inhaled administration in man*. Br J Clin Pharmacol, 2001. 51(5): 400-409.
87. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. 72(1-2): 248-254.
88. Noble, J.E. and M.J.A. Bailey, *Quantitation of Protein*, in *Guide to Protein Purification, Second Edition*. Vol. 463: 73-95.2009, Elsevier Academic Press Inc: San Diego.
89. Brooks, S.P., et al., *A comparison of methods for determining total body protein*. Anal Biochem, 1995. 226(1): 26-30.
90. Würthwein, G. and P. Rohdewald, *Activation of beclomethasone dipropionate by hydrolysis to beclomethasone-17-monopropionate*. Biopharm Drug Dispos, 1990. 11(5): 381-394.
91. Foe, K., et al., *Degradation products of beclomethasone dipropionate in human plasma*. Drug Metab Dispos, 1998. 26(2): 132-137.
92. Mond, H.G. and K.B. Stokes, *The steroid-eluting electrode: A 10-year experience*. Pacing Clin Electrophysiol, 1996. 19(7): 1016-1020.
93. Kaliner, M.A., *Pharmacologic characteristics and adrenal suppression with newer inhaled corticosteroids: A comparison of ciclesonide and fluticasone propionate*. Clin Ther, 2006. 28(3): 319-331.

94. Foe, K., K.F. Brown, and J.P. Seale, *Decomposition of beclomethasone propionate esters in human plasma*. Biopharm Drug Dispos, 1998. 19(1): 1-8.
95. Foe, K., K.F. Brown, and J.P. Seale, *Comparative kinetics of metabolism of beclomethasone propionate esters in human lung homogenates and plasma*. J Pharm Sci, 2000. 89(9): 1143-1150.
96. Baumann, D., C. Bachert, and P. Hogger, *Development of a novel model for comparative evaluation of intranasal pharmacokinetics and effects of anti-allergic nasal sprays*. Eur J Pharm Biopharm, 2012. 80(1): 156-163.
97. Esmailpour, N., P. Högger, and P. Rohdewald, *Binding of glucocorticoids to human nasal tissue in vitro*. Int Arch Allergy Imm, 2000. 122(2): 151-154.
98. Valotis, A., et al., *Human receptor kinetics, tissue binding affinity, and stability of mometasone furoate*. J Pharm Sci, 2004. 93(5): 1337-1350.
99. Kelly, H.W., *Comparison of Inhaled Corticosteroids: An Update*. Ann Pharmacother, 2009. 43(3): 519-527.
100. Miller-Larsson, A., et al., *Reversible fatty acid conjugation of budesonide. Novel mechanism for prolonged retention of topically applied steroid in airway tissue*. Drug Metab Dispos, 1998. 26(7): 623-630.
101. Anderson, J.M., *Mechanisms of Inflammation and Infection with Implanted Devices*. Cardiovasc Pathol, 1993. 2(3): S33-S41.
102. Corren, J., *Intranasal corticosteroids for allergic rhinitis: How do different agents compare?* J Allergy Clin Immun, 1999. 104(4): S144-S149.
103. Niedner, R., *Glukokortikosteroide in der Dermatologie: Kontrollierter Einsatz erforderlich*. Dtsch Arztebl International, 1996. 93(44): 2868-2872.
104. Buttgereit, F. and A. Scheffold, *Rapid glucocorticoid effects on immune cells*. Steroids, 2002. 67(6): 529-534.
105. Fialho, S.L., et al., *Safety and pharmacokinetics of an intravitreal biodegradable implant of dexamethasone acetate in rabbit eyes*. Curr Eye Res, 2006. 31(6): 525-34.
106. Arya, V., et al., *Brain permeability of inhaled corticosteroids*. J Pharm Pharmacol, 2005. 57(9): 1159-1167.
107. Obach, R.S., F. Lombardo, and N.J. Waters, *Trend analysis of a database of intravenous pharmacokinetic parameters in humans for 670 drug compounds*. Drug Metab Dispos, 2008. 36(7): 1385-1405.
108. Anderson, J.M., *Inflammatory response to implants*. ASAIO transactions, 1988. 34(2): 101-107.
109. Chatelain, P., R. Adamec, and J.N. Cox, *Morphological changes in human myocardium during permanent pacing*. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1985. 407(1): 43-57.
