

***Ex-vivo*-Modelle zur Charakterisierung der  
Pharmakokinetik pulmonal applizierter Wirkstoffe:  
Dialyse- und humanes Lungenperfusionsmodell**



**Dissertation**

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

vorgelegt von  
**Beatrice Trammer**  
aus Bad Neustadt

Würzburg 2011

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: .....

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

**Frau Prof. Dr. Petra Högger**

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

Meinen wundervollen Eltern,  
meinen beiden Geschwistern  
& Alexander



Aus der vorliegenden Dissertation bereits hervorgegangene Publikationen:

*Originalpublikation:*

Trammer B, Amann A, Haltner-Ukomadu E, Tillmanns S, Keller M, Högger P.

Comparative permeability and diffusion kinetics of cyclosporine A liposomes and propylene glycol solution from human lung tissue into human blood ex vivo. Eur J Pharm Biopharm 2008; 70 (3): 758-764.

*Posterbeitrag (Posterpreis in der Kategorie Pharmazie und Lebensmittelchemie):*

Gnadt M, Trammer B, Baumann D, Högger P.

Die stärkste Waffe gegen Entzündungen – Pharmakokinetik und Pharmakodynamik inhalativ oder nasal applizierter Glucocorticoide

Chem SystM – Chemie Symposium der Studierenden Mainfrankens 2007, Jungchemikerforum Würzburg.



## Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt denjenigen Personen, die mich auf so vielfältige Weise bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben:

An erster Stelle danke ich Frau Prof. Dr. Petra Högger dafür, dass sie mir durch die Aufnahme in ihren Arbeitskreis die Arbeit an einem großartigen und sehr vielfältigen Themengebiet ermöglichte. Ihre Anregungen und die stete Diskussionsbereitschaft waren für das Entstehen dieser Arbeit ebenso wichtig wie das Vertrauen, das sie mir entgegenbrachte und der Freiraum zu selbstständigem Arbeiten, den sie mir gewährte. Außerdem bin ich Frau Prof. Högger sehr dankbar für die Möglichkeit, die Pharmaziestudenten im Fach Klinische Pharmazie zu betreuen und mich dadurch selbst in dieser hochinteressanten Disziplin fortzubilden.

<sup>4</sup> Herr Prof. Dr. med. Michael Schmidt, Oberarzt der Medizinischen Klinik und Poliklinik I und Leiter der Abteilung Pneumologie im Universitätsklinikum Würzburg, danke ich sehr für die Unterstützung meiner Arbeit und für die Übernahme des Co-Referats. Seine Bereitschaft zur stets guten Zusammenarbeit habe ich sehr geschätzt.

Herrn Dr. med. Boris Kardziev, Chefarzt der Thoraxchirurgie im Thoraxzentrum Bezirk Unterfranken in Münnerstadt, danke ich für sein außerordentliches Engagement bei der Patientenrekrutierung und der Unterstützung meiner Arbeit am humanen Lungenperfusionsmodell und Dialysemodell. Sein Enthusiasmus und die gute Kommunikation ermöglichten eine sehr angenehme Zusammenarbeit.

In diesem Zusammenhang auch ein ganz herzliches Dankeschön an das gesamte OP-Team des Thoraxzentrums Bezirk Unterfranken, Münnerstadt, und an die Mitarbeiter der Werkstatt und der Klinikverwaltung. Ihr reibungsloses Zusammenspiel und die tadellose Organisation der Rahmenbedingungen ebneten den Weg für das erfolgreiche Durchführen der Experimente.

Den Mitarbeitern des Instituts für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie der Universitätsklinik Würzburg, vor allem Frau Dr. Klinker und Herrn Dr. Opitz sei herzlich gedankt für die unkomplizierte Zusammenarbeit bei der Bereitstellung von Blutprodukten.

Ich danke außerdem Prof. Dr. Godehard Friedel und dem OP-Team der Klinik Schillerhöhe in Gerlingen für die Bereitstellung von Gewebeproben in der Anfangsphase dieser Arbeit.

Der PARI GmbH danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung von Wirkstoffzubereitungen für Experimente am Dialysemodell.

Mein besonderer Dank gilt den Patienten, die bereit waren, das ihnen entnommene Lungengewebe den Forschungsarbeiten zur Verfügung zu stellen.

Bei Herrn Dr. Matthias Freiwald bedanke ich mich für die Einarbeitung in das Dialysemodell zu Beginn der Promotionszeit und Dr. Mirjam Gnadt danke ich besonders für die gute Einarbeitung in das komplexe Gebiet des humanen Lungenperfusionsmodells.

Roswitha Scheblein und Roswitha Skrabala bin ich sehr dankbar für ihre wertvolle Hilfe beim mühevollen Schneiden von Lungengewebe und Roswitha Scheblein danke ich außerdem für die hervorragende Assistenz bei Versuchen am Lungenperfusionsmodell.

Auch meinen Kollegen Max Kurlbaum und Klaus Uhlenhut möchte ich besonders für ihre spontane Bereitschaft, mich zu Perfusionen zu begleiten und mich dabei tatkräftig zu unterstützen, danken.

Herrn Dr. Anagnostis Valotis danke ich für zahlreiche Gespräche wissenschaftlicher und privater Natur und für seine große Hilfsbereitschaft. Durch seine fachliche und soziale Kompetenz stellte er eine verlässliche Anlaufstelle in allen Lebenslagen dar.

Frau Dr. Petra Kapkova und Herrn Michael Völker danke ich für die Unterstützung bei Messungen am LC-MS/MS System. Ihre hervorragende Fachkenntnis und ihr Erfahrungsschatz waren für mich eine wertvolle Hilfe.

Ein ganz großes Dankeschön richtet sich an die Werkstatt, Matthias Völker, Karl Vollmuth, Georg Walter, Christoph Kessler und die Auszubildenden: stets zuverlässig und hilfsbereit, vermochten sie mit ausgezeichneter Kompetenz so manches Problem im Handumdrehen aus der Welt zu schaffen.

Herrn Berthold Fertig, dem Glasbläser des Instituts der Organischen Chemie, danke ich für die Herstellung und Reparatur diverser Glasgeräte.

Den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern meines Arbeitskreises Dr. Daniel Baumann, Dr. Matthias Freiwald, Dr. Mirjam Gnadt, Martin Haas, Dr. Max Kurlbaum, Melanie Mülle, Dr. Angelika Schäfer, Roswitha Scheblein, Roswitha Skrabala, Dr. Julia Thern, Nora Thiele, Klaus Uhlenhut, Frederic Vollmers und Tanja Wittmann möchte ich ganz herzlich dafür danken, dass sie durch ihre freundschaftliche Art die Promotionszeit zu einer sehr wertvollen Erfahrung gemacht haben und zu einer Zeit, die ich sehr gerne und überaus positiv in Erinnerung behalten werde. Ich hatte das große Glück, unter Euch neue Freunde zu finden. Die Diskussionsrunden am Mittagstisch, die gemeinsamen Unternehmungen und so manch fröhlichen Feier-Abend vermisse ich schon jetzt sehr.



Die Studentenbetreuung mit dem „Klin.-Pharm.-Team“ nahm für mich einen besonderen Stellenwert innerhalb der Promotionszeit ein. So bereitete mir die gemeinsame Arbeit mit Daniel Baumann, Mirjam Gnadl und Armin Welker viel Freude, was nicht zuletzt am harmonischen und effektiven Zusammenspiel innerhalb der Gruppe lag. Ein großes Dankeschön dafür und für die vielen lustigen Momente mit Euch.

Nicht versäumen möchte ich, Frau Ebner, Frau Möhler und Frau Schneider für ihr stets offenes Ohr, die große Hilfsbereitschaft und ein stets freundliches Gespräch zu danken. Ohne Sie würde dem Institut etwas Entscheidendes fehlen.

Carsten, Önder, Alex, Rosi, Enni und meinen Eltern danke ich vielmals fürs aufmerksame Korrekturlesen.

Meinen lieben Mädels Anja, Beli, Krissy und Tini, die mich sowohl durch das Studium als auch durch die Promotionszeit hindurch begleitet haben, danke ich für die Freundschaft, die wir auch über weite Entfernungen aufrecht erhalten und für die einzigartige gemeinsame Zeit.

Den „Lemi-Mädels“ Andrea, Anett, Claudi, Ebru, Kathrin und Sanja danke ich für die schöne Zeit besonders in der „Endphase“ der Arbeit.

Meinen „alten“ Freunden in Brendlorenzen möchte ich für tolle gemeinsame Erlebnisse, die Ablenkung und die Motivation in Zeiten der Frustration danken.

Ulla und Erich Kühl, Euch danke ich für Eure Herzlichkeit, den Zuspruch und die erstklassige Verpflegung an so manchem Sonntag.

Meiner Familie, besonders meinem Bruder, gebührt Dank. Dass Ihr mit mir gelitten, gefiebert und Euch gefreut habt. Dafür, dass Ihr immer für mich da seid und ich mich auf Euch verlassen kann. Vielen Dank auch an meine Schwester: dass Du mir trotz der großen Entfernung so nahe stehst.

Ganz besonderen Dank verdienen meine Eltern, Christa und Paul Trammer. Ohne Eure bedingungslose Liebe und Unterstützung wäre nichts von alledem möglich geworden. Könnte man sich seine Eltern aussuchen, ich hätte genau Euch ausgewählt.

Mein Alex, Dir danke ich für Deine Liebe und Deine grenzenlose Bereitschaft, mit mir zu fühlen, mich durch alle Frustrationslagen hindurch auszuhalten, mir zuzuhören und mich immer wieder aufzubauen. Du bist meine Gewissheit, dass alles gut wird.



Non quia difficilia sunt, non audemus, sed quia non audemus, difficilia sunt!

*-Seneca-*



# Inhaltsverzeichnis

<b>A</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>19</b>
1	DIE HUMANE LUNGE – SOWOHL WEG ALS AUCH ZIEL FÜR PULMONAL APPLIZIERTE ARZNEISTOFFE .....	21
1.1	Obstruktive Erkrankungen der Lunge .....	21
1.1.1	COPD .....	21
1.1.2	Asthma bronchiale .....	23
1.2	Inhalative Anwendung von Arzneistoffen .....	25
1.2.1	Lokale bzw. systemische Wirkung pulmonal applizierter Wirkstoffe .....	25
1.2.2	Anatomie der humanen Lunge .....	27
1.3	Modelle zur Charakterisierung der Pharmakokinetik pulmonal applizierter Wirkstoffe .....	29
1.3.1	<i>In-vitro</i> -Zellkulturmodelle .....	29
1.3.2	<i>Ex-vivo</i> -Modelle .....	30
1.3.3	<i>In-vivo</i> -Studien .....	31
2	ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....	33
<b>B</b>	<b>ALLGEMEINER TEIL</b> .....	<b>35</b>
1	<i>EX-VIVO</i> -VERGLEICH DER VERTEILUNGSKINETIK ZWEIER CYCLOSPORIN A-FORMULIERUNGEN VON HUMANEM LUNGENGeweBE IN HUMANES BLUT MIT HILFE EINES DIALYSEMODELLS .....	37
1.1	Hintergrund .....	37
1.2	Pharmakologische und pharmakokinetische Eigenschaften des Cyclosporin A .....	40
1.3	Prinzip der Bestimmung .....	45
1.3.1	Eigenschaften der liposomalen Cyclosporin A-Formulierung .....	45
1.3.2	Modifikation des Dialysemodells zur Anpassung an die aktuelle Fragestellung .....	45
1.3.3	Durchführung der Dialyseversuche .....	46
1.4	Ergebnisse der Diffusionsversuche .....	49
1.5	Diskussion der Diffusionsversuche .....	51
1.5.1	Die Ergebnisse der Diffusionsversuche im Kontext von klinischen Studien zu inhalativ appliziertem Cyclosporin A .....	53
1.5.2	Vergleich der Ergebnisse der Diffusionsversuche mit <i>in-vitro</i> -Studien mit der humanen Bronchialzelllinie Calu-3 .....	55
2	ETABLIERUNG DES KONTINUIERLICHEN DIALYSEMODELLS - VERGLEICH DER DIFFUSIONSKINETIK VON FLUTICASONPROPIONAT BEI ANWENDUNG DER STATISCHEN (SD) UND DER KONTINUIERLICHEN DIALYSE (KD) .....	58
2.1	Hintergrund .....	58
2.2	Prinzip der Bestimmung .....	60
2.2.1	Weiterentwicklung des statischen Dialysemodells hin zur kontinuierlichen Dialyse .....	60
2.2.2	Durchführung der Dialyseversuche .....	64
2.3	Ergebnisse der Diffusionsversuche .....	67
2.4	Diskussion der Diffusionsversuche .....	69
2.4.1	Die Ergebnisse der Diffusionsversuche im Kontext von <i>ex-vivo</i> - bzw. <i>in-vitro</i> -Studien zu pharmakokinetischen Fragestellungen .....	71
2.4.2	Die Ergebnisse der Diffusionsversuche im Kontext von klinischen Humanstudien .....	73
3	BESTIMMUNG DER DIFFUSIONSKINETIK VON FENOTEROLHYDROBROMID UND IPRATROPIUMBROMID NACH FREISETZUNG AUS DEM DOSIERAEROSOL BERODUAL <sup>®</sup> N BEI ANWENDUNG DES KONTINUIERLICHEN DIALYSEMODELLS .....	78
3.1	Hintergrund .....	78
3.2	Pharmakologische Eigenschaften von Fenoterol und Ipratropiumbromid .....	78
3.3	Prinzip der Bestimmung .....	82
3.3.1	Tatsächlich applizierte Dosis .....	82
3.3.2	Durchführung der Dialyseversuche .....	84
3.4	Ergebnisse der Diffusionsversuche .....	87

3.4.1	Resultierende tatsächlich applizierte Dosis.....	87
3.4.2	Diffusion von Fenoterolhydrobromid und Ipratropiumbromid.....	88
3.5	Diskussion .....	90
3.5.1	Deposition von FE und IB bei den Dialyseversuchen.....	91
3.5.2	Vergleich der Diffusionsergebnisse mit Ergebnissen aus klinischen Humanstudien.....	93
3.5.3	Vergleich des Diffusionsverhaltens von Fenoterol, Ipratropiumbromid und Fluticasonpropionat bei Verwendung der kontinuierlichen Dialyse .....	96
4	UNTERSUCHUNGEN ZUR PULMONALEN ABSORPTION VON SALBUTAMOL NACH VORHERIGER INHALATIVER APPLIKATION VON CARNITIN AM HUMANEN LUNGENPERFUSIONSMODELL .....	99
4.1	Hintergrund.....	99
4.1.1	Vorausgegangene Versuche .....	101
4.1.1.1	Studie zur Pharmakokinetik (PK-Studie).....	101
4.1.1.2	Studie zur Pharmakokinetik und Pharmakodynamik (PK/PD-Studie).....	102
4.1.2	Vorausgegangene Beobachtungen.....	103
4.2	Prinzip der Bestimmung.....	106
4.2.1	Organische Kation/Carnitin Transporter – OCTN2 .....	107
4.2.2	L-Carnitin als OCTN2 Substrat für die eigenen Versuche mit dem humanen Lungenperfusionmodell .....	110
4.2.3	Durchführung der Versuche am humanen Lungenperfusionmodell .....	111
4.3	Ergebnisse .....	113
4.4	Diskussion der Versuche am humanen Lungenperfusionmodell .....	116
4.4.1	Vergleich der Ergebnisse mit bisherigen Untersuchungsergebnissen der PK- und PK/PD-Studie ..	116
4.4.2	Die Ergebnisse im Kontext von <i>in-vitro</i> -Studien .....	121
5	BESTIMMUNG DER KONZENTRATION VON PROSTAGLANDIN E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) IN PROBEN AUS LUNGENPERFUSIONSVERSUCHEN UND VOLLBLUT-ÄQUIVALENT-PROBEN MITTELS ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) .....	124
5.1	Hintergrund.....	124
5.2	Prinzip der Bestimmung.....	126
5.2.1	Proben aus Perfusionsexperimenten .....	126
5.2.2	Vollblut-Äquivalent-Proben als Leerwertkontrollen .....	127
5.2.3	Durchführung des ELISA .....	128
5.3	Ergebnisse .....	129
5.4	Diskussion .....	132
<b>C</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL .....</b>	<b>139</b>
1	<i>EX-VIVO</i> -VERGLEICH DER VERTEILUNGSKINETIK ZWEIER CYCLOSPORIN A-FORMULIERUNGEN VON HUMANEM LUNGENGeweBE IN HUMANES BLUT MIT HILFE EINES DIALYSEMODELLS.....	141
1.1	Verwendete Reagenzien, Materialien und Geräte .....	141
1.1.1	Substanzen .....	141
1.1.2	Krebs-Ringer-HEPES-Puffer.....	141
1.1.3	Humanes Lungengewebe, Blut und Blutplasma.....	142
1.1.3.1	Herkunft des humanen Lungengewebes .....	142
1.1.3.2	Herkunft des humanen Blutes und Blutplasmas .....	142
1.1.3.3	Herstellung des Lungenhomogenates .....	143
1.1.3.4	Bestimmung und Einstellung des Hämatokritgehaltes des humanen Blutes .....	143
1.1.4	Dialyseapparatur .....	144
1.1.5	Sonstige Geräte und Materialien.....	145
1.2	Durchführung der Dialyseversuche.....	147
1.2.1	Kalibrierung der Mikroliterpipette für die Probenentnahme.....	147
1.2.2	Vergleich der Verteilungskinetik einer liposomalen Cyclosporin A-Formulierung mit einer Lösung von Cyclosporin A in Propylenglykol von humanem Lungengewebe in humanes Blut .....	148
1.2.2.1	Kontrollversuche mit einer Propylenglykol-Lösung und wirkstofffreien Liposomen.....	148

1.2.2.2	Vorbereitung der Dialyse .....	148
1.2.2.3	Applikation der Dosis .....	149
1.2.2.4	Durchführung der Dialyse .....	150
1.2.3	Analyse des Cyclosporin A-Gehaltes der Dialyseproben .....	151
1.2.3.1	Probenaufarbeitung .....	151
1.2.3.2	Quantifizierung mittels LC-MS/MS.....	151
1.2.3.3	Validierung der analytischen Methode.....	152
2	ETABLIERUNG DES KONTINUIERLICHEN DIALYSEMODELLS - VERGLEICH DER DIFFUSIONSKINETIK VON FLUTICASONPROPIONAT BEI ANWENDUNG DER STATISCHEN UND DER KONTINUIERLICHEN DIALYSE .....	153
2.1	Verwendete Reagenzien, Materialien und Geräte.....	153
2.1.1	Substanzen.....	153
2.1.2	Standardlösungen für die Quantifizierung und Applikationslösung.....	153
2.1.3	Humanes Lungengewebe und Blutplasma.....	154
2.1.3.1	Herkunft .....	154
2.1.3.2	Herstellung des Lungenhomogenates.....	155
2.1.4	Dialyseapparatur.....	156
2.1.5	HPLC-System .....	158
2.1.6	Sonstige Geräte und Materialien .....	159
2.2	Durchführung der Dialyseversuche.....	160
2.2.1	Untersuchung der Diffusionskinetik von Fluticasonpropionat von humanem Lungengewebe in humanes Plasma mit Hilfe des statischen Dialysemodells .....	160
2.2.1.1	Vorbereitung der Dialyse .....	161
2.2.1.2	Applikation der Dosis .....	161
2.2.1.3	Ablauf der Dialyse .....	163
2.2.2	Vor- und Kontrollversuche zur Funktionsfähigkeit des kontinuierlichen Dialysemodells .....	164
2.2.2.1	Bestimmung der Flussrate .....	164
2.2.2.2	Prüfung der einzelnen Abläufe während eines Dialyseversuches .....	166
2.2.2.3	Einstellung des Fraktionensammlers für die Probengewinnung.....	167
2.2.3	Untersuchung der Diffusionskinetik von Fluticasonpropionat von humanem Lungengewebe in humanes Plasma mit Hilfe des kontinuierlichen Dialysemodells.....	168
2.2.3.1	Vorbereitung der Dialyse .....	169
2.2.3.2	Applikation der Dosis .....	169
2.2.3.3	Ablauf der Dialyse .....	170
2.3	Bestimmung der Wirkstoffkonzentrationen in den Dialyseproben .....	171
2.3.1	Probenaufarbeitung.....	171
2.3.2	Quantifizierung mittels HPLC.....	172
3	BESTIMMUNG DER DIFFUSIONSKINETIK VON FENOTEROLHYDROBROMID UND IPRATROPIUMBROMID NACH FREISETZUNG AUS DEM DOSIERAEROSOL BERODUAL <sup>®</sup> N BEI ANWENDUNG DES KONTINUIERLICHEN DIALYSEMODELLS .....	174
3.1	Verwendete Reagenzien, Materialien und Geräte.....	174
3.1.1	Substanzen.....	174
3.1.2	Standardlösungen für die Quantifizierung.....	174
3.1.3	Humanes Lungengewebe und Blutplasma.....	175
3.1.3.1	Herkunft .....	175
3.1.3.2	Herstellung des Lungenhomogenates.....	175
3.1.4	Dialyseapparatur.....	176
3.1.5	LC-MS/MS System.....	176
3.1.6	Sonstige Geräte und Materialien .....	177
3.2	Durchführung der Dialyseversuche.....	177
3.2.1	Vorbereitung der Dialyse .....	177
3.2.2	Applikation der Dosis.....	177

3.2.3	Ablauf der Dialyse.....	179
3.2.4	Bestimmung der applizierten Dosis.....	181
3.3	Bestimmung der Wirkstoffkonzentrationen in den Dialyseproben.....	183
3.3.1	Probenaufarbeitung.....	183
3.3.1.1	Dialyseversuch.....	183
3.3.1.2	Dosisbestimmung.....	183
3.3.2	Quantifizierung mittels LC-MS/MS.....	184
4	UNTERSUCHUNGEN ZUR PULMONALEN ABSORPTION VON SALBUTAMOL NACH VORHERIGER INHALATIVER APPLIKATION VON CARNITIN AM HUMANEN LUNGENPERFUSIONSMODELL.....	187
4.1	Verwendete Reagenzien, Materialien und Geräte.....	187
4.1.1	Substanzen.....	187
4.1.2	Standardlösungen für die Quantifizierung.....	187
4.1.3	Applikationslösungen.....	188
4.1.3.1	Carnitin.....	188
4.1.3.2	Salbutamol.....	188
4.1.4	Perfusionspuffer.....	189
4.1.5	Humanes Lungengewebe.....	190
4.1.6	Aufbau des humanen Lungenperfusionsmodells.....	190
4.1.7	LC-MS/MS System.....	192
4.1.8	Sonstige Geräte und Materialien.....	193
4.2	Durchführung der Experimente mit dem humanen Lungenperfusionsmodell.....	195
4.2.1	Versuchsvorbereitungen und Präparation des Lungenlappens.....	195
4.2.2	Ventilations- und Perfusionsparameter.....	196
4.2.3	Applikation von Carnitin.....	197
4.2.4	Applikation von Salbutamol.....	198
4.2.5	Probengewinnung.....	198
4.3	Bestimmung der tatsächlich applizierten Dosis Salbutamol.....	199
4.3.1	Salbutamolkonzentration in der Applikationslösung (= Dosis <sub>Applikationslösung</sub> ).....	199
4.3.2	Rückstand der Applikationslösung im Vernebler (= Dosis <sub>Vernebler</sub> ).....	200
4.3.3	An Applikationshilfe adsorbierte Menge Salbutamol (= Dosis <sub>Adsorbiert</sub> ).....	200
4.4	Bestimmung der Salbutamol-Konzentration in Proben aus Lungenperfusionsversuchen.....	201
4.4.1	Herstellung von Kalibrierstandards.....	201
4.4.1.1	Methanolisch-wässrige Kalibrierreihe.....	201
4.4.1.2	Kalibrierreihe mit Perfusionspuffer als Matrix.....	201
4.4.2	Probenaufarbeitung.....	202
4.4.3	Quantifizierung mittels LC-MS/MS.....	203
5	BESTIMMUNG DER KONZENTRATION VON PROSTAGLANDIN E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) IN PROBEN AUS LUNGENPERFUSIONSVERSUCHEN UND VOLLBLUT-ÄQUIVALENT-PROBEN MITTELS ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA).....	206
5.1	Verwendete Reagenzien, Materialien und Geräte.....	206
5.1.1	Reagenzien und Lösungen.....	206
5.1.2	Perfusionsflüssigkeit.....	206
5.1.2.1	Perfusionspuffer.....	206
5.1.2.2	Vollblut-Äquivalent mit einem Hämatokritgehalt von 20 %.....	207
5.1.3	Sonstige Geräte und Materialien.....	207
5.2	Durchführung des ELISA zur Bestimmung der PGE <sub>2</sub> -Konzentration.....	209
5.2.1	Herkunft und Vorbereitung der Proben aus Lungenperfusionsversuchen.....	209
5.2.2	Herstellung von Vollblut-Äquivalent-Proben.....	210
5.2.3	Herstellung von Waschpuffer und Kalibrierlösungen.....	211
5.2.4	Versuchsdurchführung.....	211
5.2.5	Auswertung des PGE <sub>2</sub> -ELISA.....	213



<b>D</b>	<b>TABELLARISCHER ANHANG .....</b>	<b>215</b>
1	EX-VIVO-VERGLEICH DER VERTEILUNGSKINETIK ZWEIER CYCLOSPORIN A-FORMULIERUNGEN VON HUMANEM LUNGENGeweBE IN HUMANES BLUT MIT HILFE EINES DIALYSEMODELLS .....	217
1.1	Lösung von Cyclosporin A in Propylenglykol (CsA-PG) .....	217
1.2	Liposomale Cyclosporin A-Formulierung (L-CsA) .....	217
1.3	Mittlere Konzentration von CsA im Dialysat - Vergleich der beiden Formulierungen .....	218
1.4	AUC.....	218
1.5	Diffusionsrate (DR) .....	219
2	ETABLIERUNG DES KONTINUIERLICHEN DIALYSEMODELLS - VERGLEICH DER DIFFUSIONSKINETIK VON FLUTICASONPROPIONAT BEI ANWENDUNG DER STATISCHEN UND DER KONTINUIERLICHEN DIALYSE .....	220
2.1	Statische Dialyse (SD) .....	220
2.2	Kontinuierliche Dialyse (KD) .....	220
2.3	Mittlere Konzentration von Fluticasonpropionat (FP) im Dialysat – Vergleich der statischen (SD) und der kontinuierlichen (KD) Dialyse.....	221
3	BESTIMMUNG DER DIFFUSIONSKINETIK VON FENOTEROLHYDROBROMID UND IPRATROPIUMBROMID NACH FREISETZUNG AUS DEM DOSIERAEROSOL BERODUAL <sup>®</sup> N BEI ANWENDUNG DES KONTINUIERLICHEN DIALYSEMODELLS .....	222
3.1	Resultierende tatsächlich applizierte Dosis.....	222
3.1.1	Fenoterol.....	222
3.1.2	Ipratropiumbromid .....	222
3.2	Diffusionsversuche Berodual <sup>®</sup> N.....	223
3.2.1	Fenoterol.....	223
3.2.2	Ipratropiumbromid .....	224
4	UNTERSUCHUNGEN ZUR PULMONALEN ABSORPTION VON SALBUTAMOL NACH VORHERIGER INHALATIVER APPLIKATION VON CARNITIN AM HUMANEN LUNGENPERFUSIONSMODELL.....	226
4.1	Tatsächlich applizierte Dosis und Gewicht des Lungengewebes .....	226
4.2	Ergebnisse der Perfusionsversuche.....	226
4.2.1	Venöser Ausgang .....	226
4.2.2	Reservoir .....	227
4.2.3	AUC .....	228
5	BESTIMMUNG DER KONZENTRATION VON PROSTAGLANDIN E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) IN PROBEN AUS LUNGENPERFUSIONSVERSUCHEN UND VOLLBLUT-ÄQUIVALENT-PROBEN MITTELS ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA).....	229
5.1	Perfusionen mit Blutmischung als Perfusionsflüssigkeit (GW597901) .....	229
5.2	Perfusionen mit Puffer als Perfusionsflüssigkeit (Salbutamol) .....	229
5.3	Leerwertkontrollen aus Vollblut-Äquivalent .....	230
<b>E</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>233</b>
1	ZUSAMMENFASSUNG.....	235
2	SUMMARY .....	238
<b>F</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>241</b>
<b>G</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>245</b>



## **A Einleitung**

---



# **1 Die humane Lunge – sowohl Weg als auch Ziel für pulmonal applizierte Arzneistoffe**

## **1.1 Obstruktive Erkrankungen der Lunge**

### **1.1.1 COPD**

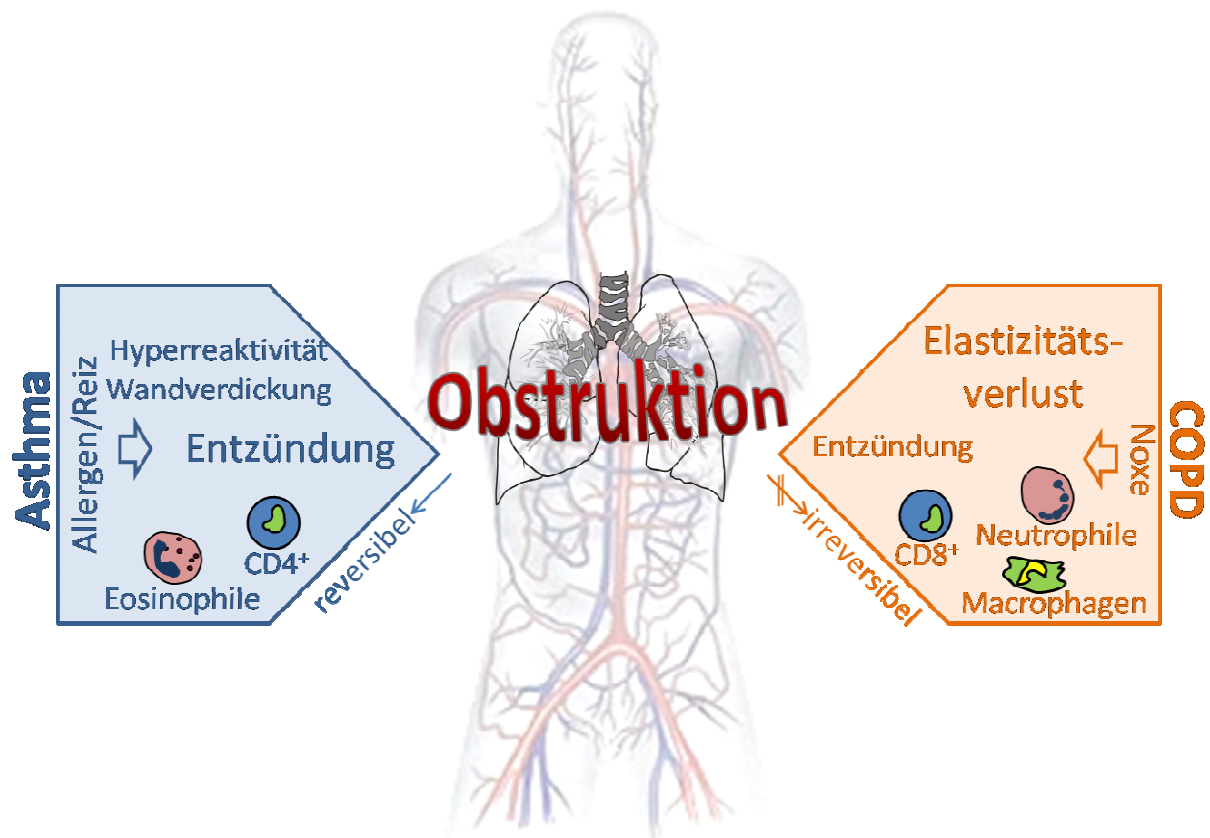
Die chronisch obstruktive Lungenkrankheit (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) ist weltweit eine der Hauptursachen chronischer Morbidität und Mortalität [1] und ist die einzige der sechs Haupt-Todesursachen Herzerkrankung, Schlaganfall, Krebs, Unfälle, Diabetes Mellitus und COPD in den USA, die seit 1970 beständig an Bedeutung zugenommen hat [2]. Es wird damit gerechnet, dass diese Krankheit bis zum Jahre 2020 weltweit an dritter Stelle der führenden Todesursachen stehen wird und dass sie Rang fünf innerhalb der Belastungen durch Krankheitskosten einnehmen wird [1, 3]. Den am häufigsten vorkommenden beeinflussbaren Risikofaktor stellt der Zigarettenrauch dar, auch die Exposition zu Tabakrauch allgemein, beruflich bedingte Belastung durch Stäube und Chemikalien und Luftverschmutzung innerhalb und außerhalb geschlossener Räume tragen in entscheidendem Maße zur Entwicklung einer COPD bei, wobei die Gesamtlast inhalierten Partikel über die Lebenszeit eines Individuums beachtet werden muss [1]. Auch systemische Komplikationen der COPD wie Gewichtsverlust, Ernährungsstörungen oder Dysfunktionen der Skelett-Muskulatur sind bekannt, die mit extrapulmonalen Comorbiditäten im Zusammenhang stehen. Hier ist neben neurologischen Defekten beispielsweise ein erhöhtes Risiko der Patienten für kardiovaskuläre Erkrankungen, Osteoporose, Diabetes oder Depression zu nennen. Diesen Auswirkungen liegt vermutlich ein Zusammenspiel multipler Faktoren wie mangelnde körperliche Aktivität, systemische Entzündung, Gewebehypoxie und oxidativer Stress zugrunde, wobei die Mechanismen weitgehend ungeklärt sind [1, 4-7].

Die pulmonale Komponente der chronisch obstruktiven Lungenkrankheit ist definiert als eine nicht vollständig reversible, meist progressiv fortschreitende Einschränkung der Atmung mit einer übermäßigen inflammatorischen Reaktion der Lunge auf schädliche Partikel oder Gase und äußert sich unter anderem in den Symptomen Husten, Sputum-Produktion und Dyspnoe bei Anstrengung [1]. In der aktuellen Definition der COPD wurde bewusst auf die Begriffe „chronische Bronchitis“ und „Emphysem“ verzichtet, da eine chronische Bronchitis – definiert als das Auftreten von Husten und Auswurf über mindestens drei Monate in jeweils zwei aufeinanderfolgenden Jahren - nicht zwangsläufig mit einer Atemwegsobstruktion verbunden ist

und ein Emphysem als Zerstörung der Alveolen nur eine der bei COPD-Patienten auftretenden pathologischen Veränderungen der Lunge beschreibt [1]. Im Rahmen der Pathophysiologie initiieren und erhalten die bereits erwähnten Noxen ein Entzündungsgeschehen in der Lunge. Dieses wird durch oxidativen Stress und eine überschüssige Aktivität Lungenparenchym-zerstörender Proteasen wie z.B. Matrix-Metalloproteasen (MMPs) bei gleichzeitig verringerter Aktivität der entsprechenden Antiproteinasen (z.B. Tissue inhibitors of MMP 1-4, TIMP 1-4) noch verstärkt. Es entsteht eine obstruktive Bronchiolitis, die mit Umbauvorgängen in der Struktur der kleineren Atemwege einhergeht, und eine Zerstörung des Lungenparenchyms und der Alveolarsepten führt zum Elastizitätsverlust der Lunge. Aus dem Zusammenspiel dieser krankhaften Veränderungen resultiert letztendlich die chronische Atemwegobstruktion, da die Atemwege ihre Fähigkeit, während der Expiration offen zu bleiben, einbüßen und kollabieren [1, 8].

Eine Abgrenzung der COPD vom Asthma bronchiale (siehe 1.1.2), der zweiten chronisch obstruktiven Lungenerkrankung mit weltweit sehr großer Bedeutung, erfolgt auf Grund der Tatsache, dass beim Asthma die Atemwegobstruktion weitgehend reversibel ist, wobei beachtet werden muss, dass bei den Patienten auch Mischformen der beiden Erkrankungen auftreten können [1, 9, 10]. Auch die Art der chronischen Entzündung der Atemwege bei der COPD ist im Vergleich zum Asthma von ganz anderer Natur: vor allem CD8<sup>+</sup> - T-Lymphozyten, Macrophagen und neutrophile Granulozyten sind nach Einwirkung einer Noxe in das inflammatorische Geschehen involviert (siehe *Abbildung 1*). Die daraus entstehende Obstruktion der Atemwege ist irreversibel bzw. nicht vollständig reversibel [1].

Bronchodilatoren stellen die Basis jeder medikamentösen Therapie zur Symptombehandlung dieser Erkrankung dar, eine inhalative Anwendungsform wird dabei bevorzugt. Die Optionen umfassen kurz- und langwirksame Anticholinergika und  $\beta_2$ -Sympathomimetika, Methylxanthine und die Kombination verschiedener Arzneistoffe dieser Gruppen, wobei ab Stadium II ( $50\% \leq FEV_1 < 80\%$  des vorhergesagten Wertes und  $FEV_1/FVC < 0,7$ ) der vier COPD-Schweregrade langwirksame Bronchodilatoren als Dauermedikation eingesetzt werden [1]. Obwohl das beschriebene Entzündungsgeschehen bei der Pathogenese der COPD eine entscheidende Rolle spielt, ist der Einsatz inhalativer Glucocorticoide nicht für jeden Patienten indiziert, so wird diese Substanzklasse in der Regel als Dauermedikation nur als Zusatz zur bronchodilatierenden Therapie bei Personen mit Stadium III oder IV der COPD und wiederholten Exazerbationen gegeben [1].



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Obstruktionsgeschehens bei Asthma und COPD im Vergleich.

Auf der linken Seite sind Faktoren dargestellt, die im Falle des Asthmas zur Entstehung einer Atemwegobstruktion beitragen: Allergene oder Reize fungieren meist als Auslöser und  $CD4^+$ -T-Lymphozyten sowie eosinophile Granulozyten charakterisieren typischerweise die chronische Entzündungsart. Die Obstruktion kommt aus einem komplexen Zusammenspiel mehrerer Faktoren, darunter eine bronchiale Wandverdickung und eine Hyperreaktivität der Lunge zustande und ist weitgehend reversibel. Rechts in der Abbildung ist die COPD-Seite dargestellt: Am Entzündungsgeschehen sind hier nach Einwirkung einer Noxe vornehmlich  $CD8^+$ -Lymphozyten, Macrophagen und neutrophile Granulozyten beteiligt. Die Obstruktion resultiert unter anderem durch einen Elastizitätsverlust der Lunge und ist nicht vollständig reversibel. Eine derart klare Abgrenzung der beiden Erkrankungsformen ist allerdings nicht immer möglich.

### 1.1.2 Asthma bronchiale

Weltweit wird die Zahl der vom Asthma betroffenen Patienten auf etwa 300 Millionen geschätzt [11], was die Wichtigkeit einer adäquaten Behandlung dieser Erkrankung deutlich macht. Per Definition der Global Initiative for Asthma (GINA) handelt es sich beim Asthma um eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Atemwege, die mit einer bronchialen Hyperreaktivität einhergeht, durch Obstruktion der Atemwege gekennzeichnet ist und sich klinisch manifestiert

in den periodisch auftretenden Symptomen pfeifende Atemgeräusche, Atemnot, Brustenge und Husten vor allem in der Nacht oder in den frühen Morgenstunden. Die Stärke der Obstruktion ist dabei variabel und ist meist spontan oder durch medikamentöse Behandlung reversibel. Zu den Triggerfaktoren, die eine Exacerbation auslösen können, gehören beispielsweise Allergene, reizende Stoffe, körperliche Betätigung, Infektionen des Respirationstraktes, starke emotionale Regungen oder kalte Luft. Laut den aktuellen GINA-Empfehlungen ist bei der Klassifizierung des Asthma die Kontrolle der Erkrankung der entscheidende Faktor und nicht der Schweregrad [12]. Ein komplexes Zusammenspiel aus genetischen prädisponierenden Faktoren und Einflüssen aus der Umwelt bildet die Grundlage für die Entstehung und das Auslösen der Krankheit, wenngleich die genauen Mechanismen und die Pathogenese noch nicht in Gänze verstanden werden [12].

Anders als bei der COPD löst beim Asthma ein meist über Allergene verursachter Reiz eine vorwiegend durch CD4<sup>+</sup> - T-Lymphozyten und eosinophile Granulozyten vermittelte chronische Entzündung der Atemwege aus, die in einer grundsätzlich reversiblen Obstruktion der Atemwege resultiert [1, 12] (siehe *Abbildung 1*).

Auch die Art der strukturellen Veränderungen in der Lunge ist beim Asthma im Vergleich zur COPD typischerweise durch andere Merkmale charakterisiert, wenngleich die einzelnen Zusammenhänge komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt sind [12]. Ablagerungen von Kollagenfasern und Proteoglykanen unterhalb der Epithelschicht münden in fibrotische Veränderungen, eine durch Entzündungsmediatoren ausgelöste Hypertrophie und Hyperplasie der glatten Muskulatur trägt zu einer Zunahme der Wanddicke in den Atemwegen bei [12-14]. Durch das Entzündungsgeschehen kommt es ferner vermehrt zu mikrovaskulären Leckagen und Ödemen, die zusammen mit einer übermäßigen Schleimproduktion, der Bronchialwand-Verdickung und einer erhöhten Kontraktilität der glatten Muskelzellen resultieren in einer Verengung der Atemwege [12, 15-17]. Wie bereits erwähnt, ist eine klare Abgrenzung von Asthma und COPD in der klinischen Praxis jedoch nicht immer möglich, da fließende Übergänge zwischen beiden Erkrankungen existieren [1].

Grundsätzlich kann man bei der Medikation des Asthma bronchiale zwischen den beiden Wirkstoffklassen „controller“ und „reliever“ unterscheiden. Arzneistoffe, die von den Asthmapatienten täglich über eine längere Zeit hinweg angewendet werden und damit eine klinische Kontrolle der Erkrankung ermöglichen („controller“), umfassen die Gruppe der Glucocorticoide, die in inhalativer Form augenblicklich auf Grund ihrer anti-entzündlichen Wirkung die effektivste Methode zur Krankheitskontrolle darstellen [18-21], Leukotrienrezeptor-Antagonisten, langwirksame  $\beta_2$ -Sympathomimetika, Theophyllin, Mastzellstabilisatoren und bei



bestimmten Formen des schweren allergischen Asthmas Anti-IgE (Omalizumab) [12]. Zur Klasse der „reliever“ gehören neben raschwirksamen  $\beta_2$ -Sympathomimetika – das Mittel der Wahl für die schnelle Linderung eines Bronchospasmus oder zur Vorbeugung von anstrengungsinduziertem Asthma - auch Anticholinergika, kurzwirksames Theophyllin und in einzelnen Fällen orale kurzwirksame  $\beta_2$ -Sympathomimetika [12]. Sie werden im Bedarfsfall eingesetzt und wirken innerhalb von wenigen Minuten bronchienerweiternd [19]. Die bevorzugte Applikationsform bei der Behandlung des Asthmas ist die Inhalation der jeweiligen Wirkstoffe. Im Gegensatz zur oralen oder parenteralen Anwendung bietet die topische Applikation den Vorteil einer Deposition direkt am Wirkort mit einer hohen lokalen Arzneistoffkonzentration verbunden mit einer Minimierung systemischer Wirkstoffspiegel und damit systemischer Nebenwirkungen.

## 1.2 Inhalative Anwendung von Arzneistoffen

### 1.2.1 Lokale bzw. systemische Wirkung pulmonal applizierter Wirkstoffe

Der Ursprung inhalativer Therapieformen liegt mehrere Jahrtausende zurück. Bereits etwa 2000 Jahre vor Christus wurden in Indien im Rahmen der ayurvedischen Heilkunde Datura-Zubereitungen zur Bronchienerweiterung geraucht [22]. Aus der heutigen Medizin sind Inhalativa nicht mehr wegzudenken und finden sowohl zur topischen als auch zur systemischen Wirkung eine breite Anwendung (siehe *Tabelle 1*). Mit dem Ziel einer lokalen Wirkung in der Lunge werden z.B. beim Asthma bronchiale oder auch bei der COPD bronchienerweiternde Wirkstoffe wie die kurzwirksamen  $\beta_2$ -Sympathomimetika Salbutamol und Fenoterol oder das Anticholinergikum Ipratropiumbromid eingesetzt. Auch Glucocorticoide, wie beispielsweise Fluticasonpropionat entfalten ihre entzündungshemmende Wirkung direkt am Zielorgan. Nach einer Lungentransplantation kann Cyclosporin A inhaliert werden, um eine Abstoßung des Organs zu verhindern. Dornase alpha, eine gentechnisch hergestellte Variante des natürlich beim Menschen vorkommenden Enzyms Desoxyribonuklease I, welches extrazelluläre DNA spaltet, wird bei Patienten mit Cystischer Fibrose zur Verflüssigung des Bronchialschleims und zur Verbesserung der mukoziliären Clearance eingesetzt.

Eine systemische Wirkung über den inhalativen Weg wird z.B. durch Flurane bei der Narkoseeinleitung vor operativen Eingriffen erreicht. Gegen Influenza A und B wird das Virustatikum Zanamivir in Form eines Pulverinhalators eingesetzt. Auch an der Entwicklung inhalierbarer Analgetika wie Fentanyl und Morphin wird gearbeitet; mit der inhalativ

applizierbaren Form des Insulins wurde bereits gezeigt, dass dieser Applikationsweg sich sogar für Makromoleküle eignet, auch wenn das entsprechende Fertigarzneimittel Exubera<sup>®</sup> seit dem Jahr 2008 aus kommerziellen Gründen und wegen möglicher Gesundheitsrisiken nicht mehr auf dem Arzneimittelmarkt verfügbar ist [23-25]. Ein besonders bemerkenswerter Aspekt der Nutzung des Respirationstraktes als Portal für systemisch wirkende Arzneistoffe ist, dass für eine derartige Applikation keine invasiven Maßnahmen erforderlich sind.

**Tabelle 1:** Beispiele für pulmonal applizierte Wirkstoffe

Lokale Wirkung		Systemische Wirkung	
Wirkstoff	Handelspräparat (Beispiel)	Wirkstoff	Handelspräparat (Beispiel)
Salbutamol	Bronchospray <sup>®</sup> novo	Isofluran	Forene <sup>®</sup>
Fenoterol	Berotec <sup>®</sup> N	Zanamivir	Relenza <sup>™</sup>
Ipratropiumbromid	Atrovent <sup>®</sup> N	Morphin, Fentanyl	Gegenwärtig nur in klinischen Studien
Fluticasonpropionat	Flutide <sup>®</sup> mite	Insulin	Exubera <sup>®</sup> , nicht mehr im Handel
Cyclosporin A	Gegenwärtig nur in klinischen Studien		
Dornase alpha	Pulmozyme <sup>®</sup>		

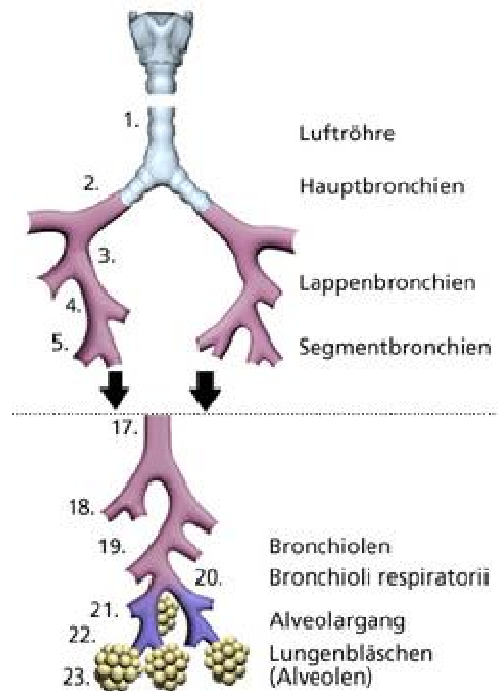
Die Therapiebeispiele belegen die ungeheure Bedeutung und das Potential pulmonal applizierter Medikamente. Im Vergleich zur peroralen Einnahme bietet die inhalative Anwendung von Arzneistoffen einige Vorteile, wobei, wie bereits angedeutet, unterschieden werden muss, ob der Wirkstoff lokal gegen eine Erkrankung der Lunge eingesetzt wird, oder ob er systemisch wirken soll. Die bei der topischen Anwendung prinzipiell angestrebte lange Verweildauer des Arzneistoffes in der Lunge kann durch eine gezielte technologische Formulierung der inhalierten Aerosol- oder Pulverpartikel erreicht werden, wie z.B. der Verwendung einer liposomalen Zubereitungsform oder der Erzeugung eines Aerosols mit medianen aerodynamischen Massenäquivalentdurchmessern von 1 bis 5 µm [26-28]. Ein

weiterer Vorteil ist, dass die erwünschte Wirkung durch eine hohe Arzneistoffkonzentration am Zielort maximiert werden kann bei einer gleichzeitigen Minimierung unerwünschter systemischer Nebenwirkungen, indem gegenüber der peroralen Gabe bei pulmonaler Applikation zum Einen eine wesentlich geringere Wirkstoffdosis erforderlich ist und zum Anderen ein deutlich kleinerer Teil dieser Dosis in die systemische Zirkulation gelangt und hohe Blutspiegel weitestgehend vermieden werden. Zudem trägt das direkte Anfluten des Arzneistoffes am Zielort zu einem raschen Wirkungseintritt bei [29, 30].

Im Falle der Nutzung der Lunge als nicht invasives Portal für systemisch wirkende Arzneistoffe wird eine schnelle Umverteilung des Wirkstoffes vom Lungengewebe in das Blutkompartiment angestrebt. Hierbei sind die anatomischen Eigenschaften der Lunge auf Grund ihrer physiologischen Funktion von großem Vorteil: Die enorme alveolare Resorptionsoberfläche der Lunge, die beim Erwachsenen mehr als 100 m<sup>2</sup> umfasst [31], eine ausgesprochen hohe Permeabilität des Lungenepithels und ein geringes wässriges Volumen am Ort der Absorption tragen dazu bei, dass kleine Moleküle nach Deposition sehr schnell – innerhalb von Sekunden oder Minuten – in den systemischen Kreislauf aufgenommen werden können [31, 32]. Physikochemische Substanzeigenschaften wie die Lipophilie, das Molekulargewicht und das Potential, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, spielen bei der Schnelligkeit der Absorption eine entscheidende Rolle [33]. Die intensive Durchblutung des respiratorischen Mukosa und die dünnen Barrieren zwischen Alveolarraum und Blutgefäßlumen begünstigen die rasche Absorption zusätzlich. Im Gegensatz zur enteralen Applikation wird der First-Pass-Effekt in der Leber umgangen; die Konzentration metabolisierender Enzyme ist in der Lunge bis zu etwa 65 % geringer als im Gastrointestinaltrakt und in der Leber [34], wodurch die inhalierten Moleküle nicht solch ausgeprägten Abbauprozessen unterworfen sind, bevor sie überhaupt den systemischen Kreislauf erreichen [32, 33, 35-37].

### **1.2.2 Anatomie der humanen Lunge**

Entsprechend der Funktion wird der Respirationstrakt in einen luftleitenden und einen gasaustauschenden Bereich unterteilt. Die konduktiven Passagen umfassen dabei Nase, Nasenrachenraum, Larynx, Trachea, Bronchien und Bronchiolen bis hin zu den terminalen Bronchiolen. Der Austausch von frischem Sauerstoff gegen Kohlenstoffdioxid findet in den Bronchioli respiratorii, den Alveolargängen und den Lungenbläschen statt [33, 38]. In *Abbildung 2* sind die luftleitenden Lungenabschnitte ab der Trachea in weiß und rosa dargestellt, die Farbe Lila signalisiert die Bereiche des Gasaustausches neben den Alveolen.



**Abbildung 2:** Anatomie des humanen Bronchialbaumes.

Die Luftröhre mündet in zwei Hauptbronchien, die den rechten und den linken Lungenflügel mit Sauerstoff versorgen. Entsprechend der Anzahl der Lungenlappen gliedert sich der rechte Hauptbronchus in drei Lappenbronchien, der linke Hauptbronchus in zwei. Die Lappenbronchien verzweigen sich dichotom zu den Segmentbronchien und die Verzweigung setzt sich fort in immer kleinere Äste, die Bronchiolen und Alveolargänge, bis nach etwa 20 bis 25 Teilungsschritten die Lungenbläschen erreicht werden. Die Zahlen neben den Bronchialästen bezeichnen den Verzweigungsschritt [39]. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von: [www.lungenaerzte-im-netz.de](http://www.lungenaerzte-im-netz.de)

Dem anatomischen Aufbau und dem Luftstrom von außen in das Innere des Organs folgend, teilt sich die Luftröhre (Trachea) in zwei Hauptbronchien auf, diese wiederum verzweigen sich weiter in die Lappenbronchien, die jeweils einen Lungenlappen belüften (siehe *Abbildung 2*). Beim Menschen gliedert sich die linke Lungenhälfte in zwei Lungenlappen, wohingegen die rechte Seite der Lunge dreigeteilt ist und sich aus Ober-, Mittel-, und Unterlappen zusammensetzt. Die Lappenbronchien teilen sich weiter in die Segmentbronchien und diese verzweigen sich in die Bronchiolen, die nach fortlaufender Aufteilung schließlich in die Alveolargänge und die Alveolensäckchen übergehen (siehe *Abbildung 2*). Ausgehend von der Trachea hin zur Peripherie der Lunge entsteht durch die wiederholte Aufteilung eines Hauptzweiges in jeweils zwei Tochterzweige letztendlich der Bronchialbaum mit seinen terminalen Ästen, wobei Durchmesser und Länge der einzeln betrachteten Abschnitte abnehmen, gleichzeitig aber ihr Gesamtdurchmesser und die Gesamtoberfläche exponentiell zunehmen [40, 41]. Die Blutversorgung der Lunge wird durch zwei verschiedene

Zirkulationssysteme sichergestellt, wobei der bronchiale Kreislauf als Teil des systemischen Blutkreislaufes unter hohem Druck steht und die konduktiven Atemwege von der Trachea bis hin zu den terminalen Bronchiolen mit sauerstoffreichem Blut und Nährstoffen beliefert. In den pulmonalen Kreislauf hingegen, der das engmaschige Kapillarbett der Alveolen umfasst, mündet das gesamte Herzschlagvolumen und ermöglicht im Rahmen eines Niederdrucksystems den Gasaustausch durch passive Diffusion und die Nährstoffversorgung der Lungenbläschenwände [42].

### **1.3 Modelle zur Charakterisierung der Pharmakokinetik pulmonal applizierter Wirkstoffe**

So vielversprechend die Entwicklung und Anwendung von inhalativ anwendbaren Arzneimitteln auch ist, die Sicherheit und Effektivität der Wirkstoffe, ihre zuverlässige und gut kontrollierbare Deposition, Freisetzung und Absorption, eine hohe Stabilität der Formulierung, wirtschaftliche und anwenderfreundliche Aspekte im klinischen Alltag stellen eine große Herausforderung dar [32, 43]. Daher ist es gerade für die Aspekte der Sicherheit und Wirksamkeit sehr wichtig, die Pharmakokinetik inhalativ applizierter Wirkstoffe inklusive pulmonaler Absorptions-, Distributions- und Eliminationsprozesse beschreiben zu können, wobei pharmakokinetische Modelle der Lunge, die eine Vielzahl von *in-vitro*-, *ex-vivo*- und *in-vivo*-Methoden umfassen, einen wichtigen Beitrag leisten können.

#### **1.3.1 *In-vitro*-Zellkulturmodelle**

Einen ersten Eindruck über Absorptionsprozesse, Geschwindigkeit und Ausmaß der Umverteilung eines pulmonal applizierten Wirkstoffes von der Lunge in den systemischen Kreislauf können *in-vitro*-Zellkulturmodelle, wie beispielsweise die humane Bronchialzelllinie Calu-3 vermitteln. Da durch Flimmerepithelzellen und sekretorische Zellen sowohl die physiologischen Eigenschaften des Epithels der Luftwege nachempfunden werden als auch Merkmale bezüglich Transportmechanismen und Metabolisierung, die für die Absorption des Wirkstoffes relevant sind, eignet sie sich hervorragend für die Klärung transepithelialer Mechanismen bezüglich Diffusion und Transport und für die Vorhersage der pulmonalen Absorption inhalativ angewandter Wirkstoffe *in-vivo* [44-46]. Auch die Zelllinie 16HBE14o- kann für *in-vitro*-Studien zu pharmakokinetischen Prozessen inhalativ verabreichter Wirkstoffe herangezogen werden. Sie geht durch virale Transformation aus normalen bronchialen

Epithelzellen hervor und kann wie die Calu-3 Zelllinie durch Bildung von Tight Junctions eine Diffusionsbarriere formieren, eine wichtige Eigenschaft, damit das Modell ähnliche Transporteigenschaften wie die intakte Lunge *in-vivo* aufweist [47, 48]. Zellkulturmodelle bieten die Möglichkeit, mit nicht allzu aufwändigen Mitteln schnell und mit einer hohen Durchsatzrate Wirkstoffe hinsichtlich ihrer pulmonalen Absorptionskinetik und ihres –mechanismus zu screenen und stellen in vielen Fällen eine Alternative zu Tierversuchen dar [49].

Allerdings stößt die Aussagekraft solcher *in-vitro*-Systeme schnell an ihre Grenzen, wenn es um komplexe und miteinander interagierende Vorgänge im realen Organsystem geht. So fehlen beispielsweise Mechanismen der mucoziliären Clearance oder auch alveolare Macrophagen, die besonders bei der inhalativen Applikation von Makromolekülen eine Rolle spielen, da diese als Fremdstoffe im Zuge der Elimination von Macrophagen aufgenommen werden [47, 50]. Eine Forschergruppe um Blank *et al.* hat diesbezüglich ein interessantes Co-Kultur Modell aus drei Zellarten entwickelt, das eine Monolayerschicht A549 oder 16HBE14o-, darüber aus humanen Monozyten abgeleitete Macrophagen und darunter aus humanen Monozyten abgeleitete dendritische Zellen kombiniert; auf diese Weise sollte die Aufnahme von Partikeln in der Lunge durch Immunzellen nachgestellt werden, was ein vielversprechendes und an die Physiologie angenähertes *in-vitro*-Modell für die Absorption von Wirkstoffen einschließlich Mechanismen der Clearance in der Lunge darstellen könnte [49, 51].

Durch die limitierte Aussagekraft der *in-vitro*-Modelle ist es sehr wichtig, Ergebnisse von *in-vitro*-Studien im Zusammenhang mit Erkenntnissen aus anderen Modellen *ex-vivo* und *in-vivo*, die näher an physiologische Bedingungen heranreichen, zu bewerten [47].

### 1.3.2 *Ex-vivo-Modelle*

Ein *ex-vivo*-Modell wie das einfache Dialysemodell mit humanem Lungengewebe im Donorkompartiment [52, 53], bietet die Möglichkeit, die Auflösungs- und Diffusionskinetik unterschiedlicher Wirkstoffformulierungen zu vergleichen. So untersuchte Freiwald unter Einsatz zweier verschiedener Dosieraerosole (Ventolair® und Sanasthmax®) nach Deposition von Beclomethasondipropionat (BDP) auf dem Lungengewebe die Vorgänge der Auflösung und Umverteilung des Arzneistoffes in das Akzeptorkompartiment der Dialysekammer. Er stellte für die von Ventolair® stammenden Wirkstoffpartikel fest, dass die Auflösung schneller und in einem größeren Ausmaß erfolgte als bei Verwendung von Sanasthmax®, was sich in einer vermehrten Diffusion von BDP in die Dialyseflüssigkeit in der Akzeptorkammer bei Ventolair® äußerte [52, 53]. Auf die Stärken und Limitationen dieses Modells wird in nachfolgenden Kapiteln (siehe B1.2, B1.5, B2.1 – *Allgemeiner Teil*) näher eingegangen.

*Ex-vivo* perfundierte Tierlungen ermöglichen eine Charakterisierung lungenspezifischer pharmakokinetischer Vorgänge im Rahmen der pulmonalen Absorption. So wurden Versuche mit isolierten, perfundierten und ventilierten Ratten- Meerschweinchen- und Kaninchen-Lungen durchgeführt [54, 55]. Ein entscheidender Vorteil dieser Modelle ist, dass die pulmonale Wirkstoffabsorption in isolierter Form ohne den Beitrag des komplexen Systems *in-vivo* untersucht werden kann. Dabei kann nach Tötung der Versuchstiere das komplette Atmungsorgan eingesetzt werden und die Integrität zellulärer und biochemischer Systeme sowie anatomische Strukturen bleiben weitestgehend erhalten.

Mit dem vom Linder *et al.* [56] entwickelten humanen Lungenperfuisionsmodell gelang eine Verschmelzung der Methodik des isolierten Organs mit humanem Gewebe, wobei es sich für die Beantwortung sowohl pharmakokinetischer als auch pharmakodynamischer Fragestellungen eignet und dabei eine gute Annäherung an reale Bedingungen *in-vivo* erzielt [53, 56, 57]. Im Gegensatz zu perfundierten Tierlungen kann hier nur ein Teil des Organs für die experimentellen Zwecke eingesetzt werden, da das humane Lungengewebe im Rahmen einer Lobektomie, Bilobektomie oder Pneumektomie von Patienten für die experimentellen Zwecke zur Verfügung gestellt wird. Ein Nachteil der *ex-vivo* perfundierten Organe ist deren zeitlich begrenzte Einsatzfähigkeit, die die Versuchsdauer auf wenige Stunden einschränkt und die Untersuchung länger andauernder pharmakokinetischer Vorgänge durch die Entstehung von Ödemen und Zerstörung des Gewebes leider nicht ermöglicht [57, 58].

Lungenödeme bei Organspendern stellen auch im Bereich der Lungentransplantation ein großes Problem dar, da Lungen mit einer solchen Verletzung des Gewebes oft ungeeignet für eine Transplantation sind bzw. ein sehr hohes Risiko für eine Dysfunktion des transplantierten Spenderorgans innerhalb der ersten Tage bergen [59].

### **1.3.3 *In-vivo*-Studien**

Das direkte Gewinnen pharmakokinetischer Daten pulmonal applizierter Wirkstoffe ist auch durch *in-vivo*-Studien möglich. Im Rahmen tierexperimenteller Modelle werden an den Versuchstieren wie Mäusen, Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen oder auch Hunden spezielle Techniken der intratrachealen Instillation und Inhalation angewendet, um pharmakokinetische Vorgänge in der Lunge innerhalb ihres physiologischen Umfeldes zu untersuchen [47, 60-65]. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse pharmakokinetischer Tierstudien auf den Menschen ist jedoch begrenzt, da zwischen diesen Spezies große Abweichungen in der Anatomie der Lunge auf physiologischer und molekularer Ebene existieren. So gibt es deutliche Unterschiede in der Deposition inhalierten Partikel und der mucozilären Clearance, Faktoren, die einen

bedeutenden Einfluss auf die im Zielgewebe der Lunge deponierte Dosis, die sich anschließenden Absorptionsvorgänge und letztlich die Wirkung des Arzneistoffes haben können [66, 67]. Bezüglich des Clearance-Musters weist der Mensch beispielsweise eine größere Ähnlichkeit zur Spezies Hund auf als zu Nagern, wobei in Abhängigkeit von der Deposition sich langsam auflösende Partikel beim Menschen länger in der Lunge verweilen als bei Nagern [66-68].

Beim Menschen prallen inhalierte Aerosolteilchen mit einem medianen Massendurchmesser (MMD) von 5 bis 10  $\mu\text{m}$  im oropharyngealen Bereich oder in den luftleitenden Lungenabschnitten auf; Partikel, die kleiner als 1  $\mu\text{m}$  sind, werden hingegen meist wieder ausgeatmet und stehen für eine pulmonale Absorption ebenfalls nicht zur Verfügung. Um eine Deposition in den kleinsten Atemwegen in der Peripherie der humanen Lunge und im Bereich der Alveolen zu erreichen, wird somit je nach Zielregion des Arzneistoffes ein Aerosol mit einem MMD der Teilchen von 1 bis 5  $\mu\text{m}$  anvisiert [47, 69, 70]. Bei kleinen Nagern, die meist als Labortiere für die Versuche eingesetzt werden, ist ein solches Depositionsmuster nicht vorzufinden. Als obligatorische Nasenatmer weisen sie eine völlig andere Atemphysiologie auf als der Mensch, eine Modifikation des MMD inhalierter Partikel führt bei ihnen kaum zu Veränderungen im Depositionsmuster der Teilchen und die Distribution inhalierter Stoffe lässt sich zwischen Mensch und Tier in diesen Fällen oftmals nicht vergleichen [47, 71]. Zudem werden die Untersuchungen aus ethischen Gründen meist an anästhesierten Tieren durchgeführt, wobei eine Narkose z. B. die Stabilität des Lungen-Surfactants herabsetzen, die Permeabilität des alveolaren Epithels erhöhen oder die mukoziliäre Clearance verändern und somit die pulmonale Absorption entscheidend beeinflussen kann [72-75].

Aber auch Humanstudien, die zweifellos die reale Situation am besten widerspiegeln, können zu bestimmten Aspekten nur begrenzte bzw. keine Informationen liefern. Wie in den übrigen *in-vivo*-Studien ist eine isolierte Untersuchung der Verweilzeit eines pulmonal applizierten Wirkstoffes im Lungengewebe und seiner Umverteilungskinetik nur sehr schwer möglich, da der Einfluss verschiedener Faktoren auf die analysierten Blutspiegel, wie die Verteilung in andere Gewebe, Metabolisierungs- oder Eliminationsprozesse berücksichtigt werden muss und zum großen Teil Wirkstoffkonzentrationen im systemischen Kreislauf unterhalb der Nachweisgrenze zu erwarten sind. Außerdem ist die Depositionsrate der inhalierten Substanz in der Lunge unbekannt, es sei denn sie wird mit Hilfe aufwändiger und deshalb selten durchgeführter Methoden wie radioaktiver Wirkstoffmarkierung bestimmt. Zudem ist die Wirkung, die aus dem im Mund- und Rachenraum abgelagerten und im Anschluss



verschluckten Dosisanteil resultiert, bei Substanzen mit einer hohen oralen Bioverfügbarkeit kaum vom Effekt der pulmonal absorbierten Dosis abgrenzbar [76-79].

Erst das Zusammenspiel der einzelnen Methoden, von denen jede ihre Stärken und Limitierungen hat und der gezielte Einsatz der für die jeweilige Fragestellung am besten geeigneten Methode ermöglicht valide Erkenntnisse zur Pharmakokinetik pulmonal applizierter Wirkstoffe.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, Modelle der humanen Lunge zu etablieren bzw. weiterzuentwickeln, die sich zur Bestimmung der Pharmakokinetik pulmonal applizierter Wirkstoffe eignen und die dabei den physiologischen Verhältnissen der humanen Lunge möglichst nahe kommen. Dazu sollten Wirkstoffe aus ganz unterschiedlichen Klassen beispielhaft zur Untersuchung herangezogen werden. Das bereits durch Freiwald *et al.* etablierte Modell der statischen Dialyse [53] sollte für den Vergleich der Diffusionskinetik zweier verschiedener Cyclosporin A-Formulierungen modifiziert werden und in weiteren Experimenten um den Faktor eines konstanten Flusses durch das Akzeptorkompartiment erweitert werden. Für die Etablierung der kontinuierlichen Dialyse wurde Fluticasonpropionat als Modellsubstanz ausgewählt, Fenoterol-HBr und Ipratropiumbromid aus dem Berodual<sup>®</sup> N Dosieraerosol dienen als Wirkstoffe für Diffusionsexperimente mit dem kontinuierlichen Dialysemodell. Am humanen Lungenperusionsmodell, dessen Entwicklung auf Linder *et al.* [56] zurückgeht, sollten Fragen zu Transportmechanismen auf molekularer Ebene beantwortet werden, die sich aus vorangegangenen Studien zur Pharmakokinetik und Pharmakodynamik (PK/PD-Studie) inhalativ applizierter  $\beta_2$ -Sympathomimetika von Gnadt [57] ergeben hatten. Hierzu wurden Salbutamol und Carnitin als vernebelte Substanzen eingesetzt. Weiterhin wurde versucht, durch Untersuchung von PGE<sub>2</sub>-Spiegeln im Perfusat von Experimenten der PK/PD-Studie [57] beobachtete pharmakodynamische Effekte zu erklären.



## **B Allgemeiner Teil**

---



# **1 Ex-vivo-Vergleich der Verteilungskinetik zweier Cyclosporin A-Formulierungen von humanem Lungengewebe in humanes Blut mit Hilfe eines Dialysemodells**

## **1.1 Hintergrund**

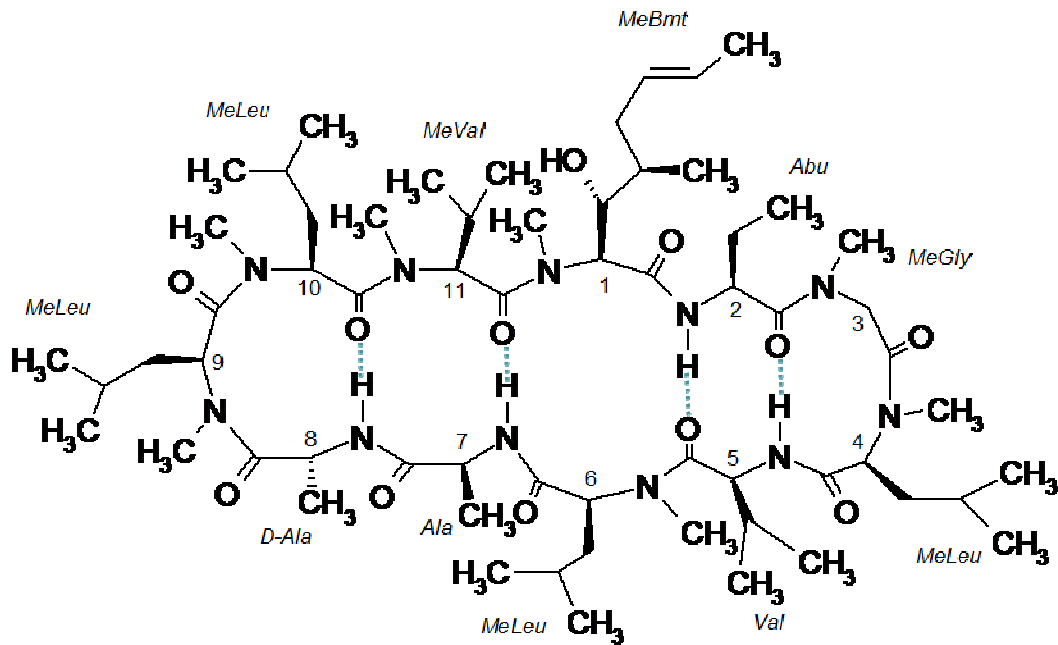
Die Transplantation einer Spenderlunge hat sich für zahlreiche Patienten mit fortgeschrittenen Lungenerkrankungen wie z.B. chronisch obstruktiver Lungenkrankheit (COPD), cystischer Fibrose, idiopathischer interstitieller Pneumonie und anderen Lungenleiden, die mit einer dauerhaften Einschränkung oder gar dem Verlust der Lungenfunktion einhergehen, zu einer lebensrettenden Therapiealternative etabliert [80]. Die Zahl durchgeführter Lungenverpflanzungen ist innerhalb der letzten Jahrzehnte stetig gestiegen. Wurden der Internationalen Gesellschaft für Herz und Lungentransplantation (International Society for Heart and Lung Transplantation - ISHLT) im Jahre 1985 nur 14 Lungentransplantationen gemeldet, so waren es 2006 bereits 2168 Fälle [81, 82]. Diese Zahlen geben zwar lediglich die von der ISHLT registrierten Verpflanzungen wieder und stellen keine absoluten Zahlen für die weltweit durchgeführten Transplantationen dar, jedoch vermitteln sie einen Eindruck über die allgemeine Entwicklung.

Eine wesentliche Limitierung der Langzeitprognose nach einer Lungentransplantation stellt die Abstoßung des Spenderorgans dar, die sich sowohl in akuter als auch in chronischer Form manifestieren kann [80]. Die akute Transplantatabstoßung lässt sich beschreiben als Vasculitis, die zu einem Verlust der pulmonalen Funktionsfähigkeit führt und kann durch gepulste Steroidgabe oder andere starke Immunsuppression abgewendet werden. Die chronische Abstoßung der Spenderlunge tritt als Bronchiolitis obliterans (BO) in Erscheinung, die sich histologisch manifestiert durch Vernarbung und schließlich Zerstörung der Bronchiolen und in einer obstruktiven und irreversiblen fibrotischen Lungenerkrankung mit Bronchiektasen und Verfall der Lungenfunktion resultiert. Mehr als die Hälfte der Organempfänger, die eine Überlebenszeit von einem Jahr überschreiten, entwickeln eine solche mit BO assoziierte Transplantatabstoßung und überleben nach der Diagnose im Mittel ungefähr drei Jahre. Bei diesen Patienten ist die chronische Abstoßung des Organs die schwerwiegendste Komplikation bezüglich der Langzeitprognose und die häufigste Todesursache nach einer Lungentransplantation [80, 83-86]. Inhalativ angewandtes Cyclosporin A (CsA) hat bereits einen positiven therapeutischen Nutzen bei der Behandlung von Organabstoßungsreaktionen nach einer Lungentransplantation gezeigt und trägt möglicherweise dazu bei, das Auftreten einer

Bronchiolitis obliterans zu verhindern [87]. Die typischerweise auftretende Entzündung der kleinen Atemwege wird durch das Einbringen von CsA direkt in die Lunge gemildert [88] und es konnte gezeigt werden, dass der Wirkstoff über die Atemwege verabreicht in Kombination mit konventioneller Immunsuppression Transplantatempfängern mit BO einen Überlebensvorteil gegenüber der konventionellen Therapie allein bot [84, 89].

Im Hinblick auf die geringe therapeutische Breite und die ausgeprägte inter- und intraindividuelle Variabilität der peroralen Bioverfügbarkeit, die das Immunsuppressivum aufweist, kann postuliert werden, dass der Weg der inhalativen Anwendung verglichen mit der oralen Einnahme einer hohen Dosis CsA und damit verbundenen hohen Blutspiegeln im systemischen Kreislauf ernsthafte dosisabhängige unerwünschte Arzneimittelwirkungen wie z.B. Nephrotoxizität und Hypertonie weitestgehend zu minimieren vermag [80]. Lokal können am Wirkort Lungengewebe hohe Arzneistoffkonzentrationen erzielt werden, ohne dass es zu hohen Konzentrationen in der systemischen Zirkulation kommt. Darüberhinaus muss man beachten, dass die Medikation mit Immunsuppressiva zur Behandlung oder Prävention einer Abstoßungsreaktion die Patienten für opportunistische Infektionen, die die zweithäufigste Todesursache für diese Population darstellen, prädisponiert [90]. Ein weiterer Grund also, die systemische Konzentration des Cyclosporins so gering wie möglich zu halten. Die topische Applikation ermöglicht es zudem, der dosisabhängigen Wirksamkeit des CsA Rechnung zu tragen und gezielt das für die Effektivität der Therapie essentielle Erreichen eines ausreichend hohen Arzneistoffspiegels am Wirkort zu gewährleisten.

Aus technologischer Sicht stellen die Stoffeigenschaften des Cyclosporin im Hinblick auf die Entwicklung einer inhalativen Anwendungsform eine Herausforderung dar: als cyclisches, homodetes Polypeptid, das aus elf Aminosäuren besteht (siehe *Abbildung 3*), weist der Wirkstoff eine extrem hohe Lipophilie auf. Um der Wasserunlöslichkeit des CsA gerecht zu werden, wurde die Cyclosporinlösung zur inhalativen Anwendung in ihrer frühesten Form unter Verwendung von Ethanol als Lösungsmittel hergestellt. Aufgrund der die Atemwege stark reizenden Eigenschaften wurde dieses Lösungsmittel von Propylenglykol abgelöst [80]. Bekanntermaßen ruft jedoch auch dieser Begleitstoff bei inhalativer Anwendung starke Irritationen der Atemwege hervor, weshalb eine Lösung von CsA in Propylenglykol (CsA-PG) bei Patienten erst nach Verabreichung eines Anästhetikums angewendet wurde, um deren Verträglichkeit zu verbessern [84, 87, 91-93]. Neben den Inhalationslösungen wurden im Rahmen klinischer Studien auch andere Formulierungen des Cyclosporins zur Applikation über die Atemwege entwickelt und angewandt, wie z.B. eine Feststoffdispersion [94, 95] oder ein Pulverinhalat [96].



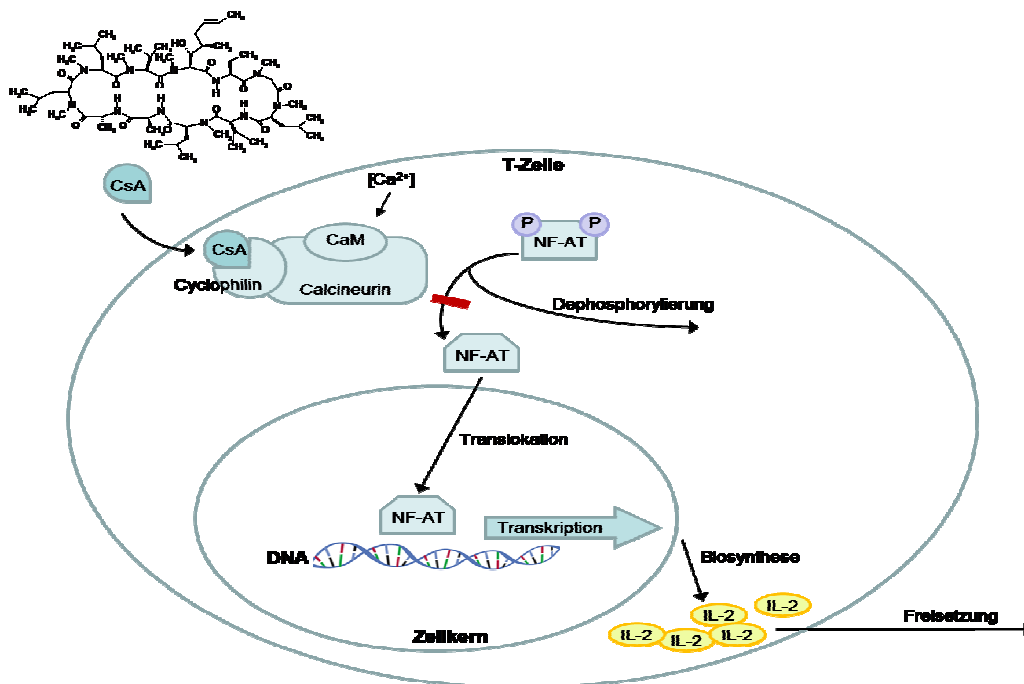
**Abbildung 3:** Struktur des Cyclosporin.

Cyclosporin A ist ein cyclisches Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 1202 Da, das aus einer Sequenz von elf zum Teil atypischen Aminosäuren besteht und vom Bodenpilz *Tolypocladium inflatum* Gams stammt. Bis auf D-Alanin in Position acht (liegt in R-Konfiguration vor) weisen alle Aminosäuren die S-Konfiguration der natürlichen L-Aminosäuren auf [97]. Die Lipophilie der Substanz lässt sich begründen durch die aliphatischen Aminosäuren und durch die Methylierung von sieben der Amidstoffatome der Peptidbindungen, während die restlichen vier innerhalb des Polypeptides Wasserstoffbrücken ausbilden. [Abu – L- $\alpha$ -Aminobuttersäure; MeBmt – (4R)-4-((E)-2-Butenyl)-N,4-dimethyl-L-threonin; MeLeu – N-Methyl-L-leucin; MeVal – N-Methyl-L-valin; MeGly – N-Methyl-L-Glycin; Val – Valin; Ala – Alanin; D-Ala – D-Alanin]

Mit dem Ziel, das Problem der eingeschränkten Verträglichkeit der vernebelten Lösungen zu umgehen, wurde von der Firma PARI (München) eine liposomale CsA-Inhalationssuspension entwickelt. Sie ist frei von reizenden organischen Lösungsmitteln und wird in klinischen Studien mit Hilfe eines elektronischen Schwingmembran-Verneblers, wie z.B. dem sogenannten eFlow<sup>®</sup> appliziert [98, 99]. Dieses Inhalationsgerät erzeugt mittels einer perforierten Edelmetallmembran auf schonende Art und Weise aus der Inhalationslösung ein feines Aerosol mit definiertem Partikelspektrum, sodass auch empfindlichere Moleküle wie Liposomen zerstäubt werden können. Ein entscheidender Vorteil für die Patienten bei der Verwendung eines solchen Verneblers ist die gegenüber alternativen Methoden deutlich verkürzte Inhalationszeit. Pro Zeiteinheit wird eine größere Menge an Flüssigkeit zerstäubt, was sich positiv auf die Compliance der Patienten und somit letztendlich auf den therapeutischen Erfolg auswirkt [100].

## 1.2 Pharmakologische und pharmakokinetische Eigenschaften des Cyclosporin A

Cyclosporin A unterdrückt sowohl humorale als auch zelluläre Immunreaktionen, wobei der immunsupprimierende Effekt primär darauf beruht, dass es über die Hemmung des Enzymes Calcineurin die Produktion und Sekretion von Interleukin-2 (IL-2) aus T-Helferzellen inhibiert (siehe *Abbildung 4*). IL-2 spielt durch die Signalübermittlung zur Aktivierung und Proliferation cytotoxischer T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle im Abstoßungsprozess eines transplantierten Organs. Durch die Hemmung der Freisetzung von IL-2 resultiert ein Mangel an der Transmittersubstanz und die Ausreifung von T-Zellen zu cytotoxischen Zellen unterbleibt [101, 102].



**Abbildung 4:** Wirkmechanismus von Cyclosporin A.

Auf molekularer Ebene bindet Cyclosporin A (CsA), nachdem es in die T-Zelle gelangt ist mit hoher Affinität an das Cyclophilin, ein cytosolisches Protein aus der Gruppe der Immunophiline. Normalerweise findet nach der Bindung und Erkennung von Antigenen durch T-Zell-Rezeptoren die Aktivierung von Calcineurin in Form eines Calcineurin-Calmodulin-Komplexes statt, die die Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NF-AT (nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen) mit nachgeschalteter Translokation in den Zellkern und Transkription von Cytokinen zur Folge hat. Durch den Cyclosporin/Cyclophilin-Komplex wird die Calcium-abhängige Protein-Phosphatase-Aktivität des Calcineurin-Calmodulin-Komplexes gehemmt, die Translokation dieses Transkriptionsfaktors in den Zellkern und somit die IL-2-Synthese unterbleiben [101]. [CaM – Calmodulin; NF-AT - nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen]



Zur Pharmakokinetik des Cyclosporin A (CsA) gibt es zahlreiche Erkenntnisse [101-103]. Die Bioverfügbarkeit bei oraler Applikation ist limitiert und in hohem Maße variabel. Es finden sich unterschiedliche Angaben, wie ein Bereich von 20 bis 50 % [101] oder 8 bis 60 % [102], da sie starken inter- und intraindividuellen Variationen unterliegt. Durchschnittlich kann man aber einen Wert von etwa 30 % annehmen. Folgende zwei Faktoren tragen zur unvollständigen und veränderlichen Absorption von CsA bei: Der Wirkstoff unterliegt zum einen einer präsystemischen Metabolisierung durch Cytochrom P 450-3A4 (CYP 3A4) im Darm, zum anderen stellt er ein Substrat für die Effluxpumpe P-Glykoprotein dar. Eine geringe oder variable Bioverfügbarkeit ist ein Risikofaktor für eine Transplantatabstoßung [104, 105].

Da Cyclosporin in hohem Maße an Erythrozyten, Lipoproteine und Albumin gebunden wird, beträgt der freie Anteil im Blut weniger als 10 %. CsA wird im Organismus nahezu quantitativ metabolisiert, wobei Hydroxylierungen, Demethylierungen und Carboxylierungen stattfinden. Die Metabolisierung durch hepatische Biotransformation erfolgt hauptsächlich durch CYP 3A4 in mehr als 25 Metabolite, von denen angenommen wird, dass sie weniger aktiv sind als die Muttersubstanz [102], deren klinische Relevanz aber unbekannt ist. Die Ausscheidung des CsA und seiner Metabolite erfolgt hauptsächlich biliär und renal. Auch die Angaben über die Halbwertszeit schwanken. Sie reichen von 6-12 h [102] bis hin zu 8-27 h [103]. Diese Variabilität der Halbwertszeit ergibt sich aus der Unsicherheit bei der Abschätzung des Verteilungsvolumens und der Clearance. Die Theorie, dass Cyclosporin bei der Verteilung einem Mehrkompartimentmodell folgt, könnte auch zu einer Unterschätzung der terminalen Halbwertszeit und der damit assoziierten pharmakokinetischen Parameter führen [102]. Auf Grund der starken Variabilität der pharmakokinetischen Parameter und seiner geringen therapeutischen Breite stellt Cyclosporin in vielen Fällen einen Kandidaten für Therapeutisches Drug-Monitoring dar.

