

**Charakterisierung verschiedener Verneblersysteme und  
Untersuchung der Übertrittskinetiken von inhalativ  
verabreichten Fluoreszenzfarbstoffen sowie von  
Salbutamol am Modell der isolierten Kaninchenlunge**

**KERSTIN LAHNSTEIN**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Pferde,  
Innere Medizin, der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuerin: PD Dr. med. vet. Kerstin Fey

**und**

dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Gießen  
Medizinische Klinik und Poliklinik II  
Betreuer: Prof. Dr. med. Werner Seeger

**Charakterisierung verschiedener Verneblersysteme und  
Untersuchung der Übertrittskinetiken von inhalativ verabreichten  
Fluoreszenzfarbstoffen sowie von Salbutamol am Modell der  
isolierten Kaninchenlunge**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Kerstin Lahnstein**

Tierärztin aus Neunkirchen

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Gutachter/in:  
PD Dr. med.vet. Kerstin Fey  
Prof. Dr. med. Werner Seeger

Tag der Disputation: 4. Dezember 2009

**für meine Familie  
in Liebe und Dankbarkeit**

und für all meine Freunde, die mir auf meinem Weg stets zur  
Seite gestanden haben

„Da steh ich nun, ich armer Tor!  
Und bin so klug als wie zuvor“

*Johann Wolfgang Goethe, „Faust - Der Tragödie 1. Teil“*

## Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
$A_{(0)}$	Aktivität zur Zeit 0
$A_{(t)}$	Aktivität zur Zeit t
Abb.	Abbildung
ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrome (Atemnotsyndrom des Erwachsenen)
ATP	Adenosin Triphosphat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAS	Chemical Abstract Service
$C_{\text{corr}}(t)$	korrigierte Wirkstoffkonzentration im Perfusat nach der Zeit (t)
$C(t)$	gemessene Wirkstoffkonzentration im Perfusat nach der Zeit (t)
CF	5(6)-Carboxyfluorescein
CLSM	Confocal laser scanning fluorescence microscopy (konfokale Fluoreszenzmikroskopie)
cm	Zentimeter
$\text{cm}^2$	Quadratmeter
$\text{cmH}_2\text{O}$	Zentimeter Wassersäule
$\text{CO}_2$	Kohlenstoffdioxid
$C_{\text{octanol}}$	Stoffkonzentration in der Octanolphase
$C_{\text{wasser}}$	Stoffkonzentration in der Wasserphase
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
d	Tag
d.h.	das heißt
DP-4	Dry Powder Insufflator™ -4
DPI	Dry powder inhaler (Pulverinhalator)
DPPC	Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin
Fe	Eisen (Ferrum)
g	Gramm
GSD	Geometric standard deviation (geometrische Standardabweichung)
h	Stunde
HCl	Salzsäure
$\text{HCO}_3^-$	Bikarbonat
Hg	Quecksilber
$\text{H}_2\text{O}$	Wasser



## Abkürzungsverzeichnis

HPLC	High Performance Liquid Chromatographie (Hochleistungsflüssigkeitchromatographie)
HRLD	High Resolution Laser Diffraction
ILM	isoliertes Lungenmodell
JLU	Justus-Liebig-Universität
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
ln	natürlicher Logarithmus
log P	dekadischer Logarithmus des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten
LVP	linksventrikulärer Druck
M	Molar (mol/l)
$\text{m}^2$	Quadratmeter
mbar	Millibar
MBq	Megabecquerel
MDI	Metered dose inhaler (Dosieraerosole)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MMAD	Mass median aerodynamic diameter (medianer aerodynamischer Massendurchmesser)
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MPTS	8-methoxyppyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (Trinatrium 8-Methoxyppyren-1,3,6-Trisulfonsäure)
ms	Millisekunde
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
n	Anzahl
$\text{N}_2$	Stickstoff
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
Na-K-ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant

## Abkürzungsverzeichnis

O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OECD	Organisation for economic cooperation and development
PAP	pulmonaler arterieller Druck
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PC	Personal Computer
PEEP	Positive endexpiratory pressure (positiver endexpiratorischer Druck)
PET	Positron emission tomography (Positronen-Emissions-Tomographie)
P-gp	P-Glycoprotein
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenaktivität
PH	pulmonale Hypertonie
pK <sub>a</sub>	Säuredissoziationskonstante
PVC	Polyvinylchlorid (Kunststoff)
r	Korrelationskoeffizient
r <sup>2</sup>	Determinationskoeffizient
rpm	rounds per minute (Drehzahl)
R6G	Rhodamin 6G
s	Sekunde
S.	Seite
s.	siehe
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SPECT	Single photon emission computer tomography (Einzelphotonen-Emissions-Tomographie)
t	Zeit
Tab.	Tabelle
<sup>99m</sup> Tc	<sup>99m</sup> Technetium-Per technetat
t <sub>H</sub>	Halbwertszeit
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolettstrahlung
V.	Vena
v.a.	vor allem
V <sub>p</sub> (t)	Perfusatvolumen nach der Zeit (t)
V <sub>p</sub> (0)	Perfusatvolumen zum Zeitpunkt 0
z.B.	zum Beispiel
λ <sub>em</sub>	Emissionswellenlänge
λ <sub>ex</sub>	Anregungswellenlänge
°	Grad

## **Inhaltsverzeichnis**

Abkürzungsverzeichnis	I - III
Inhaltsverzeichnis	IV – VII
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2 LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>2-22</b>
<b>2.1 Die Lunge als Ort für Medikamentenapplikationen</b>	<b>2-13</b>
2.1.1 Anatomie der Lunge	2
2.1.2 Die nicht-respiratorischen Funktionen der Lunge	5
2.1.3 Faktoren, die die Medikamentenapplikation in die Lunge beeinflussen	10
<b>2.2 Transport von Medikamenten in die Lunge</b>	<b>13-19</b>
2.2.1 Inhalation	13-19
2.2.1.1 Dosieraerosole	13
2.2.1.2 Pulveraerosole	14
2.2.1.3 Flüssigaerosole	16
2.2.2 Instillation	19
<b>2.3 Lungen – Modellsysteme</b>	<b>19-22</b>
2.3.1 Tiermodelle	19-21
2.3.1.1 In vivo - Tiermodelle	19
2.3.1.2 Ex vivo - Tiermodelle	20
2.3.2 In vitro - Modelle	21
2.3.3 Krankheitsmodelle	21
<b>3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>23-75</b>
<b>3.1 Material und Methode</b>	<b>23-52</b>
3.1.1 Modellsubstanzen	23
3.1.1.1 Carboxyfluorescein	23
3.1.1.2 Trinatrium 8-Methoxyppyren-1,3,6-Trisulfonsäure	24
3.1.1.3 Rhodamin	25
3.1.1.4 Salbutamol	26
3.1.2 Bestimmung des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten	27
3.1.3 Verneblung	28
3.1.3.1 Aeroneb® Professional	29

## Inhaltsverzeichnis

3.1.3.2	AKITA <sup>2</sup> APIXNEB	30
3.1.3.3	DP-4 Dry Powder Insufflator™	31
3.1.3.4	Small Animal Dry Powder Aerosol Dispensor	33
3.1.4	Aerosolpartikelgrößen	36
3.1.4.1	Laserdiffraktometrie	36
3.1.4.1.1	Partikelgrößen der Flüssigaerosole	37
3.1.4.1.2	Partikelgrößen der Pulveraerosole	38
3.1.4.2	Andersen Impaktor	38
3.1.5	Bestimmung der Lungendeposition	39
3.1.5.1	Verneblungen von Technetium mittels AKITA <sup>2</sup> APIXNEB in die Lunge	39
3.1.5.2	Verneblungen von Salbutamolpulver mittels Aerosol Dispensor in einen Filter	40
3.1.6	Die isolierte, ventilierte und blutfrei perfundierte Kaninchenlunge	41
3.1.6.1	Prinzip und Aufbau des Modells	41
3.1.6.2	Versuchsvorbereitungen	43
3.1.6.3	Präparation und Integration der Lunge ins System	44
3.1.6.4	Versuchsdurchführung	45
3.1.6.4.1	Verneblung der Fluoreszenzfarbstoffe	46
3.1.6.4.2	Carboxyfluorescein-Verneblung unter Verwendung von 1/3 Perfusat	46
3.1.6.4.3	Carboxyfluorescein-Übertritt nach Instillation	47
3.1.6.4.4	Verneblung von Salbutamolösungen mit dem AKITA <sup>2</sup> APIXNEB	47
3.1.6.4.5	Verneblung von Salbutamolpulver	47
3.1.6.4.6	Berechnung der Stoffverteilung im Lungenmodell	48
3.1.7	Pulmonale Hypertonie an der isolierten Kaninchenlunge	48
3.1.8	Nachweis der Modellsubstanzen	49
3.1.8.1	Fluoreszenzmessungen	49
3.1.8.2	HPLC	50
3.1.8.3	Messungen der Radioaktivität	51
3.1.9	Statistische Auswertung	52
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53-75</b>
3.2.1	Bestimmung des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten	53
3.2.2	Aerosolpartikelgrößen	54
3.2.2.1	Partikelgrößen nach Verneblung mit dem Aeroneb® Professional	54
3.2.2.2	Partikelgrößen nach Verneblung mit dem AKITA <sup>2</sup> APIXNEB	55

## Inhaltsverzeichnis

3.2.2.3	Vergleich AKITA <sup>2</sup> APIXNEB und Aeroneb <sup>®</sup> Professional mittels NaCl	56
3.2.2.4	Überblick über die Partikelgrößen der Flüssigaerosole	57
3.2.2.5	Partikelgrößen von mikronisiertem Salbutamolpulver	58
3.2.2.6	Partikelgrößenmessung mittels Andersen Impaktor	58
3.2.3	Lungendeposition	59
3.2.3.1	Verneblungen von Technetium mittels AKITA <sup>2</sup> APIXNEB in die Lunge	59
3.2.3.2	Verneblungen von Salbutamolpulver mittels Aerosol Dispensor in einen Filter	59
3.2.4	Substanzübertritt am Modell der isolierten Kaninchenlunge	61
3.2.4.1	Versuche mit dem Aeroneb <sup>®</sup> Professional	61
3.2.4.1.1	Verneblung der Fluoreszenzfarbstoffe	62
3.2.4.1.2	Carboxyfluorescein-Verneblung unter Verwendung von 1/3-Perfusat	64
3.2.4.1.3	Carboxyfluorescein-Übertritt nach Instillation	65
3.2.4.2	Verneblung von Salbutamolösungen mit dem AKITA <sup>2</sup> APIXNEB	67
3.2.4.3	Verneblung von Salbutamolpulver	71
3.2.5	Medikamentenübertritt bei pulmonaler Hypertonie	74
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>76-89</b>
<b>4.1</b>	<b>Diskussion der Methoden</b>	<b>76-79</b>
4.1.1	Partikelgrößenmessung	76
4.1.2	Lungendeposition	77
4.1.3	Das Modell der isolierten Kaninchenlunge	78
<b>4.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>79-89</b>
4.2.1	Aerosolpartikelgrößen	79
4.2.1.1	Flüssigaerosole	79
4.2.1.2	Pulveraerosole	82
4.2.2	Lungendeposition	82
4.2.3	Medikamentenübertritt am Modell der isolierten Kaninchenlunge	83
4.2.3.1	Fluoreszenzfarbstoffe	83
4.2.3.1.1	Vergleich des Übertritts verschiedener Farbstoffe	83
4.2.3.1.2	Stoffübertritt unter Verwendung verschiedener Perfusionsmedien	86
4.2.3.1.3	Carboxyfluorescein bei pulmonaler Hypertonie	86
4.2.3.1.4	Vergleich Verneblung und Instillation von Carboxyfluorescein	87

## Inhaltsverzeichnis

4.2.3.2	Salbutamol	87
4.2.3.2.1	Verneblung von Salbutamolösungen	87
4.2.3.2.2	Verneblung von Salbutamolpulver	88
<b>5</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN</b>	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>91-92</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>93-94</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>95-108</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b>	<b>Anhang S. 1-9</b>
<b>9.1</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	Anhang S. 1
<b>9.2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	Anhang S. 2-5
<b>9.4</b>	<b>Materialverzeichnis</b>	Anhang S. 6-9
9.4.1	Substanzliste	Anhang S. 6
9.4.2	Geräteliste	Anhang S. 7-8
9.4.3	Verbrauchsmaterial und Sonstiges	Anhang S. 8-9



### **1 EINLEITUNG**

Die Inhalation von Medikamenten stellt eine sehr alte und seit langem bewährte Methode zur Behandlung unterschiedlichster Erkrankungen dar (Rau, 2005). Erste Ursprünge der Inhalation als Therapie gegen Asthma und andere Lungenerkrankungen entstanden vermutlich schon um 2000 vor Christus im Rahmen der ayurvedischen Medizin in Indien (Anderson, 2005).

Die Inhalation bietet den Vorteil eines direkten Zugangs zu den verschiedenen Regionen der Lunge und damit die Möglichkeit einer gezielten intra- und transpulmonalen Medikamentenapplikation. Ein Nachteil vieler dieser Therapieformen ist jedoch, dass aufgrund der meist nur kurzen Wirkdauer der Medikamente häufig Behandlungen mit oft mehr als 3 - 4 Inhalationen pro Tag nötig sind (Zeng et al., 1995). Ein wichtiges Beispiel hierfür ist die Iloprost-Aerosolapplikation bei der lebensbedrohlichen pulmonalen Hypertonie, einer Erkrankung der Lungengefäße, die mit 9-12 täglichen Inhalationen des Prostazyklinanalogons behandelt werden kann (Gessler et al., 2002; 2008; Kleemann et al., 2007). Die Verwendung von Controlled Release-Formulierungen, wie z.B. Liposomen oder bioabbaubaren Nanopartikeln, Nanofasern und – röhren, soll die Nachteile einer nur kurzen Wirkdauer der eingebrachten Medikamente sowie einer unselektiven Wirkung überwinden. Zur Entwicklung und Untersuchung einer Retardformulierung ist es enorm wichtig, dass zum einen geeignete Modellsubstanzen zur Verkapslung in solche inhalierbaren Carriersysteme zur Verfügung stehen und dass es zum anderen geeignete Geräte zur Verneblung dieser Substanzen gibt, die nicht nur am Menschen, sondern auch an Modellsystemen wie z. B. der isolierten Kaninchenlunge anwendbar sind. Viele Flüssigvernebler sind mit dem Problem großer Aerosolverluste und einer nur geringen tatsächlichen Deposition des Aerosols in der Lunge behaftet, während die meisten Pulveraerosole zur Auslösung der Verneblung eine aktive Inspiration mit Flüssen von mindestens 60 l/min benötigen. All dies kann bei experimentellen Untersuchungen mit Verneblung geringer Mengen Testsubstanz in ein ex vivo-Modell wie der isolierten, perfundierten und ventilierten Kaninchenlunge zu großen Problemen führen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, sowohl geeignete Modellsubstanzen für die Verkapslung in Controlled Release-Formulierungen zu finden, als auch geeignete Geräte zur Verneblung dieser Formulierungen in die isolierte, perfundierte und ventilierte Kaninchenlunge zu entwickeln



## **2 LITERATURÜBERSICHT**

### **2.1 Die Lunge als Ort für Medikamentenapplikationen**

#### 2.1.1 Anatomie der Lunge

Die Atmungsorgane lassen sich funktionell in einen luftleitenden (Nasenhöhle, Trachea, Bronchien und Bronchiolen) und einen gasaustauschenden Anteil (Bronchioli respiratorii und Alveolen) einteilen (Nickel et al., 1999). Die luftleitenden Atemwege unterteilen sich wiederum in die oberen Luftwege, bestehend aus Nase, Nasennebenhöhlen und Rachenraum und die unteren Luftwege, die mit dem Kehlkopf beginnen und bis zu den Bronchen reichen (Rohen und Lütjen-Drecoll, 2001). An den Kehlkopf schließt sich die Luftröhre (Trachea) an, die sich an der Bifurcatio tracheae in die beiden kräftigen, kurzen Haupt- oder Stammbronchen (Bronchi principales) aufteilt. Diese teilen sich nach ihrem Eintritt in die Lunge wiederum in die Lappenbronchen (Bronchi lobares), die jeweils ein Gebiet belüften, das als Lungenlappen (Lobus pulmonalis) bezeichnet wird. Die Gliederung der Lunge in Lappen ist je nach Spezies unterschiedlich und entspricht jeweils der Aufzweigung des Bronchialbaums. Die linke Lunge besteht dabei regelmäßig aus zwei Lungenlappen (Lobus cranialis und caudalis), wobei der Lobus cranialis bei einigen Spezies (z. B. Fleischfresser, Schwein und Wiederkäuer) noch einmal in eine Pars cranialis und Pars caudalis unterteilt ist (Nickel et al., 1999). Größere Unterschiede gibt es beim Aufbau der rechten Lunge. Die rechte Lunge ist beim Menschen dreigeteilt und besteht aus Ober-, Mittel- und Unterlappen (Rohen und Lütjen-Drecoll, 2001). Auch die Pferdellunge besitzt drei Lappen, den Lobus cranialis, -caudalis und -accessorius, während die rechten Lungen von Fleischfresser, Schwein und Wiederkäuer dagegen in 4 Lungenlappen, den Lobus cranialis, -medius, -caudalis und -accessorius unterteilt sind (Nickel et al., 1999). Die Lunge des Kaninchens besteht ebenfalls aus zwei linken und vier rechten Lungenlappen (Kikkawa et al. 1971). Aus den Lappenbronchen zweigen schließlich die Segmentbronchen (Bronchi segmentales) ab, die je ein in sich abgeschlossenes, kegelförmiges Lungensegment belüften. Die einzelnen Lungensegmente sind gegeneinander durch bindegewebige Septen abgegrenzt und besitzen jeweils eigene Ventilationsäste und Versorgungsgefäße (Nickel et al. 1999, Parchet et al. 1951). Die Segmentbronchen wiederum teilen sich weiter in so genannte Bronchuli. Nach mehreren Teilungen der Bronchuli entstehen die Bronchuli respiratorii, die die letzten luftleitenden Äste des Bronchialbaums (Abb. 1) darstellen und bereits bläschenförmige Ausbuchtungen in ihren Wänden (Alveolen) aufweisen. Nach weiteren ein bis zwei eng beieinander liegenden Teilungen entstehen letztendlich die Alveolengänge (Ductuli

## Literaturübersicht

alveolares), deren endständige Ausbuchtungen die Alveolensäckchen (Sacculi alveolares) bilden. Hier in den Lungenbläschen (Alveoli pulmonis) erfolgt der Gasaustausch (Nickel et al. 1999). Als Voraussetzung dafür ist jede Alveole von einem engmaschigen Kapillarnetz umgeben (Abb. 2), das mit den Ästen der Arteria pulmonalis und über weitlumige Venolen mit den abführenden Pulmonalvenen in Verbindung steht (Rohen und Lütjen-Drecoll, 2000).