110. Ellenbogen, K.A., et al., *Clinical Cardiac Pacing, Defibrillation and Resynchronization Therapy*. 4 ed. 2011: Elsevier Health Sciences. ISBN: 978-1-437737905.
111. Coleman, D.L., R.N. King, and J.D. Andrade, *The foreign body reaction: a chronic inflammatory response*. J Biomed Mater Res, 1974. 8(5): 199-211.
112. Hua, W., H.G. Mond, and N. Strathmore, *Chronic steroid-eluting lead performance: A comparison of atrial and ventricular pacing*. Pacing Clin Electrophysiol, 1997. 20(1): 17-24.
113. Sutton, R. and S. Guneri, *The impact of steroid eluting leads on long term pacing in the atrium and ventricle*. J Am Coll Cardiol, 1990. 15(2 SUPPL. A): 68A.
114. Stojanov, P., et al., *Assessment of long-term stability of chronic ventricular pacing thresholds in steroid-eluting electrodes*. Pacing Clin Electrophysiol, 1992. 15(10 Pt 1): 1417-1420.
115. Cines, D.B., et al., *Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders*. Blood, 1998. 91(10): 3527-3561.
116. Unger, R.E., et al., *In vitro expression of the endothelial phenotype: comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R*. Microvasc Res, 2002. 64(3): 384-397.
117. Cook-Mills, J.M. and T.L. Deem, *Active participation of endothelial cells in inflammation*. J Leukoc Biol, 2005. 77(4): 487-495.
118. Edgell, C.J., C.C. McDonald, and J.B. Graham, *Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. 80(12): 3734-3737.
119. Gill, E.A., et al., *Bacterial lipopolysaccharide induces endothelial cells to synthesize a degranulating factor for neutrophils*. FASEB J, 1998. 12(9): 673-684.
120. Cromwell, O., et al., *Expression and Generation of Interleukin-8, Il-6 and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor by Bronchial Epithelial-Cells and Enhancement by Il-1-Beta and Tumor-Necrosis-Factor-Alpha*. Immunology, 1992. 77(3): 330-337.
121. Cheng, Y.C., et al., *Lipopolysaccharide upregulates uPA, MMP-2 and MMP-9 via ERK1/2 signaling in H9c2 cardiomyoblast cells*. Mol Cell Biochem, 2009. 325(1-2): 15-23.
122. Jirik, F.R., et al., *Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells*. J Immunol, 1989. 142(1): 144-147.
123. Ros, J., et al., *Effect of bacterial lipopolysaccharide on endothelin-1 production in human vascular endothelial cells*. J Hepatol, 1997. 26(1): 81-87.
124. Schuchert, A., K.H. Kuck, and T. Meinertz, *Do steroid-eluting pacemaker electrodes permit programming at lower pacemaker pulse amplitudes?* Dtsch Med Wochenschr, 1995. 120(17): 593-596.
125. Balint, R., N.J. Cassidy, and S.H. Cartmell, *Electrical stimulation: a novel tool for tissue engineering*. Tissue Eng Part B Rev, 2013. 19(1): 48-57.

126. Bai, H., J.V. Forrester, and M. Zhao, *DC electric stimulation upregulates angiogenic factors in endothelial cells through activation of VEGF receptors*. Cytokine, 2011. 55(1): 110-115.
127. Kaplanski, G., et al., *IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation*. Trends Immunol, 2003. 24(1): 25-29.
128. Shi, G., Z. Zhang, and M. Rouabhia, *The regulation of cell functions electrically using biodegradable polypyrrole-poly lactide conductors*. Biomaterials, 2008. 29(28): 3792-3798.
129. Yamazaki, K.G., et al., *Cell adhesion molecule mediation of myocardial inflammatory responses associated with ventricular pacing*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. 302(7): H1387-1393.
130. Yamazaki, K.G. and F.J. Villarreal, *Ventricular pacing-induced loss of contractile function and development of epicardial inflammation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. 300(4): H1282-H1290.
131. Khokha, R., A. Murthy, and A. Weiss, *Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity*. Nat Rev Immunol, 2013. 13(9): 649-665.