Oral eingenommen beträgt die mittlere tägliche Erhaltungsdosis 2-6 mg/kg Körpergewicht auf zwei Einzeldosen verteilt. In Studien mit einer Lösung von CsA in Propylenglykol zur Inhalation wurden dreimal wöchentlich 300 mg des Immunsuppressivums appliziert [89, 106]. Bei Anwendung einer liposomalen CsA-Formulierung inhalierten die Patienten Dosen von 10 bzw. 20 mg täglich [99].

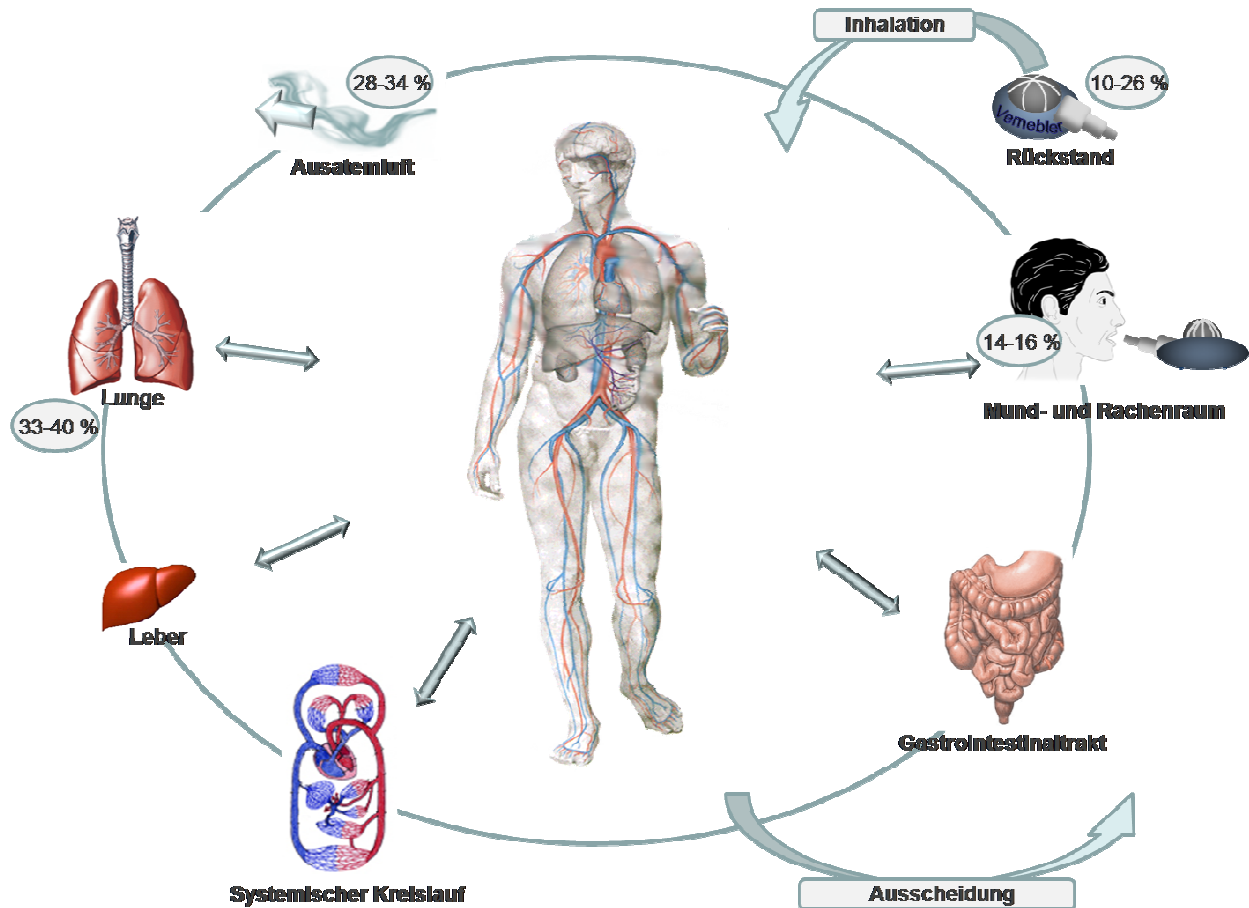
In einem Review verglich Corcoran die pharmakokinetischen Parameter AUC, Halbwertszeit und  $c_{\max}$  von Cyclosporin als Aerosol, intravenöse und orale Applikationsform [80, 106, 107] (siehe *Tabelle 2*).

**Tabelle 2:** Pharmakokinetische Parameter als Resultat unterschiedlicher Applikationswege.

Studie	Applikationsform	Dosis	Pharmakokinetischer Parameter		
			AUC [ng/mL*h]	t <sub>1/2</sub> [h]	C <sub>max</sub> [ng/mL]
Corcoran, [80]	Inhalativ	300 mg	1034 (24 h)	40,7	206
O’Riordan, [106]	Intravenös	1 mg/kg/4 h	3580 (Infusionsdauer)	6,5	
Knoop, [107]	Oral	Ø 170 mg 2 x täglich	7447 (12 h)	3-4	1710

Aus der vergleichenden Betrachtung der pharmakokinetischen Parameter geht hervor, dass die Formulierung, mittels der das Cyclosporin dargereicht wird, einen deutlichen Einfluss auf die Pharmakokinetik hat. Besonders auffällig ist, dass nach inhalativer Anwendung des Immunsuppressivums mit 206 ng/mL eine etwa um den Faktor acht geringere maximale Konzentration im Blut erreicht wird als nach peroraler Applikation. Auch die Betrachtung der Halbwertszeit zeigt deutliche Unterschiede, so ist dieser Parameter nach Verabreichung von vernebeltem CsA um das Sechsfache höher im Vergleich zur intravenösen Gabe, gegenüber der oralen Einnahme sogar um das Zwölfwache.

Aus pharmakokinetischer Sicht sind neben Parametern wie der oralen Bioverfügbarkeit und der systemischen Clearance für die Effektivität des inhalativ angewandten Cyclosporins unter anderem das Ausmaß der pulmonalen Deposition, die Verweilzeit des Wirkstoffes im Lungengewebe und seine pulmonale Umverteilungskinetik entscheidend. Bei der Applikation des Immunsuppressivums ist es wichtig, dass nur ein kleiner Anteil im Mund-und Rachenraum abgelagert wird und dagegen ein möglichst großer Prozentsatz die Lunge erreicht, um seine Wirkung zu entfalten (siehe *Abbildung 5*). Im Hinblick auf das Nebenwirkungspotenzial des Cyclosporins kommt der Minimierung der systemischen Konzentration ausgehend vom verschluckten Anteil der Dosis eine entscheidende Bedeutung zu. Zur Wirkungsoptimierung sollte eine lange Verweilzeit des Arzneistoffes im Zielgewebe angestrebt werden verbunden mit einer langsamen Umverteilung in den systemischen Kreislauf.



**Abbildung 5:** Weg des inhalativ angewandten Cyclosporins.

Im Rahmen einer klinischen Studie wurde durch Behr *et al.* nach Applikation von 10 bzw. 20 mg einer radioaktiv markierten liposomalen Cyclosporinformulierung eine pulmonale Deposition von 40 % (10 mg) bzw. 33 % (20 mg) beobachtet. Jeweils ungefähr die Hälfte davon wurde in der Peripherie der Lunge deponiert, entsprechend 2,0 mg (bei 10 mg) bis 3,4 mg (bei 20 mg). Ein nicht unbedeutender Teil von 28 bis 34 % wurde wieder ausgeatmet. 10 bis 26 % der Dosis blieben im Vernebler zurück, 14 bis 16 % lagerten sich im Mund- und Rachenraum ab [99]. (Modifiziert nach einer Abbildung von [108] und [109])

Die Deposition von CsA in der Lunge nach Inhalation einer radioaktiv markierten Lösung durch Lungentransplantationspatienten wurde bereits untersucht [80, 92, 99]. Bei Corcoran *et al.* fand eine Lösung von Cyclosporin in Propylenglykol Verwendung, wohingegen bei Behr *et al.* eine liposomale Formulierung des Immunsuppressivums vernebelt wurde. Von besonderer Bedeutung ist jeweils der in der Peripherie der Lunge deponierte Anteil. Dieser korreliert im Gegensatz zur total in der Lunge deponierten Dosis besser mit dem erzielten Effekt, da er der mukoziliären Clearance weniger zugänglich ist und eher eine Aussage darüber treffen kann, welche Dosis den gesamten Lungenraum erreicht hat [92]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die in der Peripherie der transplantierten Lunge erreichte Dosis in einem eindeutigeren

Zusammenhang mit der gemessenen Veränderung der Lungenfunktion stand als die Gesamtdosis im verpflanzten Organ [80].

Eine isolierte Betrachtung der Verweilzeit des Wirkstoffes im Lungengewebe und seiner Umverteilungskinetik *in-vivo* nach der Deposition in der Lunge ist nicht leicht möglich, da der Einfluss verschiedener Faktoren wie die Verteilung in andere Gewebe, Metabolisierungs- oder Eliminationsprozesse bei der Blutspiegelmessung immer mitbestimmt wird. Zudem besteht nach der Inhalation eines Arzneistoffes bezüglich des Depositionsanteils in der Lunge und des durch Verschlucken peroral aufgenommenen Anteils eine große Unsicherheit. Es ist schwer auszumachen, welcher Teil der Wirkung von der im Mund- und Rachenraum abgelagerten und im Anschluss an das Schlucken resorbierten Wirkstoffmenge herrührt, welcher aber von der tatsächlich in der Lunge deponierten Dosis. Zur isolierten Erfassung pharmakokinetischer Vorgänge nach der Wirkstoffdeposition in der Lunge erscheint es in diesem Zusammenhang äußerst sinnvoll, auf ein einfaches *in-vitro*-Konzept wie das bereits von Freiwald *et al.* [53] etablierte Dialysemodell zurückzugreifen, um Vorgänge der Verweildauer und Diffusionskinetik nach Applikation von zwei unterschiedlichen Cyclosporin- (CsA-) Formulierungen an pulmonalem Gewebe vergleichend beurteilen zu können. Die Entwicklung des Dialysemodells verfolgte das Ziel, die Untersuchung der Absorptionsphase verschiedener pharmazeutischer Wirkstoffzubereitungen zu ermöglichen. Freiwald *et al.* diente das Modell, um die Verteilung zweier unterschiedlicher Glucocorticoidformulierungen von humanem Lungengewebe in humanes Plasma zu vergleichen [53]. Es ergaben sich Unterschiede für die Absorptionsraten der beiden Zubereitungen, die in ähnlicher Weise beim humanen Lungenperfusionmodell beobachtet wurden. Letztere Ergebnisse wiederum stimmten mit den Daten, die in einer klinischen Studie mit denselben Wirkstoffformulierungen gewonnen wurden in hohem Maße überein [110].

Wie bereits erläutert, wurden Studien zur inhalativen Anwendung von CsA sowohl mit einer Lösung von CsA in Propylenglykol (CsA-PG) als auch mit einer liposomalen CsA-Formulierung (L-CsA) durchgeführt. Da noch keine vergleichenden klinischen Daten für diese beiden Formulierungen verfügbar sind, sollte mit Hilfe des *ex-vivo*-Konzeptes des Dialysemodells und der Gegenüberstellung der CsA-Zubereitungen das mögliche Absorptionsverhalten *in-vivo* vorhergesagt werden mit dem Ziel, etwaige Unterschiede in der Diffusionskinetik in Abhängigkeit von der verwendeten Wirkstoffformulierung festzustellen.

## 1.3 Prinzip der Bestimmung

### 1.3.1 *Eigenschaften der liposomalen Cyclosporin A-Formulierung*

Bei der applizierten Wirkstoffsuspension handelt es sich um eine Formulierung, die Cyclosporin A (CsA) in liposomal solubilisierter Form enthält. Die flüssige wässrige Zubereitung enthält neben dem Wirkstoff CsA als Löslichkeitsverbessernde Komponenten ein Phospholipid und ein nichtionisches Tensid [100]. Die Liposomen werden vor allem durch das Phospholipid gebildet und erreichen entsprechend der Patentangaben durch den Herstellungsprozess einen medianen Durchmesser von 30 bis 70 nm. Die vorliegende liposomale Cyclosporin A-Formulierung (L-CsA) wies einen medianen Liposomendurchmesser von 46 nm und einen pH-Wert von 6.5 auf. Besonders vorteilhaft für die pulmonale Anwendungsform zur inhalativen Prophylaxe oder Behandlung der Lungentransplantat-Abstoßung ist der Nebeneffekt, dass das Cyclosporin durch die Liposomen geschmacksmaskiert vorliegt [100].

### 1.3.2 *Modifikation des Dialysemodells zur Anpassung an die aktuelle Fragestellung*

Im vorliegenden *in-vitro*-Experiment wurde der von Freiwald *et al.* [53] etablierte Dialyseaufbau verwendet. Bei der Versuchsplanung galt es, einige grundlegende Eigenschaften des eingesetzten Wirkstoffes zu berücksichtigen: Cyclosporin wird zu ungefähr 20 % an Leukozyten und zu 40 % an Erythrozyten gebunden. Circa 40 % verbleiben in der Plasmafraktion des Blutes und werden dort stark an Lipoproteine gebunden [111, 112]. Auf Grund dieser Stoffeigenschaften ergab sich die Notwendigkeit, beim vorliegenden Experiment Blut als Matrix einzusetzen. Folglich wurde das von Freiwald *et al.* etablierte Modell dahingehend modifiziert, dass an Stelle von Plasma oder Krebs-Ringer-HEPES-Puffer erstmals Blut als Dialyseflüssigkeit verwendet wurde. Der Einsatz dieser Matrix ermöglichte es, auf Grundlage von physiologischen Verhältnissen der Blutbestandteile Verfälschungen bei der Bestimmung des Cyclosporinspiegels zu vermeiden [113]. Da die Bindung von Cyclosporin an die Blutbestandteile temperaturabhängig ist, war bei der experimentellen Durchführung außerdem auf die Einhaltung einer Temperatur von 37 °C zu achten. Mit Hilfe des Blutes und durch eine konstante Temperatur von 37 °C während der Dialyse wurde versucht, die Bedingungen *in-vivo* möglichst realitätsnah nachzuahmen, um natürliche Bindungskonditionen für das Cyclosporin an die verschiedenen Blutbestandteile zu ermöglichen und somit eine Abschätzung der

tatsächlichen Verteilungs- und Diffusionsvorgänge vornehmen zu können. Die Durchführung der Diffusion bei Körpertemperatur gelang durch Inkubation der gesamten Versuchsanordnung im Wärmeschrank, aus dem sie nur zur Probengewinnung herausgenommen wurde (siehe *C1.2.2 – Experimenteller Teil*). Die Methodenmodifikation der Dialyseflüssigkeit stellte sich als besondere Herausforderung heraus, da die festen Bestandteile des Blutes während der Inkubationszeiten, wenn die Apparatur längere Zeit unbewegt stand, sedimentierten. Um diesem schwerkraftbedingten Absinken der Erythrozyten entgegenzuwirken, wurde zum einen das Blut im Reservoir durch Einsatz eines Magnetrührers durchmischt, zum anderen die Dialyseflüssigkeit in der Kammer durch Schwenken in Bewegung versetzt (siehe *1.3.3 und C1.2.2.4 – Experimenteller Teil*).

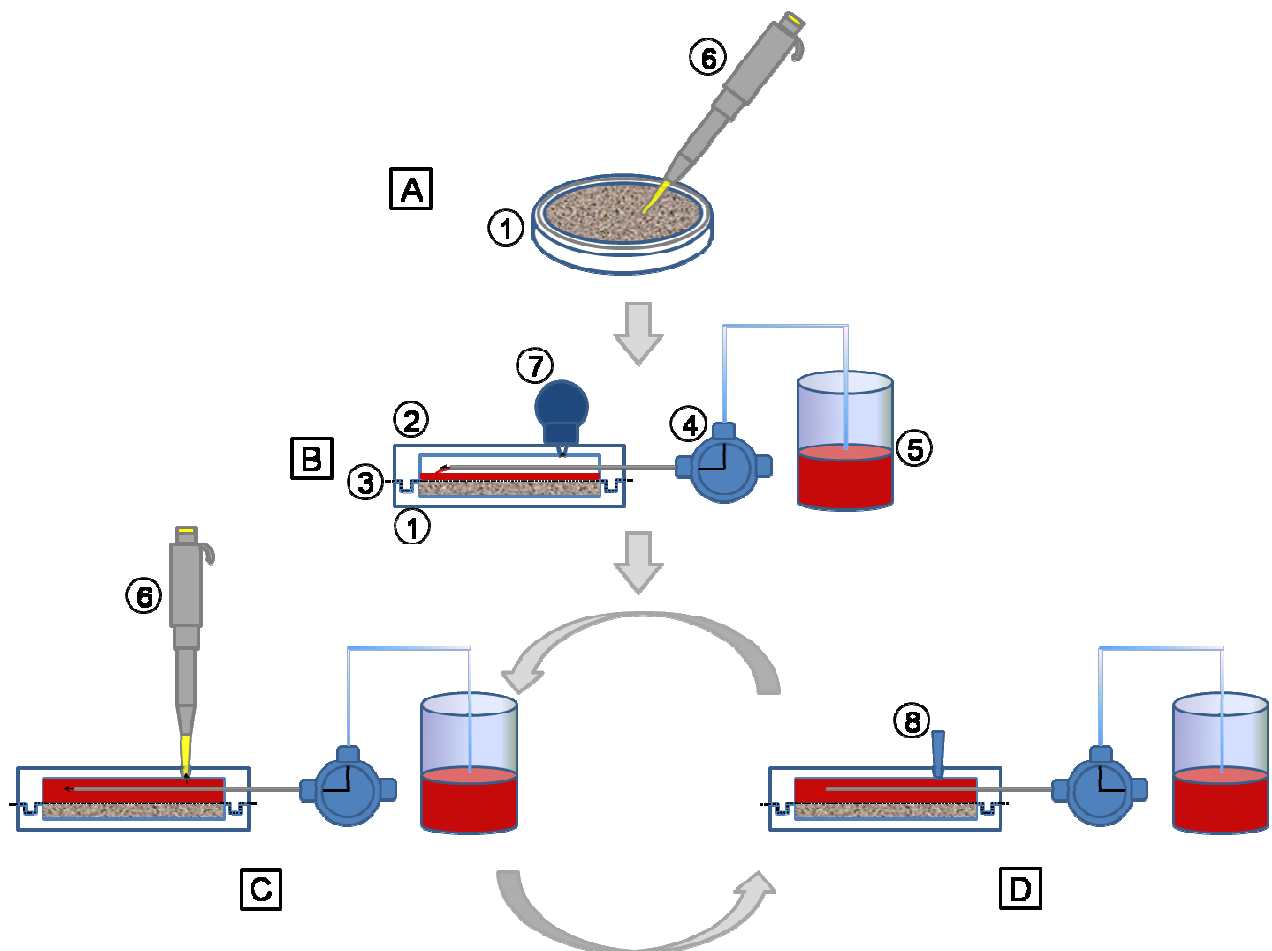
Als Dialysemembran kam eine Spectra/Por® 6 mit einer molekularen Porengrößenbegrenzung von 2000 Da zum Einsatz. In Anbetracht eines Molekulargewichts des Cyclosporins (CsA) von 1202 Da, erschien diese Membran gut geeignet, um Diffusionsvorgänge des CsA aus humanem Lungengewebe in Blut zu untersuchen.

Die applizierte Dosis wurde basierend auf der inhalativen Anwendung von 300 mg CsA in 4,8 mL Propylenglykol durch Studienteilnehmer [87] und unter der Annahme von ca. einem Kilogramm Lungenmasse eines Patienten *in-vivo* festgelegt. Bei Zugrundelegung von ca. 15 mL Dialysekammervolumen und 5 g Lungenhomogenat ergab sich als eine sinnvolle Dosis für das vorliegende Experiment die Applikation von 1,0 mg Cyclosporin (siehe *Experimenteller Teil C 1.2.2.3, Tabelle 6*).

### **1.3.3 Durchführung der Dialyseversuche**

Die Dialysekammer bestand, wie bei Freiwald *et al.* [53] beschrieben, aus zwei zylindrisch geformten Kammerhälften, die zwischen sich eine Membran einschlossen (siehe *Abbildung 16, C1.1.4 – Experimenteller Teil*). Die Applikationslösung, also eine Zubereitung von Cyclosporin A in Propylenglykol (CsA-PG), eine liposomale Cyclosporin-Formulierung (L-CsA) oder eine Placebozubereitung, wurde mit Hilfe einer Mikroliterpipette direkt auf das Lungengewebe in der unteren Kammerhälfte aufgebracht und untergemischt (siehe *C1.2.2.3 – Experimenteller Teil*), wobei die applizierte Menge mit einem Volumen von 250 µL einer Dosis von einem Milligramm (siehe *1.3.2 und Experimenteller Teil C 1.2.2.3, Tabelle 6*) des Wirkstoffes entsprach (siehe *Abbildung 6 A*). Bei den beiden eingesetzten Placebozubereitungen handelte es sich um eine wirkstofffreie Suspension von Liposomen bzw. um eine wirkstofffreie Propylenglykollösung (siehe *C1.2.2.1 – Experimenteller Teil*). Die Durchführung je eines Dialyseversuches mit diesen Zubereitungen hatte einen analytischen Hintergrund: Auf diese Weise wurden für die spätere

Kalibrierung bei der Bestimmung des Cyclosporin A-Gehaltes der Dialyseproben (siehe C1.2.3 – *Experimenteller Teil*) Matrixproben erhalten und ein Einfluss der Probenmatrix auf das Cyclosporin A-Signal konnte ausgeschlossen werden. Analog zu den Wirkstoffformulierungen wurden 250 µL der jeweiligen Placebozubereitung auf das Lungengewebe appliziert.



**Abbildung 6:** Ablauf eines Dialyseversuchs.

(A) Die Cyclosporin-Formulierung wird mit Hilfe einer Mikroliterpipette direkt auf das Lungengewebe appliziert. (B) Die zusammengebaute Dialysekammer wird bei offener Ventilstellung mit Dialyseflüssigkeit befüllt. (C) Über eine Mikroliterpipette erfolgt die Probenentnahme, wobei das Mehrwegeventil in geöffneter Position steht. (D) Die Inkubation der verschlossenen Dialyseapparatur bei 37 °C schließt sich direkt an die Gewinnung einer Probe an. Sie wird nur zu den festgelegten Zeitpunkten zur Probenentnahme unterbrochen. Das Mehrwegeventil ist während der Inkubation geschlossen. [① Unterteil der Dialysekammer mit Lungengewebe; ② Oberteil der Dialysekammer; ③ Dialysemembran; ④ Mehrwegeventil; ⑤ Reservoir mit Dialyseflüssigkeit; ⑥ Mikroliterpipette; ⑦ Pipettensauger; ⑧ Verschluss] (Modifiziert nach [53])

Die Dialyse wurde entsprechend der von Freiwald *et al.* etablierten Methode [53] durchgeführt: Nach Einspannen der vorbehandelten Dialysemembran und Schließen des Systems durch Aufsetzen der oberen Kammerhälfte, konnte die Versorgung des Kammeroberteils mit Blut aus dem Reservoir über ein Mehrwegeventil erfolgen. Hierzu wurde eine Öffnung im oberen Teil der Kammer genutzt: Mit Hilfe eines Pipettensaugers oder einer Mikroliterpipette, die an die besagte Öffnung angesetzt wurden, konnte bei geöffnetem Ventil ein Unterdruck erzeugt werden, der es erlaubte, Dialyseflüssigkeit aus dem Reservoir in das Kammeroberteil zu saugen (siehe C1.2.2.3, C1.2.2.4 – *Experimenteller Teil*). Diese Vorgehensweise wurde zu Beginn des Experimentes zur Befüllung des Kammeroberteils mit Blut genutzt und ermöglichte auch während des Versuches bei der Probenentnahme das Nachströmen von frischer Dialyseflüssigkeit aus dem Reservoir als Volumenersatz (siehe *Abbildung 6 B und C*). Während der Inkubation der Dialyseapparatur im Wärmeschrank bei 37 °C wurde diese Öffnung wie auch das Mehrwegeventil verschlossen (siehe *Abbildung 6 D*), sodass die Verbindung zwischen Kammer und Reservoir unterbrochen war. Zur zusätzlichen Absicherung wurde unmittelbar nach dem Ventil eine Federklammer aus Metall angebracht, die den Kapillarschlauch zusammendrückte.

Das Blut im Reservoir wurde mit Hilfe eines Magnetrührers durchmischt, sodass die homogene Beschaffenheit der aus dem Reservoir frisch nachströmenden Dialyseflüssigkeit gesichert war. Um eine Sedimentation der festen Blutbestandteile in der oberen Kammerhälfte zu verhindern, wurde die Kammer in verschlossenem Zustand vor jeder Probenentnahme und während längerer Inkubationszeiten alle 15 min mehrmals durch Drehung um 180° geschwenkt. Auf diese Weise konnte einer schwerkraftbedingten Ansammlung von Erythrozyten an der Membran und einer inhomogenen Beschaffenheit der Proben mit einhergehender Verfälschung der Ergebnisse entgegengewirkt werden.

Während der Inkubation über einen Zeitraum von sieben Stunden wurden bei jedem Versuch zu den festgelegten Zeitpunkten mit Hilfe einer Mikroliterpipette insgesamt zehn Proben mit einem Volumen von jeweils 500 µL aus dem Dialysat gewonnen. Mit Hilfe einer LC-MS/MS Methode nach ESI-Ionisation wurde der Cyclosporin Gehalt der Proben analysiert (siehe C1.2.3 – *Experimenteller Teil*).

Da die Zusammensetzung des Blutes bei der Bindungs- und Verteilungsvorgängen des Cyclosporins eine entscheidende Rolle spielt (siehe B1.3.2 – *Allgemeiner Teil*), wurde darauf geachtet, Blut mit einem näherungsweise physiologischen Hämatokritgehalt, vor allem aber für alle Versuche gleich beschaffene Dialyseflüssigkeit zu verwenden. Aus diesem Grunde wurde von jeder Blutcharge der Hämatokritgehalt bestimmt. Die entsprechenden Blutkonserven

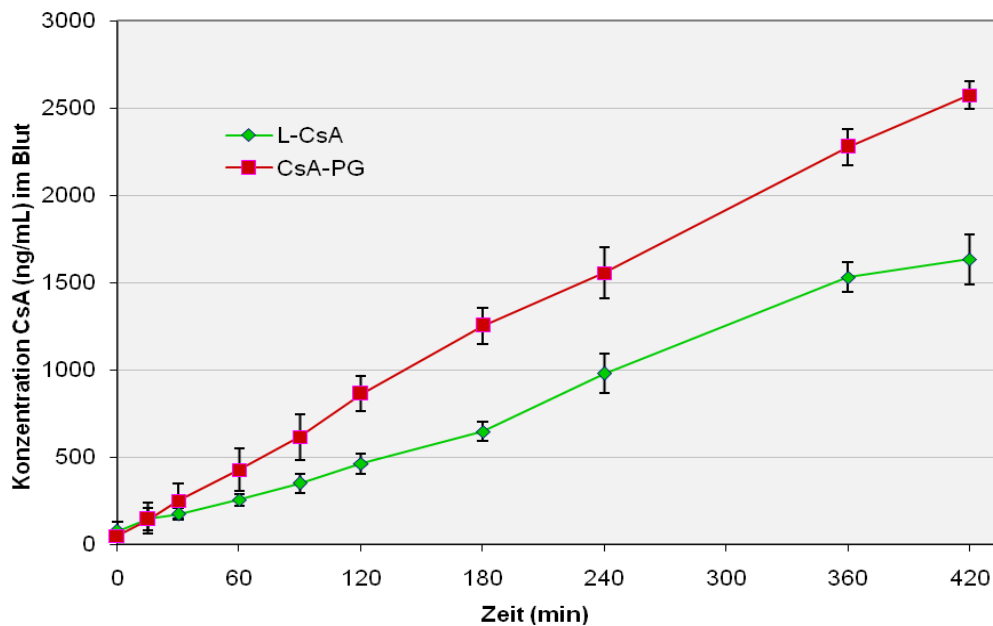


wurden gegebenenfalls vor Versuchsbeginn mit Humanplasma ergänzt, sodass ein Verhältnis von Hämatokrit zu Plasma 40:60 resultierte (siehe *C1.1.3.4 – Experimenteller Teil*).

## 1.4 Ergebnisse der Diffusionsversuche

Nach Applikation von jeweils 250 µL (entsprechend 1 mg Wirkstoff, siehe *Experimenteller Teil C 1.2.2.3, Tabelle 6*) der beiden Zubereitungen L-CsA (liposomale Cyclosporin A-Formulierung) bzw. CsA-PG (Lösung von Cyclosporin A in Propylenglykol) waren erwartungsgemäß deutliche Unterschiede der Cyclosporin A (CsA)-Konzentrationen im Blut und somit Unterschiede der Diffusionsgeschwindigkeit bzw. Verweildauer im Lungenhomogenat zu erkennen. Während CsA-PG eine rasche Umverteilung von humanem Lungengewebe in humanes Blut zeigte, verweilte der Wirkstoff nach Applikation von L-CsA deutlich länger im Homogenat und die Cyclosporinkonzentration im Dialysat stieg langsamer an (siehe *Diagramm 1*).

Für jede der beiden CsA-Formulierungen wurden drei Dialyseversuche durchgeführt, wobei jeweils über einen Zeitraum von sieben Stunden zehn Proben gewonnen wurden. In *Diagramm 1* sind die verschiedenen Zeitpunkte der Probenentnahmen gegen die jeweilige Konzentration von CsA im Blut aufgetragen. Die rote bzw. grüne Kurve zeigt den Blutspiegelverlauf nach Applikation von CsA-PG und der liposomalen CsA-Formulierung. Der Verlauf der beiden Kurven ist nahezu linear. Zu Beginn des Versuches war noch kein deutlicher Unterschied in der Diffusion von CsA zwischen den beiden Wirkstoffformulierungen erkennbar. Die beiden Blutspiegelkurven liegen an dieser Stelle nahe beisammen bzw. überschneiden sich. Ab einem Zeitpunkt etwa 90 min nach Versuchsbeginn allerdings war die Konzentration bei Anwendung von CsA-PG im Blut mit  $615 \pm 129$  ng/mL deutlich höher als bei L-CsA mit  $349 \pm 55$  ng/mL (siehe *D1.3 – Tabellarischer Anhang*). Im Verlauf des Experimentes wurde die ausgeprägtere Umverteilung von CsA aus CsA-PG in das Blut noch deutlicher und resultierte bei Versuchsende in Konzentrationen von  $2573 \pm 79$  ng/mL (CsA-PG) gegenüber  $1633 \pm 145$  ng/mL (L-CsA).



**Diagramm 1:** Diffusion von CsA aus humanem Lungengewebe in humanes Blut - Vergleich von CsA-PG und L-CsA.

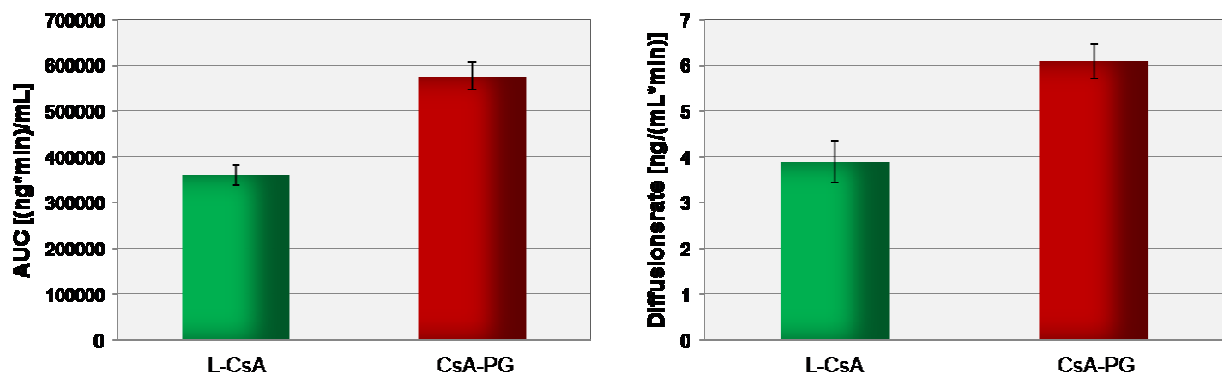
Zeitlicher Verlauf des Übergangs von CsA von humanem Lungengewebe in humanes Blut bei 37 °C. Die beiden Kurven zeigen den Konzentrationsverlauf nach Applikation von CsA-PG bzw. L-CsA. [Mittelwert ± mittlere Abweichung vom Mittelwert, n = 3 mit Blut von 3 verschiedenen Spendern]

Die Aufnahme von CsA aus der Propylenglykol-Lösung in das Blutkompartiment nahm über den beobachteten Zeitraum von 420 min hinweg stetig zu, wohingegen sich die Diffusionsrate von CsA aus L-CsA zwischen 360 und 420 min verlangsamt und das Zutreiben der Cyclosporinkonzentration auf ein Plateau hin vermuten ließ. Die Tatsache, dass die CsA-Blutspiegelkurve von CsA-PG ab dem Zeitpunkt 30 min stets oberhalb der Kurve von L-CsA verlief und der damit langsamere Anstieg der CsA-Konzentration im Blut aus der L-CsA-Formulierung erlaubt die Schlussfolgerung, dass die Propylenglykol-Zubereitung einen schnelleren Übergang von CsA aus dem Lungengewebe heraus in das Blutkompartiment ermöglichte als die liposomale Formulierung. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass beim Vergleich der beiden Zubereitungsformen eine stärkere Retention im Lungengewebe für L-CsA beobachtet wurde.

Das unterschiedliche Ausmaß der Diffusion von CsA aus dem Lungengewebe in das Blut wird untermauert durch die pharmakokinetischen Parameter AUC und Diffusionsrate (siehe *Diagramm 2*), die für CsA berechnet wurden (siehe *C1.2.3.2 – Experimenteller Teil*). Nach Applikation von CsA-PG zum Lungengewebe war die AUC von CsA im Blut mit

575 458 (ng\*min)/mL ungefähr um das 1,6 fache höher im Vergleich zu L-CsA mit 359 094 (ng\*min)/mL. Die Diffusionsrate, die durch CsA-PG erzielt wurde ( $6,08 \pm 0,36$  ng/(mL\*min), entsprechend  $5,06 \pm 0,30$  nM/min), war über 50 % größer als die durch L-CsA erzielte Diffusionsrate ( $3,87 \pm 0,46$  ng/(mL\*min), entsprechend  $3,22 \pm 0,38$  nM/min).

Die Experimente haben also gezeigt, dass Cyclosporin A aus der liposomalen Formulierung länger im Lungengewebe verweilt und langsamer in das Blutkompartiment diffundiert als aus der Lösung von Cyclosporin A in Propylenglykol. Eine längere Verweildauer des inhalierten Arzneistoffs im Lungengewebe führt zu einem verlängerten pharmakologischen Effekt mit einer höheren Wirkstoffkonzentration am Zielgewebe, ohne jedoch hohe Konzentrationen im systemischen Kreislauf zu erzeugen, und ist somit auf jeden Fall eine erstrebenswerte Eigenschaft.



**Diagramm 2:** AUC und Diffusionsrate von L-CsA und CsA-PG im Vergleich.

Area under the curve (AUC) und Diffusionsrate von CsA in Blut, bestimmt nach Applikation von CsA-PG bzw. L-CsA zu humanem Lungengewebe im Dialysemodell beim Übergang von CsA von humanem Lungengewebe in humanes Blut bei 37 °C. L-CsA und CsA-PG sind im Vergleich dargestellt. [Mittelwert  $\pm$  mittlere Abweichung vom Mittelwert, n = 3 mit Blut von 3 verschiedenen Spendern]

## 1.5 Diskussion der Diffusionsversuche

Im Rahmen einer immunsupprimierenden Therapie nach einer Transplantation ist eine lange Verweilzeit von inhalativ angewandtem Cyclosporin A (CsA) in der Lunge erwünscht. Eine Methode, diese Eigenschaft verschiedener Arzneistoffformulierungen mit möglichst einfachen Mitteln abzuschätzen, bietet das Dialysemodell durch die Untersuchung der Diffusionsvorgänge des Wirkstoffes. Im vorliegenden Versuchskonzept wurde die Diffusionskinetik der beiden CsA-Formulierungen L-CsA (liposomale Cyclosporin A-Formulierung) und CsA-PG (Lösung von

Cyclosporin A in Propylenglykol), die bereits in verschiedenen klinischen Studien durch Lungentransplantations-Patienten Anwendung fanden [87, 89, 91-93, 99], verglichen. In diesen bisherigen Studien fand stets die isolierte Betrachtung nur einer der beiden Zubereitungen statt. Das vorliegende Dialysemodell bietet die Möglichkeit, erstmals einen direkten Vergleich der Verteilungskinetik von L-CsA und CsA-PG von humanem Lungengewebe in humanes Blut vorzunehmen. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in Ausmaß und Geschwindigkeit der Aufnahme von CsA in das Blutkompartiment, wobei die Verweildauer im Lungengewebe *ex-vivo* bei der liposomalen CsA-Formulierung (L-CsA) länger war als bei der Lösung von CsA in Propylenglykol (CsA-PG). Da das verwendete Lungenhomogenat für alle Versuche aus derselben Grundgesamtheit stammte, die Eigenschaften bezüglich des Hämatokritgehaltes für alle verwendeten Blutchargen einheitlich waren und zudem mit einer Blutcharge jeweils ein Versuch mit CsA-PG und einer mit L-CsA durchgeführt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Unterschiede ausschließlich auf die Cyclosporinformulierungen zurückzuführen sind und nicht auf Einflüsse der verwendeten Matrices.

Wie man am Versuchsaufbau (siehe *Abbildung 16, C1.1.4 - Experimenteller Teil*) leicht erkennen kann, zeichnet eine einfache Handhabung das Dialysemodell aus. Es eignet sich für eine erste Einschätzung des Diffusionsverhaltens verschiedener Arzneistoffformulierungen oder verschiedener Wirkstoffe. Die Arzneistoffzubereitung kann direkt und unverändert auf das Lungengewebe appliziert werden, sodass gegebenenfalls auch der Auflösungsprozess eines Wirkstoffes berücksichtigt wird. Diese Tatsache erscheint besonders im vorliegenden Experiment relevant, da CsA ein stark lipophiler Wirkstoff mit geringer Wasserlöslichkeit ist [95, 114]. Durch Liposomen wird die Möglichkeit eröffnet, solch hydrophobe Wirkstoffe, die in eine Lipidmembran eingebettet werden, zu solubilisieren [114, 115]. Auf Grund einer modifizierten Verteilung liposomaler Wirkstoffzubereitungen im Gewebe und damit einer Änderung des pharmakokinetischen Verhaltens des Wirkstoffes [114] können Liposomen zu einer Verlängerung der therapeutischen Konzentration am Wirkort führen [27]. So wurde durch Fielding *et al.* gezeigt, dass die Zusammensetzung der Lipide einer inhalierten liposomalen Formulierung eine große Rolle bei der Freisetzungsgeschwindigkeit des Wirkstoffes spielt [26]. Gerade bei der Verabreichung von CsA an Patienten nach einer Lungentransplantation ist eine verlängerte Verweilzeit des Wirkstoffes im Lungengewebe verbunden mit einer nur geringen pulmonalen Absorption in die systemische Zirkulation wünschenswert. Hinzu kommt die überaus zuträgliche Eigenschaft der Liposomen, keine lokalen Irritationen im Respirationstrakt auszulösen [27].

Eine verlängerte Verweilzeit des inhalierten CsA im Lungengewebe müsste sich widerspiegeln in einer geringeren pulmonalen Absorptionsrate, einer späteren Zeit des Konzentrationsmaximums im Blut (größeres  $t_{\max}$ ) und geringeren Wirkstoffkonzentrationen im Blut (kleineres  $c_{\max}$ ) über einen längeren Zeitraum hinweg (größere  $t_{1/2}$ ). An dieser Stelle tritt eine wesentliche Limitierung des vorliegenden Dialysemodells zu Tage: Wie schon durch Freiwald *et al.* [53] gezeigt wurde, kann das Dialysemodell lediglich die Absorptionsphase widerspiegeln. Dieser Sachverhalt ist im vorliegenden Experiment erkennbar an der kontinuierlichen Steigung der Geraden, die die Diffusion von Cyclosporin aus humanem Lungengewebe in humanes Blut nach Applikation von CsA-PG bzw. L-CsA darstellen (siehe *Diagramm 1, Kapitel 1.4*). Parameter wie  $c_{\max}$ ,  $t_{\max}$  und  $t_{1/2}$  konnten aus den gewonnenen Daten nicht berechnet werden, da der Übergang des Wirkstoffes vom Lungengewebe in das Blut nach 420 min noch nicht abgeschlossen war und zudem der für die Ermittlung dieser Parameter essentielle Vorgang der Elimination beim Dialysemodell nicht stattfindet.

### **1.5.1 Die Ergebnisse der Diffusionsversuche im Kontext von klinischen Studien zu inhalativ appliziertem Cyclosporin A**

Es existieren einige klinische Studien, die sich mit der Erfassung pharmakokinetischer Daten des inhalativ angewandten Cyclosporins beschäftigen. So wurden in einer Untersuchung von Burkart *et al.* [91] 300 mg Cyclosporin gelöst in Propylenglykol von Patienten nach einer Lungentransplantation inhaliert. Bei Rohatagi *et al.* wurden 3-20 mg CsA über ein Dosieraerosol an gesunde Probanden und Asthmapatienten verabreicht [116]. Nach Applikation einer Einzeldosis lag der Median von  $t_{\max}$  nach der Inhalation bei 0,5 bis 0,88 h, die mittlere terminale Halbwertszeit  $t_{1/2}$  erstreckte sich von 3,09 bis 5,59 h. Die Gabe einer inhalativen liposomalen Cyclosporinformulierung (L-CsA) bei Lungentransplantatpatienten ergab nach Behr *et al.* und Keller *et al.* ein  $t_{\max}$  von 2 h und eine terminale Halbwertszeit  $t_{1/2}$  von ca. 6 h [98, 117]. Obwohl  $t_{\max}$  deutlich verzögert erscheint im Vergleich zu den  $t_{\max}$ -Werten der anderen beiden klinischen Studien von 0,68 h [91] und 0,50-0,88 h [116], muss dieses Ergebnis mit Vorsicht betrachtet werden, da die erste Blutprobe erst 2 h nach der Inhalation gewonnen wurde. Dennoch gibt die Betrachtung dieser Ergebnisse aus klinischen Studien dazu Anlass, einen nicht unbedeutenden Einfluss der Wahl der Wirkstoffformulierung auf die Pharmakokinetik des Cyclosporins zu vermuten.

Angesichts der hohen Divergenz der applizierten Dosen und der stark unterschiedlichen Studienpopulationen mit gesunden Freiwilligen und Asthmapatienten einerseits [116] und

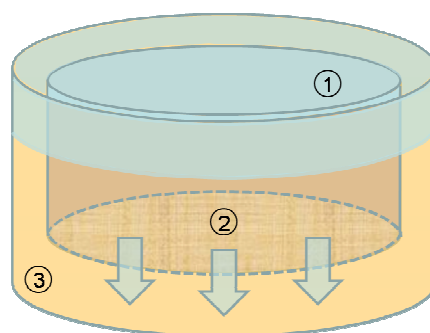
Transplantatempfängern andererseits [91, 98, 117], scheint ein direkter Vergleich der Daten diffizil. Deshalb ist ein Modellsystem wie das vorliegende Dialysemodell, das unter vereinfachten experimentellen Bedingungen eine unmittelbare Gegenüberstellung verschiedener CsA-Zubereitungen ermöglicht, sehr vielversprechend, um zuverlässige, direkt vergleichbare Daten zu erhalten.

Basierend auf den Resultaten des Diffusionsverhaltens von CsA von humanem Lungengewebe aus in humanes Blut hinein, die sich im Rahmen der eigenen Untersuchung nach Applikation der zwei verschiedenen CsA-Formulierungen ergaben, ist die Annahme gerechtfertigt, dass die liposomale CsA-Zubereitung zu einer geringeren pulmonalen Absorption des Wirkstoffes und zu einer ausgeprägteren Retention im Gewebe führt als die Lösung von CsA in Propylenglykol. Überraschend ist dieses Ergebnis nicht, da verlängerte therapeutische Konzentrationen am Wirkort für Liposomen gegenüber anderen Zubereitungsgrundlagen bereits festgestellt wurden [26, 27]. Außerdem ist eine Übereinstimmung mit den bereits erwähnten klinischen Studien von Burkart [91], Rohatagi [116], Behr [98] und Keller [117] *et al.* zu erkennen, wobei L-CsA im Vergleich zur Lösung von Cyclosporin A in Propylenglykol und zum Dosieraerosol ein verzögertes  $t_{max}$  und eine prolongierte terminale Halbwertszeit  $t_{1/2}$  zeigte. Dennoch gilt zu beachten, dass *in-vitro* stets nur eine bestmögliche Annäherung der Verhältnisse an die Realität möglich ist und so muss das Potential des Dialysemodells, eine Voraussage für Vorgänge *in-vivo* treffen zu können, durch klinische Studien bestätigt und verifiziert werden.

Basierend auf der gewonnenen Erkenntnis, dass L-CsA eine verlängerte Verweildauer am Zielorgan aufweist, lässt sich spekulieren, dass der depotartige Effekt einer topisch applizierten liposomalen Formulierung von Cyclosporin die für die adäquate Wirkung notwendige Anwendungshäufigkeit im Vergleich zu anderen Zubereitungsformen herabsetzen könnte. Dies wiederum könnte zu einer erhöhten Compliance der Patienten führen, die die Medikation nicht so oft einsetzen müssten und somit letztlich zu einem gesteigerten Therapieerfolg. Auch die Tatsache, dass die Inhalation der liposomalen Formulierung nicht zu einer lokalen Reizung der Atemwege führt, spricht für die Anwenderfreundlichkeit. Ferner machen die für Cyclosporin beschriebenen T-Zell-supprimierenden Effekte und die vermutete anti-fibrotische Wirkung den Arzneistoff zu einem Kandidaten für den Einsatz bei anderen Lungenerkrankungen, die mit inflammatorischen oder fibrotischen Komponenten einhergehen [80].

### 1.5.2 Vergleich der Ergebnisse der Diffusionsversuche mit *in-vitro*-Studien mit der humanen Bronchialzelllinie Calu-3

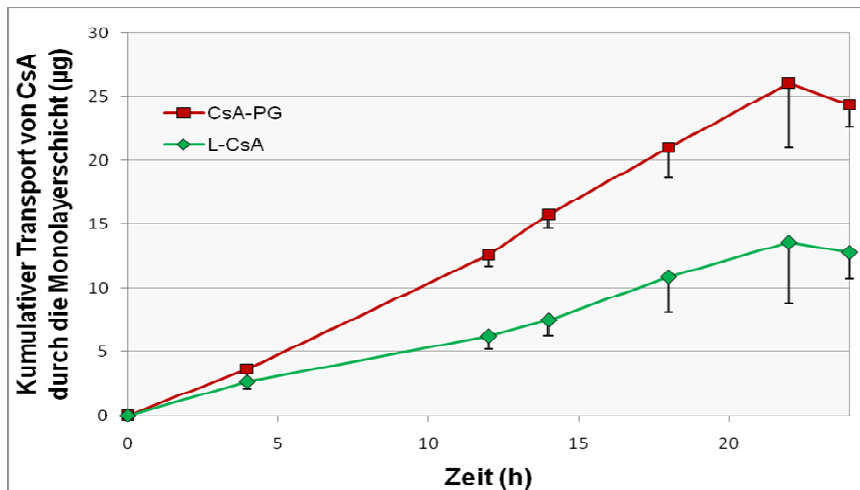
Die mit dem Dialysemodell erzielten Ergebnisse, die für CsA-PG eine schnellere Verteilung von humanem Lungengewebe in humanes Blut zeigten als für L-CsA, welches verlängerte Freisetzungseigenschaften aufwies, decken sich ausgezeichnet mit den *in-vitro*-Studien zur Permeabilität der CsA-Formulierungen, die mit der humanen Bronchialzelllinie Calu-3 durchgeführt wurden [118]. Dieses Zellmodell ist als Standardverfahren zur vergleichenden Untersuchung von Diffusionsvorgängen gut etabliert. Wie schon durch Florea *et al.* und Steimer *et al.* [45, 46] gezeigt wurde, ist die Calu-3 Zelllinie ein sehr gut geeignetes *in-vitro*-Modell für die Vorhersage von pulmonaler Absorption inhalativ angewandter Wirkstoffe *in-vivo*. Sowohl die physiologischen Eigenschaften des Epithels der Luftwege werden nachempfunden als auch Merkmale bezüglich Transportmechanismen und Metabolisierung, die für die Absorption des Wirkstoffes relevant sind. In den *in-vitro*-Studien zur Permeabilität der CsA-Formulierungen verwendete die Forschergruppe die gleichen Wirkstoffformulierungen, die in den eigenen Experimenten eingesetzt wurden, nämlich eine Lösung von Cyclosporin A in Propylenglykol (CsA-PG) und eine liposomale Zubereitung von CsA (L-CsA) [118]. Nach Applikation von L-CsA bzw. CsA-PG in das Donorkompartiment wurde der Wirkstofftransport durch die Monolayerschicht der Calu-3 Zellen, die sich auf einem durchlässigen Wellboden befand beobachtet (siehe *Abbildung 7*), indem über 24 h hinweg aus dem Akzeptorkompartiment Proben entnommen wurden.



**Abbildung 7:** Diffusionsversuch mit Calu-3 Monolayerschicht im Well.

Schematische Darstellung des Wirkstofftransportes vom ① Donorkompartiment, durch ② eine Monolayerschicht von Calu-3 Zellen auf einem durchlässigen Wellboden in das ③ Akzeptorkompartiment.

Anschließend wurden die Ergebnisse der Wirkstoffdiffusion nach Applikation der beiden Formulierungen einander gegenübergestellt. Die Durchlässigkeit der Calu-3 Monolayerschicht für CsA war insgesamt gering, wobei allerdings die Permeabilität für CsA-PG ungefähr doppelt so hoch war wie die für L-CsA (siehe *Diagramm 3*).



**Diagramm 3:** Ergebnisse aus Versuchen zur Diffusion von Cyclosporin durch Calu-3 Monolayer.

Kumulativer Transport apikal zu basolateral von L-CsA bzw. CsA-PG in Calu-3 Monolayerschicht über 24 h. [Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n = 3 parallel durchgeführte Experimente] (Modifiziert nach [118])

*Diagramm 3* stellt die kumulativ transportierte Menge von CsA nach Applikation von CsA-PG bzw. L-CsA durch die Monolayer-Schicht in  $\mu\text{g}$ , aufgetragen gegen den Zeitpunkt der Probenentnahme dar. Über 24 Stunden hinweg wurde die Diffusion des Wirkstoffes durch die Zellschicht erfasst. Der Verlauf der beiden Kurven und ihr Verhältnis zueinander erinnern stark an die Ergebnisse der Diffusion von CsA aus humanem Lungengewebe in humanes Blut im Dialysemodell (siehe *Diagramm 1, Kapitel 1.4*).

Nach einem initial annähernd gleichen Verlauf der beiden Kurven wird ab einem Zeitpunkt bei etwa fünf Stunden deutlich, dass nach Applikation von CsA-PG in der gleichen Zeit eine viel größere Wirkstoffmenge durch die Monolayerschicht diffundierte als bei Verwendung von L-CsA. Dieser Trend setzte sich über die Dauer des Versuches hinweg fort und resultierte in einem Verhältnis von ungefähr 2:1 der durch die Zellschicht transportierten Menge CsA bei CsA-PG im Vergleich zu L-CsA. Die Lösung von Cyclosporin A in Propylenglykol zeigte mit höheren Flux-Werten von  $1,068 \pm 0,187 \mu\text{g}/\text{h}\cdot\text{cm}^2$  eine doppelt so



hohe Permeabilität durch die Monolayer-Schicht als die liposomale Wirkstoffformulierung ( $0,505 \pm 0,042 \mu\text{g}/\text{h}\cdot\text{cm}^2$ ), die somit eine deutlich verlangsamte Freisetzung aufwies.

Obwohl die Zeitdimensionen bei den Experimenten mit dem Dialysemodell (siehe *Diagramm 1, Kapitel 1.4*) und mit der Zellkultur (siehe *Diagramm 3*) unterschiedlich sind, ist der Verlauf der Kurven und ihr Verhältnis zueinander sehr gut vergleichbar. Aus beiden Versuchsmodellen lässt sich übereinstimmend ableiten, dass die liposomale Cyclosporin-Formulierung eine langsamere Wirkstoffdiffusion aus dem Donorkompartiment in das Akzeptorkompartiment bewirkt. Resultierten beim Dialyseexperiment bei Versuchsende nach 420 min Konzentrationen von  $2573 \pm 79 \text{ ng/mL}$  (CsA-PG) gegenüber  $1633 \pm 145 \text{ ng/mL}$  (L-CsA) (siehe 1.4), so zeigte sich bei den Versuchen mit der humanen Bronchialzelllinie Calu-3 nach 24 h eine nahezu doppelt so hohe durch die Zellschicht transportierte Menge Cyclosporin bei CsA-PG im Vergleich zu L-CsA. Die ausgesprochen gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zum Diffusionsverhalten von CsA, die durch Verwendung des Dialysemodells und mit Hilfe der Calu-3 Zelllinie erzielt wurden, bestätigt die generelle Eignung des Dialysemodells als Instrument zu Vorhersage von Diffusionsvorgängen *in-vivo*, da das Zellkulturmodell als solches bereits etabliert ist [45, 46]. Beim Vergleich der beiden Modelle fällt zudem ein Vorteil des Dialysemodells auf: Der Unterschied der beiden CsA-Formulierungen in der Diffusion war im Dialysemodell schneller ersichtlich. Hier zeigte sich der Konzentrationsunterschied der Blutspiegelkurven von CsA-PG und L-CsA bereits nach 90 min (siehe *Diagramm 1, Kapitel 1.4*), während die Disparität der transportierten Menge Cyclosporin nach Applikation der beiden Formulierungen beim Zellkulturmodell erst nach etwa 5 h (siehe *Diagramm 3*) zu erkennen war.

Dennoch kann ein *in-vitro*-Modell nur eine Approximierung an reale Bedingungen *in-vivo* bieten. Eine entscheidende Limitierung sowohl des Dialysemodells als auch des Zellkulturmodells ist, dass keine Eliminationsphase stattfindet und somit pharmakokinetische Parameter wie  $c_{\text{max}}$ ,  $t_{\text{max}}$  und  $t_{1/2}$  mit Hilfe der beiden Modelle nicht ermittelt werden können. Sie spiegeln lediglich die Absorptions- bzw. Diffusionsphase wider, was sich graphisch in einer konstant steigenden Gerade (siehe *Diagramm 1, Kapitel 1.4* und *Diagramm 3*) zeigt.

## **2 Etablierung des kontinuierlichen Dialysemodells - Vergleich der Diffusionskinetik von Fluticasonpropionat bei Anwendung der statischen (SD) und der kontinuierlichen Dialyse (KD)**

### **2.1 Hintergrund**

Glucocorticoide repräsentieren eine Arzneistoffgruppe innerhalb der Inhalativa, die als Dauermedikation aus der Therapie chronisch verlaufender Atemwegserkrankungen mit entzündlicher Komponente wie Asthma oder COPD nicht mehr wegzudenken sind [19, 119]. Die Pharmakokinetik dieser Stoffe in Bezug auf die Umverteilung vom Lungengewebe in den systemischen Kreislauf ist zum Einen wichtig für ihre Effektivität, da beispielsweise eine verlängerte Verweildauer am Zielort der Wirksamkeit zuträglich ist [120, 121]. Auch spielen Parameter wie die Deposition nach inhalativer Gabe und Auflösungsprozesse, die den Wirkstoff aus seiner Formulierung freisetzen eine entscheidende Rolle. Zum Anderen dienen pharmakokinetische Aspekte zur Beurteilung der Sicherheit der Glucocorticoide, so müssen unerwünschte systemische Nebenwirkungen wie z.B. eine verminderte Knochendichte [122] durch eine zu starke systemische Exposition zu diesen Wirkstoffen unbedingt verhindert werden. Vom inhalativ angewendeten Fluticasonpropionat (FP) ist bekannt, dass es eine vernachlässigbar geringe orale Bioverfügbarkeit von < 1 % [123] besitzt, da nach dem Verschlucken des Wirkstoffes nur wenig FP aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert wird und es zudem einem ausgeprägten First-Pass Metabolismus in der Leber unterliegt [123]. In einer klinischen Studie mit gesunden und an COPD erkrankten Probanden wurde nach inhalativer Verabreichung von 1000 µg FP eine systemische Verfügbarkeit von 14 bis 31 % bei den gesunden Erwachsenen und 8,5 bis 20,9 % bei den Patienten mit COPD erreicht. Der Großteil der applizierten Dosis unterlag nicht der präsystemischen Clearance, sondern wurde über das pulmonale Gefäßsystem absorbiert [124, 125]. Entscheidend für die systemische Verfügbarkeit ist demnach die pulmonale Bioverfügbarkeit, definiert als der Dosisanteil, der aus dem Lungengewebe in die systemische Zirkulation umverteilt wird und damit die pulmonale Absorption des Wirkstoffes [126, 127]. Letztere ist schwer in isolierter Form *in-vivo* zu beobachten [77-79], obgleich es die Möglichkeit gibt, durch perorale Gabe von Aktivkohle die orale Absorption eines Wirkstoffes zu blockieren und somit den Beitrag des oral verschluckten Anteils eines Inhalativums zur systemischen Bioverfügbarkeit auszublenden [76, 128]. Diese Methode wird auch von der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) im Rahmen von pharmakokinetischen Studien nach pulmonaler Applikation vorgeschlagen [129]. Der Einsatz

dieser Vorgehensweise bei klinischen Studien am Menschen ist allerdings nicht optimal. So wurde in verschiedenen Untersuchungen die Absorption des peroralen Anteils in die systemische Zirkulation nach Inhalation mit einer Effektivität von 92-98 % reduziert [76, 130, 131]. Es ist also nicht für jeden Wirkstoff klar, welche Menge an Aktivkohle einem Probanden gegeben werden muss, um eine Absorption in den systemischen Kreislauf möglichst vollständig zu verhindern, zumal dies stark von den physikalisch-chemischen Eigenschaften eines Stoffes und von der tatsächlich verschluckten Wirkstoffmenge abhängt [57].

Aus diesen Gründen ist es sinnvoll und wichtig, Methoden zu etablieren und weiterzuentwickeln, die auf möglichst einfache Art die Absorptionsphase vom Lungengewebe in das Blutkompartiment beschreiben und dabei die Verhältnisse möglichst realitätsnah widerspiegeln. Zu diesem Thema wurden bereits einige Untersuchungen durchgeführt und es existieren *in-vitro*- bzw. *ex-vivo*-Modelle, mit deren Hilfe ein Beitrag zum Verständnis der pulmonalen Absorption geleistet wurde: Van Zyl *et al.* führten mit einem Durchflussmodell Untersuchungen zur Diffusion verschiedener Wirkstoffe - darunter mehrere Xanthinderivate, das  $\beta_2$ -Sympathomimetikum Salbutamol und das Anticholinergikum Ipratropiumbromid - durch Lungengewebe vom Schwein durch [132]. Sie stellten fest, dass neben der Lipophilie eines Stoffes, die entscheidend für die Diffusion durch das Bronchialgewebe war auch strukturelle Eigenschaften, nämlich Anzahl und Position der Alkylgruppen bei der Passage der untersuchten Substanzen durch die Membran eine wichtige Rolle spielten [133].

Freiwald *et al.* führten mit dem statischen Dialysemodell, das auch in den vorliegenden Versuchen zu Vergleichszwecken mit dem kontinuierlichen Modell und zur Bestimmung der Diffusionskinetik von Cyclosporin A nach Applikation zweier verschiedener Formulierungen eingesetzt wurde (siehe *Kapitel 1*), bereits Diffusionsversuche mit Glucocorticoiden durch [53]. Hierbei wurde die Auflösungs- und Umverteilungskinetik von Beclomethason-17,21-dipropionat (BDP) nach Freisetzung aus zwei handelsüblichen Dosieraerosolen (Sanasthmax<sup>®</sup> und Ventolair<sup>®</sup>) untersucht und es zeigten sich deutlich unterschiedliche Absorptionsraten der beiden Formulierungen. Im Gegensatz zu Freiwald *et al.* [53] wurde der Arzneistoff in den eigenen Versuchen zur Etablierung des kontinuierlichen Dialysemodells nicht in einer anwendungsbereiten Applikationsform eingesetzt, sondern eine methanolische Lösung des Wirkstoffes (siehe *C2.1.2 – Experimenteller Teil*) wurde mit Hilfe einer Mikroliterpipette direkt auf das Lungenhomogenat aufgetragen. Die Auflösungskinetik des applizierten Wirkstoffes war nicht Gegenstand der Untersuchung, sondern es sollte die Wirkstoff-Diffusion bei Verwendung unterschiedlicher Dialysearten (statische vs. kontinuierliche Dialyse) verglichen werden.

Obwohl die Thematik, wie erläutert, schon vielfältig behandelt wurde, ist eine weitere Annäherung der *in-vitro*-Modelle an physiologische Verhältnisse dennoch wünschenswert. Das statische Dialysemodell [53, 118] stellt ein geeignetes Instrument zur Vorhersage von Diffusionsvorgängen *in-vivo* dar. Wie in 1.2 dargelegt, wurde dies belegt durch die gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus den BDP-Diffusionsversuchen einerseits mit Resultaten aus Experimenten mit dem humanen Lungenperfuisionsmodell [53] und andererseits mit Daten, die in einer klinischen Humanstudie mit denselben Wirkstoffformulierungen erzielt wurden [110]. Auch im Falle der Dialyseversuche mit CsA (siehe *Kapitel 1*) wurden die Ergebnisse gestützt durch die Resultate des etablierten Zellkulturmodells der humanen Bronchialzelllinie Calu-3, die eine langsamere Wirkstoffdiffusion der liposomalen Cyclosporin-Formulierung aus dem humanen Lungengewebe in das Blutkompartiment zeigte im Vergleich zur Lösung von CsA in Propylenglykol.

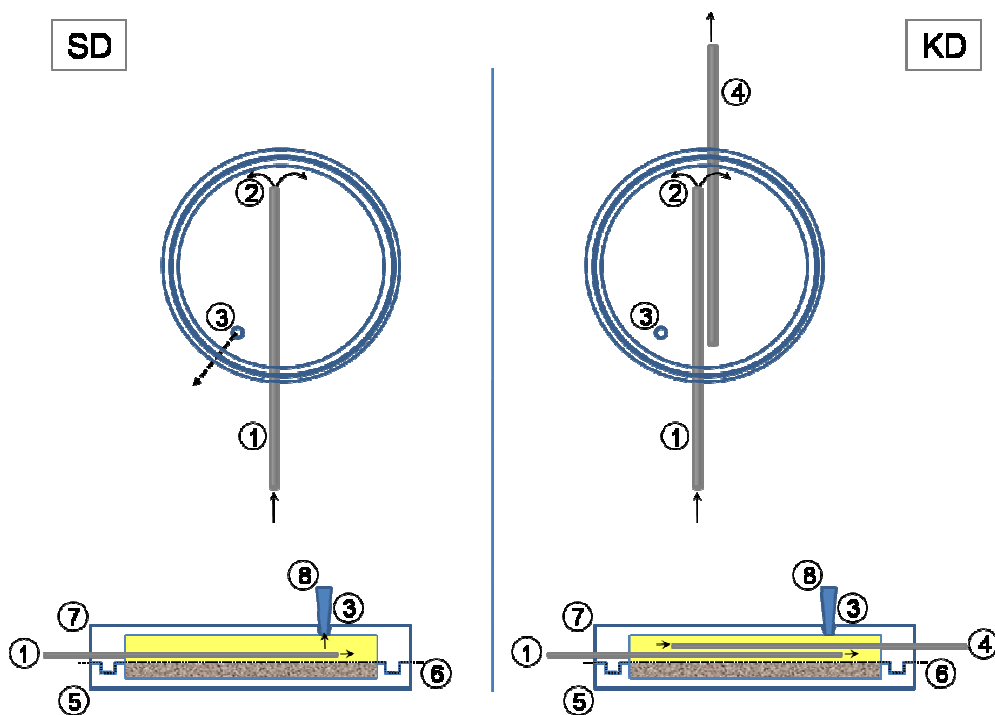
Trotz der guten Eignung des statischen Dialysemodells für Experimente zu Diffusionsvorgängen inhalativ angewandeter Arzneimittel zeigte sich als entscheidende Limitierung das Fehlen einer Eliminationsphase (siehe *Kapitel 1*), die wichtig wäre, um die Pharmakokinetik der untersuchten Substanzen genauer beschreiben zu können. In den vorliegenden Experimenten wurde der Versuch unternommen, das statische Dialysemodell durch das Erzeugen eines konstanten Flusses durch das Akzeptorkompartiment dahingehend zu erweitern, dass eine Eliminationsphase simuliert wurde. Es wurden vergleichende Untersuchungen mit dem statischen Dialysemodell (SD) einerseits und einem kontinuierlichen Dialysemodell (KD) andererseits durchgeführt. Mit Hilfe des *ex-vivo*-Konzeptes des Dialysemodells und der Gegenüberstellung der statischen und der kontinuierlichen Methodik sollte das mögliche Absorptionsverhalten *in-vivo* vorhergesagt werden mit dem Ziel, durch die Erzeugung eines kontinuierlichen Flusses eine Eliminationsphase nachzustellen und das Dialysemodell damit möglicherweise physiologischen Verhältnissen *in-vivo* anzunähern.

## 2.2 Prinzip der Bestimmung

### 2.2.1 Weiterentwicklung des statischen Dialysemodells hin zur kontinuierlichen Dialyse

Wie bereits erläutert, erwies sich das statische Dialysemodell (SD) als geeignetes Instrument zur Beschreibung der Diffusion verschiedener Wirkstoffe [53, 118]. Dennoch schien es wünschenswert, das Modell durch einige Modifikationen näher an physiologische Verhältnisse

heranzubringen, gerade in Bezug auf das Fehlen einer Eliminationsphase. Hierzu sollte ein kontinuierlicher „Blutfluss“ durch das Akzeptorkompartiment der Kammer erzeugt werden und es wurden einige Modifikationen am bereits etablierten Dialysemodell vorgenommen: Zunächst musste eine neue Dialysekammer gefertigt werden, die vom Aufbau her auf dem bereits bekannten Modell basierte, jedoch zusätzlich für einen kontinuierlichen Durchfluss geeignet war (siehe *Abbildung 8*).



**Abbildung 8:** Direkter Vergleich der Kammern der statischen Dialyse (SD) und der kontinuierlichen Dialyse (KD).

Die Dialysekammern sind im Querschnitt, die oberen Kammerhälften zusätzlich in der Aufsicht dargestellt: ① Einlass-Edelstahlkapillare, mit dem Reservoir verbunden, ② Strömung des in die Kammer fließenden Plasmas, ③ Öffnung zur Probenentnahme (SD) bzw. für das Entweichen von Luft bei der Kammerbefüllung (KD); ④ Auslass-Edelstahlkapillare, mit dem Fraktionensammler verbunden (nur KD), ⑤ untere Kammerhälfte mit Lungenhomogenat; ⑥ Dialysemembran; ⑦ obere Kammerhälfte gefüllt mit Plasma; ⑧ Verschluss der Öffnung.

Die untere Kammerhälfte wurde als Depot für das Lungenhomogenat nicht verändert. Auch die Einlass-Edelstahlkapillare wurde in der bestehenden Form beibehalten. Eine zweite Edelstahlkapillare wurde in den Rand der oberen Kammerhälfte eingebaut und fungierte somit als Ausgang für die Dialyseflüssigkeit aus dem Akzeptorkompartiment. Sie wurde gegenüber der Einlass-Edelstahlkapillare so positioniert, dass die Dialyseflüssigkeit nach Eintritt in die

Kammer den größtmöglichen Weg durch diese zurücklegen musste und somit möglichst viel Kontaktzeit zwischen Dialyseflüssigkeit im Akzeptorkompartiment und Membran zur Verfügung stand, um eine Diffusion des Wirkstoffes aus dem Lungenhomogenat zu ermöglichen. Die Öffnung, die beim statischen Kammermodell für die Probenentnahme dient, wurde ebenfalls beibehalten, wenngleich sie bei der kontinuierlichen Variante eine andere Aufgabe erfüllte: Beim Befüllen der oberen Kammerhälfte konnte an dieser Stelle die Luft entweichen (siehe C2.2.3.2 - *Experimenteller Teil*).

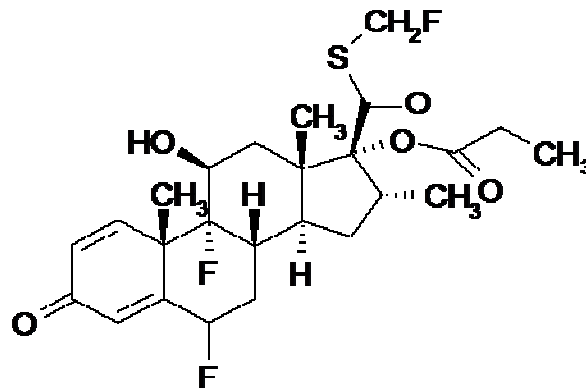
Als neue Komponenten der kontinuierlichen Dialyseapparatur wurden eine Pumpe (Minipuls 2 von Gilson, siehe C2.1.6 – *Experimenteller Teil*) und ein Fraktionensammler an das System angeschlossen (siehe *Abbildung 18*, C2.1.4 – *Experimenteller Teil*). Die Pumpe förderte beständig Dialyseflüssigkeit aus dem Reservoir über die Einlass-Edelstahlkapillare in die obere Kammerhälfte. Im selben Maß, wie Flüssigkeit in das Akzeptorkompartiment hineingepumpt wurde, verließ das Dialysat selbiges über die Auslass-Edelstahlkapillare wieder und wurde zum Fraktionensammler geleitet, der kontinuierlich das Dialysat auffing.

Die Auswahl einer geeigneten Flussgeschwindigkeit erfolgte im Rahmen von Vorversuchen. Durch das über eine bestimmte Zeit geförderte Volumen wurde die Flussrate in Korrelation zu einer Umdrehungszahl des Pumpenkopfes gesetzt, da an der Pumpe die Fließgeschwindigkeit nicht direkt abgelesen werden konnte. Dabei wurde für die weiteren Versuche ein Fluss von 0,38 mL/min gewählt, entsprechend einer Einstellung an der Pumpe von „2 Umdrehungen“. Diese Pumpgeschwindigkeit schien optimal, da der Fluss zum Einen ausreichend langsam war, um für jede gesammelte Fraktion eine möglichst lange Kontaktzeit der Dialyseflüssigkeit mit der Membranoberfläche zu erzeugen und somit dem Wirkstoff genügend Möglichkeit zur Diffusion aus dem Lungengewebe in das Plasma zu bieten, so dass detektierbare Konzentrationen erhalten wurden. Zum Anderen stellte ein Fluss von 0,38 mL/min einen konstanten Dialysattransport innerhalb der oberen Kammerhälfte sicher, essentiell, um das Konzept der KD umzusetzen. Eine Forschergruppe um van Zyl *et al.* führte vergleichende Untersuchungen zur Diffusion verschiedener Arzneistoffe, darunter Ipratropiumbromid und Salbutamol mit einem *in-vitro*-Durchfluss-System durch, bei dem der Wirkstofftransport durch Lungengewebe vom Schwein beobachtet wurde. Dabei wurde eine Lösung des jeweiligen Wirkstoffes in die Donor-Seite gegeben und Puffer mit einer Flussrate von 1,5 mL/h durch die Akzeptorkammer der Diffusionszellen gepumpt [133]. In den vorliegenden Versuchen mit dem kontinuierlichen Dialysemmodell wurde ein deutlich schnellerer Fluss von umgerechnet 22,8 mL/h erreicht. Man muss jedoch die unterschiedlichen Größen der beiden verglichenen Systeme beachten. Bei van Zyl *et al.* handelte es sich um eine der Diffusion exponierte Oberfläche von

0,039 cm<sup>2</sup> [133], während die beiden Kammerhälften der Dialyseapparatur in den eigenen Versuchen eine Fläche von 15,9 cm<sup>2</sup> Membran zwischen sich einspannten. Zudem ermöglichten apparative Limitierungen der Pumpe bei Versuchen zur KD keine langsamere Einstellung der Flussgeschwindigkeit. Wenn man jedoch die bei Lange angegebenen üblichen Fließgeschwindigkeiten des Mediums von 8 bis 48 mL/min [134] bei Freisetzungsexperimenten zu Arzneistoffformen im Rahmen von biopharmazeutischen Untersuchungen beachtet, so scheint der für die KD gewählte Fluss eher niedrig. Bei diesem Vergleich handelt es sich allerdings um ein Beispiel aus einem völlig anderen Fachgebiet, in dem es nicht um eine Wirkstoffdiffusion geht, sondern um die Freisetzung eines Arzneistoffes aus seiner Formulierung. So scheint die gewählte Flussrate für die aktuelle Fragestellung dennoch adäquat.

Im Unterschied zu den Diffusionsversuchen mit Cyclosporin A wurde sowohl bei der SD als auch bei der KD die Kammer während eines Versuches im Wärmeschrank auf einem Wippschüttler gelagert. Durch die gleichmäßige Schwenkbewegung war eine Durchmischung des Kammerinhaltes gewährleistet und dies in gleichem Maße bei beiden Dialysearten, so dass eine gute Vergleichbarkeit bezüglich der Homogenität gegeben war.

Als Modellsubstanz für die Etablierung des kontinuierlichen Dialysemodells wurde Fluticasonpropionat (FP) gewählt (siehe *Abbildung 9*).



**Abbildung 9:** Strukturformel des Fluticason-17-propionat (FP).

$M_r$  (FP) = 500,57 g/mol; Summenformel (FP) = C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>F<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S

Es ist ein inhalierbares Glucocorticoid mit einer hohen Lipophilie, einer geringen oralen Bioverfügbarkeit, einer hohen Plasmaproteinbindung, einer hohen Affinität zum Glucocorticoid-Rezeptor und einer schnellen systemischen Clearance [135, 136]. Neben seiner immensen

therapeutischen Bedeutung im Kreise der Glucocorticoide schien FP geeignet, da das statische Dialysemodell von Freiwald *et al.* bereits erfolgreich für Diffusionsversuche mit Glucocorticoiden eingesetzt wurde [53]. Auf Grund der hohen Plasmaproteinbindung des untersuchten Wirkstoffes FP zwischen 81 und 95 % wurde bei den vorliegenden Versuchen Plasma als Dialyseflüssigkeit eingesetzt.

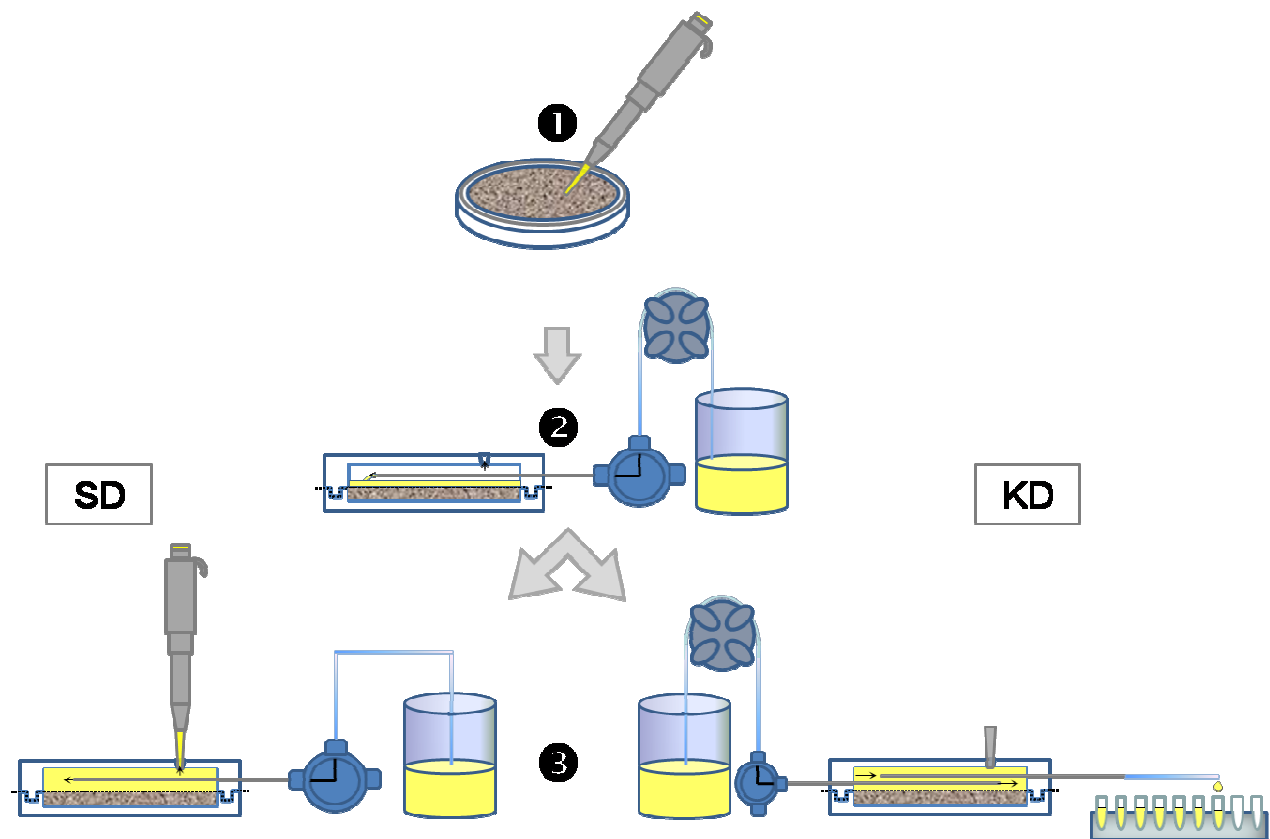
Durch die Simulation eines Blut- bzw. Plasmaflusses durch das Akzeptorkompartiment der Dialysekammer wurde das System der statischen Dialyse weiterentwickelt und um die Dimension der Dynamik erweitert. Durch die Nachahmung einer Eliminationsphase konnte das Dialysemodell weiter an physiologische Verhältnisse angenähert werden.

### **2.2.2 Durchführung der Dialyseversuche**

Sowohl bei der statischen Dialyse (SD) als auch bei der kontinuierlichen Dialyse (KD) setzte sich die Kammer aus einer oberen und einer unteren Hälfte aus Teflon zusammen, die zwischen sich eine Membran einspannten (siehe *Abbildung 8, Kapitel 2.2.1*). Dieselbe Apparatur, die bereits für Versuche mit Cyclosporin A eingesetzt worden war (siehe *1 und C1 – Experimenteller Teil*), wurde auch für die vorliegenden Experimente zur SD verwendet. Während die unteren Kammerhälften bei beiden Dialysearten identisch konstruiert waren, unterschieden sich die oberen Teile der Dialyseeinheit. Die Kammer bei der SD besaß nur eine Edelstahlkapillare und die Probenentnahme erfolgte über eine Öffnung an der Oberseite, die obere KD-Kammerhälfte hingegen wies sowohl eine Einlass- als auch eine Auslass-Edelstahlkapillare auf (siehe *Abbildung 8, Kapitel 2.2.1*). In jedem der insgesamt sechs Dialyseversuche wurde zunächst mit einer Mikroliterpipette die Wirkstofflösung von 1 mg/mL Fluticasonpropionat (FP) in Methanol direkt auf das Lungenhomogenat auf der unteren Kammerhälfte appliziert und mit dem Gewebe vermischt (siehe *C2.2.1.2 und C2.2.3.2 - Experimenteller Teil*), wobei eine aufgetragene Dosis von 200 µg FP resultierte. Nach Zusammenfügen von Kammeroberteil und –unterteil inklusive der dazwischen eingespannten Membran erfolgte die Befüllung der oberen Kammerhälfte mit Plasma. Dabei wurde aus Gründen der einfacheren Handhabung und einer schnelleren Durchführung eine Pumpe eingesetzt. Da bei beiden Dialysemethoden (SD und KD) der Füllvorgang mit Hilfe einer Pumpe bewerkstelligt wurde, war im Hinblick auf Dauer und Art der Befüllung außerdem die Vergleichbarkeit der zwei Dialysearten gewährleistet. Sowohl bei der SD als auch bei der KD wurde die obere Kammerhälfte über eine Verbindung zum Reservoir mit frischer Dialyseflüssigkeit versorgt. Nach dem Abschließen des Befüllungsvorganges begann die



Inkubationszeit von vier Stunden. Ab diesem Zeitpunkt unterschieden sich die experimentellen Vorgehensweisen bei der statischen und der kontinuierlichen Dialyse (siehe *Abbildung 10*).



**Abbildung 10:** Ablauf eines Dialyseversuches, Gegenüberstellung der statischen Dialyse (SD) und der kontinuierlichen Dialyse (KD).

❶ Die Fluticasonpropionat-Lösung wird mit Hilfe einer Mikroliterpipette direkt auf das Lungenhomogenat appliziert. ❷ Die zusammengebaute Dialysekammer wird bei offener Ventilstellung mit Hilfe einer Pumpe mit Dialyseflüssigkeit befüllt. ❸ (SD) Über eine Mikroliterpipette erfolgt die Probenentnahme, wobei das Mehrwegeventil in geöffneter Position steht. Die Inkubation der verschlossenen Dialyseapparatur mit geschlossenem Mehrwegeventil bei 37 °C wird nur zu den festgelegten Zeitpunkten zur Probenentnahme unterbrochen. ❹ (KD) Kontinuierlich wird Plasma bei stets geöffnetem Mehrwegeventil durch die Dialyseeinheit gepumpt, die Probengewinnung erfolgt dabei automatisiert über einen Fraktionensammler und die Kammer wird über die gesamte Versuchsdauer bei 37 °C inkubiert. [Die Bezeichnungen der einzelnen Bestandteile der Dialyseapparaturen können *Abbildung 8* und *Abbildung 18* entnommen werden.]

Im Falle der SD wurde jeweils zu einem Probenentnahmezeitpunkt durch Ansetzen einer Mikroliterpipette an die Öffnung der Kammeroberseite bei geöffneter Position des Mehrwegeventils ein Unterdruck erzeugt, wodurch frisches Plasma aus dem Reservoir als Volumenersatz in die Kammer nachströmte. Eine Probe im Rahmen der SD bestand demnach

aus dem zu den Zeitpunkten 3, 6, 15, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 und 240 Minuten nach Beginn der Inkubationszeit entnommenen Dialysat mit einem Volumen von jeweils 1000 µL.