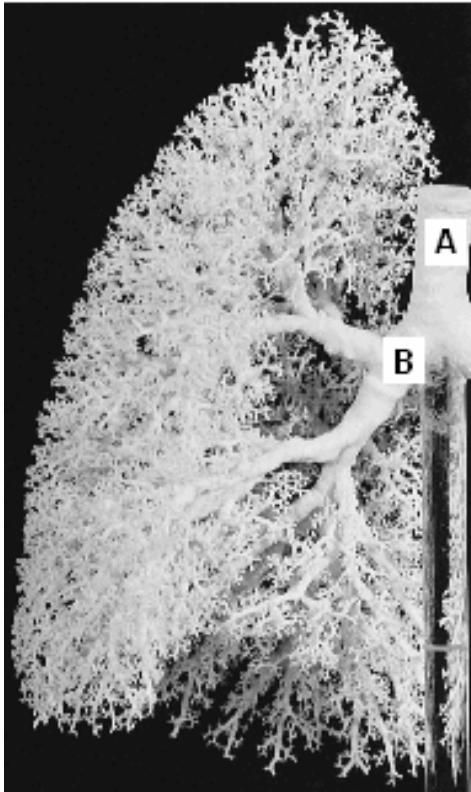


Abb. 1: Ventrale Ansicht des Bronchialbaumes der linken Hälfte einer menschlichen Lunge (Latexguss). Deutlich zu erkennen ist die Aufzweigung der Trachea (A) in die Stammbronchien (B linker Stammbronchus) und die weiteren Aufzweigungen in Lappen- und Segmentbronchien bis hin zu den terminalen Ästen des Bronchialbaumes (modifiziert nach Brown et al., 1997).

Folgt man dem Luftstrom ausgehend von der Trachea tiefer in die Lunge, so nehmen die Einzeldurchmesser der luftleitenden Wege deutlich ab, während der Gesamtdurchmesser und die Oberfläche immer größer werden. Durch die Aufteilung des Bronchialsystems in etwa 1 Million terminale Äste (Abb. 1), an denen ca. 300 Millionen Alveolen mit einem jeweiligen Durchmesser von 75-300  $\mu\text{m}$  hängen, entsteht schließlich eine Oberfläche von etwa 70-100  $\text{m}^2$  (Rohen und Lütjen-Drecoll, 2001).

## Literaturübersicht

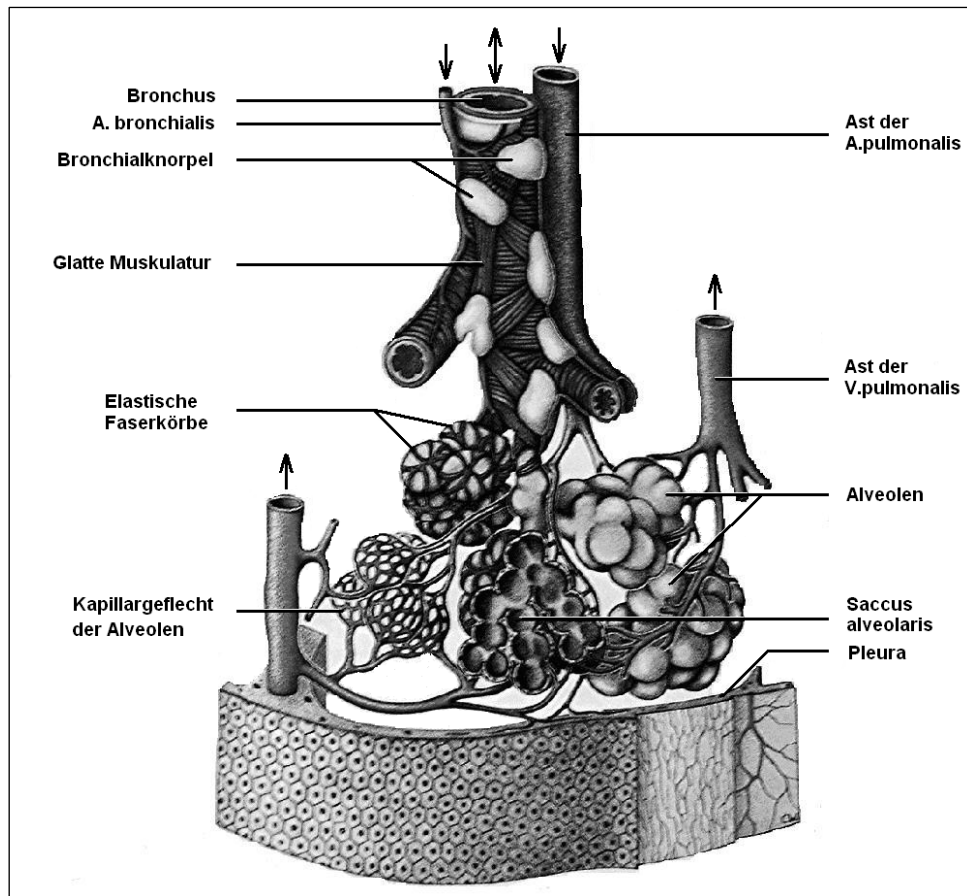


Abb. 2: Schematische Darstellung der Lungenalveolen mit umgebenden elastischen Fasern und Kapillargeflecht sowie zu- und abführenden Blutgefäßen (modifiziert nach Rohen und Lütjen-Drecoll, 2001).

Von der Nasenhöhle bis zu den terminalen Bronchen werden die Atemwege von einem mehrreihigen Zylinderepithel ausgekleidet, in dem die ziliotragenden Zylinderzellen und die Becherzellen dominieren. Durch die Becherzellen und einige seromuköse Drüsen unter dem Epithel wird ein Schleimfilm gebildet, in dem eingeatmete Partikel eingeschlossen und durch den Zilienschlag der Zylinderzellen mit einer Geschwindigkeit von ca. 1-2 cm/min oralwärts transportiert werden. Die Wand der Ductuli alveolares wird von einem einschichtigen kubischen Epithel bedeckt, das im Bereich der Alveolen stark abflacht (Rohen und Lütjen-Drecoll, 2000). Die Alveolarwand besteht aus meist weniger als 100 nm dünnen Alveolarepithelzellen, den Pneumozyten-Typ I. Diese Zellen besitzen einen großen Durchmesser von bis zu 70  $\mu\text{m}$  und bilden daher, obwohl sie nur ca. 30 % der Gesamtanzahl an Epithelzellen ausmachen, 93-97 % der Oberfläche des Alveolarepithels (Carneiro, 2005; Mobley und Hochhaus, 2001). Die Pneumozyten-Typ I liegen einer dünnen Basalmembran auf, die eng an die Basalmembran der Kapillarwand angrenzt. Somit besteht die alveolo-kapilläre Membran (Blut-Luft-Schranke) lediglich aus dem Alveolarepithel, den beiden

## Literaturübersicht

Basalmembranen und dem dünnen Endothel der Kapillare (Rohen und Lütjen-Drecoll, 2000). Die Dicke dieser Blut-Luft-Schranke beträgt nur zwischen 0,1 und 1,5  $\mu\text{m}$ . Eine weitere wichtige Zellform im Alveolarepithel sind die Pneumozyten-Typ II, die sich zu Pneumozyten-Typ I differenzieren können und somit eine Reservepopulation darstellen. Pneumozyten-Typ II sind kleine, kubische bis rundliche Zellen mit einem Durchmesser von ca. 10  $\mu\text{m}$ . Obwohl sie doppelt so häufig vorkommen wie Pneumozyten-Typ I, bedecken sie lediglich 5 % der Alveolaroberfläche. Ihre wichtigste Aufgabe neben der Funktion als Reservepopulation ist die Bildung und Sekretion von Surfactant, einer Flüssigkeit, die reich an Phospholipiden ist und dazu dient, die Oberflächenspannung der Alveolen herabzusetzen: die Grenzflächenspannung zur Luft wird dadurch auf ca. 1/10 reduziert (Carneiro, 2005).

### 2.1.2 Die nicht-respiratorischen Funktionen der Lunge

Die Lunge ist bekanntermaßen als Organ der äußeren Atmung für die  $\text{O}_2$ -Aufnahme und  $\text{CO}_2$ -Abgabe verantwortlich. Dieser Austausch erfolgt durch Diffusion entlang eines Partialdruckunterschiedes zwischen dem Alveolarraum und den Erythrozyten im Lungenkapillarblut (Silbernagel und Despopoulos, 2001). Allgemein erfolgt ein Austausch zwischen Umwelt und Körper immer durch Absorption fremder und Sekretion körpereigener Stoffe. Bekannt für die Absorption von Stoffen sind v.a. Darm und Haut, für die Exkretion v.a. Niere und Haut. Dabei wird oft übersehen, dass die Lunge mit ihrer großen Epitheloberfläche und der geringen Strecke zwischen Luft und Blut in direktem Kontakt zur Umwelt steht. Neben der Aufnahme und Abgabe von Gasen, dient die Lunge auch der Absorption und Exkretion unterschiedlichster Stoffe (von Wichert und Seifart, 2005). So besitzt die Lunge zum Beispiel die Fähigkeit durch die Abgabe von Wasserdampf (Pollitzer et al., 1924) Einfluss auf den Wasserhaushalt des Körpers zu nehmen. Die Flüssigkeitsabgabe über die Atmung hat wiederum direkten Einfluss auf die Wärmeregulation. Beim Hecheln des Hundes zum Beispiel handelt es sich um eine aktive physikalische Temperaturregulation (Kapple und Albers, 1963), bei der durch verstärkte Ventilation des Totraums (also der luftleitenden Atemwege) Wärme durch Verdunstung abgegeben wird. Diese Art der Thermoregulation ist vielen Tieren zu Eigen (Robertshaw, 2006). Obwohl beim Menschen die Beteiligung der Atmung an der Temperaturregulation nicht aktiv geschieht, wirken sich die rein physikalischen Gegebenheiten der Atmung günstig auf den Wärmehaushalt des Körpers aus. So konnte Thauer (1955) durch systematische Messungen des Wasserdampfgehaltes der Expirationsluft zeigen, dass mit abnehmender Lufttemperatur ein zunehmender Prozentsatz des in der Alveolarluft enthaltenen Wasserdampfes während der Expiration wieder aus-

## Literaturübersicht

kondensiert wird - begründet durch die Vorkühlung der Atemwege während der Inspiration. Liegt dagegen die Einatemungstemperatur über der Körpertemperatur, so kann von der expirierten Alveolarluft beim Verlassen der Atemwege mehr Wasser aufgenommen werden und es entsteht ein Wärmeverlust („thermoregulatorischer Totraumeffekt“). In der Lunge wird jedoch nicht nur Flüssigkeit zur Hydratation in die Alveolen transportiert, sondern auch aus den Alveolen in den Körper aufgenommen (von Wichert und Seifart, 2005), was essentiell zur Entfernung von Flüssigkeiten aus der Lunge z. B. nach der Geburt (Bland, 1990; Folkesson et al., 1998) oder bei Lungenödemen ist (Matthay et al. 2002, 2005). Neben  $O_2$ ,  $CO_2$  und Wasser können aber auch gelöste Stoffe und sogar Makromoleküle die Blut-Luft-Schranke in beide Richtungen passieren (Newhouse et al., 1987). Da die Permeabilität des Alveolarepithels bedeutend geringer ist als die des Gefäßendothels (Gorin and Steward, 1979), wird die Absorption in der Lunge von dem Transport durch das Alveolarepithel limitiert (Groneberg et al., 2003). Treibende Kraft für die Absorption von Flüssigkeiten ist dabei der aktive Transport von Natrium entlang der Epithelbarriere, dem aus osmotischen Gründen Wasser folgt (Basset et al., 1987; Folkesson und Matthay, 2006; Ghofrani et al., 2001; Matthay et al., 1996, 2005). Sowohl Pneumozyten-Typ I (Johnson et al., 2002; Johnson, 2007) als auch -Typ II (Matalon, 1991; Michaut et al. 1996) zeigen einen aktiven Ionentransport über epitheliale Na-Kanäle und Na-K-ATPase und sind daher an diesen Transportvorgängen beteiligt (Abb. 3).

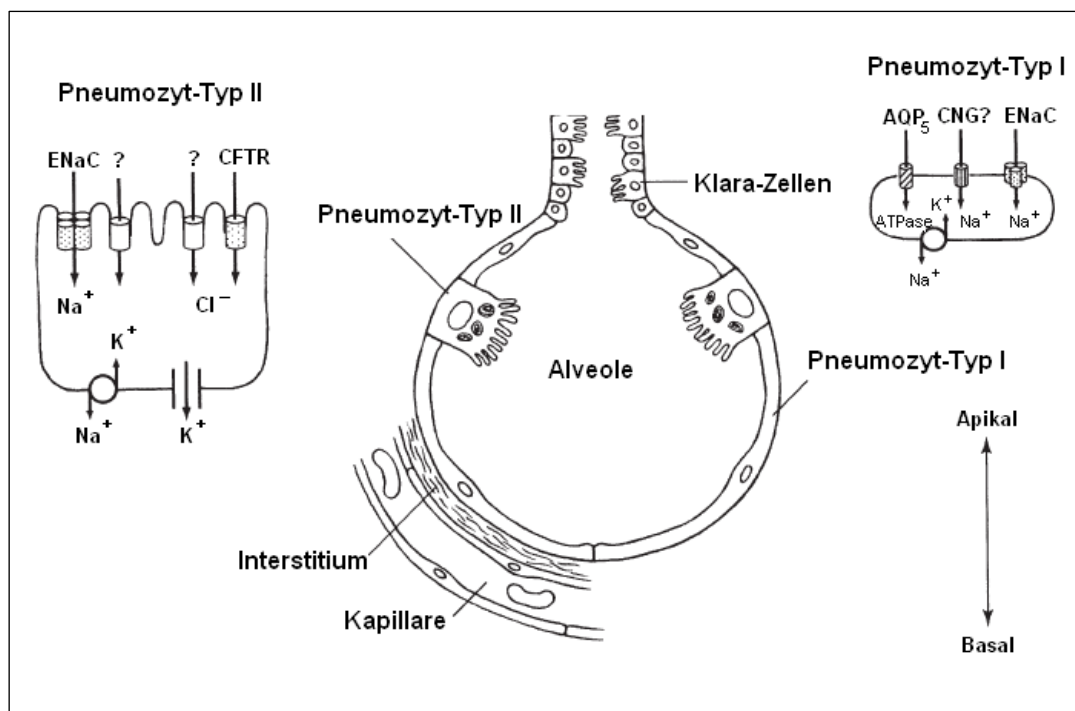


Abb. 3: Schematische Darstellung des Salz- und Wassertransportes im Alveolarepithel (modifiziert nach Matthay et al., 2002).

## Literaturübersicht

Neben dem Elektrolyt- und dem damit verbundenen Wassertransport, können auch zahlreiche andere Substanzen in der Lunge absorbiert werden. Einen Überblick über die Absorptionsmechanismen in der Lunge geben von Wichert und Seifart (2005). Demnach werden Elektrolyte sowohl aktiv, als auch passiv transportiert, während Wasser passiv entlang eines osmotischen Gradienten diffundiert. Die Aufnahme inhalierter Botenstoffe geschieht rezeptorvermittelt, genauso wie die Absorption von Lipiden, welche zusätzlich durch Pinozytose in die Zelle aufgenommen werden. Zucker gelangen para- und transzellulär in das Gewebe und Peptide und Proteine können sowohl aktiv als auch passiv, para- und transzellulär (Endo- und Transzytose) absorbiert werden. Die gute Absorption vieler niedermolekularer Stoffe (Tronde et al., 2003) und die Fähigkeit der Lunge sogar Makromoleküle, wie z. B. Proteine (Agu et al. 2001; Folkesson et al., 1990) aufzunehmen, verbunden mit der großen Absorptionsoberfläche, machen dieses Organ interessant für die Medikamentenapplikation. Wirkstoffe, die bereits Anwendung in der Lunge finden sind z. B. Kortikosteroide (Winkler et al. 2004) und Brochodilatoren (Manocha et al. 2006; O'Donnell et al. 2004). Obwohl die Lunge im Vergleich zum Gastro-Intestinaltrakt den Vorteil bietet viele Substanzen nur in geringem Umfang zu inaktivieren (Lipworth, 1996; Okamoto et al., 2002), findet auch hier in hohem Maße Metabolismus statt. So beeinflusst die Lunge zahlreiche im Blut vorhandene Stoffe während ihrer Lungenpassage v.a. durch Interaktionen mit dem Endothel (Gillis, 1987). Die Effizienz der Lunge hinsichtlich ihrer metabolischen Eigenschaften ist dabei nicht etwa besonderen Fähigkeiten des Lungenendothels gegenüber anderen Endothelien zuzuschreiben (Fishman, 1977), sondern ist ihrer großen Oberfläche und der Tatsache, dass das gesamte Blut die Lunge mehrmals in der Minute passiert, zu verdanken (Gillis, 1987).

Einige Beispiele für spezifische metabolische Fähigkeiten der Lunge, die sowohl anabole als auch katabole Eigenschaften besitzt, sind die Aufnahme und der Abbau von Aminen. Serotonin und Norepinephrin werden z.B. durch einen sättig- und hemmbaren, temperatur- und energieabhängigen Transport in die Endothelzellen aufgenommen (Iwasawa et al., 1973; Iwasawa und Gillis, 1974) und hier intrazellulär durch Enzyme (z. B. Monoaminoxidase) abgebaut (Junod, 1976). Auch Peptide werden in der Lunge effektiv abgebaut. So wird z.B. Bradykinin während nur einer Passage durch die Lunge fast vollständig hydrolysiert (Ryan et al., 1968). Ebenfalls überwiegend in der Lunge entsteht aus Angiotensin I nach Abspaltung zweier Aminosäuren durch das Angiotensin-Converting-Enzym Angiotensin II (Fishman, 1977; Silbernagel und Despopoulos, 2001).