132. Mukherjee, R., et al., *Short-term disruption in regional left ventricular electrical conduction patterns increases interstitial matrix metalloproteinase activity*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. 299(1): H217-H224.
133. Tyagi, S.C., et al., *Proteinases and restenosis in the human coronary artery: extracellular matrix production exceeds the expression of proteolytic activity*. Atherosclerosis, 1995. 116(1): 43-57.
134. McCaig, C.D., et al., *Controlling cell behavior electrically: current views and future potential*. Physiol Rev, 2005. 85(3): 943-978.
135. Aaron, R.K. and D.M. Ciombor, *Therapeutic effects of electromagnetic fields in the stimulation of connective tissue repair*. J Cell Biochem, 1993. 52(1): 42-46.
136. Zhao, M., et al., *Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors*. J Cell Sci, 2004. 117(3): 397-405.
137. Nagasaka, M., et al., *Effect of low-voltage electrical stimulation on angiogenic growth factors in ischaemic rat skeletal muscle*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006. 33(7): 623-627.
138. Sulahian, T.H., et al., *Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155*. Cytokine, 2000. 12(9): 1312-1321.
139. Fabrick, B.O., C.D. Dijkstra, and T.K. van den Berg, *The macrophage scavenger receptor CD163*. Immunobiology, 2005. 210(2-4): 153-160.
140. Hochhaus, G., *Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of mometasone furoate nasal spray: potential effects on clinical safety and efficacy*. Clin Ther, 2008. 30(1): 1-13.
141. Hochhaus, G., et al., *Pharmacokinetic/pharmacodynamic aspects of aerosol therapy using glucocorticoids as a model*. J Clin Pharmacol, 1997. 37(10): 881-892.
142. Valotis, A. and P. Högger, *Human receptor kinetics and lung tissue retention of the enhanced-affinity glucocorticoid fluticasone furoate*. Resp Res, 2007. 8: 54-62.
143. Stoeck, M., et al., *In vitro and in vivo anti-inflammatory activity of the new glucocorticoid ciclesonide*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. 309(1): 249-258.
144. Derendorf, H., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids*. J Allergy Clin Immunol, 1998. 10(4, Part 2): S440-S446.
145. Derendorf, H., *Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of inhaled ciclesonide*. J Clin Pharmacol, 2007. 47(6): 782-789.
146. Schmitz, S., *Der Experimentator: Zellkultur*. Vol. 3. 2011, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. ISBN: 978-3-827425720.
147. Bauer, K.H., et al., *Pharmazeutische Technologie: mit Einführung in die Biopharmazie*. Vol. 9. 2012, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. ISBN: 978-3-804725522.
148. Herzfeldt, C.-D. and J. Kreuter, *Grundlagen der Arzneiformenlehre*. Vol. 2. 1999: Springer Berlin Heidelberg. ISBN: 978-3-540652915.
149. Schuchert, A., et al., *Chronic Ventricular Electrograms - Do Steroid-Eluting Leads Differ from Conventional Leads*. Pacing Clin Electrophysiol, 1990. 13(12): 1879-1882.
150. Singaray, S., et al., *A comparative study of the action of dexamethasone sodium phosphate and dexamethasone acetate in steroid-eluting pacemaker leads*. Pacing Clin Electrophysiol, 2005. 28(4): 311-315.
151. Zhang, N., et al., *Suppression of Cytokine Release by Fluticasone Furoate vs. Mometasone Furoate in Human Nasal Tissue Ex-Vivo*. Plos One, 2014. 9(4): 8.
152. Nave, R., R. Fisher, and N. McCracken, *In vitro metabolism of beclomethasone dipropionate, budesonide, ciclesonide, and fluticasone propionate in human lung precision-cut tissue slices*. Respir Res, 2007. 8: 65-73.
153. Broughton, G., 2nd, J.E. Janis, and C.E. Attinger, *The basic science of wound healing*. Plast Reconstr Surg, 2006. 117(7 Suppl): 12S-34S.