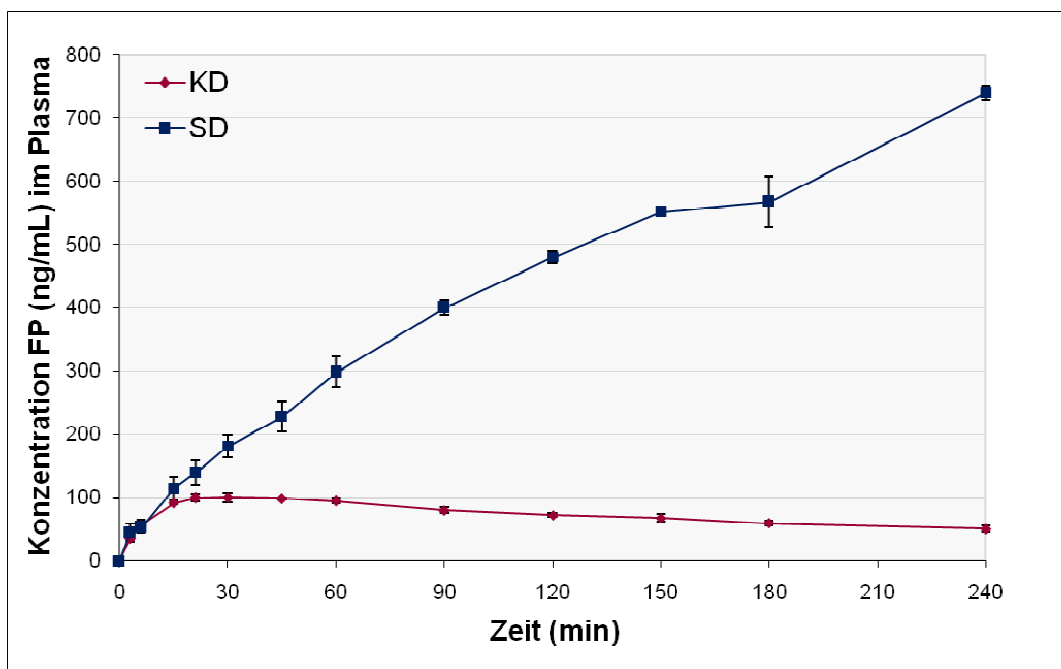
Bei der kontinuierlichen Form der Dialyse erfolgte die Probengewinnung dagegen automatisch. Die Dialyseflüssigkeit wurde beständig durch die Pumpe mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,38 mL/min gefördert, durch das permanent geöffnete Ventil in die obere Kammerhälfte geleitet und nach Verlassen der Kammer über die Auslass-Edelstahlkapillare mit Hilfe eines Fraktionensammlers in Gefäßen aufgefangen. Die Sammlung einer Fraktion erstreckte sich dabei über einen Zeitraum von drei Minuten und resultierte in einem Volumen von 1,14 mL pro Eppendorfgefäß. Zur Aufarbeitung der Proben im Rahmen der Quantifizierung von FP wurden jeder zu analysierenden Probe 1000 µL Volumen entnommen und der weiteren Verarbeitung zugeführt (siehe *C2.3.1 - Experimenteller Teil*). Dabei wurde der Arzneistoffgehalt nicht in allen zur Verfügung stehenden Fraktionen bestimmt, sondern lediglich in den Proben, deren Sammelintervall zu den Zeitpunkten 3, 6, 15, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 und 240 Minuten nach Beginn der Inkubationszeit abgeschlossen worden war. Die Auswahl der Proben für die Analyse erfolgte dabei bewusst analog der Probengewinnung bei der SD, um die zeitlichen Diffusionsverläufe bei KD und SD direkt vergleichen zu können.

Die Dialysekammer der KD lagerte während der gesamten Versuchsdauer auf dem Wippschüttler im Wärmeschrank bei 37 °C, die SD-Kammer wurde nur zum Zwecke einer Probenentnahme aus dem Wärmeschrank entfernt und danach mit verschlossener Öffnung der Kammeroberseite und durch das Ventil unterbrochener Verbindung zum Reservoir umgehend zurückgestellt.

Sowohl bei der SD als auch bei der KD wurde das Plasma im Reservoir mit Hilfe eines Magnetrührers durchmischt, damit eine homogene Beschaffenheit der aus dem Reservoir frisch nachströmenden Dialyseflüssigkeit sichergestellt war. Der Einsatz eines Wippschüttlers ermöglichte eine stete, sanfte Bewegung der Dialyseflüssigkeit im Oberteil der Kammer und verhinderte auf diese Weise das Entstehen einer Schicht mit erhöhter FP-Konzentration in Membrannähe im Vergleich zum übrigen Dialysat in der Kammer und damit eine Verfälschung des Gehaltes in den gewonnenen Proben. Die analysierte FP-Konzentration in einer Probe kann somit also stets als repräsentativ für den Gehalt an Glucocorticoid in der oberen Kammerhälfte zum entsprechenden Zeitpunkt angesehen werden. Mit beiden Dialysemodellen wurden jeweils drei Versuche durchgeführt und pro Experiment zwölf Dialysatproben mittels HPLC und UV-Detektion auf ihren FP-Gehalt hin analysiert (siehe *C2.3.2 – Experimenteller Teil*).

### 2.3 Ergebnisse der Diffusionsversuche

Die Untersuchung der Diffusion von Fluticasonpropionat (FP) bei Verwendung der statischen Dialysemethode einerseits und der kontinuierlichen Dialyse andererseits führte erwartungsgemäß zu deutlich unterschiedlichen Profilen des Konzentrationsverlaufes von FP beim Übertritt von humanem Lungengewebe in humanes Plasma. Nach Applikation von 200 µg FP wurde bei der SD, bei der ja ein kumulativer Transport des FP vom Gewebe in das Plasmakompartiment stattfand, ein steter Anstieg der Konzentration im Dialysat beobachtet. Bei Verwendung der KD wurde durch die Pumpe kontinuierlich Arzneistoff aus dem oberen Kompartiment entfernt, die Konzentrationskurve erreichte ein Plateau und fiel danach ab. Durch die KD konnte somit eine Annäherung des Modells an physiologische Verhältnisse erzielt werden, da der Konzentrationsverlauf im Plasma mit Andeutung einer Eliminationsphase den Plasmaspiegelkurven von FP *in-vivo* ähnelte (siehe *Diagramm 4*).



**Diagramm 4:** Diffusion von Fluticasonpropionat (FP) von humanem Lungengewebe in humanes Plasma – Vergleich der statischen Dialyse (SD) und der kontinuierlichen Dialyse (KD).

Zeitlicher Verlauf des Übergangs von FP von humanem Lungengewebe in humanes Plasma bei 37 °C. Die dunkelblaue Kurve zeigt den Konzentrationsverlauf bei Verwendung der SD, die weinrote Kurve dagegen bei Einsatz der KD. [Mittelwert ± mittlere Abweichung vom Mittelwert, n = 3]

Mit jeder Dialysemethode wurden drei Experimente durchgeführt und jeweils der Wirkstoffgehalt von zwölf Proben, die zu festgelegten Zeitpunkten innerhalb der vierstündigen Inkubationszeit aus dem Dialysat gewonnen wurden, mittels HPLC und UV-Detektion bestimmt. *Diagramm 4* zeigt die Konzentration von FP im Plasma, aufgetragen gegen die Versuchsdauer von vier Stunden, wobei die dunkelblaue Kurve den Plasmaspiegelverlauf für die statische Dialyse dargestellt, die weinrote den für das kontinuierliche Dialyseverfahren.

Zu Beginn des Versuches verlaufen die beiden Kurven nahezu gleich, sie liegen an dieser Stelle nahe beisammen bzw. überschneiden sich. FP diffundierte demnach in gleichem Maße in das Plasmakompartiment, unabhängig davon, ob durch die obere Kammerhälfte ein Fluss strömte oder nicht. Ab einem Zeitpunkt bei 21 Minuten erkennt man allerdings im Diagramm deutliche Unterschiede zwischen den beiden Dialysemethoden. Bei SD wurde zu diesem Zeitpunkt eine Konzentration von  $138 \pm 6$  ng/mL gemessen (siehe *D2.3 – Tabellarischer Anhang*). Die Kurve steigt bis zum Ende des Experimentes nahezu linear an, da FP beständig durch die Membran hindurch diffundierte und die Konzentration im Akzeptorkompartiment immer weiter stieg. Es fand demnach bei statischen Bedingungen, also wenn bis auf das Nachströmen von frischem Plasma als Volumenersatz einer Probe keinerlei Dialyseflüssigkeit ausgetauscht wurde, ein kumulativer Transport des Glucocorticoids statt.

Bei KD hingegen lag zum Zeitpunkt 21 Minuten eine Konzentration von  $99 \pm 20$  ng/mL FP vor (siehe *D2.3 – Tabellarischer Anhang*). Durch die Pumpe und den damit erzeugten Fluss wurde kontinuierlich Arzneistoff aus der oberen Kammerhälfte entfernt. Im weiteren Verlauf des Experimentes erreichte die Konzentrationskurve der KD bei 30 Minuten mit  $100 \pm 7$  ng/mL ein Plateau und ab einem Zeitpunkt bei 60 Minuten fiel die FP-Konzentration im Akzeptorkompartiment sukzessive ab. Pro Zeiteinheit wurde also mehr Wirkstoff eliminiert als aus dem Lungengewebe nachdiffundierte. Zum Versuchsende bei 240 Minuten betrug der FP-Gehalt bei Verwendung der statischen Dialyse das 14,8 fache der gemessenen Konzentration bei der kontinuierlichen Dialyse. Während bei der SD  $739 \pm 11$  ng/mL FP im Plasma vorlagen, wurden bei der KD weitaus niedrigere Spiegel von  $50 \pm 5$  ng/mL analysiert.

Die Tatsache, dass die KD-Plasmaspiegelkurve von Fluticasonpropionat 30 Minuten nach Versuchsbeginn ein Plateau erreicht und nach 60 Minuten beständig abfällt, erlaubt die Schlussfolgerung, dass KD als Weiterentwicklung der statischen Dialyse gewissermaßen einen „Blutfluss“ bzw. Plasmafluss und damit eine Eliminationsphase simuliert. Es kann somit durch das Hinzufügen einer dynamischen Dimension in das Akzeptorkompartiment von einer Annäherung des *in-vitro*-Dialysemodells an physiologische Verhältnisse *in-vivo* gesprochen werden.

## 2.4 Diskussion der Diffusionsversuche

Die gemessenen FP-Konzentrationen und die Diffusionsprofile unterscheiden sich stark zwischen der kontinuierlichen (KD) und der statischen Dialyse (SD). Während bei SD ein kontinuierlicher Anstieg zu sehen ist, nimmt die Wirkstoffkonzentration im Plasmakompartiment bei Verwendung der KD nach Erreichen eines Plateaus wieder ab und es werden vergleichsweise niedrigere Konzentrationen erreicht. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Verschiedenartigkeit im Verlauf der Plasmaspiegelkurven von SD einerseits und KD andererseits allein auf die Komponente eines konstanten Flusses im Vergleich zu statischen Bedingungen zurückzuführen sind, da dies den einzigen Unterschied zwischen den beiden Methoden darstellte. Sowohl das verwendete Lungenhomogenat als auch das Plasma stammten aus derselben Grundgesamtheit, es kann also von identischen Merkmalen bezüglich der Zusammensetzung der biologischen Matrices ausgegangen werden. Auch der direkt auf das Lungengewebe aufgetragene Wirkstoff entstammte ein und derselben Applikationslösung. Zudem lagen bei beiden Modellen die gleichen Rahmenbedingungen vor: Die Befüllung der oberen Kammerhälfte mit Plasma wurde mit Hilfe einer Pumpe vollzogen. Die Zeit vom Aufsetzen der Dialysemembran auf das Homogenat über das Schließen des Systems durch Aufsetzen der zweiten Kammerhälfte bis hin zur Gewinnung der ersten Probe war somit gleich, dementsprechend auch die Kontaktzeit der Dialyseflüssigkeit mit der Membran und damit verbunden die Möglichkeit der Diffusion für FP. Erst nach abgeschlossener Befüllung der oberen Kammerhälfte mit Plasma kam die im weiteren Versuchsverlauf differierende Vorgehensweise bezüglich des kontinuierlichen Flusses und der statischen Bedingungen zum Tragen, was den Schluss erlaubt, dass dies der Grund für die unterschiedlichen Kurvenformen von SD und KD ist.

Während des Experimentes wurde im Falle der KD die Dialysekammer ununterbrochen bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert, während die SD-Kammer zum Zwecke der Probenentnahme herausgenommen wurde. Der Vorgang der Probengewinnung umfasste allerdings nur eine sehr kurze Zeitspanne von etwa 45 Sekunden. Es scheint unwahrscheinlich, dass die Unterbrechung der Inkubation in Anbetracht der Kürze der Zeit einen Einfluss auf die Diffusion des FP hatte. Im Falle der KD konnte das Reservoir auf dem Magnetrührer aus Platzgründen nicht simultan mit der Kammer auf dem Wippschüttler im Wärmeschrank gelagert werden. Es wurde daher außerhalb des Wärmeschrankes bei RT positioniert. Es kann dennoch davon ausgegangen werden, dass dies keinen nennenswerten Einfluss auf die Diffusion des FP hatte, da die dünnen Schläuche und der langsame Fluss eine ausreichende Kontaktzeit der Dialyseflüssigkeit mit der warmen Umgebungsluft gewährleisteten und damit eine ausreichende

Erwärmung des Plasmas vor Eintritt in die Kammer. Beide Apparaturen wurden während der Versuchsdauer – die SD-Kammer mit Ausnahme der Probengewinnung – auf dem Wippschüttler bei gleicher Schwenkgeschwindigkeit gelagert. Zum Einen war damit eine gleichmäßige FP-Konzentration innerhalb des Akzeptorkompartimentes gewährleistet. Diese Tatsache ist besonders bei der Probengewinnung von Bedeutung, da nur bei einem homogenen FP-Gehalt innerhalb der oberen Kammerhälfte davon ausgegangen werden kann, dass die Konzentration der aus der Gesamtheit gewonnenen Probe repräsentativ für den Wirkstoffgehalt in der Akzeptorkammer ist. Zum Anderen verhinderte die stete Durchmischung des Kammerinhaltes die Bildung einer Grenzschicht mit erhöhter FP-Konzentration am Übergang von Membran zu Plasma, so dass ein uneingeschränkter Nachschub von Arzneistoff aus dem Lungenhomogenat bei anhaltendem Konzentrationsgefälle gegeben war. Eine sanfte Bewegung innerhalb der Kammer und damit eine gleichmäßige Verteilung des Glucocorticoids war also in gleichem Maße bei SD und KD vorhanden und der steilere Anstieg im Diffusionsprofil der SD ohne Fluss kann demnach nicht auf eine lokale Aufkonzentrierung im Plasmakompartiment zurückzuführen sein, sondern allein auf das Fehlen eines konstanten Dialysattransportes durch die Pumpe im Gegensatz zur KD. Zwar bestand bei der KD auf Grund des größeren Anteils an frischer Dialyseflüssigkeit ein steileres Konzentrationsgefälle als bei der SD, jedoch waren bei beiden Dialysearten stets sogenannte „Sink-Konditionen“ gegeben, das heißt die Konzentration des permeierenden Stoffes im Akzeptorkompartiment erreichte nie  $\geq 10\%$  von der Donorkammer [132, 133]. Dies wird deutlich, wenn man die Fluticasonpropionat-Konzentrationen im Akzeptorkompartiment jeweils zum Zeitpunkt des höchsten gemessenen Wirkstoffgehaltes betrachtet: Bei SD war diese Bedingung gegen Versuchsende hin mit einer FP-Konzentration von  $739 \pm 11$  ng/mL gegeben, wobei die Konzentration nach vier Stunden noch immer kein Plateau erreicht hatte. Bei KD wurden im Plasma weitaus niedrigere Konzentrationen analysiert, in der Plateauphase bei 30 Minuten  $100 \pm 7$  ng/mL FP. Wenn man beachtet, dass eine Dosis von 200  $\mu$ g Wirkstoff auf das Lungenhomogenat mit einem Volumen von etwa 5 mL appliziert wurde, resultierte in der Donorkammer eine Konzentration des Glucocorticoids von ca. 40000 ng/mL. Die für Sink-Bedingungen relevante Schwelle von 10 % des Wirkstoffgehaltes im Donorkompartiment, die in der oberen Kammerhälfte nicht überschritten werden darf, zugrundegelegt, wurde dieser Wert sowohl bei der SD ( $739 \pm 11$  ng/mL) als auch bei der KD ( $100 \pm 7$  ng/mL) weit unterschritten. Dies bedeutet, dass zu jedem Zeitpunkt der Dialyse bei der SD und der KD Sink-Konditionen und vergleichbare Diffusionsbedingungen für die Stoffwanderung herrschten und die unterschiedlichen Profile des Übergangs von FP vom Lungengewebe in das Plasma bei

Verwendung der beiden Dialysearten allein auf das Vorhandensein oder die Abwesenheit eines konstanten Flusses zurückzuführen sind.

Schließlich ist noch zu erwähnen, dass die analysierten FP-Konzentrationen sich im Falle der SD auf Zeitpunkte beziehen, während die Proben bei der KD über einen Zeitraum von drei Minuten gewonnen wurden. Dieser Unterschied ist auf Grund des Versuchsaufbaus mit einem kontinuierlichen Fluss bei der KD allerdings unvermeidlich. Durch die Zuordnung eines Zeitpunktes (SD) wie z.B. 30 min zu dem entsprechenden Zeitraum (KD), der sich über drei Minuten erstreckte und zum Vergleichs-Zeitpunkt abgeschlossen wurde (entsprechend 27-30 min), können die Plasmaspiegelverläufe der beiden Methoden jedoch wie in *Diagramm 4* geschehen einander gegenübergestellt werden.

#### **2.4.1 Die Ergebnisse der Diffusionsversuche im Kontext von ex-vivo- bzw. in-vitro-Studien zu pharmakokinetischen Fragestellungen**

Wie bereits in Kapitel 1 der vorliegenden Arbeit erklärt wurde, bietet das statische Dialysemodell eine gute Möglichkeit, mit einfachen Mitteln pharmakokinetische Untersuchungen zur Diffusion von Wirkstoffen durchzuführen und es ist durch verschiedene Experimente als valides pharmakokinetisches Modell etabliert. Mit dieser statischen Form der Dialyse wurde durch den direkten Vergleich der Verteilungskinetik einer liposomalen Cyclosporin A-Formulierung (L-CsA) und einer Lösung von Cyclosporin A in Propylenglykol (CsA-PG) eine unterschiedliche Geschwindigkeit der Diffusion von CsA (Cyclosporin A) vom Lungengewebe in das Blutkompartiment gezeigt (siehe *Kapitel 1*, [118]). L-CsA wies dabei eine längere Verweildauer im Lungenkompartiment auf, eine im Rahmen einer immunsuppressiven Therapie nach einer Lungentransplantation erwünschte Eigenschaft einer Wirkstoffformulierung. Bei Freiwald *et al.* wurde das statische Dialysemodell dazu eingesetzt, die Diffusion von Beclomethason-17,21-dipropionat nach Freisetzung aus den zwei Dosieraerosolen Sanasthmax<sup>®</sup> und Ventolair<sup>®</sup> zu untersuchen [53]. Im vorliegenden Kapitel wurde die kontinuierliche Dialyse (KD) als eine Weiterentwicklung des statischen Modells (SD) vorgestellt und die beiden Dialysemethoden wurden am Beispiel der Diffusion von FP (Fluticasonpropionat) unmittelbar miteinander verglichen. Beide Modelle zeichnen sich basierend auf dem Versuchsaufbau (siehe *Abbildung 10*, *Kapitel 2.2.2*) durch eine einfache Handhabung aus und können gut zur Einschätzung des Diffusionsverhaltens von Wirkstoffen und deren Zubereitungsformen eingesetzt werden, wobei auch eventuellen Auflösungsprozessen Rechnung getragen werden kann.

Ein weiteres *in-vitro*-Modell zur Untersuchung pharmakokinetischer Fragestellungen stellt das Zellkulturmodell mit der humanen Bronchialzelllinie Calu-3 dar. Dieses Modell ist als Standardverfahren zur Vorhersage der pulmonalen Absorption inhalativ angewandter Wirkstoffe *in-vivo* bereits etabliert [45, 46]. In diesem Modell können die physiologischen Eigenschaften des Epithels der Luftwege wie eine induzierte Ziliogenese und Mukusproduktion realisiert werden, aber auch für die Absorption von Wirkstoffen relevante Merkmale bezüglich Metabolisierung und Transportmechanismen wie P-Glykoprotein Efflux Systeme [137, 138]. Bei Borchard *et al.* wurde die Diffusion und Metabolisierung von FP und Budesonid (BUD) durch die Calu-3 Zelllinie untersucht [30]. Dabei wurden die Glucocorticoid-haltigen Lösungen in die Donorkammer gegeben und der kumulative Stofftransport durch die Monolayerschicht hindurch über einige Stunden hinweg verfolgt, indem der Konzentrationsverlauf im Akzeptorkompartiment erfasst wurde. Vom Versuchskonzept her entsprachen diese *in-vitro*-Versuche also dem statischen Modell der Dialyse. Auf dem porösen Filterboden befand sich die Monolayerschicht der Calu-3 Zellen, durch die der Wirkstofftransport in das Akzeptorkompartiment erfolgte. Im Rahmen der Experimente wurde eine lokale Metabolisierung von BUD durch intrazelluläre Konjugation mit Fettsäuren und damit einhergehend eine verlängerte Retention von BUD in den Calu-3 Zellen festgestellt. Bei FP fand eine derartige Metabolisierung dagegen nicht statt [30]. Das Calu-3 Zellkulturmodell wurde in diesem Fall als nützliches Werkzeug für die Untersuchung der Pharmakokinetik von Glucocorticoiden in Bezug auf Absorption und Metabolisierung genutzt. Wichtig für eine Übertragbarkeit der Versuchsergebnisse ist das Ausmaß der Vergleichbarkeit zwischen den Eigenschaften der Zellen des *in-vitro*-Modells und der zellulären Gegebenheiten *in-vivo*, also des Epithels der Atemwege. Wie bereits erwähnt, ist im Falle der Calu-3 Zellen eine sehr gute Vergleichbarkeit mit dem realen Vorbild *in-vivo* gegeben. Dennoch stellt das Fehlen einer Eliminationsphase bei der Untersuchung eines kumulativen Wirkstofftransportes sowohl im Zellkulturmodell als auch beim statischen Dialysemmodell eine Einschränkung dar, da ausschließlich eine Betrachtung der Absorptionsphase erfolgen kann. Die Weiterentwicklung des Dialysemmodells hin zu einer Apparatur mit einem konstanten Durchfluss durch das Akzeptorkompartiment unter Beibehaltung der bewährten Komponente des Lungenhomogenates ermöglicht nun die Simulation eines Blut- bzw. Plasmaflusses und damit eine Annäherung des *in-vitro*-Modells an physiologische Verhältnisse mit der Chance, weitere pharmakokinetische Parameter auf eine experimentell nicht allzu aufwändige Art und Weise zu bestimmen.

Das bei der kontinuierlichen Dialyse verwendete Prinzip eines konstanten Flusses erinnert an Durchflusszellen [139, 140], wie sie auch als *in-vitro*-Modelle bei

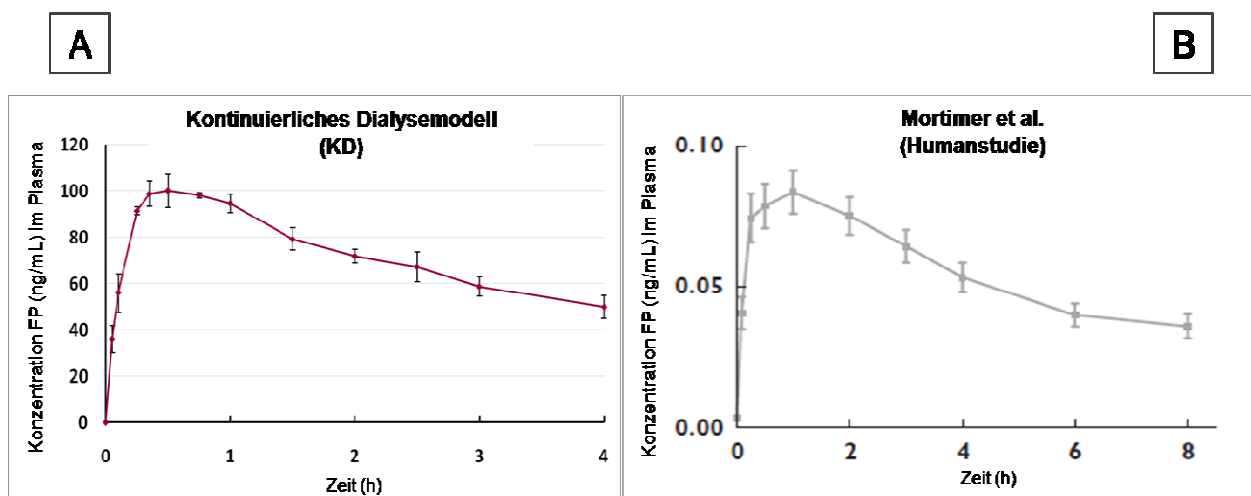


Freisetzungsversuchen im Rahmen der Entwicklung und Prüfung von Arzneistoffformulierungen eingesetzt werden. Eine Forschergruppe um van der Bijl *et al.* beschreibt die Verwendung eines Durchfluss-Perfusions-Systems mit humaner Darmmukosa [132]. Anstelle der Darmmukosa wurden beispielsweise auch Gewebeproben der Haut oder der Cornea und Vaginal- und Buccalmukosa für eine solche Art von Versuchen herangezogen [91, 141-144]. Van der Bijl *et al.* verglichen die Diffusion verschiedenster Wirkstoffe durch Darmmukosa, die sich hinsichtlich ihrer chemischen Eigenschaften, Molekülgröße, Konformation, Lipophilie und Ionisierungsgrad unterschieden, um die Eignung des Systems für eine Vielfalt von Substanzen zu demonstrieren [132]. Die Proben aus Darmgewebe stammten von Patienten, die sich einem chirurgischen Eingriff am Darm unterziehen mussten und wurden im Rahmen dieser Prozedur gewonnen. Eine Lösung des zu untersuchenden Stoffes wurde in das Donorkompartiment gegeben. Mit einer Flussrate von 1,5 mL/h wurde 24 Stunden lang Flüssigkeit durch das Akzeptorkompartiment gepumpt und mit einem Fraktionensammler aufgefangen. Die permeierende Substanz diffundierte dabei unter Sink-Konditionen (siehe 2.4) durch die Epithelschicht mit einer Fläche von 0,039 cm<sup>2</sup>. Die Autoren zeigten, dass das Durchflusssystem mit biologischen Membranen eine interessante Untersuchungsmethode für Permeabilitätsbestimmungen im Rahmen von Studien zur Bioverfügbarkeit bzw. Bioäquivalenz darstellt [132]. Wie die Experimente zur Etablierung der kontinuierlichen Dialyse vermuten lassen, scheint für die Bestimmung von Diffusionsvorgängen speziell an der humanen Lunge die Verwendung des *in-vitro*-Modells der KD, einer Art von Durchflusssystem mit Integration von Lungenhomogenat im Donorkompartiment gut geeignet zu sein, wie im folgenden Kapitel beim Vergleich mit Daten aus Humanstudien noch verdeutlicht wird.

#### **2.4.2 Die Ergebnisse der Diffusionsversuche im Kontext von klinischen Humanstudien**

Pharmakokinetische Modelle können stets nur in Ausschnitten die komplexen Verhältnisse der Wirklichkeit abbilden. Die Gegebenheiten des Originals jedoch so gut wie möglich nachzuempfinden bzw. der Realität möglichst nahe zu kommen ist das Ziel bei der Entwicklung und Optimierung von Modellen. Eine solche Annäherung an physiologische Verhältnisse bei einem gleichzeitig recht einfachen Versuchsaufbau konnte durch die Weiterentwicklung des statischen Dialysemodells hin zu einer kontinuierlichen Dialyse erreicht werden. Diese Annäherung an physiologische Verhältnisse lässt sich untermauern durch den Vergleich der kontinuierlichen Dialyse mit einer Humanstudie.

Mortimer und Kollegen haben die pharmakokinetischen Profile verschiedener Glucocorticoide nach Inhalation bei 30 Asthmatikern untersucht und dabei geprüft, ob sich ein Zusammenhang zwischen der Lungenfunktion und den Wirkstoffspiegeln im Plasma der Probanden zeigte [145]. Nach inhalativer Einzelgabe von 1000 µg Fluticasonpropionat (FP) zeigte sich bei Patienten mit einer besseren Lungenfunktion, die an Hand der Einsekundenkapazität (FEV<sub>1</sub>) gemessen wurde, eine 1,4-fach größere AUC für das FP im Vergleich zu Patienten mit schlechterer Lungenfunktion. Der Verlauf des Plasmaspiegels wurde nach der Applikation über acht Stunden hinweg verfolgt und ist in *Diagramm 5 B* dargestellt.



**Diagramm 5:** Plasmaspiegelkurven von Fluticasonpropionat (FP) – Vergleich der Diffusion bei Verwendung des kontinuierlichen Dialysemodells (KD) mit dem Plasmaspiegel nach Inhalation von FP bei einer Humanstudie.

A: Zeitlicher Verlauf des Übergangs von FP von humanem Lungengewebe in humanes Plasma bei 37 °C über vier Stunden bei Verwendung des KD, entspricht der weinroten Kurve aus *Diagramm 4*. [Mittelwert ± mittlere Abweichung vom Mittelwert, n = 3]

B: FP-Plasmaspiegel nach Inhalation in einer Humanstudie von Mortimer *et al.* mit 30 Probanden [145] [Mittelwert ± SE]; Copyright (2006) Wiley. Mit freundlicher Genehmigung von Kevin J. Mortimer, Plasma concentrations of inhaled corticosteroids in relation to airflow obstruction in asthma, *British Journal of Clinical Pharmacology*, John Wiley and Sons.

Die Ergebnisse der KD wurden denen der Humanstudie von Mortimer *et al.* direkt gegenüber gestellt (siehe *Diagramm 5*). Dabei entspricht die linke Abbildung (*Diagramm 5 A*, KD) der in *Diagramm 4* dargestellten weinroten Kurve der kontinuierlichen Dialyse, in diesem Fall mit einer Einteilung der Zeitskala in Stunden, damit ein besserer Vergleich mit dem rechten Diagramm (*Diagramm 5 B*, Humanstudie) möglich ist. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Diffusion von FP von humanem Lungengewebe in humanes Plasma bei Verwendung der kontinuierlichen

Dialyse. Die rechte Abbildung zeigt den Plasmaspiegelverlauf von FP über acht Stunden hinweg, nachdem dreißig Asthmapatienten inhalativ 1000 µg des Glucocorticoids verabreicht worden waren. Der sehr ähnliche Verlauf der beiden Kurven A und B fällt sofort ins Auge. Die Zeit, zu der die Maximalkonzentration gemessen wurde, lag beim Dialysemodell bei 0,5 Stunden (siehe D2.3 - *Tabellarischer Anhang*) und somit etwas früher als bei der Humanstudie. Hier wurde  $t_{\max}$  bei 0,9 Stunden erreicht [145]. Ein Grund für das spätere  $t_{\max}$  in der Studie von Mortimer *et al.* könnte sein, dass die verabreichten FP-Partikel erst im epithelialen Flüssigkeitsfilm der Lunge in Lösung gehen mussten, bevor sie pulmonal absorbiert werden konnten. In den Dialyseexperimenten hingegen wurde der Wirkstoff bereits in gelöster Form auf das Lungenhomogenat aufgetragen (siehe 2.2.2).

Das Absinken der Plasmaspiegelkurve vom Maximalwert auf etwa die Hälfte ging bei der KD ebenfalls in etwas kürzerer Zeit vonstatten, so sank der FP-Spiegel innerhalb von 3,5 Stunden von 100 ng/mL auf 50 ng/mL ab (siehe D2.3 – *Tabellarischer Anhang*). In der Studie von Mortimer *et al.* wurde eine terminale Halbwertszeit von 5,7 Stunden für FP angegeben [145]. Wenngleich bei der kontinuierlichen Dialyse  $c_{\max}$  etwas früher erreicht und eine kürzere Halbwertszeit für das FP bestimmt wurde, so bewegen sich diese pharmakokinetischen Parameter dennoch in einem gut vergleichbaren Rahmen und es ergeben sich von der Kurvenform her sehr ähnlich verlaufende Diagramme. Dies unterstreicht – mit Berücksichtigung, dass das Dialysemodell als eine Nachahmung der Verhältnisse *in-vivo* die Realität nie in Gänze widerspiegeln können - das Potenzial des kontinuierlichen Dialysemodells als Vorhersageinstrument mit guter Annäherung an physiologische Verhältnisse.

Ein Aspekt zwischen beiden Szenarien, der große Unterschiede zeigt, ist der jeweils festgestellte Konzentrationsbereich: Bei der kontinuierlichen Dialyse wurde nach Applikation einer Dosis von 200 µg FP eine Spitzenkonzentration im Akzeptorkompartiment von 100 ng/mL ( $c_{\max}$ ) erreicht. In der Humanstudie dagegen wurde eine Dosis von 1000 µg des Glucocorticoids inhaliert und ein maximaler Plasmaspiegel von 0,09 ng/mL gemessen [145]. Es findet also bei der Dialyse eine verhältnismäßig viel größere Umverteilung des FP vom Lungengewebe in das Plasmakompartiment statt als *in-vivo*, das Ausmaß ist erwartungsgemäß nicht ansatzweise übertragbar. Eine Forschergruppe um Möllmann *et al.* untersuchte die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik nach Inhalation zweier verschiedener Dosen FP aus einem Pulverinhalator bei 14 gesunden Probanden nach einer Einzelgabe und im Steady-State Zustand und verglich die Daten mit Ergebnissen, die nach Anwendung von Budesonid am gleichen Probandenkollektiv zustande kamen [136]. Nach einer Einzeldosis von 200 µg FP wurde nach 90 Minuten eine Maximalkonzentration von 0,037 ng/mL im Serum erreicht, wobei für  $t_{\max}$  ein

sehr variabler Bereich von 20 bis 120 Minuten angegeben wurde. Die Halbwertszeit betrug 5,1 Stunden. Nach Verabreichung von 500 µg FP wurde ebenfalls ein  $t_{\max}$  von 90 Minuten (Bereich von 30 bis 120 min) bestimmt,  $c_{\max}$  betrug 0,094 ng/mL und  $t_{1/2}$  10,1 Stunden [136]. Die gemessenen Konzentrationen liegen im Bereich derer bei Mortimer *et al.*. Wurde bei den Asthmatikern nach Inhalation von 1000 µg FP eine Maximalkonzentration von 0,09 ng/mL festgestellt, so reichten bei der Studie von Möllmann *et al.* 500 µg des Wirkstoffes aus, um ein  $c_{\max}$  von 0,094 ng/mL hervorzurufen.

Das Phänomen, dass bei Patienten mit einer Obstruktion der Atemwege der inhalede Arzneistoff zu einem geringeren Ausmaß in die systemische Zirkulation umverteilt wird als bei gesunden Probanden bzw. Patienten mit nicht so starker Einschränkung der Lungenfunktion, wurde jedoch schon vielfach gezeigt [125, 145-147]. Als mögliche Ursache wurde diskutiert, dass eine Bronchokonstriktion zu einer verstärkten Deposition des inhalierten Arzneistoffes in einer zentraleren Region der Atemwege führen könnte, was wiederum mit einer höheren mukoziliären Clearance verbunden wurde [147, 148]. Dieser Faktor ist gerade für die systemische Verfügbarkeit von inhaliertem FP entscheidend, da FP sich auf Grund seiner hohen Lipophilie nur langsam im Flüssigkeitsfilm der Atemwege löst und dementsprechend dieser Art der Clearance in verstärktem Maße zugänglich ist. Hinzu kommt die geringe orale Bioverfügbarkeit des FP, die dazu führt, dass nach einem Verschlucken im Anschluss zur mukoziliären Clearance nur wenig in die systemische Zirkulation gelangt [147, 149].

In Anbetracht der verschiedenen Verhältnisse in Bezug auf Größe und Komplexität der beiden Systeme Dialysekammer und Mensch ist der beobachtete große Unterschied im Ausmaß der Umverteilung des FP in das Akzeptorkompartiment bzw. die systemische Zirkulation nicht verwunderlich. Spielen *in-vivo* beim Menschen zahlreiche Vorgänge wie beispielsweise die Freisetzung der Substanz aus ihrer Formulierung, Ausmaß und Lokalisation der Dosisdeposition, mukoziliäre Clearance, Verteilungsvolumen und Metabolisierungsvorgänge bei der Bestimmung der Pharmakokinetik des Arzneistoffes eine Rolle, so besteht die Eliminationsphase beim Dialysemodell lediglich darin, dass Wirkstoff aus dem Akzeptorkompartiment abtransportiert wird und dies in stärkerem Ausmaß als Arzneistoff aus dem Lungenhomogenat nachdiffundieren kann. Die Absorptionsphase bei den vorliegenden Experimenten mit dem KD wurde durch die Diffusion von FP vom Donorkompartiment in das Plasma bestimmt, es mussten dabei keinerlei Faktoren wie die tatsächlich deponierte Dosis oder die Auflösungsgeschwindigkeit von Wirkstoffkristallen berücksichtigt werden, da der Wirkstoff in gelöster Form direkt auf das Lungenhomogenat appliziert wurde. Diese Umstände wurden deutlich sichtbar im kleineren  $t_{\max}$ -Wert der KD-Experimente im direkten Vergleich zur

Humanstudie von Mortimer *et al.* [145]. Erhalten bleibt jedoch die gute Vergleichbarkeit des Konzentrationsverlaufes über die Zeit betrachtet und somit der Beleg, dass mit der Erzeugung einer Eliminationsphase durch die KD eine Annäherung an die Verhältnisse der Realität erreicht werden konnte.

Schließlich gilt auch zu beachten, dass die gesamte pulmonale Absorption sich zusammensetzt aus dem Anteil, der über das Lungenepithel absorbiert wird und dem Anteil, der über das Epithel der Alveolen absorbiert wird. Beide unterscheiden sich strukturell [133]. Zudem wurde in den Dialyseexperimenten ein Homogenat aus Lungengewebe verwendet, was mit einer weitgehenden Zerstörung von Organ- und Zellstrukturen verbunden ist. Die Kinetik pulmonal applizierter Wirkstoffe *in-vivo* wird sich schon aus diesem Grund deutlich von der hier untersuchten unterscheiden. Auch müssen immense Unterschiede zwischen dem Modell und der humanen Lunge in der Größe der Austauschoberfläche und der Diffusionsstrecken beachtet werden.

Dennoch leistet das Dialysemodell, basierend auf den Feststellungen, dass mit dem kontinuierlichen Dialysemodell ein *in-vitro*-Modell an physiologische Verhältnisse angenähert wurde, einen wichtigen Beitrag zur Vorhersage und Erfassung des sehr komplexen Themas der Absorption von Wirkstoffen nach inhalativer Anwendung. Die Ähnlichkeit der Plasmaspiegelverläufe bei Verwendung des Modells und bei einer Humanstudie (siehe *Diagramm 5*) lässt dieses Modell attraktiv erscheinen als aussagekräftiges Vorhersageinstrument der Absorptionsvorgänge inhalativ angewendeter Wirkstoffe *in-vivo*, das sich dabei noch durch eine einfache experimentelle Handhabung und die Möglichkeit einer hohen Durchsatzrate durchgeführter Experimente auszeichnet.

### **3 Bestimmung der Diffusionskinetik von Fenoterolhydrobromid und Ipratropiumbromid nach Freisetzung aus dem Dosieraerosol Berodual® N bei Anwendung des kontinuierlichen Dialysemodells**

#### **3.1 Hintergrund**

Die generelle Eignung des kontinuierlichen Dialysemodells (KD) als Vorhersageinstrument zur Abschätzung von Absorptionsvorgängen inhalativ angewandter Arzneistoffe mit einer Annäherung an physiologische Verhältnisse wurde im vorangegangenen *Kapitel 2* im Rahmen der Etablierung der KD beim Vergleich der Diffusionskinetik des Glucocorticoids Fluticasonpropionat mit der statischen und der kontinuierlichen Dialyse deutlich.

In den vorliegenden Versuchen sollte am Anwendungsbeispiel des Dosieraerosols Berodual® N vergleichend die Diffusion der beiden Wirkstoffe Fenoterol (FE) und Ipratropiumbromid (IB) unter Verwendung der KD untersucht werden. Ein Sprühstoß des Aerosols enthält 20 µg des Anticholinergikums Ipratropiumbromid und 50 µg des kurzwirksamen  $\beta_2$ -Sympathomimetikums Fenoterol-HBr. Mit zwei bronchodilatatorischen Inhaltsstoffen ist Berodual® N indiziert zur Verhütung und Behandlung von Atemnot bei chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen und wird beispielsweise eingesetzt bei Asthma bronchiale oder chronisch obstruktiver Bronchitis. Auf Grund der raschen bronchienerweiternden Wirkung wird es auch zur Vorbereitung einer Aerosoltherapie mit Glucocorticoiden oder Antibiotika eingesetzt.

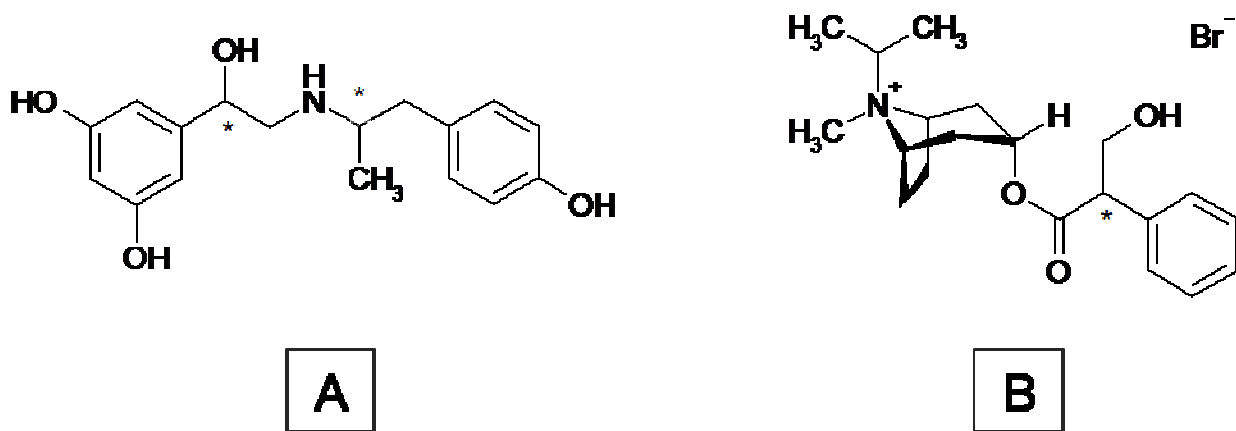
Im Gegensatz zu den Experimenten der Etablierung der KD (*Kapitel 2*) wurde der Wirkstoff in den vorliegenden Versuchen nicht in gelöster Form direkt mit einer Mikroliterpipette (siehe *C1.2.2.3*, *C2.2.1.2*, *C2.2.3.2 – Experimenteller Teil*) auf das Lungenhomogenat aufgetragen, sondern in der anwendungsbereiten Formulierung eines handelsüblichen Dosieraerosols, wie sie auch von Patienten eingesetzt wird (siehe *C3.2.2 – Experimenteller Teil*). Beim eingesetzten Fertigarzneimittel Berodual® N handelt es sich um ein Lösungsaerosol, das über Druckgas aus der Kartusche die beiden Wirkstoffe FE und IB freisetzt.

#### **3.2 Pharmakologische Eigenschaften von Fenoterol und Ipratropiumbromid**

Berodual® N spricht durch die Kombination zweier Wirkstoffe aus unterschiedlichen Substanzgruppen zwei verschiedene pharmakologische Angriffspunkte für die

Bronchienerweiterung an und ermöglicht dadurch eine gesteigerte additive Wirkung gegen die Konstriktion der Atemwege bei gleichzeitiger Minimierung von Nebenwirkungen, die durch eine höhere Dosis der Einzelwirkstoffe hervorgerufen werden könnten.

Fenoterolhydrobromid (siehe *Abbildung 11 A*) ist ein Arzneistoff aus der Gruppe der kurzwirksamen  $\beta_2$ -Sympathomimetika. Es bewirkt eine Relaxation der glatten Muskulatur von Gefäßen und Bronchien und die Freisetzung von bronchokonstriktorischen und entzündungsfördernden Botenstoffen aus Mastzellen wird verhindert. Förderlich für die bronchodilatatorische Wirkung ist auch eine durch FE gesteigerte mukoziliäre Clearance [150].



**Abbildung 11:** Strukturformeln von A: Fenoterol (FE, freie Base) und B: Ipratropiumbromid (IB).

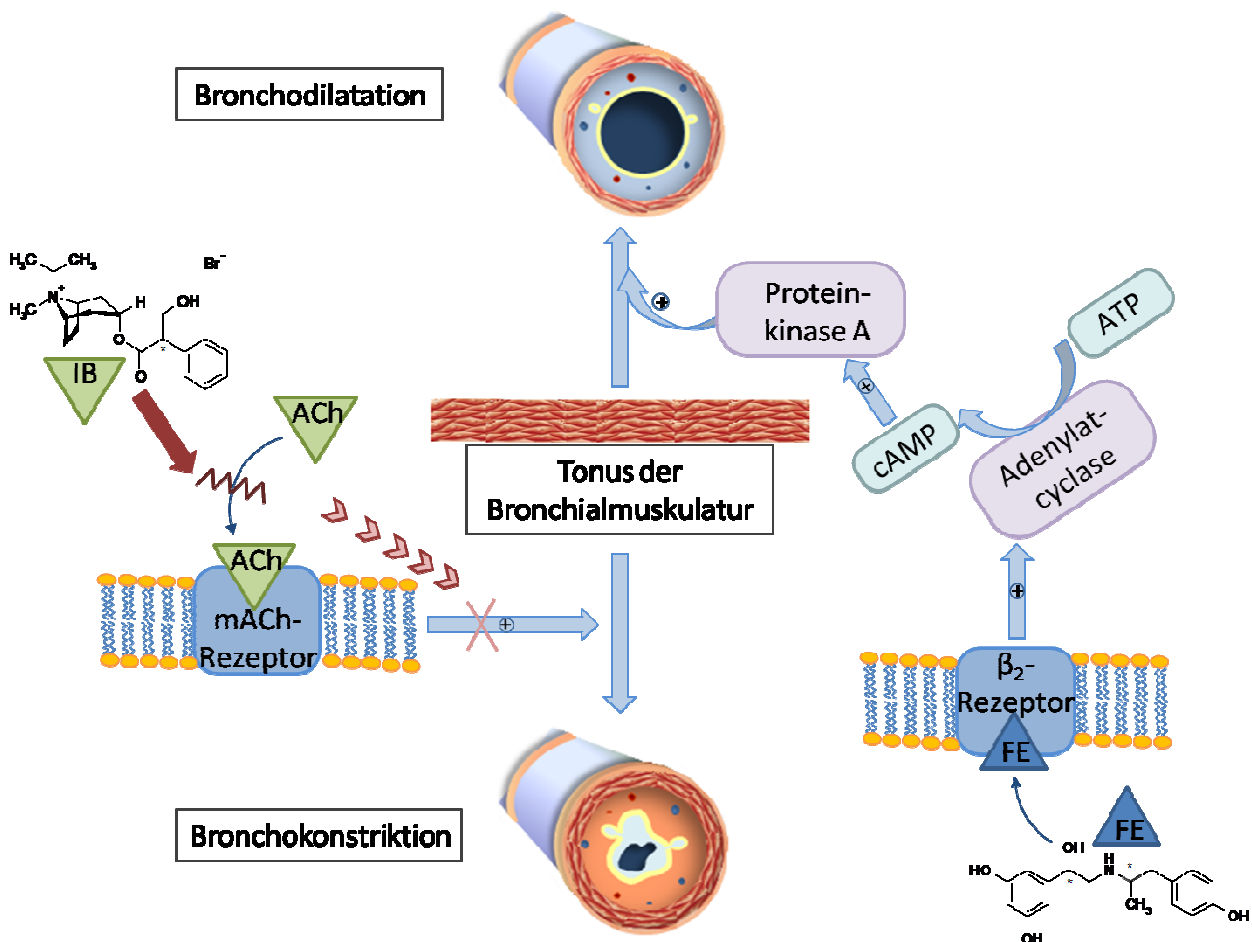
A:  $M_r$  (FE) = 303,35 g/mol; Summenformel (FE) =  $C_{17}H_{21}NO_4$  [151]

B:  $M_r$  (IB) = 412,36 g/mol; Summenformel (IB) =  $C_{20}H_{30}BrNO_3$  [152]

\* markieren die Stereozentren

$\beta_2$ -Adrenozeptoren kommen in einer großen Zahl von 30 000 bis 40 000 pro Zelle in den glatten Muskelzellen der Atemwege vor, aber auch in Epithel- und Endothelzellen der Lunge, in Typ II Zellen und Mastzellen und gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Die Dichte der Rezeptoren ist dabei in den zentralen Bereichen der Lunge und in den Alveolen besonders hoch [153, 154]. Auf molekularer Ebene wird nach Besetzung von  $\beta_2$ -Adrenozeptoren durch ein  $\beta_2$ -Sympathomimetikum über ein  $G_s$ -Protein die Adenylatcyclase aktiviert [155]. Es kommt in der Folge zu einem Anstieg des intrazellulären cyclischen Adenosinmonophosphat- (cAMP) Gehaltes und zu einer Aktivierung der Proteinkinase A (siehe *Abbildung 12*), die Tonus-regulierende Zielproteine in den glatten Muskelzellen phosphoryliert und letztlich eine Erschlaffung der Bronchialmuskulatur herbeiführt [154]. Aus der Zunahme des cAMP resultiert außerdem eine Abnahme der zytosolischen

Calcium-Konzentration, was ebenfalls zu einer Hemmung der kontraktile Elemente in der glatten Muskulatur führt [154].  $\beta_2$ -Sympathomimetika weisen zudem einen antiallergischen Effekt auf, da sie die Freisetzung von bronchokonstriktorisch wirksamen Mediatoren wie Histamin und neutrophilen chemotaktischen Faktor (NCF) aus Mastzellen hemmen [156, 157].



**Abbildung 12:** Angriffspunkte des  $\beta_2$ -Sympathomimetikums Fenoterol (FE) und des Anticholinergikums Ipratropiumbromid (IB) zur Regulierung des Tonus der Bronchialmuskulatur.

Linke Seite der Abbildung: IB konkurriert mit Acetylcholin (ACh) um die Bindungsstelle am muskarinergen Acetylcholinrezeptor (mACh-Rezeptor) und verhindert somit die Stimulation cholinergischer Nerven durch den Neurotransmitter. Eine Tonuserhöhung der glatten Bronchialmuskulatur und eine daraus resultierende Bronchokonstriktion werden auf diese Weise verhindert.

Rechte Seite der Abbildung: Das kurzwirksame  $\beta_2$ -Sympathomimetikum FE besetzt einen  $\beta_2$ -Adrenozeptor. Es kommt zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase und in der Folge zu einer vermehrten Umwandlung von Adenosin-5'-triphosphat (ATP) in cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), verbunden mit einer Aktivierung der Proteinkinase A, die durch Phosphorylierung Tonus-regulierender Zielproteine eine Relaxation der glatten Bronchialmuskulatur bewirkt.



Das Atropinderivat Ipratropiumbromid (siehe *Abbildung 11 B*) ist eine quartäre Ammoniumverbindung und antagonisiert als Vertreter der kurzwirksamen Parasympatholytika die Wirkung von Acetylcholin, wodurch es vom Vagusnerv vermittelte Reflexe hemmt. Quartäre Amine und somit elektrisch geladene Teilchen bieten die Vorteile, dass sie kaum vom Gastrointestinaltrakt absorbiert werden, nicht die Blut-Hirn-Schranke passieren und nur in geringem Ausmaß in die systemische Zirkulation übergehen, zudem aber eine längere Wirkungsdauer haben als das tertiäre Amin Atropin [158, 159]. Durch die geringe systemische Verfügbarkeit können nach Inhalation anticholinerge systemische Nebenwirkungen wie zum Beispiel Mundtrockenheit, Glaukom oder Harnverhalt umgangen werden [160-162]. Die Innervation der menschlichen Lunge setzt sich aus cholinergen, adrenergen, nicht-cholinergen und nicht-adrenergen Komponenten zusammen [163, 164]. Der Parasympathikus ist der Hauptverantwortliche für die Regulation des Bronchialtonus [165]. Die Stimulation cholinergischer Nerven führt zu einer Bronchokonstriktion durch Kontraktion glatter Muskelzellen, zur Mukussekretion und Vasodilatation in den Bronchien [166]; dabei ist Acetylcholin (ACh) in den Atemwegen der wichtigste Neurotransmitter des parasympathischen Systems (siehe *Abbildung 12*). Nicotinische und muskarinische Acetylcholinrezeptoren in der Lunge fungieren als Mediatoren [167], wobei in diesem Organ die drei Subtypen M1, M2 und M3 der Muskarinrezeptoren vorkommen [168]. Die Stimulation von M1 und M3 führt zur parasympathikus-vermittelten Bronchokonstriktion, während eine Besetzung der M2 Rezeptoren, die sich postganglionär an den Nerven befinden, nach dem Prinzip der negativen Rückkopplung zu einer Hemmung der ACh-Freisetzung führt und somit vor einer parasympathikus-vermittelten Bronchokonstriktion schützt [167, 169, 170]. IB inhibiert alle drei Subtypen, wohingegen die weiterentwickelte Substanz Tiotropiumbromid länger an den M1 und M3 Rezeptoren verweilt (14,6 und 34 Stunden) und nach ca. 4 Stunden vom M2 Rezeptor dissoziiert. Tiotropiumbromid kommt folglich näher an ein optimiertes Anticholinergikum heran, das selektiv M1 und M3 Rezeptoren antagonisiert und nur geringe Affinität zum M2 Rezeptor besitzt [158, 165, 171].

Im Rahmen einer Entzündung der Atemwege weist der Parasympathikus eine erhöhte Aktivität auf, es kommt zu einer gesteigerten Expression und Funktion von Neurotransmittern, zu einer übermäßigen Freisetzung von neuronalem ACh und letztlich zu einer Erhöhung des Tonus der glatten Muskulatur der Atemwege. Auf diesem Geschehen basiert der Einsatz einer anticholinergen Therapie bei Asthma oder COPD [172, 173]. Der Reaktionsweg nach Aktivierung der muskarinergen Acetylcholinrezeptoren M1 und M3, der die Kontraktion der glatten Muskeln über die intrazelluläre Calcium-Konzentration steuert [174, 175], wird mit Hilfe

eines G-Proteins in Gang gesetzt. Nach Inaktivierung der Adenylatcyclase, Aktivierung der membranständigen Phospholipase C (PLC) und über den Weg des Phosphoinositol-Systems resultiert die Phosphorylierung von Zielproteinen, eine Öffnung von Kaliumkanälen, die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern und in Folge dessen eine Bronchokonstriktion durch Kontraktion der glatten Muskelzellen [101]. Diese Mechanismen können von anticholinerg wirkenden Substanzen unterbunden werden (siehe *Abbildung 12*).

Lokal nach Inhalation kommt es zur Competition des Anticholinergikums mit Acetylcholin um den G-Protein-gekoppelten muscarinischen Rezeptor der glatten Muskelzelle. Die typischerweise nach Bindung von ACh an den Rezeptor auftretende Informationskaskade im Zielgewebe wird durch das Anticholinergikum verhindert, es kommt somit zu einer Abnahme der intrazellulären Konzentration von cyclischem Guanosin Monophosphat und zu einer Verhinderung der tonisch-cholinergen Aktivität [176]. Die sich daraus ergebende Bronchodilatation ist ein vorwiegend lokaler Effekt am Zielort mit Konzentration auf die großen und zentral gelegenen Atemwege [158, 177].

Das Dosieraerosol Berodual<sup>®</sup> N kann somit durch die Kombination der anticholinergen und  $\beta_2$ -agonistischen Wirkungsweise für manche Patienten einen zusätzlichen Nutzen im Vergleich zur Monotherapie mit den Einzelsubstanzen bringen, da jeder der beiden Arzneistoffe Fenoterol und Ipratropiumbromid durch einen anderen Mechanismus zur Minderung der Bronchokonstriktion beiträgt [178-180].

### 3.3 Prinzip der Bestimmung

#### 3.3.1 Tatsächlich applizierte Dosis

Bei Anwendung eines Dosieraerosols (DA) stellt die Applikation der Dosis im Rahmen eines Dialyseversuches eine Herausforderung dar, da der freigesetzte Sprühstoß als diffuser wirkstoffhaltiger Nebel möglichst quantitativ das Lungenhomogenat erreichen soll. Daher wurde eine Applikationshilfe verwendet, die sich wie folgt zusammensetzt: ein Glaszylinder, der mit Hilfe eines Kunststoffringes fest auf der unteren Kammerhälfte mit dem Lungengewebe positioniert wurde, wurde nach oben hin durch einen Teflondeckel abgedichtet, der eine passgenaue Öffnung für das Mundstück des DA besitzt (siehe *Abbildung 19, Kapitel C3.2.2 – Experimenteller Teil*). Das Prinzip der Applikationshilfe wurde bereits von Freiwald *et al.* eingesetzt [53], die apparative Vorrichtung wurde lediglich um die Komponenten des Teflondeckels und des Kunststoffringes erweitert. Bestand der ursprüngliche Deckel mit der

Öffnung für das Mundstück des DA aus einer Kunststoff-Petrischale, so wurde die neue Abdeckung aus Teflon gefertigt, um Adsorptionseffekte der Arzneistoffe zu minimieren. Der Kunststoffring wurde ergänzt, um dem System während der Dosisapplikation mehr Stabilität zu verleihen und ein Verrutschen des Glasrohrs während des Dosierungsvorganges praktisch auszuschließen. Diese stabilisierende Komponente wurde von der institutseigenen Werkstatt so gefertigt, dass sie gleichzeitig die untere Kammerhälfte mit dem Homogenat und das zylindrische Glasrohr fest umschloss. Das Material war bei diesem Ring nicht ausschlaggebend für etwaige Adsorptionseffekte, da er sich an der Außenseite der Apparatur befand und somit nicht mit dem applizierten Wirkstoff in Berührung kam oder mit ihm interagieren konnte. Nach dem Auslösen konnte das Aerosol dann gezielt auf das Lungengewebe absinken.

Da mit Adsorptionseffekten der Wirkstoffe an das Mundstück und den Glaszylinder zu rechnen war, musste bestimmt werden, welcher Anteil der vom Aerosol freigesetzten Dosis das Lungenhomogenat tatsächlich erreichen konnte. Hierzu wurde die untere Kammerhälfte mit Krebs-Ringer-HEPES-Puffer an Stelle von Lungenhomogenat befüllt, da bei gleicher Aussagekraft des Analyseergebnisses für die tatsächlich applizierte Dosis zum einen der Arzneistoffgehalt in der wässrigen Lösung mit weniger Aufwand bei der Probenaufarbeitung analysiert werden konnte als in einer Gewebesuspension und es zum anderen dadurch möglich war, Lungenhomogenat zu sparen, das in der Herstellung recht aufwändig war. Auf die Innenseite des Glasrohres und in das Kammerunterteil mit Krebs-Ringer-HEPES-Puffer wurde Salbutamol-Lösung als interner Standard gegeben (siehe C3.2.4 – *Experimenteller Teil*). Anschließend wurde analog zu einem regulären Dialyseversuch vorgegangen: Nach Aufsetzen der Applikationshilfe - bestehend aus Glaszylinder, Teflondeckel und Kunststoffring – auf die untere Kammerhälfte und Einsetzen des zuvor geschüttelten DA in die Apparatur wurden mit kurzer Unterbrechung zum erneuten Schütteln der Kartusche insgesamt fünf Sprühstöße mit dem Berodual<sup>®</sup> N DA in das Innere der Applikationshilfe und auf das Kammerunterteil abgegeben, entsprechend einer nominal applizierten Dosis von 250 µg Fenoterolhydrobromid und 100 µg Ipratropiumbromid. Zwei Minuten lang wurde abgewartet, bis sich der Sprühnebel absetzen konnte, dann folgte das Entfernen der Applikationshilfe von der unteren Kammerhälfte.

Zur Bestimmung des Dosisanteils, der das Lungenhomogenat, bzw. in diesem Fall den Puffer auf dem Kammerunterteil erreichen konnte, wurde der Inhalt der unteren Kammerhälfte - in Analogie zum Auffüllen mit Gewebesuspension im regulären Dialyseexperiment - mit Krebs-Ringer-HEPES-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 5 mL ergänzt, durchmischt und nach einer viertelstündigen Inkubation in einen Maßkolben überführt. Diese Lösung wurde mit der

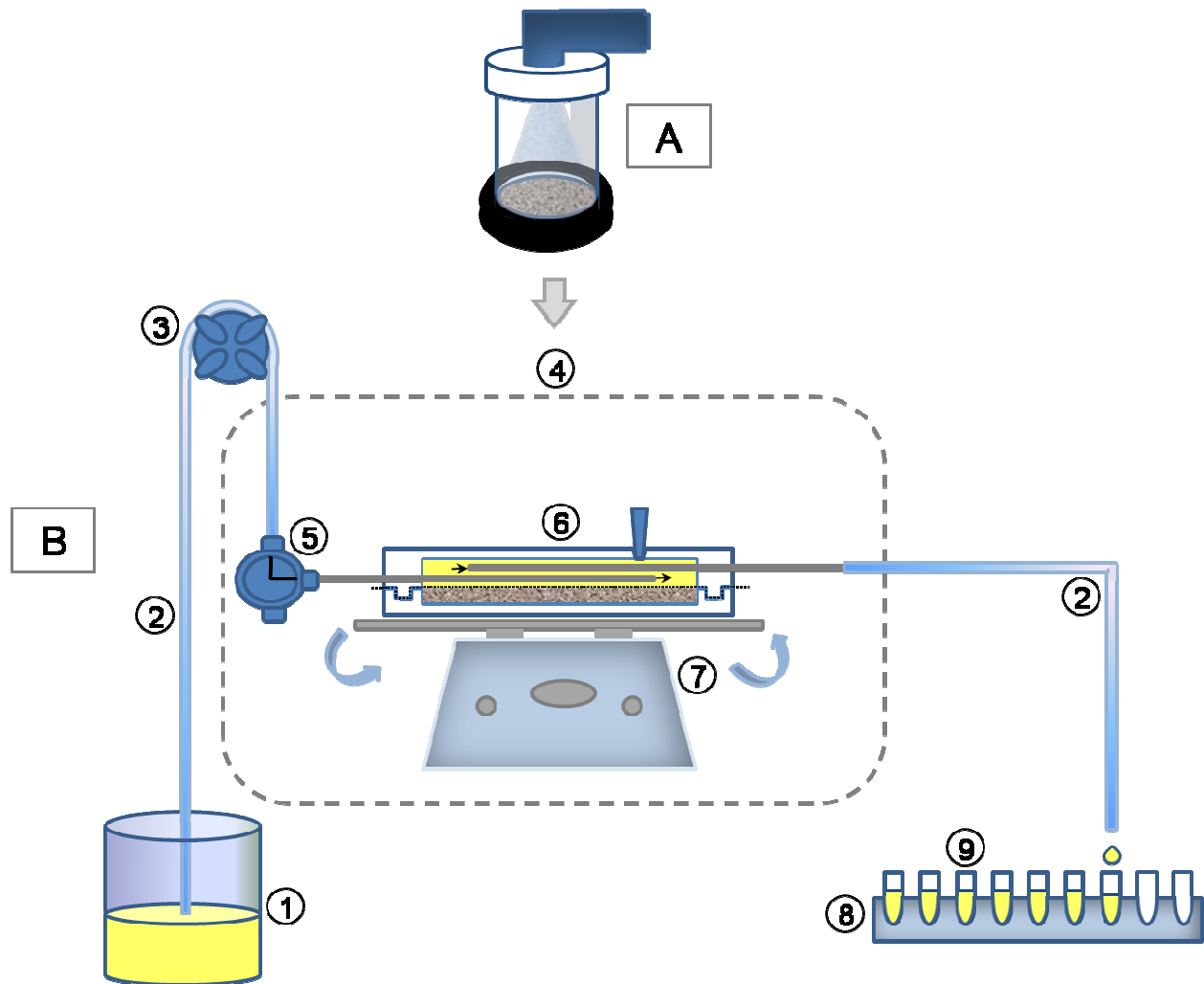
Spülflüssigkeit (Methanol) aus zwei Waschvorgängen des Kammerunterteils vereinigt und mit Millipore®-Wasser auf ein definiertes Endvolumen ergänzt (siehe C3.2.4 – *Experimenteller Teil*).

Da nach Auslösen des DA ein feiner Sprühnebel entstand, der sich zunächst raumfüllend im Inneren der Applikationshilfe verteilte bevor er auf das Kammerunterteil absank, war auch eine Adsorption von FE und IB an das Glas nicht auszuschließen. Die an die Innenwand des Glaszylinders adsorbierten Wirkstoffe wurden durch zweimaliges Auswaschen des Glasrohres mit Methanol und Millipore®-Wasser in einer Schale aufgefangen und die Spülflüssigkeit mit Millipore®-Wasser auf ein definiertes Endvolumen ergänzt (siehe C3.2.4 – *Experimenteller Teil*).

Zur Bestimmung des Dosisanteils, der im Mundstück zurückgehalten wurde, wurde zunächst interne Standardlösung Salbutamol an der Innenseite im Bereich der Austrittsöffnung des Sprühnebels verteilt. Nachdem diese getrocknet war, wurde die eben beschriebene Vorgehensweise bei den Versuchen zur Bestimmung des Dosisanteils auf dem Lungenhomogenat-Depot und am Glaszylinder wiederholt (siehe C3.2.4 - *Experimenteller Teil*). Der im Mundstück retenierte Anteil der Dosis wurde in einem separaten Versuch bestimmt, da im Zuge eines Sprühstoßes ein Mitreißen des internen Standards Salbutamol, der vor Auslösen des DA im Innenbereich des Mundstückes verteilt worden war, und somit eine unkontrollierte Verteilung von internem Standard auf Kammerunterteil und Glaszylinder möglich schien, was zu einer Verfälschung der Analyseergebnisse geführt hätte. Dementsprechend wurde im vorliegenden Experiment nur der an das Mundstück adsorbierte Wirkstoffanteil untersucht und die Befüllung des Kammerunterteils mit Puffer entfiel. An die Wartezeit nach dem letzten Sprühstoß schloss sich das Auswaschen des Mundstückes erst mit Methanol, dann mit Millipore®-Wasser an. Nach adäquater Verdünnung dieser drei Lösungen (siehe C3.2.4 - *Experimenteller Teil*) erfolgte die Analyse des Wirkstoffgehaltes mittels LC-MS/MS (siehe C3.3.2– *Experimenteller Teil*).

### **3.3.2 Durchführung der Dialyseversuche**

Bei den Dialyseexperimenten zur Diffusionskinetik von FE und IB nach Freisetzung aus dem Dosieraerosol Berodual® N wurde die Apparatur für die kontinuierliche Dialyse (KD) eingesetzt (siehe *Abbildung 13*), die auch bei den Versuchen in *Kapitel 2* zur Etablierung der KD mit Fluticasonpropionat verwendet wurde (siehe *Abbildung 17 und Abbildung 18, C2.1.4 – Experimenteller Teil*).



**Abbildung 13:** Ablauf eines Experimentes mit dem kontinuierlichen Dialysemodell nach Anwendung des Berodual<sup>®</sup> N Dosieraerosols.

A: Applikation der Dosis durch Auslösen des Dosieraerosols mit Einsatz einer Applikationshilfe.

B: Diffusion von Fenoterol und Ipratropiumbromid, wobei die Dialyseflüssigkeit (Plasma) aus dem ① Reservoir über eine ② Schlauchleitung von der ③ Pumpe über das permanent geöffnete ⑤ Ventil in das Akzeptorkompartiment der ⑥ Dialysekammer gefördert wird. Nach Passage der Dialysekammer wird das Dialysat zum ⑧ Fraktionensammler geleitet und in ⑨ Eppendorfgefäßen aufgefangen. Die Dialyseapparatur lagert während des Experimentes bei 37 °C im ④ Wärmeschrank und wird durch einen ⑦ Wippschüttler konstant geschwenkt.

Anders als bei den bisherigen Dialyseversuchen mit Cyclosporin A und Fluticasonpropionat wurde das Lungengewebe für Versuche mit Berodual<sup>®</sup> N mit einem Skalpell in kleine Stücke mit einer Kantenlänge von ca. 1 mm geschnitten und nicht zerschlagen oder mit dem Ultra-Turrax homogenisiert (siehe C3.1.3.2 – Experimenteller Teil). Auf diese Weise konnte die Integrität des Zielgewebes etwas besser erhalten werden, vor allem in Hinblick auf die  $\beta_2$ -Adrenozeptoren, die vermehrt in den glatten Muskelzellen der Atemwege vorkommen, aber auch in Epithel- und

Endothelzellen der Lunge und in Typ II Zellen der Alveolen [154]. Das Anbieten geeigneter Zielstrukturen im Donorkompartiment ist wichtig, um die Diffusionsbedingungen so realistisch wie möglich zu gestalten.

Vor Versuchsbeginn wurden die Membran, das Lungenhomogenat, die Dialyseflüssigkeit und die Dialysekammer bei 37 °C vortemperiert (siehe *C3.2.1 - Experimenteller Teil*). In insgesamt drei unabhängigen Dialyseversuchen wurde mit einer Applikationshilfe (siehe *Abbildung 19, C3.2.2 – Experimenteller Teil*) jeweils eine nominale Dosis von 100 µg IB und 250 µg FE-HBr durch Betätigen des Dosieraerosols auf das Lungenhomogenat in der unteren Dialysekammerhälfte abgegeben (siehe *Abbildung 13 A*) und nach Sedimentation des Sprühnebels mit dem Gewebe vermischt (siehe *C3.2.2 – Experimenteller Teil*). Mit dazwischengeschalteter Membran wurde das KammerSystem bestehend aus Donorkompartiment mit wirkstoffhaltigem Lungenhomogenat und noch leerem Akzeptorkompartiment geschlossen und über das Ventil und die Einlass-Edelstahlkapillare der oberen Kammerhälfte mit der Pumpe und dem Reservoir, das auf einem Magnetrührer lagerte, verbunden. Die Auslass-Edelstahlkapillare wurde an den Fraktionensammler gekoppelt. Zur Befüllung der oberen Kammerhälfte mit Plasma als Dialyseflüssigkeit wurde die angeschlossene Pumpe eingesetzt und sobald dieser Vorgang abgeschlossen war, wurde durch den Fraktionensammler automatisch die Kollektion der ersten Fraktion initiiert (siehe *C3.2.2 – Experimenteller Teil*) und das Dialysat zur Untersuchung der Diffusion der beiden Arzneistoffe FE und IB von humanem Lungengewebe in Plasma wurde über vier Stunden hinweg gesammelt (siehe *C3.2.3 – Experimenteller Teil*). Dabei wurde das Plasma mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,38 mL/min beständig durch die Pumpe aus dem Reservoir gefördert und über die Einlass-Edelstahlkapillare in die obere Kammerhälfte gepumpt, wo es diffundierenden Arzneistoff aufnehmen konnte, bevor es das Akzeptorkompartiment der Kammer wieder über die Auslass-Edelstahlkapillare verließ und vom Fraktionensammler in Eppendorfgefäße geleitet wurde (siehe *C3.2.3 - Experimenteller Teil*). Während der Versuchsdauer sorgte ein Wippschüttler für eine konstante Mischbewegung des Kammerinhaltes und die Inkubation der Kammer bei 37 °C stellte Diffusionsbedingungen bei Körpertemperatur nach (siehe *Abbildung 13 B*). Die homogene Beschaffenheit der frisch aus dem Reservoir nachströmenden Dialyseflüssigkeit war gewährleistet, da das Plasma im Reservoir mit Hilfe eines Magnetrührers durchmischt wurde.

Von den insgesamt 80 Fraktionen mit einem Sammelintervall von jeweils drei Minuten und einem Volumen von je 1,14 mL wurden lediglich die Proben, deren Sammlung zu den Zeitpunkten 3, 6, 15, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 und 240 Minuten nach Beginn der

Inkubationszeit abgeschlossen worden war, auf ihren Gehalt an FE und IB hin untersucht. Die Auswahl der Proben für die Analyse erfolgte analog zu den vorangegangenen Versuchen mit Fluticasonpropionat (siehe C2.2.3.3 - *Experimenteller Teil*), da sie sich als geeignet für die Darstellung eines Diffusionsverlaufes bei Verwendung der kontinuierlichen Dialyse erwiesen hatte. Im Rahmen der Probenaufarbeitung für die Quantifizierung wurde jeder zu analysierenden Fraktion ein Volumen von 1000 µL entnommen und der weiteren Verarbeitung zugeführt (siehe C3.3.1.1 – *Experimenteller Teil*). Aus drei unabhängigen Dialyseexperimenten wurde in jeweils zwölf Proben mittels massenspektrometrischer Detektion nach Auftrennung der Wirkstoffe durch Flüssigchromatographie der Gehalt an FE und IB analysiert (siehe C3.3.2 – *Experimenteller Teil*).

### 3.4 Ergebnisse der Diffusionsversuche

#### 3.4.1 Resultierende tatsächlich applizierte Dosis

Obgleich es sich bei Berodual® N um ein Lösungsaerosol handelt und deshalb davon auszugehen ist, dass FE und IB bei Abgabe eines Sprühstoßes in gleichem Maße freigesetzt werden, wurden Unterschiede in der auf dem Homogenat deponierten Dosis festgestellt (siehe *Tabelle 3*).

**Tabelle 3:** Applizierte Dosis in Abhängigkeit vom Depositionsort.

Depositionsort	Prozent der Nominaldosis (%)	
	Fenoterol	Ipratropiumbromid
Mundstück	26 ± 0	18 ± 0
Glasrohr	32 ± 2	21 ± 3
Depot für das Lungenhomogenat	31* ± 5	37* ± 6

Mittelwert ± Mittlere Abweichung vom Mittelwert, n = 3 bzw. \*n = 4

Ein Sprühstoß des Berodual® N Dosieraerosols enthält 20 µg IB und 50 µg FE-HBr, dementsprechend betrug die nominal applizierte Dosis nach fünf Hüben 197 µg FE (freie Base) und 100 µg IB.

Zunächst fiel auf, dass im Verhältnis sechs Prozent mehr IB ( $37 \pm 6 \%$ ) die untere Kammerhälfte, die in den Dialyseexperimenten als Depot für das Lungenhomogenat diente, erreichten gegenüber dem zweiten Wirkstoff FE mit  $31 \pm 5 \%$  der Nominaldosis (siehe *D3.1.1* und *D3.1.2 - Tabellarischer Anhang*). Allerdings adsorbierte wesentlich mehr FE an die Glaswand der zylindrischen Applikationshilfe.  $32 \pm 2 \%$  der Nominaldosis FE wurden in der Waschflüssigkeit des Glasrohres wiedergefunden, dagegen nur  $21 \pm 3 \%$  der vom Aerosol abgegebenen Dosis IB. Im Falle des FE wurde außerdem mehr Arzneistoff im Mundstück zurückgehalten ( $26 \pm 0 \%$  FE vs.  $18 \pm 0 \%$  IB). Da FE und IB in den Experimenten zur tatsächlich applizierten Dosis in unterschiedlichem Ausmaß das Depot für das Lungenhomogenat erreichten, wurden die Ergebnisse der Diffusionsversuche im Folgenden (siehe *3.4.2*) als Prozent der applizierten Dosis ausgedrückt, wobei dem Donorkompartiment ein Volumen von 4,8 mL (siehe *C1.1.4 – Experimenteller Teil*) zugrundegelegt wurde.

### **3.4.2 Diffusion von Fenoterolhydrobromid und Ipratropiumbromid**

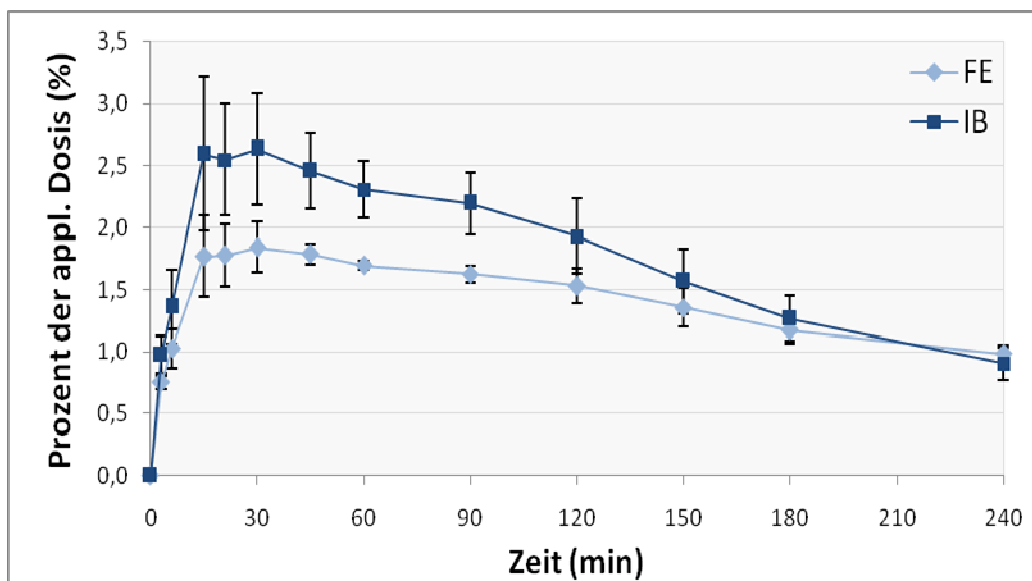
Nach Applikation von 250 µg Fenoterolhydrobromid (FE-HBr) und 100 µg Ipratropiumbromid (IB) mit dem Berodual® N Dosieraerosol verlief die Diffusion der beiden Wirkstoffe bei Anwendung des kontinuierlichen Dialysemodells (KD) sehr ähnlich (siehe *Diagramm 6*).

Insgesamt wurden mit dem Berodual® N Dosieraerosol drei Dialyseexperimente durchgeführt. Pro Versuch wurden innerhalb der vierstündigen Versuchsdauer zwölf Zeitpunkte ausgewählt und der Wirkstoffgehalt in den entsprechenden Dialysat-Proben mittels LC-MS/MS analysiert.

Bei Versuchsbeginn lagen die beiden Wirkstoffe mit dem Lungenhomogenat vermischt vor und diffundierten offensichtlich in gleichem Maße in das Akzeptorkompartiment, das Plasma. Die dunkel- (Ipratropiumbromid) und die hellblaue Kurve (Fenoterol) bzw. die jeweiligen Mittelabweichungen überlagern sich bis zum Zeitpunkt bei etwa 15 Minuten, es war somit in der Anfangsphase des Experimentes kein Unterschied in der Diffusion zwischen den beiden Arzneistoffen feststellbar. Nach dem initial raschen Anstieg der Wirkstoffkonzentration im Akzeptorkompartiment erreichten beide Substanzen bei 30 Minuten einen Maximalspiegel, FE mit  $1,84 \pm 0,21 \%$  der auf der unteren Kammerhälfte deponierten Dosis, IB mit  $2,64 \pm 0,45 \%$  (siehe *D3.2.1* und *D3.2.2 - Tabellarischer Anhang*). Im weiteren Verlauf zeigten sich bei FE im Zeitraum von 21 bis 90 Minuten etwas geringere Plasmaspiegel mit  $1,63 \pm 0,07 \%$  bis  $1,84 \pm$



0,21 % der Dosis im Vergleich zu IB mit  $2,20 \pm 0,25$  % bis  $2,64 \pm 0,45$  %. Die Plasmaspiegel beider Substanzen erreichten allerdings in dieser Zeit ein Plateau und fielen bis zum Versuchsende hin ab, wobei ab 120 Minuten wieder ein annähernd identischer Verlauf der Graphen und somit der Diffusion festzustellen ist. Die Kurve des FE scheint dabei tendenziell etwas langsamer abzuflachen, zu Versuchsende erreichte IB mit  $0,91 \pm 0,13$  % eine etwas geringere Konzentration als FE ( $0,99 \pm 0,07$  %), wobei der Plasmaspiegel des IB nach der anfangs gleich verlaufenden Phase stets oberhalb der FE-Kurve lokalisiert war. Für eine konkrete Aussage in dieser Hinsicht und um möglicherweise deutlichere Unterschiede im weiteren Verlauf der beiden Graphen zu zeigen, wäre allerdings eine längere Versuchsdauer nötig gewesen. Auch die in den Dialyseexperimenten bestimmten AUC-Werte der beiden Substanzen wiesen ähnliche Werte auf: IB zeigte mit  $425,5 \pm 55,2$  % der applizierten Dosis \* min eine nur geringfügig höhere AUC als FE mit  $340,0 \pm 24,1$  % der applizierten Dosis \* min (siehe D3.2.1 und D3.2.2 - Tabellarischer Anhang).



**Diagramm 6:** Diffusion von Fenoterol (FE) und Ipratropiumbromid (IB) von humanem Lungengewebe in humanes Plasma bei Verwendung der kontinuierlichen Dialyse.

Zeitlicher Verlauf des Übergangs von FE und IB von humanem Lungengewebe in humanes Plasma bei 37 °C, dargestellt als Prozent der applizierten Dosis. Die dunkelblaue Kurve zeigt den Konzentrationsverlauf des IB, die hellblaue Kurve dagegen den des FE. [Mittelwert  $\pm$  mittlere Abweichung vom Mittelwert, n = 3]

Wenn man die über vier Stunden hinweg verfolgten Konzentrationsverläufe von FE und IB betrachtet, kann von einem sehr ähnlichen Ausmaß der Diffusion der beiden Wirkstoffe

gesprochen werden. Sowohl bei FE als auch bei IB wurde in Folge des kontinuierlichen, durch die Pumpe erzeugten Stromes nach einem Anstieg des Arzneistoffgehaltes im Akzeptorkompartiment ein Plateau erreicht, gefolgt von einer Abnahme der Konzentration, da die Wirkstoffe beständig aus dem oberen Kompartiment entfernt wurden. Dabei überwog das Ausmaß der aus der oberen Kammer transportierten Substanzen gegenüber den nachdiffundierenden Wirkstoffmengen. Im Zuge der Verwendung des kontinuierlichen Dialysemodells konnte eine Eliminationsphase simuliert werden, gut zu erkennen durch das Absinken der Wirkstoffkonzentrationen im Plasma, und somit ein Konzentrationsverlauf der Wirkstoffspiegel nahe der Verhältnisse *in-vivo*.

### 3.5 Diskussion

Die beiden Substanzen Fenoterol und Ipratropiumbromid verhielten sich bei der Diffusion vom Lungenhomogenat in das Plasmakompartiment sehr ähnlich. So zeigte sich bei der Betrachtung der Wirkstoffspiegel nicht nur in Bezug auf die Verlaufsform der Kurven eine große Übereinstimmung, sondern auch was das Ausmaß der diffundierten Wirkstoffmenge - auf die jeweils applizierte Dosis bezogen - betraf. Durch die gleichzeitige Durchführung der Diffusion und durch die Nutzung ein und desselben Systems für beide Substanzen herrschten innerhalb eines Dialyseexperimentes identische Bedingungen für FE und IB, so dass ein direkter Vergleich möglich ist.

Die ähnliche Umverteilung von FE und IB entspricht auch dem ähnlichen Verteilungsvolumen der beiden Substanzen *in-vivo*. Nach intravenöser Gabe liegt das Verteilungsvolumen von FE bei 2,7 L/kg Körpergewicht und das von IB bei 2,4 L/kg. Da FE und IB sehr ähnliche Diffusionsprofile bei der kontinuierlichen Dialyse zeigten, konnte ihr Verhalten bezüglich des Verteilungsvolumens *in-vivo* im *ex-vivo*-Modell bestätigt werden.

Lediglich im Zeitraum von 21 bis 90 Minuten nach Inkubationsbeginn deutete sich ein etwas geringerer Übergang von FE in das Plasmakompartiment an. In diesem Zeitabschnitt ist die Plasmaspiegelkurve des FE von der des IB abgrenzbar (siehe *Diagramm 6*) und die hellblaue FE-Kurve liegt, wie in *Diagramm 6* zu erkennen, unterhalb der Konzentration des IB, wenngleich dies nur sehr geringe Unterschiede sind. Ein weiteres Indiz für die langsamere Diffusion von FE im beschriebenen Zeitraum ist, dass am Ende des Experimentes die FE-Konzentration tendenziell etwas anzusteigen schien im Vergleich zu IB. So wurde im Dialysat erstmals im Versuchsverlauf bei 240 Minuten ein höherer Gehalt des  $\beta_2$ -Sympathomimetikums festgestellt, wohingegen während der restlichen Zeit stets die Konzentration des

Anticholinergikums überwogen hatte – hierbei ist jeweils die Wirkstoffkonzentration als Prozent der applizierten Dosis zu betrachten. Als eine mögliche Erklärung für eine tendenziell langsamere Diffusion des FE kommen die physikochemischen Eigenschaften der beiden Wirkstoffe in Frage. Im Vergleich zum quartären Amin und damit ausgesprochen hydrophilen Ipratropiumbromid ( $\log P = 0,89$  [181]) stellt Fenoterol ( $\log P = 1,36$  [181]) die lipophilere der beiden Substanzen dar, was sich auch in den  $\log P$ -Werten (dekadischer Logarithmus des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten) der beiden Substanzen widerspiegelt.