## Literaturübersicht

Liegen im Blut vorhandene Metaboliten bei Körpertemperatur in einem flüchtigen Zustand vor, so verlassen diese den Körper vorwiegend über die Lunge, indem sie mit der Atemluft abgeatmet werden. Diese Metaboliten verleihen dem Atem oft einen typischen Geruch, wie zum Beispiel Aceton bei Erkrankung mit Diabetes mellitus (Heinemann und Fishman, 1969). Eine der anabolen Fähigkeiten der Lunge liegt in der Bildung von Surfactant (surface active agent). Surfactant besteht zu ca. 10 % aus Proteinen und zu ca. 90 % aus Lipiden (Yu und Possmayer, 2003) und letztere wiederum v.a. aus Phospholipiden, wobei Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) den Hauptanteil der Phospholipide bildet (Pérez-Gil und Keough, 1998). Die Bildung des Surfactants erfolgt in den Pneumozyten-Typ II (Haagsman und van Golde, 1991), die die dafür notwendigen Substrate aus den umliegenden Kapillaren erhalten. Neben der Funktion, die Oberflächenspannung herabzusetzen und zu verhindern, dass die Alveolen bei der Expiration kollabieren, besitzt das Surfactant auch wichtige immunologische Funktionen. Eingeatmete Partikel und Mikroorganismen (Viren und Bakterien) werden in dem Surfactantfilm eingeschlossen und anschließend von den Alveolarmakrophagen aufgenommen. Die nach oral gerichtete Fließeigenschaft des Surfactant hilft zusätzlich eingeschlossene Partikel zu entfernen (Kösters, 2003). Einige Surfactantproteine spielen außerdem, z.B. durch Bindung an Makrophagen, eine wichtige Rolle zur Aktivierung der unspezifischen Abwehr (Sano et al. 1999). Makrophagen kommen in der Lunge je nach Lokalisation als Atemwegs-, Alveolar-, Interstitial-, Intravascular- und Pleuralkmakrophagen vor (Oberdörster, 1994). Sie besitzen die Fähigkeit der Phagozytose und spielen somit eine zentrale Rolle bei der Immunabwehr der Lunge. Alveolarmakrophagen, die beim Menschen den Hauptteil an Zellen in einer bronchoalveolären Lavage darstellen (Löfdahl et al. 2006), bilden dabei die größte Population an immunkompetenten Zellen im unteren Respirationstrakt (Maus et al. 1997). Der Immunabwehr durch Makrophagen gehen jedoch schon andere Mechanismen zum Schutz der Lunge voraus. So bleibt ein Großteil der eingeatmeten Schmutzpartikel und Krankheitserreger bereits im Mukus von Nasen- und Rachenhöhle, Trachea und Bronchialbaum hängen. Sie werden vor Ort phagozytiert und/oder wenn sie in den tieferen Atemwegen abgefangen werden, samt Mukusschicht vom Flimmerepithel rachenwärts transportiert. Durch 10-20 Zilienschläge pro Sekunde wird der Mukus mit einer Geschwindigkeit von 1 cm/min bewegt. In Abhängigkeit von lokalen Reizen und der vagalen Stimulation beträgt die Schleimproduktion ca. 10-100 ml/d (Silbernagel und Despopoulos, 2001). Die Lunge spielt jedoch nicht nur eine Rolle bei der Abwehr von Krankheitserregern, die auf inhalativem Weg in die Lunge gelangen, sondern ist auch in der Lage im Blut zirkulierende Erreger zu eliminieren. So zeigten z.B. Versuche an Schweinen,

## Literaturübersicht

dass im Blut vorhandene Bakterien (*Pseudomonas aeruginosa*) zu 60-80 % in der Lunge eliminiert wurden. Dabei konnte die Phagozytose der Bakterien durch Zellen des mononukleären Phagozytensystems vor allem in den kleinen Pulmonalgefäßen beobachtet werden (Crocker et al., 1981).

Eine weitere wichtige Aufgabe der Lunge ist die Beteiligung am Säure-Base-Haushalt des Körpers. Zur Aufrechterhaltung des Blut-pH-Wertes wird bei einer Azidose mehr, bzw. bei einer Alkalose weniger CO<sub>2</sub> abgeatmet (Silbernagel und Despopoulos, 2001). Weiterhin beeinflusst die Lunge das Blut positiv durch Herausfiltern von Partikeln, die im Körperkreislauf einen Embolus verursachen könnten. Diese Filterfunktion ist in der Lunge besonders effektiv, da das Lungenkapillarnetz nicht nur die größte Oberfläche, sondern auch die kleinsten Gefäßdurchmesser besitzt (Heinemann und Fishman, 1969). Um herausgefilterte Thromben wieder aus dem Kapillarnetz zu entfernen, besitzt die Lunge proteolytische, fibrinolytische und antikoagulatorische Funktionen (Campbell und Waterhouse, 2005).

Die Lunge, die bei einem Menschen in Ruhe ca. 10 % des Gesamtblutvolumens enthält, bildet außerdem durch die Dehnbarkeit der Lungengefäße ein Blutreservoir (Heineman und Fishman, 1969). Die Dehnbarkeit der Lungengefäße ermöglicht es die Schwankungen in der Verteilung des Blutvolumens (z.B. erhöhter venöser Rückfluß während des Hinlegens) auszugleichen, denen der Körper im Verlaufe eines Tages unterliegt (Campbell und Waterhouse, 2005).

Eine weitere, wenn auch nicht lebenswichtige, für das soziale Miteinander jedoch sehr bedeutsame Funktion der Lunge, liegt in ihrer Beteiligung an der Lautgebung. Ohne die Lunge als „Windraum“ wäre der für die Sprache notwendige Luftstrom nicht möglich (Silbernagel und Despopoulos, 2001).

Übersicht über die beschriebenen nicht-respiratorischen Fähigkeiten der Lunge:

- ⇒ Beteiligung am Wasserhaushalt
- ⇒ Thermoregulation
- ⇒ Elektrolyttransport
- ⇒ Flüssigkeitssekretion
- ⇒ Absorption (Mikro- und Makromoleküle, Wasser – z.B. nach der Geburt, bei Lungenödemen)
- ⇒ Metabolismus (z.B. Serotonin, Bradykinin, Angiotensin)

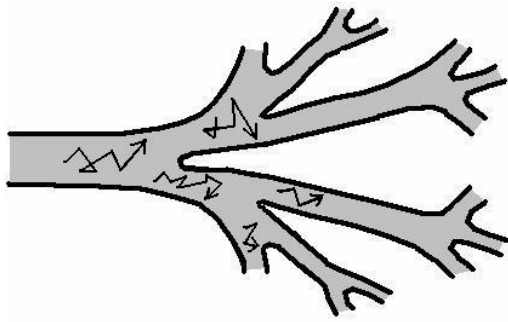


## Literaturübersicht

- ⇒ Surfactant-System
- ⇒ Abwehrmechanismen der Lunge
- ⇒ Beeinflussung des Säure-Base-Haushaltes
- ⇒ Filter für im Blut zirkulierende Partikel
- ⇒ Blutreservoir
- ⇒ Lautbildung

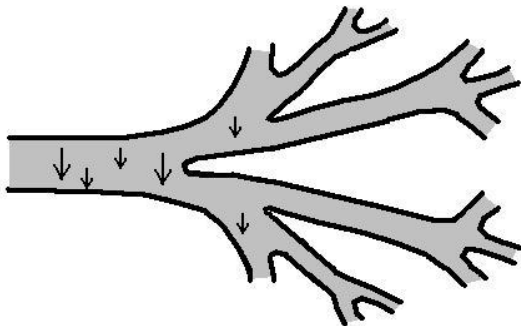
### 2.1.3 Faktoren, die die Medikamentenapplikation in die Lunge beeinflussen

Die Applikation von Medikamenten in die Lunge erfolgt zumeist durch Inhalation eines Aerosols. Bei einem Aerosol handelt es sich um eine Suspension aus festen oder flüssigen Partikeln in einem Gas (meist Luft). Somit stellt schon die uns umgebende Atemluft ein Aerosol dar (Scheuch, 1997). Zum Schutz vor den vielen, zum Teil schädlichen Partikeln, die in den ca. 20.000 Liter Luft, die wir täglich einatmen (Stahlhofen, 1997) enthalten sind, besitzen die Atemwege effektive Filtermechanismen. Trotzdem gelangen viele dieser Teilchen in den Atemtrakt, wo sie entweder wieder ausgeatmet oder an den Wänden des Atemtrakts abgeschieden werden. Ob und wo die in einem Aerosol enthaltenen Partikel nun in der Lunge deponiert werden, hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab (Heyder, 1997; Scheuch et al., 2006; Voshaar et al. 2001). Will man ein Medikament gezielt inhalativ applizieren, so muss man die gegebenen chemischen (Eigenschaften des Medikamentes), physikalischen (Eigenschaften des Partikels), physiologischen (Strömungsverhältnisse im Atemtrakt) und morphologischen (Geometrie des Atemtrakts) Bedingungen berücksichtigen (Heyder, 1997; Scheuch, 1997). Damit Aerosolpartikel in der Lunge deponieren können, müssen sie den Luftstrom verlassen und nach Kollision mit den Wänden des Atemtrakts abgelagert werden. Die Kräfte, die den Teilchentransport beeinflussen, hängen von den physikalischen Teilcheneigenschaften (Größe und Dichte) und den Atemparametern (Atemzugdauer und Stömungsgeschwindigkeit) ab (Heyder, 1997). Der wohl wichtigste Parameter bei der inhalativen Medikamentenapplikation ist die Partikelgröße der Aerosolteilchen. Sie hat großen Einfluss auf den Depositionsmechanismus, durch den sich die Teilchen im Atemtrakt abscheiden. Die drei Wichtigsten dieser Mechanismen (Abb. 4) sind die Diffusion, die Sedimentation und die Impaktion (Groneberg et al. 2003; Scheuch, 1997; Stuart, 1976).



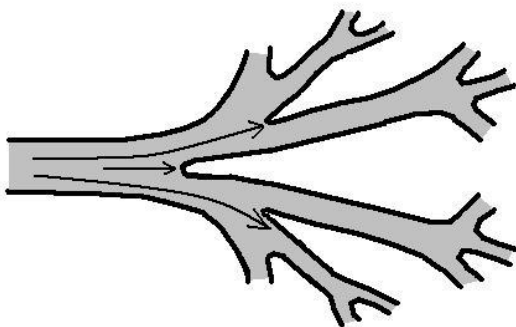
**Diffusion**

(Brownsche Molekularbewegung)



**Sedimentation**

(Gravitation)



**Impaktion**

(Trägheit)

Abb. 4: Schematische Darstellung der drei wichtigsten Mechanismen zur Abscheidung von Aerosolpartikeln an den Wänden des Atemtrakts.

Die Abscheidung durch Diffusion spielt vor allem für Partikel mit einem Durchmesser von weniger als  $0,5 \mu\text{m}$  eine Rolle (Heyder, 1997). Solch kleine Partikel werden von den Stößen der im Gas befindlichen Moleküle beeinflusst und bewegen sich unorientiert im Raum (Brownsche Molekularbewegung), bis sie an eine Wand stoßen, an der sie hängen bleiben. Die Molekülstöße wirken dabei umso effektiver, je kleiner die Partikel sind. Bewegen sich viele Teilchen in einem Kollektiv durch die Brownsche Molekularbewegung, so nennt man dies Diffusion. Da die Wahrscheinlichkeit, dass die Partikel auf eine Wand treffen, mit

## Literaturübersicht

zunehmender Verweildauer im Atemtrakt steigt, wird die Depositionsrate bei langsamer Atmung oder einer Atempause deutlich erhöht (Scheuch, 1997).

Mit zunehmender Partikelgröße steigt auch der Einfluss des Gravitationsfeldes der Erde und die Partikel beginnen zu sinken (Sedimentation). Dieser Mechanismus tritt bei Partikeln über  $0,5 \mu\text{m}$  in den Vordergrund (Heyder, 1997). Die Depositionswahrscheinlichkeit bei der Sedimentation nimmt sowohl mit zunehmender Partikelgröße und somit mit zunehmender Sinkgeschwindigkeit, als auch mit zunehmender Verweildauer im Atemtrakt zu. Wegen der relativ hohen Strömungsgeschwindigkeit und der damit verbundenen kurzen Aufenthaltszeit des Aerosols in Mund oder Nase während einer Inhalation, spielt die Sedimentation in dieser Region keine Rolle. Besonders effektiv ist sie dagegen in den kleinen Strukturen der Atemwege und Alveolen, wo die Abstände und die Atemstromgeschwindigkeiten sehr klein sind, so dass herabsinkende Partikel schnell an einer Fläche abgeschieden werden. Die Sinkgeschwindigkeit von Teilchen wird verwendet, um ihre aerodynamischen Eigenschaften zu charakterisieren. Der aerodynamische Teilchendurchmesser (MMAD) ist daher definiert als der Durchmesser einer Kugel der Dichte  $1 \text{ g/cm}^3$ , die in Luft genauso schnell fällt, wie das betrachtete Teilchen (Scheuch, 1997).

Für größere Aerosolpartikel ab ca.  $3 \mu\text{m}$  spielt schließlich die Trägheitsabscheidung eine zunehmende Rolle (Scheuch et al. 2006). Dementsprechend können größere Partikel den Richtungsänderungen des Luftstroms in den Atemwegen nur noch bedingt folgen und prallen daher gegen die Wände des Atemtrakts (Impaktion). Die Deposition durch Impaktion steigt mit zunehmender Fliehkraft und diese wiederum ist umso größer, je höher die Flussgeschwindigkeit und je größer die Partikel sind. Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser von über  $10 \mu\text{m}$  werden daher bei schnellen Inhalationsflüssen mit großer Wahrscheinlichkeit schon im Nasen/Mund-Rachenraum abgeschieden. Durch sehr langsame Inhalation (Atemflüsse unter  $12 \text{ l/min}$ ) können jedoch selbst solch große Partikel noch bis in die Lunge vordringen (Scheuch, 1997).

Die ideale Partikelgröße zur Inhalation liegt zwischen  $2$  und  $6 \mu\text{m}$ . Partikel kleiner als  $2 \mu\text{m}$  deponieren hauptsächlich in der Alveolarregion oder werden wieder exhalieret, während Partikel größer als  $6 \mu\text{m}$  in hohem Maße schon im Oropharyngealbereich impaktieren (Biddiscombe et al., 2003). Eine maximale Deposition im Alveolarraum wird mit Partikeln eines MMADs von ca.  $3 \mu\text{m}$  erreicht (Groneberg et al., 2003). Nicht immer ist der Durchmesser eines Partikels jedoch feststehend. Viele trockene Pulverteilchen nehmen in einer so feuchten Umgebung wie den Atemwegen innerhalb von kurzer Zeit Wasser auf und gewinnen dadurch an Größe (Hygroskopizität). Dementsprechend verändern sich die

## Literaturübersicht

Eigenschaften dieser Pulverpartikel während der Passage durch die Atemwege (Persons et al., 1987). Eine weitere Eigenschaft der Partikel, die die Lungendeposition beeinflusst, ist die elektrische Ladung der einzelnen Aerosolteilchen (Scheuch, 1997). Während sich Partikel mit gleicher Ladung abstoßen und dadurch einen größtmöglichen Abstand zueinander einhalten, ziehen sich Partikel gegensätzlicher Ladung an, was zur Bildung von Aggregaten und somit zu einer Größenzunahme führen kann.

## **2.2 Transport von Medikamenten in die Lunge**

### 2.2.1 Inhalation

Zur inhalativen Applikation von Medikamenten in die Lunge stehen drei verschiedene Verfahren zur Verfügung (Gebhart, 1997; Le Brun et al., 2000):

- Versprühen eines Dosieraerosols aus einer Überdruckdose, in welcher das Medikament als Suspension in einem Treibgas vorliegt
- Zerstäuben eines trockenen, pulverförmigen Medikaments
- Verneblung von flüssigen Medikamentenlösungen oder - suspensionen

#### 2.2.1.1 Dosieraerosole

Dosieraerosole (MDI, metered dose inhaler) sind kompakte, leicht anwendbare Verneblungssysteme (Kleinstreuer et al., 2007), die noch immer einen Großteil an Verneblungssystemen darstellen (Byron, 2004; Voshaar et al. 2001) und seit über 50 Jahren erfolgreich zur Aerosoltherapie von obstruktiven Atemwegserkrankungen eingesetzt werden. Das Medikament befindet sich dabei in Sprühbehältern, in denen es als feines Pulver gleichmäßig in dem unter Überdruck stehenden Treibgas verteilt ist (Gebhart, 1997). Nach Auslösen des Sprühstoßes wird eine relativ konstante Medikamentendosis mit hoher Geschwindigkeit abgegeben. Die kurze Dauer dieses Sprühstoßes macht eine gute Koordination zwischen Aktivierung und Inspiration erforderlich (Le Brun et al., 2000; Voshaar et al., 2005). Um die Problematik der hohen Partikelabscheidung im Mund-Rachen-Raum zu verbessern, hat es sich bewährt, ein Hohlraumssystem („Spacer“ – meist eine Plastikkammer unterschiedlicher Größe und mit unterschiedlichen elektrostatischen Eigenschaften) als Distanzhalter zwischen Düse und Mundstück zu schalten. Dadurch wird die Aerosolwolke infolge der Luftreibung zunehmend abgebremst und die flüchtigen Bestandteile der Partikel können abdampfen. Andererseits kommt es durch die elektrostatischen Kräfte zu einem Wirkstoffverlust (Gebhart, 1997; Voshaar et al., 2001). Da mit Hydrofluoralkalen (HFA) 227 und 134a (Norfluran) chlorfreie und somit nicht

## Literaturübersicht

ozonschädliche Treibgase als Alternative zu Fluorchlorkohlenwasserstoffen (FCKW) zur Verfügung stehen (Voshaar et al. 2001), wurden zum Schutz der Umwelt viele FCKW betriebene Dosieraerosole vom Markt genommen.

Dosieraerosole besitzen folgende Vor- und Nachteile (Gebhart, 1997; Voshaar et al., 2005):

Vorteile:

- kostengünstig, klein, handlich und überall einsetzbar
- reproduzierbare Dosis pro Aktivierung
- Dosis und Partikelspektrum unabhängig vom Atemmanöver
- in Notfallsituationen einsetzbar
- in Beatmungssystemen (mit „Spacer“) einsetzbar
- keine Energieversorgung notwendig
- Behälterinhalt ist vor Kontaminationen geschützt

Nachteile:

- durch hohe Austrittsgeschwindigkeit deponieren (bei Verwendung ohne „Spacer“) bis zu 75 % im oropharyngealen Bereich
- geringe pulmonale Wirkstoffdeposition
- schwierige Koordination zwischen Aktivierung und Atmung
- ungeeignet für Kinder unter 6 Jahren
- Einsatz von Treibgasen und anderen Zusatzstoffen notwendig

### 2.2.1.2 Pulveraerosole

Pulverinhalatoren (DPI, dry powder inhaler) bieten die Möglichkeit einer einfachen Medikamenteninhalation ohne Verwendung zusätzlicher Treibgase (Hindle et al., 1997), indem sie zur Erzeugung des Aerosols den inspiratorischen Atemzug des inhalierenden Patienten nutzen (Broeders et al., 2001; Gebhart, 1997; Voshaar et al. 2001). Die Dosierung des inhalierten Trockenpulvers basiert darauf, dass pro Atemzug eine definierte Menge des Medikaments in der Atemluft suspendiert und inhaliert wird (Gebhart, 1997). Dabei ist jedoch nicht nur die Dosisabgabe, sondern vor allem auch die Generierung respirabler Partikel abhängig vom Inspirationsfluss. So führt ein höherer Inspirationsfluss zur Generierung eines größeren Anteils an kleinen Aerosolpartikeln (Voshaar et al., 2005). Obwohl die optimalen Inspirationsflüsse für die verschiedenen Geräte unterschiedlich sind, führt ein Atemfluss von 60 l/min oder mehr meist zu einer guten Wirkstoffdeposition im Bronchialsystem (Voshaar et al. 2001). Entscheidend für die Desagglomeration des Pulvers ist neben dem Inspirationsfluss auch der Ablauf des Inspirationsmanövers. So führt ein initial langsamer und erst im Verlauf