154. Anstead, G.M., *Steroids, retinoids, and wound healing*. Adv Wound Care, 1998. 11(6): 277-285.
155. Chen, W.L., et al., *In-vitro effects of dexamethasone on cellular proliferation, apoptosis, and Na⁺-K⁺-ATPase activity of bovine corneal endothelial cells*. Ocul Immunol Inflamm, 2006. 14(4): 215-223.
156. Choi, S.J., et al., *Effects of glucocorticoid on human dermal papilla cells in vitro*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2013. 135: 24-29.
157. Hettmannsperger, U., et al., *Corticosteroids Induce Proliferation but Do Not Influence Tnf- or Il-1-Beta-Induced Icam-1 Expression of Human Dermal Microvascular Endothelial-Cells in-Vitro*. Arch Dermatol Res, 1993. 285(6): 347-351.

158. Bourcier, T., et al., *In vitro effects of dexamethasone on human corneal keratocytes*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999. 40(6): 1061-1070.
159. Wu, W.S., et al., *Dexamethasone induction of keloid regression through effective suppression of VEGF expression and keloid fibroblast proliferation*. J Invest Dermatol, 2006. 126(6): 1264-1271.
160. Beule, A.G., et al., *Effects of Topically Applied Dexamethasone on Mucosal Wound Healing Using a Drug-Releasing Stent*. Laryngoscope, 2008. 118(11): 2073-2077.
161. Wang, Y.Y. and X.X. Zheng, *A flow cytometry-based assay for quantitative analysis of cellular proliferation and cytotoxicity in vitro*. J Immunol Methods, 2002. 268(2): 179-188.
162. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. 65(1-2): 55-63.
163. Crouch, S.P.M., et al., *The Use of ATP Bioluminescence as a Measure of Cell-Proliferation and Cytotoxicity*. J Immunol Methods, 1993. 160(1): 81-88.
164. Petty, R.D., et al., *Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number*. J Biolumin Chemilumin, 1995. 10(1): 29-34.
165. Jones, L.J., et al., *Sensitive determination of cell number using the CyQUANT (R) cell proliferation assay*. J Immunol Methods, 2001. 254(1-2): 85-98.
166. Fotakis, G. and J.A. Timbrell, *In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride*. Toxicol Lett, 2006. 160(2): 171-177.
167. Dengler, W.A., et al., *Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays*. Anti-Cancer Drugs, 1995. 6(4): 522-532.
168. Gillis, S., et al., *T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity*. J Immunol, 1978. 120(6): 2027-2032.
169. Fotsis, T., et al., *The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth*. Nature, 1994. 368(6468): 237-9.
170. Lippert, C., et al., *The effects of A-ring and D-ring metabolites of estradiol on the proliferation of vascular endothelial cells*. Life Sci, 2000. 67(13): 1653-1658.
171. Quezada, M., et al., *Antiangiogenic, antimigratory and antiinflammatory effects of 2-methoxyestradiol in zebrafish larvae*. Comp Biochem Physiol C-Toxicol Pharmacol, 2013. 157(2): 141-149.
172. Suda, K., et al., *Phenotypic characterization of human umbilical vein endothelial (ECV304) and urinary carcinoma (T24) cells: endothelial versus epithelial features*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2001. 37(8): 505-514.
173. Lidington, E.A., et al., *A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions*. Transpl Immunol, 1999. 7(4): 239-246.
174. Durant, S., D. Duval, and F. Homo-Delarche, *Factors involved in the control of fibroblast proliferation by glucocorticoids: a review*. Endocr Rev, 1986. 7(3): 254-269.
175. Luo, J.C., et al., *Dexamethasone inhibits basic fibroblast growth factor-stimulated gastric epithelial cell proliferation*. Biochem Pharmacol, 2008. 76(7): 841-849.
176. Luo, J.C., et al., *Dexamethasone inhibits epidermal growth factor-stimulated gastric epithelial cell proliferation*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. 320(2): 687-694.
177. Reil, T.D., et al., *Dexamethasone suppresses vascular smooth muscle cell proliferation*. J Surg Res, 1999. 85(1): 109-114.
178. Kimura, M., H. Moteki, and M. Ogihara, *Inhibitory Effects of Dexamethasone on Hepatocyte Growth Factor-Induced DNA Synthesis and Proliferation in Primary Cultures of Adult Rat Hepatocytes*. J Pharmacol Sci, 2011. 115(3): 390-398.