In Kapitel 1 wurde bereits gezeigt, dass das Dialysemodell bestens dazu geeignet ist, Diffusionsunterschiede zwischen Substanzen zu demonstrieren, die auf einer unterschiedlichen Lipophilie der Wirkstoffformulierungen beruhen. Beim Vergleich einer liposomalen Formulierung von Cyclosporin A (L-CsA) und einer Lösung von Cyclosporin A in Propylenglykol (CsA-PG) zeigten sich signifikante Unterschiede in Ausmaß und Geschwindigkeit der Aufnahme von CsA in das Akzeptorkompartiment, wobei die Verweildauer im Lungengewebe bei L-CsA länger war als bei CsA-PG (siehe 1.4).

Für eine gesicherte Aussage in den vorliegenden Versuchen, ob tatsächlich die stärkere Lipophilie des FE im Gegensatz zum IB zu einer tendenziell etwas längeren Verweildauer des  $\beta_2$ -Sympathomimetikums im Lungenhomogenat gereicht, hätte die Diffusion über einen längeren Zeitraum fortgeführt werden müssen. In diesem Zusammenhang wäre auch der Vergleich der Diffusion von Substanzen, die sich stärker in ihren physikochemischen Eigenschaften unterscheiden, sinnvoll. Beispielsweise könnte man mit dem kontinuierlichen Dialysemodell vergleichende Untersuchungen zur Diffusion von kurz- und langwirksamen  $\beta_2$ -Agonisten wie Fenoterol versus Salmeterol oder von kurz- und langwirksamen Anticholinergika wie Ipratropiumbromid gegenüber Tiotropium durchführen. Da derartige Experimente aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht unternommen wurden, wurde in 3.5.3 eine Gegenüberstellung der Diffusionsergebnisse der beiden Wirkstoffe FE und IB und des Diffusionsverhaltens des wesentlich lipophileren FP angestellt, da diese Daten aus den Experimenten zur Etablierung des kontinuierlichen Dialysemodells bereits vorlagen.

### **3.5.1 Deposition von FE und IB bei den Dialyseversuchen**

Da es sich bei Berodual<sup>®</sup> N um ein Lösungsaerosol handelt und somit davon auszugehen ist, dass FE und IB in der Arzneistoffzubereitung gleichermaßen nebeneinander in gelöster Form vorliegen, war die Beobachtung, dass die beiden Wirkstoffe bei den Dialyseversuchen nach Freisetzung der Dosis aus dem DA in unterschiedlichem Ausmaß (ausgedrückt als % der Nominaldosis) das Depot für das Lungenhomogenat erreichten, unerwartet (siehe 3.4.1).

Über die Ursachen dieser Beobachtungen lässt sich spekulieren, da ein solch unterschiedliches Verhalten der in ein und derselben Lösung vorliegenden Wirkstoffmoleküle nicht eindeutig erklärbar scheint. Möglicherweise hatten die physikochemischen Eigenschaften der enthaltenen Wirkstoffe einen entscheidenden Einfluss auf das erzeugte Aerosol [182]. So scheint eine stärkere Wechselwirkung des lipophileren FE im Vergleich zu IB mit dem Kunststoff des Mundstückes und dem Glasmaterial der zylindrischen Applikationshilfe eine mögliche plausible Erklärung für das Depositionsverhalten der beiden Wirkstoffe zu sein.

Bei einem Lösungsaerosol bietet sich galenisch die Möglichkeit, einen Sprühnebel aus besonders kleinen Tröpfchen zu erzeugen. Dies ist prinzipiell für den Einsatz am Patienten eine erstrebenswerte Eigenschaft, da die Wirkstoffe weniger im oropharyngealen Bereich und vermehrt intrapulmonal deponiert werden können [183]. Auf diese Weise erreichen die Aerosolpartikel auch die peripheren Areale der Atemwege, wobei weder die Freisetzung der Dosis noch die Partikelgrößenverteilung vom Einatemstrom des Patienten abhängig sind und eine nicht optimale Koordination von Auslösen des Dosieraerosols und Inspiration beim entstehenden weichen Sprühnebel nicht so stark ins Gewicht fällt wie bei früheren treibgasbetriebenen DA [183].

Während das Lösungsaerosol mit der sehr feinen Partikelverteilung *in-vivo* einige Vorteile bringt, könnte diese Eigenschaft in den vorliegenden Dialyseexperimenten für eine effektive Dosisdeposition am „Wirkort“ Lungenhomogenat möglicherweise eher kontraproduktiv gewesen sein. Die feine, weiche Sprühwolke ging vermutlich nicht zielgerichtet auf das Homogenat nieder und bot ausreichend Zeit für eine Wechselwirkung zwischen FE und vorhandenen Oberflächen, zumal keinerlei Luftströmung innerhalb der Applikationshilfe stattfand, wie sie bei Anwendung *in-vivo* am Patienten durch den Einatemvorgang entsteht und die Aerosolpartikel zum Wirkort transportiert. Durch die Kontaktzeit zwischen dem feinverteilten Nebel und den Oberflächen der Applikationshilfe bei Abwesenheit von Luftströmungen während der Wartezeit nach Auslösen des DA und dem Entfernen der Applikationshilfe (zwei Minuten, siehe C3.2.4 – *Experimenteller Teil*) könnten die lipophilen Eigenschaften des FE zum Tragen gekommen sein und eine verstärkte Adsorption des  $\beta_2$ -Sympathomimetikums an die Elemente der Applikationsvorrichtung im Gegensatz zu IB bewirkt haben.

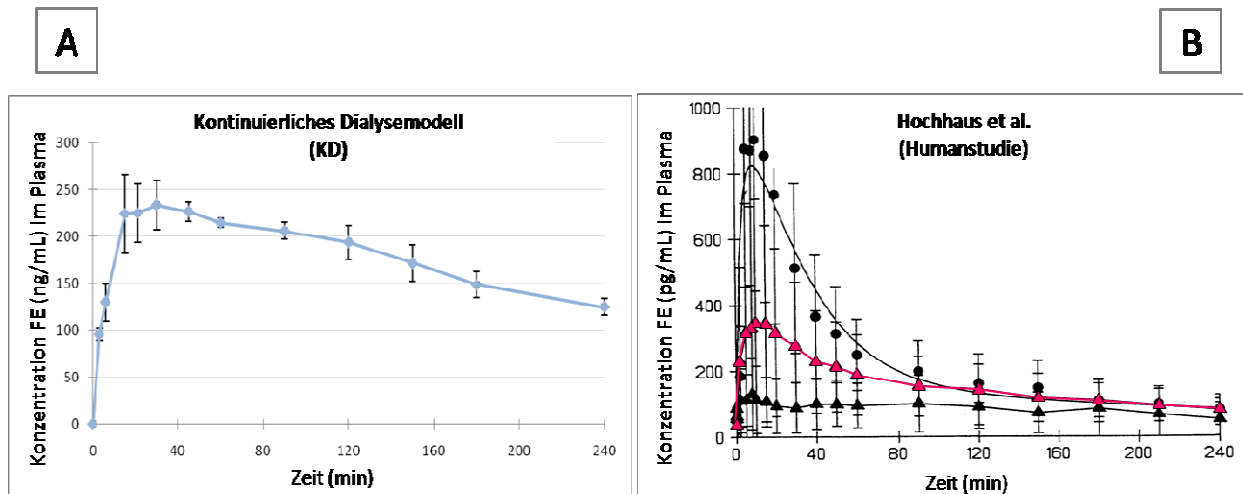
Bei Freiwald *et al.* zeigten sich in den Dialyseversuchen bei Einsatz der beiden Fertigarzneimittel Sanasthmax<sup>®</sup> und Ventolair<sup>®</sup> ebenfalls Unterschiede in der auf dem Lungenhomogenat deponierten Wirkstoffdosis, wobei in diesem Fall vor allem die ungleichen Partikelgrößen und die Ausbreitungsgeschwindigkeiten der Aerosole von Bedeutung waren [28, 53]. Hier wurde die geringere Arzneistoffdeposition bei Anwendung von Ventolair<sup>®</sup> ( $12,2 \pm$

0,4 % der Nominaldosis) darauf zurückgeführt, dass kleinere Partikel vorlagen und eine hohe Geschwindigkeit des erzeugten Aerosols zu vermehrtem Aufwirbeln und geringerem Sedimentieren der Wirkstoffpartikel führte, im Gegensatz zum Sanasthmax<sup>®</sup>, bei dem wegen der geringeren Ausbreitungsgeschwindigkeit des Aerosols und der größeren Partikel trotz äquivalenter Nominaldosen die zweieinhalbfache Menge BDP ( $30,6 \pm 3$  % der Nominaldosis) das Lungenhomogenat erreichte [52, 53].

In den vorliegenden Dialyseversuchen mit Berodual<sup>®</sup> N waren unterschiedliche Partikelgrößen und Ausbreitungsgeschwindigkeiten von FE und IB auszuschließen, da es sich um ein Lösungsaerosol handelt, in dem beide Wirkstoffe nebeneinander aus der Zubereitung vernebelt werden. Die Vermutung, dass eine weiche Sprühwolke des Berodual<sup>®</sup> N zu einer vermehrten Wechselwirkung der Wirkstoffe mit gebotenen Oberflächen führte und in einer verminderten Deposition des FE auf dem Lungenhomogenat resultierte, stellt allerdings neben der Theorie von Freiwald, die eine hohe Geschwindigkeit des Aerosols für eine geringere Wirkstoffdeposition verantwortlich machte [52], einen weiteren Hinweis für einen deutlichen Einfluss physikochemischer Eigenschaften des Aerosols auf die tatsächlich deponierte Dosis dar.

### **3.5.2 Vergleich der Diffusionsergebnisse mit Ergebnissen aus klinischen Humanstudien**

Die generelle Annäherung des Dialysemodells mit kontinuierlichem Fluss an Verhältnisse *in-vivo* im Vergleich zur statischen Dialyse wurde bereits in 2.4.2 deutlich, da beim Vergleich der kontinuierlichen Dialyse mit einer Humanstudie Parallelen bzw. Ähnlichkeiten bezüglich pharmakokinetischer Parameter wie  $t_{\max}$  und der Halbwertszeit gezogen werden konnten. Die Ergebnisse aus den Diffusionsversuchen mit dem Berodual<sup>®</sup> N Dosieraerosol (DA) im vorliegenden Kapitel untermauern diese Beobachtung zusätzlich. Um mögliche Gemeinsamkeiten zwischen den Ergebnissen der *in-vitro*- und einer *in-vivo*-Studie zu erkennen, wurden die graphischen Resultate der Diffusion von Fenoterol in *Diagramm 7* einer Plasmaspiegelkurve aus einer Humanstudie von Hochhaus *et al.* direkt gegenübergestellt [184], wobei im Folgenden ausschließlich auf die rosafarben hervorgehobene Kurve von *Diagramm 7 B* eingegangen wird. In ihrer Studie untersuchten Hochhaus und Kollegen bei Asthmapatienten nach Gabe von Fenoterol über unterschiedliche Applikationswege der Injektion, Infusion, Instillation über die Nase und Inhalation kardiale und pulmonale Effekte sowie pharmakokinetische Parameter des Fenoterols.



**Diagramm 7:** Plasmaspiegelkurven von Fenoterol (FE) – Vergleich der Diffusion bei Verwendung des kontinuierlichen Dialysemodells (KD) mit dem Plasmaspiegel nach Inhalation von FE bei einer Humanstudie.

A: Zeitlicher Verlauf des Übergangs von FE von humanem Lungengewebe in humanes Plasma bei 37 °C über vier Stunden bei Verwendung des KD, entspricht der hellblauen Kurve aus *Diagramm 6*. [Mittelwert ± mittlere Abweichung vom Mittelwert, n = 3]

B, rosafarben hervorgehobene Kurve: FE-Plasmaspiegel nach Inhalation in einer Humanstudie von Hochhaus *et al.* mit 27 Asthmapatienten [184] [Mittelwert ± SE]; Abbildung modifiziert nach [184], Fig. 3. Copyright (1992) Springer. Mit freundlicher Genehmigung von Günther Hochhaus, Pharmacokinetic/Dynamic Correlation of Pulmonary and Cardiac Effects of Fenoterol in Asthmatic Patients After Different Routes of Administration, Pharmaceutical Research, Springer.

Bei der Gegenüberstellung in *Diagramm 7* entspricht die linke Abbildung (*Diagramm 7 A*, KD) der in *Diagramm 6* dargestellten hellblauen Kurve des Diffusionsverhaltens von FE nach Applikation aus dem Berodual® N Dosieraerosol, wobei die Konzentrationen auf der y-Achse in diesem Fall nicht als Prozent der applizierten Dosis, sondern als absolute Werte in ng/mL angegeben sind, um eine bessere Vergleichbarkeit mit dem rechten Diagramm (*Diagramm 7 B*, Humanstudie) zu ermöglichen. Gezeigt wird das Ergebnis der vierstündigen Diffusion von FE von Lungengewebe in Plasma bei Anwendung des kontinuierlichen Dialysemodells, nachdem die Dosis direkt aus dem DA freigesetzt wurde. Die rechtsseitige Abbildung (rosafarben hervorgehobene Kurve) repräsentiert über 240 Minuten hinweg betrachtet den Plasmaspiegelverlauf von FE nach inhalativer Gabe von 400 µg des  $\beta_2$ -Sympathomimetikums an ein Patientenkollektiv von 27 Asthmatikern [184]. Abgesehen vom weitaus geringeren Konzentrationsbereich in der Humanstudie ist ein ähnlicher Verlauf der beiden FE-Plasmaspiegelkurven bei der KD und der Studie mit den Asthmapatienten festzustellen. Die Maximalkonzentration wurde jeweils schnell erreicht, bei der Dialyse betrug  $t_{max}$  30 Minuten (siehe *D3.2.1 – Tabellarischer Anhang*), nach Inhalation wurde der höchste FE-Spiegel etwas

früher nach ca. 15 Minuten gemessen. In beiden Fällen wurde der Wirkstoff in Form eines Lösungsaerosols (Berodual® N bei der KD und Berotec® N bei der Humanstudie) appliziert, das schnellere Erreichen des Spitzenspiegels in der Studie mit den Patienten könnte auf die große Oberfläche der Lunge *in-vivo* zurückzuführen sein, die eine dementsprechende große Absorptionsfläche bietet und in Verbindung mit der ausgesprochen intensiven Durchblutung des Organs zu einer schnellen Anflutung des Arzneistoffes in der systemischen Zirkulation nach inhalativer Anwendung führt.

Gegen Ende des Dialyseexperimentes nach vier Stunden, also etwa 210 Minuten nach Erreichen des Spitzenspiegels, war die Konzentration des  $\beta_2$ -Sympathomimetikums mit  $125 \pm 9$  ng/mL auf etwa die Hälfte von  $c_{\max}$  ( $234 \pm 26$  ng/mL) abgefallen (siehe D3.2.1 – *Tabellarischer Anhang*). In der Studie von Hochhaus *et al.* wurde für Fenoterol eine etwas kürzere terminale Halbwertszeit von 200 Minuten, die sich allerdings in einer mit der KD gut vergleichbaren Größenordnung bewegt, angegeben [184]. Das kontinuierliche Dialysemodell konnte folglich neben der in 2.4.2 diskutierten Nachahmung der Verhältnisse *in-vivo* bei der Diffusion von Fluticasonpropionat auch im Falle des Fenoterols als Vorhersagemodell mit einer guten Annäherung an physiologische Verhältnisse fungieren, wie die ähnlich verlaufenden Plasmaspiegelkurven beim Vergleich der Diffusionsergebnisse von Berodual® N und der Humanstudie von Hochhaus *et al.* zeigen (siehe *Diagramm 7*).

In den Diffusionsversuchen wurde auch für Ipratropiumbromid ein  $t_{\max}$  von 30 Minuten bestimmt, während die Halbwertszeit für das Anticholinergikum mit etwa 150 Minuten im Vergleich zu FE kürzer ausfiel. Bei IB sank die Plasmakonzentration bereits drei Stunden nach Inkubationsbeginn mit  $97 \pm 14$  ng/mL auf die Hälfte des Maximalspiegels ( $201 \pm 34$  ng/mL, siehe D3.2.2 – *Tabellarischer Anhang*). Restrepo gibt eine Eliminationshalbwertszeit von etwa 1,6 Stunden nach inhalativer Anwendung des IB an [158], was im Vergleich zu den Ergebnissen der KD (2,5 Stunden, entsprechend 150 Minuten) nahezu eine Stunde kürzer ist. In Anbetracht der Verschiedenheit der Systeme Mensch und Dialysemodell scheint dies aber dennoch ein akzeptabler Bereich zu sein, um von einer Vergleichbarkeit des Modells mit *in-vivo*-Verhältnissen zu sprechen. Nach Inhalation wird im menschlichen Organismus schnell die Maximalkonzentration erreicht. In einer älteren Studie mit zehn gesunden Probanden stellten Ensing und Kollegen nach inhalativer Gabe von 2 mg IB ein  $t_{\max}$  von etwa 15 Minuten fest [185], was den bereits genannten Angaben zum FE entspricht und wiederum einige Minuten früher erreicht wird im Vergleich zur kontinuierlichen Dialyse ( $t_{\max} = 30$  Minuten), sich aber dennoch in einem sehr ähnlichen Zeitrahmen bewegt.

Auch für IB lassen sich folglich bezüglich des Diffusionsprofils Parallelen zu Plasmaspiegelverläufen in Humanstudien ziehen. Ein positiv hervorzuhebender Faktor ist ferner, dass das Dialysemodell für FE und IB trotz gleicher  $t_{\max}$ -Werte unterschiedliche „Eliminationshalbwertszeiten“ ergab, die mit denen *in-vivo* korrelieren. So wurde mit der KD für Fenoterol ein  $t_{1/2}$  von 210 Minuten bestimmt, *in-vivo* lag dieser Wert mit 200 Minuten [184] nur wenig davon entfernt. Die im Menschen im Vergleich zum  $\beta_2$ -Sympathomimetikum kürzere Halbwertszeit des IB (ca. 96 Minuten) spiegelte sich auch beim Dialysemodell in einer kürzeren  $t_{1/2}$  von 150 Minuten wider. Dies bedeutet, dass die Abnahme der Konzentration des jeweiligen Wirkstoffes im kontinuierlichen Dialysemodell nicht lediglich auf dem Abtransport der Substanz aus dem Akzeptorkompartiment beruht, sondern dass die physikochemischen Stoffeigenschaften die Form der Plasmakurve entscheidend mitbestimmen und bestärkt ein weiteres Mal die gute Eignung des kontinuierlichen Dialysemodells als einfaches und dennoch potentes *in-vitro*-Vorhersageinstrument für pharmakokinetische Vorgänge nach inhalativer Applikation von Arzneistoffen *in-vivo*.

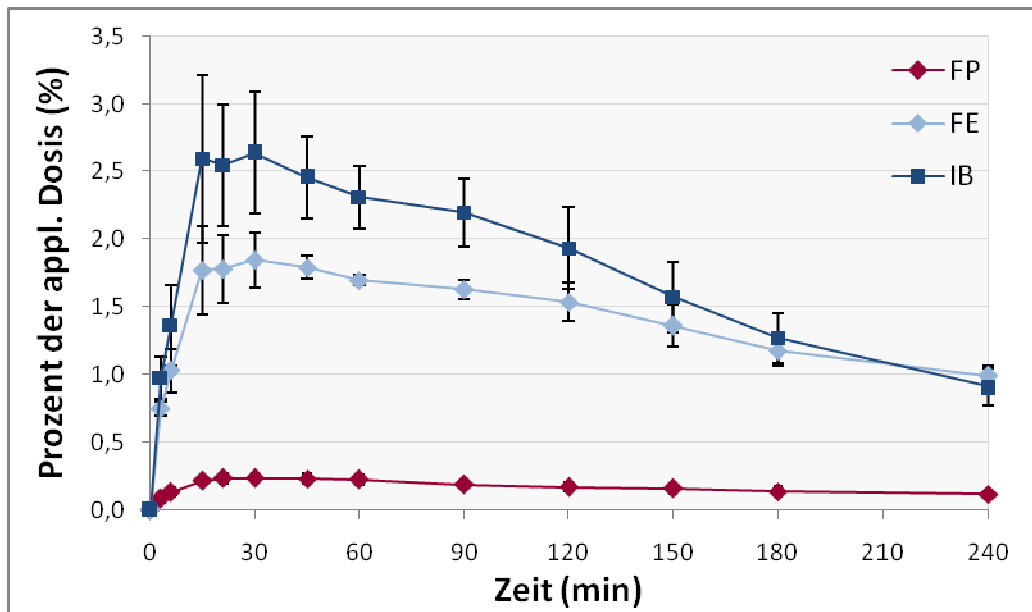
### **3.5.3 Vergleich des Diffusionsverhaltens von Fenoterol, Ipratropiumbromid und Fluticasonpropionat bei Verwendung der kontinuierlichen Dialyse**

Nachdem sich in den Experimenten aus dem vorliegenden Kapitel Tendenzen abzeichneten, dass sich das kontinuierliche Dialysemodell in besonderer Weise dazu eignen könnte, ein ungleiches Diffusionsverhalten von Substanzen oder Formulierungen mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften aufzuzeigen, wurden die Diffusionsergebnisse von Fenoterol (FE) und Ipratropiumbromid (IB) aus den Dialyseversuchen mit Berodual® N dem Diffusionsverhalten des Fluticasonpropionat (FP) aus den Versuchen zur Etablierung des kontinuierlichen Dialysemodells (siehe *Kapitel 2*) gegenübergestellt. Dabei wurden deutliche Unterschiede erkennbar, wenn die Dialysatkonzentrationen des jeweiligen Wirkstoffes auf die tatsächlich applizierte Dosis bezogen wurden. Die in *Diagramm 8* dargestellten hell- (FE) und dunkelblauen (IB) Plasmaspiegelkurven entsprechen *Diagramm 6* (siehe 3.4.2) und die weinrote Kurve für FP entspricht der aus *Diagramm 4* (siehe 2.3), wobei die Konzentration als Prozent der applizierten Dosis dargestellt ist.

Die Diffusion von FE und IB wurde nach Applikation der Dosis mit Hilfe des Dosieraerosols - entsprechend 250  $\mu\text{g}$  FE-HBr und 100  $\mu\text{g}$  IB – über vier Stunden hinweg verfolgt, der Übergang von FP vom Donor- in das Akzeptorkompartiment wurde nach Auftragen von 200  $\mu\text{g}$  Wirkstoff in Form einer methanolischen Lösung direkt auf das Lungenhomogenat



untersucht. Es fallen erwartungsgemäß deutliche Unterschiede zwischen den beiden blauen Kurven des FE und IB einerseits und der weinroten Kurve des FP andererseits auf (siehe *Diagramm 8*).



**Diagramm 8:** Diffusion von Fluticasonpropionat (FP), Fenoterol (FE) und Ipratropiumbromid (IB) von humanem Lungengewebe in humanes Plasma bei Verwendung der kontinuierlichen Dialyse.

Zeitlicher Verlauf des Übergangs von FP (entsprechend *Diagramm 4*, Kapitel 2.3), FE und IB (entsprechend *Diagramm 6*, Kapitel 3.4.2) von humanem Lungengewebe in humanes Plasma bei 37 °C, dargestellt als Prozent der applizierten Dosis. Die dunkelblaue Kurve zeigt den Konzentrationsverlauf des IB, die hellblaue Kurve dagegen den des FE und weinrot dargestellt ist der Plasmaspiegelverlauf des FP. [Mittelwert  $\pm$  mittlere Abweichung vom Mittelwert,  $n = 3$ ]

Bereits innerhalb der ersten Minuten nach Versuchsbeginn zeigte sich die Verschiedenartigkeit der beiden Bronchodilatoren und des Glucocorticoids bezüglich Ausmaß der Diffusion und der Diffusionsgeschwindigkeit bzw. der Verweildauer im Lungenhomogenat. Während FE und IB rasch vom Lungengewebe in das Akzeptorkompartiment diffundierten und die Plasmakonzentrationen nach 30 Minuten mit  $1,84 \pm 0,21$  % (FE) und  $2,64 \pm 0,45$  % (IB) der applizierten Dosis jeweils ein Maximum erreichten (siehe *D3.2.1* und *D3.2.2 – Tabellarischer Anhang*), verweilte die vergleichsweise deutlich lipophilere Substanz FP wesentlich länger im Homogenat, die Glucocortikoidkonzentration im Dialysat stieg nicht so steil und in einem geringeren Ausmaß an. Zwar wurde auch im Falle des Glucocorticoids nach 30 Minuten der

Spitzenspiegel erreicht, allerdings mit lediglich  $0,24 \pm 0,02$  % der applizierten Dosis und mit einem flacher ausgeprägten Profil des Plateaus im Vergleich zu den beiden blauen Kurven.

Die Konzentrationskurve des FP fiel im Anschluss im Zuge der „Eliminationsphase“ deutlich langsamer ab als die Plasmaspiegel von FE und IB. In der Zeit von 30 Minuten nach Inkubationsbeginn bis zum Versuchsende bei vier Stunden nahm die FE-Konzentration vom Maximalwert  $1,84 \pm 0,21$  % der applizierten Dosis auf einen Wert von  $0,99 \pm 0,07$  % ab, die IB-Konzentration fiel in dieser Zeit von  $2,64 \pm 0,45$  % auf  $0,91 \pm 0,13$  % der applizierten Dosis (siehe *D3.2.1* und *D3.2.2 – Tabellarischer Anhang*). Im Vergleich dazu lag bei 30 Minuten mit  $0,24 \pm 0,02$  % der applizierten Dosis der Spitzenspiegel des Glucocorticoids vor und sank bis zum Versuchsende bei vier Stunden auf  $0,12 \pm 0,01$  %. Obwohl FP in gelöster Form auf das Lungengewebe aufgetragen wurde, sodass vor der Diffusion keine Auflösungsprozesse stattfinden mussten, zeigte es bezüglich des Ausmaßes eine wesentlich geringere Umverteilung in das Akzeptorkompartiment als das  $\beta_2$ -Sympathomimetikum und das Anticholinergikum (siehe *Diagramm 8*).

Die äußeren Rahmenbedingungen der Experimente mit Berodual® N einerseits und mit FP andererseits waren gleich, es wurde in beiden Fällen der identische Versuchsaufbau und auch –ablauf der kontinuierlichen Dialyse eingesetzt. Dass die unterschiedlichen Herstellungsmethoden des Lungenhomogenates – Zerschneiden des Gewebes im Falle des Berodual® N (siehe *C3.1.3.2 - Experimenteller Teil*) und Zerschlagen und Homogenisieren mit dem Ultraturrax bei den Versuchen zur Etablierung mit FP (siehe *C2.1.3.2 - Experimenteller Teil*) - und die Verwendung verschiedener Plasmachargen einen Einfluss auf die Diffusion hatten ist nicht gänzlich auszuschließen, scheint jedoch in einem derartigen Ausmaß, wie es in *Diagramm 8* zu sehen ist, eher unwahrscheinlich. Man kann daher davon ausgehen, dass die unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften, die Lipophilie der Substanzen den ausschlaggebenden Faktor für das unterschiedliche Diffusionsverhalten darstellte. Die lipophilste der drei Substanzen, das FP, wurde im Vergleich zu den anderen beiden Stoffen deutlich länger im Lungenhomogenat retiniert und diffundierte in einem vergleichsweise geringen Ausmaß in das Akzeptorkompartiment. Dies zeigt das Potential des kontinuierlichen Dialysemodells, Unterschiede in der Diffusion lipophiler Stoffe (FP) im Vergleich zu Substanzen mit weniger lipophilen Eigenschaften aufzuzeigen und eröffnet die Möglichkeit, das Modell für eine Vorhersage pharmakokinetischer Parameter beim Vergleich verschiedenartiger Stoffe zu nutzen.

## 4 Untersuchungen zur pulmonalen Absorption von Salbutamol nach vorheriger inhalativer Applikation von Carnitin am humanen Lungenperfuisionsmodell

### 4.1 Hintergrund

Die Lunge stellt ein bedeutsames Portal für die Applikation sowohl lokal als auch systemisch wirkender Arzneistoffe dar. Im Kreise der pulmonal applizierten Wirkstoffe nehmen  $\beta_2$ -Sympathomimetika zur Bronchodilatation bei chronisch obstruktiven Erkrankungen der Lunge wie Asthma und COPD eine zentrale Rolle ein [1, 12]. Um ein Verständnis für die Effektivität und die Sicherheit der eingesetzten Wirkstoffe zu entwickeln, ist die Kenntnis sowohl pharmakodynamischer als auch pharmakokinetischer Prozesse im Zuge der Absorption eines Stoffes, der Verteilung und der Elimination essentiell. In den vergangenen Jahrzehnten wurden bereits zahlreiche Bemühungen unternommen, Modelle der Lunge zu etablieren, die die Beschreibung pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Vorgänge inhalativ angewendeter Arzneimittel ermöglichen. Besonders realitätsnah gelingt dies schon auf Grund der anatomischen Gegebenheiten wenn das Organ selbst in möglichst unzerstörter Form und unter möglichst physiologischen Bedingungen eingesetzt wird [186-188], wie es beim humanen Lungenperfuisionsmodell der Fall ist.

Erste Versuche an *ex-vivo* perfundierten Lungen wurden mit Organen von Tieren, wie z.B. Ratten oder Hasen durchgeführt [189-192], der in den vorliegenden Versuchen eingesetzte Versuchsaufbau des humanen Lungenperfuisionsmodells basiert auf einem Modell nach Linder *et al.* [56]. Hierbei wird ein humaner Lungenlappen oder Lungenflügel, der einem Patienten z.B. auf Grund eines Karzinoms entnommen wurde, unmittelbar nach der Resektion außerhalb des Körpers gewissermaßen „wieder zum Leben erweckt“: Das Organteil wird mit Hilfe eines Beatmungsgerätes ventiliert und durch eine Pumpe an einen halboffenen Blutkreislauf angeschlossen. Über einen Spacer ist die inhalative Applikation von Arzneistoffen an die Lunge möglich, durch Gewinnung von Perfusatproben oder Ventilationsdaten können pharmakokinetische und pharmakodynamische Parameter gemessen werden (siehe 4.2.3). Das humane Lungenperfuisionsmodell vereinigt zahlreiche Vorteile gegenüber *in-vivo*-Studien zur Pharmakokinetik/Pharmakodynamik (PK/PD) und anderen *in-vitro*-Modellen, die Teilaspekte der Lunge nachahmen, und weist dennoch gleichzeitig eine einzigartige Nähe an physiologische Verhältnisse *in-vivo* auf. In Humanstudien mit inhalativ angewendeten Wirkstoffen *in-vivo* ist es nicht leicht, die effektiv in der Lunge deponierte Dosis zu bestimmen. Zudem ist eine isolierte

Betrachtung der pulmonalen Absorption schwer zu realisieren. Bei der Analyse von Blutspiegeln des zu bestimmenden Wirkstoffes gilt es zu beachten, dass ein Teil der applizierten Dosis verschluckt wird und über die gastrointestinale Absorption zur Höhe der systemischen Arzneistoffkonzentration beitragen kann. Außerdem kann es zwischen der Inhalation und dem Zeitpunkt der Blutentnahme bereits zu einer teilweisen Metabolisierung des Wirkstoffes in der Leber gekommen sein. Beim Lungenperfusionsmodell ist es durch quantitative Analyse der in der Applikationsvorrichtung verbliebenen Wirkstoffmenge (siehe C4.3 – *Experimenteller Teil*) möglich, sehr genau die effektiv im Organ deponierte Dosis zu bestimmen; durch das vom übrigen Körper isolierte Vorliegen des Präparates kommt ausschließlich die pulmonale Absorption eines Wirkstoffes zum Tragen und Metabolisierungsvorgänge etwa durch die Leber können ausgeschlossen werden. Im Vergleich zu anderen *ex-vivo*- bzw. *in-vitro*-Modellen wie dem Dialysemmodell (siehe 1, 2 und 3) oder Zellkulturmodellen [45, 46, 137, 138], die in der Lage sind, die epithelialen Eigenschaften der Lunge zu imitieren und Absorptionsvorgänge zu simulieren, zeichnet sich das humane Lungenperfusionsmodell dadurch aus, dass sehr nahe an physiologischen Verhältnissen das intakte Gefüge des Organs erhalten bleibt und dies bei einer gleichzeitig nicht allzu aufwändigen Durchführbarkeit des Versuches.

Die Verwendung humaner Organe oder Organteile ist von entscheidender Bedeutung und sehr sinnvoll für die Erkenntnis von pathophysiologischen Mechanismen bzw. therapeutischen Möglichkeiten, in das Krankheitsgeschehen einzugreifen, da Atemwegserkrankungen wie Asthma oder COPD in dieser Form ausschließlich beim Menschen vorkommen und vor allem die Mechanismen der Atemwegsverengung sich bei den einzelnen Spezies stark unterscheiden. Die Aussagekraft von Tiermodellen ist daher limitiert und sie stoßen bezüglich einer Übertragbarkeit der Erkenntnisse auf den Menschen schnell an ihre Grenzen [193]. Das Modell der isolierten und perfundierten Lunge bietet zudem den für pharmakokinetische Untersuchungen essentiellen Vorteil, dass die Verbindung/Beziehung von Atemwegen und Gefäßsystem zueinander erhalten bleibt und deren Zusammenspiel ungehindert untersucht werden kann [193].

Verschiedene Modifikationen am Lungenperfusionsmodell durch Freiwald *et al.* [53] und Gnadt [57] erlaubten weitere Versuchsansätze für pharmakokinetische und auch pharmakodynamische Fragestellungen. So ermöglichte die Weiterentwicklung durch Freiwald *et al.* erstmals die inhalative Applikation von Wirkstoffen, in diesem Fall des Glucocorticoids Beclomethason-17,21-dipropionat (BDP) aus zwei verschiedenen Dosieraerosolen, an das isolierte Organ und eine Untersuchung der pulmonalen Absorptionsphase durch Proben aus dem Perfusat nahe an realen Verhältnissen. Dabei zeigten sich in Abhängigkeit von der

Formulierung Unterschiede in der Auflösungs- bzw. Umverteilungskinetik des BDP [53]. Gnadt erweiterte das humane Lungenperfusionsmodell um die Dimension der Pharmakodynamik [57]. Nach Auslösen einer Bronchokonstriktion durch Methacholin wurde die bronchienerweiternde Wirkung des hydrophilen Salbutamols und eines lipophilen  $\beta_2$ -Sympathomimetikums verglichen. Hierbei wurden für das humane Lungenperfusionsmodell geeignete respiratorische Parameter zur Quantifizierung einer Bronchodilatation identifiziert.

Im Rahmen dieser Experimente mit den  $\beta_2$ -Agonisten ergaben sich neue weiterführende Fragestellungen bezüglich möglicher molekularer Absorptionsmechanismen mit Beteiligung von Kation/Carnitin Transportern, die in der vorliegenden Arbeit am Lungenperfusionsmodell untersucht wurden.

#### **4.1.1 Vorausgegangene Versuche**

Da mehrere im Vorfeld abgeschlossene Studien mit  $\beta_2$ -Sympathomimetika am humanen Lungenperfusionsmodell aufeinander aufbauten und im Untersuchungsgegenstand des vorliegenden Kapitels resultierten, ist es sinnvoll, sich einen kurzen Überblick über diese Versuche zu verschaffen.

##### **4.1.1.1 Studie zur Pharmakokinetik (PK-Studie)**

Zunächst sollte geklärt werden, ob sich das humane Lungenperfusionsmodell dazu eignete, die pharmakokinetischen Eigenschaften und Unterschiede zwischen einem neuen, langwirksamen  $\beta_2$ -Sympathomimetikum (GW597901, ein von Salmeterol abgeleitetes Analogon [194]) und dem kurzwirksamen  $\beta_2$ -Agonisten Salbutamol (SB) zu beschreiben [57]. In sechs unabhängigen Versuchen wurden der ventilierten und perfundierten Lunge inhalativ mit Hilfe eines PARI Boy® Verneblers SB und der neue Arzneistoff in Kombination verabreicht. Durch das Sammeln und Analysieren von Proben sowohl aus dem venösen Ausgang als auch aus dem Reservoir konnte die Umverteilung der Wirkstoffe vom Lungengewebe in das Perfusat verfolgt werden. Der Versuchsaufbau entsprach dabei *Abbildung 20* (siehe *C4.1.6 – Experimenteller Teil*) und die Durchführung der Experimente erfolgte entsprechend der in *C4.2 (Experimenteller Teil)* und *4.2.3* beschriebenen Vorgehensweise [57]. Das Lungenperfusionsmodell erwies sich als geeignet, Unterschiede in der pulmonalen Absorption der  $\beta_2$ -Agonisten zu demonstrieren. So wurde die lipophile Substanz GW597901 in einem deutlich geringeren Ausmaß in das Perfusat umverteilt als das hydrophile Salbutamol [57]. Ein Teilergebnis der PK-Studie, der Konzentrationsverlauf des Salbutamol in der Perfusionsflüssigkeit über die Dauer des Versuches, ist in *Diagramm 9* (Kapitel *4.1.2*) gezeigt. Hierbei wird von den beiden eingesetzten

$\beta_2$ -Sympathomimetika nur auf Salbutamol eingegangen, da diese Substanz den Untersuchungsgegenstand in den eigenen Versuchen des vorliegenden Kapitels darstellte.

### 4.1.1.2 **Studie zur Pharmakokinetik und Pharmakodynamik (PK/PD-Studie)**

In einer weiteren Experimentreihe, der PK/PD-Studie, wurde untersucht, ob eine durch Methacholin (MCh) induzierte Bronchokonstriktion sich auf die Pharmakokinetik (PK) der verabreichten  $\beta_2$ -Sympathomimetika auswirkte. Ferner wurden die pharmakodynamischen Effekte (Pharmakodynamik, PD) der Bronchokonstriktion durch MCh einerseits und der Bronchodilatation durch Salbutamol (SB) bzw. GW597901 andererseits über Ventilationsparameter wie das Minutenvolumen, Atemzugvolumen, Resistance und Compliance verfolgt [57]. Der genaue Versuchsaufbau und die Durchführung der Experimente entsprachen den eigenen Versuchen mit Carnitin und anschließender SB-Vernebelung und sind *Abbildung 20* (siehe *C4.1.6 – Experimenteller Teil*) bzw. *C4.2 (Experimenteller Teil)* und *4.2.3* zu entnehmen. In der PK/PD-Studie wurde nach einer initialen Äquilibrationsphase des Ventilations- und Perfusionssystems mit stabilen Beatmungsparametern versucht, durch Verabreichung von MCh mit Hilfe des PARI Boy<sup>®</sup> Verneblers eine Bronchokonstriktion auszulösen [57]. Die Konzentration der wässrigen MCh-Lösung wurde in einem Bereich von 10-50 mg/mL individuell an das Gewicht des jeweiligen Lungenlappens angepasst, wobei zunächst generell die niedrigste Konzentrationsstufe angewendet wurde. Falls das MCh keine Bronchokonstriktion auslöste, wurde mit der Applikation der nächst höher konzentrierten Lösung fortgefahren, wobei eine ausreichende Verengung der Atemwege definiert wurde als eine Abnahme des anfänglichen Minutenvolumens um 40 %. Im Mittel wurde eine Konzentration von 26,5 mg/mL (10-50 mg/mL) MCh vernebelt, entsprechend einer durchschnittlich applizierten Gesamtdosis von 85,2 mg (2,5-180,5 mg) Methacholin. Unmittelbar nach Erreichen einer Atemwegsverengung oder wenn die Provokation auch nach insgesamt sechs Intervallen einer MCh-Applikation erfolglos blieb, wurde mit der Gabe der bronchienerweiternden „Rescue-Medikation“ in Form von entweder SB oder GW597901 unter Einsatz des PARI Boy<sup>®</sup> Verneblers über einen Zeitraum von etwa 12 Minuten begonnen. Auch *in-vivo* spricht nicht jede Lunge auf eine Provokation mit MCh an. Bezüglich der Prävalenz von Responderraten finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben, die in einem Bereich von etwa 12 % (Männer) bzw. 22 % (Frauen) [195] oder 6 – 55 % [196, 197] liegen und durch zahlreiche Faktoren wie Raucherstatus, Alter, Geschlecht oder der Veranlagung zu atopischen Erkrankungen beeinflusst werden [195].

Zu Zeitpunkten, die mit der PK-Studie vergleichbar waren, wurden Perfusatproben aus dem venösen Ausgang des Lungenpräparates und aus dem Reservoir gewonnen und auf ihren

Gehalt an jeweiligem  $\beta_2$ -Agonist analysiert. Insgesamt sechs Perfusionsversuche wurden mit Salbutamol durchgeführt, wobei davon in drei Experimenten erfolgreich eine Bronchokonstriktion ausgelöst werden konnte und die zu verabreichende Zieldosis 600  $\mu\text{g}$  SB betrug [57]. Das Ergebnis der PK/PD-Studie von Gnadt [57] wird ebenfalls in *Diagramm 9* (Kapitel 4.1.2) präsentiert.

#### **4.1.2 Vorausgegangene Beobachtungen**

In der Literatur existieren mehrere Anhaltspunkte dafür, dass bei Patienten mit obstruktiven Atemwegsleiden, die mit krankhaften Veränderungen der Lunge einhergehen im Vergleich zu gesunden Probanden eine veränderte PK inhalierter Wirkstoffe vorliegt. Mortimer *et al.* untersuchten bei 20 Patienten mit mildem Asthma den Einfluss einer durch Methacholin (MCh) ausgelösten Obstruktion der Atemwege auf die Absorption von inhalativ angewendetem Fluticasonpropionat (FP) und Budesonid (BUD) in die systemische Zirkulation [147]. Jeder Patient wurde zwei Mal vorstellig und inhalierte jeweils 1000  $\mu\text{g}$  FP und zusätzlich 800  $\mu\text{g}$  BUD, wobei bei einem der beiden Besuche im Vorfeld zur Applikation der Glucocorticoide mit MCh eine Abnahme des individuellen  $\text{FEV}_1$ -Wertes von durchschnittlich 33 % herbeigeführt wurde. Die Plasmaspiegel von FP und BUD wurden über fünf Stunden hinweg bestimmt und anschließend die AUC-Werte der Wirkstoffspiegel mit zuvor verringertem  $\text{FEV}_1$  bzw. ohne vorherige Bronchokonstriktion einander gegenübergestellt. Im Falle des FP nahm die AUC über fünf Stunden betrachtet bei vorher erfolgter Bronchokonstriktion um 60 % (Median) gegenüber der reinen Glucocorticoid-Gabe ab, bei BUD wurde die AUC um 29 % (Median) reduziert.[147]

Ähnliche Beobachtungen machten Dalby *et al.* in einer Humanstudie im cross-over Design, als sie gesunden Probanden und COPD-Patienten zwei Einzeldosen von 400  $\mu\text{g}$  BUD und 500  $\mu\text{g}$  FP jeweils in Kombination mit einem langwirksamen  $\beta_2$ -Agonisten und einer dazwischenliegenden Auswaschphase verabreichten und die resultierenden AUC-Werte verglichen [198]. Die analysierten AUC-Werte waren sowohl für BUD mit etwa 49 % (Patienten 3,07  $\mu\text{M}\cdot\text{h}$  vs. Gesunde 6,21  $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ ) als auch für FP mit ca. 56 % (Patienten 0,84  $\mu\text{M}\cdot\text{h}$  vs. Gesunde 1,50  $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ ) bei den COPD-Patienten wesentlich geringer gegenüber den gesunden Probanden [198]. Auch der Vergleich von Asthmatikern mit Gesunden durch eine Forschergruppe um Brutsche [146] ergab nach inhalativer Applikation von 1000  $\mu\text{g}$  FP über sieben Tage für die Patienten eine um 54 % geringere systemische Verfügbarkeit im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, die bei den Asthmatikern gemessene AUC war um 62 % kleiner und der Maximalspiegel mit 117  $\text{pg/mL}$  (Patienten) vs. 383  $\text{pg/mL}$  (Gesunde) um 68 % gegenüber der Vergleichsgruppe verringert. Nach intravenöser Verabreichung einer Einzeldosis

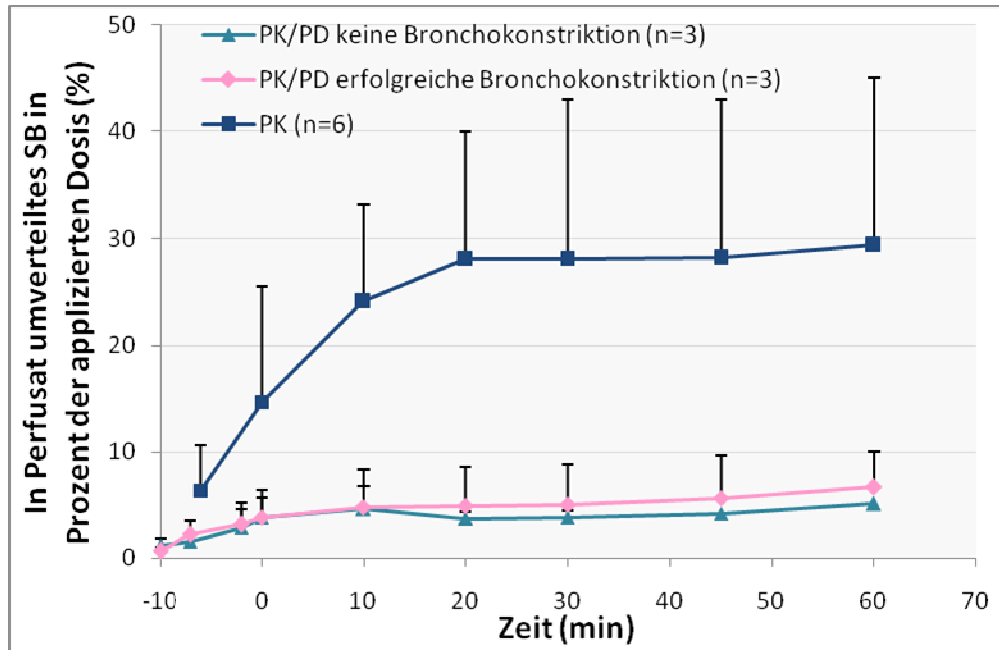
von 1000 µg FP ergaben sich allerdings für beide Gruppen sehr ähnliche pharmakokinetische Daten, was verdeutlicht, dass die festgestellten Unterschiede zwischen Patienten und Gesunden allein auf der ungleichen pulmonalen Absorption des FP beruhen [146].

In der Literatur wurde diskutiert, dass möglicherweise *in-vivo* eine Bronchokonstriktion zu einer verstärkten Deposition des inhalierten Arzneistoffes in einer zentraleren Region der Atemwege führen kann, verbunden mit einer höheren mukoziliären Clearance und letztlich in dem vielfach beobachteten Phänomen der verminderten Umverteilung eines inhalierten Arzneistoffes in die systemische Zirkulation bei Patienten mit einer Obstruktion der Atemwege im Vergleich zu gesunden Probanden bzw. Patienten mit nicht so starker Einschränkung der Lungenfunktion resultiert [147, 148].

So wurde bei den bereits beschriebenen, den eigenen Experimenten vorausgegangenen Versuchen der PK- und PK/PD-Studie (siehe 4.1.1.1 und 4.1.1.2) von Gnadt [57] also erwartet, dass eine durch Methacholin induzierte Bronchokonstriktion zu einer veränderten Pharmakokinetik des anschließend verabreichten  $\beta_2$ -Sympathomimetikums führen würde (PK/PD-Studie) im Vergleich zur alleinigen Applikation des  $\beta_2$ -Agonisten (PK-Studie).

Diese Vermutung wurde tatsächlich durch die Untersuchungsergebnisse bestätigt, da SB nach Vernebelung von MCh im Rahmen der PK/PD-Studie in einem wesentlich geringeren Ausmaß in die Perfusionsflüssigkeit umverteilt wurde als nach alleiniger Applikation des  $\beta_2$ -Sympathomimetikums in der PK-Studie. *Diagramm 9* stellt die Ergebnisse der PK- und PK/PD-Studie einander direkt gegenüber, wobei die Salbutamol-Konzentration als Prozent der applizierten Dosis angegeben ist und der Zeitpunkt „0 Minuten“ im Rahmen der Versuchsdauer das Ende des Vernebelungsvorganges der Dosisapplikation von SB bezeichnet. Es sind lediglich die SB-Konzentrationen dargestellt, die aus dem venösen Ausgang gewonnen wurden und nicht die Proben aus dem Reservoir. Zum Einen wird die initiale Absorptionsphase von diesen Proben besser wiedergespiegelt, da mit ihrer Gewinnung bereits 10 Minuten (PK/PD-Studie) bzw. 6 Minuten (PK-Studie) vor Applikationsende des SB begonnen wurde, während Dialysat aus dem Reservoir erst zum Dosierungsende – entsprechend Zeitpunkt „0 Minuten“ – entnommen wurde. Zum Anderen wurden in den Proben aus dem Reservoir nahezu gleiche Arzneistoffmengen analysiert [57], sodass es ausreichend in Bezug auf die Aussagekraft und übersichtlicher schien, in der vorliegenden Arbeit nur die Konzentrationen aus dem venösen Ausgang aufzugreifen.





**Diagramm 9:** Vorausgegangene Versuche am humanen Lungenperfusionsmodell von Gnadt [57] - Umverteilung von Salbutamol (SB) in Perfusionsflüssigkeit, Proben aus dem venösen Ausgang.

Zeitlicher Verlauf der Umverteilung von SB vom Lungengewebe in die Perfusionsflüssigkeit, dargestellt als Prozent der applizierten Dosis. Die dunkelblaue Kurve mit quadratischen Symbolen zeigt das Ergebnis der PK-Studie mit ausschließlicher Applikation von  $\beta_2$ -Sympathomimetika. Die rosafarbene Kurve demonstriert den Konzentrationsverlauf von SB bei der PK/PD-Studie nach vorheriger Vernebelung von Methacholin und erfolgreicher Bronchokonstriktion, die hellblaue Kurve mit dreieckigen Symbolen den Konzentrationsverlauf von SB in der PK/PD-Studie ohne Bronchokonstriktion [Mittelwert  $\pm$  SD] – Ergebnisse aus [57].

Wurden in der PK-Studie bei 60 Minuten Maximalwerte von im Mittel 29,4 % der applizierten Dosis im Perfusat wiedergefunden, so lag nach einer Bronchokonstriktion bei der PK/PD-Studie die höchste SB-Konzentration in der Perfusionsflüssigkeit mit durchschnittlich 6,7 % der applizierten Dosis (bei 60 Minuten) in einem weitaus niedrigeren Bereich [57]. Unerwarteterweise jedoch zeigte sich dasselbe Phänomen der veränderten Pharmakokinetik des SB auch in den Perfusionsexperimenten, in denen trotz MCh-Applikation eine Bronchokonstriktion ausblieb; in diesen Versuchen wurden 5,1 % des applizierten SB in das Perfusat umverteilt [57]. In *Diagramm 9* ist dieser Aspekt sehr deutlich visualisiert, da die Konzentrationskurve des SB aus der PK-Studie weit oberhalb der beiden PK/PD-Diagramme verläuft, während die Kurven der PK/PD-Studie nahezu deckungsgleich verlaufen. SB wurde folglich nach vorheriger Applikation von MCh in einem deutlich geringeren Umfang von der Lunge in das Perfusat abgegeben als nach alleiniger Gabe des  $\beta_2$ -Sympathomimetikums und

zwar unabhängig davon, ob im Vorfeld durch MCh eine Bronchokonstriktion ausgelöst worden war oder nicht [57].

### 4.2 Prinzip der Bestimmung

Erklärungsversuche für das unerwartete Phänomen der veränderten Pharmakokinetik des Salbutamols nach Methacholin-Applikation sind komplex. In den beschriebenen vorausgegangenen Versuchen der PK/PD-Studie (siehe 4.1.1.2) von Gnadt führte eine Verengung der Atemwege des Lungenpräparates, gemessen als 40 %ige Verringerung des Minutenvolumens gegenüber dem Ausgangswert, zu einer Abnahme der AUC von Salbutamol im Perfusat um 79 % gegenüber der in der PK-Studie bestimmten AUC [57]. Eine Bronchokonstriktion als alleinige Ursache für die verminderte pulmonale Absorption des  $\beta_2$ -Sympathomimetikums konnte jedoch ausgeschlossen werden, da auch ohne erfolgreiche Provokation durch MCh die gleiche Beobachtung der geringen Umverteilung von SB in die Perfusionsflüssigkeit gemacht wurde (siehe *Diagramm 9*, PK/PD keine Bronchokonstriktion). Eine veränderte Deposition des Wirkstoffes im Zuge der Bronchokonstriktion, verbunden mit einer höheren mukoziliären Clearance, wie sie in Humanstudien beobachtet wurde, schied demnach als Erklärung aus. Zudem scheint eine Funktionsfähigkeit dieses Mechanismus in einem *ex-vivo* perfundierten Lungenpräparat fraglich [57, 147, 148]. Auf der Suche nach einer Erklärungsmöglichkeit richtete sich die Aufmerksamkeit schnell auf das MCh, da dessen Applikation vor der Vernebelung des  $\beta_2$ -Agonisten den zentralen Unterschied zwischen der PK- und der PK/PD-Studie darstellte. Die Unabhängigkeit der veränderten Pharmakokinetik des SB von einer Bronchokonstriktion deutete auf die Beteiligung eines Mechanismus, der mit dem Absorptionsgeschehen des  $\beta_2$ -Sympathomimetikums in Verbindung steht, hin und auf Konkurrenz-Mechanismen zwischen MCh und SB auf molekularer Ebene [57].

In der Literatur wurden Transporter identifiziert, die die Passage verschiedener kationischer Moleküle durch Membranbarrieren ermöglichen [199, 200]. Da *in-vitro*-Versuche zeigten, dass  $\beta_2$ -Sympathomimetika Substrate der sogenannten OCTN2 Transporter darstellen [199, 201], konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf eben diese Untergruppe der organischen Kation/Carnitin Transporter (OCTN).

#### 4.2.1 Organische Kation/Carnitin Transporter – OCTN2

Organische Kation/Carnitin Transporter (OCTN) sind Membranproteine, die zur Familie der “solute carrier transporter” SLC22A gehören. Diese Familie umfasst die drei Subtypen der organischen Kation Transporter OCT1, OCT2 und OCT3, die angetrieben durch die transmembrane Potentialdifferenz über das Prinzip der passiven Diffusion funktionieren, ferner den wahrscheinlich als Proton-Kationen Austauscher fungierenden Kation und Carnitin Transporter OCTN1, außerdem OCTN2 und den Carnitin und Kation Transporter OCT6 [202]. Die Transportproteine dienen dem Körper zur Aufnahme, Ausscheidung, und Verteilung verschiedenster endogener und exogener Substanzen kationischer Natur und kommen in diversen Gewebeabschnitten des Menschen wie z.B. dem Dünndarm, den Nieren, dem Herzen, dem Gehirn, der Leber und der Lunge vor. Dabei liegen sie in basolateralen oder luminalen Membranen der Epithelzellen und beeinflussen zum Teil die Absorption und Disposition von Wirkstoffen in diesen Organen [202].

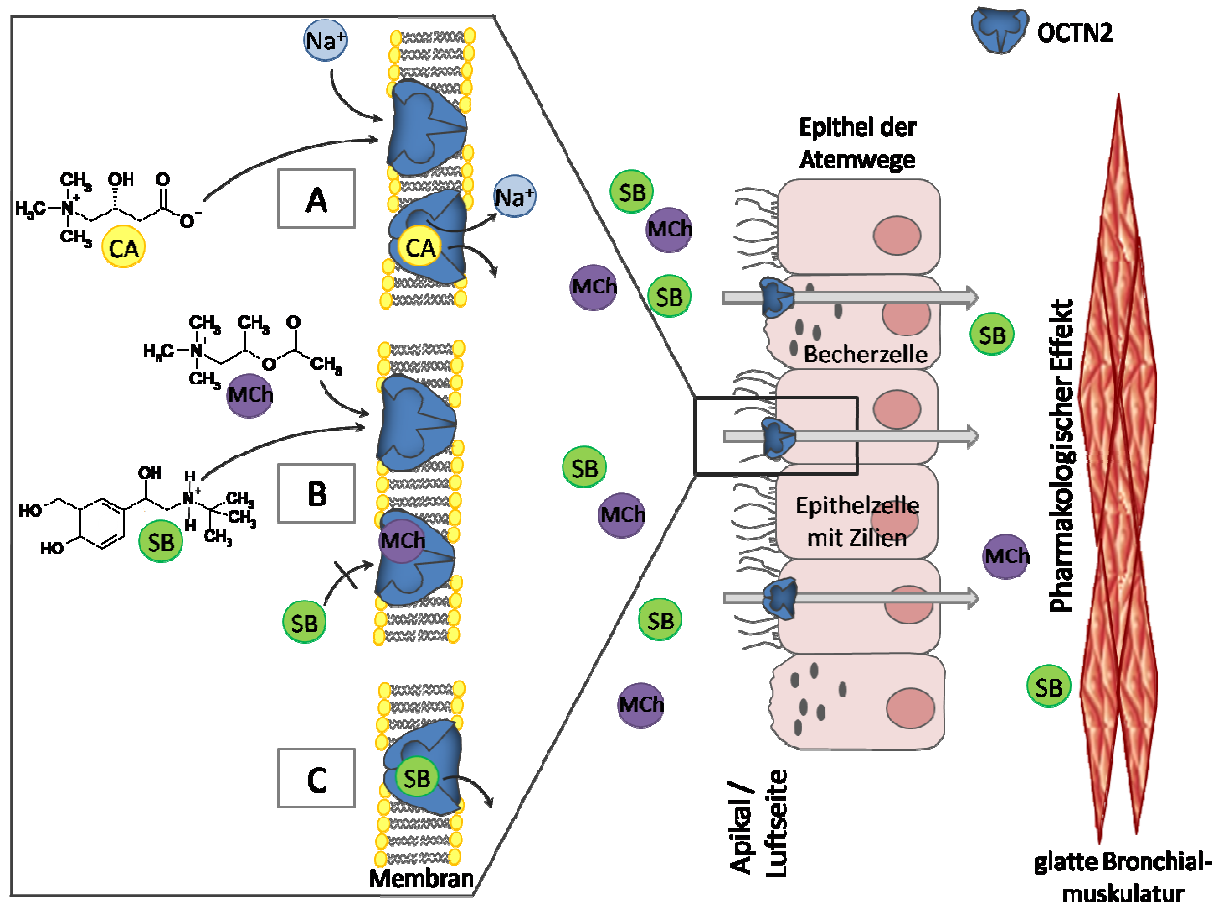
In der humanen Lunge sind nahezu alle Mitglieder der SLC22A-Transporterfamilie vertreten: OCT1-3, OCTN1 und OCTN2 werden in den Epithelzellen der Trachea und der Bronchien in der luminalen Membran exprimiert [199, 203]. Neben OCT1 und OCT3 kommen OCTN1 und OCTN2 auch in Epithelzellen der Alveolen vor [199, 204]. Obwohl die Bedeutung der einzelnen polyspezifischen organischen Kation Transporter noch nicht in Gänze verstanden wird, ist davon auszugehen, dass sie eine wichtige Rolle bei der pulmonalen Absorption einiger inhalierter Wirkstoffe und bei deren Verteilung in der Lunge spielen, was gleichzeitig ein enormes Potential für die Erschließung neuer Zielstrukturen bei der Behandlung von Erkrankungen der Lunge wie beispielsweise Asthma oder COPD birgt [199, 202, 205, 206].

In Experimenten mit der humanen Bronchialepithel-Zelllinie BEAS-2B wurde gezeigt, dass die Zellen mit Hilfe von Transportern die quartäre Ammoniumverbindung Ipratropiumbromid (IB) befördern und OCTN2 dabei die Hauptrolle spielen. Dieser Mechanismus führt trotz der Hydrophilie und geringen Membranpermeabilität der Substanz zur systemischen Verfügbarkeit des IB nach Inhalation [200, 207]. Auch für Salbutamol (SB), das bezüglich seiner physikochemischen Eigenschaften, wie der Lipophilie und der Membranpermeabilität, Ähnlichkeiten mit IB aufweist, gibt es einige Hinweise in der Literatur, dass es auf dieselbe Art wie das IB durch das Epithel transportiert wird [200, 201].

OCTN2 betreibt einen  $\text{Na}^+$ -abhängigen Transport von Carnitin ( $\text{Na}^+$ -Carnitin Cotransporter, siehe *Abbildung 14 A*) und kann auch als  $\text{Na}^+$ -unabhängiger Transporter organischer Kationen in beide Richtungen durch die Zellmembran fungieren [202, 208, 209]. Dabei besitzt das Transportprotein mindestens zwei Bindungsstellen [209]. Die Stoffe werden in

Abhängigkeit des pH-Wertes befördert, wobei der Transport mit der Azidität des Milieus abnimmt [210]. Das Membranprotein ist beteiligt an der aktiven Aufnahme von Carnitin in das Zellinnere, weshalb Mutationen, die das kodierende Gen betreffen, mit einem primären systemischen Carnitin-Mangel in Verbindung gebracht werden. Durch den intrazellulären Carnitinmangel kommt es zu Störungen bei der Fettsäureoxidation in den Mitochondrien und somit zu Einschränkungen bei Stoffwechselprozessen. Diese Erkrankung wird autosomal-rezessiv vererbt und äußert sich in Symptomen wie hypoketotischer Hypoglykämie, hepatischer Enzephalopathie und im späteren Verlauf in skeletaler Myopathie oder Kardiomyopathie [211, 212].

Da gezeigt wurde, dass das organische Kation Tetraethylammonium und L-Carnitin an derselben Bindungsstelle des OCTN2 miteinander wechselwirken und gegenseitig kompetitiv den Transport der jeweils anderen Substanz inhibieren können [202, 213], wurde hinter der in der PK/PD-Studie beobachteten Pharmakokinetik-Beeinflussung des Salbutamols ebenfalls ein Konkurrenzmechanismus zwischen Methacholin und dem bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 (siehe *C4.1.4 – Experimenteller Teil*) positiv geladenen  $\beta_2$ -Sympathomimetikum [201, 205] auf molekularer Ebene vermutet (siehe *Abbildung 14 B*).



**Abbildung 14:** Das Epithel der Atemwege mit apikal lokalisierten OCTN2 Transportern, dem  $\text{Na}^+$ -abhängigen Transport von Carnitin (CA) und dem möglichen Wettbewerbsmechanismus von Methacholin (MCh) und Salbutamol (SB) in schematischer Darstellungsweise.

A-C zeigen verschiedene mögliche Konstellationen beim Transport organischer Kationen ausgehend von der Luftseite durch die Membran epithelialer Zellen in das Zellinnere mit Hilfe von OCTN2:

**A:** Cotransport von  $\text{Na}^+$  und CA, wobei die beiden Kationen von OCTN2 aufgenommen werden, durch die Membran hindurch geschleust und in das Zellinnere entlassen werden.

**B:** Im Rahmen des  $\text{Na}^+$ -unabhängigen Transportes konkurrieren MCh und SB (bei pH 7,4 als organische Kationen vorliegend) auf der apikalen Seite des Epithels um OCTN2. MCh, das bereits an den Transporter gebunden hat, kann die Aufnahme von SB inhibieren und, wie bei der PK/PD-Studie beobachtet, zu einer geringeren Umverteilung des  $\beta_2$ -Sympathomimetikums in das Perfusat führen im Vergleich zur alleinigen Applikation von SB.

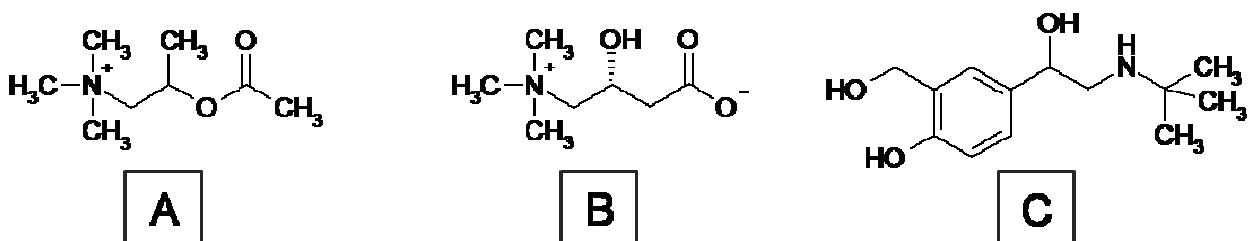
**C:** SB wird über OCTN2 durch die Membran der Epithelzellen transportiert.

Nach Passage des Atemwegsepithels gelangen SB und MCh zu ihren Zielstrukturen auf den Zellen der glatten Bronchialmuskulatur und können ihre pharmakologischen Effekte entfalten.

(Modifiziert nach [57, 200, 209, 214])

#### 4.2.2 L-Carnitin als OCTN2 Substrat für die eigenen Versuche mit dem humanen Lungenperfusionsmodell

Durch weiterführende Versuche sollte geklärt werden, ob sich die Hypothese, dass Methacholin (MCh, siehe *Abbildung 15 A*) unabhängig von einer Bronchokonstriktion die pulmonale Absorption und somit die Pharmakokinetik des Salbutamol (SB, siehe *Abbildung 15 C*) beeinflusste, bestätigen ließ. Zu diesem Zwecke wurde im Rahmen der weiteren experimentellen Vorgehensweise L-Carnitin (CA, siehe *Abbildung 15 B*) an Stelle von MCh ausgewählt, um eine mögliche Konkurrenz mit SB während des Absorptionsprozesses zu zeigen. CA schien gut geeignet, da es ein Substrat mit hoher Affinität für die OCTN2 Transporter darstellt, strukturelle Ähnlichkeit mit dem MCh aufweist (siehe *Abbildung 15 A und B*) und nach Inhalation keine Bronchokonstriktion auslöst. Die Bedeutung des OCTN2 beim Transport von CA (siehe 4.2.1) legt potentielle Interaktionen zwischen Wirkstoffen und L-Carnitin nahe [215], mitunter wird die Substanz als OCTN2 Inhibitor beschrieben [205].



**Abbildung 15:** Strukturformeln von A: Methacholin (MCh), B: L-Carnitin (CA) und C: Salbutamol (SB, freie Base).

A:  $M_r$  (MCh) = 160,23 g/mol; Summenformel (MCh) =  $C_8H_{18}NO_2^+$  [216]

B:  $M_r$  (CA) = 161,20 g/mol; Summenformel (CA) =  $C_7H_{15}NO_3$  [217]

C:  $M_r$  (SB) = 239,31 g/mol; Summenformel (SB) =  $C_{13}H_{21}NO_3$  [218]

L-Carnitin besitzt eine starke Affinität zu OCTN2 und wird von diesen in einer  $Na^+$ -abhängigen Weise mit hoher stereospezifischer Selektivität transportiert. Dies ist erkennbar an der Michaeliskonstanten  $K_m$ , wobei humane OCTN2 Transporter zu L-Carnitin mit vergleichsweise kleinen  $K_m$ -Werten von 4-5  $\mu M$  eine höhere Affinität zeigten als zu D-Carnitin mit  $K_m$ -Werten von 11 bzw. 98  $\mu M$  [202, 210, 219]. Aus diesem Grund wurde das L-Enantiomer der Substanz für die Lungenperfusionsversuche ausgewählt. Im Rahmen der Experimente wurde zunächst, wie in der vorausgegangenen PK/PD-Studie, anstatt MCh (siehe 4.1.1.2) eine Carnitin-Lösung an den Lungenlappen verabreicht, bevor SB appliziert wurde. Da im Gegensatz zu MCh

(PK/PD-Studie) durch CA kein pharmakodynamischer Effekt in Form einer Bronchokonstriktion zu erwarten war, sondern das Zwitterion lediglich den OCTN2 Transportern des Lungenpräparates bei der pulmonalen Absorption als Substrat zur Verfügung stehen sollte, wurde ohne zeitliche Verzögerung mit der Applikation von Salbutamol fortgefahren. Der Gehalt des  $\beta_2$ -Sympathomimetikums in der Perfusionsflüssigkeit wurde bestimmt und die analysierten Konzentrationen wurden in der Folge mit den Ergebnissen der PK- und der PK/PD-Studie verglichen.

#### **4.2.3 Durchführung der Versuche am humanen Lungenperfusionsmodell**

Für die Experimente mit Carnitin und Salbutamol am humanen Lungenperfusionsmodell wurde der gleiche Versuchsaufbau verwendet, der bei der PK- und PK/PD-Studie [57] eingesetzt worden war (siehe *Abbildung 20, C4.1.6 – Experimenteller Teil*), wobei das von Linder *et al.* beschriebene Modell zu Grunde lag [56].

Das zentrale Element bildete ein humaner Lungenlappen oder Lungenflügel, der einem Patienten im Rahmen der Therapie eines Bronchialkarzinoms operativ entfernt wurde und unmittelbar nach der Resektion außerhalb des Körpers anastomosiert, mit Hilfe eines Beatmungsgerätes ventiliert und über die katheterisierten Pulmonalarterien durch ein Pumpsystem an einen halboffenen Perfusionskreislauf angeschlossen wurde (siehe *C4.1.6 – Experimenteller Teil*). Die Zusammensetzung der eingesetzten Pufferlösung entsprach der in der PK/PD-Studie [57] verwendeten Perfusionsflüssigkeit (siehe *C4.1.4 – Experimenteller Teil*).

Die zuständige Ethikkommission genehmigte die Studie im Vorfeld und das Einverständnis der Patienten für die experimentelle Verwendung des ihnen entnommenen Gewebes lag jeweils schriftlich vor. Patienten wurden ausgeschlossen, wenn sie neoadjuvant behandelt wurden oder eine infektiöse Erkrankung vorlag. Um eine ausreichend lange Auswaschphase zu gewährleisten und somit eine Verfälschung der pharmakokinetischen Daten zu verhindern, mussten die Patienten ein inhalativ oder oral angewendetes  $\beta_2$ -Sympathomimetikum mindestens vier Wochen vor dem chirurgischen Eingriff abgesetzt haben (siehe *C4.1.5 – Experimenteller Teil*).

Die Beatmung des Lungenpräparates erfolgte druckkontrolliert im BiPAP (Biphasic Positive Airway Pressure) –Modus, sodass bei konstantem PEEP (Positive End Expiratory Pressure) und  $P_{Peak}$  (maximaler Beatmungsdruck) ein für jedes Präparat individuelles Atemzugsvolumen ermöglicht wurde. Auf diese Weise konnte Beschädigungen des Lungengewebes durch Überblähung entgegengewirkt werden und die physiologische Beschaffenheit des Organteils wurde während der Experimentdauer möglichst lange aufrecht

erhalten (siehe *C4.2.2 – Experimenteller Teil*). Mit Hilfe eines PARI Boy® und über einen Spacer, der zwischen das Beatmungsgerät und den anastomosierten Bronchus geschaltet war (siehe *Abbildung 20, C4.1.6 – Experimenteller Teil*) konnten die Wirkstofflösungen an das Lungenpräparat verabreicht werden.

Nach einer Äquilibrierungsphase, in der sich stabile Ventilations- und Perfusionsparameter einstellen konnten, wurde über zehn Minuten hinweg die Carnitin-Applikationslösung (25 mg/mL) verabreicht und resultierte in einer applizierten Dosis von 62,7 mg L-Carnitin (CA) (siehe *C4.2.3 – Experimenteller Teil*). Der Gehalt der verabreichten Lösung orientierte sich dabei an der mittleren Konzentration der applizierten Methacholin-Lösung in den Experimenten von Gnadt (26,5 mg/mL), ebenso wie die Vernebelungsdauer der PK/PD-Studie (8,4 min) zum Vorbild diente [57]. Die Applikation von Salbutamol erfolgte unmittelbar im Anschluss, wobei die Zieldosis analog zu den Experimenten der PK/PD-Studie (siehe *4.1.1.2*) und zu einem Teil der PK-Studie (siehe *4.1.1.1*) von Gnadt [57] 600 µg SB betrug (siehe *C4.2.4 – Experimenteller Teil*).

Für CA wurde der PARI LC® SPRINT Vernebler mit blauem Düsenaufsatz verwendet (MMD 2,9 µm, 75 % < 5 µm, Output Rate 590 mg/min), die Applikation des SB erfolgte hingegen mit dem roten Düsenaufsatz (MMD 2,2 µm, 89 % < 5 µm, Output Rate 450 mg/min). Die erzeugten Aerosolpartikel lagen demnach im inhalierbaren Bereich von 2 – 5 µm MMD und es konnte von einer Wirkstoffdeposition innerhalb der zentralen und peripheren Bereiche der Lunge ausgegangen werden [220].

Zur Bestimmung der initialen Absorptionsphase des  $\beta_2$ -Sympathomimetikums wurden bereits 2, 5 und 10 Minuten (entsprechend mit -10, -7 und -2 Minuten bezeichnet) nach Beginn der etwa zwölf-minütigen Applikation von SB Proben mit einem Volumen von je 6 mL aus dem venösen Ausgang des Lungenpräparates gewonnen. Nach Abschluss des Dosierungsvorganges wurde die Umverteilung des  $\beta_2$ -Sympathomimetikums in die Perfusionsflüssigkeit über weitere 60 Minuten hinweg verfolgt, indem zu den zuvor festgelegten Zeitpunkten bei 0 (Ende der SB-Verabreichung), 10, 20, 30, 45 und 60 Minuten Perfusatproben (jeweils 6 mL) sowohl aus dem venösen Ausgang als auch aus dem Reservoir entnommen wurden. Unmittelbar nach jeder Probenentnahme wurde das aus dem System entfernte Volumen durch Überführung frischer Perfusionsflüssigkeit in das Reservoir ersetzt (siehe *C4.2.5 - Experimenteller Teil*).

Im Anschluss an jedes Perfusionsexperiment wurde auf indirekte Weise bestimmt, welcher Anteil der vernebelten SB-Dosis die Atemwege des Lungenpräparates tatsächlich erreicht hatte. Hierzu wurde der Rückstand der Applikationslösung im Vernebler bestimmt und



die Applikationshilfe inklusive all ihrer Bestandteile ausgewaschen und auf ihren SB-Gehalt hin analysiert (siehe *C4.3– Experimenteller Teil*).

Insgesamt wurden drei Experimente mit Carnitin- und anschließender Salbutamol-Vernebelung durchgeführt. Die Quantifizierung des SB-Gehaltes der Proben erfolgte mittels LC-MS/MS (siehe *C4.4.3 – Experimenteller Teil*). Die im Perfusat analysierte Konzentration SB wurde als Anteil der tatsächlich applizierten Dosis ausgedrückt und konnte unmittelbar mit den vorausgegangenen Versuchen der PK- und PK/PD-Studie von Gnadt [57] verglichen werden.

### 4.3 Ergebnisse

Die Eigenschaften der in den drei Carnitin-Perfusionen verwendeten Lungenpräparate, Informationen zu den Spendern und die experimentellen Rahmenbedingungen sind in *Tabelle 4* näher beschrieben. Dabei wurden die Perfusionsexperimente in chronologischer Reihenfolge mit den Zahlen 1 bis 3 bezeichnet.

**Tabelle 4:** Charakteristika der Spenderlungen und der Perfusionsexperimente.

Experiment	Spender		Reseziertes Lungengewebe	Anzahl katheterisierter Pulmonalarterien	Perfusionsdauer Gesamt (min)
	Geschlecht	Alter (Jahre)			
1	m	63	OL + ML (r)	2	108
2	-	-	Lungenflügel (l)	2	104
3	m	71	UL (r)	2	112

m – männlich; OL – Oberlappen; ML – Mittellappen; UL – Unterlappen; r – rechte Lungenhälfte; l – linke Lungenhälfte

- Daten wurden nicht erfasst

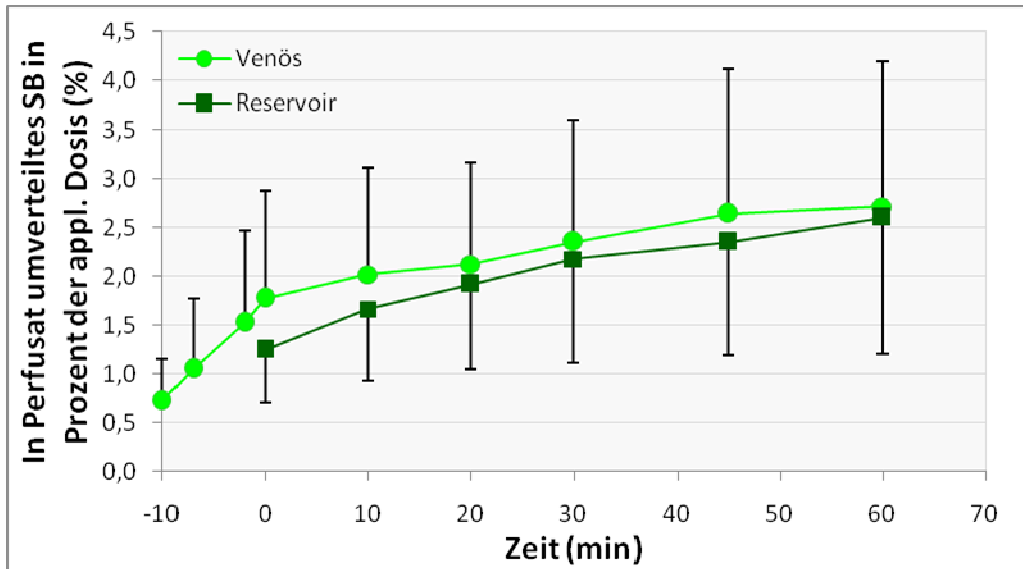
Patient 3 musste sich einer Lobektomie unterziehen, Patient 1 einer Bilobektomie und bei der Operation von Patient 2 handelte es sich um eine Pneumektomie. In jedem Fall konnten zwei Pulmonalarterien des Präparates katheterisiert werden. Die Perfusion wurde in allen Versuchen nach der Dosisapplikation des Salbutamol über 60 Minuten hinweg fortgesetzt, die verschieden langen Zeitspannen der Gesamtdauer von 104 bis 112 Minuten (siehe *Tabelle 4*) kamen durch zeitliche Unterschiede bei der Etablierung stabiler Ventilations- und Perfusionsparameter der individuellen Lungenpräparate vor der CA-Vernebelung zustande.

Erwartungsgemäß zeigte die Applikation von Carnitin keine bronchokonstriktorische Wirkung und es wurde ohne Verzögerung mit der Vernebelung der Zieldosis von 600 µg Salbutamol fortgefahren. Wirkstoffverluste, die durch Adsorption von SB an die Applikationsvorrichtung und die Verbindungsstücke zum Lungengewebe zustande kamen, beliefen sich auf  $3,9 \pm 2,7$  % der vernebelten Arzneistoffmenge, sodass eine im Lungenpräparat deponierte Dosis von  $601 \pm 142$  µg SB abgeschätzt wurde (siehe *D4.1 – Tabellarischer Anhang*). Durch die angewendete Methode zur Bestimmung der tatsächlich applizierten Dosis (siehe *C4.3 – Experimenteller Teil*) konnte allerdings der wieder ausgeatmete Wirkstoffanteil nicht berücksichtigt werden, sodass tendenziell von einer geringeren Arzneistoffdeposition im Zielgewebe als der hier abgeschätzten Menge ausgegangen werden sollte [108, 221].

Jeweils 15 Proben, die zu den festgelegten Zeitpunkten aus dem venösen Ausgang und dem Reservoir gewonnen worden waren, wurden für jedes der drei Perfusionsexperimente mittels LC-MS/MS auf ihren SB-Gehalt hin analysiert (siehe *C4.4.3 – Experimenteller Teil*). Die Konzentrationen wurden in Relation zur tatsächlich applizierten Dosis gesetzt und nach Bildung der jeweiligen arithmetischen Mittelwerte erfolgte die Darstellung des zeitlichen Verlaufes der Umverteilung von SB aus dem Lungengewebe in die Perfusionsflüssigkeit, wie in *Diagramm 10* abgebildet.

Die hellgrüne Kurve in *Diagramm 10* zeigt den Konzentrationsverlauf von Salbutamol, der in der Perfusionsflüssigkeit direkt aus dem venösen Ausgang des Lungenpräparates gemessen wurde, dargestellt als Prozent der applizierten SB-Dosis. Dabei repräsentieren die Konzentrationen zu den Zeitpunkten -10, -7 und -2 Minuten die initiale Absorptionsphase des  $\beta_2$ -Sympathomimetikums, da diese Proben bereits während des Vernebelungsvorganges von SB gewonnen wurden (siehe *C4.2.5 – Experimenteller Teil*). Der Zeitpunkt „0 Minuten“ bezeichnet das Ende der Dosisapplikation. Die dunkelgrüne Kurve in *Diagramm 10* stellt die Umverteilung von SB in den Perfusionspuffer dar, wobei die Proben aus dem Reservoir gewonnen wurden und die Analyse des Perfusates erst zum Ende der Applikation von SB (Zeitpunkt „0 Minuten“) einsetzte.

Bereits zwei Minuten nach Beginn der Dosisapplikation (siehe *Diagramm 10*, Zeitpunkt -10 min) von Salbutamol war der  $\beta_2$ -Agonist im Perfusat aus dem venösen Ausgang messbar. Dabei betrug die SB-Konzentration  $2,4 \pm 1,0$  ng/mL, entsprechend  $0,4 \pm 0,7$  % der applizierten Dosis (siehe *D4.2.1 - Tabellarischer Anhang*). Im Verlauf des Perfusionsexperimentes stieg der Gehalt des Arzneistoffes stetig an und erreichte eine Stunde nach Abschluss der SB-Dosierung gegen Versuchsende eine Konzentration von  $2,7 \pm 1,5$  % der applizierten Dosis ( $9,3 \pm 4,3$  ng/mL).



**Diagramm 10:** Umverteilung von Salbutamol (SB) von humanem Lungengewebe in Perfusionsflüssigkeit nach Applikation von Carnitin (CA).

Zeitlicher Verlauf der Umverteilung von SB in die Perfusionsflüssigkeit bei Versuchen am humanen Lungenperfusionsmodell nach erfolgter CA-Vernebelung. Dargestellt sind die Konzentrationsverläufe, die im venösen Ausgang des Lungenpräparates (hellgrüne Kurve) und im Reservoir (dunkelgrüne Kurve) bestimmt wurden, ausgedrückt als Prozent der tatsächlich applizierten SB-Dosis. [Mittelwert  $\pm$  mittlere Abweichung vom Mittelwert,  $n = 3$ ]

Die im Reservoir gemessene Konzentration SB war tendenziell über den gesamten Versuchsverlauf etwas geringer als die aus der Pulmonalvene, jedoch kann man auf Grund der Überschneidungen der Abweichungen der einzelnen Messpunkte von venösem Ausgang und Reservoir von einem annähernd gleichen Verlauf der Umverteilung sprechen. So wurden unmittelbar nach Abschluss des Vernebelungsvorganges  $1,2 \pm 0,5$  % der applizierten Dosis (entsprechend  $4,4 \pm 1,1$  ng/mL) im Reservoir wiedergefunden. Es folgte ein langsamer und kontinuierlicher Anstieg der SB-Konzentration, der zu Versuchsende in einem Gehalt von  $2,6 \pm 1,4$  % der applizierten Dosis ( $8,9 \pm 4,0$  ng/mL) resultierte (siehe D4.2.2 - *Tabellarischer Anhang*).