## Literaturübersicht

der Inspiration zunehmender Atemfluss zu einer schlechten Desagglomeration und somit zu einer vermehrten oropharyngealen und einer verminderten intrapulmonalen Deposition (Everard et al., 1997; Voshaar et al., 2001). Ein hoher Inspirationsfluss erzeugt zwar einerseits eine gute Desagglomeration, führt jedoch andererseits auch zu einer hohen Beschleunigung der Teilchen und fördert somit die Trägheitsabscheidung von Partikeln im Mund-Rachen-Raum (Gebhart, 1997; Voshaar et al., 2005). Ebenfalls abhängig ist die Dispersion des Pulvers von den Fließeigenschaften des Pulvers, welche durch die physikochemischen Eigenschaften des Medikamentes und die Granulatstruktur des Pulvers beeinflusst werden (Gebhart, 1997). Zur Verbesserung der Fließeigenschaften werden vielen Trockenpulvern Hilfssubstanzen wie z.B. Laktose zugesetzt. Durch Anlagerung der feineren Wirkstoffpartikel an die meist wesentlich größeren Trägerpartikel können die starken Anziehungskräfte der mikronisierten Wirkstoffpartikel untereinander reduziert und somit die Fließeigenschaften verbessert werden. Zur Dosierung des Medikaments wird das Pulver entweder aus Einzelkapseln (z.B. Aerosolizer<sup>®</sup> bzw. HandiHaler<sup>®</sup>, Rotahaler<sup>®</sup>, Spinhaler<sup>®</sup>), aus Multirevolverkapseln bzw. verblisterten Einzeldosen (z.B. Diskus<sup>®</sup> und Diskhaler<sup>®</sup>) oder aus einem Gesamtreservoir (z. B. Turbohaler<sup>®</sup>) freigesetzt (Rau, 2005; Voshaar et al. 2001). Zur Beurteilung der Pulververneblung lassen sich insgesamt folgende Vor- und Nachteile zusammenfassen (Gebhart, 1997; Voshaar et al., 2005):

- Vorteile:
- leicht tragbare, handliche Vorrichtung, überall einsetzbar
  - keine Energiequelle nötig
  - durch Aktivierung über den Einatemvorgang ist keine Koordination zwischen Auslösung und Atmung nötig
  - Aerosol ist frei von schädlichen Treibgasen
  - Einzel- und Mehrfachdosierung möglich
- Nachteile:
- Dosis und pulmonale Wirkstoffdeposition vom Inspirationsfluss und vom Atemmanöver abhängig
  - notwendige Atemflüsse von 60-80 l/min können nicht von allen Patienten aufgebracht werden
  - Beeinflussung des Dispergierverhaltens durch Luftfeuchtigkeit möglich
  - hohe Deposition im Mund-Rachen-Raum
  - ungeeignet für Notfallsituationen und für Kinder unter 4 Jahren
  - nicht einsetzbar in Beatmungssystemen

## Literaturübersicht

### 2.2.1.3 Flüssigaerosole

Geräte zur Verneblung von Flüssigkeiten lassen sich in der Regel entsprechend ihrer Funktionsweisen in Düsenvernebler, Ultraschallvernebler und piezoelektrische Vernebler unterteilen. Bei der Verwendung von Düsenverneblern wird komprimierte Luft (Pressluft, 1-2 bar, 2-8 l/min) einer Düse zugeführt und durch eine Kapillare geleitet. Nach Austritt aus der Kapillare entsteht durch die hohe Geschwindigkeit der expandierenden Luft ein Unterdruckgebiet (Bernoulli-Effekt) und die Verneblerflüssigkeit wird aus dem Vorratsgefäß über eine Kanüle kontinuierlich angesaugt und zerstäubt. Große Tropfen des so entstandenen Primäraerosols werden an internen Impaktionseinrichtungen wieder abgeschieden und gelangen zurück in das Verneblerreservoir (Gebhart, 1997; O`Callaghan und Barry, 1997). Nur ca. 10 % der ursprünglich dispergierten Flüssigkeit verlassen den Vernebler als feiner Nebel (Gebhart, 1997). Die Partikelgrößen dieses Aerosols können zwischen 1,2 und 6,9 µm betragen (Groneberg et al., 2002) und sind u.a. abhängig von der Flussgeschwindigkeit der zugeführten Luft (Le Brun et al., 2000). Neben kontinuierlich arbeitenden Geräten befinden sich auch atmungstriggerte Düsenvernebler auf dem Markt (Nikander et al., 2000), die die großen Medikamentenverluste minimieren sollen, die bei kontinuierlicher Verneblung während der Expiration entstehen (Newman et al., 1994).

Ultraschallvernebler nutzen einen piezoelektrischen Kristall zur Erzeugung mechanischer Wellen (Rau, 2002). Die entstehenden Vibrationen werden entweder direkt durch die zu vernebelnde Flüssigkeit geleitet oder sie durchqueren erst ein wässriges Medium, welches durch eine Membran, die gleichzeitig als Medikamentenbecher dient, von der zu vernebelnden Flüssigkeit getrennt ist (Voshaar et al., 2001). Durch diese Vibrationen entstehen Wellen am Übergang zwischen Luft und Flüssigkeit, von denen sich kontinuierlich Aerosoltröpfchen ablösen. Dabei lösen sich größere Tropfen überwiegend von der oberen Region der Wellen, während kleinere Tropfen hauptsächlich an der Basis entstehen (Ghazanfari et al., 2007; O`Callaghan und Barry, 1997). Die Größe der Aerosolpartikel hängt neben den Eigenschaften der Flüssigkeit hauptsächlich von der Ultraschallfrequenz ab (Voshaar et al., 2001). Wie bei den Düsenverneblern werden auch hier größere Partikel des Primäraerosols noch im Vernebler abgeschieden und wieder dem Flüssigkeitsreservoir zugefügt (O`Callaghan und Barry, 1997). Das auf diese Weise gebildete heterogene Aerosol kann mittlere Partikelgrößen zwischen 3,7 und 10,5 µm aufweisen (Groneberg et al., 2002).

Sowohl Ultraschall- als auch Düsenvernebler bieten verschiedene Vor- und Nachteile. Düsenvernebler besitzen z. B. den Vorteil einer Verneblung bei normaler Atmung. Außerdem sind einfache Modifikationen hinsichtlich Dosis und Zusammensetzung des Medikamentes

## Literaturübersicht

möglich. Als nachteilig ist hier jedoch der geringe Output und die dadurch bedingte lange Behandlungsdauer anzusehen (Rau, 2002). Bei der Düsenverneblung kommt es weiterhin zu großen Medikamentenverlusten - so werden weniger als 25 % der eingefüllten Flüssigkeit tatsächlich vom Patienten inhaliert (Nikander et al., 2000). Ebenfalls ein Problem kann die Abkühlung und Aufkonzentration der Medikamentenlösung durch Verdunstungsprozesse (Rau, 2002) sowie das Vorhandensein großer Scherkräfte während der Verneblung (Kleemann et al., 2007) darstellen. Viele Ultraschallvernebler hingegen arbeiten ohne Aufkonzentration der Flüssigkeit im Verneblerreservoir und besitzen einen deutlich höheren Output, jedoch zum Teil auch größere Aerosolpartikel als viele Düsenvernebler (Rau, 2002). Der Ultraschallvernebler erreicht im Vergleich zu vielen Düsenverneblern eine wesentlich höhere Lungendeposition (Fok et al., 1997; Gessler et al., 2001; Harvey et al., 1997). Doch auch hier gibt es entscheidende Nachteile: die meist recht teuren Geräte können viele Suspensionen schlecht vernebeln (Rau, 2002) und wärmen die Medikamentenlösung durch die piezoelektrischen Schwingungen zunehmend auf (Steckel und Eskandar, 2003), wodurch labile Medikamente (z. B. Proteine) Schaden nehmen können (Niven et al., 1995).

Zur Vermeidung all dieser Nachteile bei der Flüssigverneblung mit Düsen- und Ultraschallverneblern bieten viele Hersteller (z. B. Aerogen, Omron, ODEM, Pari Respiratory Equipment) mittlerweile auch Geräte an, bei denen das Aerosol durch eine mit zahlreichen Löchern versehene, vibrierende Platte erzeugt wird (Dhand, 2004). Auch bei diesen Verneblern spielt der piezoelektrische Effekt eine Rolle. Anders als beim Ultraschallvernebler wirken die Schwingungen hier jedoch nicht direkt auf eine Flüssigkeit, sondern auf eine Lochplatte, durch die die Flüssigkeit extrudiert wird. Bei passiv vibrierenden Systemen (z.B. Omron MicroAir NE-U22) werden die piezoelektrischen Wellen über einen Transducer geleitet, der mit der zu vernebelnden Flüssigkeit in Kontakt steht. Die Schwingungen werden durch die Flüssigkeit auf eine dahinter befindliche Platte übertragen, wodurch die Flüssigkeit durch die ca. 6000 Löcher (Durchmesser ca. 3 µm) der Platte gepresst wird und den Vernebler als feines Aerosol verlässt. Als aktiv vibrierend werden Systeme (z.B. Aeronex Pro) bezeichnet, bei denen der piezoelektrische Kristall direkt mit der Lochplatte verbunden ist (Ghazanfari et al., 2007). Die Platte des Aeronex Pro Verneblers z.B. besitzt ca. 1000 trichterförmige Bohrungen, deren größere Öffnungen der Flüssigkeit zugewandt sind und die zum Ausgang hin immer enger werden. Durch Anlegen einer elektrischen Wechselspannung beginnt das piezoelektrische Keramikelement, das die Lochplatte kreisförmig umgibt, sich zusammenzuziehen und wieder auszudehnen. Dadurch bewegt sich die Lochplatte einige Mikrometer auf und ab und wirkt somit wie eine „Mikropumpe“, die die Flüssigkeit als



## Literaturübersicht

Aerosol nach aussen presst. Sowohl Partikelgröße als auch Output sind dabei von der Größe der Lochbohrungen in der Platte abhängig. Die Verneblungszeit ist dabei durch einen Output von 0,3 - 0,6 ml/min deutlich kürzer als bei herkömmlichen Düsen- oder Ultraschallverneblern (Dhand, 2004) und bietet somit durch kürzere Behandlungszeiten v.a. bei der Anwendung an Kindern große Vorteile (Adachi et al., 2006). Mit Hilfe der deutlich schnelleren piezoelektrischen Vernebler können feine Aerosole ohne Veränderung der Temperatur der Medikamentenlösung hergestellt (Dhand, 2002) und effektiv in der Lunge deponiert werden (Dubus et al., 2005). So können sowohl Lösungen, als auch Suspensionen (Proteine, Peptide, DNA-Fragmente) ohne große Verluste fast rückstandsfrei vernebelt werden (Dhand, 2002).

Die Vor- und Nachteile der Flüssigverneblung werden von Voshaar et al. (2005) zusammengefasst:

- Vorteile:
- keine schwierige Koordination zwischen Verneblung und Inspiration nötig
  - für alle Altersklassen (auch für Kinder unter 4 Jahren) geeignet
  - Kombination unterschiedlicher Wirkstoffe möglich
  - verwendbar für Arzneimittellösungen, die weder für DPI, noch für MDI erhältlich sind
  - Kombination mit Physiotherapiegeräten möglich
  - in Notfallsituationen einsetzbar
  - in Beatmungssystemen einsetzbar
- Nachteile:
- Geräte zum Teil relativ groß und schlecht transportierbar
  - von externer Energiezufuhr (Akku oder Netz) oder von Druckluft abhängig
  - hohe Anschaffungskosten
  - relativ lange Inhalationsdauer
  - regelmäßige Reinigung erforderlich
  - relativ unpräzise Dosierung

### 2.2.2 Instillation

Eine weitere Möglichkeit Flüssigkeiten in die Lunge zu applizieren bietet neben der Aerosolinhalation auch die intratracheale Instillation. Die Instillation ist ein gebräuchlicher Weg, um z.B. exogenen Surfactant in die Lungen von Patienten mit ARDS einzubringen (Cogo et al., 2007; Schermuly et al., 2000). Auch in der Forschung wird die Instillation routinemäßig genutzt, um narkotisierten Versuchstieren Substanzen intrapulmonal über eine Sonde zu verabreichen. Die Instillation bietet den Vorteil einer akkuraten und schnellen Applikation der Testsubstanz in die unteren Atemwege bei gleichzeitiger Umgehung der Schutz- und Reinigungsmechanismen der oberen Atemwege. Besonders bei gefährlichen Substanzen ist es ein bedeutender Vorteil der Instillation, dass in der Regel nur wenig Material benötigt wird und dieses ohne Kontamination der Umgebung in die Lunge verbracht werden kann (Osier et al., 1997). Der Nachteil der Instillation liegt v.a. in der ungleichmäßigen Verteilung der Flüssigkeit in der Lunge (Leong et al., 1998; Oberdörster et al., 1997) mit überwiegender Ablagerung in den basalen Regionen (Osier et al., 1997). Die Instillation geringer Mengen (z.B. weniger als 2 ml bei der Ratte) führt häufig zu einer ungleichmäßigen Verteilung zwischen der rechten und der linken Lungenhälfte (Morrow, 1975). Viele Substanzen (z.B. suspendierte Partikel) verhalten sich nach Instillation völlig anders als nach Inhalation. Da die deutlich weniger invasive Inhalation die physiologischere Applikationsweise ist (Osier et al., 1997) und für die Anwendung am Menschen dementsprechend höhere Relevanz besitzt (Dorries and Valberg, 1992), ist die Inhalation der Instillation wenn möglich vorzuziehen.

## **2.3 Lungen-Modellsysteme**

### 2.3.1 Tiermodelle

#### 2.3.1.1 In vivo-Tiermodelle

Die Verwendung von Tiermodellen ist essentiell für die Untersuchung inhalierten Substanzen (Phalen, 2007), da hier Untersuchungen und Manipulationen möglich sind, die am Menschen nicht durchführbar wären (Cryan et al., 2007). Wegen der physiologischen und anatomischen Unterschiede zwischen Mensch und Tier (Mensch z.B. größere Anzahl an Alveolar-makrophagen, annähernd symmetrische Bronchialaufzweigung, breiteres Interstitium und Kapillarendothel) gibt es kein universell geeignetes Tiermodell (Cryan et al., 2007; Phalen, 2007), sondern es ist vielmehr nötig, für jede spezielle Fragestellung das geeignete Tiermodell zu finden. So werden z.B. Ratten (Leong et al., 1998) und Meerschweinchen häufig für die Untersuchung der pulmonalen Medikamentenapplikation verwendet, da hier nur eine geringe

## Literaturübersicht

Medikamentenmenge benötigt wird. Größere Tiere wie Kaninchen, Hunde, Schafe und Primaten werden meist für komplexere Studien verwendet oder wenn größere Mengen an Probenmaterial erforderlich sind (Cryan et al., 2007). Bei Untersuchungen der Aerosoldeposition ist zu beachten, dass die deponierte Gesamtmenge in der Lunge trotz unterschiedlicher Anatomie bei vielen Säugern mit ähnlichem Körpergewicht vergleichbar ist, während es jedoch hinsichtlich der regionalen Partikeldeposition größere Unterschiede gibt. Auch ist die Lungenclearance langsam löslicher Partikel deutlich speziesabhängig, während die Clearance schnell löslicher Partikel weniger abhängig von der Tierart ist (Phalen, 2007). Für pharmakokinetische Studien der Stoffabsorption aus der Lunge in die systemische Zirkulation ist am lebenden Tier jedoch nicht nur die Partikeldeposition und -clearance wichtig, sondern auch die systemische Verteilung, der Metabolismus und die Elimination der Testsubstanz sind von entscheidender Bedeutung. Der Nachteil von Versuchen am lebenden Tier ist, dass es durch den Einfluss anderer Organe sehr schwer sein kann, die lungenspezifischen Abläufe zu erkennen (Tronde et al., 2003). So gibt es kein in vivo-Modell zur Untersuchung der spezifischen pulmonalen metabolischen Aktivität ohne Beeinflussung der Ergebnisse durch andere Organe (Niemeier, 1984). Gut geeignet sind in vivo-Versuche jedoch z.B. für toxikologische (Wang et al., 2007) und allgemeine pharmakokinetische und -dynamische Studien (Perreault, et al., 1992; Vick et al., 2007), für Untersuchungen der Lungenentwicklung (Kikkawa et al., 1971) oder Krankheitsmodelle (Ischenko et al., 2007; Maris et al., 2004).

### 2.3.1.2 Ex vivo-Tiermodelle

Zur Untersuchung vieler Prozesse in der Lunge, die u.a. die Aerosolpartikelverteilung, absorption und -clearance betreffen, sind komplexe Systeme nötig, an denen diese Prozesse in intaktem Gewebe studiert werden können (Niemeier, 1984). Die Verwendung von isolierten, perfundierten und ventilierten Lungenmodellen bietet die Möglichkeit lungenspezifische Abläufe ohne systemische Beeinflussung durch extra-pulmonale Faktoren studieren zu können (Mobley und Hochhaus, 2001; Tronde et al., 2002). Trotz der Trennung der Lunge vom Rest des Organismus bleiben die Zellen im Gegensatz zu in vitro-Modellen in ihrem normalen anatomischen und physiologischen Verbund (Niemeier, 1984). Im isolierten ex vivo-Lungenmodell bleibt nicht nur die strukturelle und zelluläre Integrität, sondern auch die Permeabilität, Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen und metabolische Aktivität für bis zu 5 h erhalten (Tronde et al., 2002; 2003). Obwohl sich die isolierte Lunge dank der Erhaltung der Schrankeneigenschaften des respiratorischen Epithels (Bosquillon et al., 2007b)

## Literaturübersicht

für Untersuchungen der pulmonalen Medikamentenabsorption anbietet und eine gute Korrelation zu in vivo-Versuchen besteht, ist dieses arbeits- und kostenintensive Tiermodell nur schlecht als einfaches Screeningverfahren geeignet (Tronde et al., 2003).

### 2.3.2 In vitro-Modelle

Die Verwendung von Zelllinien stellt ein sehr nützliches Screeningverfahren zur Untersuchung der epithelialen Permeabilität und Absorption verschiedener Medikamente dar (Forbes et al., 2003; Tronde et al., 2003) und bietet so die Möglichkeit, Tierversuche auf ein geringeres Maß zu reduzieren. Eine häufig verwendete Zelllinie zur Untersuchung oral applizierbarer Medikamente sind die intestinalen Caco-2 Zellen, deren Relevanz für pulmonal verabreichte Medikamente jedoch fraglich ist (Tronde et al., 2003). Zwei vielversprechende Zellkulturen als Modell für die Medikamentenabsorption in den Atemwegen stellen u.a. die aus menschlichem Bronchialepithel gewonnenen Zelllinien Calu-3 und 16HBE14o dar (Forbes et al., 2003), die eine gute Korrelation zu in vivo-Versuchen aufweisen (Bosquillon et al., 2007a). Mathia et al. (2002) zeigen z.B. eine in vitro- in vivo - Korrelation der Medikamentenabsorption zwischen Calu-3 Zellen und der in vivo Rattenlunge von  $r^2 = 0,94$ .

### 2.3.3 Krankheitsmodelle

Die bereits beschriebenen Lungenmodelle gesunder Tiere können allerdings keinen Aufschluss über das möglicherweise andersartige Absorptionsverhalten geben, welches durch krankheitsbedingte Veränderungen in der Struktur und Funktion der Lunge entsteht (von Wichert und Seifart, 2005). Um die veränderten Bedingungen in erkrankten Lungen, genauso wie die Entstehung, Entwicklung und mögliche neue Therapieansätze unterschiedlicher Krankheiten des Respirationstrakts untersuchen zu können, dienen die verschiedensten Krankheitsmodelle. Die Verwendung experimenteller Tiermodelle mit durch äußere Faktoren induzierten Lungenerkrankungen sind deshalb so wichtig, da es ethische Limitationen natürlich weitgehend verbieten Versuche an erkrankten Menschen durchzuführen oder hier gar Krankheiten auszulösen. Daneben ermöglichen es experimentelle Krankheitsmodelle am Tier Experimente präzise zu planen und alle relevanten Parameter genau zu kontrollieren (Trosić et al., 1996). Bei den meisten Krankheitsmodellen handelt es sich um in vivo-Studien an verschiedenen Versuchstieren, wie z. B. die durch Lipopolysaccharide induzierte Lungenentzündung bei der Maus (Ischenko et al., 2007; Maris et al., 2004), die Bleomycin-induzierte Lungenfibrose bei Mäusen (Liu et al., 2007) und Ratten (Azoulay et al., 2003) und viele andere Erkrankungen an unterschiedlichen Tierarten wie u. a. Meerschweinchen

## Literaturübersicht

(Garcia-Contreras und Hickey, 2007), Hunden (Rosenthal, 2007), Katzen (Norris Reinero et al., 2004) und Schweinen (Forsgren et al., 1990). Neben der Verwendung von in vivo-Krankheitsmodellen gibt es auch die Möglichkeit, krankhafte Veränderungen an ex vivo-Lungenmodellen zu erzeugen. Ein Beispiel hierfür ist das Modell der pulmonalen Hypertonie, bei dem durch kontinuierliche Zugabe des Thromboxan A<sub>2</sub>-Analogons U-46619 eine Vasokonstriktion und somit ein pulmoanalarterieller Druckanstieg induziert wird (Walmrath et al., 1997; Schermuly et al., 2001a; 2001b; 2003).