179. Tombran-Tink, J., et al., *Retinoic acid and dexamethasone regulate the expression of PEDF in retinal and endothelial cells*. Experimental Eye Research, 2004. 78(5): 945-955.
180. Schoepe, S., et al., *Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy*. Exp Dermatol, 2006. 15(6): 406-420.
181. Hengge, U.R., et al., *Adverse effects of topical glucocorticosteroids*. J Am Acad Dermatol, 2006. 54(1): 1-15.
182. Schakman, O., et al., *Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. 45(10): 2163-2172.
183. Weiner, F.R., et al., *The Effects of Dexamethasone on Invitro Collagen Gene-Expression*. J Biol Chem, 1987. 262(15): 6955-6958.
184. Cutroneo, K.R. and K.M. Sterling, *How do glucocorticoids compare to oligo decoys as inhibitors of collagen synthesis and potential toxicity of these therapeutics?* J Cell Biochem, 2004. 92(1): 6-15.
185. Jones, K.H. and J.A. Senft, *An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide*. J Histochem Cytochem, 1985. 33(1): 77-79.
186. Becker, J.C., W. Domschke, and T. Pohle, *Biological in vitro effects of fibrin glue: Fibroblast proliferation, expression and binding of growth factors*. Scand J Gastroenterol, 2004. 39(10): 927-932.
187. Cushing, M.C. and K.S. Anseth, *Hydrogel cell cultures*. Science, 2007. 316(5828): 1133-1134.
188. Fu, X.Y., C.H. Tann, and T.K. Thiruvengadam, *Process improvements in the synthesis of corticosteroid 9,11 beta-epoxides*. Org Process Res Dev, 2001. 5(4): 376-382.
189. Oliveto, E.P., *Synthesis of 16alpha-methyl and 16beta-methyl corticoids*. Ann NY Acad Sci, 1959. 82(4): 809-820.
190. Herzog, H. and E.P. Oliveto, *A history of significant steroid discoveries and developments originated at the Schering Corporation (USA) since 1948*. Steroids, 1992. 57(12): 617-623.

191. Gentile, D.M., et al., *Dexamethasone metabolism by human liver in vitro. Metabolite identification and inhibition of 6-hydroxylation*. J Pharmacol Exp Ther, 1996. 277(1): 105-112.
192. Simons, S.S., M.J. Merchlinsky, and D.F. Johnson, *17-Ketosteroids via abase induced cleavage of C-17-dihydroxy acetone side-chains*. Steroids, 1981. 37(3): 281-289.
193. Le Pera, A., et al., *A straightforward chemical synthesis of 17-ketosteroids by cleavage of the C-17-dihydroxy acetone side chain in corticosteroids*. Steroids, 2003. 68(2): 139-142.
194. Derendorf, H., et al., *Pharmakokinetik kompakt - Grundlagen und Praxisrelevanz*. Vol. 3. 2011, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. ISBN: 978-3-804724501.
195. Zsila, F., *Subdomain IB Is the Third Major Drug Binding Region of Human Serum Albumin: Toward the Three-Sites Model*. Mol Pharm, 2013. 10(5): 1668-1682.
196. Curry, S., *Lessons from the crystallographic analysis of small molecule binding to human serum albumin*. Drug Metab Pharmacokinet, 2009. 24(4): 342-357.
197. Ahmad, I., et al., *Effect of acetate and carbonate buffers on the photolysis of riboflavin in aqueous solution: a kinetic study*. AAPS PharmSciTech, 2014. 15(3): 550-559.
198. Hansen, J., et al., *Kinetics of Degradation of Methotrexate in Aqueous-Solution*. Int J Pharm, 1983. 16(2): 141-152.
199. Carroll, J.J. and A.E. Mather, *The System Carbon Dioxide-Water and the Krichevsky-Kasarnovsky Equation*. J Solution Chem, 1992. 21(7): 607-621.
200. Pinto, R.M., et al., *Bismuth(III) triflate-catalyzed direct conversion of corticosteroids into highly functionalized 17-ketosteroids by cleavage of the C17-dihydroxyacetone side chain*. J Org Chem, 2009. 74(21): 8488-8491.