## 4.4 Diskussion der Versuche am humanen Lungenperfusionsmodell

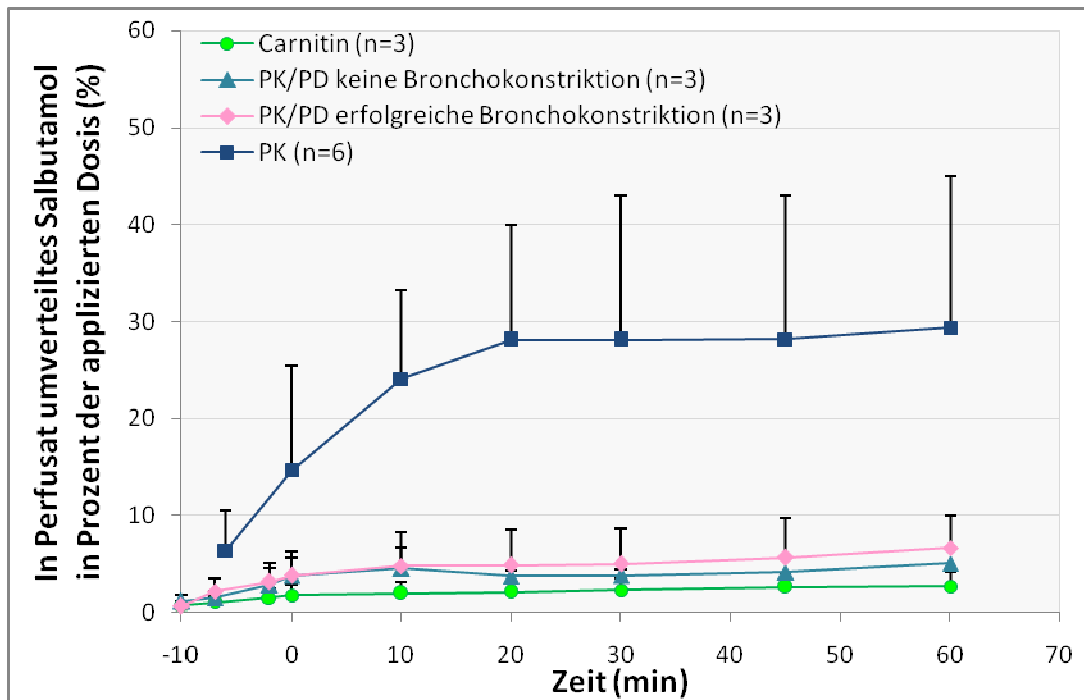
### 4.4.1 Vergleich der Ergebnisse mit bisherigen Untersuchungsergebnissen der PK- und PK/PD-Studie

Vorausgegangene Versuche mit dem humanen Lungenperfusionsmodell von Gnadt [57] hatten zu der Hypothese geführt, dass Methacholin möglicherweise durch Konkurrenzmechanismen auf molekularer Ebene unter Beteiligung von OCTN2 Transportern zu einer veränderten Umverteilung des Salbutamols vom Lungengewebe in die Perfusionsflüssigkeit führen könnte (siehe 4.1.2). Diese wurde durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt.

Die Unterschiede des Absorptionsverhaltens von SB mit bzw. ohne vorher verabreichtes OCTN2 Substrat werden bei Betrachtung der Diagramme sämtlicher in diesem Kapitel erwähnter Versuchsreihen mit dem humanen Lungenperfusionsmodell im direkten Vergleich evident und sind in *Diagramm 11* zusammenfassend dargestellt. Dabei wurde die Umverteilung des  $\beta_2$ -Agonisten in Abhängigkeit von der Zeit als Anteil der tatsächlich applizierten Dosis angegeben. Dunkelblau ist die Konzentrationskurve der PK-Studie dargestellt, in der ausschließlich SB an das Lungenpräparat verabreicht wurde (siehe 4.1.1.1), rosafarben der Verlauf des  $\beta_2$ -Sympathomimetikums im Perfusat nach erfolgreicher vorheriger Methacholin-induzierter Bronchokonstriktion (PK/PD-Studie, siehe 4.1.1.2) und hellblau das graphische Ergebnis der Versuche im Rahmen der PK/PD-Studie, bei denen trotz Vernebelung von Methacholin keine Bronchokonstriktion erzielt werden konnte (siehe 4.1.1.2). Die grüne Kurve in *Diagramm 11* repräsentiert den Konzentrationsverlauf von SB im Perfusat nach vorheriger Verabreichung von Carnitin in den eigenen Versuchen am humanen Lungenperfusionsmodell (siehe C4 – Experimenteller Teil).

Deutlich zu erkennen ist die sehr unterschiedliche pulmonale Absorption des Salbutamols in der PK-Studie einerseits und in den PK/PD- und Carnitin-Studien andererseits, da sich die dunkelblaue Kurve klar von den übrigen drei Diagrammen abgrenzt (siehe *Diagramm 11*). Während sowohl das zeitliche Verlaufsprofil als auch das Ausmaß der Umverteilung der rosafarbenen, hellblauen und grünen Konzentrationskurven der Carnitin- und PK/PD-Perfusionen einander gut entsprechen und die Diagramme nahezu deckungsgleich verlaufen, wurde nach alleiniger Applikation von SB in der PK-Studie eine wesentlich ausgeprägtere pulmonale Absorption des  $\beta_2$ -Agonisten festgestellt. Bereits im Laufe der Dosisvernebelung (Zeitpunkt -6 Minuten, siehe *Diagramm 11*) wurde in der PK-Studie ein SB-Spiegel von  $6,4 \pm 4,2$  % der applizierten Dosis gemessen, bei etwa 20 Minuten wurde mit  $28,1 \pm$

11,9 % ein Plateau erreicht und eine Stunde nach Ende der Wirkstoffgabe waren  $29,4 \pm 15,6$  % des applizierten SB in das Perfusat übergegangen, wobei sich die Konzentrationsangaben stets auf Proben aus der Pulmonalvene beziehen [57].



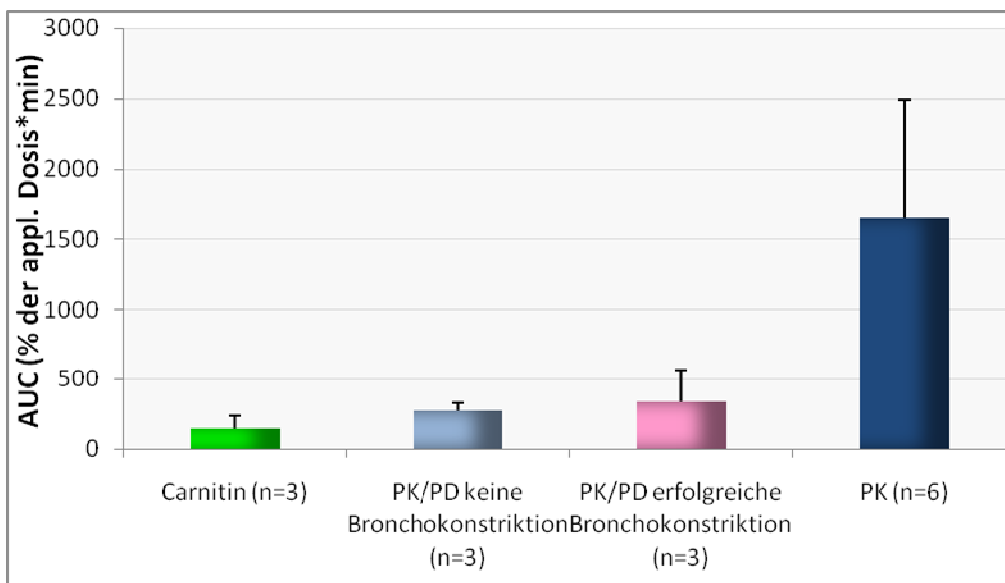
**Diagramm 11:** Umverteilung von Salbutamol (SB) in das Perfusat bei Experimenten am humanen Lungenperfusionsmodell – Vergleich der eigenen Ergebnisse der Perfusionsversuche mit Carnitin-Applikation mit den Ergebnissen der PK- und PK/PD-Studie von Gnadt [57].

Zeitlicher Verlauf der SB-Konzentration von Proben aus der Pulmonalvene der Perfusionsexperimente mit CA- und anschließender SB-Vernebelung (hellgrün,  $n = 3$ ) im Vergleich zur PK/PD-Studie ohne Bronchokonstriktion (hellblau,  $n = 3$ ), zur PK/PD-Studie mit erfolgreicher Bronchokonstriktion (rosafarben,  $n = 3$ ) und zur PK-Studie (dunkelblau,  $n = 6$ ). [Mittelwert  $\pm$  mittlere Abweichung vom Mittelwert bzw. Standardabweichung]

In der PK/PD-Studie konnten ebenfalls bereits während der SB-Verabreichung Wirkstoffspiegel gemessen werden, allerdings in einem wesentlich geringeren Konzentrationsbereich als bei der PK-Studie: In der initialen Absorptionsphase wurden zum Zeitpunkt – 10 Minuten bei den Experimenten mit erfolgreicher Bronchokonstriktion  $0,7 \pm 0,3$  % der applizierten Dosis Salbutamol in der Perfusionsflüssigkeit wiedergefunden, in Versuchen, bei denen trotz Methacholin-Gabe keine Bronchokonstriktion eintrat waren es  $1,2 \pm 0,6$  %. Es folgte in allen Experimenten der PK/PD-Reihe ein langsamer Anstieg des SB-Gehaltes im Perfusat, wobei zu Versuchsende, 60 Minuten nach Vernebelung des  $\beta_2$ -Sympathomimetikums  $6,7 \pm 3,3$  % bei

erfolgreicher Bronchokonstriktion bzw.  $5,1 \pm 0$  % der applizierten Dosis bei ausbleibender Verengung der Atemwege resultierten. In der Carnitin-Studie lagen die Salbutamolspiegel ähnlich niedrig wie in der PK/PD-Versuchsreihe: In der initialen Absorptionsphase zum Zeitpunkt -10 Minuten wurden  $0,7 \pm 0,4$  % der applizierten Dosis in Proben aus dem venösen Ausgang analysiert, bis zum Ende des Perfusionsexperimentes stieg die Konzentration im Perfusat langsam auf  $2,7 \pm 1,5$  % der applizierten Dosis an (siehe *D4.2.1 - Tabellarischer Anhang*).

Die nahezu deckungsgleichen Profile der Umverteilung von SB nach Applikation von MCh und CA einerseits und die andererseits wesentlich ausgeprägtere pulmonale Absorption nach Vernebelung von SB alleine spiegeln sich auch wider beim Vergleich der AUC-Werte über die initiale Absorptionsphase und die folgenden 60 Minuten Perfusionsdauer ( $AUC_{60}$ ), die aus den Konzentrationen der Perfusatproben des venösen Ausgangs mit Hilfe der Trapezmethode berechnet wurden und in *Diagramm 12* dargestellt sind.



**Diagramm 12:** AUC-Werte der pulmonalen Absorption von Salbutamol (SB) über 60 Minuten – Vergleich der Ergebnisse der Versuche mit dem humanen Lungenperfuisionsmodell.

Von links nach rechts dargestellt sind die  $AUC_{60}$ -Werte der eigenen Perfusionsexperimente mit Carnitin- und anschließender SB-Applikation (hellgrün), der PK/PD-Studie ohne Bronchokonstriktion (hellblau), der PK/PD-Studie mit erfolgreicher Bronchokonstriktion (rosa) und der PK-Studie (dunkelblau) [57]. Die Werte wurden aus den Konzentrationen der Proben aus dem venösen Ausgang berechnet.

Die farbliche Zuordnung der Balken zu den Versuchsreihen entspricht dabei dem bereits bekannten Schema: hellgrün ist die  $AUC_{60}$  der eigenen Versuchsreihe mit Carnitin- und

anschließender Salbutamol-Vernebelung gekennzeichnet, hellblau die der PK/PD-Studie von Gnadt [57] ohne Bronchokonstriktion; die Farbe Rosa repräsentiert das Ergebnis der PK/PD-Studie, bei der durch Methacholin erfolgreich eine Bronchokonstriktion herbeigeführt wurde und dunkelblau ist die  $AUC_{60}$  der PK-Studie [57], bei der ausschließlich SB vernebelt wurde.

Die  $AUC_{60}$ -Werte der Experimente, in denen vor Applikation des  $\beta_2$ -Sympathomimetikums ein OCTN2 Substrat an das Lungenpräparat verabreicht wurde, lagen alle in einem sehr ähnlichen Bereich. In *Diagramm 12* ist die vergleichbare Größenordnung der AUCs aus Carnitin- und PK/PD-Studie gut zu erkennen.

Nach zuvor erfolgter CA-Gabe wurde eine  $AUC_{60}$  von  $152 \pm 84$  % der applizierten Dosis\*min erreicht (siehe *D4.2.3 – Tabellarischer Anhang*). Damit lag das Ausmaß der pulmonalen Absorption von SB in einem ähnlichen Bereich wie in der PK/PD-Studie von Gnadt, bei der nach Vernebelung von Methacholin in Versuchen ohne erfolgte Bronchokonstriktion ein  $AUC_{60}$ -Wert von  $274 \pm 55$  % der applizierten Dosis\*min ermittelt wurde und in Versuchen mit erfolgreicher bronchialer Provokation eine  $AUC_{60}$  von  $340 \pm 230$  % der applizierten Dosis\*min [57].

Verglichen mit den Carnitin-Experimenten wurde dagegen ein um den Faktor 10,9 höherer  $AUC_{60}$ -Wert in der PK-Studie ( $1654 \pm 834$  % der applizierten Dosis\*min) ermittelt, in der vor Applikation des  $\beta_2$ -Agonisten kein OCTN2 Substrat vernebelt wurde [57]. Die AUC von Salbutamol in der Perfusionsflüssigkeit war in der PK-Studie auch um ein Vielfaches größer als in den PK/PD-Experimenten, wobei die Umverteilung von SB in das Perfusat ohne vorherige Applikation von MCh um den Faktor 4,9 (PK/PD-Versuche mit Bronchokonstriktion) bzw. 6 (PK/PD-Versuche ohne Bronchokonstriktion) höher war.

Die Ergebnisse der Perfusionsexperimente mit CA und der Vergleich mit der PK- und der PK/PD-Studie unterstützen die Vermutung, dass die in der PK/PD-Studie beobachtete, gegenüber der PK-Studie veränderte Pharmakokinetik des Salbutamols auf einem Konkurrenzmechanismus zwischen Methacholin und dem  $\beta_2$ -Sympathomimetikum auf molekularer Ebene beruht, sehr wahrscheinlich mit Beteiligung von OCTN2 Transportern. Die Vernebelung von CA im Vorfeld zur SB-Applikation führte genauso wie die Provokation mit Methacholin im Rahmen der PK/PD-Versuche unabhängig von einer Bronchokonstriktion zu einer verringerten pulmonalen Absorption des  $\beta_2$ -Sympathomimetikums, tendenziell sogar zu noch niedrigeren Perfusatkonzentrationen (siehe *Diagramm 11* und *Diagramm 12*). Da das in den Perfusionsexperimenten eingesetzte L-Carnitin als Inhibitor der OCTN2 Transporter fungiert [205], ist davon auszugehen, dass die Substanz unmittelbar nach der Applikation die Transporter innerhalb der Epithelzellen der Atemwege besetzte und eine ungehinderte

Beförderung des zeitlich verzögert ankommenden Salbutamols über OCTN2 durch die Epithelschicht nicht möglich war, zumindest nicht in dem Maße, wie es bei alleiniger Anwesenheit von SB in der PK-Studie möglich war.

Die ähnliche Umverteilung von Salbutamol in die Perfusionsflüssigkeit in den eigenen Experimenten mit CA und der PK/PD-Studie einerseits und die andererseits viel größere Umverteilung des  $\beta_2$ -Sympathomimetikums in der PK-Studie, erlauben die Schlussfolgerung, dass sowohl Carnitin als auch Methacholin zu einer verringerten pulmonalen Absorption von Salbutamol führen im Vergleich zur Umverteilung des  $\beta_2$ -Agonisten in die Perfusionsflüssigkeit bzw. im übertragenen Sinne in den systemischen Kreislauf *in-vivo*, wenn kein Kompetitor um molekulare Transportstrukturen vorhanden ist.

In den vorliegenden Versuchen am Perfusionsmodell mit CA wurde ein an die Applikationshilfe adsorbierter Anteil von  $3,9 \pm 2,7$  % der vernebelten SB-Menge und eine tatsächlich an das Lungenpräparat verabreichte Dosis von  $601 \pm 142$   $\mu\text{g}$  ermittelt (siehe 4.3). Demgegenüber stehen eine weitaus höhere adsorbierte Wirkstoffmenge und eine geringere deponierte Dosis bei Gnadt. Hier wurden durchschnittlich 17,6 % des vernebelten SB in der PK-Studie und 16,7 % in der PK/PD-Studie an die Bestandteile der Applikationshilfe adsorbiert. Dementsprechend erreichten auch geringere Wirkstoffmengen den Lungenlappen: In der PK/PD-Studie wurden im Mittel 379,8  $\mu\text{g}$  SB im Präparat deponiert und in der PK-Studie 269,9  $\mu\text{g}$ , wobei berücksichtigt werden muss, dass die Zieldosis der ersten drei Perfusionen dieser Versuchsreihe 150  $\mu\text{g}$  SB betrug und diese nach Quantifizierung der ersten Proben aus analytischen Überlegungen für die restlichen drei Experimente auf 600  $\mu\text{g}$  erhöht wurde [57]. Diese Unterschiede in der applizierten Dosis von SB zwischen den eigenen Perfusionsexperimenten und denen von Gnadt könnten auf einer unvollständigen Erfassung der an die Applikationshilfe adsorbierten Wirkstoffmenge in den Carnitin-Versuchen beruhen, obwohl die Methode zur Bestimmung von Gnadt übernommen wurde. Auch eine von den vorherigen Versuchen abweichende Technik bei Betätigung des Verneblers während der Inspirationsphase bei Applikation des Salbutamols könnte zu einer höheren deponierten Dosis im Präparat bei der CA-Studie beigetragen haben. Diese Unterschiede zwischen den eigenen Perfusionsversuchen und den Experimenten von Gnadt in den absoluten an die Applikationshilfe adsorbierten bzw. an das Lungenpräparat applizierten Wirkstoffmengen können nicht hinreichend erklärt werden. Die Darstellungsweise der in das Perfusat umverteilten SB-Menge als Prozent der applizierten Dosis ermöglicht jedoch trotz dieser Unterschiede einen direkten Vergleich der pulmonalen Absorption des  $\beta_2$ -Sympathomimetikums nach CA-Vernebelung, nach vorheriger Provokation mit Methacholin (PK/PD-Studie) und nach



alleiniger Applikation des SB ohne vorausgehende Gabe möglicher Kompetitoren um Transportmechanismen (PK-Studie).

#### **4.4.2 Die Ergebnisse im Kontext von *in-vitro*-Studien**

Im *ex-vivo*-Modell des isolierten humanen Lungenlappens konnte durch die vorliegenden Ergebnisse sehr nahe an physiologischen Verhältnissen beobachtet werden, was bereits im Rahmen von *in-vitro*-Versuchen gezeigt wurde: Die Beteiligung von Transportern an der pulmonalen Absorption des Salbutamols und damit einhergehend potentielle Wechselwirkungen bzw. Konkurrenzmechanismen zwischen verschiedenen Substraten von Organischen Kation/Carnitin Transportern auf molekularer Ebene.

Ehrhardt *et al.* zeigten, dass durch die zwei humanen Bronchialepithelzelllinien Calu-3 und 16HBE14o-, die beide humane OCT Transporter und insbesondere OCTN2 exprimierten, ein aktiver Transport von SB durch die Barriere des Epithels stattfand. Dabei war der Vorgang sättigbar und gleichzeitig anwesende, im Überschuss vorhandene organische Kationen wie Tetraethylammoniumionen oder Guanidin inhibierten die Absorption von SB [201]. Auch Ohashi *et al.* berichteten von gegenseitiger Inhibition des OCTN2-vermittelten Transportes zwischen Carnitin und organischen Kationen, so wurde beispielsweise die Aufnahme von CA über OCTN2 Transporter durch Methacholin und Acetylcholin unterbunden [209, 213].

Die Erkenntnisse zur pulmonalen Absorption des Salbutamol aus den Experimenten am humanen Lungenperusionsmodell belegen erstmals die physiologische Relevanz dieser Vorgänge auf molekularer Ebene und könnten auch für andere inhalativ applizierte Wirkstoffe bedeutsam sein. So werden die quartären Amine Ipratropium und Tiotropium in bronchialen Epithelzellen hauptsächlich durch OCTN2 und in geringerem Ausmaß über OCTN1 aufgenommen, wie eine Forschergruppe um Nakamura *et al.* bei Untersuchungen mit der humanen Bronchial-Epithelzelllinie BEAS-2B und HEK293-Zellen herausfand [200]. Wechselwirkungen oder Konkurrenzreaktionen gleichzeitig verabreichter Transportersubstrate untereinander sind bei der pulmonalen Absorption dieser Wirkstoffe durchaus denkbar, obgleich nicht bekannt ist, dass hieraus eine klinische Relevanz resultiert.

Durch die Experimente mit Carnitin bzw. Methacholin und Salbutamol am humanen Lungenperusionsmodell konnte gezeigt werden, dass eine Übertragung der *in-vitro*-Ergebnisse aus den Zellkulturversuchen auf Verhältnisse *in-vivo* möglich ist, da die Validität des Lungenperusionsmodells als Vorhersageinstrument für reale Konditionen bereits mehrfach gezeigt wurde [52, 57]. Dabei wäre eine Bestätigung der Erkenntnisse zu molekularen Transportmechanismen inhalativ applizierter Wirkstoffe durch Humanstudien dennoch sinnvoll,

gerade im Hinblick auf die Klärung der klinischen Relevanz des Konkurrenzverhaltens verschiedener Transportersubstrate bei simultaner Applikation.

Bei Überlegungen zu einer klinischen Bedeutung dieser Mechanismen *in-vivo* muss beachtet werden, dass MCh in den Lungenperfusionsexperimenten in weitaus höheren Konzentrationen eingesetzt wurde als es *in-vivo* aus ethischen Gründen zur objektiven Testung der bronchialen Hyperreaktivität verwendet wird. Die Europäische Studie zu Atemwegserkrankungen (European Community Respiratory Health Survey, ECRHS) untersuchte die Variabilität bronchialer Reaktivität in sechzehn Ländern und definierte dabei einen hohen Grad an Hyperreaktivität als eine Abnahme des FEV<sub>1</sub> um 20 % bei Gabe einer MCh-Dosis von weniger als 1 mg [222]. Im klinischen Alltag gibt es verschiedene Vorgehensweisen, eine bronchiale Provokation mit MCh durchzuführen; die amerikanische Leitlinie empfiehlt je nach verwendeter Methode den Einsatz von Lösungen aus einem Konzentrationsbereich von 0,0625 oder 0,03 mg/mL bis 16 mg/mL, für Experimente im Rahmen klinischer Studien bis zu 32 mg/mL [223]. In der PK/PD-Studie wurden Methacholinlösungen einer vergleichsweise hohen Konzentration von durchschnittlich 26,5 mg/mL vernebelt und die verabreichte Dosis, die zu einer erfolgreichen Provokation führte, belief sich auf 2,5 – 180,5 mg MCh [57]. Basierend auf diesen Versuchen mit MCh im Rahmen der PK/PD-Studie (siehe 4.1.1.2) wurde für die eigenen Experimente mit dem humanen Lungenperfuptionsmodell auch eine dementsprechend hohe Carnitindosis von 62,7 mg gewählt (siehe 4.2.3). Es ist recht wahrscheinlich, dass eine veränderte pulmonale Absorption des SB erst ab einer bestimmten Dosis des vorher verabreichten OCTN2 Substrates auftritt und weitere Versuche wären nötig, um diesen Sachverhalt zu klären.

Eine Limitierung des humanen Lungenperfuptionsmodells als Instrument zur Beschreibung pharmakokinetischer Prozesse auf molekularer Ebene ist sicherlich, dass nicht bekannt ist, in welchem Maße das Vorhandensein und die Aktivität von Transportproteinen im eingesetzten Gewebe durch die vorliegende Erkrankung des Patienten in Mitleidenschaft gezogen wurden. Es ist außerdem unklar, ob und in welcher Weise eine langjährige medikamentöse Behandlung der Patienten das Transportermuster in der Lunge beeinflussen kann [205]. Zwar wurden bei den Versuchen mit dem humanen Lungenperfuptionsmodell Patienten ausgeschlossen, die im Rahmen ihrer Krebserkrankung eine neoadjuvante Therapie erhalten hatten, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass das eingesetzte Gewebe bis auf den Tumor weitestgehend intakt war. Aber durch die Tatsache, dass von den Patienten, die an einem Lungenkarzinom erkranken, zuvor ca. 50 % von ihnen bereits über Jahre hinweg an COPD oder einer obstruktiven Atemwegserkrankung litten, ist es leicht einsehbar, dass ein

chronischer Einsatz medikamentöser Maßnahmen nötig war und deren Einfluss auf das Transportermuster der Lungen unvorhersehbar ist [205, 224, 225]. Von einem anderen Blickwinkel aus betrachtet ist es jedoch von höchster Bedeutung, pharmakokinetische und pharmakodynamische Untersuchungen, zumindest was topisch eingesetzte Arzneimittel betrifft, direkt am für Patienten charakteristischen Gewebe durchzuführen, da dieses ja den Zielort der medikamentösen Maßnahmen darstellt. Zudem bestätigten die Beobachtungen mit dem Lungenperfuisionsmodell, wie bereits weiter oben in diesem Kapitel beschrieben, Vorgänge auf molekularer Ebene, die in *in-vitro*-Versuchen mit etablierten Zellkulturmodellen mit Imitation einer intakten Funktionalität des Lungenepithels beschrieben wurden [201, 209, 213].

Es scheint ein vielversprechender Ausblick für inhalativ angewendete Arzneimittel zu sein, sich die Transporter-vermittelten Mechanismen zu Nutze zu machen. Zum Einen könnte man systematisch durch die Transporter kontrolliert über den Weg der Lunge eine systemische Wirkung erzielen [200]. Vom therapeutischen Ziel einer lokalen Wirkung her betrachtet, könnte eine gezielte Einbeziehung der Transporterproteine in der Lunge auch dazu genutzt werden, eine verlängerte Verweilzeit topischer Wirkstoffe im Zielgewebe zu erreichen [205].

Wie die vorliegenden Experimente zeigen, eignet sich das humane Lungenperfuisionsmodell dazu, den Beitrag der einzelnen Transporter zur pulmonalen Absorption inhalativ verabreichter Wirkstoffe in physiologischer Umgebung zu untersuchen.

## 5 Bestimmung der Konzentration von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) in Proben aus Lungenperfusionsversuchen und Vollblut-Äquivalent-Proben mittels *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA)

### 5.1 Hintergrund

In den insgesamt zwölf Experimenten am humanen Lungenperfusionsmodell im Rahmen der PK/PD-Studie von Gnadt [57] mit Methacholin (MCh)-Vernebelung und anschließender Applikation eines  $\beta_2$ -Sympathomimetikums (siehe 4.1.1.2) reagierten 50 % der Lungenpräparate, unabhängig von Typ (Lobektomie von Unter- Mittel- oder Oberlappen, Bilobektomie oder Pneumektomie) und Ausgangsgewicht des Lungengewebes, nicht auf die Provokation und eine Bronchokonstriktion blieb in diesen Fällen auch bei sehr hohen MCh-Konzentrationen von durchschnittlich 137,3 mg (70,2 bis 180,5 mg) aus. In den sechs Perfusionen mit erfolgreicher Bronchokonstriktion genügte dagegen eine geringere MCh-Dosis von im Mittel 33,0 mg (2,5 bis 120,4 mg), um eine Verengung der Atemwege auszulösen. Dabei wurde eine erfolgreiche Provokation definiert als eine Abnahme der Ventilationsparameter Minutenvolumen und Atemzugvolumen um 40 % gegenüber den Referenzwerten zu Beginn des jeweiligen Perfusionsexperimentes, sobald sich stabile Beatmungsbedingungen eingestellt hatten [57]. Auch *in-vivo* gibt es eine Non-Responderrate gegenüber der Provokationssubstanz MCh von bis zu 55 % [197]. Dennoch war es erstaunlich, dass selbst sehr hohe kumulative Dosen MCh, die um ein Vielfaches die *in-vivo* üblicherweise eingesetzten Mengen überstiegen (siehe 4.4.2), in der Hälfte der Experimente der PK/PD-Reihe keine Bronchokonstriktion herbeiführen konnten und dass folglich kein Zusammenhang zwischen der Höhe der MCh-Dosis und einer erfolgreichen Provokation festgestellt werden konnte.

Als eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wurde eine erhöhte Konzentration von PGE<sub>2</sub> in der Perfusionsflüssigkeit, verursacht durch die bei den Spendern vorliegende Erkrankung Bronchialkarzinom, in Erwägung gezogen [57]. Durch eine über die cAMP-abhängige Proteinkinase A vermittelte Relaxation der glatten Bronchialmuskulatur besitzt PGE<sub>2</sub> potentiell eine bronchodilatierende Wirkung, die dem bronchokonstriktorischen Effekt des Methacholins entgegensteht [226].

Lungentumore zeigen eine gesteigerte Sekretion von Interleukin-6, Interleukin-10 und Vascular Endothelial Growth Factor, was in immunsuppressiven Funktionen resultiert [227, 228]. Daneben tragen sie durch eine erhöhte Expression von Cyclooxygenase-2 (COX-2) zu einer gesteigerten Produktion von PGE<sub>2</sub> bei [229, 230]. Zusätzlich wird die NAD<sup>+</sup>-abhängige

15-Hydroxyprostaglandinhydrogenase, die bei der Prostaglandin-Inaktivierung eine wichtige Rolle spielt, in Anwesenheit verschiedener Bronchialkarzinome in verringertem Ausmaß exprimiert, sodass höhere PGE<sub>2</sub>-Spiegel erreicht werden können [231]. PGE<sub>2</sub> spielt für die Tumorprogression als Mediator eine Rolle beim Zellwachstum von Bronchialkarzinomen, der Invasion, Zellmigration und Apoptose-Resistenz [232-235].

Auch der chirurgische Eingriff selbst, dem sich die Patienten im Rahmen der Lobektomie, Bilobektomie oder Pneumektomie unterziehen mussten, könnte als natürliche Reaktion des Körpers auf die invasive Maßnahme zu einer gesteigerten Sekretion von PGE<sub>2</sub> beigetragen haben. Das Gewebshormon ermöglicht es dem Organismus, durch Antreiben des Entzündungsgeschehens, Verengung der Blutgefäße und verstärkte Blutgerinnung und Schmerzwahrnehmung, auf Wunden und Verletzungen zu reagieren. So wurde beispielsweise bei Patienten, die sich einem chirurgischen Eingriff am Hüftgelenk unterzogen, eine Stunde nach Operationsbeginn eine signifikante Zunahme der PGE<sub>2</sub>-Plasmaspiegel gegenüber dem Anfang der OP festgestellt [236].

PGE<sub>2</sub> geht hervor aus der ungesättigten Fettsäure Arachidonsäure, die in veresterter Form in den Phospholipiden der Zellmembran vorkommt [237]. Nach Freisetzung durch die Phospholipase wird die Arachidonsäure durch die Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2) mit gleichzeitiger Peroxidase-Aktivität in Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) umgewandelt, aus dem verschiedene biologisch aktive Prostanoiden und Thromboxane synthetisiert werden. Während COX-1 grundsätzlich im normalen Gewebe exprimiert wird und essentiell ist für diverse physiologische Funktionen wie beispielsweise das Aggregationsgeschehen bei der Blutgerinnung, die Integrität der Magenschleimhaut und die Erhaltung des renalen Blutflusses, wird die Produktion von COX-2 in neoplastischem und entzündetem Gewebe induziert.

Das Enzym Cyclooxygenase-2 ist an der Bildung von PGE<sub>2</sub> beteiligt [237]. Durch Bindung an vier Unterformen von Prostaglandin E Rezeptoren EP1 bis EP4, die zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören, entfaltet PGE<sub>2</sub> seine mannigfaltigen Wirkungen [238]. So ist das Gewebshormon unter anderem maßgeblich beteiligt an der Entstehung von Entzündungen und Schmerz, da es die Gefäßpermeabilität erhöht und den durch Mediatoren wie Bradykinin oder Histamin hervorgerufenen Schmerz durch Sensibilisierung nozizeptiver Nervenenden potenziert. Weiterhin besitzt PGE<sub>2</sub> eine über den EP3 Rezeptor vermittelte pyretische Aktivität, es begrenzt durch Erhöhung von cAMP im Rahmen einer negativen Rückkopplung immunologische Funktionen, inhibiert die Interleukin-2- und Interferon- $\gamma$  Bildung durch T-Lymphozyten und die Freisetzung von Interleukin-1 und TNF $\alpha$  aus Makrophagen. Gleichzeitig stimuliert es jedoch die Differenzierung unreifer Zellen des Immunsystems [238-239].

241]. Durch ein Zusammenspiel mehrerer Mechanismen wirkt PGE<sub>2</sub> zytoprotektiv auf den Magen: EP3-vermittelt reduziert PGE<sub>2</sub> die Sekretion der Magensäure durch die Belegzellen der Magenschleimhaut, es steigert die Durchblutung der Mukosa und regt die Sekretion von viskösem Schleim und Bikarbonat über den EP3 Rezeptor an. Daneben stimuliert PGE<sub>2</sub> die EP1 Rezeptoren der glatten Muskelzellen des Gastrointestinaltraktes und bewirkt somit deren Kontraktion [238, 242, 243].

In Bezug auf die Lunge kann man unterscheiden zwischen Effekten von PGE<sub>2</sub> auf die glatten Muskelzellen der Atemwege und Beteiligung des Gewebshormons an entzündlichem Geschehen [244]. Durch die Aktivierung von EP2 und EP4 Rezeptoren hat PGE<sub>2</sub> potentiell einen relaxierenden Effekt auf die glatte Muskulatur der Atemwege; wie beim  $\beta_2$ -Adrenozeptor (siehe *Abbildung 12, Kapitel 3.2*) führt die Stimulation der Prostaglandinrezeptoren zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase, in der Folge zu einer vermehrten Umwandlung von Adenosintriphosphat (ATP) in cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und schließlich zu einer Aktivierung der Proteinkinase A, die durch Phosphorylierung Tonus-regulierender Zielproteine eine Relaxation der glatten Bronchialmuskulatur bewirkt [226].

In den Perfusionsexperimenten der PK/PD-Reihe ohne erfolgreiche Bronchokonstriktion übten somit möglicherweise höhere PGE<sub>2</sub>-Spiegel, die vom Tumorgewebe in dem Präparat verursacht wurden, eine protektive Wirkung gegen den atemwegsverengenden Reiz durch die Provokationssubstanz aus [57]. So wurde für Mäuse gezeigt, dass vernebeltes PGE<sub>2</sub> zu einer verminderten bronchokonstriktorischen Reaktion auf eine Provokation mit Methacholin führte [245, 246].

Um festzustellen, ob Unterschiede in den PGE<sub>2</sub>-Spiegeln zwischen Lungenperfusionsexperimenten mit erfolgreicher Methacholin-induzierter Bronchokonstriktion einerseits und ausbleibender Verengung der Atemwege andererseits existierten, wurden Proben der Perfusionsflüssigkeit aus der Reihe der PK/PD-Studie von Gnadt [57] auf ihren PGE<sub>2</sub>-Gehalt hin analysiert.

## 5.2 Prinzip der Bestimmung

### 5.2.1 Proben aus Perfusionsexperimenten

Die Proben, die im Rahmen der eigenen experimentellen Arbeit auf ihren PGE<sub>2</sub>-Gehalt hin analysiert wurden, stammten aus den Perfusionsversuchen der PK/PD-Studie von Gnadt (siehe 4.1.1.2), wobei in sechs Experimenten nach der Provokation mit Methacholin Salbutamol (SB)

vernebelt wurde und in den übrigen sechs Versuchen GW597901 appliziert wurde [57]. Die Nummerierung der einzelnen Experimentreihen erfolgte dabei für jeden  $\beta_2$ -Agonisten getrennt, chronologisch in aufsteigender Reihenfolge (SB 1 – SB 6 und GW 1 – GW 6). Je nach untersuchter Substanz wurden zwei unterschiedliche Perfusionsflüssigkeiten eingesetzt: In den Experimenten mit SB wurde reiner Perfusionspuffer (siehe C4.1.4, C5.1.2.1 – *Experimenteller Teil*) verwendet, in den Untersuchungen zu GW597901 dagegen eine Blutzubereitung mit einem Hämatokritgehalt von 20 % (siehe C5.1.2.2 – *Experimenteller Teil*).

Die Proben, die zur PGE<sub>2</sub>-Konzentrationsbestimmung mittels ELISA herangezogen wurden, dienten ursprünglich Gnadt [57] bei der Quantifizierung der  $\beta_2$ -Sympathomimetika als Kontrolle (Blank) der Matrix und wurden jeweils zu Beginn der Perfusionsexperimente nach Passage des Lungenlappens aus dem Reservoir gewonnen, sobald die Perfusions- und Ventilationsparameter stabile Werte erreicht hatten und bevor die Applikation eines Wirkstoffes stattfand (siehe C5.2.1 – *Experimenteller Teil*). In Bezug auf die vorliegende quantitative Bestimmung mittels ELISA bedeutet dies, dass die ermittelten PGE<sub>2</sub>-Spiegel allein vom perfundierten Gewebe im Zustand unmittelbar nach der Resektion stammen konnten. Da die für die Herstellung der Perfusionsflüssigkeit verwendeten Erythrozytenkonzentrate (siehe C5.1.2.2 – *Experimenteller Teil*) potentiell einen Basalspiegel an PGE<sub>2</sub> enthalten konnten, wurden für die Proben aus Experimenten mit Blutgemisch zur Feststellung einer solchen Basalkonzentration in der Perfusionsflüssigkeit zusätzlich Leerwertkontrollen analysiert, wie im nachfolgenden Kapitel beschrieben wird.

Die Proben wurden nach Schockgefrierung tiefgefroren gelagert, wobei bei den Perfusionen mit Blutmischung zuvor die zellfreie Fraktion durch Zentrifugation von den festen Blutbestandteilen abgetrennt wurde (siehe C5.2.1 – *Experimenteller Teil*). Die PGE<sub>2</sub>-Konzentrationsmessung mittels ELISA wurde mit den zellfreien Überständen durchgeführt.

### **5.2.2 Vollblut-Äquivalent-Proben als Leerwertkontrollen**

Es war nicht bekannt, in welchem Ausmaß die für die Herstellung der Perfusionsflüssigkeit verwendeten Erythrozytenkonzentrate (siehe C5.1.2.2 – *Experimenteller Teil*) PGE<sub>2</sub> enthielten. Um in Experimenten mit Blutgemisch als Perfusionsflüssigkeit (GW 1 – GW 6) einen möglichen Grundspiegel des PGE<sub>2</sub> in der verwendeten Matrix zu ermitteln und einer damit einhergehenden Fehlinterpretation der vorliegenden PGE<sub>2</sub>-Konzentration in den Perfusatproben entgegenzuwirken, wurden insgesamt sechs verschiedene Blutproben als Leerwertkontrollen aus sechs unterschiedlichen Erythrozytenkonzentrat-Chargen hergestellt, wie Perfusionsproben behandelt und ebenfalls auf ihren PGE<sub>2</sub>-Gehalt hin analysiert.

Die Zubereitung der Leerwertkontrollen erfolgte dabei in Analogie zur Mischung von Perfusionsflüssigkeit für die Experimente am Lungenperfusionsmodell (siehe C5.2.2 – *Experimenteller Teil*) und es wurde versucht, die einzelnen Schritte, denen die Proben aus den Perfusionsversuchen unterzogen wurden, auch bei den Leerwertkontrollen möglichst nachzustellen. Nach der Bestimmung des Anteils der zellulären Bestandteile wurde dem Erythrozytenkonzentrat Perfusionspuffer (siehe C4.1.4 – *Experimenteller Teil*) zugemischt, so dass ein Hämatokritgehalt von 20 % resultierte. Während der Perfusionsexperimente wurde die Perfusionsflüssigkeit auf 37 °C erwärmt, um dem Lungengewebe möglichst physiologische Bedingungen zu bieten. Bei der Herstellung der Leerwertkontrollen folgte dem Zubereiten der Blutgemisch-Proben daher eine Lagerung über 150 Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank, wobei die Proben durch Positionierung auf einem Wippschüttler konstant durchmischt wurden. Die Dauer der Inkubationszeit von zweieinhalb Stunden wurde entsprechend der Zeit gewählt, die sich die Perfusionsflüssigkeit bei einem Perfusionsexperiment ungefähr inklusive Vorbereitungszeit, Wartezeit bis zur Verfügbarkeit des Lungenpräparates und Versuchsdauer im System der Perfusionsapparatur befand. Der beständigen Bewegung der Perfusionsflüssigkeit durch die Pumpen bei Experimenten am Lungenperfusionsmodell entsprach die Bewegung der Blutproben auf dem Wippschüttler, zudem wurde dadurch einem schwerkraftbedingten Absinken der enthaltenen festen Blutbestandteile entgegengewirkt. Der Inkubation der Leerwertkontrollen folgte eine 30-minütige Lagerung auf Eis, die die Aufbewahrung der Perfusionsproben während des Transportes von der Klinik zum Institut für Pharmazie in Würzburg nachahmte (siehe C5.2.1 – *Experimenteller Teil*). Da für die quantitative Bestimmung des PGE<sub>2</sub> mittels ELISA die zellfreie Fraktion der Blutproben eingesetzt wurde, wurde diese wie bei den Proben aus Perfusionsversuchen mit GW597901 durch Zentrifugation gewonnen und nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff bei -25 °C eingelagert (siehe C5.2.2 – *Experimenteller Teil*).

### **5.2.3 Durchführung des ELISA**

Die Konzentration an Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) in den Proben wurde mittels spezifischem Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) bestimmt, wobei das eingesetzte Correlate-EIA™ PGE<sub>2</sub> Kit nach dem Prinzip der Competition funktionierte.

Gemäß der Angaben in der Herstellerinformation (siehe C5.2.4 – *Experimenteller Teil*) erfolgte die Zugabe einer PGE<sub>2</sub>-konjugierten Lösung alkalischer Phosphatase und einer monoklonalen PGE<sub>2</sub>-Antikörper Lösung zu den Standardlösungen, den Blut-Leerwertkontrollen und den Proben aus Lungenperfusionsversuchen. In der sich anschließenden Inkubationszeit



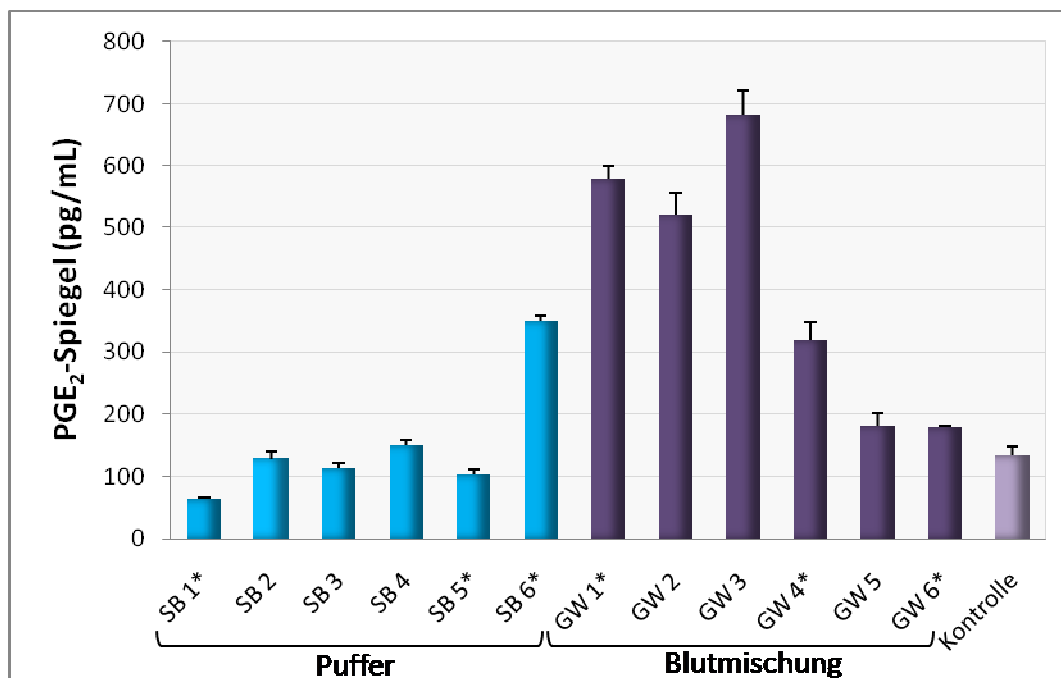
konnten die monoklonalen PGE<sub>2</sub>-Antikörper in einer kompetitiven Art und Weise an PGE<sub>2</sub> aus den Proben bzw. aus den Standardzubereitungen oder an PGE<sub>2</sub>, das kovalent an Moleküle der alkalischen Phosphatase angeschlossen war, binden. Nach Entfernung überschüssiger, nicht an die Mikrotiterplatte gebundener Reagenzien in einem Waschvorgang, wurde Substrat hinzugegeben und je nach Anwesenheit des enzymatischen Reaktionspartners, entstand während der zweiten Inkubationszeit in den Näpfen eine gelbe Färbung. Unmittelbar nach dem Stoppen der Enzymreaktion mittels Natriumphosphat-Lösung wurde die generierte Farbe durch einen Mikrotiterplatten-Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm vermessen, wobei die Intensität der Farbreaktion umgekehrt proportional zur PGE<sub>2</sub>-Konzentration in der Probe war. Die Quantifizierung der Proben aus Perfusionsversuchen und der Leerwertkontrollen erfolgte mittels einer im gleichen Versuchsansatz gemessenen PGE<sub>2</sub>-Standardreihe bekannter Konzentration nach Erstellung einer linearen Kalibriergeraden auf Basis einer Logit-Log Transformation der jeweiligen Absorptionswerte (siehe C5.2.5– *Experimenteller Teil*). Für jede Probe wurden drei PGE<sub>2</sub>-Gehaltsbestimmungen mittels ELISA durchgeführt und der Mittelwert gebildet.

### 5.3 Ergebnisse

Grundsätzlich zeigte sich in Proben aus Lungenperfusionsversuchen ein höherer PGE<sub>2</sub>-Gehalt, wenn als Perfusionsflüssigkeit ein Gemisch aus Erythrozytenkonzentrat und Perfusionspuffer als Vollblut-Äquivalent - (siehe C5.1.2.2 – *Experimenteller Teil*) eingesetzt wurde, im Vergleich zu reinem Perfusionspuffer (siehe C4.1.4, C5.1.2.1 – *Experimenteller Teil*). Dieser Sachverhalt ist deutlich in *Diagramm 13* erkennbar, in der die jeweils analysierten PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen dargestellt sind. Die blauen Säulen zeigen das Ergebnis für die sechs Perfusionsexperimente der PK/PD-Studie SB 1 – SB 6, in denen später Salbutamol appliziert wurde und Puffer als Perfusionsflüssigkeit diente. Die PGE<sub>2</sub>-Spiegel der Proben aus Perfusionen der PK/PD-Studie mit nachfolgender GW597901-Applikation und Blutmischung werden dagegen durch Säulen in der Farbe dunkellila repräsentiert (GW 1 – GW 6) und in hellem lila ist der mittlere PGE<sub>2</sub>-Gehalt der sechs verschiedenen Leerwertkontrollen aus Vollblut-Äquivalent dargestellt, die in Analogie zur Perfusionsflüssigkeit hergestellt wurden, jedoch nicht mit Lungengewebe in Kontakt kamen (siehe 5.2.2). Die Perfusionsexperimente, bei denen mit Hilfe von Methacholin (MCh) erfolgreich eine Bronchokonstriktion herbeigeführt werden konnte, sind mit \* gekennzeichnet.

In den Experimenten mit Blut (GW 1 – GW 6) wurden PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen von im Mittel  $410 \pm 184$  pg/mL (178 - 683 pg/mL) gemessen und in den Perfusionen mit Salbutamol

(SB 1 – SB 6), in denen reiner Puffer als Perfusionsflüssigkeit eingesetzt wurde, fanden sich mit durchschnittlich nur  $152 \pm 66$  pg/mL (64 - 350 pg/mL) deutlich niedrigere Spiegel des Gewebshormons (siehe D5.1 und D5.2 – Tabellarischer Anhang). Im Überstand der Blutproben, die als Leerwertkontrollen dienten und die nicht mit Lungengewebe in Kontakt kamen, wurde eine PGE<sub>2</sub>-Konzentration von  $133 \pm 15$  pg/mL (114 - 165 pg/mL) gemessen (siehe D5.3 – Tabellarischer Anhang). Trotz eines PGE<sub>2</sub>-Grundspiegels, der, wie die Untersuchung der Leerwertkontrollen zeigt, auch allein durch die verwendete Matrix zustande kam, lag tendenziell in Proben aus Perfusionsversuchen mit Blutmischung eine höhere PGE<sub>2</sub>-Konzentration vor.



**Diagramm 13:** PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen vor Applikation eines Wirkstoffes in zwölf Versuchen der PK/PD-Studie am humanen Lungenperfusionsmodell und der Vollblut-Äquivalent-Leerwertkontrolle im Vergleich.

Die blauen Säulen zeigen den PGE<sub>2</sub>-Gehalt, der in den sechs Perfusionsexperimenten mit späterer Salbutamol-Vernebelung und Puffer als Perfusionsflüssigkeit analysiert wurde (SB 1 – SB 6). Dunkellila ist die PGE<sub>2</sub>-Konzentration der Perfusionen mit Blutmischung (GW 1 – GW 6) und helllila die der sechs verschiedenen Leerwertkontrollen aus Vollblut-Äquivalent dargestellt. Mit \* gekennzeichnete Versuche bezeichnen Perfusionsexperimente mit erfolgreicher MCh-induzierter Bronchokonstriktion. [Mittelwert ± mittlere Abweichung vom Mittelwert, n = 3; Kontrolle n = 6]

In Experimenten mit Perfusionspuffer unterschied sich die durchschnittliche Konzentration an PGE<sub>2</sub> kaum, unabhängig davon, ob eine Bronchokonstriktion ausgelöst worden war oder nicht: Während bei SB 1, SB 5 und SB 6 (erfolgreiche Bronchokonstriktion) Spiegel von  $172 \pm$

118 pg/mL PGE<sub>2</sub> (64 – 350 pg/mL) gemessen wurden, lag der PGE<sub>2</sub>-Spiegel bei den Experimenten ohne Bronchokonstriktion (SB 2, SB 3 und SB 4) mit  $131 \pm 13$  pg/mL (114 – 151 pg/mL) in einem ähnlichen Bereich (siehe *D5.2 – Tabellarischer Anhang*). Vor allem die große Variabilität der PGE<sub>2</sub>-Konzentration in den Experimenten mit erfolgreicher Provokation ließ eine Beobachtung von unterschiedlichen Tendenzen in Abhängigkeit einer Verengung der Atemwege nicht zu.

Leichte Unterschiede in der Höhe der PGE<sub>2</sub>-Spiegel zeigten sich dagegen bei den Versuchen mit Blutmischung: Wenn die Provokation mit MCh nicht zur Bronchokonstriktion führte, lag der PGE<sub>2</sub>-Gehalt durchschnittlich bei  $462 \pm 186$  pg/mL (182 – 683 pg/mL). Mit  $358 \pm 146$  pg/mL (178 – 578 pg/mL) ergab die Analyse der Proben von Perfusionsexperimenten mit einer erfolgreich herbeigeführten Verengung der Atemwege tendenziell niedrigere PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen.

## 5.4 Diskussion

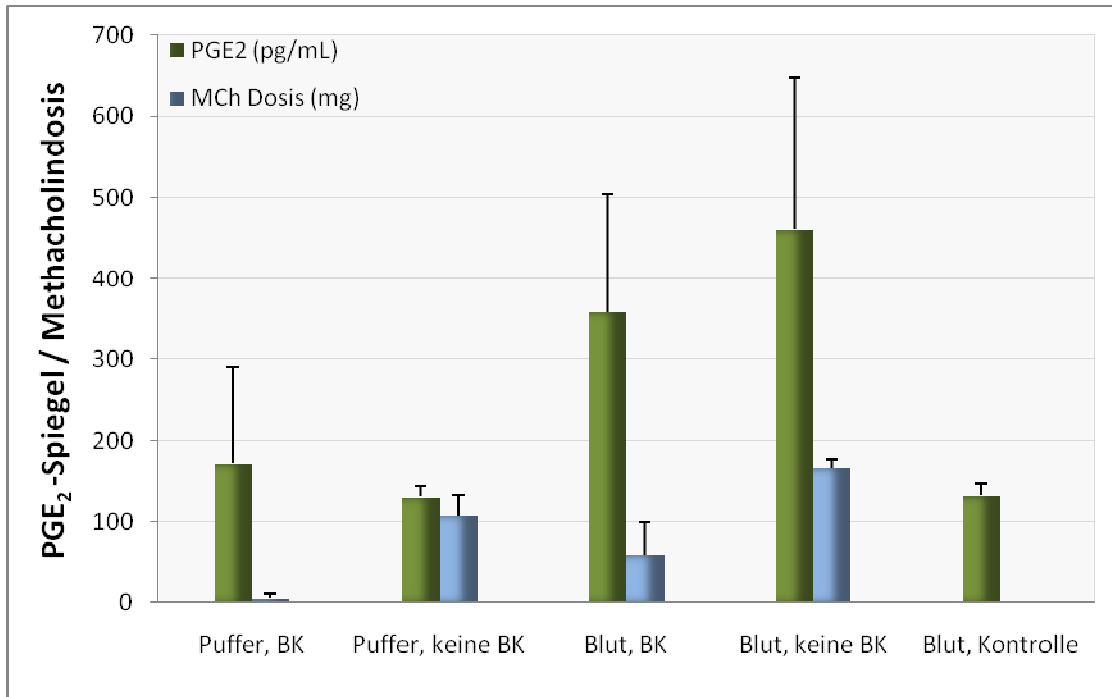
Entscheidend für eine angemessene Interpretation der Ergebnisse aus der Bestimmung der PGE<sub>2</sub>-Spiegel, ist im Zusammenhang damit die Betrachtung der beim jeweiligen Lungenperfusionsexperiment eingesetzten Dosis Methacholin (MCh) im Rahmen der PK/PD-Studie von Gnadt [57]. Die kumulativ verabreichten MCh Dosen sind in *Tabelle 5* aufgeführt und den entsprechenden Perfusionsversuchen zugeordnet.

**Tabelle 5:** Kumulativ verabreichte Dosen Methacholin (MCh) im Rahmen der PK/PD-Studie von Gnadt [57].

Perfusionen mit Blutmischung		Perfusionen mit Puffer	
Experiment	Gesamtdosis MCh (mg)	Experiment	Gesamtdosis MCh (mg)
GW 1	120,4	SB 1	12,5
GW 2	180,5	SB 2	119,1
GW 3	150,5	SB 3	135,4
GW 4	37,6	SB 4	70,2
GW 5	168,0	SB 5	2,5
GW 6	22,6	SB 6	2,5

In den Versuchen GW 1 bis GW 6 (Vollblut-Äquivalent als Perfusionsflüssigkeit) wurde nach Vernebelung von Methacholin (MCh) GW597901 appliziert, in den Experimenten SB 1 bis SB 6 dagegen Salbutamol (Puffer als Perfusionsflüssigkeit). Grau hinterlegte Felder bezeichnen Perfusionsexperimente mit erfolgreicher MCh-induzierter Bronchokonstriktion.

Da PGE<sub>2</sub>, wie bereits in Kapitel 5.1 erläutert wurde, über vermehrte Bildung von cAMP potentiell einen relaxierenden Effekt auf die glatte Muskulatur der Atemwege ausüben kann, konnte vermutet werden, dass höhere PGE<sub>2</sub>-Spiegel in der Perfusionsflüssigkeit protektiv gegen den atemwegsverengenden Reiz durch die Provokationssubstanz wirkten bzw. eine höhere Dosis MCh erforderten, um eine Bronchokonstriktion herbeizuführen [57, 226, 245, 246]. *Diagramm 14* zeigt für alle zwölf Experimente der PK/PD-Studie, welche PGE<sub>2</sub>-Konzentration in der Perfusionsflüssigkeit vor Applikation eines Wirkstoffes festgestellt wurde und wie viel MCh im Rahmen der Provokation kumulativ an die Lungenpräparate verabreicht wurde.



**Diagramm 14:** PGE<sub>2</sub>-Spiegel bzw. Methacholindosis (MCh Dosis) – Vergleich der Perfusionen der PK/PD-Studie mit Puffer oder Blutmischung als Perfusionsflüssigkeit, jeweils bei erfolgreicher oder ausbleibender Bronchokonstriktion (BK) und PGE<sub>2</sub>-Konzentration der Blut-Leerwertkontrollen.

Die insgesamt zwölf Perfusionsexperimente der PK/PD-Studie wurden für diese Darstellungsweise in vier Gruppen aufgeteilt: Perfusionen mit Puffer als Perfusionsflüssigkeit und erfolgreicher MCh-induzierter Bronchokonstriktion (BK), Versuche mit Puffer ohne funktionierende BK, Perfusionen mit Blut als Perfusionsflüssigkeit und erfolgreicher MCh-induzierter BK und Experimente mit Blut als Perfusionsflüssigkeit, bei denen eine BK ausblieb. Die grüne Säule repräsentiert jeweils die PGE<sub>2</sub>-Konzentration des Perfusates vor Applikation eines Wirkstoffes, die blaue Säule hingegen die kumulativ verabreichte MCh Dosis während eines Perfusionsversuches. Grün dargestellt ist des Weiteren der PGE<sub>2</sub>-Gehalt der Leerwertkontrollen aus Blut, die analog zur Perfusionsflüssigkeit hergestellt und behandelt wurden, jedoch nicht mit Lungengewebe in Berührung kamen. [Mittelwert ± mittlere Abweichung vom Mittelwert, n = 3; Kontrolle n = 6]

Dabei wurden die Perfusionsversuche - im Säulendiagramm von links nach rechts dargestellt - in vier Gruppen unterteilt: Perfusionen mit Puffer als Perfusionsflüssigkeit, bei denen mit Methacholin (MCh) entweder erfolgreich eine Bronchokonstriktion (BK) induziert wurde (n = 3) oder aber ausblieb (n = 3), Perfusionen mit der Perfusionsflüssigkeit Blut und durch MCh ausgelöster Verengung der Atemwege (n = 3) bzw. nicht erfolgter BK (n = 3). Die Farbe Grün repräsentiert jeweils die mittlere PGE<sub>2</sub>-Konzentration der Probengruppe, blau dagegen die im Rahmen der Perfusionsexperimente kumulativ applizierte Dosis MCh. Zusätzlich ist in *Diagramm 14* der PGE<sub>2</sub>-Gehalt der sechs Leerwertkontrollen aus Vollblut-Äquivalent („Blut, Kontrolle“) dargestellt, die analog zur Perfusionsflüssigkeit hergestellt und behandelt wurden, jedoch keinerlei Kontakt mit Lungengewebe hatten (siehe 5.2.2). Die Kontrolle erfasste somit

die Basalkonzentration PGE<sub>2</sub>, den die in GW-Versuchen verwendete Perfusionsflüssigkeit Blut in das System beitrug und ermöglichte eine Aussage über die Menge des Gewebshormons, die in Experimenten mit Blutgemisch ausschließlich aus dem Lungenpräparat stammte.

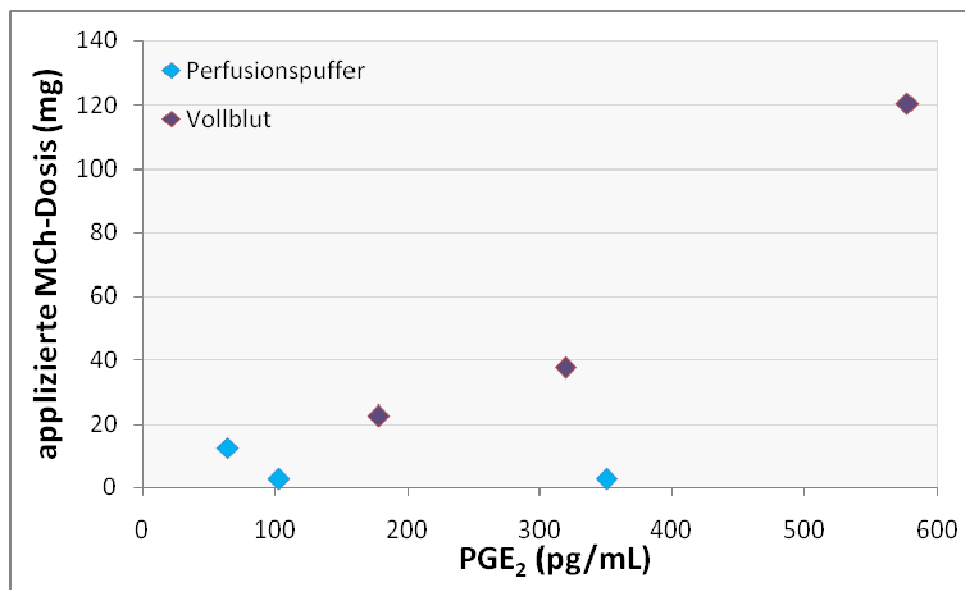
In den Perfusionsexperimenten, in denen reiner Puffer als Perfusionsflüssigkeit diente (spätere Vernebelung von Salbutamol), kann sicher davon ausgegangen werden, dass sämtliches PGE<sub>2</sub> aus dem Lungengewebe stammte, da die verwendete Matrix Puffer keine Quelle für zusätzlich eingebrachtes PGE<sub>2</sub> darstellte. Allerdings konnte innerhalb dieser Versuchsgruppe kein Zusammenhang zwischen PGE<sub>2</sub> Spiegel und benötigter MCh Dosis festgestellt werden. Zwar wurden in den drei Experimenten mit erfolgreicher Provokation weitaus geringere MCh-Dosen (2,5 – 12,5 mg; siehe *Tabelle 5*) appliziert als in den Perfusionen ohne Bronchokonstriktion (70,2 - 135,4 mg; siehe *Tabelle 5*), eine erhöhte PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Perfusat der Experimente, in denen eine MCh-induzierte Atemwegsverengung ausblieb, konnte aber, wie in 5.3 bereits erläutert, nicht festgestellt werden (siehe *Diagramm 14*). Angesichts der insgesamt sehr niedrigen PGE<sub>2</sub>-Spiegel in den Versuchen mit Perfusionspuffer ist es allerdings fraglich, ob diese Konzentrationen ausreichten, um einen bronchoprotektiven Effekt bei der Provokation mit MCh auszuüben.

In Lungenperfusionen mit Blut als Perfusionsflüssigkeit zeigte sich dagegen ein Zusammenhang zwischen den beiden Parametern PGE<sub>2</sub> und MCh Dosis (siehe *Diagramm 14*): In den Fällen, in denen keine Verengung der Atemwege ausgelöst werden konnte, wurde durchschnittlich mehr MCh vernebelt (166 ± 11 mg) und es lagen höhere PGE<sub>2</sub>-Spiegel vor als in den Experimenten mit erfolgreicher Provokation, bei denen mit 60 ± 40 mg deutlich weniger MCh appliziert wurde (siehe *D5.1– Tabellarischer Anhang* und *Tabelle 5*). Die Leerwertkontrollen aus Blut bestätigten, dass der Großteil des analysierten Gewebshormons aus dem Lungengewebe stammte, da der PGE<sub>2</sub>-Gehalt in diesen Proben mit durchschnittlich 133 ± 15 pg/mL (siehe *D5.3 – Tabellarischer Anhang*) deutlich niedriger war als in den Proben aus den Perfusionsexperimenten.

Weiterhin fällt beim Vergleich der kumulativ vernebelten MCh Dosen auf, dass in Experimenten mit reinem Puffer als Perfusionsflüssigkeit weniger Provokationssubstanz (6 ± 4 mg bei erfolgreicher BK bzw. 108 ± 25 mg bei ausbleibender BK) appliziert wurde, als in den Versuchen mit Vollblut-Äquivalent (60 ± 40 mg bei erfolgreicher BK bzw. 166 ± 11 mg bei ausbleibender BK).

Bei gesonderter Betrachtung der Versuche der PK/PD-Studie mit erfolgreicher BK war es möglich, den Zusammenhang zwischen PGE<sub>2</sub>-Konzentration und MCh Dosis mathematisch zu beschreiben. So ergab sich ein Korrelationskoeffizient von  $r = 0,8171$ , wobei dieser

Zusammenhang mit einem  $p \leq 0,05$  (zweiseitiger Test) statistisch signifikant war. Zur Visualisierung der Beziehung zwischen  $\text{PGE}_2$ -Konzentration und MCh Dosis zeigt *Diagramm 15* die Korrelation zwischen den beiden Größen. Jeder der dargestellten Punkte steht für ein Perfusionsexperiment der PK/PD-Studie mit erfolgreicher Bronchokonstriktion und zeigt gleichzeitig die jeweils eingesetzte Menge MCh und die analysierte  $\text{PGE}_2$ -Konzentration an. In der Farbe Lila sind dabei die drei Perfusionen mit Blutgemisch als Perfusionsflüssigkeit dargestellt, blau hingegen die drei Versuche, in denen Perfusionspuffer eingesetzt wurde.



**Diagramm 15:** Korrelation des  $\text{PGE}_2$ -Spiegels vor Wirkstoffapplikation und der kumulativ zur Provokation verabreichten Dosis Methacholin (MCh) bei Perfusionsexperimenten der PK/PD-Studie mit erfolgreicher MCh-induzierter Bronchokonstriktion.

Die Punkte repräsentieren den Zusammenhang zwischen der mittels ELISA analysierten  $\text{PGE}_2$ -Konzentration und der beim jeweiligen Perfusionsversuch benötigten Gesamtdosis MCh, um eine Bronchokonstriktion auszulösen. In der Farbe Lila sind die Wertepaare für Perfusionen mit Blut (spätere GW597901-Vernebelung) dargestellt, blau hingegen für die Experimente mit Puffer als Perfusionsflüssigkeit (spätere Salbutamol-Vernebelung).

Gut zu erkennen ist, dass im Großteil der Fälle das Vorhandensein eines höheren  $\text{PGE}_2$ -Spiegels mit einer höheren MCh Dosis einherging. Folglich wurde bei einem vorliegenden erhöhten  $\text{PGE}_2$ -Spiegel mehr Methacholin für eine erfolgreiche Provokation benötigt im Vergleich zu Lungenpräparaten, die einen niedrigeren  $\text{PGE}_2$  Spiegel aufwiesen.

Die Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass aus den Lungenpräparaten stammendes  $\text{PGE}_2$  die bronchokonstriktorische Reaktion auf Methacholin tendenziell antagonisierte. In Anbetracht der geringen Versuchsanzahl und der stark variierenden  $\text{PGE}_2$ -Spiegel in den

Experimenten mit Puffer als Perfusionsflüssigkeit kann diesbezüglich zwar keine eindeutige Bewertung erfolgen, aber es kann zusammenfassend geschlussfolgert werden, dass eine gesteigerte PGE<sub>2</sub>-Sekretion durch den Tumor bzw. ein höherer PGE<sub>2</sub>-Spiegel sich protektiv gegen eine MCh-induzierte Bronchokonstriktion auswirkte und die Applikation einer höheren Dosis MCh notwendig machte, um erfolgreich eine Bronchokonstriktion auszulösen.

Eine Tonus-regulierende Wirkung von PGE<sub>2</sub> konnte auch *in-vivo* beobachtet werden. In Untersuchungen mit inhalativ verabreichtem PGE<sub>2</sub> bei gesunden Probanden und Asthmatikern zeigte das Gewebshormon relaxierende Effekte und beugte der atemwegsverengenden Reaktion auf bronchokonstriktorische Stoffe vor [247]. Bemerkenswerterweise fungierte vernebeltes PGE<sub>2</sub> an anderer Stelle bei gesunden Testpersonen als Bronchodilatator während bei Asthmapatienten sowohl dilatatorische als auch konstriktorische Effekte beobachtet wurden [248]. Eine Forschergruppe um Yan *et al.* stellte durch Zellkulturversuche mit humanen glatten Muskelzellen der Atemwege fest, dass PGE<sub>2</sub> wie auch  $\beta_2$ -Sympathomimetika über eine Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A eine vermehrtes Wachstum der glatten Muskulatur in den Atemwegen antagonisiert. Diese Proliferation stellt einen wichtigen pathogenen Mechanismus beim Asthma bronchiale dar [249].

In den vorliegenden Experimenten wurde somit ein möglicher Zusammenhang zwischen dem PGE<sub>2</sub>-Spiegel im Perfusat, der applizierten Dosis Methacholin und dem Induzieren einer Bronchokonstriktion gezeigt. Diese Ergebnisse können die Basis für weitere Untersuchungen bezüglich der den Bronchialtonus beeinflussenden Eigenschaften von PGE<sub>2</sub> und der Auswirkung erhöhter Spiegel des Gewebshormons auf Vorgänge *in-vivo* bilden und unterstreichen die Bedeutung des humanen Lungenperfusionsmodells als Instrument zur Beschreibung und Untersuchung komplexer physiologischer bzw. pathophysiologischer Zusammenhänge *in-vivo*.







## **C Experimenteller Teil**

---



# 1 *Ex-vivo*-Vergleich der Verteilungskinetik zweier Cyclosporin A-Formulierungen von humanem Lungengewebe in humanes Blut mit Hilfe eines Dialysemodells

## 1.1 Verwendete Reagenzien, Materialien und Geräte

### 1.1.1 Substanzen

Eine Lösung von Cyclosporin A (CsA) in Propylenglykol (CsA-PG) mit einer Konzentration von 4 mg/mL und eine liposomale CsA-Formulierung (L-CsA) mit einer Konzentration von 4 mg/mL wurden von PARI (München, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Ebenso wurden die beiden Placebo-Zubereitungen, eine reine Propylenglykol-Lösung und wirkstofffreie Liposomen, von PARI erhalten.

Das verwendete Wasser entstammte der hauseigenen Demineralisationsanlage (Umkehrosmose), die mit einer Wasseraufbereitungsanlage (Milli-Q<sup>®</sup>-reagent grade water system) von Millipore (Schwalbach, Deutschland) gekoppelt ist. Ferner wurden N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES) von GERBU (Gaiberg, Deutschland), eine Stammlösung mit 10 000 IU/mL Penicillin und 10 000 µg/mL Streptomycin in 0,9 % NaCl von Biochrom AG (Berlin, Deutschland) und Ascomycin von Bio Trend (Köln, Deutschland) bezogen. Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden von E. Merck (Darmstadt, Deutschland) erworben.

### 1.1.2 Krebs-Ringer-HEPES-Puffer

Zur Herstellung des Krebs-Ringer-HEPES-Puffers wurden zunächst die drei folgenden Stammlösungen zubereitet, die bei 4 bis 8 °C gelagert wurden:

Stammlösung A:	Natriumchlorid	1,18 M
	Kaliumchlorid	48,4 mM
	Kaliumdihydrogenphosphat	12,0 mM
	Magnesiumsulfat Hexahydrat	24,3 mM
Stammlösung B:	Calciumchlorid Dihydrat	24,4 mM
Stammlösung C:	HEPES	100,0 mM

Unmittelbar vor der Herstellung des Krebs-Ringer-HEPES-Puffers wurden die drei Stammlösungen auf Raumtemperatur gebracht. Jeweils 10,0 mL der Stammlösung A, B und C wurden miteinander vermischt und die resultierende Lösung wurde mit Milliporewasser auf ca. 90 mL aufgefüllt. Nachdem der pH-Wert der Lösung mit 1 molarer Natriumhydroxid-Lösung auf den Wert 7,4 eingestellt worden war, wurde das Volumen mit Wasser zu 100,0 mL ergänzt. Der Puffer wurde zur Herstellung des Lungenhomogenats und vor jedem Dialyseversuch jeweils frisch angesetzt. Es resultierte folgende Endkonzentration des Krebs-Ringer-HEPES-Puffers:

Natriumchlorid	118 mM
Kaliumchlorid	4,84 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	1,20 mM
Magnesiumsulfat Hexahydrat	2,43 mM
Calciumchlorid Dihydrat	2,44 mM
HEPES	10,0 mM

### **1.1.3 *Humanes Lungengewebe, Blut und Blutplasma***

#### **1.1.3.1 *Herkunft des humanen Lungengewebes***

Humanes Lungengewebe stammte von Patienten, die an einem Lungenkarzinom erkrankt waren und sich im Thoraxzentrum Bezirk Unterfranken, Münnerstadt, oder in der Klinik Schillerhöhe, Gerlingen, einer Lobektomie unterziehen mussten. Nur nichtinfektiöses, tumorfreies Gewebe aus der Peripherie wurde für die Experimente herangezogen. Die Patienten wurden vor dem operativen Eingriff durch die behandelnden Ärzte über die Verwendung des ihnen entnommenen Gewebes zu experimentellen Zwecken aufgeklärt und gaben schriftlich ihr Einverständnis. Das Lungengewebe wurde nach der Resektion in isotonischer Kochsalzlösung blutfrei gewaschen und unter Kühlung mit Eis in das Institut für Pharmazie in Würzburg transportiert. Dort wurde es in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Zeitpunkt der Verwendung bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

#### **1.1.3.2 *Herkunft des humanen Blutes und Blutplasmas***

Humanes Blut und Blutplasma stammten von gesunden, freiwilligen Probanden. Die Blutspender gaben schriftlich ihr Einverständnis zur wissenschaftlichen Verwendung der Spezimen. Blutkonserven wurden vom DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg bezogen und innerhalb von fünf Tagen nach der Blutspende verwendet. Blutplasma stammte von der

Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie des Universitätsklinikums Würzburg. Aus Verfallsgründen war es nicht mehr zur Anwendung am Menschen zugelassen, jedoch für experimentelle Zwecke in einwandfreiem Zustand. Plasmaproben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Zeitpunkt der Verwendung bei  $-80\text{ °C}$  aufbewahrt.

#### 1.1.3.3 **Herstellung des Lungenhomogenates**

Um ausreichend Material für die Experimente bereitzustellen und um einen Einfluss patientenspezifischer, interindividueller Unterschiede hinsichtlich Enzymaktivität und Proteingehalt auf die Beschaffenheit des Versuchsmaterials auszuschließen, wurden Gewebeproben von drei verschiedenen Patienten vereinigt.

Das Lungengewebe wurde in gefrorenem Zustand auf einer Glasplatte, die auf Eis lagerte, in kleine Würfelstücke mit einer Kantenlänge von ca. 1 bis 3 mm geschnitten, wie bei Freiwald *et al.* beschrieben [53]. Sobald das Gewebe auftaute und eine für die weitere Verarbeitung ungeeignete Konsistenz annahm, wurde es in flüssigen Stickstoff getaucht, sodass die festere Beschaffenheit das weitere Zerkleinern erleichterte. Ein Teil feinschnittenes Lungengewebe wurde mit zwei Teilen Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (*siehe 1.1.2*) vermengt. Zur Sicherung der mikrobiologischen Stabilität des Versuchsmaterials wurde der Puffer mit einer Penicillin-Streptomycin Lösung versetzt, wobei eine Endkonzentration von 10 IU/mL Penicillin und 10  $\mu\text{g/mL}$  Streptomycin erzielt wurde. Die weitere Homogenisierung des Lungengewebe-Puffer Gemisches erfolgte unter fortwährender Eiskühlung mit Hilfe eines Ultra-Turrax bei etwa 20 000 Upm. Um durch diesen Vorgang in der Gewebesuspension keine Temperaturen über  $40\text{ °C}$  zu erzeugen, wurde der Ultra-Turrax in vier Intervallen bedient, wobei stets auf eine Betätigungszeit von 20 Sekunden eine Pause von 20 Sekunden erfolgte. Die insgesamt benötigte Menge an humanem Lungenhomogenat wurde vor Beginn der Versuchsreihe berechnet, dementsprechend hergestellt und in Aliquote zu jeweils 5 g für jeden Einzelversuch aufgeteilt. Die abgefüllten Homogenatportionen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80\text{ °C}$  gelagert. Da sämtliche Aliquote von derselben Grundgesamtheit abstammten, kann von identischem Proteingehalt und gleicher enzymatischer Aktivität des Homogenates für jeden Dialyseversuch ausgegangen werden.

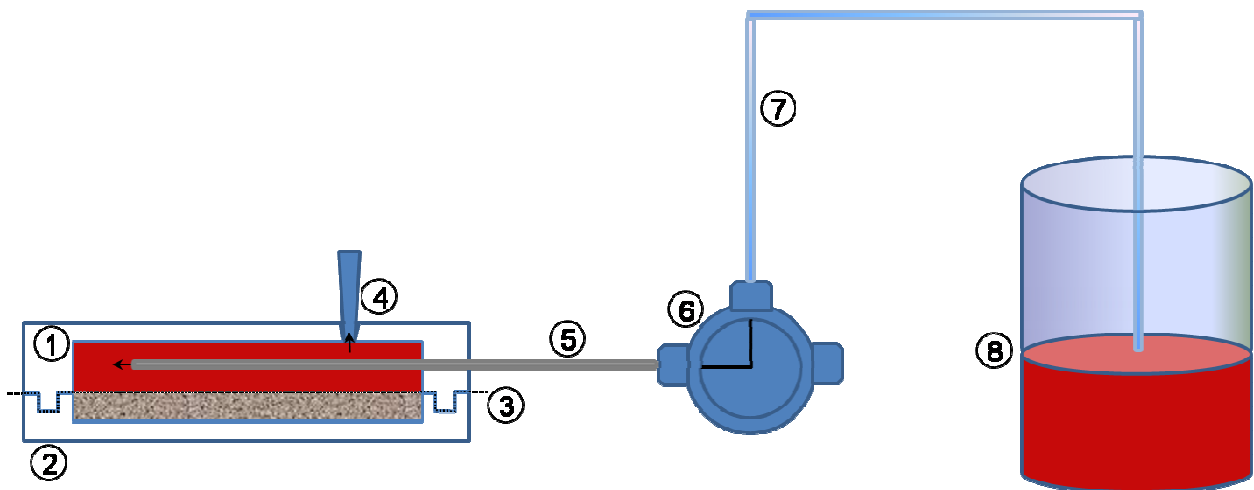
#### 1.1.3.4 **Bestimmung und Einstellung des Hämatokritgehaltes des humanen Blutes**

Bei jeder Blutcharge wurde mittels Zentrifugation (Microfuge<sup>®</sup> 22R Centrifuge) und anschließender Analyse des Plasmavolumens das Verhältnis von Hämatokrit zu Plasma bestimmt. Hierzu wurde je 1 mL Blut 20 Minuten lang bei  $904 \times g$  und  $5\text{ °C}$  zentrifugiert. Das Plasma im Überstand wurde mit einer Mikroliterpipette abgenommen und das Volumen

quantitativ bestimmt. Falls notwendig, wurde den Blutkonserven Plasma zugemischt, sodass ein Verhältnis von Hämatokrit zu Plasma 40:60 resultierte. Auf diese Weise wurde für alle Dialyseversuche die Verwendung von Blut mit einem einheitlichen und näherungsweise physiologischen Hämatokritgehalt sichergestellt.

### 1.1.4 Dialyseapparatur

Für die Dialyseversuche wurde die von Freiwald *et al.* [53] vorgestellte Dialyseapparatur in unveränderter Form verwendet. Flüssigkeitsreservoir, Mehrwegeventil und Dialysekammer stellen die Hauptkomponenten dieser Apparatur dar. Der schematische Aufbau ist in *Abbildung 16* dargestellt.



**Abbildung 16:** Dialyseapparatur.

Die Dialysekammer ist im Querschnitt dargestellt: ① obere Kammerhälfte, gefüllt mit Blut; ② untere Kammerhälfte, gefüllt mit Lungenhomogenat; ③ Dialysemembran; ④ Öffnung für die Probenentnahme mit Verschluss; ⑤ Edelmetallkapillare. Blut wird der Kammer über das ⑥ Mehrwegeventil und einen ⑦ Kapillarschlauch aus dem ⑧ Reservoir zugeführt. (Modifiziert nach einer Abbildung von [53])

Die Dialysekammer setzte sich aus zwei Kammerhälften aus Teflon zusammen, die beim Aufeinandersetzen bündig schlossen und zwischen sich die Dialysemembran einspannten. Die untere Kammerhälfte (innerer Durchmesser 45 mm, innere Tiefe 3 mm, Füllvolumen ca. 4,8 mL) diente als Depot für das Lungenhomogenat, die obere Hälfte (innerer Durchmesser 45 mm, innere Tiefe 6 mm, Füllvolumen ca. 9,6 mL) wurde mit Blut gefüllt.



Das Mehrwegeventil steuerte die Blutzufuhr in die Kammer. Bei geöffnetem Ventil während des Befüllens der Kammer und während der Probenentnahme gelangte die Dialyseflüssigkeit über einen Kapillarschlauch aus dem Reservoir über das Ventil und die Edelstahlkapillare in das obere Kompartiment der Dialysekammer. Solange das Ventil geschlossen war, wurde jeglicher Bluttransfer zwischen Kammer und Reservoir unterbunden. Zur zusätzlichen Absicherung wurde unmittelbar nach dem Ventil eine Federklammer aus Metall angebracht, die den Kapillarschlauch zusammendrückte.

Um eine Sedimentation der zellulären Blutbestandteile zu verhindern und somit eine homogene Zusammensetzung der Dialyseflüssigkeit über die Dauer des Experiments sicherzustellen, wurde das Blut im Reservoir mit Hilfe eines Magnetrührstäbchens in Kombination mit einem Magnetrührer gemischt solange sich die Apparatur außerhalb des Wärmeschrankes befand.

### 1.1.5 Sonstige Geräte und Materialien

Analysewaage	ABJ 220-4M; 0,01-220 g; 0,1 mg minimale Wägedifferenz (Kern & Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland)
Dialysemembran	Spectra/Por® 6 mit einer molekularen Porengrößenbegrenzung von 2000 Dalton (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, USA)
Kapillarschläuche	Kapillarschläuche aus Teflon mit einem Innendurchmesser von 1,1 mm (Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Deutschland)
Mehrwegeventil	LV-4, Zubehör für Chromatographie (Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Deutschland)
Mikroliterpipette 10-100 µL	Eppendorf Research® variabel, 10-100 µL (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Mikroliterpipette 100-1000 µL	Eppendorf Research® variabel, 100-1000 µL (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Präzisionswaage	Mettler P1200; 0,1-1200 g; 10 mg minimale Wägedifferenz (Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland)
Ultra-Turrax	Modell TP 18-10 (Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland)
Vortex	Modell K-550-GE (Bender & Hobein, Zürich, Schweiz)
Wärmeschrank	Modell 400 (Memmert, Schwabach, Deutschland)

## C – EXPERIMENTELLER TEIL

---

---

Zentrifuge	Microfuge <sup>®</sup> 22R Centrifuge (Beckman Coulter TM, Palo Alto, California, USA)
Magnetrührer	Variomag Electronic Rührer Mono (H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland)
Magnetrührstäbchen	Magnetrührstäbchen, zylindrisch, PTFE-ummantelter, starker Alnico V-Magnetkern, runde, glatte Oberfläche mit einer Länge von 20 mm und einem Durchmesser von 6 mm (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)
LC-MS/MS System	Agilent 1100 HPLC System (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)
Massenspektrometer	TSQ Quantum Ultra Massenspektrometer (Thermo Electron, Deutschland)
Analytische HPLC-Säule	Phenomenex C18 (ODS), 4 x 3,0 mm (Phenomenex, Deutschland)

---

## 1.2 Durchführung der Dialyseversuche

### 1.2.1 Kalibrierung der Mikroliterpipette für die Probenentnahme

Für die Kalibrierung der Mikroliterpipette musste für jede der verwendeten Blutchargen nach abgeschlossener Hämatokriteinstellung das tatsächliche Probenvolumen bestimmt werden. Hierzu wurde die Masse eines definierten Volumens experimentell bestimmt, um Richtigkeit und Reproduzierbarkeit des Probenvolumens zu gewährleisten. Die Kalibrierung der Mikroliterpipette mit den dazugehörigen Wägeversuchen wurde bewusst bei Raumtemperatur durchgeführt und nicht bei 37 °C, da die Probenentnahme bei den anstehenden Dialyseversuchen ebenfalls außerhalb des Wärmeschranke bei Raumtemperatur durchgeführt werden sollte. Zunächst wurde mit Hilfe einer geeichten Vollpipette für jede Blutcharge individuell die Dichte bestimmt. Hierzu wurde ein Becherglas in die Analysenwaage gestellt und tariert. Mit der Vollpipette wurde nun ein definiertes Volumen Blut in das Becherglas überführt. Um der Viskosität des Blutes Rechnung zu tragen, wurde beim Füll- und Entleerungsvorgang der Pipette der Zeitpunkt als Endpunkt des jeweiligen Vorganges definiert, zu dem kein sichtbarer Volumenstrom aus der oder in die Pipette hinein mehr wahrnehmbar war. Diese Gewichtsmessung wurde für jede Blutcharge dreimal durchgeführt. Aus dem mittleren Gewicht und dem eingesetzten Volumen konnte dann nach *Formel 1* die Dichte des Blutes berechnet werden.