### 3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

#### 3.1 Material und Methoden

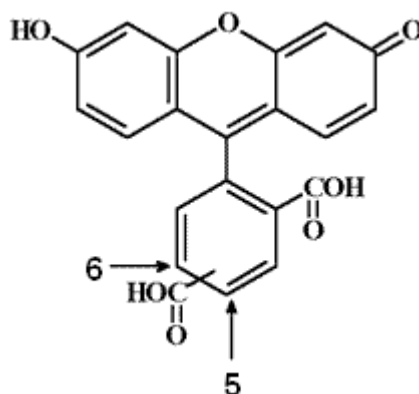
##### 3.1.1 Modellsubstanzen

##### 3.1.1.1 Carboxyfluorescein

5(6)-Carboxyfluorescein (CF; Fluka, Buchs, Schweiz) ist ein wasserlöslicher, gelber (in hohen Konzentrationen roter) Fluoreszenzfarbstoff, der schon mehrfach zur liposomalen Verkapselung verwendet und bereits hinsichtlich seiner pulmonalen Absorption untersucht wurde (Woolfrey et al., 1986; Yamamoto et al., 2004). CF besitzt hinsichtlich seiner Fluoreszenz eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert des umgebenden Milieus (Babcock, 1983). Diese pH-Wert-Abhängigkeit macht es notwendig die verwendete CF-Lösung auf einen pH von mindestens 7 zu puffern und alle in den Versuchen erhobenen Messdaten auf den verwendeten pH-Wert zu kalibrieren. CF besitzt eine ähnliche Struktur wie Fluorescein, jedoch mit zusätzlichen Carboxylgruppen an Position 5 oder 6 (das hier verwendete Produkt ist eine Mischung beider Isomere). Die wasserlöslichste und am stärksten fluoreszierende Form von CF liegt bei neutralem und alkalischem pH-Wert vor, in saurem Medium dagegen verliert CF an Löslichkeit und besitzt eine hohe Tendenz, Bindungen mit Proteinen und anderen biologischen Materialien einzugehen (Weinstein et al., 1986).

CF (CAS-Nummer 72088-94-9) besitzt folgende chemische Eigenschaften (<http://www.biotium.com/prodindex/other-ion/pH/51013.htm>; <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/FLUKA/21877>; Weinstein et al., 1986):

- Summenformel:  $C_{21}H_{12}O_7$
- Anregungs-, Emissionswellenlänge:  $\lambda_{ex} = 492 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em} = 517\text{-}520 \text{ nm}$
- Molekulargewicht: 376,32 g/mol
- $pK_a$  : 6,5
- Schmelzpunkt: 275 °C
- Strukturformel:



## Eigene Untersuchungen – Material und Methoden

Zur Herstellung von 100 ml einer CF-Stammlösung mit einer Zielkonzentration von 50 mg/ml und einem pH-Wert von 7,4 wurden 5 g CF in einem 100 ml Maßkolben mit 50 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) versetzt. Zur besseren Löslichkeit wurde unter ständigem Rühren tropfenweise Natriumhydroxid 10 M zugegeben bis keinerlei Pulverreste mehr vorhanden waren. Nach Auffüllen der Lösung mit PBS auf etwa 90 ml erfolgte die Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 und des Volumens auf 100 ml durch schrittweise Zugabe von PBS und NaOH 10 M, bzw. HCL 1 M. Diese Stammlösung wurde im Kühlschrank bei ca. 4 °C lichtgeschützt gelagert. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine CF-Lösung der Konzentration 500 µg/ml verwendet. Die Verdünnung auf 500 µg/ml, bzw. auf die für eine Messeichreihe notwendigen Konzentrationen, erfolgte durch Zugabe der entsprechenden Menge an PBS zu der hergestellten CF-Stammlösung (z. B. 1:100 Verdünnung für eine Endkonzentration von 500 µg/ml).

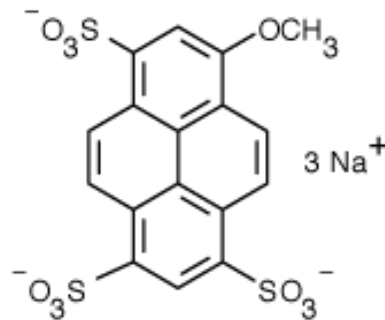
### 3.1.1.2 Trinatium 8-Methoxyppyren-1,3,6-Trisulfonsäure

Eine weitere wasserlösliche Substanz ist der superpolare Fluoreszenzfarbstoff Trinatium 8-Methoxyppyren-1,3,6-Trisulfonsäure (MPTS; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Der gelbe Fluoreszenzfarbstoff MPTS wird durch kationische Moleküle statisch gequench (d.h. durch Anlagerung dieser Moleküle an den Farbstoff wird die Fluoreszenz vermindert), was zum spezifischen Nachweis schon geringer Mengen an kationischen Lösungsmitteln (zum Beispiel zur Untersuchung von Wasserverschmutzungen) verwendet werden kann (Marhold et al., 1990).

MPTS besitzt die CAS-Nummer 82962-86-5 und hat folgende chemische Eigenschaften (Marhold et al., 1990; <http://probes.invitrogen.com/servlets/structure?item=395>; <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/FLUKA/65325>):

- Summenformel:  $C_{17}H_9Na_3O_{10}S_3$
- Anregungs-, Emissionswellenlänge:  $\lambda_{ex} = 404 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em} = 431 \text{ nm}$  in  $H_2O$
- Molekulargewicht: 538,41 g/mol
- Schmelzpunkt: 253-260 °C

- Strukturformel:



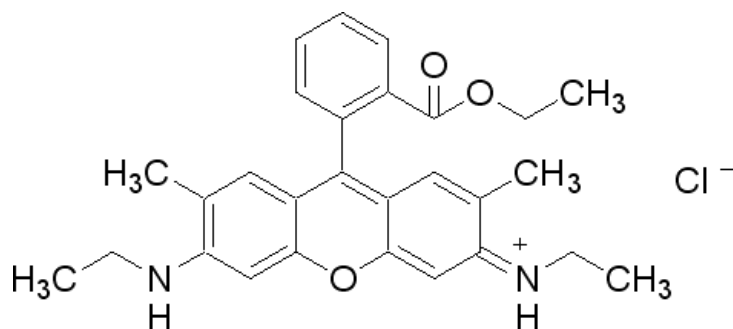
Für die Versuche im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde MPTS, welches als Pulver lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert wurde, in einer Konzentration von 500 µg/ml in NaCl 0,9% gelöst. Durch weitere Verdünnungen mit isotoner Kochsalzlösung wurden die für die Eichreihen erforderlichen Konzentrationen hergestellt.

### 3.1.1.3 Rhodamin

Rhodamin 6G (R6G; Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) ist ein lipophiler, roter Fluoreszenzfarbstoff, der bereits erfolgreich zur Verkapselung in Nanopartikeln eingesetzt werden konnte (Bourges et al., 2003; Roy et al., 2004).

R6G (CAS-Nummer 989-38-8) besitzt folgende chemische Eigenschaften (Duvvuri et al., 2004; <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIAL/252433>):

- Summenformel:  $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$
- Anregungs-, Emissionswellenlänge:  $\lambda_{ex} = 528 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em} = 551 \text{ nm}$
- Molekulargewicht: 479,01 g/mol
- $pK_a$ : 7,5
- Strukturformel:



Zur Herstellung einer R6G-Lösung wurde das rötlich-braune Pulver in einer Konzentration von 500 µg/ml in PBS (pH 7,4) durch mindestens zweiminütiges Schütteln gelöst. Aus dieser Stammlösung wurden durch Zugabe von PBS verschiedene Verdünnungsstufen zur Eichung



des Fluoreszenzreaders angefertigt. Zur Fluoreszenzmessung mussten sämtliche R6G enthaltende Proben unmittelbar vor der Messung 1:1 mit Ethanol versetzt werden. Dieser Schritt war notwendig, da sich R6G zwar in PBS lösen lässt, hier aber nur eine unzureichende Fluoreszenz zeigt. Erst nach Zugabe der gleichen Menge an Ethanol zu den Proben wurde die Fluoreszenz in ausreichendem Maße detektierbar.

### 3.1.1.4 Salbutamol

Salbutamol, eine Substanz des Arzneibuchs, ist ein weißes, geruchloses, kristallines Pulver mit einem Molekulargewicht von 239,3 g/mol. Salbutamol ist als sekundäres aliphatisches Amin eine Base ( $pK_a = 9,07$ ) und als Phenol zugleich eine schwache Säure ( $pK_a = 10,37$ ). Bei physiologischem pH-Wert liegt hauptsächlich das Kation vor. Gebräuchlicher als Salbutamol in Form der freien Base ist das besser lösliche Salz Salbutamolsulfat. Dabei handelt es sich um ein direktes  $\beta_2$ -Sympathomimetikum mit typischer Phenylethylamin-Grundstruktur, wobei die Substitution am Stickstoff die Affinität zu den  $\beta$ -Rezeptoren erhöht und die zusätzliche Substitution des Phenylringes das Molekül vor dem Abbau durch Catechol-O-Methyl-Transferase schützt (Lohrmann, 2005; Schöttle, 2006).

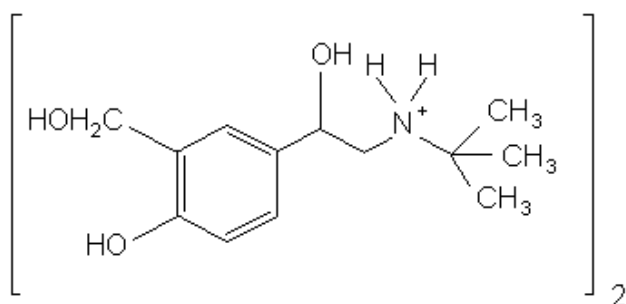


Abb. 5: Strukturformel von Salbutamolsulfat (Lohrmann, 2005).

Das kurz wirksame  $\beta_2$ -Sympathomimetikum liegt in Form zweier optischer Isomere (Enantiomere) als (R)- und (S)-Salbutamol vor. Therapeutisch verwendetes Salbutamol ist ein Racemat, bei welchem beide Formen zu etwa gleichen Teilen enthalten sind (Broadley, 2006). Die (S)-Form, die schneller abgebaut wird als die (R)-Form, hat nach Page and Morley (1999) keine  $\beta_2$ -sympathomimetischen Eigenschaften, verstärkt jedoch v.a. bei chronischer Anwendung das Auftreten von Nebenwirkungen. Obwohl Boulton und Fawcett (2001) behaupten, dass die klinischen Vorteile durch reines (R)-Salbutamol (Levosalbutamol) gegenüber dem Racemat nur gering sind, zeigt das teurere Levosalbutamol therapeutische Vorteile und besitzt bessere Eigenschaften hinsichtlich der Nebenwirkungen (Gupta und Singh, 2007).

Salbutamolsulfat ist in Wasser (250 g/l) löslich, schmilzt bei 157 °C und besitzt ein Molekulargewicht von 576,7 g/mol (Schöttle, 2006). Der pK<sub>a</sub> von Salbutamolsulfat liegt bei etwa 9,8 und der log P-Wert als Maß für die Lipophilie beträgt ca. 0,02 (Desaphy et al., 2003).

Das im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendete Salbutamolsulfat, welches von der Boehringer-Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG (Ingelheim am Rhein, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurde, lag als sprühgetrocknetes mikronisiertes Pulver sowohl frei, als auch - zur Verwendung im HandiHaler® (Boehringer-Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland) - abgewogen in Kapseln vor. Die Partikelgrößen des mikronisierten Pulvers lagen bei 2,25 µm mit einer Feinpartikelfraktion von 41,58 %. Im Rahmen der eigenen Versuche wurde Salbutamolsulfat entweder direkt als Pulver (lose eingewogen oder in Kapseln) vernebelt oder es wurde für die Experimente mit dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System eine Salbutamollösung hergestellt. Dazu wurde Salbutamolsulfat in den Konzentrationen 1, 10 und 100 mg/ml in isotoner Kochsalzlösung gelöst.

### 3.1.2 Bestimmung des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten

Der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient beschreibt das Verhältnis der Gleichgewichtskonzentrationen einer gelösten Substanz in einem Zweiphasensystem bestehend aus 1-Octanol und Wasser und wird üblicherweise als dekadischer Logarithmus (log P) angegeben. Die Berechnung des dimensionslosen Verteilungskoeffizienten erfolgt dabei nach:

$$P = C_{\text{Octanol}}/C_{\text{Wasser}}$$

C<sub>Octanol</sub> = Konzentration in der Octanolphase

C<sub>Wasser</sub> = Konzentration in der Wasserphase

Die Messung des Verteilungskoeffizienten wurde in Form der „shake-flask“ Methode gemäß der OECD-Richtlinie 107 (OECD, 1995) durchgeführt, wobei als wässrige Phase statt Wasser PBS-Puffer (pH 7,4) für CF und R6G und 0,9%iges NaCl für MPTS verwendet wurde. Vor Versuchsbeginn wurden die verwendeten Lösungsmittel, Octanol (1-Octanol 99 %, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und PBS, bzw. NaCl mit der jeweils anderen Phase vorgesättigt, indem Octanol mit PBS oder NaCl (und umgekehrt) versetzt und die Gemische

24h geschüttelt wurden. Danach mussten die Lösungen solange stehen, bis sich die zwei Phasen vollständig getrennt hatten. Der Gehalt an Testsubstanz, der im Versuch eingesetzt wurde, richtete sich nach der minimalen Nachweisgrenze in jeder Phase und einer Maximalkonzentration von 0,01 mol/l. Um eine höhere Genauigkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden Mehrfachansätze mit verschiedenen Konzentrationen jeder Testsubstanz angefertigt. Die Abweichung vom Mittelwert darf gemäß der OECD-Richtlinie 107 (OECD, 1995) dabei nicht mehr als  $\pm 0,3$  betragen.

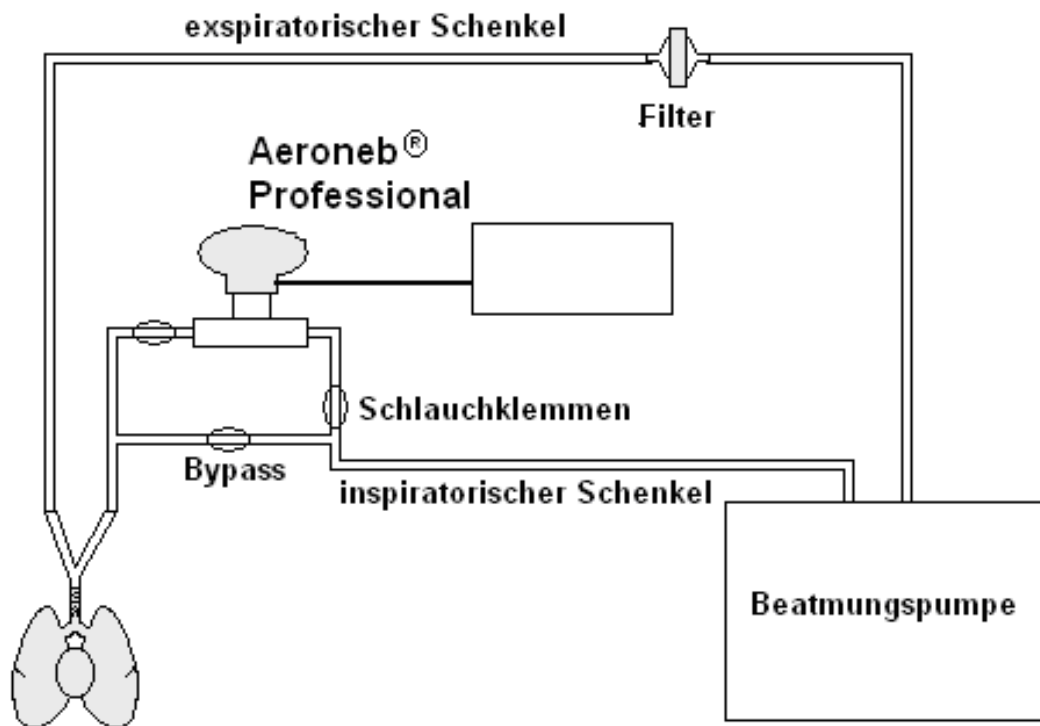
Der lipophile Farbstoff R6G wurde in einer Konzentration von 3,0 mg/ml (n = 4), 1,5 mg/ml (n = 1) und 0,6 mg/ml (n = 1) in einem Milliliter des vorgesättigten Octanols gelöst, wonach die gleiche Menge PBS-Puffer zugesetzt wurde. Die beiden hydrophilen Farbstoffe wurden in der wässrigen Phase wie folgt gelöst: 3, 2 und 1 mg/ml CF in PBS (je n = 2) und 4 (n = 1), 2 (n = 3) und 1 mg/ml (n = 1) MPTS in 0,9 %iger Kochsalzlösung. Nach Zufügen der gleichen Menge an 1-Octanol wurden alle Proben mindestens 5 Minuten lang von Hand geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Nach Trennung der beiden Phasen wurde der Farbstoffgehalt in der Phase mit dem niedrigeren Farbstoffgehalt (R6G in PBS und MPTS und CF in Octanol) mittels Fluoreszenzreader bestimmt. Der Gehalt an Farbstoff in der jeweils anderen Phase errechnete sich durch Abzug der vorher ermittelten Konzentration von der eingesetzten Gesamtkonzentration. Zur Messung von CF, welches wegen seiner pH-Abhängigkeit nicht direkt im Octanol messbar war, wurde die Octanol-Phase nochmals 1:1 mit PBS versetzt und schließlich nach gründlichem Durchmischen und Zentrifugieren der CF-Gehalt in der PBS-Phase bestimmt.

### 3.1.3 Verneblung

Zur Anwendung kamen im Rahmen dieser Doktorarbeit zwei verschiedene Pulver- und zwei Flüssigvernebler. Bei den Flüssigverneblern handelte es sich um folgende piezoelektrische Vernebler: Aeroneb<sup>®</sup> Professional (Aerogen, Dangan, Galway, Irland) und das im Rahmen dieser Studie neu entwickelte und zum Patent angemeldete AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System (Activaero GmbH, München, Deutschland). Zur Trockenpulververneblung wurde der kommerziell erhältliche DP-4 Dry Powder Insufflator<sup>™</sup> (PennCentury<sup>™</sup>, Philadelphia, USA) sowie der in Zusammenarbeit mit der Firma Activaero GmbH entwickelte und patentierte Aerosol Dispenser verwendet.