201. Turnbull, J.P., *Preparation of 17-Oxo-Steroids*. Patent 1329706, Great Britain, 1973.
202. Vollhardt, K.P.C. and N.E. Schore, *Organische Chemie*. Vol. 4. 2007, Weinheim: WILEY-VCH. ISBN: 978-3-527313808.
203. *Guidance for Industry - Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology*. ICH, 1996.
204. *EMA Guideline for bioanalytical method validation, EMEA/CHMP/EWP/192217/2009*. European Medicines Agency, 2011.
205. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. EURACHEM Guide, 1998.
206. Kromidas, S., *Validierung in der Analytik*. Vol. 2. 2011, Weinheim: Wiley-VCH. ISBN: 978-3-527329397.
207. Kromidas, S., *Handbuch Validierung in der Analytik*. Vol. 2. 2011, Weinheim: Wiley-VCH. ISBN: 978-3-527329380.
208. Mackie, A.E., et al., *Pharmacokinetics of intravenous fluticasone propionate in healthy subjects*. Br J Clin Pharmacol, 1996. 41(6): 539-542.
209. Petersen, M.C., et al., *Pharmacokinetics of Betamethasone in healthy-adults after intravenous administration*. Eur J Clin Pharmacol, 1983. 25(5): 643-650.
210. Allen, A., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and inhaled fluticasone furoate in healthy Caucasian and East Asian subjects*. Br J Clin Pharmacol, 2014. 77(5): 808-820.
211. Rohdewald, P., et al., *Pharmacokinetics of Dexamethasone and Its Phosphate Ester*. Biopharm Drug Dispos, 1987. 8(3): 205-212.
212. Taub, D., et al., *16-beta-methyl cortical steroids* Journal of the American Chemical Society, 1960. 82(15): 4012-4026.
213. Feth, M.P., et al., *Physicochemical, crystallographic, thermal, and spectroscopic behavior of crystalline and X-ray amorphous ciclesonide*. J Pharm Sci, 2008. 97(9): 3765-3780.
214. Teshima, M., et al., *Prednisolone retention in integrated liposomes by chemical approach and pharmaceutical approach*. J Control Release, 2004. 97(2): 211-218.
215. Buchwald, P. and N. Bodor, *Soft glucocorticoid design: structural elements and physicochemical parameters determining receptor-binding affinity*. Pharmazie, 2004. 59(5): 396-404.
216. Lian, G., L. Chen, and L. Han, *An evaluation of mathematical models for predicting skin permeability*. J Pharm Sci, 2008. 97(1): 584-598.
217. Qu, X.Z., et al., *Carbohydrate-based micelle clusters which enhance hydrophobic drug bioavailability by up to 1 order of magnitude*. Biomacromolecules, 2006. 7(12): 3452-3459.
218. Sanderson, H. and M. Thomsen, *Comparative analysis of pharmaceuticals versus industrial chemicals acute aquatic toxicity classification according to the United Nations classification system for chemicals. Assessment of the (Q)SAR predictability of pharmaceuticals acute aquatic toxicity and their predominant acute toxic mode-of-action*. Toxicol Lett, 2009. 187(2): 84-93.
219. Guo, J., et al., *Rapid throughput solubility screening method for BCS class II drugs in animal GI fluids and simulated human GI fluids using a 96-well format*. J Pharm Sci, 2008. 97(4): 1427-1442.
220. Goller, A.H., et al., *In silico prediction of buffer solubility based on quantum-mechanical and HQSAR- and topology-based descriptors*. J Chem Inf Model, 2006. 46(2): 648-658.
221. Ali, H.S.M., et al., *Solubility of Budesonide, Hydrocortisone, and Prednisolone in Ethanol plus Water Mixtures at 298.2 K*. J Chem Eng Dat, 2010. 55(1): 578-582.
222. Hu, T.T., et al., *Engineering Pharmaceutical Fine Particles of Budesonide for Dry Powder Inhalation (DPI)*. Ind Eng Chem Res, 2008. 47(23): 9623-9627.
223. Bartolomei, M., *Solid-state studies on the hemihydrate and the anhydrous forms of flunisolide*. J Pharm Biomed Anal, 2000. 24(1): 81-93.