**Formel 1**

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

$\rho$	Dichte
$m$	Masse
$V$	Volumen

Durch die Kalibrierung der Mikroliterpipette sollte ein effektives Probenvolumen von 500  $\mu\text{L}$  erzielt werden. Das Becherglas wurde erneut tariert. Nun wurde bei einer Volumeneinstellung von 500  $\mu\text{L}$  mit der Mikroliterpipette eine Probe der Blutcharge aufgenommen und direkt in das Becherglas überführt. Auf Grund der Viskosität der Probe wurde beim Aufziehen und Entleeren der Pipettenspitze wiederum ausreichend Zeit zur Vollendung des jeweiligen Vorganges gewährt. Aus dem gemessenen Gewicht und der zuvor bestimmten Dichte konnte wiederum

nach *Formel 1* das tatsächliche Volumen der Probe berechnet werden. Über eine Dreisatzrechnung wurde schließlich die nötige Volumeneinstellung der Mikroliterpipette bestimmt, um ein effektives Probenvolumen von 500 µL zu erzielen.

### **1.2.2 Vergleich der Verteilungskinetik einer liposomalen Cyclosporin A-Formulierung mit einer Lösung von Cyclosporin A in Propylenglykol von humanem Lungengewebe in humanes Blut**

Jeder Dialyseversuch zum Vergleich der Verteilungskinetik einer liposomalen CsA-Formulierung mit der einer Lösung von CsA in Propylenglykol entsprach vom Aufbau her *Abbildung 16*. Bei allen Versuchen enthielt das Kammerunterteil humanes Lungenhomogenat und als Dialyseflüssigkeit wurde stets humanes Blut verwendet. Obwohl das Mehrwegeventil Parallelversuche zugelassen hätte, wurden aus Gründen der einfacheren Durchführbarkeit stets nur Einzelversuche ausgeführt. Es wurden drei verschiedene Blutchargen verwendet, wobei mit jeder Charge je ein Versuch mit der liposomalen CsA-Formulierung und ein Versuch mit der Lösung von CsA in Propylenglykol durchgeführt wurde, um einen direkten Vergleich ohne möglicherweise verfälschenden Einfluss unterschiedlicher Blutproduktchargen zu ermöglichen. Es resultierten also für jede Zubereitung drei Dialyseversuche mit drei unterschiedlichen Blutchargen.

#### **1.2.2.1 Kontrollversuche mit einer Propylenglykol-Lösung und wirkstofffreien Liposomen**

Zusätzlich zu den Dialyseversuchen mit Wirkstofflösung wurde mit jeder Placebozubereitung, einer Propylenglykol-Lösung und einer Suspension aus wirkstofffreien Liposomen, ein Dialyseversuch durchgeführt. Der gesamte Versuchsablauf inklusive Apparaturaufbau (siehe *Abbildung 16*), Vorbereitung der Dialyse (siehe 1.2.2.2), Applikation der Dosis (siehe 1.2.2.3) und Durchführung der Dialyse (siehe 1.2.2.4) war identisch zu dem der Dialyseversuche mit Wirkstofflösung. Auf diese Weise wurden für die spätere Kalibrierung bei der Bestimmung des Cyclosporin A-Gehaltes der Dialyseproben (siehe 1.2.3) Matrixproben erhalten und der Einfluss der Probenmatrix auf das Cyclosporin A-Signal konnte in Abhängigkeit vom Entnahmezeitpunkt der Leerprobe bestimmt werden.

#### **1.2.2.2 Vorbereitung der Dialyse**

Eine Dialysemembran wurde so zurechtgeschnitten, dass sie die Grundfläche des Unterteils der Dialysekammer an jeder Stelle um ca. einen cm überragte. Sie wurde für etwa eine halbe

Stunde bei Raumtemperatur in Millipore®-Wasser eingelegt und dann mit Millipore®-Wasser aus einer Spritzflasche gründlich gewaschen. Es folgte die Äquilibration der Dialysemembran in frisch hergestelltem Krebs-Ringer-HEPES-Puffer für weitere 45 Minuten bei 37 °C. Unterdessen wurde ein Becherglas mit Magnetrührfisch mit Blut befüllt, das Reservoir über einen Kapillarschlauch mit dem Mehrwegeventil verbunden und das Becherglas schließlich mit Parafilm verschlossen, um Verdunstungsverluste während des Versuchs zu vermeiden. Anschließend wurde *Abbildung 16* entsprechend das Oberteil der Dialysekammer an das Ventil angeschlossen und die vorbereitete Apparatur sowie das noch nicht angefügte Kammerunterteil wurden für 45 Minuten bei 37 °C in den Wärmeschrank gestellt. Auch ein Aliquot Lungenhomogenat wurde für 45 Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert.

### 1.2.2.3 **Applikation der Dosis**

Das Unterteil der Dialysekammer und das Lungenhomogenat wurden aus dem Wärmeschrank genommen. Nachdem das Unterteil mit etwa 2,5 g des Homogenats gleichmäßig befüllt worden war, wurden mit einer Mikroliterpipette 250 µL der jeweiligen Zubereitung appliziert (*Tabelle 6*) und das restliche Lungenhomogenat des bereits angebrochenen Aliquots wurde auf das Kammerunterteil gegeben. Anschließend wurde das Homogenat mit der zur Applikation der Dosis verwendeten Pipettenspitze für 15 Sekunden gründlich durchmischt, wobei darauf geachtet wurde, mit der Pipette keinerlei Gewebe oder Flüssigkeit anzusaugen.

**Tabelle 6:** Applikation der Dosis.

Zubereitung	Konzentration CsA	Dem Lungenhomogenat zugegebenes Volumen	Applizierte Dosis
CsA in Propylenglykol	4 mg/mL	250 µL	1 mg
liposomale CsA- Formulierung	4 mg/mL	250 µL	1 mg

Nun wurde das befüllte Unterteil der Dialysekammer mit der vorkonditionierten Membran bedeckt, wobei sorgfältig darauf geachtet wurde, dass keine Luftblasen zwischen der Membran und der Homogenatoberfläche eingeschlossen wurden und die Membran bündig auf dem inneren Rand des Kammerunterteils zum Liegen kam. Sobald die Dialysemembran korrekt

positioniert war, wurde die vorbereitete Dialyseapparatur dem Wärmeschrank entnommen, das Oberteil der Kammer aufgesetzt und mit zwei Federklammern fixiert. Zur Befüllung der oberen Kammer mit Dialyseflüssigkeit wurde zunächst das Ventil zum Reservoir hin geöffnet. Dann wurde mit Hilfe eines Pipettensaugers, der an der Öffnung zur Probenentnahme angesetzt wurde, ein Unterdruck in der Kammer erzeugt, sodass Blut vom Reservoir in die Kammer gesaugt werden konnte. War die Kammer fast vollständig gefüllt, machte sich dies dadurch bemerkbar, dass erste Flüssigkeit in den Pipettensauger gezogen wurde. Sobald dieser Punkt erreicht war, wurde der Pipettensauger beiseite gelegt und die restliche Befüllung der Kammer mit einer Mikroliterpipette vollendet. Die Dialysekammer wurde zu diesem Zwecke leicht schräg gehalten, damit die Öffnung der Kammer und somit die Luft in der Kammer möglichst hoch lag. Mit der Mikroliterpipette (100 – 1000  $\mu\text{L}$ ) wurde nun solange versucht, Blut aus der Kammer zu ziehen, bis keine Luft mehr gezogen wurde, sondern die erste Dialyseflüssigkeit in der Pipettenspitze sichtbar war. Das Ventil wurde geschlossen, die Mikroliterpipette aus der Probenöffnung entfernt und sofort durch den Verschluss der Öffnung ersetzt. Zur zusätzlichen Absicherung, um einen Rückfluss von Blut ins Reservoir zu unterbinden, wurde unmittelbar nach dem Ventil eine Federklammer aus Metall angebracht, die den Kapillarschlauch zusammendrückte.

#### 1.2.2.4 **Durchführung der Dialyse**

Mit dem Verschluss des Ventils begann die Inkubationszeit von 420 min. Deshalb wurde sogleich die Probe für den Zeitpunkt 0 min der Inkubation gezogen und die komplette Dialyseapparatur nach Verschluss der Probenöffnung schnellstmöglich in den Wärmeschrank (37 °C) gestellt. Die Probenentnahme fand stets außerhalb des Wärmeschrankes statt. Während dieses Prozesses wurde das Blut im Reservoir mit Hilfe eines Magnetrührers durchmischt. Um eine Sedimentation der festen Blutbestandteile in der oberen Kammerhälfte und somit eine Verfälschung der Ergebnisse zu verhindern, wurde die Kammer in verschlossenem Zustand vor jeder Probenentnahme und während längerer Inkubationszeiten alle 15 min acht Mal durch Drehung um 180° geschwenkt. Somit wurde einer schwerkraftbedingten Ansammlung von Erythrozyten an der Membran und einer inhomogenen Beschaffenheit der Proben entgegengewirkt. Zur Entnahme einer Probe zu den gegebenen Zeitpunkten wurde die auf ein effektives Probenvolumen von 500  $\mu\text{L}$  eingestellte Mikroliterpipette (siehe 1.2.1) auf die Probenöffnung gesetzt. Nach Entfernung der Federklammer vom Kapillarschlauch und Öffnung des Mehrwegeventils wurde sofort begonnen, das Probenvolumen langsam aufzunehmen. Frisches, temperiertes Blut strömte automatisch durch den erzeugten Unterdruck aus dem Reservoir in die Kammer nach. Wegen der Viskosität

der Dialyseflüssigkeit wurde nach vollständiger Entlastung des Pipettenkolbens 20 s lang gewartet, bevor die Verbindung zum Reservoir durch Schließen des Mehrwegeventils unterbrochen und die Pipette durch den Verschluss ersetzt wurde. Die Federklammer wurde wieder am Kapillarschlauch positioniert und die Dialyseapparatur wurde zur Inkubation bei 37 °C zurück in den Wärmeschrank gestellt. Die Probe wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C eingelagert. Insgesamt wurden bei jedem Versuch 10 Proben gewonnen zu den Zeitpunkten 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360 und 420 min nach Inkubationsstart.

### **1.2.3 Analyse des Cyclosporin A-Gehaltes der Dialyseproben**

#### **1.2.3.1 Probenaufarbeitung**

Die Proben wurden in gefrorenem Zustand auf Trockeneis an A&M GmbH, Bergheim, Deutschland versendet und dort analysiert.

Nach dem Auftauen wurden 10 µL jeder Probe mit 50 µL einer 100 mM Zinksulfatlösung gemischt. Die Ausfällung der Proteine zur Aufreinigung der Proben erfolgte durch Zugabe von 100 µL Acetonitril, der 50 ng/mL Ascomycin als Internen Standard enthielt.

#### **1.2.3.2 Quantifizierung mittels LC-MS/MS**

Der Cyclosporin A (CsA)-Gehalt der Proben wurde mit Hilfe einer LC-MS/MS Methode nach ESI-Ionisation analysiert, basierend auf einem von Keevil *et al.* [250] beschriebenen Verfahren. Das LC-MS/MS System bestand aus einer binären Pumpe, einem Vakuum-Degaser und einem beheizbaren Autosampler und war mit einem Massenspektrometer gekoppelt. Die Überführung der Verbindungen in die Gasphase erfolgte im ESI-Interface bei positivem Ionisationsmodus. Die chromatographische Auftrennung der zu analysierenden Komponenten wurde nach Injektion von 10 µL Probenvolumen bei 60 °C mittels Gradientenelution durchgeführt. Als Fließmittel wurden Methanol mit 0,1 % (V/V) Ameisensäure (Komponente A) und Ammoniumacetat mit 0,1 % (V/V) Ameisensäure (Komponente B) eingesetzt. Der Anteil der Komponente A stieg von 50 % auf 95 %, während der Anteil der Komponente B zu Beginn 50 % betrug und im Laufe der Gradientenelution auf 5 % sank. Die Flussrate betrug konstant 0,3 mL/min.

Die Ionen mit einem m/z von 1220 bis 1203 stellten die zur Quantifizierung herangezogenen Fragmente von CsA dar, bei Ascomycin hatten die entsprechenden Ionen ein m/z von 809 bis 756.

Die Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter AUC und Diffusionsrate (DR) für CsA aus den beiden Zubereitungen L-CsA (liposomale Cyclosporin A-Formulierung) bzw. CsA-PG (Lösung von Cyclosporin A in Propylenglykol) erfolgte mit Hilfe des Programmes EXCEL aus den durch die LC-MS/MS-Analyse gewonnenen Rohdaten. Die AUC wurde über die Trapezregel bestimmt, während die DR unter Annahme eines zugrundeliegenden linearen Zusammenhangs als Steigung der Regressionsgeraden der jeweiligen CsA-Blutspiegel-Zeitkurve berechnet wurde.

### 1.2.3.3 ***Validierung der analytischen Methode***

Die Validierung der Methode erfolgte durch A&M GmbH, Bergheim. Hierbei wurden die Intra- und Inter-Assay Präzision und Richtigkeit der Methode bestimmt. Ferner wurden die Quenching-Rate, die Extraktionskoeffizienz, der Einfluss der Verdünnung und die Spezifität der Methode festgestellt. Für die Bestimmungsgrenze (LLOQ) wurde ein Wert von 1 ng/mL ermittelt. Die Stabilität des Analyten wurde sowohl in Matrix als auch in reiner Lösung überprüft. Auch die Stabilität von Proben, die weiterverarbeitet worden waren, wurde kontrolliert.



## **2 Etablierung des kontinuierlichen Dialysemodells - Vergleich der Diffusionskinetik von Fluticasonpropionat bei Anwendung der statischen und der kontinuierlichen Dialyse**

### **2.1 Verwendete Reagenzien, Materialien und Geräte**

#### **2.1.1 Substanzen**

Fluticasonpropionat (FP) wurde von GlaxoSmithKline (Greenford, England) zur Verfügung gestellt. Der Farbstoff Fast Green FCF wurde von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen, Diethylether (HPLC-Qualität) und Acetonitril (HPLC-gradient-grade) stammten von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) und VWR Prolabo® (Darmstadt, Deutschland). Das verwendete Wasser wurde der hauseigenen Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q®-Synthesis von Millipore (Molsheim, Frankreich) entnommen, ebenso stammte Methanol in HPLC-gradient-grade Qualität von einer hauseigenen Abfüllanlage. Ferner wurden N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N´-2-ethansulfonsäure (HEPES) von GERBU (Gaiberg, Deutschland) und eine Stammlösung mit 10 000 IU/mL Penicillin und 10 000 µg/mL Streptomycin in 0,9 % NaCl von Biochrom AG (Berlin, Deutschland) bezogen. Sowohl Stickstoff in Druckgasflaschen (Qualität 5.0) als auch Stickstoff in flüssiger Form stammte von Linde (München, Deutschland). Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden von E. Merck (Darmstadt, Deutschland) erworben.

#### **2.1.2 Standardlösungen für die Quantifizierung und Applikationslösung**

- Interner Standard

Als interner Standard diene eine methanolische Lösung des Glucocorticoids Amcinonid in einer Konzentration von 5 µg/mL (Verdünnung  $V_1$ ). Ausgehend von einer Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL Amcinonid in Methanol wurde  $V_1$  durch Verdünnung hergestellt. Sowohl die Stammlösung als auch die Verdünnung wurden bei -20 °C gelagert.

- Kalibrierstandards

Zunächst wurde eine methanolische Lösung hergestellt, die Fluticasonpropionat in einer Konzentration von 1 mg/mL enthielt. Basierend auf dieser Stammlösung wurden durch Verdünnung mit Methanol Standardlösungen (V) der folgenden Konzentrationen erhalten:

V <sub>1</sub>	5000 ng/mL
V <sub>2</sub>	2500 ng/mL
V <sub>3</sub>	1000 ng/mL
V <sub>4</sub>	500 ng/mL
V <sub>5</sub>	250 ng/mL
V <sub>6</sub>	100 ng/mL

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

- Applikationslösung

Die methanolische Stammlösung mit Fluticasonpropionat in einer Konzentration von 1 mg/mL diente zusätzlich als Applikationslösung für die Dialyseversuche.

### **2.1.3 Humanes Lungengewebe und Blutplasma**

#### **2.1.3.1 Herkunft**

Humanes Lungengewebe, welches für die Experimente zur Etablierung des kontinuierlichen Dialysemodells verwendet wurde, stammte von Patienten, die sich auf Grund eines Lungenkarzinoms im Thoraxzentrum Bezirk Unterfranken, Münnerstadt, einer Lobektomie unterziehen mussten. Für die Versuche wurde ausschließlich nichtinfektiöses, tumorfreies Gewebe aus der Peripherie verwendet. Die Aufklärung der Patienten über die Verwendung des ihnen entnommenen Gewebes zu experimentellen Zwecken durch die behandelnden Ärzte war stets gewährleistet und die Einverständniserklärung der Spender erfolgte schriftlich (siehe 1.1.3.1). Nach der Entnahme im Zuge der Operation wurde das Lungengewebe mit isotonischer Kochsalzlösung blutfrei gewaschen. Der Transport des Gewebes nach Würzburg erfolgte unter Kühlung auf Eis. Dort wurde es in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Zeitpunkt der weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Humanes Blutplasma, das von gesunden freiwilligen Probanden stammte, wurde von der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie des Universitätsklinikums

Würzburg bezogen (siehe 1.1.3.2). Eine Anwendung am Menschen war aus Verfallsgründen nicht mehr zulässig, für experimentelle Zwecke war das Plasma allerdings in einwandfreiem Zustand. Um für alle Dialyseversuche eine ausreichende Menge Plasma in vergleichbarer Zusammensetzung zur Verfügung zu stellen, wurde Plasma von insgesamt fünf Spendern vermischt. Es wurde zu jeweils 50 mL aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

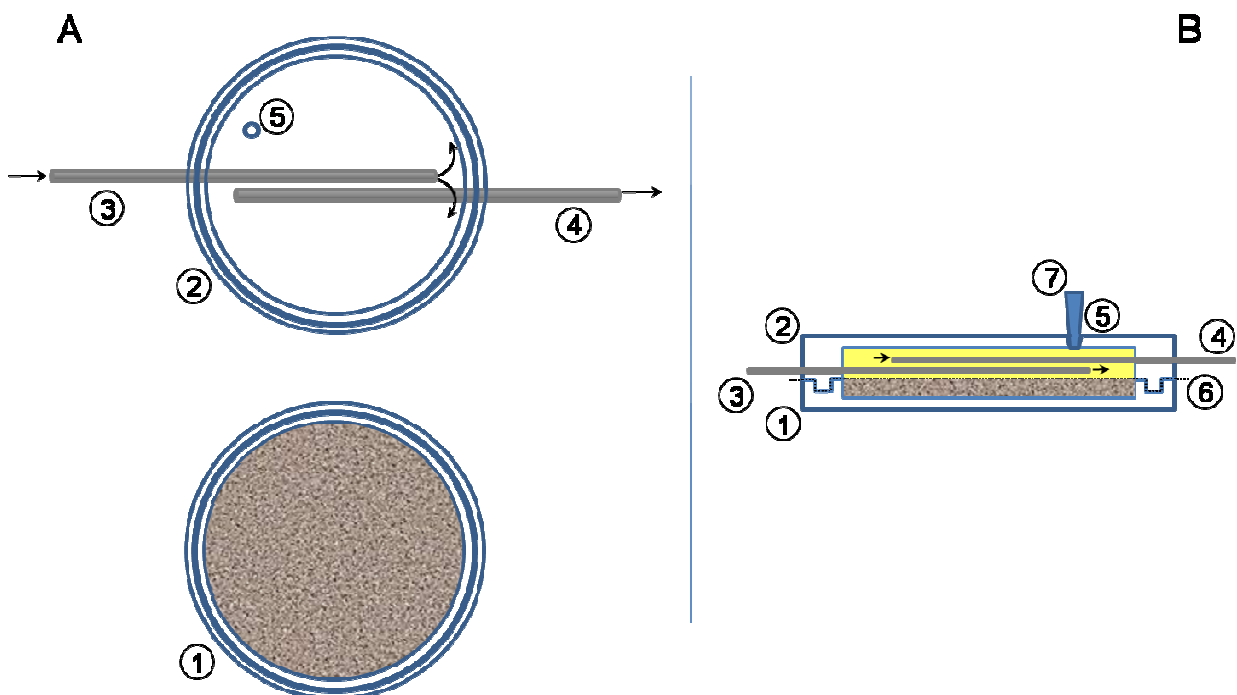
#### 2.1.3.2 **Herstellung des Lungenhomogenates**

Es wurden Gewebeproben von drei verschiedenen Patienten verwendet. Um für die einzelnen Dialyseexperimente eine vergleichbare Beschaffenheit des Lungengewebes bezüglich Enzymaktivität und Proteingehalt zu gewährleisten, wurde in Anlehnung an 1.1.3.3 ausreichend Lungenhomogenat hergestellt. Im Gegensatz zur an dieser Stelle beschriebenen Methode von Freiwald *et al.* [53] wurde das Lungengewebe für die vorliegenden Versuche jedoch nicht zerschnitten, sondern mit Hilfe eines Metall-Stößels in gefrorenem Zustand zerschlagen. Dieses Vorgehen ermöglichte im Vergleich zur bisher verwendeten Methode (siehe 1.1.3.3) eine deutlich schnellere Gewinnung von zerkleinertem Lungengewebe bei vergleichbarem Resultat bezüglich der Teilchengröße.

Zunächst wurde das Lungengewebe in noch gefrorenem Zustand in grobe Würfelstücke mit Kantenlängen von ungefähr drei bis fünf Millimetern zerschnitten. Während des Schneidevorgangs wurde auf einer Glasplatte gearbeitet, die auf Eis lagerte. Die Lungenwürfel wurden in flüssigem Stickstoff einige Minuten abgekühlt und anschließend in eine stabile, durchsichtige Plastikgefrierüte überführt. Die Tüte wurde verschlossen, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Luftpolster in dem Plastikbeutel vorhanden waren. Auf einem Holzbrett wurden die tiefgefrorenen Lungenstücke in der Tüte so lange mit Hilfe eines Metall-Stößels zerschlagen, bis sie die gewünschte Größe von Würfeln mit einer Kantenlänge von 1 bis 3 mm erreicht hatten. Insgesamt wurden ca. 21 g Lungengewebe auf diese Weise zerkleinert, von jedem der drei Patienten ca. 7 g. Anschließend wurde ein Teil des Lungengewebes mit zwei Teilen Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (siehe 1.1.2) vermengt. Wie bereits bei 1.1.3.3 beschrieben, enthielt der Puffer zur Sicherung der mikrobiologischen Stabilität des Versuchsmaterials eine Penicillin-Streptomycin Lösung. Das Lungengewebe-Puffer Gemisch wurde unter permanenter Eiskühlung mit Hilfe eines Ultra-Turrax TP 18-10 bei einer Rührgeschwindigkeit von etwa 20 000 Upm weiter homogenisiert, wobei darauf geachtet wurde, durch diesen Vorgang lokal in der Gewebesuspension keine Temperaturen über  $40\text{ °C}$  zu erzeugen (siehe 1.1.3.3). Das Lungenhomogenat wurde in Aliquote zu jeweils 5 g für jeden Einzelversuch aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

### 2.1.4 Dialyseapparatur

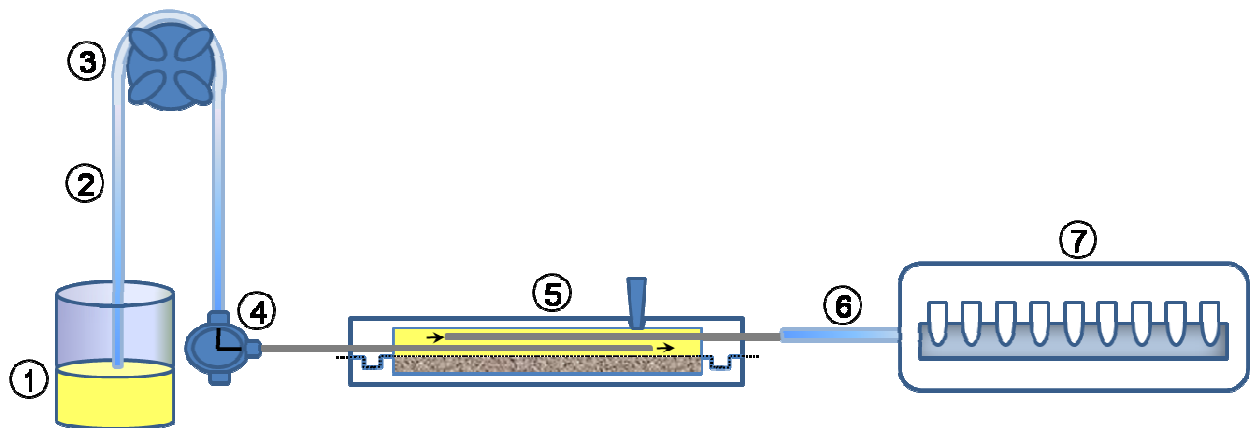
Für die statischen Dialyseversuche wurde die bereits in 1.1.4 beschriebene Dialyseapparatur eingesetzt (siehe *Abbildung 16*). Als Dialyseflüssigkeit wurde in den vorliegenden Experimenten mit Fluticasonpropionat jedoch humanes Blutplasma anstelle von Blut verwendet, das dem System aus dem Reservoir zugeführt wurde. Für die Experimente mit kontinuierlichem Fluss hingegen wurde diese Apparatur abgewandelt und an die neuen Bedürfnisse angepasst. Nach dem Vorbild des von *Freiwald et al.* [53] etablierten statischen Dialysemodells wurde in Zusammenarbeit mit der institutseigenen Werkstatt eine erweiterte Form dieser Apparatur konstruiert, die einen kontinuierlichen Fluss der Dialyseflüssigkeit durch die Dialysekammer ermöglichte. Um der Dialyseflüssigkeit einen kontrollierten Austritt aus der Kammer zu bieten, wurde in die obere Kammerhälfte eine zweite Edelstahlkapillare eingefügt, wie *Abbildung 17* schematisch gezeigt.



**Abbildung 17:** Dialysekammer, kontinuierliches Modell.

Die Dialysekammer in der Version des kontinuierlichen Modells ist **A** geöffnet, in der Perspektive der Aufsicht und **B** im Querschnitt in geschlossener Form dargestellt: ① untere Kammerhälfte aus Teflon, gefüllt mit Lungenhomogenat; ② obere Kammerhälfte aus Teflon, gefüllt mit Plasma; ③ Einlass-Edelstahlkapillare, der aus dem Reservoir Dialyseflüssigkeit (Plasma) zugeführt wird; ④ Auslass-Edelstahlkapillare, die das Dialysat in Richtung des Fraktionensammlers weiterleitet; ⑤ Öffnung für das Entweichen von Luft bei der Kammerbefüllung; ⑥ Dialysemembran; ⑦ Verschluss der Öffnung. (Modifiziert nach [52])

Die Komponenten der kontinuierlichen Dialyseapparatur bilden im Einzelnen das Reservoir, die Pumpe, die Dialysekammer und der Fraktionensammler. Sie sind über Schläuche miteinander verbunden (siehe *Abbildung 18*). Mit Hilfe eines Rührstäbchens und Positionierung des Gefäßes auf einem Magnetrührer wurde die Dialyseflüssigkeit im Reservoir beständig in Bewegung gehalten. Aus dem Reservoir wurde über eine direkte Verbindung durch die Pumpe Dialyseflüssigkeit gefördert und über ein Ventil und die Einlass-Edelstahlkapillare in die Dialysekammer geleitet. Das Ventil diente in diesem Fall als Verbindungsstück zwischen Kapillarschlauch und Edelstahlkapillare, es war während des gesamten Experimentes in geöffneter Stellung. Die Positionen der beiden Kapillaren innerhalb der Kammer wurden so gewählt, dass die Dialyseflüssigkeit nach dem Eintritt in die obere Kammerhälfte den größtmöglichen Weg durch diese hindurch fließen musste bevor sie durch die Auslass-Edelstahlkapillare das Akzeptorkompartiment wieder verließ. Die Ausmaße der Dialysekammer entsprachen denen des statischen Dialysemodells (siehe 1.1.4).



**Abbildung 18:** Komponenten des kontinuierlichen Dialysemodells.

Die Hauptbestandteile der kontinuierlichen Dialyseapparatur bilden ① das Reservoir, ③ die Pumpe, ⑤ die Dialysekammer mit Einlass- und Auslass-Edelstahlkapillare und ⑦ der Fraktionensammler. Die einzelnen Komponenten sind über ② einen Schlauch mit 4 mm Innendurchmesser, ④ ein Ventil und ⑥ einen Kapillarschlauch miteinander verbunden.

Um während der kontinuierlichen Dialyse einen Einblick in die Vorgänge innerhalb der Dialysekammer zu ermöglichen, wurde durch die institutseigene Werkstatt neben der Kammer, deren beide Teile aus Teflon bestanden, auch eine obere Kammerhälfte angefertigt, deren Oberteil aus Plexiglas bestand. Die obere Kammerhälfte in dieser durchsichtigen Ausführung kam ausschließlich bei den Kontrollversuchen zur Prüfung der Funktionsfähigkeit des

kontinuierlichen Dialysemodells zum Einsatz (siehe 2.2.2.2). Im Gegensatz zur oberen Kammerhälfte aus Teflon betrug die Höhe innerhalb des Oberteils mit Plexiglas aus Gründen der Praktikabilität beim Produktionsvorgang 9 mm anstelle von 6 mm. Die Einstellung der Pumpe wurde so gewählt, dass ein kontinuierlicher Transport von Dialysat mit einer Flussrate von 0,38 mL/min durch die obere Kammerhälfte erfolgte (siehe 2.2.2.1). Zum Auffangen des Dialysates wurde ein Fraktionensammler an das System angeschlossen. Er gestattete eine lückenlose Sammlung der durch die obere Kammerhälfte transportierten Flüssigkeit. Bei den Einstellungsmöglichkeiten des Gerätes wurde der Sammelmodus nach Zeit gewählt (siehe 2.2.2.3), wobei das Sammelintervall pro Fraktion drei Minuten betrug und insgesamt bei jedem Experiment über einen Zeitraum von vier Stunden 80 Fraktionen gewonnen wurden. Für den Fraktionensammler wurde ein Aufsatz angefertigt, der dazu geeignet war, Eppendorf-Gefäße mit geöffnetem Verschluss aufzunehmen und diese in einer stabilen Position zu halten.

### 2.1.5 HPLC-System

---

Degaser	Modell 1525 <i>In-Line</i> Vakuum-Degaser (Waters, Milford, USA);
Pumpe	Modell 1525 für binäre Hochdruckgradienten mit analytischem Pumpenkopf (Waters);
Probengeber	Modell 717 plus Autosampler mit integriertem Kühler und Heizer (Waters);
Säulenofen	Serie 1500 (Waters);
Analytische HPLC-Säule	Symmetry® C18; 4,6 x 150 mm; 5 µm Partikel; PatNo. WAT045905 (Waters);
Detektor	Dualband-UV-Detektor Modell 2487 (Waters);
Steuerung und Datenverarbeitung	Software Breeze® Version 3.30 (Waters)

---

### 2.1.6 Sonstige Geräte und Materialien

Analysenwaage	ABJ 220-4M; 0,01-220 g; 0,1 mg minimale Wägedifferenz (Kern & Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland)
Dialysemembran	Spectra/Por <sup>®</sup> 6 mit einer molekularen Porengrößenbegrenzung von 2000 Dalton (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, USA)
Fraktionensammler	Waters Fraction Collector 40109, Advantec SF-2120 (Advantec, Ontario, Kanada)
Kapillarschläuche	Kapillarschläuche aus Teflon mit einem Innendurchmesser von 1,1 mm (Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Deutschland)
Verbindungsschläuche	LS-4 Verbindungsstücke mit einer Länge von 30 cm und einem Innendurchmesser von 4 mm, steril (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland)
Magnetrührer	Variomag Electronic Rührer Mono (H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland)
Magnetrührstäbchen	Magnetrührstäbchen, zylindrisch, PTFE-ummantelter, starker Alnico V-Magnetkern, runde, glatte Oberfläche mit einer Länge von 20 mm und einem Durchmesser von 6 mm (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Mehrwegeventil	LV-4, Zubehör für Chromatographie (Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Deutschland)
Mikroliterpipette 10-100 µL	Eppendorf Research <sup>®</sup> variabel, 10-100 µL (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Mikroliterpipette 20-200 µL	Eppendorf Research <sup>®</sup> variabel, 20-200 µL (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Mikroliterpipette 100-1000 µL	Eppendorf Research <sup>®</sup> variabel, 100-1000 µL (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Mischrad	Außendurchmesser 340 mm, 24 Halterungen für Normschliffe NS 14/23, Umdrehungszahl 10 Upm (Anfertigung durch die institutseigene Werkstatt)
Präzisionswaage	Mettler P1200; 0,1-1200 g; 10 mg minimale Wägedifferenz (Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland)
Pumpe	Schlauchpumpe Minipuls 2 (Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich)

Reagiergefäß	Gefäß mit konischem Boden und anhängendem Deckel; 1,5 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Silikonschlauch	MPL Produktlinie Verlängerung 30 cm, pyrogenfrei, steril (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Spitzkolben	Spitzkolben mit Normschliff NS 14/23, Inhalt 5 mL (Witeg Labortechnik, Wertheim, Deutschland)
Thermostat für Wasserbad	Modell F4391 (Haake, Berlin, Deutschland)
Ultraschallbad	Modell USR 30 (Merck eurolab N.V., Belgien)
Ultra-Turrax	Modell TP 18-10 (Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland)
Vortex	Modell K-550-GE (Bender & Hobein, Zürich, Schweiz)
Wärmeschrank	Modell 400 (Memmert, Schwabach, Deutschland)
Wippschüttler	Mini Rocker Bio MR-1 (Bio San, Riga, Lettland)
Zentrifuge	Centrifuge 5702 max. 2750 x g (4400 Upm), Winkelarbeitskopf 30 x 15 mL (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Zentrifugengläser	Rundbodengläser 16 x 100 mm mit Normschliff NS 14/23 (Normschliff Gerätebau, Wertheim, Deutschland)

---

## 2.2 Durchführung der Dialyseversuche

Zur Ermöglichung eines direkten Vergleiches der Diffusionskinetik von Fluticasonpropionat bei Einsatz eines statischen Dialysemodells (siehe *Abbildung 16, Kapitel 1.1.4*) einerseits und eines kontinuierlichen Modells (*Abbildung 18, Kapitel 2.1.4*) andererseits, wurden mit jeder der beiden Apparaturen jeweils drei Experimente durchgeführt. Das Kammerunterteil diente stets als Depot für das humane Lungenhomogenat, als Dialyseflüssigkeit wurde humanes Plasma eingesetzt.

### 2.2.1 Untersuchung der Diffusionskinetik von Fluticasonpropionat von humanem Lungengewebe in humanes Plasma mit Hilfe des statischen Dialysemodells

Jedes der drei Experimente zur Bestimmung der Diffusionskinetik des Fluticasonpropionat (FP) mit dem statischen Dialysemodell wurde mit Hilfe der Apparatur gemäß *Abbildung 16 (Kapitel*



1.1.4) durchgeführt. Als Dialyseflüssigkeit wurde Plasma eingesetzt, das aus einer gemischten Grundgesamtheit von fünf Spendern stammte (siehe 2.1.3.1). Das Vorgehen während des Versuches unterschied sich von dem des Kapitels 1.2.2 nur wenig, wie in den nachfolgenden Abschnitten genauer erläutert wird.

#### 2.2.1.1 **Vorbereitung der Dialyse**

Ein Aliquot des Lungenhomogenates und zwei Aliquote humanen Plasmas wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurde das Plasma in einem ausreichend großen Gefäß vereinigt und für 10 Minuten in das Ultraschallbad gestellt, um eventuell vorhandene Proteinablagerungen, die zu einem Verstopfen der Kapillarleitungen führen könnten (siehe 2.2.2.3), aufzulösen. Währenddessen wurde die zugeschnittene Dialysemembran für etwa eine halbe Stunde bei Raumtemperatur in Millipore®-Wasser eingelegt, mit frischem Millipore®-Wasser gründlich gewaschen und anschließend für 45 Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank in Plasma äquilibriert. Das Reservoir mit Magnetührstäbchen wurde mit Plasma befüllt, mit Parafilm gegen Verdunstungseffekte abgedichtet und wie alle übrigen Bestandteile der Dialyseapparatur und das Lungenhomogenat ebenfalls für 45 Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert (siehe 1.2.2.2).

#### 2.2.1.2 **Applikation der Dosis**

In Anlehnung an 1.2.2.3 wurden außerhalb des Wärmeschrankes, nach gleichmäßiger Befüllung der unteren Kammerhälfte mit etwa der Hälfte des Lungenhomogenates, mit Hilfe einer Mikroliterpipette 200 µL der 1 mg/mL Lösung von Fluticasonpropionat in Methanol (siehe 2.1.2) appliziert. Dies entsprach einer Dosis von 200 µg FP. Vor Verwendung der Glucocorticoidlösung musste diese Zimmertemperatur erreicht haben. Die restliche Menge Lungenhomogenat des verwendeten Aliquots wurde in das Kammerunterteil gefüllt und das mit Wirkstoff versetzte Homogenat wurde mit der zur Applikation der Dosis verwendeten Pipettenspitze 15 Sekunden lang gründlich durchmischt. Nach sorgfältiger Positionierung der in Plasma vorinkubierten Membran und Aufsetzen des Kammeroberteils auf das mit Lungenhomogenat befüllte Unterteil folgte der Verschluss der Kammer, zusätzlich unterstützt durch zwei Federklammern (siehe 1.2.2.3). Das Kammeroberteil war zu diesem Zeitpunkt bereits wie in *Abbildung 16* gezeigt mit dem Mehrwegeventil verbunden. Die Befüllung der oberen Kammerhälfte wurde im Gegensatz zu den Versuchen mit Cyclosporin A (siehe 1.2.2.3) nicht durch Erzeugung eines Unterdrucks bewerkstelligt, sondern hierzu wurde in den vorliegenden Experimenten die bei den kontinuierlichen Dialyseversuchen eingesetzte Pumpe genutzt. Das Reservoir wurde außerhalb des Wärmeschrankes auf dem Magnetührer

positioniert und über einen Verbindungsschlauch an die Pumpe angeschlossen. Zur Befüllung wurde nun der Kapillarschlauch, der durch das Ventil mit der oberen Kammerhälfte verbunden war und während des Dialyseversuches als direkte Verbindung zwischen Reservoir und Kammer fungierte (siehe *Abbildung 16, Kapitel 1.1.4*), über ein Verbindungsstück mit der Pumpe gekoppelt. Somit war das Reservoir über die Pumpe bei geöffnetem Ventil mit der Dialysekammer verbunden. Die Pumpe wurde eingeschaltet und das Kammeroberteil möglichst luftblasenfrei mit Plasma gefüllt. Hierbei wurde die Kammer in einer derartigen Position gehalten, dass die Öffnung in der oberen Kammerhälfte zur Probengewinnung an erhöhter Stelle gegenüber dem Rest der Kammer lag und somit zum vollständigen Entweichen von Luft aus der oberen Kammerhälfte diente. Um den Zeitpunkt bis zum Versuchsstart nicht unnötig hinauszuzögern, wurde der Vorgang der Befüllung schneller vorangetrieben, indem der Beschleunigungs-Knopf der Pumpe betätigt wurde. Die Tatsache, dass die obere Kammerhälfte komplett mit Dialyseflüssigkeit gefüllt war, konnte man am ersten Austreten von Plasma über die Öffnung an der Kammeroberseite erkennen. Sobald dies der Fall war, wurde die Pumpe ausgeschaltet, die Öffnung zur Probenentnahme mit einem Stopfen fest abgedichtet und das Ventil geschlossen. Dieser Zeitpunkt entsprach dem Start des Dialyseexperimentes und die Inkubationszeit von vier Stunden begann. Der Kapillarschlauch wurde vom Pumpenschlauch abgetrennt und direkt ins Reservoir überführt, so dass die Dialyseflüssigkeit fortan vom Reservoir über den Kapillarschlauch und das Ventil in die obere Kammerhälfte gelangen konnte. Die Leistung der Pumpe entfiel nun, jedoch war der Transport der Flüssigkeit in die Kammer durch die Erzeugung eines Unterdruckes bei der Gewinnung von Proben gewährleistet. Sobald der Vorgang der Befüllung und die Verbindung des Kapillarschlauches direkt zum Reservoir abgeschlossen war, wurde die Dialysekammer auf dem Mini-Wippschüttler im Wärmeschrank positioniert und das Reservoir ebenfalls zur Inkubation in den Wärmeschrank gestellt. Der Wippschüttler wurde so eingestellt, dass er in einer Minute etwa 10 bis 15 wippende Bewegungen mit einem Neigungswinkel von  $7^\circ$  ausführte. Die Benutzung des Schüttlers stellte eine gleichmäßige, sanfte Durchmischung der Dialyseflüssigkeit in der oberen Kammerhälfte sicher, so dass sich vor allen Dingen in unmittelbarer Membrannähe keine Bereiche mit einer dauerhaft erhöhten Wirkstoffkonzentration bilden konnten, also stets ein ausreichendes Konzentrationsgefälle, welches essentiell für den Vorgang der Diffusion ist, vorhanden war. Auf diese Weise wurde außerdem die Vergleichbarkeit bezüglich der Dialysatdurchmischung während des Experimentes zwischen den beiden Modellen des kontinuierlichen und statischen Dialysemodells gewährleistet, da die Wipp-Apparatur auch bei den Versuchen zur kontinuierlichen Dialyse zum Einsatz kam (siehe 2.2.3).

### 2.2.1.3 **Ablauf der Dialyse**

Genau drei Minuten nach Versuchsbeginn erfolgte die erste Probenentnahme. Hierzu wurde die gesamte Dialyseapparatur aus dem Wärmeschrank genommen und das Reservoir mit Rührstäbchen auf dem Magnetrührer positioniert, sodass eine homogene Beschaffenheit der Dialyseflüssigkeit gewährleistet war. Nach Entfernung des Verschlusses der Probenöffnung wurde die auf ein Volumen von 1000 µL eingestellte Mikroliterpipette auf die Durchbohrung in der oberen Kammerhälfte gesetzt. Gleichzeitig mit dem Öffnen des Ventils wurde durch langsame Entlastung des Pipettenkolbens damit begonnen, die Probe in die Pipettenspitze aufzunehmen. Das Nachfließen von frischem, auf 37 °C vorgewärmtem Plasma aus dem Reservoir wurde dabei automatisch durch die Erzeugung eines Unterdruckes über die Pipette gesteuert. Um der Viskosität des Plasmas Rechnung zu tragen, wurde nach vollständiger Entlastung des Pipettenkolbens 20 s lang gewartet, bevor das Mehrwegeventil geschlossen und die Pipette durch den Stopfen ersetzt wurde. Nach Überführung der Probe in ein Zentrifugenglas mit Schliffstopfen wurde dieses sofort bei -20 °C eingelagert, und die Dialyseapparatur zurück in den Wärmeschrank gestellt, wobei die Kammer wiederum auf dem Wippschüttler positioniert wurde.

Weitere Proben wurden auf die eben beschriebene Weise 6, 15, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 und 240 Minuten nach Beginn der Inkubationszeit gewonnen.

Um für die spätere Gehaltsbestimmung eine wirkstofffreie Matrixprobe als *Blank* zu erhalten, wurden nach Beendigung des Dialyseexperiments mit einer Mikroliterpipette 1000 µL Plasma aus dem Reservoir entnommen und in ein Zentrifugenglas mit Schliffstopfen überführt und sofort bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Zusätzlich wurden sechs weitere Aliquote Plasma in Zentrifugengläser abgefüllt, die zum Zwecke der Gewinnung einer Kalibriergeraden für die spätere Quantifizierung mit den entsprechenden FP-Standardlösungen (siehe 2.1.2) versetzt wurden. Das jeweils zupipettierte Volumen der entsprechenden methanolischen Standardlösung und die daraus resultierenden Endkonzentrationen der Kalibrierstandards können *Tabelle 7* entnommen werden. Diese Proben wurden ebenfalls bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingelagert.

**Tabelle 7:** Herstellung und Endkonzentration der FP-Standardreihe, wie sie zur Extraktion vorlag und zur Gewinnung einer Kalibriergeraden bei der Quantifizierung der Dialyseproben verwendet wurde.

Standard	Konzentration [ng/mL]	Volumen methanolische Lösung [ $\mu$ L]	Volumen Matrix [ $\mu$ L]
S <sub>1</sub>	500	100 V <sub>1</sub>	900
S <sub>2</sub>	250	100 V <sub>2</sub>	900
S <sub>3</sub>	100	100 V <sub>3</sub>	900
S <sub>4</sub>	50	100 V <sub>4</sub>	900
S <sub>5</sub>	25	100 V <sub>5</sub>	900
S <sub>6</sub>	10	100 V <sub>6</sub>	900

## 2.2.2 Vor- und Kontrollversuche zur Funktionsfähigkeit des kontinuierlichen Dialysemodells

### 2.2.2.1 Bestimmung der Flussrate

Für die Durchführung der Experimente mit dem kontinuierlichen Dialysemodell (siehe *Abbildung 18, Kapitel 2.1.4*) musste zunächst eine geeignete Fließgeschwindigkeit der Dialyseflüssigkeit durch die obere Kammerhälfte gewählt werden. Die Umdrehungsgeschwindigkeit der Pumpe sollte dabei möglichst langsam sein, um pro Fraktion genügend Arzneistoff die Diffusion vom Lungengewebe in das Plasma zu ermöglichen und somit eine ausreichend hohe Konzentration FP in den Proben zu liefern. Gleichzeitig jedoch sollte der Fluss schnell genug sein, um einen kontinuierlichen Flüssigkeitstransport durch die Dialyseeinheit zu erzeugen.

An der verwendeten Pumpe (Minipuls 2, Gilson; siehe *2.1.6*) können nur Einstellungen zur Drehgeschwindigkeit des Pumpenkopfes vorgenommen werden, diese werden im Folgenden als „Umdrehungen“ bezeichnet. Es fehlen jedoch Angaben dazu, mit welcher Flussrate die entsprechende Einstellung der Umdrehungszahl korreliert. Die Kenntnis dieses Parameters ist eine essentielle Voraussetzung für die Durchführung der Versuche mit dem kontinuierlichen Dialysemodell.

Zur Bestimmung der Pumpgeschwindigkeit wurde zunächst die Membran analog zu einem Dialyseversuch vorbereitet (siehe *1.2.2.2*). Dem 30-minütigen Einlegen in Millipore®-Wasser schloss sich die Äquilibration in Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (siehe *1.1.2*) im Wärmeschrank an. Die für die vorliegenden Versuche verwendete Teflonkammer ist in

*Abbildung 17* (siehe 2.1.4) dargestellt und wurde auch bei den späteren Experimenten mit dem kontinuierlichen Dialysemmodell (siehe 2.2.3 und 3) eingesetzt. Als Dialyseflüssigkeit diente Millipore®-Wasser. Nach dem Vortemperieren von Reservoir und Dialysekammer bei 37 °C wurde das Kammerunterteil mit 5 mL Millipore®-Wasser befüllt und mit der Membran bedeckt, anschließend wurde das Kammeroberteil aufgesetzt und mit Federklammern fixiert. Ein flexibler Schlauch aus Silikon mit 4 mm Innendurchmesser wurde in den Pumpenkopf eingefädelt und über ein Ventil mit der Einlass-Edelstahlkapillare der oberen Kammerhälfte gekoppelt (siehe *Abbildung 18, Kapitel 2.1.4*). Mit Hilfe der Pumpe wurde das Kammeroberteil luftblasenfrei mit Millipore®-Wasser befüllt und die Öffnung an der Kammeroberseite mit einem Stopfen fest abgedichtet, sobald der Füllvorgang abgeschlossen war (siehe 2.2.1.2). Für die Bestimmung der Flussrate war der Fraktionensammler zunächst nicht an das System angeschlossen. Die Flüssigkeit wurde bei laufender Pumpe aus der oberen Kammerhälfte über die Auslass-Edelstahlkapillare und einen Kapillarschlauch in einen Auffangbehälter geleitet. Während des Experimentes war die Dialysekammer auf dem Wippschüttler gelagert.

An der Pumpe wurde nun die Einstellung der Umdrehungszahl variiert und die jeweils korrelierende Flussgeschwindigkeit bestimmt. Zunächst wurde die Einstellung „2 Umdrehungen“ gewählt und nach Starten der Pumpe kurz abgewartet, sodass kontinuierlich Wasser in den Auffangbehälter tropfte, somit also ein stabiler Fluss vorlag. Der Kapillarschlauch wurde vom Auffangbehälter entfernt und stattdessen in einen 10 mL-Messzylinder überführt, wobei zeitgleich eine Stoppuhr betätigt wurde, die mit dem Aufzeichnen der Zeit begann. Über fünf Minuten hinweg wurde Dialyseflüssigkeit mit dem Messzylinder aufgefangen. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Pumpe angehalten und über das am Sammelgefäß abgelesene Volumen die Flussrate berechnet. Nacheinander wurden auf diese Weise die Fließgeschwindigkeiten bei den Einstellungen „10, 50 und 200 Umdrehungen“ bestimmt. Das Wasser wurde jeweils fünf Minuten lang bzw. bei „200 Umdrehungen“ eine Minute lang gesammelt. Für jede vorgenommene Einstellung wurden drei Messungen durchgeführt, anschließend wurde der Mittelwert gebildet. Die bestimmten Volumina und die sich daraus ergebenden Flussraten sind in *Tabelle 8* dargestellt.

**Tabelle 8:** Mittelwerte der Abgelesenen Volumina und Flussraten bei verschiedenen Einstellungen der Pumpe (n=3).

Umdrehungen	Sammelzeit [min]	Abgelesenes Volumen	
		[mL]	Flussrate [mL/min]
2	5	1,9	0,38
10	5	2,4	0,48
50	5	4,6	0,92
200	1	2,6	2,60

Für die weiteren Versuche mit dem kontinuierlichen Dialysemmodell wurde die Pumpeneinstellung „2 Umdrehungen“ mit einer resultierenden Flussrate von 0,38 mL/min gewählt.

#### 2.2.2.2 Prüfung der einzelnen Abläufe während eines Dialyseversuches

Der prinzipielle Ablauf eines Dialyseversuches mit dem kontinuierlichen Modell sollte geprüft werden, um die Durchführbarkeit und die Reproduzierbarkeit der Dialyseexperimente zu gewährleisten. Dabei wurde vor allem darauf geachtet, ob eine Befüllung der oberen Kammerhälfte mit Hilfe der Pumpe ohne Luftblasen zu bewerkstelligen ist und ob ein Strom des Dialysates durch die obere Kammerhälfte erzeugt werden kann, der zwar kontinuierlich voranschreitet, jedoch für eine Diffusion des Wirkstoffes ausreichend Kontaktzeit des Dialysates mit der Membranoberfläche bietet, bevor die Dialyseflüssigkeit die Kammer wieder über die Austritts-Edelstahlkapillare verlässt. Außerdem war es wichtig zu zeigen, dass eine gute Durchmischung der Flüssigkeit in der oberen Kammerhälfte stattfindet.

Um die Vorgänge im Kammerinneren während des Dialyseexperimentes beobachten zu können, wurde die mit Plexiglas modifizierte Version der oberen Kammerhälfte eingesetzt. Auf eine Kopplung der Dialyseeinheit an den Fraktionensammler konnte verzichtet werden, da der Schritt der Probengewinnung für diese Vorversuche zunächst keine Rolle spielte.

Die Versuchsvorbereitung entsprach der in 2.2.2.1 beschriebenen Vorgehensweise. Nach Präparation der Membran und Befüllung der unteren Kammerhälfte mit 5 mL Millipore®-Wasser wurde die Membran auf diesem Kammerteil positioniert und das System durch Aufsetzen der oberen Kammerhälfte, deren Oberseite aus Plexiglas gefertigt ist, und Fixierung mit Federklammern komplettiert. Die Kammer wurde analog zu *Abbildung 18 (Kapitel 2.1.4)* an die Pumpe angeschlossen und somit an das Reservoir, in dem sich als Dialyseflüssigkeit Millipore®-Wasser befand, gekoppelt. Die Auslass-Edelstahlkapillare wurde wie in den Versuchen zur

Bestimmung der Flussrate (siehe 2.2.2.1) über einen Kapillarschlauch mit einem Auffangbehälter verbunden. Zur Befüllung der oberen Kammerhälfte wurde die Pumpe mit der Einstellung „2 Umdrehungen“ eingeschaltet. Um den Füllvorgang möglichst schnell abzuschließen, wurde zusätzlich der Beschleunigungsknopf an der Pumpe betätigt, der zu einer schnellen Rotation des Pumpenkopfes und somit zu einer beschleunigten Förderung von Dialyseflüssigkeit aus dem Reservoir führte. Durch die durchsichtige Beschaffenheit der Oberseite der Kammer war es möglich, den Prozess der Befüllung genau zu beobachten. Während dieses Vorganges wurde die Dialysekammer leicht schräg gehalten, sodass die Öffnung auf ihrer Oberseite an erhöhter Position im Vergleich zum Rest der Kammer lag. Auf diese Weise konnte während des Einströmens der Flüssigkeit die im Kammeroberteil befindliche Luft vollständig entweichen. Sobald Wasser aus der Öffnung auf der Kammeroberseite trat, wurde die Pumpe sofort angehalten und gleichzeitig die Öffnung der Kammer mit einem Stopfen dicht verschlossen.

Nach dem erneuten Starten der Pumpe wurde Wasser mit einer Flussrate von 0,38 mL/min durch die Auslass-Edelstahlkapillare und den Schlauch in Richtung des Auffangbehälters befördert, wobei die Kammer auf dem Wippschüttler positioniert wurde. Sobald Flüssigkeit in den Auffangbehälter tropfte, wurde die Pumpe wiederum angehalten.

Zur Visualisierung des Strömungsverhaltens wurde die Dialyseflüssigkeit im Reservoir mit einer Spatelspitze (ca. 10 mg) des Farbstoffes *Fast Green FCF* versetzt. Nach kurzem Umrühren mit Hilfe des Spatels löste sich der Farbstoff schnell vollständig auf und im Reservoir entstand eine gleichmäßig blaugrüne Lösung.

Mit dem Einschalten der Pumpe konnte man beobachten, wie die nunmehr gefärbte Dialyseflüssigkeit in die Kammer einströmte, sich dort mit dem bereits vorhandenen Wasser vermischte und bei der gewählten Flussrate von 0,38 mL/min und den gleichmäßigen Schwenkbewegungen durch den Wippschüttler schnell eine homogene Farbstofflösung innerhalb der oberen Kammerhälfte bildete, bevor sie über die Auslass-Edelstahlkapillare in den Auffangbehälter floss. Durch die langsame Fließgeschwindigkeit kam es zu keinerlei Wirbelbildungen im Oberteil der Kammer. Die gefärbte Lösung ermöglichte es außerdem, zu prüfen, dass kein Rückstrom von der Kammer in das Reservoir stattfand und ausströmendes Volumen tatsächlich durch Flüssigkeit aus dem Reservoir ersetzt wurde.

### 2.2.2.3 **Einstellung des Fraktionensammlers für die Probengewinnung**

Die Sammlung der Proben, die durch die kontinuierliche Dialyse gewonnen wurden, musste lückenlos erfolgen und wurde daher mit Hilfe eines Fraktionensammlers durchgeführt. Prinzipiell ermöglicht das Gerät eine Sammlung nach Volumen oder nach Zeit. Da bei den

Dialyseversuchen kleine Volumina in Eppendorfgläsern gesammelt werden sollten, wurde ein von der institutseigenen Werkstatt gefertigter Aufsatz aus Kunststoff verwendet, in dem diese Gefäße auf stabile Art mit geöffnetem Deckel positioniert werden konnten. Zunächst wurde versucht, durch den Volumen-Modus Fraktionen mit je einem Milliliter zu gewinnen. Hierzu wurden die Vorbereitungen der Dialyseapparatur analog zu 2.2.2.1 durchgeführt, wobei zusätzlich der Fraktionensammler an das System angeschlossen wurde, so dass der Aufbau des kontinuierlichen Dialysemodells *Abbildung 18 (Kapitel 2.1.4)* entsprach. Als Dialyseflüssigkeit diente Plasma, welches auch bei den späteren Versuchen eingesetzt werden sollte. Da vermutlich eine Proteinablagerung während des Fließvorganges zum Verstopfen eines Kapillargefäßes führte, wurde fortan das Plasma vor Einfüllen in das Reservoir für zehn Minuten in das Ultraschallbad gestellt. Somit konnten etwaige Proteinausflockungen vor Beginn der Dialyse aufgelöst und ein Verstopfen der englumigen Leitungen der Apparatur verhindert werden. Mit der gewählten Flussrate von 0,38 mL/min funktionierte die Probengewinnung nach Volumen jedoch nicht zuverlässig. Der Fraktionensammler schloss die Kollektion einer Probe nicht nach einem Milliliter ab und schritt zum nächsten Gefäß voran, sondern sammelte über das eingegebene Volumen hinaus weiter. Dieses Problem könnte laut Herstellerangaben durch die geringe Fließgeschwindigkeit von weniger als fünf Tropfen pro Sekunde begründet sein.

Infolgedessen wurde für die weiteren Experimente der Sammelmodus nach Zeit gewählt. Da analog zu den Proben aus den Versuchen mit dem statischen Dialysemodell für jede zu analysierende Fraktion ein Milliliter zur Verfügung stehen sollte, wurde pro Eppendorfglas eine Sammelzeit von drei Minuten eingestellt, was einem Volumen von 1,14 mL entsprach. Um zu verifizieren, dass das angestrebte Volumen tatsächlich erreicht wurde, wurden in diesem Vorversuch insgesamt 20 Fraktionen gesammelt und das Volumen jeweils mit Hilfe einer Eppendorfpipette kontrolliert. Da die Kollektion nach Zeit zuverlässig funktionierte, konnte dieser Sammelmodus für die nachfolgenden Experimente übernommen werden.

### **2.2.3 Untersuchung der Diffusionskinetik von Fluticasonpropionat von humanem Lungengewebe in humanes Plasma mit Hilfe des kontinuierlichen Dialysemodells**

Zur Etablierung des kontinuierlichen Dialysemodells wurde die Dialyseapparatur wie in *Abbildung 18 (Kapitel 2.1.4)* dargestellt verwendet. Insgesamt wurden drei Versuche unter Einsatz von Fluticasonpropionat (FP) mit dem kontinuierlichen Modell durchgeführt, die dann mit den durch Verwendung des statischen Modells (siehe 2.2.1) generierten Ergebnissen



verglichen werden konnten. Analog zu den Experimenten mit dem statischen Dialysemodell diente Plasma als Dialyseflüssigkeit, wobei die Vergleichbarkeit der Matrix durch Verwendung von Plasma aus der selben Grundgesamtheit (siehe 2.1.3.1) sichergestellt war.

#### 2.2.3.1 **Vorbereitung der Dialyse**

Zunächst wurde der Fraktionensammler mit 80 beschrifteten Eppendorfgläsern mit einem Maximalvolumen von je 1,5 mL bestückt. Ein Aliquot Lungenhomogenat und insgesamt 200 mL Plasma wurden für jeden Einzelversuch aufgetaut. Etwaige Proteinausflockungen im Plasma wurden unter zehnjährigem Einsatz des Ultraschallbades aufgelöst. Während der Äquilibration der Membran erst in Millipore®-Wasser und anschließend in Plasma analog zur Vorbereitung bei Versuchen mit dem statischen Dialysemodell (siehe 2.2.1.1 und 1.2.2.2) wurden das mit Dialyseflüssigkeit und Rührstäbchen befüllte Reservoir, das Lungenhomogenat und die Dialysekammer bei 37 °C im Wärmeschrank vortemperiert. Es folgte die Programmierung des Fraktionensammlers, wobei – den Sammelmodus nach Zeit zugrundegelegt – ein Sammelintervall von je drei Minuten (siehe 2.2.2.3) für insgesamt 80 Fraktionen und zusätzlich 20 weitere Fraktionen zur Reinigung des Systems eingegeben wurde.

#### 2.2.3.2 **Applikation der Dosis**

Nach Entnahme des Kammerunterteils aus dem Wärmeschrank wurde – genau wie bei Versuchen mit dem statischen Dialysemodell beschrieben (siehe 2.2.1.2) – die Hälfte des Lungenhomogenates auf das Unterteil überführt, die Dosis von 200 µg FP mit einer Mikroliterpipette appliziert und das restliche Lungenhomogenat des bereits angebrochenen Aliquots dazugegeben. Hieran schloss sich die gründliche aber zugleich vorsichtige Durchmischung des wirkstoffhaltigen Homogenates mit der zur Applikation der Dosis verwendeten Pipettenspitze an. Die vorinkubierte Membran wurde auf der befüllten unteren Kammerhälfte positioniert und das Kammeroberteil wurde aufgesetzt, wobei zwei Federklammern das feste Abschließen der beiden Kammerhälften unterstützten. Das Reservoir wurde auf den Magnetrührer gestellt, über einen Schlauch an die Pumpe gekoppelt und mit Parafilm fest verschlossen. Es folgte der Anschluss der Einlass-Edelstahlkapillare der oberen Kammerhälfte über das Mehrwegeventil und den Verbindungsschlauch an die Pumpe und die Verbindung der Auslass-Edelstahlkapillare mit dem Fraktionensammler (siehe *Abbildung 18, Kapitel 2.1.4*). Analog zu den statischen Dialyseversuchen mit FP wurde nun das Kammeroberteil, das mit der Pumpe und somit mit dem Reservoir verbunden war, befüllt (siehe 2.2.1.2). Hierbei sorgte die Betätigung des Beschleunigungsknopfes an der Pumpe für eine raschere Rotation des Pumpenkopfes und somit für eine schnellere Befüllung der oberen

Kammerhälfte mit Plasma, sodass der Zeitpunkt bis zum Versuchsstart nicht unnötig verzögert wurde. Die Dialysekammer wurde dabei schräg gehalten, damit die Luft aus der oberen Kammerhälfte über die Öffnung an deren Oberseite vollständig entweichen konnte. Sobald die Kammer komplett mit Dialyseflüssigkeit gefüllt war, trat über die Öffnung an der Kammeroberseite Plasma aus. Wurde dies beobachtet, wurde die Pumpe sofort angehalten und gleichzeitig die Öffnung der Kammer mit einem Stopfen dicht verschlossen. Die Dialysekammer wurde auf dem Wippschüttler im Wärmeschrank bei 37 °C positioniert und dieser wie bei den Experimenten mit dem statischen Dialysemodell auf eine langsame Schwenkgeschwindigkeit von ungefähr 10 bis 15 Bewegungen pro Minute eingestellt (siehe 2.2.1.2). Die Pumpe wurde erneut bei einer Einstellung von „2 Umdrehungen“ gestartet und förderte mit einer Flussrate von 0,38 mL/min Dialyseflüssigkeit durch die Auslass-Edelstahlkapillare und den Schlauch in Richtung des Fraktionensammlers. Sobald das Plasma das Dreiwegeventil des Fraktionensammlers erreicht hatte und in Richtung des Auffangbehälters floss, wurde augenblicklich der Fraktionensammler gestartet und die Inkubationszeit von 240 min begann.

### 2.2.3.3 **Ablauf der Dialyse**

Das Dialysat wurde nunmehr aus der oberen Kammerhälfte über das Ventil und die Tropfvorrichtung des Fraktionensammlers direkt in das jeweilige Sammelgefäß geleitet. Der Beginn der Sammlung der ersten Fraktion entsprach dem Zeitpunkt Null des Dialyseexperimentes. Nach drei Minuten rückte der Arm des Fraktionensammlers, an dem die Tropfvorrichtung angebracht war, zum nächsten Gefäß vor und die Gewinnung der zweiten Probe begann, die den Zeitraum drei bis sechs Minuten nach Beginn der Dialyse abdeckte. Auf diese Weise wurden sukzessive über vier Stunden hinweg 80 Fraktionen gesammelt. Die Dialysekammer befand sich während des gesamten Versuches bei 37 °C im Wärmeschrank und wurde konstant auf dem Wippschüttler bewegt. Bei einem Fluss von 0,38 mL/min wurde für jede Fraktion über einen Zeitraum von drei Minuten ein Volumen von 1,14 mL in einem Eppendorfgefäß gesammelt. Alle Probengefäße wurden ordnungsgemäß verschlossen und bei -20 °C eingelagert. Die Fraktionen, deren Sammlung zu den Zeitpunkten 3, 6, 15, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 und 240 min nach Beginn der Inkubationszeit abgeschlossen wurde, wurden später auf ihren FP-Gehalt hin analysiert.

Mit Beendigung des Dialyseexperimentes nach 240 min wurde das Ende des Pumpenschlauches aus dem Reservoir entfernt und in einen Behälter mit destilliertem Wasser überführt. Nach Auskopplung der Dialysekammer aus dem System wurde zu

Reinigungszwecken mit Hilfe der Pumpe Wasser durch die Leitungen und den Fraktionensammler geleitet.

Aus dem Reservoir mit Dialyseflüssigkeit wurden sieben Aliquote Plasma mit einem Volumen von je 900  $\mu\text{L}$  entnommen und in Zentrifugengläser mit Schliffstopfen überführt. Eine dieser Proben sollte als Blank der Matrix dienen und wurde mit 100  $\mu\text{L}$  Methanol versetzt. Den übrigen Aliquots wurden zur Herstellung von Standards für eine Kalibriergerade im Rahmen der späteren Quantifizierung die entsprechenden methanolischen FP-Standardlösungen (siehe 2.1.2) zupipettiert. Die jeweilige Zusammensetzung der Kalibrierstandards und die resultierenden Endkonzentrationen entsprachen denen der beim statischen Dialysemmodell gewonnenen Proben für die Quantifizierung von FP (siehe 2.2.1.3) und können *Tabelle 7* entnommen werden. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Proben bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

## 2.3 Bestimmung der Wirkstoffkonzentrationen in den Dialyseproben

### 2.3.1 Probenaufarbeitung

Für jeden Dialyseversuch wurden die Leerwertkontrolle der Matrix, die Kalibrierstandards und die Proben aus den Experimenten bei RT aufgetaut. Von den Fraktionen, die während einer kontinuierlichen Dialyse gesammelt worden waren, wurden lediglich die Eppendorfggefäße, deren Inhalt zu den Zeitpunkten 3, 6, 15, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 und 240 min nach Beginn der Inkubationszeit abschließend gewonnen worden war, zur weiteren Analyse aus dem Gefrierschrank genommen. Mit Hilfe einer Mikroliterpipette wurden jeweils 1000  $\mu\text{L}$  der Fraktionen der kontinuierlichen Dialyse in ein Zentrifugenglas mit Schliffstopfen überführt.

Bei Versuchen mit dem statischen Dialysemmodell wurden die Proben der Zeitpunkte 120, 150, 180 und 240 min zusätzlich im Verhältnis 1 : 1 mit Plasma derselben Grundgesamtheit, die für die Dialyseexperimente eingesetzt worden war, auf ein Endvolumen von 1000  $\mu\text{L}$  verdünnt, da auf Basis von Vorversuchen von FP-Konzentrationen oberhalb des Kalibrierbereiches ausgegangen werden musste.

Der Blank wurde jeweils mit 50  $\mu\text{L}$  Methanol versetzt, allen übrigen Proben wurden als interner Standard 50  $\mu\text{L}$  der Verdünnung  $V_1$  Amcinonid (siehe 2.1.2) zupipettiert. Direkt im Anschluss wurden die Mischungen auf dem Vortex kurz vermengt. In Anlehnung an eine von Freiwald bereits verwendete Methode zur Quantifizierung von Glucocorticoiden [53] folgte die zweimalige Extraktion der Proben mit Diethylether. Hierbei wurden die Proben mit 3 mL Ether versetzt und für 20 min am Mischrad durchmengt. Zur besseren Abtrennung der wässrigen

Phase vom Ether wurden die Proben bei 1000 x *g* fünf Minuten lang zentrifugiert. Mit Hilfe einer Mikroliterpipette wurde die organische Phase abgenommen und in ein Spitzkölbchen überführt. Dieses Procedere wurde analog noch einmal durchgeführt und die Etherphasen der zwei Extraktionsschritte anschließend im Kolben zusammengeführt. Unter einem beständigen, leichten Gasstrom aus Stickstoff und bei gleichzeitiger Erwärmung mit Hilfe eines Wasserbades wurden die Proben bei 30 °C bis zur Trockene eingengt. Die Rückstände im Spitzkolben wurden anschließend in 200 µL Methanol aufgenommen, 50 µL davon in ein Vial überführt und die enthaltenen Glucocorticoidkonzentrationen mittels HPLC quantifiziert.

### 2.3.2 Quantifizierung mittels HPLC

Die quantitative Bestimmung von Fluticasonpropionat (FP) und Amcinonid erfolgte mit dem in 2.1.5 beschriebenen System und in Anlehnung an eine durch Freiwald *et al.* [53] beschriebene Methode. Bei einer Flussrate von 1 mL/min wurden Analyt und interner Standard chromatographisch unter Gradientenelution (siehe *Tabelle 9*) aufgetrennt. Die mobile Phase setzte sich aus zwei Komponenten zusammen, wobei Fließmittel A aus 0,2 % (V/V) Essigsäure in Millipore®-Wasser und Fließmittel B aus Acetonitril (MeCN) bestand. Als stationäre Phase diente eine Symmetry C18 Säule (siehe 2.1.5), die während der Analyse im Säulenofen bei 25 °C temperiert wurde. Der Probengeber kühlte die darin befindlichen Vials konstant auf eine Temperatur von 10 °C, als Injektionsvolumen wurden je 20 µL einer Probe festgelegt. Die Detektion der eluierten Substanzen erfolgte bei einer Messwellenlänge von 254 nm.

**Tabelle 9:** Zeitlicher Verlauf der Gradientenelution bei der Quantifizierung von FP mittels HPLC.

Zeitpunkt nach Probeninjektion [min]	Anteil Fließmittel A [%]	Anteil Fließmittel B [%]	Vorgang
0	60	40	Linearer Gradient
30	29	71	
31	0	100	Spülen der Säule
40	0	100	
41	60	40	Äquilibrierung der Säule
50	60	40	

Fließmittel A: 0,2 % (V/V) Essigsäure in Millipore®-Wasser

Fließmittel B: MeCN

Zur quantitativen Auswertung der erhaltenen Chromatogramme wurden zunächst unter Beachtung der Retentionszeiten mit Hilfe der Software Breeze® die Peakflächen der Glucocorticoide integriert und anschließend die Quotienten aus der Fläche des Peaks von FP und des Internen Standards gebildet. Nach Auftragen dieser Quotienten für die Kalibrierlösungen gegen die eingesetzten Konzentrationen wurde durch lineare Regression eine Kalibriergerade erhalten. Diese wurde dann verwendet, um in den Proben aus den Dialyseversuchen die FP-Konzentrationen zu ermitteln, wobei durch Einsetzen der entsprechenden Flächenverhältnisse in die Geradengleichung die unbekannt Konzentrationen berechnet wurden.

Mit dem statischen und dem kontinuierlichen Dialysemmodell wurden für jeden Probenentnahmezeitpunkt Konzentrationswerte aus drei unabhängigen Versuchsansätzen gewonnen und durch Bildung der jeweiligen arithmetischen Mittelwerte die zeitlichen Konzentrationsverläufe für die beiden Modelle dargestellt.

### **3 Bestimmung der Diffusionskinetik von Fenoterolhydrobromid und Ipratropiumbromid nach Freisetzung aus dem Dosieraerosol Berodual® N bei Anwendung des kontinuierlichen Dialysemodells**

#### **3.1 Verwendete Reagenzien, Materialien und Geräte**

##### **3.1.1 Substanzen**

Das Dosier-Aerosol Berodual® N (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland), dessen Lösung zur Druckgasinhalation pro Sprühstoß 20 µg Ipratropiumbromid (IB) und 50 µg Fenoterolhydrobromid (FE-HBr) enthält, wurde in einer öffentlichen Apotheke käuflich erworben. Die Einzelsubstanzen FE-HBr, IB und Salbutamolsulfat (SB-S) stammten von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland). Ameisensäure (p.a. Qualität) wurde von E. Merck (Darmstadt, Deutschland) erhalten und alle übrigen verwendeten Substanzen wurden analog zu 2.1.1 bezogen.

##### **3.1.2 Standardlösungen für die Quantifizierung**

- Interner Standard

Eine methanolische Lösung des  $\beta_2$ -Sympathomimetikum Salbutamol (SB) in einer Konzentration von 1 µg/mL (Verdünnung  $V_1$ ) wurde als interner Standard verwendet, wobei sich die angegebene Konzentration auf die freie Base SB bezieht. Ausgehend von einer Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL SB in Methanol wurde  $V_1$  durch Verdünnung hergestellt. Sowohl die Stammlösung als auch die Verdünnung wurden bei -20 °C lichtgeschützt in braunen Glasgefäßen gelagert.

- Kalibrierstandards

Eine methanolische Lösung, die IB in einer Konzentration von 1 mg/mL enthielt, wurde hergestellt. Auch für FE-HBr wurde eine methanolische Lösung bereitet, wobei sich die Endkonzentration von 1 mg/mL allerdings auf die freie Base der Substanz Fenoterol (FE) bezieht. Ausgehend von diesen beiden Stammlösungen resultierten durch Verdünnung mit Methanol Standardlösungen (V) der folgenden Konzentrationen:

V <sub>1</sub>	3200 ng/mL
V <sub>2</sub>	1600 ng/mL
V <sub>3</sub>	1000 ng/mL
V <sub>4</sub>	800 ng/mL
V <sub>5</sub>	500 ng/mL
V <sub>6</sub>	250 ng/mL
V <sub>7</sub>	10 ng/mL
V <sub>8</sub>	1 ng/mL

Die Stammlösungen und die Verdünnungen wurden vor Licht geschützt in braunen Glasgefäßen bei -20 °C gelagert.

### **3.1.3 *Humanes Lungengewebe und Blutplasma***

#### **3.1.3.1 *Herkunft***

Humanes Lungengewebe stammte von Patienten des Thoraxzentrums Bezirk Unterfranken, MÜNNERSTADT und Blutplasma wurde von gesunden Probanden über die Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie des Universitätsklinikums Würzburg bezogen (siehe 2.1.3.1). Analog zu 2.1.3.1 wurde das Lungengewebe nach der Lobektomie mit isotonischer Kochsalzlösung äußerlich blutfrei gewaschen und auf Eis nach Würzburg transportiert, wo es in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde. Plasma von vier Spendern wurde vermischt, um für drei Experimente mit dem kontinuierlichen Dialysemodell ausreichend Dialyseflüssigkeit zur Verfügung zu stellen. Die Lagerung der Spezimen erfolgte bei -80 °C.

#### **3.1.3.2 *Herstellung des Lungenhomogenates***

Im Gegensatz zu den bisherigen Dialyseversuchen mit Cyclosporin A und Fluticasonpropionat wurde das Lungengewebe von drei verschiedenen Patienten mit einem Skalpell in kleine Stücke mit einer Kantenlänge von ca. 1 mm geschnitten und nicht zerschlagen oder mit dem Ultra-Turrax homogenisiert (siehe 1.1.3.3 und 2.1.3.2).

Nach Zugabe von Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (siehe 1.1.2) und Penicillin-Streptomycin Lösung zu dem zerkleinerten Gewebe wurde mit einem Glasstab sorgfältig umgerührt, so dass eine gleichmäßige Suspension von Lungengewebe in Puffer resultierte. Das Homogenat wurde in Portionen zu jeweils 5 g aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingelagert.

### 3.1.4 Dialyseapparatur

Für die Dialyseversuche mit dem Berodual® N Dosieraerosol wurde die Kammer aus Teflon mit zwei Edelstahlkapillaren (siehe *Abbildung 17*, *Kapitel 2.1.4*) verwendet, die die Voraussetzungen für einen kontinuierlichen Fluss erfüllt. Analog zu *Abbildung 18* (*Kapitel 2.1.4*) setzte sich die Dialyseapparatur aus Reservoir mit Plasma, Pumpe, Ventil, Dialysekammer mit Einlass- und Auslass-Edelstahlkapillare, Fraktionensammler und Verbindungsschläuchen zusammen. Während des Experimentes durchmischte ein Magnetrührer in Kombination mit einem Rührstäbchen den Inhalt des Reservoirs und die Kammer lagerte auf dem Mini-Wippschüttler.

### 3.1.5 LC-MS/MS System

---

Analytische HPLC-Säule	XTerra MS - C18; 3,0 x 150 mm; Partikelgröße 3,5 µm (Waters, Eschborn, Deutschland)
Vorsäule	Security cartridge System RP1, 4 mm Länge, 3 mm Durchmesser (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)
Micro Vials	300 µL Glaseinsatz, eingeschmolzen in ein 2 mL Vial, Braunglas mit Schraubverschluss, 12 x 32 mm (Chromacol, Herts, UK)
Probengeber	Agilent Technologies 1200 Series HiP-ALS SL+ (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)
Degaser	Agilent Technologies 1200 Series Degasser (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)
Pumpe	Agilent Technologies 1200 Series Bin Pump SL (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)
Massenspektrometer	6460 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)
Steuerung und Datenverarbeitung	Agilent MassHunter (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)

---



### 3.1.6 *Sonstige Geräte und Materialien*

Neben den in 2.1.6 aufgeführten Utensilien wurden folgende Geräte und Materialien verwendet:

Eppifuge	Microfuge <sup>®</sup> 22R Centrifuge (Beckman Coulter <sup>™</sup> , Palo Alto, California, USA)
Reagenzröhren	Röhren aus Polypropylen mit konischem Boden und Schraubverschluss, 15 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Transferpipette 500-5000 µL	Transferpipette <sup>®</sup> elektronik (BRAND, Wertheim, Deutschland)
Zentrifuge	Centrifuge 5702 max. 2750 x g (4400 Upm), Winkelarbeitskopf 30 x 15 mL (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

## 3.2 Durchführung der Dialyseversuche

Die Diffusionskinetik von FE-HBr und IB nach Freisetzung aus dem Dosieraerosol Berodual<sup>®</sup> N wurde stets beim Übergang von humanem Lungengewebe in humanes Blutplasma beobachtet. Insgesamt wurden hierzu drei unabhängige Versuche mit dem kontinuierlichen Dialysemmodell durchgeführt.

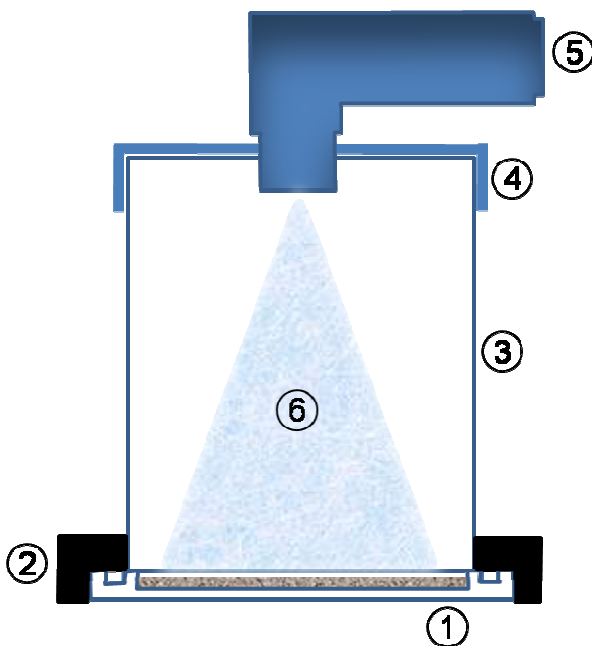
### 3.2.1 *Vorbereitung der Dialyse*

Vor dem eigentlichen Versuchsbeginn wurde ebenso verfahren, wie bei der kontinuierlichen Dialyse mit FP (siehe 2.2.3.1). Nachdem pro Versuch 200 mL Plasma bei RT aufgetaut waren, wurden diese für zehn Minuten in das Ultraschallbad gestellt. Die Membran wurde in Millipore<sup>®</sup>-Wasser bei RT und in Plasma bei 37 °C äquilibriert, wobei gleichzeitig das aufgetaute Lungenhomogenat, das Reservoir mit Dialyseflüssigkeit und die Dialysekammer im Wärmeschrank auf 37 °C temperiert wurden. Der mit Reagiergefäßen gefüllte Fraktionensammler wurde programmiert, bei einem Zeitfenster von drei Minuten pro Gefäß insgesamt 80 Fraktionen des Dialysates aufzufangen.

### 3.2.2 *Applikation der Dosis*

Die Applikation der Dosis sollte direkt durch das Auslösen des handelsüblichen Dosieraerosols erfolgen, daher war es nötig, eine Applikationshilfe einzusetzen, die auf eine standardisierte Art

und Weise das freigesetzte Aerosol zum Lungenhomogenat hin leitete. Hierzu wurde ein bereits von Freiwald *et al.* [53] eingesetztes Glasrohr verwendet, das in Zusammenarbeit mit der institutseigenen Werkstatt um zwei Elemente erweitert wurde. Ein zu dem zylindrischen Glasrohr passender Kunststoffring wurde konstruiert, der gleichzeitig das Glasrohr und die untere Kammerhälfte umschloss und damit den Glaszylinder in einer stabilen Position auf der unteren Kammerhälfte hielt. Ein Verbindungsstück aus Teflon wurde als Deckel auf das Rohr aufgesetzt und konnte passgenau durch eine Öffnung das Mundstück des Dosieraerosols aufnehmen. Der Aufbau der Applikationshilfe im Querschnitt ist in *Abbildung 19* dargestellt. Durch Verwendung von Teflon als Werkstoff für den Deckel der Apparatur konnten Adsorptionseffekte der Arzneistoffe minimiert werden. Da der Kunststoffring im Außenbereich der Applikationshilfe lag und somit nicht in Kontakt mit den Wirkstoffen kommen konnte, war die Auswahl des Materials zur Fertigung hier von untergeordneter Bedeutung.



**Abbildung 19:** Schematische Darstellung der Dosisapplikation auf das Lungenhomogenat. (Modifiziert nach [53])

Das Aufbringen der Wirkstoffe aus dem Dosieraerosol Berodual<sup>®</sup> N mit den Bestandteilen der Applikationshilfe ist schematisch im Querschnitt dargestellt: ① Kammerunterteil mit Lungenhomogenat, ② Kunststoffring zur Fixierung der Applikationshilfe, ③ 100 mm hohes Glasrohr mit einem Innendurchmesser von 53 mm und einem Außendurchmesser von 58 mm, ④ Deckel aus Teflon mit passgenauer Öffnung für das Mundstück des ⑤ Dosieraerosols, ⑥ Aerosol nach Auslösen des Berodual<sup>®</sup> N.