3.1.3.1 Aeroneb® Professional

Der Aeroneb® Professional wurde zur Verneblung mit 3 ml der entsprechenden Flüssigkeit befüllt und solange betrieben, bis das Flüssigkeitsvolumen weitgehend (bis auf einen geringen Rest von ca. 0,35 ml) vernebelt war (ca. 8 min). Zur Kontrolle des Outputs und der Verneblerleistung wurde neben der Verneblungsdauer auch das Gewicht des Gerätes vor und nach jeder Verneblung bestimmt. Der Einbau des Verneblers in das Beatmungssystem des Kaninchenlungenmodells erfolgte durch Integration eines T-Stückes mit dem Verneblerkopf in den inspiratorischen Schlauch (s. Abb. 6). Durch einen abklemmbaren Bypass wurde der inspiratorische Luftstrom so gelenkt, dass er den Vernebler nur während der Verneblungsphase passierte und außerhalb dieser Zeit den Verneblerkopf umging.



**Isolierte Kaninchenlunge**

Abb. 6: Darstellung der Integration des piezoelektrischen Verneblers Aeroneb® Professional in das Beatmungssystem am Modell der isolierten Kaninchenlunge.

Die Deposition einer mit dem Aeroneb® Professional vernebelten Flüssigkeit in der isolierten Kaninchenlunge wurde bereits in früheren Studien unter Verwendung des gleichen Beatmungssystems und des gleichen Verneblers untersucht (Gessler et al., 2007). Dazu wurde (ähnlich der in Kapitel 3.1.5.1 beschriebenen Charakterisierung des AKITA<sup>2</sup>APIXNEB) eine

<sup>99m</sup>Tc-Technetium-Kochsalzlösung in die Lunge vernebelt und die Radioaktivität mittels Gammacounter (Raytest, Straubenhardt, Deutschland) bestimmt. Diese Versuche ergaben, dass bei einem durch Wiegen bestimmten Output von  $2,65 \pm 0,15$  ml während einer Verneblungsdauer von  $8,0 \pm 0,2$  min  $0,40 \pm 0,05$  ml in der Lunge und  $0,38 \pm 0,02$  ml im expiratorischen Teil des Beatmungssystems deponiert wurden (Lahnstein et al., 2007). Aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit dieser Messungen und um unnötige Kaninchenversuche zu vermeiden, wurde in den folgenden Versuchen mit dem Aeroneb<sup>®</sup> Professional auf die bereits ermittelte Deposition von im Mittel 0,4 ml in der Kaninchenlunge zurückgegriffen.

### 3.1.3.2 AKITA<sup>2</sup>APIXNEB

Bei diesem Gerät handelt es sich um eine elektronische und pneumatische Steuer- und Versorgungseinheit (AKITA<sup>2</sup>) und eine von Activaero GmbH entwickelte Variante des eFlow-Verneblers namens APIXNEB. Im Gegensatz zum Dauerbetrieb der meisten herkömmlichen Verneblersysteme ermöglicht die Steuerung von Zeitpunkt und Dauer der Verneblung durch die AKITA<sup>2</sup>-Einheit eine Beschränkung der Verneblung auf die Inspirationsphase. Ein Drucksensor an der AKITA<sup>2</sup> registriert dabei die Druckänderung im Beatmungssystem während der Inspiration und löst daraufhin eine Verneblungsphase aus. Nach einer definierten Dauer von 0,7 s und somit vor Beendigung der Inspiration wird die Verneblung unterbrochen, um einen unnötigen Verlust des Wirkstoffes im Schlauchsystem zu verhindern.

Für die Anwendung am Modell der isolierten Kaninchenlunge wurde die AKITA<sup>2</sup> so programmiert, dass sie bei Erreichen eines Druckes von 5 mbar automatisch und inspirationsgetriggert die Verneblung für einen Zeitraum von 0,7 s startete.

Bei der Anpassung des für die Anwendung am Menschen konzipierten Verneblungssystems an das Modell der isolierten Kaninchenlunge mit seiner hohen Atemfrequenz von 30 Atemzyklen pro Minute traten jedoch Probleme auf. Daher musste die Beatmungsfrequenz von 30 auf 26 Atemzüge/min reduziert und zum Ausgleich das Atemzugvolumen von 30ml auf 35ml angehoben werden. Durch diese geringfügige Änderung konnte das Atemminutenvolumen annähernd beibehalten werden. Das AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System wurde ähnlich dem Aeroneb<sup>®</sup> Professional in den inspiratorischen Beatmungsschlauch eingebaut (s. Abb. 7). Durch ein T-Stück ebenfalls mit dem inspiratorischen Schlauch verbunden, befand sich noch vor Vernebler und Bypass der Drucksensor zur Ermittlung des Beatmungsdruckes.

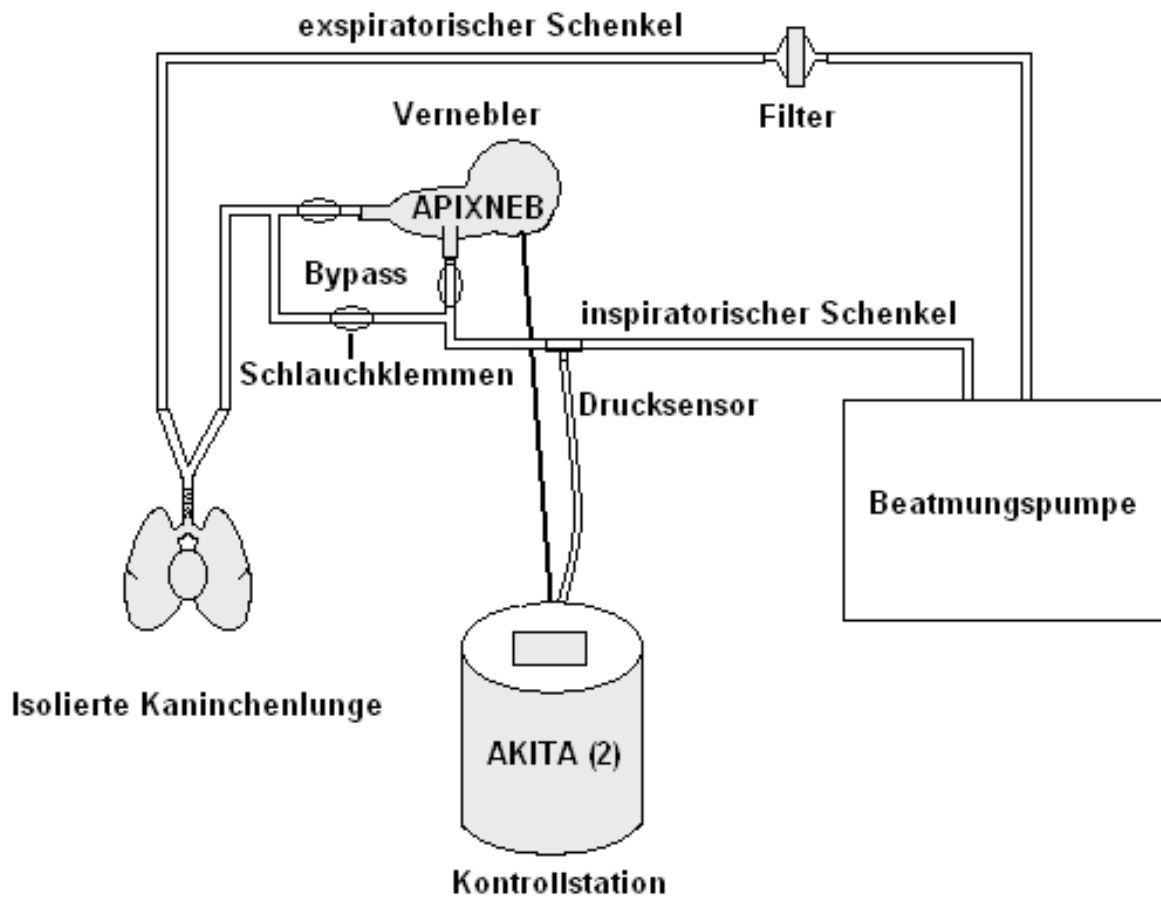


Abb. 7: Darstellung des AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-Systems im Beatmungssystem am Modell der isolierten Kaninchenlunge.

Zur Anwendung des AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-Systems wurden 4 ml der zu untersuchenden Substanz in das Gerät gefüllt und für 10 min vernebelt. Während bei dem Aeroneb<sup>®</sup> Professional die Flüssigkeit bis auf eine geringe Restmenge vernebelt und die benötigte Zeit gestoppt wurde, wurde hier die Verneblung nach 10 min beendet, ohne dass das Füllvolumen geleert wurde. Welche Menge an Flüssigkeit dabei das Gerät verließ, wurde durch vorheriges und anschließendes Wiegen mit einer Präzisionswaage (Mettler Toledo GmbH, Giessen, Deutschland) bestimmt.

### 3.1.3.3 DP-4 Dry Powder Insufflator<sup>™</sup>

Der DP-4 Dry Powder Insufflator<sup>™</sup> wurde zur Verneblung mit 1 mg mikronisiertem Salbutamolpulver befüllt und so positioniert, dass der untere Teil der Kanüle parallel zur Trachea verlief. Die Auslösung des Pulverstoßes erfolgte mittels einer dem DP-4 aufgesetzten Spritze mit einem Volumen von 10 ml. Das Gerät wurde vor und nach jeder Verneblung gewogen. Zur Anwendung an der isolierten Kaninchenlunge (s. Abb. 8) wurde die Kanüle des

DP-4 Dry Powder Insufflator™ luftdicht derart in den Beatmungstubus eingebaut, dass das Ende der Kanüle ca. 1 cm vor der Bifurcatio tracheae mündete. Um zu verhindern, dass eine Behinderung der Pulververneblung dadurch entstand, dass die Kanüle die Wand der Trachea berührte, wurde eine Drahtspange um die Kanüle im Tubus befestigt und somit ein gleichmäßiger Wandabstand gewährleistet.

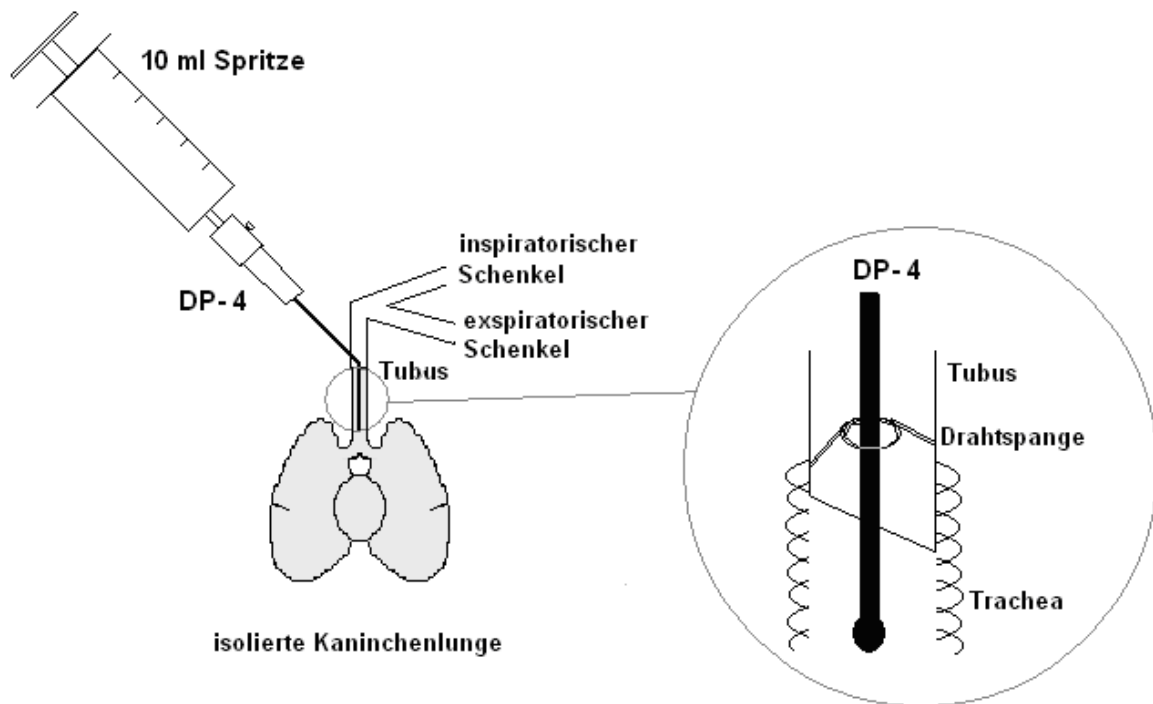


Abb. 8: Darstellung des DP-4 Dry Powder Insufflator™ im Beatmungstubus der isolierten Kaninchenlunge.

Die Pulververneblung am Kaninchenmodell wurde nach folgendem Schema durchgeführt: zu Beginn einer mittels Beatmungspumpe von 1 s auf 2 s verlängerten Inspiration wurde der erste Pulverstoß ausgelöst. Unmittelbar danach wurde durch das Abklemmen der Beatmungsschläuche noch vor Beginn der Expiration eine statische Blähung der Lunge erzeugt. In diesem Zustand wurde ein zweiter Pulverstoß ausgelöst. Eine Minute nach der zweiten Pulververneblung, in der dem Pulver Zeit zur Sedimentation blieb, wurde die Beatmung wieder mit normaler Beatmungsfrequenz (30/min) gestartet. Als die in der Lunge deponierte Menge wurde der durch Wiegen bestimmte Output abzüglich des wieder abgeatmeten Pulvers angenommen. Die Menge des ausgeatmeten Salbutamolpulvers wurde durch Spülung des expiratorischen Beatmungstückes und Messung der Spüllösung mittels HPLC bestimmt.

#### 3.1.3.4 Small Animal Dry Powder Aerosol Dispenser

Bei dem im Rahmen dieser Studie neu entwickelten Small Animal Dry Powder Aerosol Dispenser (Aerosol Dispenser) handelt es sich um eine Kombination, bestehend aus einem Trockenpulverinhalator (HandiHaler<sup>®</sup>, Boehringer-Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland), bei welchem das Trockenpulver in einer leicht befüll- und austauschbaren Kapsel enthalten ist, einem den HandiHaler<sup>®</sup> umgebenden Gehäuse mit Verneblerkammer (Volumen 800 ml; s. Abb. 9) und einer AKITA(1)-Kontrolleinheit. Ziel der Entwicklung dieses Gerätes war es, ein gleichmäßig dispergiertes Pulveraerosol für die Inhalation an einem Tiermodell zu erzeugen, ohne die mitunter sehr kleinen Tierlungen den zur Dispersion benötigten hohen Luftflüssen aussetzen zu müssen.

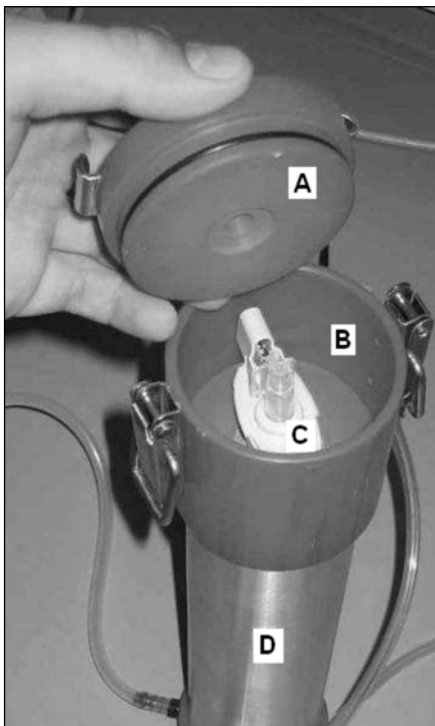


Abb. 9: Darstellung des Aerosol Dispenser mit einem Anschluss für den Dispersionsimpuls im Deckel (A), Gehäuse für den HandiHaler<sup>®</sup> (B), HandiHaler<sup>®</sup> (C) und Verneblerkammer (D) [Foto: Activaero GmbH, München, Deutschland].

Zur Bildung eines Aerosols aus dem in der Kapsel als Agglomerat vorliegenden Pulver benötigt man einen hohen Luftfluss. Zur Bereitstellung eines ausreichend hohen Luftflusses dient das AKITA(1)-System, welches kurzzeitig einen Fluss von 60 l/min liefern kann. Das System wurde so eingestellt, dass dieser Dispergierimpuls (s. Abb. 10) über einen Zeitraum von 400 ms durch den HandiHaler<sup>®</sup> hindurch in die Verneblerkammer (Spacer) abgegeben wurde.



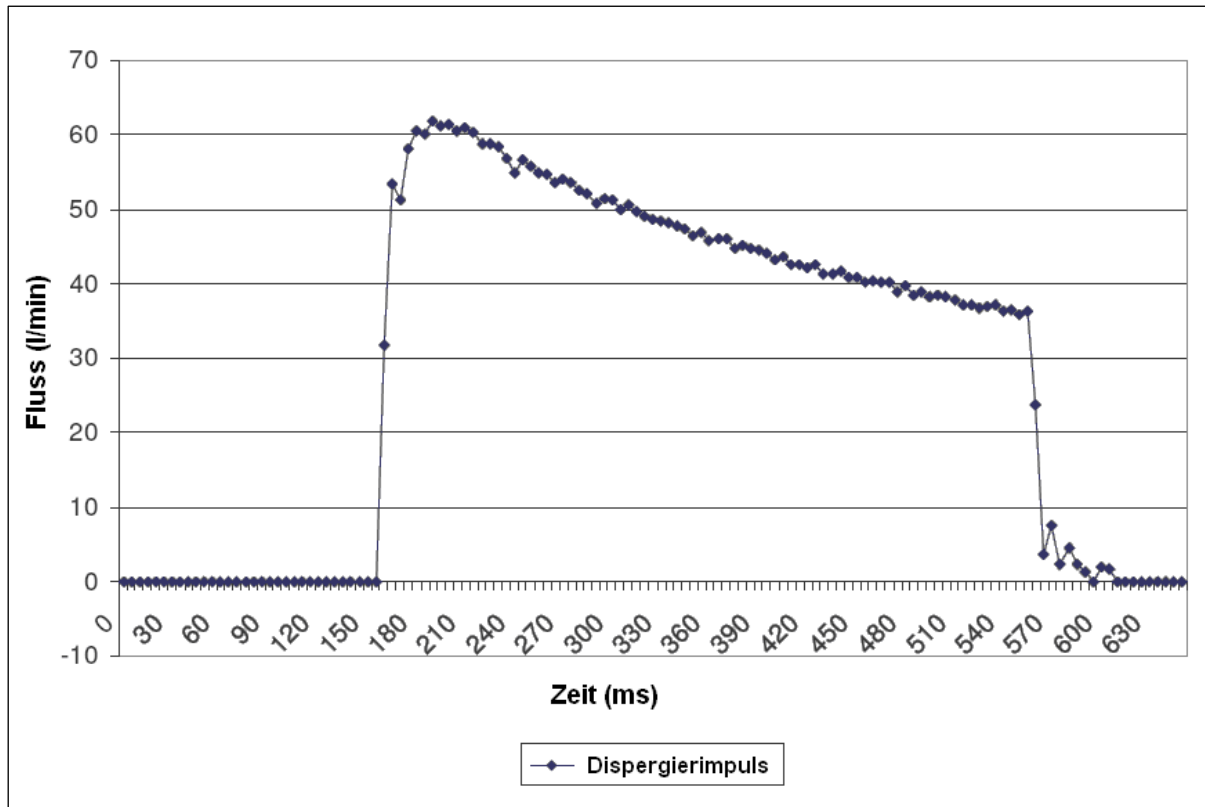


Abb. 10: Zeit/Fluss-Diagramm des Dispersionsimpulses der AKITA(1) [Activaero GmbH, München, Deutschland].

Nach Einbau des Verneblungssystems in den inspiratorischen Beatmungsteil des Lungenmodells (s. Abb. 11) gestaltete sich der Ablauf der Verneblung wie folgt: während das Verneblersystem über einen Bypass zum Schutz der Lunge vor dem auslösenden Luftstoß umgangen wurde, desagglomerierte die mittels AKITA(1) durch den HandiHaler<sup>®</sup> geblasene Luft das Trockenpulver und nahm es auf. Dabei konnte die bereits im Spacer enthaltene überschüssige Luft über eine Auspufföffnung (Auslass) im Sockel des Spacers entweichen. Unmittelbar danach wurde die Beatmungsluft der isolierten Kaninchenlunge über magnetisch steuerbare Schlauchquetschventile (Magnetumschalter) für mehrere Minuten durch den Spacer geleitet, und so das Aerosol in die Lunge transportiert. Nach dieser Zeit wurde die Ventilationszirkulation wieder über den Bypass vorbei am Spacer geleitet und eine neue Verneblung ausgelöst.

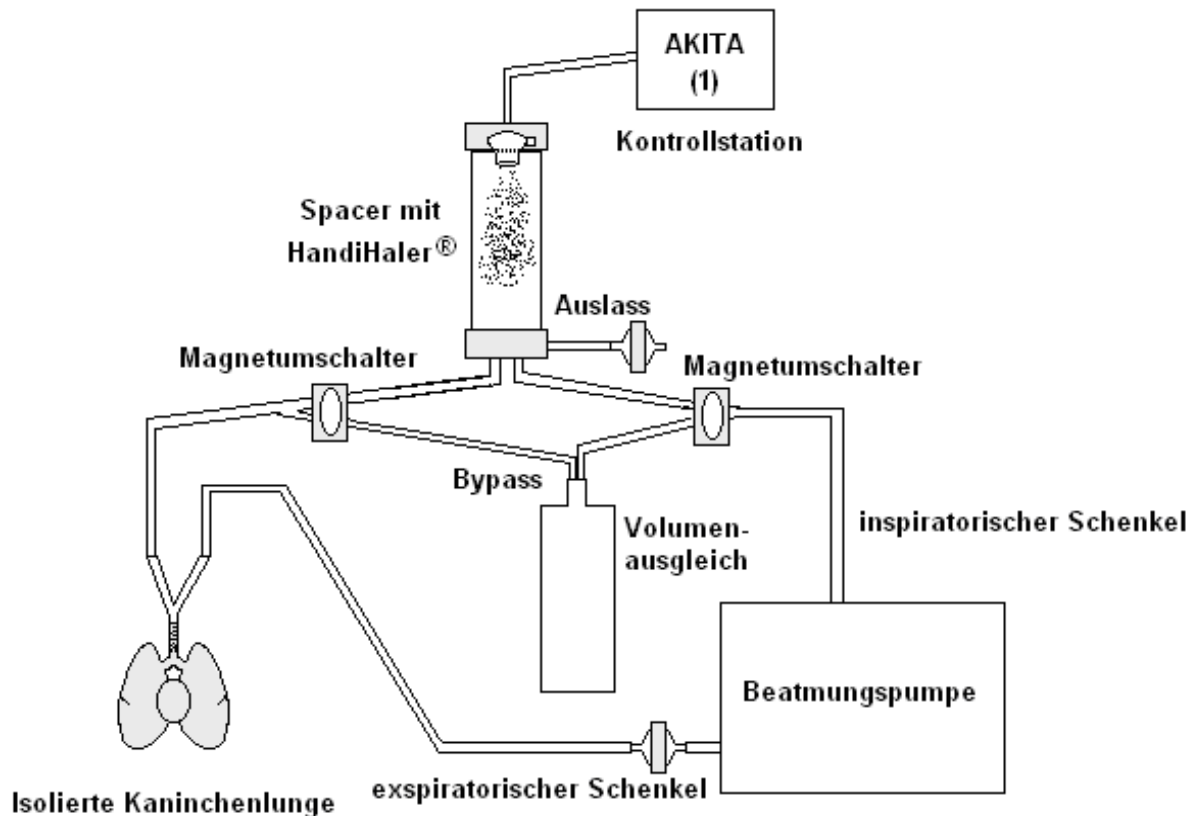


Abb. 11: Darstellung des Pulververneblers im Beatmungssystem am Modell der isolierten Kaninchenlunge.

Um eine komplette Abatmung des Pulvers aus dem Spacer (Volumen 800 ml) und eine größtmögliche Entleerung der Kapsel zu gewährleisten, wurde die Verneblung mit ein und derselben Kapsel dreimal ausgelöst und die Kammer für je 2 min mit einem vorgegebenen Atemminutenvolumen von 900 ml in den Ventilationskreislauf geschaltet. Zur Charakterisierung des Verneblers wurde zusätzlich eine Versuchsreihe mit 4 x 3 min durchgeführt. Im Verlauf der Entwicklung und Charakterisierung des Systems wurde im Rahmen dieser Arbeit außer mit unterschiedlichen Verneblungsmodi auch mit verschiedenen Systemaufbauten experimentiert. Elektrostatische Aufladungen im Schlauch- und Verneblersystem haben z.B. zur Folge, dass sich die Aerosolpartikel, welche oft elektrische Ladungen tragen, bereits im System abscheiden. Um diese Problematik in den Griff zu bekommen, wurden die ursprünglich vorhandenen Gummischläuche („ursprüngliches System“) des inspiratorischen Systems durch Schläuche aus leitendem Kunststoff mit Verbindungsstücken aus Metall ersetzt. Nun konnten sowohl Schläuche als auch der aus Aluminium, Messing und PVC bestehende Spacer leitend verbunden und geerdet werden („neues System“). Um das System von äußeren Umwelteinflüssen (Luftfeuchtigkeit)

unabhängiger zu machen, wurde nicht nur die Beatmungspumpe, sondern auch die AKITA(1) zur Desagglomeration des Pulvers mit trockener Luft gespeist („neues System, Verwendung von trockenem Gas“). Nachdem so im Laufe der Entwicklung des Gerätes verschiedene Variationen ausprobiert wurden, wurden die Versuche an der isolierten Kaninchenlunge schließlich mit geerdetem System, mit ausschließlicher Zufuhr von trockener Druckluft und einem Verneblungsmodus von 3 x 2 min durchgeführt.

### 3.1.4 Aerosolpartikelgrößen

#### 3.1.4.1 Laserdiffraktometrie

Die Laserdiffraktometrie beruht auf der Grundlage der Lichtbeugung und ermöglicht eine schnelle und reproduzierbare Messung der Partikelgrößen eines Partikelkollektivs. Dabei erzeugen die Partikel in Abhängigkeit ihrer Form und Größe unterschiedliche Lichtbeugungsmuster, aus denen auf die Größenverteilung der Teilchen geschlossen werden kann. Die mathematischen Algorithmen zur Berechnung der Teilchengröße gehen von idealrunden Partikeln aus. Weichen die tatsächlich zu messenden Partikel von dieser Form ab, können jedoch Messfehler auftreten (Schöttle, 2006).

Die Auswertung und Berechnung der Partikelgrößen erfolgt von der zum Laserdiffraktometer zugehörigen Software wahlweise nach der Fraunhofer-Theorie (HRLD) oder der Mie-Theorie. Die Fraunhofer-Theorie, die keine Kenntnisse über optische Parameter der zu untersuchenden Partikel benötigt, ist gültig für Partikel oberhalb von ca. 2 µm. Eine bessere Beschreibung der Partikel im Submikronbereich bietet die Mie-Theorie, die für sphärische Partikel beliebiger Größe gültig ist. Für die Anwendung der Mie-Theorie muss jedoch der komplexe Brechungsindex der untersuchten Substanz bekannt sein.

In den folgenden Versuchen wurden die Ergebnisse der Flüssigaerosole im Mie-Modus ausgewertet, die der Trockenpulver allerdings im HRLD- (Fraunhofer)-Modus, da die optischen Eigenschaften der verwendeten Pulver unbekannt waren.

Wichtige Parameter zur Charakterisierung eines Aerosols hinsichtlich Partikelgröße und Größenverteilung sind der MMAD (Mass Median Aerodynamic Diameter) und die GSD (Geometric Standard Deviation). Der MMAD beschreibt den aerodynamischen Teilchendurchmesser, der sich (z.B. aufgrund der Dichte der Teilchen) deutlich vom geometrischen Durchmesser eines Teilchens unterscheiden kann und daher definiert ist als der Durchmesser einer Kugel der Dichte 1 g/cm<sup>3</sup>, die in Luft genauso schnell fällt, wie das betrachtete Teilchen (Scheuch, 1997). Die GSD ist ein Maß für die Breite der Verteilung der Partikelgrößen.

3.1.4.1.1 Partikelgrößen der Flüssigaerosole

Zur Bestimmung der Partikelgrößen der Flüssigaerosole diente ein Laserdiffraktometer (Sympatec, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland). Die Verneblung der Fluoreszenzfarbstoffe und der Salbutamolösungen, jeweils im Vergleich zu isotoner Kochsalzlösung, erfolgte bei beiden piezoelektrischen Verneblern mit einem aus einer Druckluftflasche zusätzlich zugeführten Luftstrom von 2 und 10 l/min (je  $n = 6$  für jede Lösung und jeden Gasfluss). Zur besseren Kanalisation des Aerosols wurde den Verneblern eine Spritze aufgesetzt, durch die die Aerosolwolke den Vernebler gebündelt und leichter kontrollierbar verlief. Die Vernebler mit aufgesetzter Spritze wurden bei allen Messungen in einer Entfernung von ca. 3 cm zum Laserstrahl so platziert, dass die Aerosolwolke den Laserstrahl mittig durchquerte. Um eine schnelle Passage des Aerosols zu gewährleisten und eine Mehrfachmessung der Partikel zu verhindern, wurde der erzeugte Nebel von einem in ca. 10 cm Entfernung hinter dem Laserstrahl aufgestelltem Staubsaugerrohr abgesaugt. Für alle Messungen wurde eine R2 Linse (Brennweite 50 mm; Messbereich 0,25 bis 87,5  $\mu\text{m}$ ) verwendet. Während einer Gesamtmessdauer von 2 s erfolgten 40 Messzyklen von je 50 ms. Bei dieser Versuchsreihe wurde das AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System zur Erleichterung der Messungen so eingestellt, dass eine kontinuierliche Verneblung über einen Zeitraum von 25 s möglich war.

Um den Bedingungen in den späteren Versuchen am isolierten Lungenmodell (ILM) möglichst nahe zu kommen, wurde die Größenverteilung der Aerosolpartikel in einer weiteren Versuchsreihe nicht direkt am Vernebler, sondern am Ende des Schlauchsystems, welches zur Beatmung der Lunge verwendet wurde, gemessen. Dabei wurde eine Beatmungspumpe (cat/rabbit Ventilator; Hugo Sachs Elektronik, March Hugstetten, Deutschland) zur Erzeugung eines Luftstroms verwendet (je  $n = 6$  für alle Lösungen). Wie bei den ILM-Versuchen wurde die Beatmungspumpe auch hier auf 30 Atemzüge mit je 30 ml für den Aeroneb<sup>®</sup> Professional und 26 Atemzüge pro Minute mit einem Volumen von 35 ml pro Atemzug für das AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System eingestellt. Im Gegensatz zum Kaninchenlungenmodell, bei dem das AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System automatisch den Beatmungsdruck misst und die Verneblung inspirationsgetriggert auslöst, musste die Verneblung zur Partikelgrößenmessung wegen des fehlenden Druckes, der normalerweise durch die Lunge aufgebaut wurde, manuell mit jeder Inspiration durch Druck auf den Sensor-Schlauch ausgelöst werden. Wegen der relativ kurzen Inspirationsphase konnte bei diesen Versuchen eine Messzeit von 2 Sekunden nicht eingehalten werden. Daher waren die Einstellungen hier derart gestaltet, dass die Messung bei einer von dem Gerät ermittelten

optischen Konzentration von über 2 % automatisch gestartet wurde und nach Abfall der optischen Konzentration auf unter 1 %, spätestens aber nach einer Sekunde wieder endete.

### 3.1.4.1.2 Partikelgrößen der Pulveraerosole

Für die Charakterisierung der Partikelgrößen des Pulveraerosols wurde ebenfalls die automatische Messung nach Erreichen der notwendigen optischen Konzentration gewählt. Zur Verneblung wurde der DP-4 in 3 cm Abstand vor dem Laserstrahl positioniert und mit einer aufgesetzten Spritze und einem Volumen von 10 ml zügig ausgelöst (n = 6). Auch bei den Trockenpulvern wurde der erzeugte Pulverstoß hinter dem Laserstrahl wieder abgesaugt. Die Messung des Aerosols aus dem Aerosol Dispensor erfolgte nach Auslösen der Kapsel durch die AKITA(1) direkt am HandiHaler® (n = 4).

### 3.1.4.2 Andersen-Impaktor

Der verwendete Andersen-Impaktor (Andersen Cascade Impactor, Copley Scientific, Nottingham, England) ist ein Kaskaden-Impaktor bestehend aus einem Halsteil, einem Präseparator, acht Abscheidestufen und einem Filter. Die acht Stufen bestehen jeweils aus einer Prall- und einer Lochplatte und sind so übereinander angeordnet, dass die Partikel je nach Größe entweder auf der Prallplatte impaktieren oder um die Abscheideplatten herum zur nächsten Stufe strömen können. Mit fortschreitender Impaktionsstufe scheiden sich immer kleiner werdende Partikel ab, bis im Filter nur noch der restliche Feinstaub aufgefangen wird. Die durchgeführten Versuche mit dem Andersen-Impaktor dienten dazu, den medianen aerodynamischen Massendurchmesser des Salbutamolaerosols am Ende des inspiratorischen Schlauchsystems nach Verneblung mit dem Aerosol Dispensor zu untersuchen (n = 3). Zum Fixieren der Partikel auf Prallplatten und Präseparator wurden diese mit einer Brij 35-Lösung (siehe Anhang 9.4 Materialverzeichnis) beschichtet, indem auf jede Platte ein Tropfen der Lösung pipettiert und gleichmäßig verteilt wurde. Der Impaktor wurde zur Messung an eine Pumpe (HCP 5, Copley Scientific, Nottingham, England) mit einem Luftfluss von 28,3 l/min angeschlossen. Die Pulververneblung erfolgte wie bereits beschrieben unter Verwendung von trockener Gasluft und geerdetem System mit einem Verneblungsmuster von 3 x 2 min. Nach abgeschlossener Verneblung wurde das deponierte Salbutamolpulver nach folgendem Protokoll aus dem Impaktor herausgespült:

Halsteil und Präseparator wurden erst mit 20 ml Chloroform und anschließend mit 20 ml PBS gespült und beide Flüssigkeiten gemeinsam in einem 50 ml Falcon Tube gesammelt und für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit gevortext. Anschließend wurden 3 x 1,5 ml in

Eppendorf-Cups überführt, für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und schließlich die obere Phase (PBS) mittels HPLC gemessen. Prallplatten und Filter wurden einzeln in 800 ml-Glaszylinder eingelegt. Nach Zugabe von 10 ml Chloroform und leichtem Umschwenken wurde das Gefäß für 5 min in ein Ultraschallbad gestellt. Anschließend wurden 10 ml PBS dazugegeben und die Flüssigkeit nach nochmaligem Umschwenken in einem 50 ml Falcon Tube gesammelt und für 2 min mittels Vortexer bei maximaler Geschwindigkeit durchmischt. Anschließend wurden 3 x 1,5 ml in Eppendorf-Cups überführt, für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und schließlich die obere PBS-Phase mittels HPLC gemessen.

Nach abgeschlossenem Versuch wurden alle Teile des Impaktors mit Wasser und Spülmittel ausgewaschen, anschließend erst mit destilliertem Wasser und dann mit Ethanol (99,6 %) abgespült und zum Abschluss gründlich mit Druckluft ausgeblasen.

### 3.1.5 Bestimmung der Lungendeposition

#### 3.1.5.1 Verneblung von Technetium mittels AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System in die Lunge

Die Bestimmung der Flüssigkeitsdeposition in der isolierten Kaninchenlunge nach Verneblung mit dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System erfolgte mit Hilfe von Kochsalzlösung, welche mit <sup>99m</sup>Tc angereichert wurde. Dazu wurden ca. 10 MBq <sup>99m</sup>Tc (<sup>99m</sup>Technetium-Pertechnetat, Abteilung für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Gießen, Deutschland) zu 10 ml NaCl 0,9% gegeben und 4 ml dieser Lösung in das AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System gefüllt und für 10 min (s. Kapitel 3.1.3) in die isolierte Kaninchenlunge vernebelt. Da dabei nur die Deposition der Lösung in der Lunge, nicht aber der Stoffübertritt ins Perfusat untersucht werden sollte, wurde die Perfusion während der Verneblung gestoppt und die zu- und abführenden Schläuche abgeklemmt. Die Aktivität folgender Komponenten wurden mittels Gammacounter (Raytest, Straubenhardt, Deutschland) gemessen: 1 ml der Lösung in einer Pipette vor Beginn des Versuches, der mit 4 ml befüllte Vernebler vor und nach Verneblung, die Lunge von allen vier Seiten und der inspiratorische und expiratorische (mit Filter) Teil des Schlauchsystems. Nach Messung der Aktivität musste folgende Korrekturrechnung durchgeführt werden, um den radioaktiven Zerfall zur Zeit (t) zu berücksichtigen:

$$A(0) = A(t) \cdot e^{\frac{t \cdot \ln 2}{t_h}}$$

t = Zeit  
t<sub>h</sub> = Halbwertszeit (360 min für <sup>99m</sup>TC)  
A(0) = Aktivität zur Zeit 0  
A(t) = Aktivität zur Zeit t

Als Maßstab für die Aktivität in einem Milliliter wurde der Mittelwert aus der Messung eines Milliliters in einer Pipette zu Versuchsbeginn und eines Milliliters in einem Eppendorf Cup bei Versuchsende verwendet. Zur Bestimmung der in der Lunge deponierten Aktivität wurde die Lunge von allen vier Seiten gemessen und diese Werte gemittelt. Zusätzlich wurde eine Abschwächung der Aktivität durch das umgebende Lungengewebe berücksichtigt, indem 1 ml der Lösung in einem Eppendorf Cup zuerst alleine und danach abgeschirmt durch die Lunge gemessen wurde. Die Differenz aus diesen beiden Messungen abzüglich der Eigenstrahlung der Lunge wurde dann noch einmal halbiert, da sich bei den Messungen die gesamte Lunge vor dem zu messenden Milliliter befand, bei einer tatsächlich deponierten Flüssigkeit im Inneren der Lunge jedoch nur (idealisierte Weise) die Hälfte des Gewebes. Die so ermittelte Abschwächung der Radioaktivität durch die Lunge wurde dann (nach Umrechnung in Prozent) zu der zuvor bestimmten Lungendeposition dazugerechnet.