Das Unterteil der Dialysekammer und das Lungenhomogenat wurden aus dem Wärmeschrank entnommen und ungefähr die Hälfte des Gewebehomogenates wurde auf das Kammerunterteil gefüllt. Anschließend wurde der Glaszylinder konzentrisch auf das Kammerunterteil gestellt und der Kunststoffring so positioniert, dass er fest die untere Kammerhälfte umschloss und gleichzeitig das Glasrohr so stabilisierte, dass es nicht verrutschen konnte. Nun wurde die offene Oberseite des Glaszylinders durch den Deckel mit der Öffnung für das Mundstück des

Aerosols verschlossen. Das Berodual<sup>®</sup> N-Aerosol wurde zehn Sekunden lang kräftig geschüttelt, das Mundstück fest in die dafür vorgesehene Öffnung der Applikationshilfe gesteckt und zunächst drei kurz aufeinanderfolgende Sprühstöße abgegeben. Danach wurde der Druckgasbehälter vom Mundstück abgenommen, wiederum zehn Sekunden lang geschüttelt und nach Wiedereinsetzen in das Mundstück erneut zwei Mal betätigt. Dies entsprach einer nominal applizierten Dosis von 100 µg IB und 250 µg FE-HBr, entsprechend 197 µg der freien Base FE. Nach Auslösen des letzten Sprühstoßes wurde 120 s lang gewartet, sodass der Sprühnebel auf das Lungenhomogenat absinken konnte. Erst dann wurde die Applikationshilfe vorsichtig entfernt, das restliche Homogenat des bereits angebrochenen Aliquots auf das Kammerunterteil überführt und die Gewebesuspension 15 Sekunden lang mit einem Spatel gründlich durchmischt. Es schlossen sich das Positionieren der Membran und der Verschluss der Dialysekammer durch die obere Kammerhälfte mit zusätzlicher Absicherung durch zwei Federklammern an. Analog zur kontinuierlichen Dialyse mit FP (siehe 2.2.3.2) wurde das mit Plasma gefüllte Reservoir außerhalb des Wärmeschrankes auf dem Magnetrührer positioniert und mit Parafilm abgedeckt, nachdem es über den Verbindungsschlauch an die Pumpe angeschlossen worden war. Der Schlauch, der von der Pumpe wegfürte, wurde über das Mehrwegeventil an die Einlass-Edelstahlkapillare der oberen Kammerhälfte gekoppelt und die Apparatur durch Anschluss des Kammerausganges an den Fraktionensammler komplettiert (siehe *Abbildung 18, Kapitel 2.1.4*). Wie bereits bei den vorangegangenen Versuchen näher erläutert (siehe 2.2.1.2 und 2.2.3.2), wurde nun die Kammer unter Zuhilfenahme der Pumpe luftblasenfrei mit Dialyseflüssigkeit gefüllt. Sobald dieser Vorgang abgeschlossen war, wurde die Öffnung an der Kammeroberseite mit dem Stopfen fest verschlossen, die Pumpe angehalten und die Dialysekammer zur Inkubation bei 37 °C im Wärmeschrank auf den schwenkenden Wippschüttler gestellt. Nach dem erneuten Einschalten der Pumpe mit einer Flussrate von 0,38 mL/min begann die Inkubationszeit von vier Stunden, sobald die Dialyseflüssigkeit das Dreiwegeventil des Fraktionensammlers erreicht hatte und die Kollektion der ersten Probe wurde gestartet (siehe 2.2.3.2).

### **3.2.3 Ablauf der Dialyse**

Die Probengewinnung und der weitere Verlauf des Dialyseexperimentes entsprachen in Gänze dem Vorgehen bei den Versuchen zur Etablierung des kontinuierlichen Dialysemodells (siehe 2.2.3.3). Die Kammer wurde bei 37 °C im Wärmeschrank durch den Wippschüttler einer konstanten Schwenkbewegung unterzogen. Nach ihrem Austritt aus der oberen Kammerhälfte über die Auslass-Edelstahlkapillare wurde die Dialyseflüssigkeit zum Fraktionensammler und

über die Tropfvorrichtung in das jeweilige Eppendorfgefäß geleitet. Da für jede Probe das Plasma drei Minuten lang bei einem konstanten Fluss von 0,38 mL/min aufgefangen wurde, resultierte pro Fraktion ein Volumen von 1,14 mL. Insgesamt wurden über 240 min hinweg 80 Fraktionen des Dialysates gesammelt und bei -20 °C eingefroren. Auf ihren Gehalt an FE und IB wurden später lediglich die Fraktionen, deren Kollektion zu den Zeitpunkten 3, 6, 15, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 und 240 min nach Beginn der Inkubationszeit abgeschlossen war, analysiert.

Nach Beendigung des Dialyseexperimentes wurden dem Reservoir neun Aliquote Plasma à 800 µL entnommen und in 15 mL-Reagenzröhren aus Kunststoff mit Schraubverschluss überführt. Einem dieser Aliquote wurden 200 µL Methanol zupipettiert, um für die spätere Analytik einen Blank der Matrix zu erhalten. Zur Herstellung von Kalibrierstandards im Rahmen der Quantifizierung wurden zu den übrigen Plasma-Aliquoten die jeweiligen methanolischen Standardlösungen von FE und IB zugegeben (siehe 3.1.2) und die Mischungen mit Hilfe des Vortex kurz vermenget. Jeder Kalibrierstandard enthielt in gleicher Konzentration die beiden Analyten FE und IB, wobei die Endkonzentrationen und ihre Zusammensetzung im Einzelnen *Tabelle 10* entnommen werden können. Die Dialyseproben, der Blank und die Standardlösungen wurden bis zur weiteren Aufarbeitung zur quantitativen Analytik bei -20 °C eingelagert.

**Tabelle 10:** Herstellung und Endkonzentration der FE- und IB-Standardreihe, wie sie vor der Proteinfällung vorlag und zur Gewinnung einer Kalibriergeraden bei der Quantifizierung der Proben aus Dialyseversuchen mit Berodual® verwendet wurde.

Standard	Konzentration [ng/mL]	Volumen methanolische Lösung FE [µL]	Volumen methanolische Lösung IB [µL]	Volumen Matrix [µL]
S <sub>1</sub>	320	100 V <sub>1</sub>	100 V <sub>1</sub>	800
S <sub>2</sub>	160	100 V <sub>2</sub>	100 V <sub>2</sub>	800
S <sub>3</sub>	100	100 V <sub>3</sub>	100 V <sub>3</sub>	800
S <sub>4</sub>	80	100 V <sub>4</sub>	100 V <sub>4</sub>	800
S <sub>5</sub>	50	100 V <sub>5</sub>	100 V <sub>5</sub>	800
S <sub>6</sub>	25	100 V <sub>6</sub>	100 V <sub>6</sub>	800
S <sub>7</sub>	1	100 V <sub>7</sub>	100 V <sub>7</sub>	800
S <sub>8</sub>	0,1	100 V <sub>8</sub>	100 V <sub>8</sub>	800

### 3.2.4 Bestimmung der applizierten Dosis

Um eine quantitative Aussage zur während einer Dialyse stattfindenden Diffusion der beiden Arzneistoffe treffen zu können, musste der Anteil der applizierten Dosis ermittelt werden, der bei der Betätigung des Dosieraerosols zu Beginn des Experimentes (siehe 3.2.2) tatsächlich das Lungenhomogenat erreichen konnte. Hierzu diente ein bereits durch Freiwald *et al.* [53] eingesetztes Verfahren als Vorbild, das allerdings um die Bestimmung der am Glaszylinder adsorbierten Wirkstoffmenge und des vom Mundstück retenierten Anteils erweitert wurde. Um festzustellen, welcher Anteil der applizierten Dosis am Glasrohr (siehe *Abbildung 19, Kapitel 3.2.2*) haften blieb, wurden mit Hilfe einer Mikroliterpipette 50  $\mu\text{L}$  der 1 mg/mL Stammlösung Salbutamol als interner Standard (siehe 3.1.2) an der Innenseite der Glaswand verteilt. Vor Verwendung der Applikationshilfe wurde einige Minuten gewartet, bis das in der aufgetragenen Menge enthaltene Lösungsmittel verdunstet war. Die untere Kammerhälfte wurde mit 2,5 mL eines frisch hergestellten Krebs-Ringer-HEPES-Puffers (siehe 1.1.2) befüllt und mit 50  $\mu\text{L}$  der 1 mg/mL Salbutamol-Stammlösung (siehe 3.1.2) als internen Standard versetzt. Das sich anschließende Vorgehen entsprach dem der Dosisapplikation bei einem regulären Dialyseversuch (siehe 3.2.2). Das Glasrohr der Applikationshilfe wurde konzentrisch auf das Kammerunterteil gestellt, mit Hilfe des Kunststoffrings fixiert und mit dem Deckel, der die Öffnung für das Mundstück des Aerosols enthält, verschlossen. Das Dosieraerosol wurde zehn Sekunden lang kräftig geschüttelt und sein Mundstück in die dafür vorgesehene Öffnung der Applikationshilfe gesteckt. Anschließend wurde das Dosieraerosol drei Mal kurz hintereinander betätigt, die Kartusche aus dem Mundstück herausgenommen und erneut zehn Sekunden lang geschüttelt, bevor das Dosieraerosol nach dem Zusammenfügen weitere zwei Male ausgelöst wurde. Auf diese Weise ergab sich eine nominal applizierte Dosis von 250  $\mu\text{g}$  Fenoterolhydrobromid (entsprechend 197  $\mu\text{g}$  freie Base FE) und 100  $\mu\text{g}$  Ipratropiumbromid. An den letzten Sprühstoß schloss sich eine Wartezeit von 120 s an, damit der Sprühnebel sich auf die Flüssigkeit absetzen konnte. Erst dann wurde die Applikationshilfe entfernt und weitere 2,5 mL Krebs-Ringer-HEPES-Puffer wurden in die untere Kammerhälfte pipettiert. Mit einem kleinen Spatel wurde die Flüssigkeit 15 Sekunden lang umgerührt, bevor das Kammerunterteil nach dem Vorbild vorausgegangener Versuche [52] mit einer Schale abgedeckt für 15 Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert wurde. Möglichst quantitativ wurde der Kammerinhalt in einen 10 mL Maßkolben überführt, das geleerte Kammerunterteil zwei Mal hintereinander mit je 2 mL MeOH ausgewaschen und die Spülflüssigkeit ebenfalls in den Maßkolben gefüllt. Der Kolbeninhalt wurde mit Millipore®-Wasser bis zur 10 mL-Marke ergänzt, anschließend verdünnte man die Lösung mit Millipore®-Wasser um das Hundertfache. 200  $\mu\text{L}$  der so

erhaltenen Lösung wurden zur Analyse durch LC-MS/MS (siehe 3.3.2) in ein Micro Vial überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Das Glasrohr der Applikationshilfe wurde einmal mit 4 mL MeOH ausgewaschen und anschließend mit 4 mL Millipore®-Wasser. Die Spülflüssigkeit wurde in einer Schale aufgefangen und möglichst quantitativ in einen 10 mL Maßkolben überführt. Daraufhin wurde mit Millipore®-Wasser bis zur 10 mL-Marke aufgefüllt, und die Lösung mit Millipore®-Wasser um den Faktor 100 verdünnt. 200 µL dieser durch Verdünnung hergestellten Lösung wurden wiederum für die spätere quantitative Analyse durch LC-MS/MS (siehe 3.3.2) in ein Micro Vial überführt und bei -20 °C eingelagert.

Die bei einer Dosisapplikation an das Mundstück adsorbierte Wirkstoffmenge wurde in einem getrennten Versuch bestimmt. Hierzu wurden mit Hilfe einer Mikroliterpipette 50 µL der 1 mg/mL Stammlösung Salbutamol (siehe 3.1.2) an der Innenseite des gereinigten und trockenen Mundstückes im Bereich der Austrittsöffnung verteilt. Es wurde einige Minuten gewartet, bis das in der aufgetragenen Menge enthaltene Lösungsmittel verdunstet war. Das sich anschließende Vorgehen entsprach dem der Dosisapplikation bei einem regulären Dialyseversuch (siehe 3.2.2), außer dass das Unterteil der Kammer leer blieb. Anteile der applizierten Dosis, die am Glaszylinder haften blieben und das Homogenat erreichen konnten waren bereits in einem gesonderten Experiment bestimmt worden (siehe weiter oben in diesem Kapitel), so dass in diesem Fall lediglich das Mundstück für das weitere Vorgehen von Interesse war. Die Applikationshilfe, bestehend aus Glaszylinder, Kunststoffring und Deckel mit Öffnung für das Mundstück, wurde auf dem Kammerunterteil positioniert. Nachdem das Dosieraerosol zehn Sekunden lang kräftig geschüttelt worden war, wurde sein Mundstück in die Öffnung der Applikationshilfe gesteckt. Es folgte die Abgabe von drei Hüben durch das Dosieraerosol, das Herausnehmen der Kartusche aus dem Mundstück und die erneute zweimalige Betätigung des Dosieraerosols, nachdem die Kartusche zehn Sekunden lang geschüttelt und wieder in das Mundstück eingesetzt worden war. Ebenso wie bei den übrigen Versuchen zur Dosisbestimmung wurde nach dem letzten Sprühstoß 120 s lang gewartet, bevor das Mundstück von der Applikationshilfe entfernt wurde. Das Mundstück wurde im Anschluss mit 4 mL MeOH und mit 4 mL Millipore®-Wasser ausgewaschen. Die Spülflüssigkeit wurde in einer Schale aufgefangen, möglichst quantitativ in einen 10 mL Maßkolben überführt und mit Millipore®-Wasser bis zur 10 mL-Marke aufgefüllt. Nach Verdünnung der Lösung mit Millipore®-Wasser um den Faktor 100 wurden 200 µL für die quantitative Analyse durch LC-MS/MS (siehe 3.3.2) in ein Micro Vial überführt und bei -20 °C eingelagert. Die tatsächlich applizierte Dosis wurde durch dreimaliges Wiederholen der beschriebenen Vorgehensweise ermittelt.

### 3.3 Bestimmung der Wirkstoffkonzentrationen in den Dialyseproben

#### 3.3.1 Probenaufarbeitung

##### 3.3.1.1 Dialyseversuch

Zunächst wurden die Kalibrierstandards (siehe 3.2.3), der Matrixblank und die Fraktionen der Dialyseproben, deren Sammlung zu den Zeitpunkten 3, 6, 15, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 und 240 min nach Beginn der Inkubationszeit abgeschlossen worden war, bei RT aufgetaut. Von jeder dieser Fraktionen wurden mit einer Mikroliterpipette 1000  $\mu\text{L}$  in eine 15 mL-Reagenzröhre mit Schraubverschluss überführt. Mit Ausnahme des Blank wurden alle Proben mit 50  $\mu\text{L}$  des internen Standards Verdünnung  $V_1$  Salbutamol (siehe 3.1.2) versetzt und auf dem Vortex vermischt. Dem Blank wurden 50  $\mu\text{L}$  Methanol zupipettiert bevor er ebenfalls durchmischt wurde. Zur Ausfällung von Proteinen erfolgte mit Hilfe einer Transferpipette eine Zugabe von 3 mL Acetonitril (MeCN) zu jeder Probe und eine gründliche Durchmischung auf dem Vortex für 30 Sekunden. Die Proben wurden bei 700 x  $g$  fünf Minuten lang zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand abgenommen und jeweils in ein Spitzkölbchen überführt. Bei einem kontinuierlichen Stickstoffstrom wurden die Proben bis zur Trockene eingeeengt. Der verbleibende Rückstand wurde in 400  $\mu\text{L}$  eines Gemisches aus einem Teil Methanol und neun Teilen Millipore®-Wasser aufgenommen und möglichst quantitativ in ein 1,5 mL-Reagiergefäß überführt. Zur Abtrennung möglicherweise vorhandener Schwebeteilchen wurden die Proben bei 9000 x  $g$  fünf Minuten lang zentrifugiert, bevor schließlich 200  $\mu\text{L}$  davon in braune Micro Vials mit eingeschmolzenem Glaseinsatz pipettiert und dicht verschlossen bis zur Analyse mittels LC-MS/MS im Gefrierschrank aufbewahrt wurden.

##### 3.3.1.2 Dosisbestimmung

Die Proben aus der Bestimmung der applizierten Dosis (siehe 3.2.4) wurden bei RT aufgetaut. Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurden wässrig-methanolische Standards in 1,5 mL-Reagiergefäßen hergestellt, die jeweils FE und IB in der gleichen Konzentration vereinten und deren Zusammensetzung inklusive des internen Standards SB (Verdünnung  $V_1$ , siehe 3.1.2) *Tabelle 11* entnommen werden kann. Für die Leerwertkontrolle wurden 750  $\mu\text{L}$  Millipore®-Wasser 250  $\mu\text{L}$  MeOH zugemischt.

**Tabelle 11:** Herstellung und Gehalt der wässrig-methanolischen Standardreihe, die FE und IB in gleicher Konzentration enthielt und zur Quantifizierung der Proben aus der Bestimmung der applizierten Dosis verwendet wurde.

Konzentration [ng/mL]	Volumen methanolische Lösung FE [ $\mu\text{L}$ ]	Volumen methanolische Lösung IB [ $\mu\text{L}$ ]	Volumen int. Standard SB, Verdünnung $V_1$ [ $\mu\text{L}$ ]	Volumen Millipore®- Wasser [ $\mu\text{L}$ ]
320	100 $V_1$	100 $V_1$	50	750
160	100 $V_2$	100 $V_2$	50	750
100	100 $V_3$	100 $V_3$	50	750
80	100 $V_4$	100 $V_4$	50	750
50	100 $V_5$	100 $V_5$	50	750
25	100 $V_6$	100 $V_6$	50	750
1	100 $V_7$	100 $V_7$	50	750

Von jedem Kalibrierstandard und von der Leerwertkontrolle wurden 200  $\mu\text{L}$  in Micro Vials für die Analytik mittels LC-MS/MS überführt.

### 3.3.2 Quantifizierung mittels LC-MS/MS

Alle Proben und Standardlösungen aus den Dialyseversuchen zur Diffusion von FE und IB nach Applikation der Dosis durch das Berodual® N-Aerosol wurden durch massenspektrometrische Detektion nach Auftrennung der Wirkstoffe durch Flüssigchromatographie quantitativ analysiert, basierend auf einer von Gnadt beschriebenen Methode zur Bestimmung von  $\beta_2$ -Sympathomimetika [57]. Hierzu wurde das in 3.1.5 beschriebene LC-MS/MS System verwendet, als mobile Phase wurden ein Gemisch aus 0,1 % (V/V) Ameisensäure in Millipore®-Wasser (Fließmittel A) und MeCN (Fließmittel B) eingesetzt. Nach Injektion von jeweils 10  $\mu\text{L}$  Probenvolumen erfolgte die Auftrennung der drei zu quantifizierenden Komponenten FE, IB und SB mit Hilfe einer XTerra MS C18 Säule unter Gradientenelution (siehe *Tabelle 12*) bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 mL/min.



**Tabelle 12:** Zeitlicher Verlauf der Gradientenelution bei der Bestimmung von FE und IB mittels LC-MS/MS.

Zeitpunkt nach Probeninjektion [min]	Anteil Fließmittel A [%]	Anteil Fließmittel B [%]	Flussrate	Vorgang
0	95	5		
5	70	30	0,5	Linearer Gradient
8	0	100		
8,01	0	100	0,75	Spülen der Säule
11	0	100		
11,01	95	5	0,75	Äquilibration der Säule
14,5	95	5		
14,51	95	5	0,5	
16	95	5		

Fließmittel A: 0,1 % (V/V) Ameisensäure in Millipore®-Wasser

Fließmittel B: MeCN

Zur Detektion wurde die mobile Phase nach Passage der Säule in die Gasphase überführt und die eluierten Substanzen im positiven Ionisationsmodus massenspezifisch erfasst. Im Rahmen der Elektrospray-Ionisation (ESI) wurde eine Kapillarspannung von 3,5 kV angelegt, der Druck bei der Vernebelung betrug 45 psi. Als Vernebelungs- und Mantelgas wurde Stickstoff eingesetzt. Weitere Einstellungen, die am Gerät vorgenommen wurden betrafen die Gas Temperatur (300 °C), den Gasfluss (5 L/min), die Mantelgas- (Sheath) Temperatur (250 °C), den Mantelgasfluss (11 L/min) und die Nozzle-Spannung (500 V). Das Massenspektrometer wurde dabei im MRM-Modus betrieben. Aus dem Totalionenstrom wurden die in *Tabelle 13* angegebenen Ionenchromatogramme isoliert, dabei wurden für FE die Ionen mit einem m/z von 107 zur Quantifizierung herangezogen, für IB hatten die entsprechenden Fragmente ein m/z von 166 und für SB wurden die Ionen mit einem m/z von 148 verwendet. Zur quantitativen Auswertung der erhaltenen Chromatogramme wurden zunächst mit Hilfe der Software Agilent MassHunter die Peakflächen der drei Substanzen integriert und anschließend die Quotienten aus der jeweiligen Fläche des Peaks von FE bzw. IB und des Internen Standards SB gebildet. Durch lineare Regression wurde nach Auftragen dieser Quotienten für die Kalibrierlösungen gegen die eingesetzten Konzentrationen eine Kalibriergerade erhalten. Zur Ermittlung der FE- und IB-Konzentrationen in den Proben aus den Dialyseversuchen bzw. in den Proben zur

Bestimmung der applizierten Dosis wurden durch Einsetzen der entsprechenden Flächenverhältnisse in die jeweilige Geradengleichung die unbekannt Konzentrationen berechnet.

**Tabelle 13:** Parameter bei der Quantifizierung von Fenoterol (FE), Ipratropiumbromid (IB) und Salbutamol (SB) mittels LC-MS/MS.

Substanz	Mutterion (m/z)	Fragmente (m/z)	Kollisionsenergie (eV)	Fragmentorspannung (V)
FE	304	107*	33	120
		135	17	120
IB	332	124	33	180
		166*	25	180
SB (IS)	240	148*	17	100
		222	5	100

\* Quantifier

IS: interner Standard

Aus drei unabhängigen Versuchsansätzen wurden für jeden Probenentnahmezeitpunkt Konzentrationswerte gewonnen und anschließend durch Bildung der jeweiligen arithmetischen Mittelwerte die zeitlichen Konzentrationsverläufe für FE und IB nach Dosisfreisetzung aus dem Berodual® N Dosier-Aerosol dargestellt.

## **4 Untersuchungen zur pulmonalen Absorption von Salbutamol nach vorheriger inhalativer Applikation von Carnitin am humanen Lungenperusionsmodell**

### **4.1 Verwendete Reagenzien, Materialien und Geräte**

#### **4.1.1 Substanzen**

Salbutamolsulfat (SB-S), L-Carnitin (CA, Zwitterion) und Fenoterolhydrobromid (FE-HBr) wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Bovines Serumalbumin (BSA, Typ H1) stammte von GERBU (Gaiberg, Deutschland) und Glucose Monohydrat von Gruessing (Filsum, Deutschland). Heparin-Natrium-5000-ratiopharm® (Ratiopharm, Ulm, Deutschland) wurde in einer öffentlichen Apotheke käuflich erworben. Eine Stammlösung mit 10 000 IU/mL Penicillin und 10 000 µg/mL Streptomycin in 0,9 % NaCl (Pen/Strep) wurde von Biochrom AG (Berlin, Deutschland) bezogen. Das verwendete Wasser wurde der hauseigenen Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q®-Synthesis von Millipore (Molsheim, Frankreich) entnommen, ebenso stammte Methanol in HPLC-gradient-grade Qualität von einer hauseigenen Abfüllanlage. Ferner wurden Acetonitril (HPLC-gradient-grade) von VWR Prolabo® (Darmstadt, Deutschland) und Ameisensäure (p.a. Qualität) von E. Merck (Darmstadt, Deutschland) erhalten. Stickstoff in Druckgasflaschen (Qualität 5.0), Stickstoff in flüssiger Form und Kohlenstoffdioxidgas für medizinische Zwecke (DAB, Ph.Eur) stammten von Linde (München, Deutschland). Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden von E. Merck (Darmstadt, Deutschland) erworben.

#### **4.1.2 Standardlösungen für die Quantifizierung**

- Interner Standard

Eine methanolische Lösung des kurzwirksamen  $\beta_2$ -Agonisten Fenoterol (FE) in einer Konzentration von 10 µg/mL der freien Base (Verdünnung  $V_1$ ) diente als interner Standard für Proben der Perfusionsexperimente (siehe 4.4.2) und der Kalibrierreihe zur Dosisbestimmung (siehe 4.4.1.1).  $V_1$  wurde durch Verdünnung einer Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL FE in Methanol (siehe 3.1.2) hergestellt. Die Stammlösung und die Verdünnung wurden bei -20 °C lichtgeschützt in braunen Glasgefäßen gelagert.

- Kalibrierstandards

Ausgehend von einer methanolischen Stammlösung, die die freie Base Salbutamol (SB) in einer Konzentration von 1 mg/mL enthielt, wurden durch Verdünnung mit Methanol folgende Standardlösungen (V) erhalten:

V <sub>1</sub>	1600 ng/mL
V <sub>2</sub>	1000 ng/mL
V <sub>3</sub>	800 ng/mL
V <sub>4</sub>	500 ng/mL
V <sub>5</sub>	250 ng/mL
V <sub>6</sub>	100 ng/mL
V <sub>7</sub>	50 ng/mL
V <sub>8</sub>	10 ng/mL
V <sub>9</sub>	5 ng/mL
V <sub>10</sub>	1 ng/mL

Die Konzentrationsangaben beziehen sich dabei stets auf die Base SB. Die Standardlösungen V<sub>3</sub> – V<sub>10</sub> wurden bei der Quantifizierung von Salbutamol in Perfusionsproben mit Perfusionsflüssigkeit als Matrix (siehe 4.4.1.2) verwendet, bei der Dosisbestimmung in methanolisch-wässriger Grundlage (siehe 4.4.1.1) kam dagegen der Konzentrationsbereich von 10 ng/mL bis 1600 ng/mL zum Einsatz. Die Stammlösungen und die Verdünnungen wurden vor Licht geschützt in braunen Glasgefäßen bei -20 °C gelagert.

### 4.1.3 Applikationslösungen

#### 4.1.3.1 Carnitin

Die im Rahmen eines Perfusionsexperimentes an den Lungenlappen verabreichte wässrige Carnitinlösung wies eine Konzentration von 25 mg/mL auf. Zur Herstellung dieser Lösung wurde der Feststoff L-Carnitin (CA) entsprechend eingewogen und in Millipore®-Wasser gelöst. Die Applikationslösung wurde jeweils am Vortag eines Perfusionsversuches frisch zubereitet und über Nacht bei 4 bis 8 °C in einer 15 mL-Reagenzröhre mit Schraubverschluss aufbewahrt.

#### 4.1.3.2 Salbutamol

Bei jedem Perfusionsversuch wurde im Anschluss an die CA-Lösung der  $\beta_2$ -Agonist Salbutamol (SB) vernebelt. Die SB-Applikationslösung enthielt den Arzneistoff in einer Konzentration von

600 µg/mL (freie Base) und wurde durch Verdünnung einer wässrigen Stammlösung der Konzentration 1 mg/mL mit Millipore®-Wasser erhalten. Die gebrauchsfertige Lösung wurde in Aliquote zu je 5 mL in 15 mL-Reagenzröhren mit Verschluss bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 4.1.4 Perfusionspuffer

Die Zusammensetzung des Perfusionspuffers wurde nach Mürdter *et al.* [251] modifiziert und resultierte, basierend auf der Herstellungsmethode von Freiwald *et al.* [53] und Gnadt [57] in folgenden Endkonzentrationen der einzelnen Bestandteile:

BSA	5 % (m/V)
Calciumchlorid Dihydrat	2,5 mM
Glucose Monohydrat	5,5 mM
Kaliumchlorid	3,5 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	2,5 mM
Magnesiumsulfat Hexahydrat	1,18 mM
Natriumhydrogencarbonat	20 mM
Natriumchlorid	85 mM
Pen/Strep	10 000 IU/10 000 µg/L
Heparin-Na	2500 I.E./L

Zur Herstellung von 1000 mL Perfusionspuffer wurden zunächst BSA und die Salze außer Natriumhydrogencarbonat eingewogen und in etwa 90 % des angestrebten Endvolumens Millipore®-Wasser gelöst. Die Zubereitung wurde bis zum Erhalt einer klaren Lösung auf dem Magnetrührer durchmischt. Der Puffer wurde mit 1000 µL der Penicillin-Streptomycin-Stammlösung und mit 100 µL der Heparin-Natrium-Zubereitung versetzt. Mit 10 %iger (m/V) Natriumhydrogencarbonat-Lösung wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und das Volumen mit Millipore®-Wasser auf 1000 mL ergänzt [53, 57].

Jeweils am Vortag eines Versuches wurden 500 mL Perfusionspuffer für das Spülen des Lungenlappens (siehe 4.2.1) und 1500 mL für den Einsatz als Perfluationsflüssigkeit (siehe 4.2.1) frisch hergestellt und in Glasflaschen über Nacht bei 4 bis 8 °C gelagert. Zusätzlich wurden bei jedem Experiment 150 mL Perfusionspuffer - aufgeteilt in 50 mL-Tubes - als Ersatzflüssigkeit (siehe 4.2.5) mitgeführt.

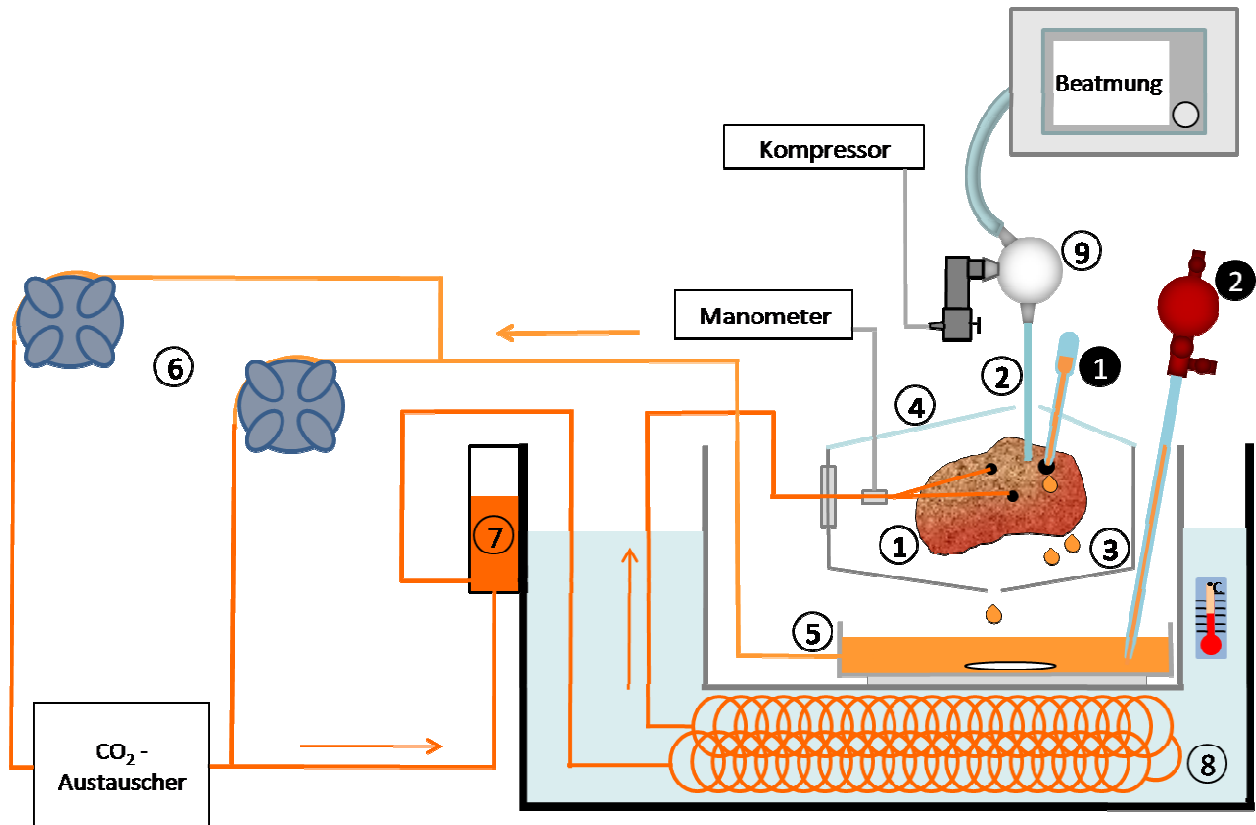
### **4.1.5 Humanes Lungengewebe**

Für die Untersuchungen zur pulmonalen Absorption von Salbutamol nach vorheriger Vernebelung von Carnitin wurden drei Patienten rekrutiert, die sich auf Grund eines Bronchialkarzinoms im Thoraxzentrum Bezirk Unterfranken, MÜNnerstadt einer Lobektomie unterziehen mussten. Die Probanden, die eingeschlossen wurden, hatten innerhalb der letzten vier Wochen vor dem chirurgischen Eingriff keine  $\beta_2$ -Sympathomimetika angewendet, bei ihnen lagen zum Zeitpunkt der Operation keine systemischen oder in der Lunge lokalisierten Infektionen vor und sie waren zuvor nicht mit einer neoadjuvanten Therapie behandelt worden. Außerdem gaben die Studienteilnehmer nach sorgfältiger Aufklärung durch den betreuenden Arzt gemäß der Deklaration von Helsinki [252] schriftlich ihr Einverständnis zur Verwendung des ihnen entnommenen Gewebes für wissenschaftliche Zwecke. Patienten wurden von der Studie ausgeschlossen, wenn der Tumor zentral innerhalb des entnommenen Lungenlappens positioniert war, da ein möglichst physiologischer Zustand des Lungengewebes für die Perfusionsexperimente angestrebt wurde. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg, Deutschland genehmigt. Die Versuche am Lungenperusionsmodell wurden vor Ort im Thoraxzentrum Bezirk Unterfranken durchgeführt, so dass nach Beendigung des Experimentes das Lungenpräparat zur Routineuntersuchung an die Pathologie übergeben werden konnte.

### **4.1.6 Aufbau des humanen Lungenperusionsmodells**

Das humane Lungenperusionsmodell wurde für *ex-vivo*-Untersuchungen zur Pharmakokinetik von inhalativ angewendetem Salbutamol nach vorheriger Carnitin-Vernebelung eingesetzt. Basierend auf einem Modell von Linder *et al.* [56] wurde dieses ausgesprochen physiologische System bereits durch diverse Modifikationen erweitert, die die Beantwortung pharmakokinetischer [53] und pharmakodynamischer [57] Fragestellungen erlauben.

Der schematische Versuchsaufbau des Lungenperusionsmodells ist in *Abbildung 20* dargestellt. Das Zentrum bildete der humane Lungenlappen oder Lungenflügel, der einem Patienten im Rahmen einer chirurgischen Intervention entnommen wurde (siehe 4.1.5). Unmittelbar nach der Resektion wurden für dieses Organteil außerhalb des Körpers der Physiologie angenäherte Bedingungen simuliert: mit Hilfe eines Beatmungsgerätes wurde die Ventilation der Lunge nachgestellt und über eine Pumpe wurde ein Blutkreislauf rekonstituiert.



**Abbildung 20:** Schematischer Aufbau des humanen Lungenperfuisionsmodells, modifiziert nach Linder *et al.* [56], Freiwald *et al.* [53] und Gnadt [57].

Dargestellte Bestandteile des Perfuisionsmodells sind im einzelnen ① der Lungenlappen oder Lungenflügel mit katheterisierten Arterien und geöffneter Vene, ② mit Silikonschlauch anastomosierter Bronchus, ③ Metallkasten, ④ Plexiglasabdeckung, ⑤ das Reservoir mit Rührstäbchen auf einem Magnetrührer, ⑥ die Pumpen, ⑦ die Luffalle, ⑧ Glasspiralen im beheizten Wasserbad und ⑨ Verbindung des Bronchus zum Beatmungsgerät mit integrierter Applikationshilfe, über die mit Hilfe eines Verneblers Wirkstoffe an das Lungenpräparat verabreicht werden können. Die Probengewinnung erfolgt ❶ aus dem venösen Ausgang und ❷ aus dem Reservoir. Pfeile neben den Schlauchleitungen bezeichnen die Flussrichtung der Perfuisionsflüssigkeit, Leitungen, die den Puffer in Richtung des Lungenlappens leiten sind dunkler dargestellt als diejenigen, die die Flüssigkeit vom Reservoir zu den Pumpen transportieren.

Das Gefäßsystem wurde über einen halboffenen Kreislauf perfundiert. Die Pufferlösung (siehe 4.1.4) mit einem Gesamtvolumen von 1,5 L innerhalb des Perfuisionssystems wurde in die katheterisierten Arterien des Lungenlappens gepumpt, verließ das Gewebe über die offene Vene wieder und tropfte über den Durchlass an der Unterseite des Metallkastens in das Reservoir, wo sie mit Hilfe eines Magnetrührers und eines Rührfisches beständig durchmischt wurde. Von dieser Stelle aus startete der Kreislauf wieder. Die Flüssigkeit gelangte über die Pumpen und zum Teil über einen Gasaustauscher, über den bei Bedarf CO<sub>2</sub> in das System eingespeist werden konnte, passierte eine Luffalle und wurde in einer Konstruktion aus

Glasspiralen auf 37 °C temperiert, bevor sie unter fortwährender Messung des Druckes wieder in den Lungenlappen geleitet wurde. Das Erwärmen der Perfusionsflüssigkeit innerhalb der Glasspiralen funktionierte über ein auf 37 °C geheiztes Wasserbad, durch das zum einen die Spiralen führten und das zum anderen den Glasbehälter mit dem Metallkasten und dem Reservoir umschloss und auf diese Weise eine dem Körper nachempfundene Umgebungstemperatur für den Lungenlappen schuf. Um eine Austrocknung des Lungengewebes und Verdunstungsverluste von Perfusionsflüssigkeit während der Versuchsdauer zu verhindern, wurde auf den Metallkasten eine Abdeckung aus Plexiglas aufgesetzt (siehe *Abbildung 20*).

Die Einstellung der Pumpen wurde so gewählt, dass ein Perfusionsfluss von ungefähr 60 – 100 mL/min entstand, jedoch gleichzeitig ein physiologischer Druck von 20 - 40 mmHg eingehalten wurde. Der Druck wurde dabei über ein Manometer vor Eintritt der Flüssigkeit in die katheterisierten Arterien gemessen (siehe *Abbildung 20*). Während des Experimentes wurden punktuell die Hydrogencarbonationen-Konzentration und der pH-Wert des Perfusates überprüft. Hierzu wurden dem venösen Ausgang ca. 500 µL Perfusionsflüssigkeit entnommen und umgehend mit einem Blutgasanalysator ABL<sup>®</sup> 510 (Radiometer, Willich-Schiefbahn, Deutschland) analysiert. Falls ein pH-Wert außerhalb des physiologischen Bereiches von 7,4 festgestellt wurde, konnte er durch Einspeisen von CO<sub>2</sub>-Gas über den Oxygenator (bei pH > 7,4) oder durch Zugabe von 10 %iger (m/V) Natriumhydrogencarbonat-Lösung (bei pH < 7,4) in das Reservoir wieder korrigiert werden.

Die Beatmung des Lungenlappens erfolgte über ein im medizinischen Bereich häufig eingesetztes Evita-Beatmungsgerät (siehe 4.1.8). Der abgesetzte Bronchus wurde dazu mit einem Silikonschlauch (siehe 4.1.8) verbunden und an den Respirator angeschlossen, wobei eine Applikationshilfe aus Glas mit einem Nettovolumen von 100 mL [57] dazwischengeschaltet wurde (siehe *Abbildung 20*). Zur Verabreichung von Wirkstofflösungen konnte an diesen Glas-Spacer ein handelsüblicher PARI Boy<sup>®</sup> gekoppelt werden, dessen Mundstück dabei über einen passgenauen Adapter die mit Hilfe des Kompressors vernebelte Arzneistofflösung in die Applikationshilfe leitete. Von hier aus wurde der Wirkstoff mit dem Atemstrom, den das Beatmungsgerät erzeugte, in die Lunge transportiert.

### **4.1.7 LC-MS/MS System**

Für die Quantifizierung der  $\beta_2$ -Sympathomimetika wurde das in 3.1.5 beschriebene LC-MS/MS System verwendet.



#### 4.1.8 Sonstige Geräte und Materialien

Analysenwaage	ABJ 220-4M; 0,01-220 g; 0,1 mg minimale Wägedifferenz (Kern & Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland)
Beatmungsgerät	Evita 4 (Draeger Medical, Lübeck, Deutschland)
Bronchus-Schlauch	Silikon Schlauch, Innendurchmesser 8 mm, Wanddicke 2 mm (WITEG Labortechnik GmbH, Wertheim, Deutschland)
Dreiwegehahn	Discofix <sup>®</sup> für Infusionstherapie und Monitoring (B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland)
Drucksensor	Druckmesswandler zum invasiven Blutdruckmonitoring (CODAN pvb Medical GmbH, Lensahn, Deutschland)
Einweg-Skalpell	Feather Einweg-Skalpell, steril (Feather Safety Razor Co. LTD, Osaka, Japan)
Eppifuge	Microfuge <sup>®</sup> 22R Centrifuge (Beckman Coulter TM, Palo Alto, California, USA)
Inhalationsgerät	PARI Boy <sup>®</sup> SX mit PARI Boy <sup>®</sup> SX Kompressor, PARI LC <sup>®</sup> SPRINT Vernebler (blauer Düsenaufsatz) bzw. PARI LC <sup>®</sup> SPRINT Star Vernebler (roter Düsenaufsatz) und PARI LC <sup>®</sup> Unterbrecher zur Intervall-Vernebelung (PARI, Weilheim, Deutschland)
LS-Verbindungsstück	LS – 4 Verbinder für die Simultaninfusion, steril (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Magnetrührer	Variomag Electronic Rührer Mono (H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland)
Magnetrührstäbchen	zylindrisch, PTFE-ummantelter Magnetkern, runde, glatte Oberfläche, Länge 60 mm, Durchmesser 10 mm (A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland)
Manometer	Multiparameter Monitor, Siemens SC 9000, Software Version VE3 (Siemens Medical Solutions USA Inc., Danvers MA, USA)
Mikroliterpipette 10-100 µL	Eppendorf Research <sup>®</sup> variabel, 10-100 µL (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Mikroliterpipette 20-200 µL	Eppendorf Research <sup>®</sup> variabel, 20-200 µL (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Mikroliterpipette 100-1000 µL	Eppendorf Research <sup>®</sup> variabel, 100-1000 µL (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

## C – EXPERIMENTELLER TEIL

---

Nahtmaterial	Prolene® Naht-Set (Ethicon GmbH & Co. KG, Norderstedt, Deutschland)
Oxygenator	Jostra Quadrox® (MAQUET Cardiopulmonary AG, Hirrlingen, Deutschland)
Pasteurpipette	Einweg-Pipette aus Polyethylen; unsteril; 7,7 mL; 150 mm lang (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Präzisionswaage	Mettler P1200; 0,1-1200 g; 10 mg minimale Wägedifferenz (Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland)
Probengefäß 50 mL	Gefäß aus Polypropylen mit Schraubverschluss, 50 mL, 115 x 28 mm (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Pumpen	MCP Pump System mit MCP/BVP Pro-280 Pumpenkopf (Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland) Ecoline VC-280 II (Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland)
Reagenzröhre 15 mL	Röhre aus Polypropylen mit konischem Boden und Schraubverschluss, 15 mL, 120 x 17 mm (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Reagiergefäß	Gefäß mit konischem Boden und anhängendem Deckel; 1,5 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Schlauchleitungen	Tygon® ST Standard Typ C; Innendurchmesser 6,4 mm; Wanddicke 1,6 mm (Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland)
Schlauchverbinder	Verbinder beidseitig, gerade, aus PP, für einen Schlauchinnendurchmesser von 6-8 mm; Luer-Kupplung männl./weibl. aus PP für Schlauchinnendurchmesser 6 mm (neoLab, Heidelberg, Deutschland)
Serologische Pipette	Einmal-Pipette 10 und 25 mL, mit Wattestopfen, einzeln steril verpackt (A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland)
Spitzkolben	Spitzkolben mit Normschliff NS 14/23, Inhalt 5 mL (Witeg Labortechnik, Wertheim, Deutschland)
Thermostat für das Wasserbad	Model Fisons DC3 (Haake, Karlsruhe, Deutschland)
Transferpipette 500-5000 µL	Transferpipette® elektronik (BRAND, Wertheim, Deutschland)
Vortex	Modell K-550-GE (Bender & Hobein, Zürich, Schweiz)
Zentrifuge	Centrifuge 5702 max. 2750 x g (4400 Upm), Winkelarbeitskopf 30 x 15 mL (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

---

## 4.2 Durchführung der Experimente mit dem humanen Lungenperfusionsmodell

### 4.2.1 Versuchsvorbereitungen und Präparation des Lungenlappens

Um die Zeit zwischen der Resektion des Lungengewebes und der Wiederherstellung von Ventilation und Perfusion außerhalb des Körpers zu minimieren, wurden die Versuchsvorbereitungen vor Ort im Thoraxzentrum so weit wie möglich im Vorfeld abgeschlossen: Apparatur und Anschlüsse wurden für den Perfusionskreislauf vorbereitet und das Wasserbad auf 37 °C temperiert. Es folgte das Einfüllen von 1,5 L Perfusionspuffer (siehe 4.1.4) in das mit einem Magnetrührstäbchen bestückte Reservoir und mit dem Einschalten des Pumpensystems die Zirkulation des Perfusionspuffers, damit eine bessere Temperierung erreicht wurde. Außerdem wurde das Beatmungsgerät angeschlossen und der Beatmungskreislauf inklusive der Applikationshilfe und der Vernebelungsvorrichtung vorbereitet.

Sogleich nach der Resektion wurde ohne zeitliche Verzögerung der abgesetzte Bronchus des Lappens an ein Stück Silikonschlauch angenäht, die Pulmonalarterien katheterisiert, und die Vene geöffnet. Die Zahl der kanülierbaren Arterien richtete sich nach der individuellen Beschaffenheit jedes einzelnen Präparates, sollte aber möglichst mindestens zwei betragen. Der präparierte Lappen wurde über die katheterisierten Arterien bei einem Fluss von 40-50 mL/min mit 500 mL Perfusionspuffer (siehe 4.1.4) ohne eine Rezirkulation der Flüssigkeit gespült. Der zum Spülen eingesetzte Puffer wurde bei RT von einer separaten, nicht zur Perfusionsapparatur gehörenden Pumpe gefördert und nach der Verwendung verworfen. Das Gewicht des Lungenlappens wurde erfasst und er wurde an den Perfusions- und Beatmungskreislauf angeschlossen. Durch die Verbindung des an den Bronchus angenähten Silikonschlauches mit der Applikationshilfe hing das Präparat frei innerhalb des Metallkastens in der Luft, ohne auf diesem aufzuliegen (siehe *Abbildung 20*). In Anlehnung an Gnadt [57] wurde für die Beatmung der druckkontrollierte BiPAP (Biphasic Positive Airway Pressure) -Modus gewählt. Je nach Größe des Lungenlappens bzw. -flügels wurde auf diese Weise ein individuelles Atemzugsvolumen bei konstantem maximalem Inspirationsdruck ermöglicht und dementsprechend einer Beschädigung des Lungengewebes durch Überblähung entgegengewirkt. Details der eingestellten Beatmungs- und Perfusionsparameter können 4.2.2 entnommen werden.

Nach Wiederherstellung von Ventilation und Perfusion des Lungenlappens wurde das System zunächst mindestens fünf Minuten lang äquilibriert, um die Entwicklung konstanter

Lungenfunktionsparameter zu ermöglichen und eine Probe Perfusionsflüssigkeit mit einem Volumen von 20 mL wurde als Leerwertkontrolle der Matrix (Blank) bzw. als Grundlage für die spätere Herstellung von Kalibrierstandards (siehe 4.4.1.2) aus dem Reservoir entnommen. Das aus dem System entfernte Volumen wurde umgehend durch frische Perfusionsflüssigkeit (siehe 4.1.4) (RT), die mit Hilfe einer serologischen Pipette in das Reservoir überführt wurde, ersetzt. Das Gefäß mit der Blank-Probe wurde über die Dauer des Versuches und des Heimtransportes auf Eis gelagert.

#### 4.2.2 Ventilations- und Perfusionsparameter

Beim Betrieb des BiPAP-Modus wurde am Beatmungsgerät eine Atemfrequenz von 15/min eingestellt. Die Zeit einer Inspirationsphase ( $T_{\text{insp}}$ ) betrug 1,7 Sekunden und eine Ausatemphase dauerte 2,5 Sekunden. Nach Anschließen des Lungenlappens an den Perfusionskreislauf und das Ventilationssystem wurde der maximale Beatmungsdruck  $P_{\text{Peak}}$  langsam auf einen konstanten Wert von etwa 20 mbar gesteigert bis eine optimale Belüftung der Lunge erreicht war. Durch die druckkontrollierte Beatmung im Rahmen des BiPAP-Modus wurde in Abhängigkeit von der Art und der Größe des ventilierten Lungenlappens ein individuell variierendes Atemvolumen ermöglicht. Bei der Einstellung des Perfusionsflusses in der Anfangsphase des Experimentes wurde der Fluss stets an das jeweilige Präparat angepasst, so dass der gemessene Perfusionsdruck in einem Bereich von 20 – 40 mmHg lag. Die bei den Carnitin-Perfusionen erreichten Werte der Beatmung und Perfusion sind in *Tabelle 14* dargestellt.

**Tabelle 14:** Ventilations- und Perfusionsparameter der Lungenperfusionsexperimente mit Carnitin und Salbutamol.

	Parameter	Mittelwert	Bereich
Ventilation	$P_{\text{Peak}}$	19 mbar	18-21 mbar
	PEEP	1 mbar	1-2 mbar
	Atemfrequenz	15/min	
Perfusion	Flussrate	94 mL/min	67-110mL/min
	Temperatur	37 °C	
	Perfusionsdruck	35 mmHg	25-52 mmHg

$P_{\text{Peak}}$  – maximaler Beatmungsdruck

PEEP – Positive End Expiratory Pressure

### 4.2.3 Applikation von Carnitin

Zur Aufklärung möglicher Konkurrenz-Mechanismen zwischen Carnitin, das strukturelle Ähnlichkeiten zu Methacholin aufweist, und Salbutamol auf molekularer Ebene und einer damit verbundenen Beeinflussung der Pharmakokinetik des Salbutamols wurde vor der Vernebelung des  $\beta_2$ -Sympathomimetikums Carnitin (CA) an den Lungenlappen verabreicht. Die CA-Lösung (25 mg/mL, siehe 4.1.3.1) wurde über den PARI LC<sup>®</sup> SPRINT Vernebler mit blauem Düsenaufsatz mit einem medianen Massendurchmesser (MMD) von 2,9  $\mu\text{m}$  und einer totalen Output Rate von 590 mg/min verabreicht, wobei ein Massenanteil von 75 % eine Partikelgröße kleiner als 5  $\mu\text{m}$  aufwies [253]. Nach Austausch des Verschlusses der Applikationshilfe gegen den Adapter für das Mundstück des Verneblers wurde über 10 Minuten hinweg die Unterbrecher-Taste am Verneblergerät jeweils vom Ende der Expirations- bis zum Ende der Inspirationsphase betätigt. Um eine bessere Deposition des CA in den Atemwegen zu erreichen, wurde der maximale Beatmungsdruck kurz vor Beginn der Applikation um 5 mbar erhöht.

In Anlehnung an die bei Gnadt [57] applizierte Methacholin-Lösung mit einer durchschnittlichen Konzentration von 26,5 mg/mL über 8,4 min wurde in den vorliegenden Versuchen eine 25 mg/mL CA-Lösung 10 Minuten lang vernebelt. Die verabreichte Dosis CA konnte mit *Formel 2* näherungsweise berechnet werden und belief sich auf 62,7 mg.

Wie bereits in 4.2.2 erwähnt, betragen die Dauer einer inspiratorischen Phase ( $T_{\text{insp}}$ ) 1,7 Sekunden und die Atemfrequenz ( $f$ ) 15/min. Unter der Annahme, dass die wässrige CA-Lösung eine Dichte von 1 g/mL aufwies konnte mit Hilfe der Herstellerangaben über die Output Rate des Verneblers [253] der Faktor 0,59 mL/min (= 0,59 g/min) festgelegt werden.

**Formel 2:** Modifiziert nach Gnadt [57]

$$Dosis_{\text{Carnitin}} = (t \times f \times T_{\text{insp}}) \times 0,59 \frac{\text{mL}}{\text{min}} \times c$$

t - Dosierungsdauer (min)

f - Atemfrequenz (1/min)

$T_{\text{insp}}$  - Dauer der Inspirationsphase (min)

c - Konzentration der CA-Lösung (mg/mL)

### **4.2.4 Applikation von Salbutamol**

Wie erwartet, zeigte CA keine bronchokonstriktorischen Eigenschaften, daher erfolgte unmittelbar im Anschluss an die CA-Vernebelung die Applikation von Salbutamol (SB) in Form einer wässrigen Lösung mit einer Konzentration von 600 µg/mL SB (siehe 4.1.3.2). Zwischen zwei Atemzügen wurde der PARI LC<sup>®</sup> SPRINT Vernebler (blauer Düsenaufsatz) entfernt und das Mundstück des PARI LC<sup>®</sup> SPRINT Star Verneblers (roter Düsenaufsatz) mit SB-Lösung fest in den Adapter zur Applikationshilfe gesteckt. Die Zieldosis für SB, die während eines Perfusionsexperimentes verabreicht werden sollte, betrug in Anlehnung an die Versuche von Gnadt 600 µg [57]. Das bei Verwendung des roten Düsenaufsatzes erzeugte Aerosol war durch einen MMD von 2,2 µm und eine totale Output Rate von 450 mg/min charakterisiert. Ein Massenanteil von 89 % wies eine Partikelgröße kleiner als 5 µm auf [253]. Auf diese Weise erreicht der vernebelte Wirkstoff laut Herstellerangaben auch die peripheren Bereiche der Lunge. Im Rahmen der Applikation wurde die Unterbrecher-Taste analog zur CA-Vernebelung (siehe 4.2.3) jeweils während der Inspirationsphase betätigt und während der Expiration losgelassen. Am veränderten Geräusch während eines Vernebelungsintervalls, bedingt durch ein zu geringes Restvolumen im Vernebler, konnte man das Ende des Dosierungsvorganges erkennen. Die Applikation des SB dauerte demnach etwa 12 Minuten. Zwischen zwei Atemzügen wurde der Adapter für den Vernebler durch den Verschluss für die Applikationsöffnung ersetzt und der maximale Beatmungsdruck wurde auf den Ausgangswert zurückgestellt. Der Vernebler mit dem roten Düsenaufsatz wurde einschließlich der Restdosis der SB-Lösung vorsichtig verpackt und zur späteren Bestimmung der tatsächlich applizierten Dosis (siehe 4.3.2) bei RT aufbewahrt.

### **4.2.5 Probengewinnung**

Während der Vernebelung des Salbutamols wurden 2, 5 und 10 min nach Beginn der Dosierung mit Hilfe von Einweg-Pasteurpipetten jeweils 6 mL Probe aus dem venösen Ausgang gesammelt und für jeden Entnahmezeitpunkt in eine 15 mL-Reagenzröhre überführt. Die Skalierung am Sammelgefäß diente dabei zur Abmessung des Volumens. Zu den Zeitpunkten 0, 10, 20, 30, 45 und 60 min wurden jeweils 6 mL Perfusionsflüssigkeit aus der geöffneten Vene und 6 mL aus dem Reservoir entnommen. Der Zeitpunkt „0 min“ bezeichnet dabei das Ende der SB-Verabreichung. Die Probengewinnung erfolgte aus dem venösen Ausgang mit Hilfe von Einweg-Pasteurpipetten, bei Proben aus dem Reservoir wurden serologische Pipetten eingesetzt. Das dem System entnommene Volumen wurde stets umgehend durch frischen

Perfusionspuffer (siehe 4.1.4) ersetzt. Die Proben wurden in je vier Aliquote zu 1000 µL aufgeteilt, wobei eine Teilmenge zur später folgenden Probenaufarbeitung (siehe 4.4.2) in eine frische 15 mL-Reagenzröhre überführt wurde, die übrigen Aliquote in 1,5 mL fassende Reagiergefäße. Alle Proben wurden für die Dauer des Experimentes und des Heimtransportes auf Eis gelagert, am Institut für Pharmazie in Würzburg in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -25 °C gelagert.

Am Ende des Experimentes wurde der Lungenlappen vom Perfusions- und Ventilationssystem abgetrennt und erneut gewogen, um Gewichtsänderungen während des Versuches dokumentieren zu können. Die Applikationshilfe wurde ohne Ausspülen zusammen mit den Anschlussstücken zum Bronchus des Lungenlappens und zum Beatmungsgerät, dem Adapter für das Mundstück des Verneblers und den Silikonschläuchen zum Lungenlappen verpackt und zur Bestimmung der tatsächlich applizierten Dosis (siehe 4.3.3) bei RT aufbewahrt.

### 4.3 Bestimmung der tatsächlich applizierten Dosis Salbutamol

Um eine Aussage über die Umverteilung von Salbutamol (SB) vom Lungengewebe in die Perfusionsflüssigkeit treffen zu können, war die Kenntnis der tatsächlich applizierten Dosis des  $\beta_2$ -Sympathomimetikums von zentraler Bedeutung. Auf diese Weise konnte das Ausmaß der Arzneistoffumverteilung in das Perfusat als Prozent der applizierten Dosis ausgedrückt werden und ein direkter Vergleich mit Daten von Gnadt [57] wurde möglich. Die tatsächlich applizierte Dosis wurde analog zu Gnadt [57] wie folgt abgeschätzt:

#### Formel 3

$$Dosis_{\text{appliziert}} = Dosis_{\text{Applikationslösung}} - Dosis_{\text{Vernebler}} - Dosis_{\text{Adsorbiert}}$$

Die Proben, die zur Bestimmung der applizierten Dosis auf ihren Salbutamolgehalt hin vermessen wurden (siehe 4.4.3), sind in 4.3.1, 4.3.2 und 4.3.3 näher beschrieben.

#### 4.3.1 Salbutamolkonzentration in der Applikationslösung (= $Dosis_{\text{Applikationslösung}}$ )

Im Anschluss an ein Perfusionsexperiment wurde die verwendete SB-Applikationslösung zunächst im Verhältnis 1:300 mit Millipore®-Wasser verdünnt. 20 µL dieser Lösung wurden mit 20 µL einer 500 ng/mL Fenoterol-Lösung als internem Standard vermischt und mit Millipore®-

Wasser auf ein Endvolumen von 400  $\mu\text{L}$  ergänzt. 200  $\mu\text{L}$  dieser Lösung wurden zur Quantifizierung mittels LC-MS/MS (siehe 4.4.3) in ein Micro Vial überführt und bis zur Analyse bei  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **4.3.2 Rückstand der Applikationslösung im Vernebler (= $Dosis_{\text{Vernebler}}$ )**

Im PARI LC<sup>®</sup> SPRINT Vernebler verblieb stets ein Rest der Applikationslösung, der nicht vernebelbar war, wobei sich das Volumen des Rückstandes auf etwa 1000 bis 1300  $\mu\text{L}$  belief. Zur Feststellung, wie viel SB im Vernebler mit dem roten Düsenaufsatz übrig blieb und nicht an den Lungenlappen verabreicht werden konnte, wurden zunächst 200  $\mu\text{L}$  FE–Stammlösung (1 mg/mL, siehe 3.1.2, 4.1.2) als interner Standard im Vernebler verteilt und die verbliebene Applikationslösung wurde möglichst quantitativ mit Hilfe einer Mikroliterpipette in einen 10 mL-Maßkolben überführt. Anschließend wurde die Dosiskammer des Verneblers drei Mal mit je 2 mL MeOH sorgfältig gespült und die Waschflüssigkeit nach Vereinigen mit der Lösung im Maßkolben mit MeOH auf ein Volumen von 10 mL ergänzt. Vor der Quantifizierung wurde dieses Gemisch aus verbliebener Applikationslösung und Spülflüssigkeit mit Millipore<sup>®</sup>-Wasser um den Faktor 1000 verdünnt. 200  $\mu\text{L}$  der erhaltenen Lösung wurden in einem Micro Vial bei  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur Analyse durch LC-MS/MS aufbewahrt.

### **4.3.3 An Applikationshilfe adsorbierte Menge Salbutamol (= $Dosis_{\text{Adsorbiert}}$ )**

Als interner Standard wurden 100  $\mu\text{L}$  der FE-Stammlösung (1 mg/mL) in der Applikationshilfe - bestehend aus Glaskörper, Adapter für das Mundstück des Verneblers, Anschlussstücken zu Beatmungsgerät und Bronchus und Silikonschläuchen zum Lungenlappen - verteilt. Es wurde einige Minuten gewartet, bis das in der aufgetragenen Menge des internen Standards enthaltene Lösungsmittel verdunstet war, dann folgte durch vorsichtige Schüttelbewegungen die Extraktion der Applikationshilfe mit zwei Mal 10 mL MeOH. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Extraktionsmittel möglichst mit der gesamten inneren Oberfläche der Apparatur in Berührung kam. Die organischen Phasen wurden vereinigt und im Verhältnis 1:200 mit Millipore<sup>®</sup>-Wasser verdünnt, bevor 200  $\mu\text{L}$  der erhaltenen Lösung bis zur Analyse durch LC-MS/MS in einem Micro Vial bei  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden.



## 4.4 Bestimmung der Salbutamol-Konzentration in Proben aus Lungenperfusionsversuchen

### 4.4.1 Herstellung von Kalibrierstandards

#### 4.4.1.1 Methanolisch-wässrige Kalibrierreihe

Zur Quantifizierung methanolisch-wässriger Proben, die im Rahmen der Bestimmung der tatsächlich applizierten Dosis Salbutamol gewonnen wurden (siehe 4.3), wurden Standards nach dem Schema von *Tabelle 15* in 1,5 mL-Reagiergefäßen bereitet und auf dem Vortex vermischt. Dabei wurden methanolische SB-Lösungen des Konzentrationsbereiches von 10 ng/mL bis 1600 ng/mL ( $V$ , siehe 4.1.2) eingesetzt. Die Leerwertkontrolle (Blank) bestand aus 800  $\mu\text{L}$  Millipore<sup>®</sup>-Wasser und 200  $\mu\text{L}$  MeOH. Jeder Kalibrierlösung außer dem Blank wurden als interner Standard (IS) 100  $\mu\text{L}$  der FE-Verdünnung  $V_1$  (10  $\mu\text{g/mL}$ , siehe 4.1.2) zugemischt. 200  $\mu\text{L}$  jedes Kalibrierstandards und der Leerwertkontrolle wurden bis zur Analyse mittels LC-MS/MS bei  $-25\text{ }^\circ\text{C}$  in Micro Vials gelagert.

**Tabelle 15:** Zusammensetzung der methanolisch-wässrigen Salbutamol (SB)-Kalibrierstandards zur Quantifizierung von SB in Proben der Dosisbestimmung.

Standard	Konzentration SB [ng/mL]	Volumen methanolische Lösung SB [ $\mu\text{L}$ ]	Volumen int. Standard FE, $V_1$ [ $\mu\text{L}$ ]	Volumen Millipore <sup>®</sup> -Wasser [ $\mu\text{L}$ ]
<b>S<sub>1</sub></b>	160	100 $V_1$	100	800
<b>S<sub>2</sub></b>	100	100 $V_2$	100	800
<b>S<sub>3</sub></b>	80	100 $V_3$	100	800
<b>S<sub>4</sub></b>	50	100 $V_4$	100	800
<b>S<sub>5</sub></b>	25	100 $V_5$	100	800
<b>S<sub>6</sub></b>	1	100 $V_8$	100	800

#### 4.4.1.2 Kalibrierreihe mit Perfusionspuffer als Matrix

Für die Quantifizierung der Proben aus den Perfusionsversuchen musste eine Kalibrierreihe hergestellt werden, deren Matrix Perfusionspuffer war. Hierfür wurde für jede Probenreihe der Blank, der zu Beginn des entsprechenden Perfusionsexperimentes nach Durchströmen des

Lungenlappens noch vor Applikation eines Wirkstoffes gewonnen worden war (siehe 4.2.1), verwendet.

Neun Aliquote Perfusat à 900 µL wurden in 15 mL-Reagenzröhren aus Kunststoff mit Schraubverschluss überführt. Einem dieser Aliquote wurden 100 µL Methanol zupipettiert, um für die spätere Analytik einen Blank der Matrix zu erhalten. Zur Herstellung von Kalibrierstandards eines Konzentrationsbereiches von 0,1 ng/mL bis 80 ng/mL Salbutamol wurden zu den übrigen Aliquoten die jeweiligen methanolischen SB-Standardlösungen zugegeben (V, siehe 4.1.2) und die Mischungen mit Hilfe des Vortex kurz vermengt. Die Endkonzentrationen der Kalibrierlösungen und ihre Zusammensetzung können *Tabelle 16* entnommen werden.

**Tabelle 16:** Herstellung und Endkonzentrationen der Salbutamol (SB)-Standardreihe, wie sie vor Proteinfällung vorlag und bei der Quantifizierung von SB in Proben aus Lungenperfusionsexperimenten verwendet wurde.

Standard	Konzentration SB [ng/mL]	Volumen methanolische Lösung SB [µL]	Volumen Perfusionspuffer [µL]
S <sub>1</sub>	80	100 V <sub>3</sub>	900
S <sub>2</sub>	50	100 V <sub>4</sub>	900
S <sub>3</sub>	25	100 V <sub>5</sub>	900
S <sub>4</sub>	10	100 V <sub>6</sub>	900
S <sub>5</sub>	5	100 V <sub>7</sub>	900
S <sub>6</sub>	1	100 V <sub>8</sub>	900
S <sub>7</sub>	0,5	100 V <sub>9</sub>	900
S <sub>8</sub>	0,1	100 V <sub>10</sub>	900

Die weitere Behandlung der Kalibrierstandards entsprach der Aufarbeitung von Proben aus den Lungenperfuisionsversuchen (siehe 4.4.2).

#### 4.4.2 Probenaufarbeitung

Auf ihren Salbutamolgehalt hin untersucht wurden von jedem Perfusionsexperiment jeweils die Proben, die 2, 5 und 10 Minuten nach Beginn der SB-Applikation aus dem venösen Ausgang gesammelt worden waren. Ebenso wurden die Proben der Zeitpunkte 0, 10, 20, 30, 45 und 60

Minuten nach SB-Dosierungsende (siehe 4.2.5) sowohl aus der Vene als auch aus dem Reservoir in die quantitative Analyse eingeschlossen.

Die Aufarbeitung der Kalibrierstandards mit Perfusionspuffer als Matrix einschließlich der Leerwertkontrolle (siehe 4.4.1.2) und der Proben aus einem Lungenperfusionsexperiment, die bereits in 15 mL-Reagenzröhren gelagert worden waren (siehe 4.2.5), erfolgte bei RT. Mit Ausnahme des Matrixblank wurden alle Proben mit 100  $\mu$ L des internen Standards Verdünnung  $V_1$  Fenoterol (10  $\mu$ g/mL, siehe 4.1.2) versetzt und auf dem Vortex vermischt. Dem Blank wurden 100  $\mu$ L Methanol zupipettiert, bevor er ebenfalls durchmischt wurde. Die Ausfällung von Proteinen erfolgte durch Zugabe von 3 mL Acetonitril (MeCN) zu jeder Probe und eine gründliche Durchmischung auf dem Vortex für 30 Sekunden. Die Proben wurden bei 700 x  $g$  fünf Minuten lang zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand abgenommen und jeweils in ein Spitzkölbchen überführt. Bei einem kontinuierlichen Stickstoffstrom wurden die Proben bis zur Trockene eingengt. Der verbleibende Rückstand wurde in 400  $\mu$ L eines Gemisches aus Methanol und Millipore®-Wasser (1:10) aufgenommen und möglichst quantitativ in ein 1,5 mL-Reagiergefäß überführt. Die Proben wurden bei 9000 x  $g$  fünf Minuten lang zentrifugiert, um Schwebeteilchen abzutrennen, bevor schließlich jeweils 200  $\mu$ L einer Probe in ein braunes Micro Vial pipettiert und dicht verschlossen bis zur Analyse mittels LC-MS/MS bei -25 °C gelagert wurden.

#### **4.4.3 Quantifizierung mittels LC-MS/MS**

Nach Auftauen bei RT wurden sowohl die Proben und Standardlösungen der Perfusionsversuche (siehe 4.4.2) als auch die Proben zur Bestimmung der tatsächlich applizierten Dosis (siehe 4.3) mit den dazugehörigen Kalibrierreihen (siehe 4.4.1.1) durch massenspektrometrische Detektion nach flüssigchromatographischer Auftrennung von Analyt und internem Standard auf ihre Salbutamol-Konzentration hin analysiert. Als Grundlage diene hier wiederum eine von Gnadt beschriebene Methode zur Bestimmung von  $\beta_2$ -Sympathomimetika [57]. Die Analytik wurde am bereits in 3.1.5 beschriebenen LC-MS/MS System durchgeführt, wobei wie in 3.3.2 ein Gemisch aus 0,1 % (V/V) Ameisensäure in Millipore®-Wasser (Fließmittel A) und MeCN (Fließmittel B) als mobile Phase dienten. Nach Injektion von jeweils 10  $\mu$ L Probenvolumen erfolgte die Auftrennung des Analyten Salbutamol (SB) und des internen Standards Fenoterol (FE) mit Hilfe einer XTerra MS C18 Säule unter Gradientenelution bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 mL/min (siehe *Tabelle 17*). Beginnend mit 95 % A und anschließendem Abfall auf 70 % innerhalb von 5 Minuten schloss sich eine

Abnahme von Fließmittel A auf 0 % innerhalb der darauffolgenden 3 Minuten an. SB wurde im Rahmen dieses Gradienten bei 4 Minuten eluiert, FE bei 5 Minuten.

**Tabelle 17:** Zeitlicher Verlauf der Gradientenelution bei der Bestimmung von SB mittels LC-MS/MS.

<b>Zeitpunkt nach Probeninjektion [min]</b>	<b>Anteil Fließmittel A [%]</b>	<b>Anteil Fließmittel B [%]</b>	<b>Flussrate</b>	<b>Vorgang</b>
0	95	5		
5	70	30	0,5	Linearer Gradient
8	0	100		
8,01	0	100	0,75	Spülen der Säule
11	0	100		
11,01	95	5	0,75	Äquilibrierung der Säule
14,5	95	5		
14,51	95	5	0,5	
16	95	5		

Fließmittel A: 0,1 % (V/V) Ameisensäure in Millipore®-Wasser

Fließmittel B: MeCN

Die Detektion der Substanzen erfolgte analog zu 3.3.2 im positiven Ionisationsmodus nach ESI und im MRM-Betriebsmodus des Massenspektrometers, als Vernebelungs- und Mantelgas wurde Stickstoff eingesetzt. Die Einstellungen der einzelnen Parameter entsprachen dabei denjenigen in 3.3.2 und sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst:

Kapillarspannung	3,5 kV
Vernebelungsdruck	45 psi
Gas-Temperatur	300 °C
Gasfluss	5 L/min
Mantelgas-Temperatur	250 °C
Mantelgasfluss	11 L/min
Nozzle-Spannung	500 V

Aus dem Totalionenstrom wurden die in *Tabelle 18* angegebenen Ionenchromatogramme isoliert, wobei für SB die Fragmente mit einem m/z von 148 und für FE die Ionen mit einem m/z von 107 zur Quantifizierung herangezogen wurden. Mit Hilfe der Software Agilent MassHunter wurden im Rahmen der Auswertung der erhaltenen Chromatogramme zunächst die Peakflächen integriert und anschließend die Quotienten aus der Fläche des Peaks von SB und der zugehörigen Fläche des FE-Peaks gebildet. Für die Kalibrierlösungen wurden diese Quotienten gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen und durch lineare Regression eine Kalibriergerade erhalten. Durch Einsetzen der entsprechenden Flächenquotienten in die jeweilige Geradengleichung konnten die unbekanntenen SB-Konzentrationen der Proben aus Perfusionsversuchen und aus der Bestimmung der applizierten Dosis berechnet werden.

**Tabelle 18:** Parameter bei der Quantifizierung von Salbutamol (SB) und Fenoterol (FE) mittels LC-MS/MS.

Substanz	Mutterion (m/z)	Fragmente (m/z)	Kollisionsenergie (eV)	Fragmentorspannung (V)
SB	240	148*	17	100
		222	5	100
FE (IS)	304	107*	33	120
		135	17	120

\* Quantifier

IS: interner Standard

Für insgesamt drei Perfusionsexperimente mit Carnitin- und anschließender Salbutamol-Vernebelung wurden auf diese Weise für jeden Probenentnahmezeitpunkt Konzentrationswerte gewonnen. Die im Perfusat gefundene Menge SB konnte ins Verhältnis zur tatsächlich applizierten Dosis gesetzt werden und somit die Konzentrationsverläufe von SB während eines Perfusionsversuches dargestellt und unmittelbar mit vorausgegangenen Versuchen von Gnadt [57] verglichen werden.

## 5 Bestimmung der Konzentration von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) in Proben aus Lungenperfusionsversuchen und Vollblut-Äquivalent-Proben mittels *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA)

Proben aus vorangegangenen Versuchen mit dem humanen Lungenperfusionsmodell, die im Rahmen der Promotionsarbeit von Gnadt [57] durchgeführt worden waren, wurden auf ihre Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)-Konzentration hin analysiert. Bei diesen Experimenten waren je nach untersuchter Substanz zwei unterschiedliche Perfusionsflüssigkeiten eingesetzt worden. Zum einen wurde reiner Perfusionspuffer (siehe 4.1.4, 5.1.2.1) verwendet, zum anderen eine Blutzubereitung mit einem Hämatokritgehalt von 20 % (siehe 5.1.2.2). Zudem wurden Vollblut-Äquivalent-Proben (siehe 5.2.2) analog zur Zubereitung von Perfusionsflüssigkeit aus den Versuchen hergestellt und als Leerwertkontrollen auf ihren PGE<sub>2</sub>-Gehalt hin untersucht.

### 5.1 Verwendete Reagenzien, Materialien und Geräte

#### 5.1.1 Reagenzien und Lösungen

Für die Quantifizierung des Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) in den Proben aus Lungenperfusionsversuchen und Vollblut-Äquivalent-Proben wurde das Correlate-EIA™ PGE<sub>2</sub> Kit von Assay Designs, Inc. (Ann Arbor, MI, USA) verwendet. Es enthält eine 96-Loch-Mikrotiterplatte, die mit Anti-Maus IgG spezifischem Ziege-Antikörper beschichtet ist, eine Lösung von alkalischer Phosphatase, die mit PGE<sub>2</sub> konjugiert ist, eine Lösung monoklonaler PGE<sub>2</sub>-Antikörper, eine Pufferlösung (TRIS-gepufferte Salzlösung mit Proteinen und Natriumazid), ein TRIS-gepuffertes Waschkonzentrat, eine PGE<sub>2</sub>-Standardlösung (50000 pg/mL), eine Substratlösung mit p-Nitrophenylphosphat (pNpp) und eine Natriumphosphat-Stopplösung. Das verwendete Wasser entstammte einer Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q®-Synthesis von Millipore (Molsheim, Frankreich). Alle übrigen verwendeten Substanzen wurden analog zu 4.1.1 bezogen

#### 5.1.2 Perfusionsflüssigkeit

##### 5.1.2.1 Perfusionspuffer

Die Herstellung des Perfusionspuffers, wie er bei der Hälfte der Lungenperfusionsversuche von Gnadt [57] verwendet wurde, ist in 4.1.4 beschrieben.

### 5.1.2.2 **Vollblut-Äquivalent mit einem Hämatokritgehalt von 20 %**

Die bei der zweiten Hälfte der Perfusionen eingesetzte Perfusionsflüssigkeit (Vollblut-Äquivalent mit einem Hämatokritgehalt von 20 %) setzte sich aus Erythrozytenkonzentrat und Perfusionspuffer (siehe 4.1.4) zusammen [57]. Die verwendeten Erythrozytenkonzentrate stammten von der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie des Universitätsklinikums Würzburg (Deutschland). Aus Verfallsgründen waren sie nicht mehr zur Anwendung am Menschen zugelassen, jedoch für experimentelle Zwecke in einwandfreiem Zustand. Für jeden Versuch wurden zwei in Bezug auf die Blutgruppen miteinander kompatible Erythrozytenkonzentrate vermischt. Zunächst wurde der Hämatokritgehalt durch 30-minütiges Zentrifugieren zweier 10 mL-Proben bei  $1800 \times g$  und  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  bestimmt (Hereus<sup>®</sup> Megafuge, Kendro, siehe 5.1.3). Anschließend wurde dem gepoolten Erythrozytenkonzentrat - je nach festgestelltem Anteil zellulärer Blutbestandteile – Perfusionspuffer (siehe 4.1.4) zugemischt, so dass gebrauchsfertige Perfusionsflüssigkeit mit einem Hämatokritgehalt von 20 % resultierte. Um während des Mischvorganges aseptische Bedingungen zu gewährleisten, wurde dabei stets unter einer Werkbank mit laminarem Luftstrom gearbeitet. Der Perfusionspuffer wurde jeweils am Vortag des Perfusionsversuches frisch hergestellt und über Nacht bei 4 bis  $8 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 5.1.3 **Sonstige Geräte und Materialien**

Magnetrührer	Variomag Electronic Rührer Mono (H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland)
Magnetrührstäbchen	Magnetrührstäbchen, zylindrisch, PTFE-ummantelter, starker Alnico V-Magnetkern, runde, glatte Oberfläche mit einer Länge von 20 mm und einem Durchmesser von 6 mm (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Mikroliterpipette 0,5-10 $\mu\text{L}$	Eppendorf Research <sup>®</sup> variabel, 0,5-10 $\mu\text{L}$ (Eppendorf, Hamburg, Deutschland);
Mikroliterpipette 10-100 $\mu\text{L}$	Eppendorf Research <sup>®</sup> variabel, 10-100 $\mu\text{L}$ (Eppendorf, Hamburg, Deutschland);
Mikroliterpipette 100-1000 $\mu\text{L}$	Eppendorf Research <sup>®</sup> variabel, 100-1000 $\mu\text{L}$ (Eppendorf, Hamburg, Deutschland);
Mikrotiterplatten-Photometer	Multiskan Ascent (Thermo Electron Corporation, Dreieich, Deutschland)
Mikrotiterplatten Washer	Multiwash Advantage (TriContinent Scientific, Grass Valley, California, USA)

## C – EXPERIMENTELLER TEIL

---

Mikrozentrifugenröhrchen	Gefäß mit Schraubdeckel; aus PP; 1,5 mL (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Reagiergefäß	Gefäß mit konischem Boden und anhängendem Deckel; 1,5 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Schüttelgerät	Unimax 1010 (Heidolph-Instruments, Schwabach, Deutschland)
Vortex	Modell K-550-GE (Bender & Hobein, Zürich, Schweiz)
Wärmeschrank	Modell 400 (Memmert, Schwabach, Deutschland)
Wippschüttler	Mini Rocker Bio MR-1 (Bio San, Riga, Lettland)
Zentrifugen	Microfuge <sup>®</sup> 22R Centrifuge (Beckman Coulter TM, Palo Alto, California, USA) Hereus <sup>®</sup> Megafuge 1.0R (Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Deutschland)
Zentrifugengläser	Rundbodengläser 16 x 100 mm mit Normschliff NS 14/23 (Normschliff Gerätebau, Wertheim, Deutschland)

---



## 5.2 Durchführung des ELISA zur Bestimmung der PGE<sub>2</sub>-Konzentration

### 5.2.1 Herkunft und Vorbereitung der Proben aus Lungenperfusionsversuchen

Die für die PGE<sub>2</sub>-Konzentrationsmessung verwendeten Proben wurden durch Gnadl im Rahmen von zwölf Versuchen mit dem humanen Lungenperfusionsmodell im Thoraxzentrum Bezirk Unterfranken, Münnerstadt, und in der Klinik Schillerhöhe, Gerlingen, gewonnen [57]. Je nach Art der zu untersuchenden Substanz wurden sechs dieser Experimente mit Blutmischung (siehe 5.1.2.2) als Perfusionsflüssigkeit durchgeführt, die übrigen sechs mit reinem Perfusionspuffer (siehe 4.1.4, 5.1.2.1). Der apparative Aufbau entsprach *Abbildung 20* (siehe 4.1.6) und die Versuchsbedingungen stimmten mit den in 4.2.1 und 4.2.2 beschriebenen überein. Die Versuche waren vornehmlich darauf ausgelegt, pharmakokinetische und pharmakodynamische Erkenntnisse über verschiedene inhalativ angewendete Arzneistoffe zu gewinnen. Die verwendeten Lungenlappen stammten von Patienten, die an einem Lungenkarzinom erkrankt waren und sich einer Lobektomie unterziehen mussten. Vor dem operativen Eingriff wurden die Patienten durch die behandelnden Ärzte über die Verwendung des ihnen entnommenen Gewebes zu experimentellen Zwecken aufgeklärt und ihre schriftliche Einverständniserklärung dokumentiert.

Die Entnahme der Proben als Blank der Matrix erfolgte zu Beginn eines Perfusionsversuches nach Passage des Lungenlappens aus dem Reservoir, sobald sich ein Perfusionsgleichgewicht innerhalb der Lungenperfusionsapparatur eingestellt hatte und bevor die Applikation eines Wirkstoffes stattfand. Mit Hilfe einer serologischen Pipette wurden 20 mL Perfusionsflüssigkeit aus dem Reservoir in ein 50 mL Tube überführt, davon wiederum wurden drei Aliquote à 1000 µL in jeweils eine 1,5 mL Mikrozentrifugenröhre pipettiert. Für die Dauer des Experimentes und des Transportes zum Institut für Pharmazie in Würzburg wurden die Proben anschließend auf Eis gelagert, nach Ankunft im Institut mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -25 °C gelagert. Bei Perfusionen mit Vollblut-Äquivalent wurde vor Einfrieren die zellfreie Fraktion einer Probe von den festen Blutbestandteilen durch Zentrifugation über 10 min bei 1000 x g und 10 °C abgetrennt (Microfuge<sup>®</sup>, Beckman Coulter, siehe 5.1.3). Für die PGE<sub>2</sub>-Konzentrationsmessung mittels ELISA wurde der zellfreie Überstand eingesetzt.

### **5.2.2 Herstellung von Vollblut-Äquivalent-Proben**

Zur Feststellung eines möglichen PGE<sub>2</sub>-Spiegels in der Matrix bei Versuchen, in denen Blutmischung als Perfusionsflüssigkeit verwendet wurde, wurden Vollblut-Äquivalent-Proben als Leerwertkontrollen generiert. Dabei wurde die Vorgehensweise sowohl bezüglich der Herstellung als auch in Bezug auf die Behandlung dieser Proben, dem Procedere der Perfusionsflüssigkeit nachempfunden. Um eine Zusammensetzung dieser Proben analog zur Perfusionsflüssigkeit in Vollblut-Äquivalent-Perfusionen sicherzustellen, wurden Erythrozytenkonzentrate und Perfusionspuffer entsprechend der Vorgehensweise bei der Herstellung von Perfusionsflüssigkeit gemischt.

Erythrozytenkonzentrate, die aus Haltbarkeitsgründen nicht mehr am Menschen angewendet werden konnten, jedoch für experimentelle Zwecke in tadellosem Zustand waren, stammten von der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie des Universitätsklinikums Würzburg und wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Der Hämatokritanteil der Blutprodukte wurde per Doppelbestimmung ermittelt. Hierzu wurden zwei Aliquote des Erythrozytenkonzentrates mit einem Volumen von einem Milliliter in 1,5 mL-Mikrozentrifugenröhrchen überführt und bei 904 x g und 10 °C dreißig Minuten lang zentrifugiert (Microfuge<sup>®</sup>, Beckman Coulter, siehe 5.1.3). Nach der Bestimmung des Anteils der zellulären Bestandteile wurde dem Erythrozytenkonzentrat in einem 1,5 mL-Reagiergefäß Perfusionspuffer (siehe 4.1.4) zugemischt, so dass ein Hämatokritgehalt von 20 % resultierte. Insgesamt wurden auf diese Weise durch Aufbereitung sechs verschiedener Erythrozytenkonzentrat-Chargen sechs unterschiedliche Blutproben mit einem Volumen von je einem Milliliter erhalten. Das Erwärmen der Perfusionsflüssigkeit auf 37 °C während eines Perfusionsexperimentes (siehe 5.2.1, 4.1.6 und 4.2.1) wurde simuliert, indem die Blutproben über 150 min bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert wurden. Dabei wurden die Proben auf einem Wippschüttler positioniert und einer beständigen, schwenkenden Bewegung unterzogen, um ein schwerkraftbedingtes Absinken der enthaltenen festen Blutbestandteile zu unterbinden. Es schloss sich eine Lagerung der Blutproben auf Eis über 30 min an, die die Aufbewahrung der Perfusionsproben während des Transportes von der Klinik zum Institut für Pharmazie in Würzburg nachahmte (siehe 5.2.1). Analog zur Behandlung von Proben aus Perfusionsversuchen mit Blut (siehe 5.2.1) wurden die Vollblut-Äquivalent-Proben bei 1000 x g und 10 °C zehn min lang zentrifugiert (Microfuge<sup>®</sup>, Beckman Coulter, siehe 5.1.3), um die zellulären Bestandteile des Blutes abzutrennen. Anschließend wurde der Überstand jeweils in

ein frisches 1,5 mL-Reagiergefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -25 °C aufbewahrt.

Für die quantitative Bestimmung des PGE<sub>2</sub> mittels ELISA wurde jeweils der zellfreie Überstand der But-Proben eingesetzt.

### **5.2.3 Herstellung von Waschpuffer und Kalibrierlösungen**

Zur Anfertigung der gebrauchsfertigen Waschlösung wurde das Waschkonzentrat bei Raumtemperatur (RT) gemäß der Herstellerangaben mit Millipore®-Wasser im Verhältnis 1:100 verdünnt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Waschlösung bei RT gelagert.

Die mitgelieferte PGE<sub>2</sub>-Standardlösung für die Erstellung einer Kalibriergeraden wurde in Zentrifugengläsern mit Pufferlösung verdünnt, so dass folgende sieben PGE<sub>2</sub>-Konzentrationsniveaus resultierten:

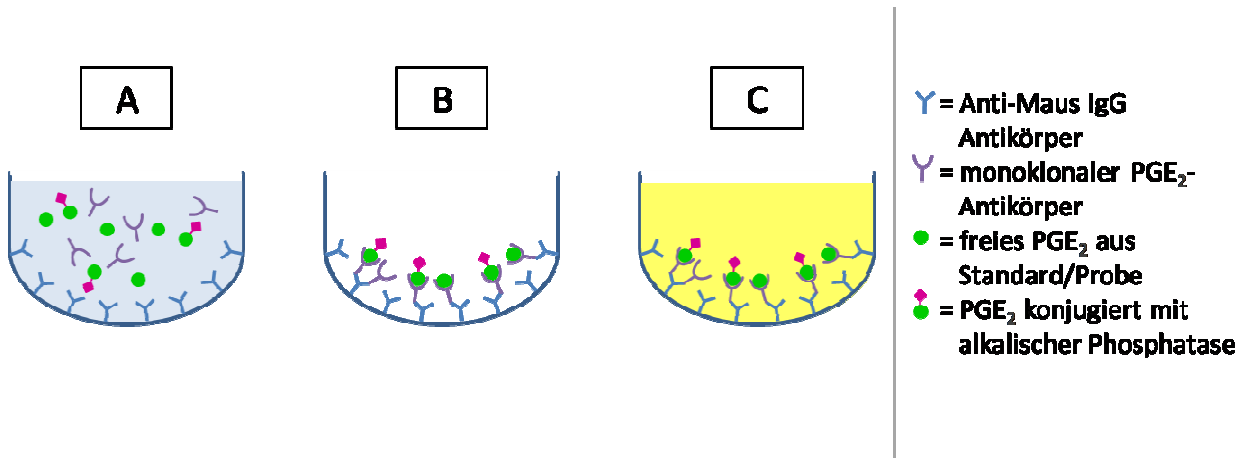
2500	pg/mL
1250	pg/mL
625	pg/mL
313	pg/mL
156	pg/mL
78,1	pg/mL
39,1	pg/mL

Die fertigen Kalibrierlösungen wurden innerhalb von 60 Minuten der Analyse mittels ELISA zugeführt.

### **5.2.4 Versuchsdurchführung**

Vor Beginn der PGE<sub>2</sub>-Konzentrationsbestimmung mittels ELISA wurde darauf geachtet, dass alle verwendeten Komponenten RT erreicht hatten. Der schematische Ablauf des Assays ist in *Abbildung 21* dargestellt. Entsprechend der Herstellerangaben wurden jeweils 100 µL der Standardlösungen, der Vollblut-Äquivalent-Proben und der Proben aus Lungenperfusionsversuchen in die entsprechenden Wells pipettiert. Anschließend wurden 50 µL der mit PGE<sub>2</sub> konjugierten Lösung alkalischer Phosphatase und 50 µL der monoklonalen PGE<sub>2</sub>-Antikörper Lösung in die Nöpfe dazugegeben und die Mikrotiterplatte wurde – mit Folie abgedeckt – zwei Stunden lang bei RT und ca. 500 Upm auf dem Schüttelgerät inkubiert. Während dieser Zeit

konnte der monoklonale Antikörper auf eine kompetitive Art und Weise das PGE<sub>2</sub> im Molekül der alkalischen Phosphatase bzw. im Standard oder der Probe binden.



**Abbildung 21:** Schematische Darstellung des ELISA zur Quantifizierung von PGE<sub>2</sub>.

Bei der quantitativen Bestimmung von PGE<sub>2</sub> werden (A) im mit Anti-Maus IgG Antikörpern beschichteten Well monoklonale PGE<sub>2</sub>-Antikörper, mit alkalischer Phosphatase konjugiertes PGE<sub>2</sub> und das in der Probe oder im Standard enthaltene PGE<sub>2</sub> zeitgleich inkubiert. Es findet eine Konkurrenz zwischen freiem und konjugiertem PGE<sub>2</sub> um den Bindungsplatz am monoklonalen Antikörper statt. Nach Entfernung überschüssiger Reagenzien (B) verbleibt über die Antikörper an die Platte gebundenes PGE<sub>2</sub> (sowohl konjugiertes als auch nicht-konjugiertes). Nach Zugabe von Substrat (C) kommt es zur Farbentwicklung.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Inhalt der Wells mit Hilfe des Mikrotiterplatten Washers geleert und jeder Napf wurde drei Mal mit jeweils 400 µL Waschpuffer gewaschen. Auf diese Weise wurden überschüssige, nicht an die Platte gebundene Reagenzien entfernt. Es folgte die Zugabe von 200 µL Substratlösung in jedes Well und eine weitere Inkubation der Mikrotiterplatte bei RT über 45 Minuten, allerdings ohne Schüttelbewegung. Während dieser Zeit wurde entsprechend der Anwesenheit des enzymatischen Reaktionspartners eine gelbe Färbung der Napfinhalte induziert. Mit 50 µL Natriumphosphat-Stopplösung wurde die Farbreaktion beendet und die Messung der Absorptionen bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Korrektur bei 600 nm mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Photometers erfolgte umgekehrt. Die Intensität der gelben Farbe in den Wells war hierbei umgekehrt proportional zur PGE<sub>2</sub>-Konzentration.

Insgesamt wurde der PGE<sub>2</sub>-Gehalt in sechs Proben aus Perfusionsexperimenten mit Puffer, sechs Proben aus Perfusionsversuchen mit Blutmischung als Perfusionsflüssigkeit und sechs verschiedenen hergestellten Vollblut-Äquivalent-Proben bestimmt. Dabei wurden alle Proben dreifach vermessen.

### 5.2.5 Auswertung des PGE<sub>2</sub>-ELISA

Aus den Messwerten der Standards wurde auf Basis einer Logit-Log Transformation eine lineare Kalibriergerade erhalten. Hierzu wurde zunächst durch Dividieren der Absorption jedes Standards durch die Absorption des „0“-Kalibrators (Standard mit 0 pg/mL PGE<sub>2</sub>) die prozentuale Bindung ( $B/B_0$  %) für jeden Kalibrator berechnet. Es folgte eine Logit-Transformation nach folgender Formel:

**Formel 4**

$$\text{Logit} \frac{B}{B_0} = \ln \frac{\frac{B}{B_0}}{\left(1 - \frac{B}{B_0}\right)}$$

B: Absorption des jeweiligen Standards

B<sub>0</sub>: Absorption des Standards mit 0 pg/mL PGE<sub>2</sub>

Die auf diese Weise transformierten Werte der Standards wurden gegen die logarithmierte PGE<sub>2</sub>-Konzentration aufgetragen und durch lineare Regression wurde eine Kalibriergerade erhalten. Durch Einsetzen der entsprechenden logit-transformierten Werte der Proben unbekannter Konzentration in die Geradengleichung konnte deren PGE<sub>2</sub>-Gehalt ermittelt werden.



## **D Tabellarischer Anhang**

---





# 1 *Ex-vivo*-Vergleich der Verteilungskinetik zweier Cyclosporin A-Formulierungen von humanem Lungengewebe in humanes Blut mit Hilfe eines Dialysemodells

## 1.1 Lösung von Cyclosporin A in Propylenglykol (CsA-PG)

Zeitpunkt (min)	Konzentration (ng/mL) im Dialysat		
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
0	35	88	24
15	81	240	107
30	99	307	340
60	328	608	345
90	421	782	641
120	709	989	893
180	1095	1322	1339
240	1333	1566	1767
360	2335	2121	2375
420	2524	2503	2691

## 1.2 Liposomale Cyclosporin A-Formulierung (L-CsA)

Zeitpunkt (min)	Konzentration (ng/mL) im Dialysat		
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
0	152	57	19
15	282	92	74
30	220	122	178
60	248	306	212
90	338	432	277
120	442	549	396
180	563	727	647
240	807	1101	1030
360	1401	1603	1581
420	1429	1621	1850

### 1.3 Mittlere Konzentration von CsA im Dialysat - Vergleich der beiden Formulierungen

Zeitpunkt (min)	Konzentration (ng/mL) im Dialysat			
	CsA-PG		L-CsA	
	Mittelwert	MAwM	Mittelwert	MAwM
0	49	26	76	51
15	143	65	149	88
30	249	100	173	34
60	427	120	255	34
90	615	129	349	55
120	864	103	462	58
180	1252	105	646	55
240	1555	148	979	115
360	2277	104	1529	85
420	2573	79	1633	145

MAwM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

### 1.4 AUC

Versuch	AUC [(ng*min)/mL]	
	CsA-PG	L-CsA
1	529 654	323 166
2	583 639	387 037
3	613 080	367 081
Mittelwert	575 458	359 094
MAwM	30 536	21 957

MAwM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

**1.5 Diffusionsrate (DR)**

Versuch	Diffusionsrate [ng/(mL*min)]	
	CsA-PG	L-CsA
1	6,23	3,19
2	5,54	4,03
3	6,47	4,40
Mittelwert	6,08	3,87
MAwM	0,36	0,46

MAwM      Mittlere Abweichung vom Mittelwert

## 2 Etablierung des kontinuierlichen Dialysemodells - Vergleich der Diffusionskinetik von Fluticasonpropionat bei Anwendung der statischen und der kontinuierlichen Dialyse

### 2.1 Statische Dialyse (SD)

Zeitpunkt (min)	Konzentration Fluticasonpropionat (ng/mL) im Dialysat		
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
0	0	0	0
3	51	26	58
6	51	41	64
15	99	101	141
21	133	114	168
30	186	155	201
45	239	191	253
60	328	262	304
90	412	382	404
120	474	494	470
150	563	549	542
180	627	553	521
240	728	756	733

### 2.2 Kontinuierliche Dialyse (KD)

Zeitpunkt (min)	Konzentration Fluticasonpropionat (ng/mL) im Dialysat		
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
0	0	0	0
3	34	45	29
6	46	68	53
15	91	94	89
21	91	102	104
30	90	100	111
45	97	97	100
60	89	94	101
90	76	76	87
120	76	68	71
150	73	58	71
180	62	52	61
240	56	42	51

### 2.3 Mittlere Konzentration von Fluticasonpropionat (FP) im Dialysat – Vergleich der statischen (SD) und der kontinuierlichen (KD) Dialyse

Zeitpunkt (min)	Konzentration FP (ng/mL) im Dialysat			
	SD		KD	
	Mittelwert	MAwM	Mittelwert	MAwM
0	0	0	0	0
3	45	13	36	6
6	52	8	56	8
15	114	18	91	2
21	138	20	99	6
30	181	17	100	7
45	228	24	98	1
60	298	24	95	4
90	399	12	79	5
120	479	10	72	3
150	551	7	67	6
180	567	40	59	4
240	739	11	50	5

MAwM      Mittlere Abweichung vom Mittelwert

### 3 Bestimmung der Diffusionskinetik von Fenoterolhydrobromid und Ipratropiumbromid nach Freisetzung aus dem Dosieraerosol Berodual® N bei Anwendung des kontinuierlichen Dialysemodells

#### 3.1 Resultierende tatsächlich applizierte Dosis

##### 3.1.1 Fenoterol

Versuch	Absolut deponierte Wirkstoffmenge (µg)		
	Mundstück	Glasrohr	Lungenhomogenat-Depot
1	53,1	57,1	68,2
2	51,6	69,1	55,8
3	51,5	62,1	72,1
4	n.d.	n.d.	47,1
Mittelwert	52,1	62,7	60,8
MAwM	0,7	4,2	9,4

MAwM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

n.d. wurde nicht durchgeführt

##### 3.1.2 Ipratropiumbromid

Versuch	Absolut deponierte Wirkstoffmenge (µg)		
	Mundstück	Glasrohr	Lungenhomogenat-Depot
1	17,4	17,4	24,2
2	17,5	25,6	42,1
3	18,2	19,1	42,2
4	n.d.	n.d.	37,8
Mittelwert	17,7	20,7	36,6
MAwM	0,3	3,3	6,2

MAwM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

n.d. wurde nicht durchgeführt

## 3.2 Diffusionsversuche Berodual® N

### 3.2.1 Fenoterol

Zeitpunkt (min)	Konzentration Fenoterol (ng/mL) im Dialysat				
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittelwert	MAwM
0	0	0	0	0	0
3	91	106	91	96	7
6	101	156	134	130	20
15	232	279	162	224	42
21	241	257	178	225	32
30	242	265	194	234	26
45	230	239	211	227	11
60	212	222	210	215	5
90	193	215	210	206	9
120	167	216	200	194	18
150	142	197	176	172	20
180	135	170	142	149	14
240	112	139	124	125	9

MAwM      Mittlere Abweichung vom Mittelwert

Zeitpunkt (min)	Fenoterol im Dialysat als Prozent der applizierten Dosis (%)	
	Mittelwert	MAwM
0	0	0
3	0,76	0,05
6	1,03	0,16
15	1,77	0,33
21	1,78	0,25
30	1,84	0,21
45	1,79	0,08
60	1,70	0,04
90	1,63	0,07
120	1,53	0,14
150	1,36	0,16
180	1,17	0,11
240	0,99	0,07

MAwM      Mittlere Abweichung vom Mittelwert

Versuch	AUC Fenoterol (% der applizierten Dosis*min)
1	316,0
2	376,2
3	327,8
Mittelwert	340,0
MAwM	24,1

MAwM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

### 3.2.2 Ipratropiumbromid

Zeitpunkt (min)	Konzentration Ipratropiumbromid (ng/mL) im Dialysat				
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittelwert	MAwM
0	0	0	0	0	0
3	63	91	68	74	11
6	76	138	98	104	23
15	188	269	137	198	47
21	186	246	151	194	34
30	183	252	168	201	34
45	165	222	176	187	23
60	150	200	179	176	18
90	139	188	176	168	19
120	113	177	152	147	23
150	90	146	123	120	20
180	75	117	98	97	14
240	54	78	75	69	10

MAwM Mittlere Abweichung vom Mittelwert



Zeitpunkt (min)	Ipratropiumbromid im Dialysat als Prozent der applizierten Dosis (%)	
	Mittelwert	MAwM
0	0	0
3	0,97	0,15
6	1,36	0,30
15	2,60	0,62
21	2,55	0,45
30	2,64	0,45
45	2,46	0,30
60	2,31	0,23
90	2,20	0,25
120	1,93	0,30
150	1,57	0,26
180	1,27	0,19
240	0,91	0,13

MAwM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

Versuch	AUC Ipratropiumbromid (% der applizierten Dosis*min)
1	350,7
2	508,3
3	417,6
Mittelwert	425,5
MAwM	55,2

MAwM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

## 4 Untersuchungen zur pulmonalen Absorption von Salbutamol nach vorheriger inhalativer Applikation von Carnitin am humanen Lungenperfusionsmodell

### 4.1 Tatsächlich applizierte Dosis und Gewicht des Lungengewebes

Perfusions- experiment	Tatsächlich applizierte Dosis ( $\mu\text{g}$ )	Gewicht des humanen Lungengewebes (g)		
		Vor Versuchsbeginn	Nach Versuchsende	Gewichtszunahme in %
1	388	307	495	61,2
2	716	824	917	11,3
3	700	224	308	37,5
Mittelwert	601			
MAwM	142			

MAwM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

### 4.2 Ergebnisse der Perfusionsversuche

#### 4.2.1 Venöser Ausgang

Zeitpunkt (min)	Konzentration Salbutamol (ng/mL) in der Perfusionsflüssigkeit				
	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Mittelwert	MAwM
-10	3,5	2,8	1,0	2,4	1,0
-7	5,5	3,0	1,9	3,5	1,4
-2	7,6	2,8	4,9	5,1	1,7
0	8,8	2,5	6,4	5,9	2,3
10	9,5	2,6	8,6	6,9	2,8
20	9,5	2,8	9,8	7,4	3,1
30	10,9	2,8	10,4	8,1	3,5
45	12,5	2,8	11,6	9,0	4,1
60	12,7	2,8	12,3	9,3	4,3

MAwM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

Zeitpunkt (min)	In die Perfusionsflüssigkeit umverteiltes Salbutamol als Prozent der applizierten Dosis (%)				
	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Mittelwert	MAwM
-10	1,4	0,6	0,2	0,7	0,4
-7	2,1	0,6	0,4	1,1	0,7
-2	2,9	0,6	1,0	1,5	0,9
0	3,4	0,5	1,4	1,8	1,1
10	3,7	0,6	1,8	2,0	1,1
20	3,7	0,6	2,1	2,1	1,0
30	4,2	0,6	2,2	2,4	1,3
45	4,8	0,6	2,5	2,6	1,5
60	4,9	0,6	2,6	2,7	1,5

MAwM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

#### 4.2.2 Reservoir

Zeitpunkt (min)	Konzentration Salbutamol (ng/mL) in der Perfusionsflüssigkeit				
	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Mittelwert	MAwM
0	5,3	2,8	5,1	4,4	1,1
10	6,8	2,7	8,3	5,9	2,2
20	8,1	2,9	9,4	6,8	2,6
30	9,5	2,8	10,5	7,6	3,2
45	10,5	2,9	11,1	8,2	3,5
60	12,1	2,9	11,7	8,9	4,0

MAwM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

Zeitpunkt (min)	In die Perfusionsflüssigkeit umverteiltes Salbutamol als Prozent der applizierten Dosis (%)				
	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Mittelwert	MAwM
0	2,1	0,6	1,1	1,2	0,5
10	2,6	0,6	1,8	1,7	0,7
20	3,1	0,6	2,0	1,9	0,9
30	3,7	0,6	2,3	2,2	1,1
45	4,1	0,6	2,4	2,4	1,2
60	4,7	0,6	2,5	2,6	1,4

MAwM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

### 4.2.3 AUC

Versuch	AUC (% der applizierten Dosis*min)
1	277,3
2	40,7
3	138,1
Mittelwert	152,0
MAwM	83,5

MAwM      Mittlere Abweichung vom Mittelwert

## 5 Bestimmung der Konzentration von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) in Proben aus Lungenperfusionsversuchen und Vollblut-Äquivalent-Proben mittels *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA)

### 5.1 Perfusionen mit Blutmischung als Perfusionsflüssigkeit (GW597901)

Experiment	Konzentration PGE <sub>2</sub> (pg/mL)				
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Mittelwert	MAwM
GW 1	545	608	580	578	22
GW 2	472	572	516	520	35
GW 3	627	715	709	683	38
GW 4	282	315	361	319	28
GW 5	151	198	197	182	20
GW 6	174	180	180	178	3

MAwM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

### 5.2 Perfusionen mit Puffer als Perfusionsflüssigkeit (Salbutamol)

Experiment	Konzentration PGE <sub>2</sub> (pg/mL)				
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Mittelwert	MAwM
SB 1	67	62	62	64	2
SB 2	115	124	145	128	11
SB 3	103	127	113	114	8
SB 4	141	152	161	151	7
SB 5	93	115	101	103	8
SB 6	340	352	359	350	7

MAwM Mittlere Abweichung vom Mittelwert

**5.3 Leerwertkontrollen aus Vollblut-Äquivalent**

Probe	Konzentration PGE <sub>2</sub> (pg/mL)				
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Mittelwert	MAwM
Kontrolle 1	121	113	113	116	3
Kontrolle 2	115	120	139	125	9
Kontrolle 3	157	180	159	165	10
Kontrolle 4	115	111	116	114	2
Kontrolle 5	122	141	164	142	15
Kontrolle 6	136	140	132	136	3

MAwM      Mittlere Abweichung vom Mittelwert







## **E Zusammenfassung**

---



## 1 Zusammenfassung

Aus pharmakokinetischer Sicht sind neben Parametern wie der oralen Bioverfügbarkeit und der systemischen Clearance, für die Effektivität und Sicherheit eines inhalativ angewendeten Wirkstoffes unter anderem das Ausmaß der pulmonalen Deposition und seine pulmonale Umverteilungskinetik entscheidend. Wird eine topische Wirkung des Arzneistoffes angestrebt, so trägt eine lange Verweilzeit des Arzneistoffes im Zielgewebe, verbunden mit einer langsamen Umverteilung in den systemischen Kreislauf zu einer Wirkungsoptimierung mit gleichzeitiger Minimierung systemischer Nebenwirkungen bei. *In-vitro*- und *ex-vivo*-Modelle eignen sich hervorragend zur isolierten Untersuchung solcher pharmakokinetischer Vorgänge ohne den Einfluss verschiedener *in-vivo*-Faktoren, wie der Verteilung in andere Gewebe, Metabolisierungs- oder Eliminationsprozessen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Modelle der humanen Lunge zu etablieren bzw. weiterzuentwickeln, die möglichst realitätsnah die Untersuchung der Pharmakokinetik pulmonal applizierter Wirkstoffe ermöglichen.

Ein bereits etabliertes statisches Dialysemmodell wurde dahingehend modifiziert, dass der Vergleich der Absorptionsphase einer liposomalen Cyclosporin A-Formulierung (L-CsA) und einer Zubereitung von Cyclosporin A in Propylenglykol (CsA-PG) nach Applikation auf humanes Lungengewebe ermöglicht wurde. Auf Grund der Stoffeigenschaften des Cyclosporins, im systemischen Kreislauf bevorzugt an Leukozyten, Erythrozyten und Lipoproteine zu binden, wurde erstmals Blut als Dialyseflüssigkeit eingesetzt und dabei eine Sedimentation der zellulären Blutbestandteile verhindert. Im Vergleich zur Lösung des Immunsuppressivums in Propylenglykol (CsA-PG) zeigte sich bei der liposomalen Formulierung (L-CsA) eine langsamere Diffusion von Cyclosporin aus dem Lungengewebe in das Blutkompartiment und somit eine stärkere Geweberetention für L-CsA, was auch für Permeabilitätsversuche mit der humanen Bronchialzelllinie Calu-3 und denselben beiden Wirkstoffformulierungen nachgewiesen worden war. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass das Dialysemmodell vergleichbare Ergebnisse liefert wie das zur Permeabilitätsbestimmung etablierte Zellkulturmodell.

Das Fehlen einer Eliminationsphase beim statischen Dialysemmodell als entscheidende Limitierung gestattete keine Berechnung pharmakokinetischer Parameter wie  $c_{\max}$ ,  $t_{\max}$  und  $t_{1/2}$  aus den gewonnenen Daten. Das Modell wurde daher zu einem dynamischen Modell weiter entwickelt, wobei ein konstanter Fluss durch das Akzeptorkompartiment den Blutkreislauf simulieren sollte. Dafür wurde eine Lösung der Modellschubstanz Fluticasonpropionat direkt auf das Lungenhomogenat aufgetragen, Plasma diente als Dialyseflüssigkeit. Vergleichende

Untersuchungen mit der statischen und der kontinuierlichen Dialyse zeigten deutlich unterschiedliche Diffusionsprofile für Fluticasonpropionat: Während bei der statischen Methode durch den kumulativen Wirkstofftransport vom Gewebe in das Plasmakompartiment die Fluticasonpropionat-Konzentration im Dialysat stetig anstieg, erreichte die Konzentrationskurve bei Versuchen mit dem kontinuierlichen Dialysemodell ein Plateau und fiel danach ab, da ein kontinuierlicher Abtransport von Arzneistoff aus dem Akzeptorkompartiment stattfand. Dies entsprach der Simulation einer Eliminationsphase, und damit einer Annäherung des Modells an physiologische Verhältnisse.

Am Anwendungsbeispiel des Dosieraerosols Berodual<sup>®</sup> N wurde mit dem kontinuierlichen Dialysemodell vergleichend die Diffusion von Fenoterol und Ipratropiumbromid untersucht. Die beiden Substanzen, die *in-vivo* nahezu übereinstimmende Verteilungsvolumina aufweisen, verhielten sich bei der Diffusion in das Plasmakompartiment sehr ähnlich und zeigten sowohl in Bezug auf die Verlaufsform der Wirkstoffspiegelkurven als auch auf das Ausmaß der diffundierten Wirkstoffmenge, das auf die applizierte Dosis bezogen wurde, breite Übereinstimmung; durch die Simulation einer Eliminationsphase zeigte sich wiederum eine Korrelation der Diffusionsprofile mit Plasmaspiegelverläufen aus klinischen Humanstudien. Die Gegenüberstellung der Diffusionsprofile von Fenoterol, Ipratropiumbromid und Fluticasonpropionat aus Experimenten mit der kontinuierlichen Dialyse offenbarte ein deutlich längeres Verweilen von Fluticasonpropionat im Lungenhomogenat, das als lipophilste der drei Substanzen im Vergleich zu den anderen beiden Stoffen in einem vergleichsweise geringeren Ausmaß in das Akzeptorkompartiment diffundierte. Dies zeigt das Potential des kontinuierlichen Dialysemodells, Unterschiede in der Diffusion von Stoffen mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften widerzuspiegeln.

Experimente am humanen Lungenperfusionsmodell lieferten potentielle Erklärungen für das Phänomen einer veränderten Pharmakokinetik von Salbutamol in Abhängigkeit von einer zuvor erfolgten Methacholin-Applikation, das sich in vorausgegangenen Studien an diesem Modell gezeigt hatte. Unabhängig davon, ob durch die Provokationssubstanz eine Bronchokonstriktion ausgelöst worden war oder nicht, war Salbutamol nach vorheriger Gabe von Methacholin in deutlich geringerem Maße in die Perfusionsflüssigkeit umverteilt worden im Vergleich zu Experimenten, in denen das  $\beta_2$ -Sympathomimetikum ausschließlich Anwendung gefunden hatte. Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit nacheinander Carnitin und Salbutamol in vernebelter Form an den Lungenlappen verabreicht. Die Umverteilung von Salbutamol in die Perfusionsflüssigkeit war nach zuvor erfolgter Vernebelung von Carnitin vergleichbar niedrig wie in Experimenten mit Methacholin-Applikation und signifikant geringer

als nach alleiniger Gabe von Salbutamol. Somit deuten die Ergebnisse sehr stark auf das Vorhandensein von Konkurrenz-Mechanismen an einem Transporterprotein - wahrscheinlich OCTN2 - zwischen Carnitin bzw. Methacholin und Salbutamol auf molekularer Ebene hin. Außerdem konnte am physiologischen humanen Lungenperfuisionsmodell erstmalig die Beteiligung von OCTN2 Transportern bei der Absorption von  $\beta_2$ -Sympathomimetika nach Inhalation beschrieben werden, ein Sachverhalt der bislang lediglich im Rahmen von Zellkulturversuchen *in-vitro* nachgewiesen worden war.

Mittels ELISA wurde der PGE<sub>2</sub>-Gehalt von Perfusatproben aus vorausgegangenen Versuchen am humanen Lungenperfuisionsmodell, die vor der Applikation von Methacholin gewonnen worden waren, analysiert. Im Rahmen dieser Studienreihe war es erstaunlich gewesen, dass selbst sehr hohe kumulative Dosen der Provokationssubstanz in der Hälfte der Experimente keine Bronchokonstriktion herbeiführten und dass kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Methacholin-Dosis und einer erfolgreichen Provokation festgestellt werden konnte. Bei Betrachtung der Versuche mit erfolgreicher Bronchokonstriktion zeigte sich eine Korrelation zwischen der PGE<sub>2</sub>-Konzentration und der Methacholin-Dosis: So wurde bei einem vorliegenden erhöhten PGE<sub>2</sub>-Spiegel mehr Methacholin für eine erfolgreiche Provokation benötigt im Vergleich zu Lungenpräparaten, die einen niedrigeren PGE<sub>2</sub> Spiegel aufwiesen. Damit kann eine tendenziell bronchoprotektive Wirkung von PGE<sub>2</sub> gegen eine Methacholin-induzierte Konstriktion postuliert werden.

Abschließend betrachtet, gelang die erfolgreiche Etablierung bzw. Weiterentwicklung von Modellen der humanen Lunge, die bei einer möglichst großen Annäherung an physiologische Verhältnisse die Charakterisierung der Pharmakokinetik pulmonal applizierter Wirkstoffe ermöglichten. Diese Modellsysteme können zur Erweiterung bestehender Untersuchungsmethoden und damit zu einem verbesserten Verständnis pharmakokinetischer Vorgänge in der Lunge beitragen.

## 2 Summary

From a pharmacokinetic point of view, the extent of pulmonary deposition and the pulmonary redistribution are crucial for an inhaled drug's effectiveness and safety besides parameters such as oral bioavailability and systemic clearance. Aiming at a local effect, a long residence time in the target tissue combined with a slow redistribution into systemic circulation contribute to a drug's optimal potency while simultaneously minimizing systemic adverse effects. *In-vitro* and *ex-vivo* models are particularly suitable for examining single pharmacokinetic aspects without the influences occurring *in-vivo* such as distribution into other tissues and processes of metabolism or elimination. Therefore, the aim of the present thesis was to establish, respectively enhance models of the human lung, which were able to describe the pharmacokinetics of pulmonary applied drugs close to reality.

An already established static dialysis model was modified to enable the comparison of the absorption behaviour of a liposomal formulation of cyclosporine A (L-CsA) and a propylene glycol solution of CsA (CsA-PG) after application to human lung tissue. Taking into account the chemical properties of CsA to distribute into white blood cells, erythrocytes and lipoproteins, blood was used for the first time as dialysis fluid, whereas sedimentation of the cellular blood components was avoided. Compared to the propylene glycol solution of the immunosuppressant (CsA-PG), the liposomal formulation (L-CsA) showed a slower diffusion of CsA from human lung tissue into the blood compartment and therefore a more pronounced tissue retention. This had also been observed in permeability studies across the human bronchial cell line Calu-3 using the same two drug formulations. Thus, for the first time it was shown that the dialysis model provided comparable results to the well established cell culture permeability model.

As a pivotal limitation of static dialysis model the calculation of pharmacokinetic parameters such as  $c_{\max}$ ,  $t_{\max}$  and  $t_{1/2}$  was not possible due to the lack of elimination processes. Thus, the model was advanced to a dynamic mode allowing a constant flow through the acceptor compartment. For a proof of concept a solution of the model compound fluticasone propionate was applied directly to the lung tissue homogenate and plasma was used as dialysis fluid. Comparative studies with the static and the continuous dialysis revealed great differences concerning the fluticasone propionate's diffusion profiles: In the static model the cumulative drug transport from the lung tissue into the plasma caused a steady rise of fluticasone propionate concentration in the dialysis fluid. The concentration reached a plateau followed by a decrease in experiments with the dynamic dialysis model, the drug was continuously removed

from the acceptor compartment simulating an elimination process and thus physiologic conditions.

Using the continuous dialysis model the diffusion kinetics of fenoterol and ipratropium bromide delivered by the metered dose inhaler Berodual® N were compared. The two substances which possess nearly identical volumes of distribution *in-vivo* revealed high similarity regarding their concentration time courses and the extent of diffusion with regard to the applied dose. The simulated elimination observed in the model was highly consistent with the diffusion profiles and pharmacokinetic time courses measured in plasma in clinical studies with humans. When comparing the diffusion profiles of fenoterol, ipratropium bromide and fluticasone propionate in continuous dialysis experiments fluticasone propionate, which is the most lipophilic of the three agents, was most prolonged retained in the tissue. This fact shows the potential of the continuous dialysis model for demonstrating differences in the diffusion profiles of substances with distinct physicochemical properties.

Experiments with the isolated human lung perfusion model revealed potential explanations for the altered pharmacokinetic behaviour of salbutamol observed in previous investigations with prior application of methacholine. Independent of a successfully induced bronchoconstriction salbutamol had been redistributed into the perfusate to a clearly lower extent when methacholine had been administered previously in contrast to experiments with sole application of the  $\beta_2$ -agonist. Therefore, in the present work nebulized carnitine and salbutamol were applied to the lung lobe consecutively. After nebulization of carnitine the redistribution of salbutamol into the perfusate was as low as seen in the experiments with previous methacholine application and significantly reduced compared to the study with exclusive nebulization of salbutamol. Thus, the results strongly indicate the presence of molecular competition processes for transporter proteins – most likely OCTN2 - between carnitine and salbutamol. Furthermore, for the first time the contribution of OCTN2 transporters for the absorption of  $\beta_2$ -agonists after inhalation was demonstrated in the physiological human lung perfusion model, a fact that previously had been only shown *in-vitro* with cell culture models.

The PGE<sub>2</sub> concentrations in the perfusate obtained in previous investigations with the isolated human lung perfusion model prior to methacholine administration were measured by using an ELISA method. It had been surprising that even very high cumulative doses of methacholine did not induce a bronchoconstriction in half of the experiments and that there was apparently no relation between the methacholine dose and a successful bronchial challenge. Yet, the experiments with effectively induced bronchoconstriction revealed a correlation

between PGE<sub>2</sub> concentration and methacholine dose: in these cases more methacholine was required for a successful provocation in the presence of higher PGE<sub>2</sub> levels. For this reason, a bronchoprotective effect of PGE<sub>2</sub> against a methacholine induced bronchoconstriction can be assumed.

In summary, the successful establishment, respectively advancement of models of the human lung was achieved, which allowed approximation to physiological conditions and enabled the pharmacokinetic characterization of pulmonary applied drugs. These models may contribute to complement existing experimental approaches and thereby deepen the understanding for pharmacokinetic processes in the lungs.



---

## F Abkürzungsverzeichnis

---

Folgende Abkürzungen werden verwendet:

ACh	Acetylcholin
AR	Absorptionsrate
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve
BDP	Beclomethason-17,21-dipropionat
BiPAP	Biphasic Positive Airway Pressure
BSA	Bovines Serumalbumin
BO	Bronchiolitis obliterans
BUD	Budesonid
CA	L-Carnitin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
COPD	chronisch obstruktive Lungenkrankheit, engl. chronic obstructive pulmonary disease
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
CsA	Cyclosporin A
CsA-PG	Lösung von Cyclosporin A in Propylenglykol
DR	Diffusionsrate
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EMA	Europäische Arzneimittelagentur
ESI	Elektrospray-Ionisation
FP	Fluticasonpropionat
FE	Fenoterol (freie Base)

FE-HBr	Fenoterolhydrobromid
FEV <sub>1</sub>	Forcierte Einsekundenkapazität (Forciertes Expiratorisches Volumen in 1 Sekunde)
FVC	Forcierte Vitalkapazität
<i>g</i>	Erdbeschleunigung 9,81 m/s <sup>2</sup>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IB	Ipratropiumbromid
IgG	Immunglobulin G
IS	Interner Standard
ISHLT	International Society for Heart and Lung Transplantation
IU	International unit
KD	Kontinuierliche Dialyse
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
L-CsA	liposomale CsA-Formulierung
LLOQ	lower limit of quantification, Bestimmungsgrenze
log P	dekadischer Logarithmus des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten
MAwM	Mittlere Abweichung vom Mittelwert
MCh	Methacholin
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
Millipore®-Wasser	Wasser, aufgereinigt mit der Wasseraufbereitungsanlage: Milli-Q®-reagent grade water system
min	Minute
MMD	medianer Massendurchmesser
m/V	Massenkonzentration

m/z	Verhältnis der molekularen Masse zur Ladung
OD	Optische Dichte
ODS	Octadecyl Silica
PD	Pharmakodynamik
PEEP	Positive End Expiratory Pressure
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandin H <sub>2</sub>
PK	Pharmakokinetik
pNpp	p-Nitrophenylphosphat
PP	Polypropylen
P <sub>Peak</sub>	maximaler Beatmungsdruck
PTFE	Polytetrafluorethylen
RT	Raumtemperatur
SB	Salbutamol (freie Base)
SB-S	Salbutamolsulfat
SD	Statische Dialyse
T <sub>insp</sub>	Zeit einer Inspirationsphase
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
Upm	Umdrehungen pro Minute
V/V	Volumenkonzentration



---

## G Literaturverzeichnis

---

1. *Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD*. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2010 [accessed 18.03.2011]; Available from: <http://www.goldcopd.org>.
2. Jemal A, Ward E, Hao Y, et al. *Trends in the leading causes of death in the United States, 1970-2002*. JAMA 2005; 294 (10): 1255-1259.
3. Murray CJ und Lopez AD. *Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study*. Lancet 1997; 349 (9064): 1498-1504.
4. Agusti AG. *Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease*. Proc Am Thorac Soc 2005; 2 (4): 367-370; discussion 371-362.
5. Fan VS, Ramsey SD, Giardino ND, et al. *Sex, depression, and risk of hospitalization and mortality in chronic obstructive pulmonary disease*. Arch Intern Med 2007; 167 (21): 2345-2353.
6. Ng TP, Niti M, Tan WC, et al. *Depressive symptoms and chronic obstructive pulmonary disease: effect on mortality, hospital readmission, symptom burden, functional status, and quality of life*. Arch Intern Med 2007; 167 (1): 60-67.
7. van Weel C und Schellevis FG. *Comorbidity and guidelines: conflicting interests*. Lancet 2006; 367 (9510): 550-551.
8. Jeffery PK. *Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. Proc Am Thorac Soc 2004; 1 (3): 176-183.
9. Chanez P, Vignola AM, O'Shaughnessy T, et al. *Corticosteroid reversibility in COPD is related to features of asthma*. Am J Respir Crit Care Med 1997; 155 (5): 1529-1534.
10. Lange P, Parner J, Vestbo J, et al. *A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma*. N Engl J Med 1998; 339 (17): 1194-1200.
11. Masoli M, Fabian D, Holt S, et al. *The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report*. Allergy 2004; 59 (5): 469-478.
12. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*. Global Initiative for Asthma (GINA) 2009 [accessed 20.03.2011]; Available from: [www.ginasthma.org](http://www.ginasthma.org).
13. Brewster CE, Howarth PH, Djukanovic R, et al. *Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma*. Am J Respir Cell Mol Biol 1990; 3 (5): 507-511.
14. Hirst SJ, Martin JG, Bonacci JV, et al. *Proliferative aspects of airway smooth muscle*. J Allergy Clin Immunol 2004; 114 (2 Suppl): S2-17.
15. Black JL. *Asthma--more muscle cells or more muscular cells?* Am J Respir Crit Care Med 2004; 169 (9): 980-981.
16. Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, et al. *Airway remodeling in asthma*. Chest 2003; 123 (3 Suppl): 417S-422S.

17. Wang L, McParland BE und Pare PD. *The functional consequences of structural changes in the airways: implications for airway hyperresponsiveness in asthma*. Chest 2003; 123 (3 Suppl): 356S-362S.
18. *Long-term effects of budesonide or nedocromil in children with asthma. The Childhood Asthma Management Program Research Group*. N Engl J Med 2000; 343 (15): 1054-1063.
19. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, et al. *Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary*. Eur Respir J 2008; 31 (1): 143-178.
20. Juniper EF, Kline PA, Vanzielegem MA, et al. *Effect of long-term treatment with an inhaled corticosteroid (budesonide) on airway hyperresponsiveness and clinical asthma in nonsteroid-dependent asthmatics*. Am Rev Respir Dis 1990; 142 (4): 832-836.
21. Suissa S, Ernst P, Benayoun S, et al. *Low-dose inhaled corticosteroids and the prevention of death from asthma*. N Engl J Med 2000; 343 (5): 332-336.
22. Anderson PJ. *History of aerosol therapy: liquid nebulization to MDIs to DPIs*. Respir Care 2005; 50 (9): 1139-1150.
23. Medknowlege. Exubera<sup>®</sup>, inhalatives Insulin bei Diabetes Mellitus [accessed 20.06.2011]; Available from: <http://www.medknowledge.de/neu/2004/I-2004-13-inhalatives-insulin.htm>.
24. Bailey CJ und Barnett AH. *Why is Exubera being withdrawn?* BMJ 2007; 335 (7630): 1156.
25. Kling J. *Inhaled insulin's last gasp?* Nat Biotechnol 2008; 26 (5): 479-480.
26. Fielding RM. *The use of inhaled liposome formulations for drug delivery to the lungs and systemic circulation*. Proc West Pharmacol Soc 1989; 32: 103-106.
27. Schreier H, Gonzalez-Rothi, R.J., Stecenko, A.A. *Pulmonary delivery of liposomes*. J Control Release 1993; 24: 209-223.
28. Ganderton D, Lewis D, Davies R, et al. *Modulite: a means of designing the aerosols generated by pressurized metered dose inhalers*. Respir Med 2002; 96 Suppl D: S3-8.
29. Lipworth BJ. *Pharmacokinetics of inhaled drugs*. Br J Clin Pharmacol 1996; 42 (6): 697-705.
30. Borchard G, Cassara ML, Roemele PE, et al. *Transport and local metabolism of budesonide and fluticasone propionate in a human bronchial epithelial cell line (Calu-3)*. J Pharm Sci 2002; 91 (6): 1561-1567.
31. Patton JS. *Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs*. Adv Drug Deliv Rev 1996; 19: 3-36.
32. Patton JS und Byron PR. *Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs*. Nat Rev Drug Discov 2007; 6 (1): 67-74.
33. Sporty JL, Horalkova L und Ehrhardt C. *In vitro cell culture models for the assessment of pulmonary drug disposition*. Expert Opin Drug Metab Toxicol 2008; 4 (4): 333-345.
34. Pacifici GM, Franchi M, Bencini C, et al. *Tissue distribution of drug-metabolizing enzymes in humans*. Xenobiotica 1988; 18 (7): 849-856.

35. Tronde A, Norden B, Marchner H, et al. *Pulmonary absorption rate and bioavailability of drugs in vivo in rats: structure-absorption relationships and physicochemical profiling of inhaled drugs*. J Pharm Sci 2003; 92 (6): 1216-1233.
36. Ji CM, Cardoso WV, Gebremichael A, et al. *Pulmonary cytochrome P-450 monooxygenase system and Clara cell differentiation in rats*. Am J Physiol 1995; 269 (3 Pt 1): L394-402.
37. Bur M, Henning A, Hein S, et al. *Inhalative nanomedicine--opportunities and challenges*. Inhal Toxicol 2009; 21 Suppl 1: 137-143.
38. Itoh H, Nishino M und Hatabu H. *Architecture of the lung: morphology and function*. J Thorac Imaging 2004; 19 (4): 221-227.
39. [www.lungenaerzte-im-netz.de](http://www.lungenaerzte-im-netz.de). Monks Ärzte-im-Netz GmbH. Unser Atemwegssystem / Aufbau [accessed 21.06.2011]; Available from: <http://www.lungenaerzte-im-netz.de/lin/lincontent/show.php3?w=%281%3D1%29%20&o=priority&og=&cur=2&nodeid=19>.
40. Weibel ER. *Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs*. Lab Invest 1963; 12: 131-155.
41. Weibel ER, *Design of airways and blood vessels considered as branching trees*, in *The Lung: Scientific Foundations*, Crystal RG and West JB, Editors. 1991, Raven Press Ltd.: New York. p. 711-720.
42. Staub NC. *Basic Respiratory Physiology*. 1991, Churchill Livingstone Inc., New York.
43. Forbes B, Asgharian B, Dailey LA, et al. *Challenges in inhaled product development and opportunities for open innovation*. Adv Drug Deliv Rev 2011; 63 (1-2): 69-87.
44. Mathia NR, Timoszyk J, Stetsko PI, et al. *Permeability characteristics of calu-3 human bronchial epithelial cells: in vitro-in vivo correlation to predict lung absorption in rats*. J Drug Target 2002; 10 (1): 31-40.
45. Florea BI, Cassara ML, Junginger HE, et al. *Drug transport and metabolism characteristics of the human airway epithelial cell line Calu-3*. J Control Release 2003; 87 (1-3): 131-138.
46. Steimer A, Haltner E und Lehr CM. *Cell culture models of the respiratory tract relevant to pulmonary drug delivery*. J Aerosol Med 2005; 18 (2): 137-182.
47. Sakagami M. *In vivo, in vitro and ex vivo models to assess pulmonary absorption and disposition of inhaled therapeutics for systemic delivery*. Adv Drug Deliv Rev 2006; 58 (9-10): 1030-1060.
48. Ehrhardt C, Kneuer C, Fiegel J, et al. *Influence of apical fluid volume on the development of functional intercellular junctions in the human epithelial cell line 16HBE14o-: implications for the use of this cell line as an in vitro model for bronchial drug absorption studies*. Cell Tissue Res 2002; 308 (3): 391-400.
49. Fernandes CA und Vanbever R. *Preclinical models for pulmonary drug delivery*. Expert Opin Drug Deliv 2009; 6 (11): 1231-1245.
50. Lombry C, Edwards DA, Preat V, et al. *Alveolar macrophages are a primary barrier to pulmonary absorption of macromolecules*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004; 286 (5): L1002-1008.

51. Blank F, Rothen-Rutishauser B und Gehr P. *Dendritic cells and macrophages form a transepithelial network against foreign particulate antigens*. Am J Respir Cell Mol Biol 2007; 36 (6): 669-677.
52. Freiwald M. *Therapeutisches Zielorgan Lunge: Pharmakokinetische Untersuchungen am humanen Lungenperfusionsmodell*. Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Institut für Pharmazie 2006.
53. Freiwald M, Valotis A, Kirschbaum A, et al. *Monitoring the initial pulmonary absorption of two different beclomethasone dipropionate aerosols employing a human lung reperfusion model*. Respir Res 2005; 6: 21.
54. Anderson MW, Orton TC, Pickett RD, et al. *Accumulation of amines in the isolated perfused rabbit lung*. J Pharmacol Exp Ther 1974; 189 (2): 456-466.
55. Ryrfeldt A und Nilsson E. *Uptake and biotransformation of ibutero and terbutaline in isolated perfused rat and guinea pig lungs*. Biochem Pharmacol 1978; 27 (3): 301-305.
56. Linder A, Friedel G, Fritz P, et al. *The ex-vivo isolated, perfused human lung model: description and potential applications*. Thorac Cardiovasc Surg 1996; 44 (3): 140-146.
57. Gnadt M. *Pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization of inhaled  $\beta_2$  - agonists using the isolated human lung perfusion model*. Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Institut für Pharmazie 2011.
58. Fisher AB, Dodia C und Linask J. *Perfusate composition and edema formation in isolated rat lungs*. Exp Lung Res 1980; 1 (1): 13-21.
59. Cypel M, Yeung JC, Liu M, et al. *Normothermic ex vivo lung perfusion in clinical lung transplantation*. N Engl J Med 2011; 364 (15): 1431-1440.
60. Brown RA, Jr. und Schanker LS. *Absorption of aerosolized drugs from the rat lung*. Drug Metab Dispos 1983; 11 (4): 355-360.
61. Burton JA und Schanker LS. *Absorption of corticosteroids from the rat lung*. Steroids 1974; 23 (5): 617-624.
62. Enna SJ und Schanker LS. *Absorption of drugs from the rat lung*. Am J Physiol 1972; 223 (5): 1227-1231.
63. Hemberger JA und Schanker LS. *Pulmonary absorption of drugs in the neonatal and adult guinea pig*. Drug Metab Dispos 1983; 11 (6): 615-616.
64. Schanker LS, Mitchell EW und Brown RA, Jr. *Pulmonary absorption of drugs in the dog: comparison with other species*. Pharmacology 1986; 32 (3): 176-180.
65. Colthorpe P, Farr SJ, Taylor G, et al. *The pharmacokinetics of pulmonary-delivered insulin: a comparison of intratracheal and aerosol administration to the rabbit*. Pharm Res 1992; 9 (6): 764-768.
66. Phalen RF, Oldham MJ und Wolff RK. *The relevance of animal models for aerosol studies*. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv 2008; 21 (1): 113-124.
67. Warheit DB. *Interspecies comparisons of lung responses to inhaled particles and gases*. Crit Rev Toxicol 1989; 20 (1): 1-29.



- 
68. Hofmann W und Asgharian B. *Comparison of Mucociliary Clearance Velocities in Human and Rat Lungs for Extrapolation Modeling*. Ann Occup Hyg 2002; 46 (1): 323-325.
  69. Wolff RK und Dorato MA. *Toxicologic testing of inhaled pharmaceutical aerosols*. Crit Rev Toxicol 1993; 23 (4): 343-369.
  70. Heyder J. *Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract and consequences for regional targeting in respiratory drug delivery*. Proc Am Thorac Soc 2004; 1 (4): 315-320.
  71. Harkema JR, Carey SA und Wagner JG. *The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium*. Toxicol Pathol 2006; 34 (3): 252-269.
  72. Patrick G und Stirling C. *Measurement of mucociliary clearance from the trachea of conscious and anesthetized rats*. J Appl Physiol 1977; 42 (3): 451-455.
  73. Wollmer P, Schairer W, Bos JA, et al. *Pulmonary clearance of 99mTc-DTPA during halothane anaesthesia*. Acta Anaesthesiol Scand 1990; 34 (7): 572-575.
  74. ChangLai SP, Hung WT und Liao KK. *Detecting alveolar epithelial injury following volatile anesthetics by (99m)Tc DTPA radioaerosol inhalation lung scan*. Respiration 1999; 66 (6): 506-510.
  75. Evander E, Wollmer P, Jonson B, et al. *Pulmonary clearance of inhaled 99mTc-DTPA: effects of surfactant depletion by lung lavage*. J Appl Physiol 1987; 62 (4): 1611-1614.
  76. Borgstrom L und Nilsson M. *A method for determination of the absolute pulmonary bioavailability of inhaled drugs: terbutaline*. Pharm Res 1990; 7 (10): 1068-1070.
  77. Derendorf H, Daley-Yates PT, Pierre LN, et al. *Systemic bioavailability of inhaled steroids: the importance of appropriate and comparable methodology*. Eur Respir J 2001; 17 (1): 157-158.
  78. Derendorf H, Hochhaus G und Mollmann H. *Evaluation of pulmonary absorption using pharmacokinetic methods*. J Aerosol Med 2001; 14 Suppl 1: S9-17.
  79. Esmailpour N, Hogger P, Rabe KF, et al. *Distribution of inhaled fluticasone propionate between human lung tissue and serum in vivo*. Eur Respir J 1997; 10 (7): 1496-1499.
  80. Corcoran TE. *Inhaled delivery of aerosolized cyclosporine*. Adv Drug Deliv Rev 2006; 58 (9-10): 1119-1127.
  81. Christie JD, Edwards LB, Aurora P, et al. *Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fifth official adult lung and heart/lung transplantation report--2008*. J Heart Lung Transplant 2008; 27 (9): 957-969.
  82. Hertz MI, Aurora P, Christie JD, et al. *Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: a quarter century of thoracic transplantation*. J Heart Lung Transplant 2008; 27 (9): 937-942.
  83. Bando K, Paradis IL, Similo S, et al. *Obliterative bronchiolitis after lung and heart-lung transplantation. An analysis of risk factors and management*. J Thorac Cardiovasc Surg 1995; 110 (1): 4-13; discussion 13-14.

84. Iacono AT, Corcoran TE, Griffith BP, et al. *Aerosol cyclosporin therapy in lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans*. Eur Respir J 2004; 23 (3): 384-390.
85. Sharples LD, Tamm M, McNeil K, et al. *Development of bronchiolitis obliterans syndrome in recipients of heart-lung transplantation--early risk factors*. Transplantation 1996; 61 (4): 560-566.
86. Valentine VG, Robbins RC, Berry GJ, et al. *Actuarial survival of heart-lung and bilateral sequential lung transplant recipients with obliterative bronchiolitis*. J Heart Lung Transplant 1996; 15 (4): 371-383.
87. Iacono AT, Smaldone GC, Keenan RJ, et al. *Dose-related reversal of acute lung rejection by aerosolized cyclosporine*. Am J Respir Crit Care Med 1997; 155 (5): 1690-1698.
88. Keenan RJ, Zeevi A, Iacono AT, et al. *Efficacy of inhaled cyclosporine in lung transplant recipients with refractory rejection: correlation of intragraft cytokine gene expression with pulmonary function and histologic characteristics*. Surgery 1995; 118 (2): 385-391.
89. Iacono AT, Johnson BA, Grgurich WF, et al. *A randomized trial of inhaled cyclosporine in lung-transplant recipients*. N Engl J Med 2006; 354 (2): 141-150.
90. Moffatt SD, Demers P, Robbins RC, et al. *Lung transplantation: a decade of experience*. J Heart Lung Transplant 2005; 24 (2): 145-151.
91. Burkart GJ, Smaldone GC, Eldon MA, et al. *Lung deposition and pharmacokinetics of cyclosporine after aerosolization in lung transplant patients*. Pharm Res 2003; 20 (2): 252-256.
92. Corcoran TE, Smaldone GC, Dauber JH, et al. *Preservation of post-transplant lung function with aerosol cyclosporin*. Eur Respir J 2004; 23 (3): 378-383.
93. Keenan RJ, Iacono A, Dauber JH, et al. *Treatment of refractory acute allograft rejection with aerosolized cyclosporine in lung transplant recipients*. J Thorac Cardiovasc Surg 1997; 113 (2): 335-340; discussion 340-331.
94. Onoue S, Sato H, Kawabata Y, et al. *In vitro and in vivo characterization on amorphous solid dispersion of cyclosporine A for inhalation therapy*. J Control Release 2009.
95. Zijlstra GS, Rijkeboer M, Jan van Drooge D, et al. *Characterization of a cyclosporine solid dispersion for inhalation*. AAPS J 2007; 9 (2): E190-199.
96. Fukaya H, Iimura A, Hoshiko K, et al. *A cyclosporin A/maltosyl-alpha-cyclodextrin complex for inhalation therapy of asthma*. Eur Respir J 2003; 22 (2): 213-219.
97. Wood AJ und Lemaire M. *Pharmacologic aspects of cyclosporine therapy: pharmacokinetics*. Transplant Proc 1985; 17 (4 Suppl 1): 27-32.
98. Behr J, Baumgartner R, Zimmermann G.S., Keller M., Menges G., Brand P., Haeussermann S., Herpich C., Sommerer K., Seitz J., *Lung deposition of a liposomal cyclosporin-A aerosol in lung transplant patients*, in *International Conference of the American Thoracic Society (ATS)*. 2007: San Francisco, USA.
99. Behr J, Zimmermann G, Baumgartner R, et al. *Lung Deposition of a Liposomal Cyclosporine A Inhalation Solution in Patients after Lung Transplantation*. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv 2009; 22 (2): 121-130.

- 
100. Keller M und Akkar A. *Pharmaceutical Compositions Comprising Cyclosporin*. World Intellectual Property Organization (WIPO) 14.06.2007; WO/2007/065588.
  101. Mutschler E, *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. achte ed. Vol. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart. 2001, Stuttgart.
  102. Winter ME. *Basic Clinical Pharmacokinetics*. Third ed. 1994, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
  103. Murphy JE. *Clinical Pharmacokinetics Pocket Reference*. second ed. 2001, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda.
  104. Kahan BD, Welsh M, Schoenberg L, et al. *Variable oral absorption of cyclosporine. A biopharmaceutical risk factor for chronic renal allograft rejection*. *Transplantation* 1996; 62 (5): 599-606.
  105. Lindholm A und Kahan BD. *Influence of cyclosporine pharmacokinetics, trough concentrations, and AUC monitoring on outcome after kidney transplantation*. *Clin Pharmacol Ther* 1993; 54 (2): 205-218.
  106. O'Riordan TG, Iacono A, Keenan RJ, et al. *Delivery and distribution of aerosolized cyclosporine in lung allograft recipients*. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151 (2 Pt 1): 516-521.
  107. Knoop C, Vervier I, Thiry P, et al. *Cyclosporine pharmacokinetics and dose monitoring after lung transplantation: comparison between cystic fibrosis and other conditions*. *Transplantation* 2003; 76 (4): 683-688.
  108. Tayab ZR und Hochhaus G. *Pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of inhalation drugs: application to targeted pulmonary delivery systems*. *Expert Opin Drug Deliv* 2005; 2 (3): 519-532.
  109. [www.helmholtz-muenchen.de](http://www.helmholtz-muenchen.de). *Helmholtz Zentrum München*. [accessed 05.01.2011]; Available from: [http://www.helmholtz-muenchen.de/uploads/pics/intdos\\_strukto\\_d.jpg](http://www.helmholtz-muenchen.de/uploads/pics/intdos_strukto_d.jpg).
  110. Woodcock A, Acerbi D und Poli G. *Modulite technology: pharmacodynamic and pharmacokinetic implications*. *Respir Med* 2002; 96 Suppl D: S9-15.
  111. Lemaire M und Tillement JP. *Role of lipoproteins and erythrocytes in the in vitro binding and distribution of cyclosporin A in the blood*. *J Pharm Pharmacol* 1982; 34 (11): 715-718.
  112. Niederberger W, Lemaire, M., Maurer, G., Nussbaumer, K., Wagner, O. *Distribution and binding of cyclosporine in blood and tissues*. *Transplant Proc* 1983; 15: 2419-2421.
  113. Oellerich M, Armstrong VW, Kahan B, et al. *Lake Louise Consensus Conference on cyclosporin monitoring in organ transplantation: report of the consensus panel*. *Ther Drug Monit* 1995; 17 (6): 642-654.
  114. Fahr A, van Hoogevest P, May S, et al. *Transfer of lipophilic drugs between liposomal membranes and biological interfaces: consequences for drug delivery*. *Eur J Pharm Sci* 2005; 26 (3-4): 251-265.
  115. O'Leary TJ, Ross PD, Lieber MR, et al. *Effects of cyclosporine A on biomembranes. Vibrational spectroscopic, calorimetric and hemolysis studies*. *Biophys J* 1986; 49 (4): 795-801.
-

116. Rohatagi S, Calic F, Harding N, et al. *Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of inhaled cyclosporin A (ADI628) after single and repeated administration in healthy male and female subjects and asthmatic patients*. J Clin Pharmacol 2000; 40 (11): 1211-1226.
117. Keller M, Bitterle, E., Tservistas, M., Steinführer, K., Akkar, A., Mueller, J., Bock, U., Haltner, E., *Cyclosporine A: Investigation on formulation dependent toxicity in a Calu-3 cell culture model and characterization of aerosols generated by the eFlow electronic nebulizer*, in Davis-Horwood International, Byron PR, Editor. 2006, Respiratory Drug Delivery X: Raleigh, NC. p. 729-732.
118. Trammer B, Amann A, Haltner-Ukomadu E, et al. *Comparative permeability and diffusion kinetics of cyclosporine A liposomes and propylene glycol solution from human lung tissue into human blood ex vivo*. Eur J Pharm Biopharm 2008; 70 (3): 758-764.
119. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, et al. *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary*. Am J Respir Crit Care Med 2007; 176 (6): 532-555.
120. Hochhaus G, Mollmann H, Derendorf H, et al. *Pharmacokinetic/pharmacodynamic aspects of aerosol therapy using glucocorticoids as a model*. J Clin Pharmacol 1997; 37 (10): 881-892.
121. Hogger P. *Dose response and therapeutic index of inhaled corticosteroids in asthma*. Curr Opin Pulm Med 2003; 9 (1): 1-8.
122. Kelly HW und Nelson HS. *Potential adverse effects of the inhaled corticosteroids*. J Allergy Clin Immunol 2003; 112 (3): 469-478; quiz 479.
123. Falcoz C, Oliver R, McDowall JE, et al. *Bioavailability of orally administered micronised fluticasone propionate*. Clin Pharmacokinet 2000; 39 Suppl 1: 9-15.
124. Pearce RE, Leeder JS und Kearns GL. *Biotransformation of fluticasone: in vitro characterization*. Drug Metab Dispos 2006; 34 (6): 1035-1040.
125. Singh SD, Whale C, Houghton N, et al. *Pharmacokinetics and systemic effects of inhaled fluticasone propionate in chronic obstructive pulmonary disease*. Br J Clin Pharmacol 2003; 55 (4): 375-381.
126. Derendorf H, Hochhaus G, Meibohm B, et al. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids*. J Allergy Clin Immunol 1998; 101 (4 Pt 2): S440-446.
127. Nair A, Menzies D, Hopkinson P, et al. *In vivo comparison of the relative systemic bioavailability of fluticasone propionate from three anti-static spacers and a metered dose inhaler*. Br J Clin Pharmacol 2009; 67 (2): 191-198.
128. Silkstone VL, Corlett SA und Chrystyn H. *Determination of the relative bioavailability of salbutamol to the lungs and systemic circulation following nebulization*. Br J Clin Pharmacol 2002; 54 (2): 115-119.
129. EMA. *Guideline on the requirements for clinical documentation for orally inhaled products (OIP) including the requirements for demonstration of therapeutic equivalence between two inhaled products for use in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD)*. 2008.
130. Daley-Yates PT, Price AC, Sisson JR, 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.

- 
131. Thorsson L, Edsbacker S und Conradson TB. *Lung deposition of budesonide from Turbuhaler is twice that from a pressurized metered-dose inhaler P-MDI*. Eur Respir J 1994; 7 (10): 1839-1844.
  132. van der Bijl P und van Eyk AD. *Permeability of human intestinal mucosa using a continuous flow-through perfusion system*. Int J Pharm 2002; 235 (1-2): 71-78.
  133. van Zyl JM, Derendinger B, Seifart HI, et al. *Comparative diffusion of drugs through bronchial tissue*. Int J Pharm 2008; 357 (1-2): 32-36.
  134. Lange T. *Neue Ansätze der Wirkstoffcharakterisierung mittels Durchflusszellen, In-vitro Wirkstofffreisetzungen und Wirkstoffpermeation*. 2009.
  135. Hubner M, Hochhaus G und Derendorf H. *Comparative pharmacology, bioavailability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of inhaled glucocorticosteroids*. Immunol Allergy Clin North Am 2005; 25 (3): 469-488.
  136. Mollmann H, Wagner M, Krishnaswami S, et al. *Single-dose and steady-state pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of therapeutically clinically equivalent doses of inhaled fluticasone propionate and budesonide, given as Diskus or Turbuhaler dry-powder inhalers to healthy subjects*. J Clin Pharmacol 2001; 41 (12): 1329-1338.
  137. Hamilton KO, Topp E, Makagiansar I, et al. *Multidrug resistance-associated protein-1 functional activity in Calu-3 cells*. J Pharmacol Exp Ther 2001; 298 (3): 1199-1205.
  138. Meaney C, Florea, BI., Borchard, G., Junginger, HE. *Characterization of a human submucosal gland cell line (Calu-3) as an in vitro model of the airway epithelium*. Proc Int Symp Control Rel Bioact Mater 1999; 26: 198-199.
  139. Grass GM und Sweetana SA. *In vitro measurement of gastrointestinal tissue permeability using a new diffusion cell*. Pharm Res 1988; 5 (6): 372-376.
  140. Squier CA, Kremer M und Wertz PW. *Continuous flow mucosal cells for measuring the in-vitro permeability of small tissue samples*. J Pharm Sci 1997; 86 (1): 82-84.
  141. van der Bijl P, Penkler L und van Eyk AD. *Permeation of sumatriptan through human vaginal and buccal mucosa*. Headache 2000; 40 (2): 137-141.
  142. van der Bijl P, van Eyk AD und Meyer D. *Effects of three penetration enhancers on transcorneal permeation of cyclosporine*. Cornea 2001; 20 (5): 505-508.
  143. van der Bijl P, van Eyk AD und Thompson IO. *Permeation of 17beta-estradiol through human vaginal and buccal mucosa*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1998; 85 (4): 393-398.
  144. van der Bijl P, van Eyk AD, Thompson IO, et al. *Diffusion rates of vasopressin through human vaginal and buccal mucosa*. Eur J Oral Sci 1998; 106 (5): 958-962.
  145. Mortimer KJ, Harrison TW, Tang Y, et al. *Plasma concentrations of inhaled corticosteroids in relation to airflow obstruction in asthma*. Br J Clin Pharmacol 2006; 62 (4): 412-419.
  146. Brutsche MH, Brutsche IC, Munawar M, et al. *Comparison of pharmacokinetics and systemic effects of inhaled fluticasone propionate in patients with asthma and healthy volunteers: a randomised crossover study*. Lancet 2000; 356 (9229): 556-561.
-

147. Mortimer KJ, Tattersfield AE, Tang Y, et al. *Plasma concentrations of fluticasone propionate and budesonide following inhalation: effect of induced bronchoconstriction*. Br J Clin Pharmacol 2007; 64 (4): 439-444.
148. Saari SM, Vidgren MT, Koskinen MO, et al. *Regional lung deposition and clearance of 99mTc-labeled beclomethasone-DLPC liposomes in mild and severe asthma*. Chest 1998; 113 (6): 1573-1579.
149. Johnson M. *Pharmacodynamics and pharmacokinetics of inhaled glucocorticoids*. J Allergy Clin Immunol 1996; 97 (1 Pt 2): 169-176.
150. Weich DJ, Viljoen H, Sweetlove MA, et al. *Investigation into the effect of Fenoterol on mucociliary clearance in patients with chronic bronchitis*. Eur J Nucl Med 1988; 14 (11): 533-537.
151. *PubChemCompound NCBI*. Fenoterol Compound Summary [accessed 31.07.2011]; Available from: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3343>.
152. *PubChemCompound NCBI*. Ipratropium bromide Compound Summary [accessed 31.07.2011]; Available from: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=657308>.
153. Barnes PJ, Basbaum CB, Nadel JA, et al. *Localization of beta-adrenoreceptors in mammalian lung by light microscopic autoradiography*. Nature 1982; 299 (5882): 444-447.
154. Johnson M. *Beta2-adrenoceptors: mechanisms of action of beta2-agonists*. Paediatr Respir Rev 2001; 2 (1): 57-62.
155. Robison GA, Butcher RW und Sutherland EW. *Adenyl cyclase as an adrenergic receptor*. Ann N Y Acad Sci 1967; 139 (3): 703-723.
156. Howarth PH, Durham SR, Lee TH, et al. *Influence of albuterol, cromolyn sodium and ipratropium bromide on the airway and circulating mediator responses to allergen bronchial provocation in asthma*. Am Rev Respir Dis 1985; 132 (5): 986-992.
157. O'Connor BJ, Aikman SL und Barnes PJ. *Tolerance to the nonbronchodilator effects of inhaled beta 2-agonists in asthma*. N Engl J Med 1992; 327 (17): 1204-1208.
158. Restrepo RD. *Use of inhaled anticholinergic agents in obstructive airway disease*. Respir Care 2007; 52 (7): 833-851.
159. Witek TJ, Jr. *The fate of inhaled drugs: the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs administered by aerosol*. Respir Care 2000; 45 (7): 826-830.
160. Chapman KR, *History of anticholinergic treatment in airways disease*. Anticholinergic therapy in obstructive airways disease, ed. Gross NJ. 1993, London: Franklin Scientific Publications Ltd. 9-17.
161. Disse B, Reichl R, Speck G, et al. *Ba 679 BR, a novel long-acting anticholinergic bronchodilator*. Life Sci 1993; 52 (5-6): 537-544.
162. Scullion JE. *The development of anticholinergics in the management of COPD*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 2007; 2 (1): 33-40.
163. de Jongste JC, Jongejan RC und Kerrebijn KF. *Control of airway caliber by autonomic nerves in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease*. Am Rev Respir Dis 1991; 143 (6): 1421-1426.

- 
164. Joos GF. *Potential usefulness of inhibiting neural mechanisms in asthma*. Monaldi Arch Chest Dis 2000; 55 (5): 411-414.
165. Flynn RA, Glynn DA und Kennedy MP. *Anticholinergic treatment in airways diseases*. Adv Ther 2009; 26 (10): 908-919.
166. van der Velden VH und Hulsmann AR. *Autonomic innervation of human airways: structure, function, and pathophysiology in asthma*. Neuroimmunomodulation 1999; 6 (3): 145-159.
167. Barnes PJ. *Distribution of receptor targets in the lung*. Proc Am Thorac Soc 2004; 1 (4): 345-351.
168. Littner MR, Ilowite JS, Tashkin DP, et al. *Long-acting bronchodilation with once-daily dosing of tiotropium (Spiriva) in stable chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161 (4 Pt 1): 1136-1142.
169. Gross NJ. *Tiotropium bromide*. Chest 2004; 126 (6): 1946-1953.
170. Roffel AF, Elzinga CR und Zaagsma J. *Muscarinic M3 receptors mediate contraction of human central and peripheral airway smooth muscle*. Pulm Pharmacol 1990; 3 (1): 47-51.
171. Disse B, Speck GA, Rominger KL, et al. *Tiotropium (Spiriva): mechanistical considerations and clinical profile in obstructive lung disease*. Life Sci 1999; 64 (6-7): 457-464.
172. Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, et al. *Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD*. Respir Res 2006; 7: 73.
173. Gross NJ und Skorodin MS. *Role of the parasympathetic system in airway obstruction due to emphysema*. N Engl J Med 1984; 311 (7): 421-425.
174. Gosens R, Schaafsma D, Nelemans SA, et al. *Rho-kinase as a drug target for the treatment of airway hyperresponsiveness in asthma*. Mini Rev Med Chem 2006; 6 (3): 339-348.
175. Hirshman CA, Lande B und Croxton TL. *Role of M2 muscarinic receptors in airway smooth muscle contraction*. Life Sci 1999; 64 (6-7): 443-448.
176. Beakes DE. *The use of anticholinergics in asthma*. J Asthma 1997; 34 (5): 357-368.
177. Mak JC und Barnes PJ. *Autoradiographic visualization of muscarinic receptor subtypes in human and guinea pig lung*. Am Rev Respir Dis 1990; 141 (6): 1559-1568.
178. Donohue JF. *Combination therapy for chronic obstructive pulmonary disease: clinical aspects*. Proc Am Thorac Soc 2005; 2 (4): 272-281; discussion 290-271.
179. O'Driscoll BR, Taylor RJ, Horsley MG, et al. *Nebulised salbutamol with and without ipratropium bromide in acute airflow obstruction*. Lancet 1989; 1 (8652): 1418-1420.
180. Okapo SO, Gupta J, Martinez E, et al. *In vitro deposition properties of nebulized formoterol fumarate: effect of nebulization time, airflow, volume of fill and nebulizer type*. Curr Med Res Opin 2009; 25 (4): 807-816.
181. Knox C, Law V, Jewison T, et al. *DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs*. Nucleic Acids Res 2011; 39 (Database issue): D1035-1041.
-

182. Smyth HD. *Propellant-driven metered-dose inhalers for pulmonary drug delivery*. Expert Opin Drug Deliv 2005; 2 (1): 53-74.
183. Voshaar T. *[Role of particulate matter and small airways in treatment of asthma with inhalative fixcombinations]*. Dtsch Med Wochenschr 2009; 134 Suppl 10: S390-393.
184. Hochhaus G, Schmidt EW, Rominger KL, et al. *Pharmacokinetic/dynamic correlation of pulmonary and cardiac effects of fenoterol in asthmatic patients after different routes of administration*. Pharm Res 1992; 9 (3): 291-297.
185. Ensing K, de Zeeuw RA, Nossent GD, et al. *Pharmacokinetics of ipratropium bromide after single dose inhalation and oral and intravenous administration*. Eur J Clin Pharmacol 1989; 36 (2): 189-194.
186. Law FC, Eling TE, Bend JR, et al. *Metabolism of xenobiotics by the isolated perfused lung. Comparison with in vitro incubations*. Drug Metab Dispos 1974; 2 (5): 433-442.
187. Mehendale HM, Angevine LS und Ohmiya Y. *The isolated perfused lung--a critical evaluation*. Toxicology 1981; 21 (1): 1-36.
188. Niemeier RW. *The isolated perfused lung*. Environ Health Perspect 1984; 56: 35-41.
189. Byron PR und Niven RW. *A novel dosing method for drug administration to the airways of the isolated perfused rat lung*. J Pharm Sci 1988; 77 (8): 693-695.
190. Byron PR, Roberts NS und Clark AR. *An isolated perfused rat lung preparation for the study of aerosolized drug deposition and absorption*. J Pharm Sci 1986; 75 (2): 168-171.
191. Morgan DD, Warshawsky D, Niemeier RW, et al. *The pharmacokinetics of benzo[alpha]pyrene in the isolated perfused rabbit lung: the influence of benzo[alpha]pyrene, n-dodecane, particulate, or sulfur dioxide*. Toxicology 1984; 33 (3-4): 275-289.
192. Niven RW und Byron PR. *Solute absorption from the airways of the isolated rat lung. I. The use of absorption data to quantify drug dissolution or release in the respiratory tract*. Pharm Res 1988; 5 (9): 574-579.
193. Hulsmann AR und de Jongste JC. *Studies of human airways in vitro: a review of the methodology*. J Pharmacol Toxicol Methods 1993; 30 (3): 117-132.
194. Cazzola M, Matera MG und Lotvall J. *Ultra long-acting beta 2-agonists in development for asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. Expert Opin Investig Drugs 2005; 14 (7): 775-783.
195. Schwartz J, Schindler C, Zemp E, et al. *Predictors of methacholine responsiveness in a general population*. Chest 2002; 122 (3): 812-820.
196. Jansen DF, Timens W, Kraan J, et al. *(A)symptomatic bronchial hyper-responsiveness and asthma*. Respir Med 1997; 91 (3): 121-134.
197. Paoletti P, Carrozzi L, Viegi G, et al. *Distribution of bronchial responsiveness in a general population: effect of sex, age, smoking, and level of pulmonary function*. Am J Respir Crit Care Med 1995; 151 (6): 1770-1777.
198. Dalby C, Polanowski T, Larsson T, et al. *The bioavailability and airway clearance of the steroid component of budesonide/formoterol and salmeterol/fluticasone after inhaled administration in*



- patients with COPD and healthy subjects: a randomized controlled trial.* Respir Res 2009; 10: 104.
199. Horvath G, Schmid N, Fragoso MA, et al. *Epithelial organic cation transporters ensure pH-dependent drug absorption in the airway.* Am J Respir Cell Mol Biol 2007; 36 (1): 53-60.
200. Nakamura T, Nakanishi T, Haruta T, et al. *Transport of ipratropium, an anti-chronic obstructive pulmonary disease drug, is mediated by organic cation/carnitine transporters in human bronchial epithelial cells: implications for carrier-mediated pulmonary absorption.* Mol Pharm 2010; 7 (1): 187-195.
201. Ehrhardt C, Kneuer C, Bies C, et al. *Salbutamol is actively absorbed across human bronchial epithelial cell layers.* Pulm Pharmacol Ther 2005; 18 (3): 165-170.
202. Koepsell H, Lips K und Volk C. *Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications.* Pharm Res 2007; 24 (7): 1227-1251.
203. Lips KS, Volk C, Schmitt BM, et al. *Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium.* Am J Respir Cell Mol Biol 2005; 33 (1): 79-88.
204. Lips KS, Luhrmann A, Tschernig T, et al. *Down-regulation of the non-neuronal acetylcholine synthesis and release machinery in acute allergic airway inflammation of rat and mouse.* Life Sci 2007; 80 (24-25): 2263-2269.
205. Bosquillon C. *Drug transporters in the lung--do they play a role in the biopharmaceutics of inhaled drugs?* J Pharm Sci 2010; 99 (5): 2240-2255.
206. Tamai I, Ohashi R, Nezu J, et al. *Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2.* J Biol Chem 1998; 273 (32): 20378-20382.
207. Keogh JP, Nakanishi T, Tamai I, et al. *Cation Transporters in the Lung: Significance and Implications for Long Acting Cholinergic Drugs.* Respiratory Drug Delivery 2010; 1: 91-100.
208. Filippo CA, Ardon O und Longo N. *Glycosylation of the OCTN2 carnitine transporter: study of natural mutations identified in patients with primary carnitine deficiency.* Biochim Biophys Acta 2011; 1812 (3): 312-320.
209. Ohashi R, Tamai I, Nezu Ji J, et al. *Molecular and physiological evidence for multifunctionality of carnitine/organic cation transporter OCTN2.* Mol Pharmacol 2001; 59 (2): 358-366.
210. Wagner CA, Lukewille U, Kaltenbach S, et al. *Functional and pharmacological characterization of human Na(+)-carnitine cotransporter hOCTN2.* Am J Physiol Renal Physiol 2000; 279 (3): F584-591.
211. Amat di San Filippo C, Pasquali M und Longo N. *Pharmacological rescue of carnitine transport in primary carnitine deficiency.* Hum Mutat 2006; 27 (6): 513-523.
212. Stanley CA, DeLeeuw S, Coates PM, et al. *Chronic cardiomyopathy and weakness or acute coma in children with a defect in carnitine uptake.* Ann Neurol 1991; 30 (5): 709-716.
213. Ohashi R, Tamai I, Inano A, et al. *Studies on functional sites of organic cation/carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5) using a Ser467Cys mutant protein.* J Pharmacol Exp Ther 2002; 302 (3): 1286-1294.

214. Forbes II. *Human airway epithelial cell lines for in vitro drug transport and metabolism studies*. Pharm Sci Technolo Today 2000; 3 (1): 18-27.
215. Diao L, Ekins S und Polli JE. *Quantitative structure activity relationship for inhibition of human organic cation/carnitine transporter*. Mol Pharm 2010; 7 (6): 2120-2131.
216. *PubChemCompound NCBI*. Methacholine Chloride Compound Summary [accessed 22.04.2011]; Available from: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=1993>.
217. *PubChemCompound NCBI*. Carnitine Compound Summary [accessed 22.04.2011]; Available from: [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=10917&loc=ec\\_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=10917&loc=ec_rcs).
218. *PubChemCompound NCBI*. Albuterol Compound Summary [accessed 22.04.2011]; Available from: [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=2083&loc=ec\\_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=2083&loc=ec_rcs).
219. Ohashi R, Tamai I, Yabuuchi H, et al. *Na(+)-dependent carnitine transport by organic cation transporter (OCTN2): its pharmacological and toxicological relevance*. J Pharmacol Exp Ther 1999; 291 (2): 778-784.
220. Chrystyn H. *Anatomy and physiology in delivery: can we define our targets?* Allergy 1999; 54 Suppl 49: 82-87.
221. Usmani OS, Biddiscombe MF und Barnes PJ. *Regional lung deposition and bronchodilator response as a function of beta2-agonist particle size*. Am J Respir Crit Care Med 2005; 172 (12): 1497-1504.
222. Chinn S, Burney P, Jarvis D, et al. *Variation in bronchial responsiveness in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS)*. Eur Respir J 1997; 10 (11): 2495-2501.
223. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, et al. *Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999*. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161 (1): 309-329.
224. Congleton J und Muers MF. *The incidence of airflow obstruction in bronchial carcinoma, its relation to breathlessness, and response to bronchodilator therapy*. Respir Med 1995; 89 (4): 291-296.
225. Loganathan RS, Stover DE, Shi W, et al. *Prevalence of COPD in women compared to men around the time of diagnosis of primary lung cancer*. Chest 2006; 129 (5): 1305-1312.
226. Loza MJ und Penn RB. *Regulation of T cells in airway disease by beta-agonist*. Front Biosci (Schol Ed) 2010; 2: 969-979.
227. Mulligan JK, Rosenzweig SA und Young MR. *Tumor secretion of VEGF induces endothelial cells to suppress T cell functions through the production of PGE2*. J Immunother 2010; 33 (2): 126-135.
228. Mulligan JK und Young MR. *Tumors induce the formation of suppressor endothelial cells in vivo*. Cancer Immunol Immunother 2010; 59 (2): 267-277.
229. Huang M, Stolina M, Sharma S, et al. *Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production*. Cancer Res 1998; 58 (6): 1208-1216.

- 
230. Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, et al. *Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma*. *Cancer Res* 1998; 58 (22): 4997-5001.
231. Hughes D, Otani T, Yang P, et al. *NAD<sup>+</sup>-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase regulates levels of bioactive lipids in non-small cell lung cancer*. *Cancer Prev Res (Phila)* 2008; 1 (4): 241-249.
232. Hazra S, Batra RK, Tai HH, et al. *Pioglitazone and rosiglitazone decrease prostaglandin E2 in non-small-cell lung cancer cells by up-regulating 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase*. *Mol Pharmacol* 2007; 71 (6): 1715-1720.
233. Keith RL, Geraci MW, Nana-Sinkam SP, et al. *Prostaglandin E2 receptor subtype 2 (EP2) null mice are protected against murine lung tumorigenesis*. *Anticancer Res* 2006; 26 (4B): 2857-2861.
234. Zheng Y, Ritzenthaler JD, Sun X, et al. *Prostaglandin E2 stimulates human lung carcinoma cell growth through induction of integrin-linked kinase: the involvement of EP4 and Sp1*. *Cancer Res* 2009; 69 (3): 896-904.
235. Kim JI, Lakshmikanthan V, Frilot N, et al. *Prostaglandin E2 promotes lung cancer cell migration via EP4-betaArrestin1-c-Src signalsome*. *Mol Cancer Res* 2010; 8 (4): 569-577.
236. Buvanendran A, Kroin JS, Berger RA, et al. *Upregulation of prostaglandin E2 and interleukins in the central nervous system and peripheral tissue during and after surgery in humans*. *Anesthesiology* 2006; 104 (3): 403-410.
237. Ramalingam S und Belani CP. *Cyclooxygenase-2 inhibitors in lung cancer*. *Clin Lung Cancer* 2004; 5 (4): 245-253.
238. Simmons DL, Botting RM und Hla T. *Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition*. *Pharmacol Rev* 2004; 56 (3): 387-437.
239. Betz M und Fox BS. *Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines*. *J Immunol* 1991; 146 (1): 108-113.
240. Kunkel SL, Chensue SW und Phan SH. *Prostaglandins as endogenous mediators of interleukin 1 production*. *J Immunol* 1986; 136 (1): 186-192.
241. Kunkel SL, Spengler M, May MA, et al. *Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression*. *J Biol Chem* 1988; 263 (11): 5380-5384.
242. Johansson C und Kollberg B. *Stimulation by intragastrically administered E2 prostaglandins of human gastric mucus output*. *Eur J Clin Invest* 1979; 9 (3): 229-232.
243. Konturek SJ, Robert A, Hanchar AJ, et al. *Comparison of prostacyclin and prostaglandin E2 on gastric secretion, gastrin release, and mucosal blood flow in dogs*. *Dig Dis Sci* 1980; 25 (9): 673-679.
244. Chung KF. *Evaluation of selective prostaglandin E2 (PGE2) receptor agonists as therapeutic agents for the treatment of asthma*. *Sci STKE* 2005; 2005 (303): pe47.
245. Hartney JM, Coggins KG, Tilley SL, et al. *Prostaglandin E2 protects lower airways against bronchoconstriction*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290 (1): L105-113.
246. Sheller JR, Mitchell D, Meyrick B, et al. *EP(2) receptor mediates bronchodilation by PGE(2) in mice*. *J Appl Physiol* 2000; 88 (6): 2214-2218.
-

247. Smith AP, Cuthbert MF und Dunlop LS. *Effects of inhaled prostaglandins E1, E2, and F2alpha on the airway resistance of healthy and asthmatic man.* Clin Sci Mol Med 1975; 48 (5): 421-430.
248. Mathe AA und Hedqvist P. *Effect of prostaglandins F2 alpha and E2 on airway conductance in healthy subjects and asthmatic patients.* Am Rev Respir Dis 1975; 111 (3): 313-320.
249. Yan H, Deshpande DA, Misior AM, et al. *Anti-mitogenic effects of beta-agonists and PGE2 on airway smooth muscle are PKA dependent.* FASEB J 2011; 25 (1): 389-397.
250. Keevil BG, Tierney DP, Cooper DP, et al. *Simultaneous and rapid analysis of cyclosporin A and creatinine in finger prick blood samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry and its application in C2 monitoring.* Ther Drug Monit 2002; 24 (6): 757-767.
251. Murdter TE, Sperker B, Kivisto KT, et al. *Enhanced uptake of doxorubicin into bronchial carcinoma: beta-glucuronidase mediates release of doxorubicin from a glucuronide prodrug (HMR 1826) at the tumor site.* Cancer Res 1997; 57 (12): 2440-2445.
252. WMA. *World Medical Association Declaration of Helsinki Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects.* WMA General Assembly, Tokyo, Japan 2004.
253. Dr.-Ing. Martin Knoch DJZ. *PARI LC SPRINT nebuliser technical data.* Updated 2004 [accessed 28.12.2010]; Available from: [www.pari.de](http://www.pari.de).