### 3.1.5.2 Verneblung von Salbutamolpulver mittels Aerosol Dispensor in einen Filter

Etwas komplizierter gestaltete sich die Ermittlung der Lungendeposition im Falle der Pulververneblung. Da hier kein radioaktiv markiertes Pulver zur Verfügung stand, musste eine indirekte Methode zur Depositionsmessung verwendet werden. Daher wurde an Stelle der Lunge ein Glasfaserfilter eingesetzt, in dem das vernebelte Pulver aufgefangen und quantifiziert werden konnte. Nachdem mikronisiertes Salbutamolpulver mittels Aerosol Dispensor in diesen Filter vernebelt wurde (s. Kapitel 3.1.3), wurden der Filter, der in- und expiratorische Beatmungsschlauch mit expiratorischem Filter, die Medikamentenkapsel, sowie der Vernebler selbst (HandiHaler<sup>®</sup>, Spacer, Auslass und Filter) mit destilliertem Wasser gespült und der darin enthaltene Salbutamolgehalt mittels HPLC bestimmt. Zuvor wurde jedoch in einer separaten Versuchsreihe (n = 8) untersucht, wie viel des in einem Filter deponierten Salbutamols wiedergefunden werden konnte. Dazu wurden definierte Mengen an Salbutamol (100 µg: n = 2; 600 µg: n = 5; und 2000 µg: n = 1) auf einen Glasfaserfilter aufgebracht und anschließend mit destilliertem Wasser wieder ausgespült. Die Spülung des Filters erfolgte 3x mit je 10 ml, die mit zwei am Vorder- und Hinterende des Filters befestigten Spritzen 10x hin und her gespült wurden. Der Spacer wurde zweimal mit je 50 ml ausgewaschen, die Schläuche einmal entsprechend ihrer Größe mit einem Volumen von 5 bis 10 ml, Kapsel und HandiHaler<sup>®</sup> mit je 10 ml und der expiratorische Filter und der Auslassfilter mit je 20 ml. Die Kapsel wurde vor und nach jedem Versuch gewogen.

Diese Versuche wurden so für mehrere unterschiedlich gestaltete Verneblungen durchgeführt. Die erste Versuchsreihe wurde mit dem ursprünglich gebauten Verneblersystem (mit

Gummischläuchen) und einem Verneblungsmodus von 3 x 2 min durchgeführt (n = 3). Bei den folgenden Versuchsreihen wurde das Verneblungssystem verbessert, indem der Spacer und die inspiratorischen Schläuche geerdet wurden, um elektrostatische Einflüsse zu minimieren. Zusätzlich wurde die Beatmungspumpe statt mit Raumluft mit der im Kaninchenversuch verwendeten trockenen Druckluft gespeist, um Unterschiede in der Luftfeuchtigkeit auszuschließen. Mit diesem verbesserten Systemaufbau wurden zwei Versuchsreihen, einmal mit einer Verneblung von 3 x 2 min (n = 7) und einmal mit 4 x 3 min (n = 4), durchgeführt. Obwohl die Beatmungspumpe nur noch trockene Druckluft transportierte, konnte ein Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf die Verneblung noch nicht einwandfrei ausgeschlossen werden, da die AKITA-Station zum Auslösen der Kapsel noch immer mit Raumluft betrieben wurde. Daher wurde ein Beutel mit trockener Luft an dem Ansaugventil der AKITA-Station befestigt, wodurch ein von der Umgebungsluft völlig unabhängiges geschlossenes System entstand. Mit diesem Aufbau und einer Verneblungsdauer von 3 x 2 min wurde die letzte Versuchsreihe (n = 8) zur Pulverdeposition durchgeführt.

### 3.1.6 Die isolierte, ventilierte und blutfrei perfundierte Kaninchenlunge

#### 3.1.6.1 Prinzip und Aufbau des Modells

Das bereits 1912 in ähnlicher Form von KNOWLTON und STARLING beschriebene Modell des isolierten Herz-Lungen-Komplexes, bei dem der Schwerpunkt zunächst auf der Untersuchung des Herzens lag (Knowlton and Starling, 1912), kommt in modifizierter Form als bewährtes ex-vivo-Modell mit den Lungen von u. a. Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen schon seit Jahrzehnten zur Anwendung (Niemeier, 1984). Auch in unserer Arbeitsgruppe ist das Modell der isolierten, perfundierten und ventilierten Kaninchenlunge schon seit langem etabliert (Leuchte, 2001; Schermuly et al., 1997, 2000; Schlaudraff, 2005; Seeger et al., 1986; Walmrath et al., 1992). Für die eigenen Versuche wurden die verwendeten Lungen in ihrem Verbund mit dem Herzen aus narkotisierten Kaninchen entnommen und in eine Versuchsaapparatur eingegliedert, die die Beatmung und die Perfusion der isolierten Organe gewährleistete. Der Versuchsaufbau ermöglichte es weiterhin die Lungen hinsichtlich ihres Gewichtes, des Beatmungsdruckes und des pulmonalarteriellen (PAP) sowie linksventrikulären Druckes (LVP) zu überwachen. Über einen Dreiwegehahn im Perfusionskreislauf wurden Proben zur Bestimmung des Medikamentengehaltes im Perfusat entnommen, ohne den Kreislauf dabei zu unterbrechen oder zu stören.



## Eigene Untersuchungen – Material und Methoden

Das isolierte Lungenmodell (s. Abb. 12) ist so aufgebaut, dass dem System über zwei beheizbare Gefäße (Volumen je 300 ml) gleichzeitig oder alternierend über Dreiwegehähne Perfusat zugeführt werden kann. Dies ermöglicht einen vollständigen Perfusatwechsel ohne den Kreislauf stoppen zu müssen. Angetrieben wird die rezirkulierende Perfusion durch eine Peristaltikpumpe (Roller Pump BP 742, Fresenius, Bad Homburg, Deutschland), die das Perfusionsmedium zum Schutz vor Embolien erst durch einen Pallfilter (Pall Cardioplegia Plus 0,2 µm, Pall Biomedical Corp., Fajardo, USA) und dann durch eine Blasenfalle zur Eliminierung evtl. noch vorhandener Luftblasen pumpt. Anschließend passiert das Perfusat eine doppelwandige Glasspirale, die ebenso wie die doppelwandigen Perfusatvorratsgefäße und die Kammer, in der die Lunge während des Versuches hängt, der Temperierung des Systems durch einen Wärmeregler (Thermomix BU, Braun, Melsungen, Deutschland) dient. Das auf diese Weise luftblasenfreie und temperierte Perfusat gelangt schließlich durch einen in die Arteria pulmonalis eingebundenen Katheter in die Lunge und verlässt diese über einen weiteren Katheter im linken Ventrikel wieder. Von hier aus wird das Perfusat, vorbei an einem Dreiwegehahn zur Probenentnahme, zurück in die Vorratsgefäße geleitet. Zwei mit Perfusat gefüllte Katheter (Innendurchmesser 1,0 mm, Außendurchmesser 1,5 mm) im Inneren der Schläuche unmittelbar vor dem Eintritt in die Arteria pulmonalis und am Austritt aus dem linken Ventrikel sind mit elektromechanischen Druckumwandlern (Combitrans, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verbunden, die das Drucksignal in ein elektrisches Signal umwandeln und an den Computer zur Aufzeichnung des LVP und des PAP weiterleiten. Aufgehängt ist die Lunge an einer Wägezelle (Typ U1, Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt, Deutschland), die Gewichtsveränderungen während der gesamten Versuchsdauer über einen Messverstärker (Plugsys DBA 660, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) an einen Schreiber (Rikadenki R 50 Series, Rikadenki Electronics, Freiburg, Deutschland) leitet und aufzeichnet.

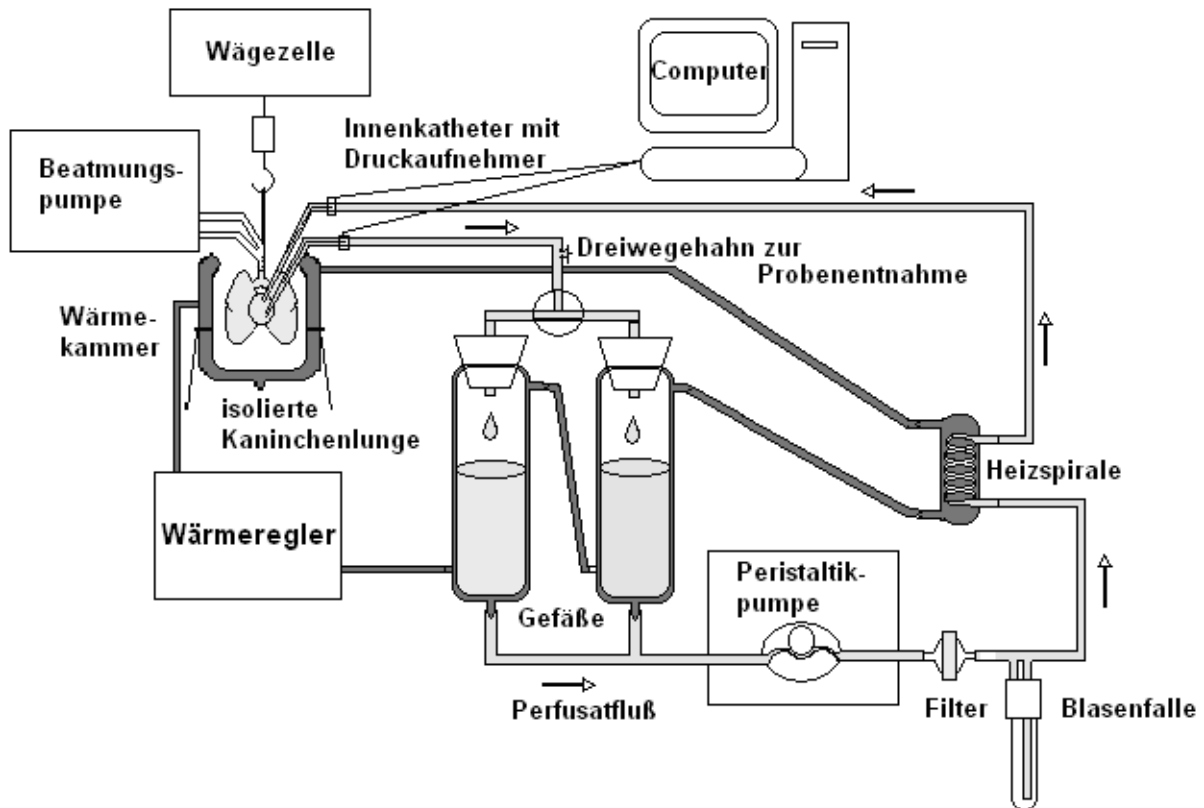


Abb. 12: Darstellung des Modells der isolierten, perfundierten und ventilerten Kaninchenlunge.

Die Beatmung der Lunge erfolgt mittels Beatmungspumpe (cat/rabbit Ventilator, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) über einen inspiratorischen und einen expiratorischen Schlauch, welche über ein y-förmiges Verbindungsstück gemeinsam in einen in die Trachea eingebundenen Tubus münden. In den inspiratorischen Schlauch wird bei Bedarf ein Vernebler eingebaut, der außerhalb der Verneblungszeit über einen Bypass umgangen wird. Im expiratorischen Schlauch befindet sich ein Drucksensor, der der Aufzeichnung des Beatmungsdruckes dient.

### 3.1.6.2 Versuchsvorbereitungen

Nach Aufbau des Systems (zunächst noch ohne Lunge) wurden die Gefäße und Schläuche erst gründlich mit 500 ml destilliertem Wasser, dann mit 500 ml isotoner Kochsalzlösung und schließlich mit 500 ml Perfusionslösung gespült. Unmittelbar vor Beginn der Lungenpräparation wurden beide Vorratsgefäße mit Perfusat aufgefüllt, das System durch Abklopfen aller Anteile auf Luftblasenfreiheit überprüft und mittels Wärmeregler auf 4 °C herabgekühlt. Das verwendete Perfusionsmedium richtete sich dabei nach Art des Versuches. Als Standard für die Versuche an der isolierten Kaninchenlunge wurde Elektrolytlösung 1/3

(Serag-Wiessner, Naila, Deutschland), bestehend aus NaCl 125 mM, KCl 4,3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,1 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,4 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,3 mM und Glucose 13,32 mM, verwendet. Bei Versuchen mit Induktion einer pulmonaler Hypertonie kam dagegen Elektrolytlösung IIN (Serag-Wiessner, Naila, Deutschland) aus NaCl 120 mM, KCl 4,3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,1 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,4 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,3 mM, Glucose 13,32 mM und Hydroxyethylstärke (MG 200.000) 50g/l zur Anwendung. Die Hydroxyethylstärke in dieser Lösung erzeugt einen erhöhten osmotischen Druck und soll dadurch die Bildung von Ödemen verringern. Da bei den späteren Versuchen des Farbstoffübertritts bei pulmonaler Hypertonie Elektrolytlösung IIN verwendet wurde, musste zur besseren Vergleichbarkeit des Farbstoffübertritts mit und ohne Druckerhöhung folglich bei allen Versuchen mit Fluoreszenzfarbstoffen dasselbe Perfusat verwendet werden. Zusätzlich wurde zur Untersuchung des Einflusses des Perfusionsmediums auf den Stoffübertritt eine Versuchsreihe (n = 4) mit Verneblung von CF unter Verwendung von Elektrolytlösung 1/3 durchgeführt. Bei den Versuchen mit Salbutamol wurde ausschließlich Elektrolytlösung 1/3 verwendet. Die Zugabe von ca. 22-24 ml Natriumbicarbonat zu 500 ml der jeweiligen Elektrolytlösung stellte einen pH-Wert von 7,32 - 7,40 in der rezirkulierenden Pufferlösung sicher. Die Messung des pH-Wertes erfolgte allerdings erst nach einigen Minuten der Lungenpassage, wobei dann bei Bedarf Natriumbicarbonat nachdosierte oder zur Verdünnung reine Elektrolytlösung nachgegeben werden konnte.

### 3.1.6.3 Präparation und Integration der Lunge ins System

Auf die bereits mehrfach ausführlich beschriebene Präparation der isolierten Lunge (Leuchte, 2001; Waschowitz, 2002) soll hier nur kurz eingegangen werden. Die Versuche erfolgten mit den Lungen männlicher Kaninchen der Rasse New Zealand White mit einem Körpergewicht zwischen 2,5 und 3,8 kg. Die Kaninchen wurden durch die langsame, schrittweise intravenöse Gabe von insgesamt 6 ml eines Gemisches aus Ketamin (Ketavet<sup>®</sup>, Pharmacia, Erlangen, Deutschland) and Xylazin (Rompun<sup>®</sup>, Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) narkotisiert und mit 1000 IE Heparin (Heparin-Natrium-25000-ratiopharm, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) pro kg Körpergewicht antikoaguliert. Nach Erreichen einer tiefen Bewusst- und Schmerzlosigkeit wurden die Tiere intubiert und durch eine Beatmungspumpe mit einem normoxischen Gasgemisch aus 21% O<sub>2</sub>, 5,3% CO<sub>2</sub> und 73,7% N<sub>2</sub> mit einer Frequenz von 30 Atemzügen pro Minute und einem Atemzugsvolumen von 30 ml beatmet. Nach Eröffnung des Thorax über dem Sternum und Einbinden des Perfusat zuführenden Katheters in die Arteria pulmonalis startete die Perfusion der Lunge mit einem Fluss von 10-20 ml/min. Direkt im Anschluss wurde die Herzspitze abgeschnitten, um einen

Abfluss des Perfusats zu gewährleisten, die Aorta abgebunden und die Lunge aus dem Thorax entnommen. Nach Entfernung der Herzklappen und der Papillarmuskeln im linken Ventrikel und Abbinden des linken Herzohrs wurde das abführende Schlauchstück in den linken Ventrikel eingebunden (Abb. 13) und der Kreislauf so geschlossen. Nun wurde die Lunge an der Wägezelle in einer temperierten Kammer frei aufgehängt, der LVP auf ca. 1,2 bis 1,6 mmHg und der end-expiratorische Druck (positive end-expiratory pressure, PEEP) auf 1 cm Wassersäule eingestellt. Nach erfolgreicher ca. 30 minütiger Aufwärmphase des Systems mit Erhöhung der Temperatur auf 39-39,5°C und der Perfusionsgeschwindigkeit auf 100 ml/min und anschließendem Perfusatwechsel (Gesamtmenge während des Versuchs 300 ml) war das System bereit zum Versuchsbeginn. Dabei wurden nur solche Lungen verwendet, die gewichtskonstant waren, einen PAP im normalen Bereich und eine gleichmäßige weiße Erscheinung ohne Anzeichen von Hämostase, Ödembildung oder Atelektasen aufwiesen.

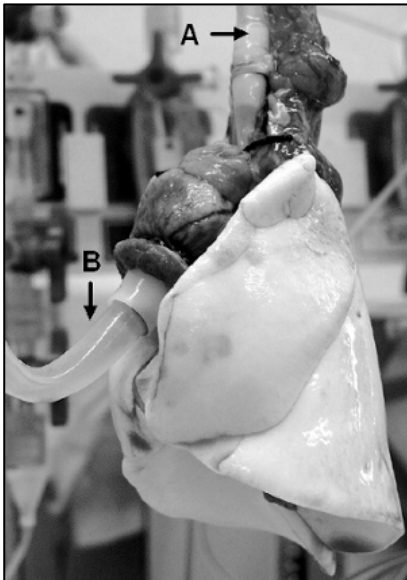


Abb. 13: Bild einer isolierten Kaninchenlunge mit Perfusatzufluss über einen Katheter in der Pulmonalarterie (A) und -abfluss über einen Schlauch im linken Ventrikel (B).

### 3.1.6.4 Versuchsdurchführung

Der Versuchsablauf gestaltete sich so, dass nach Erreichen eines stabilen „steady state“ mit der Verneblung begonnen wurde. Mit Beginn der Verneblung startete auch die Probenentnahme. Eine Nullprobe wurde vor jedem Versuch als Ausgangswert genommen. Während der Versuche kam es durch die Probenentnahme, durch Verdunstung und durch Tropfenbildung über die gesamte Lungenoberfläche zu mehr oder weniger großen Perfusatverlusten (im Mittel ca. 65 ml/300 min), welche bei der Bestimmung des Stoffübertritts ins Perfusat durch folgende Korrekturrechnung berücksichtigt wurden:

$$C_{\text{corr}}(t) = \frac{C(t) \cdot V_p(t) + (V_p(0) - V_p(t)) \cdot C(t)/2}{V_p(0)} = \frac{C(t)}{2} \cdot \left( \frac{V_p(t)}{V_p(0)} + 1 \right)$$

$C_{\text{corr}}(t)$  = korrigierte Wirkstoffkonzentration im Perfusat nach der Zeit (t)

$C(t)$  = gemessene Wirkstoffkonzentration im Perfusat nach der Zeit (t)

$V_p(t)$  = Perfusatvolumen nach der Zeit (t)

$V_p(0)$  = Perfusatvolumen zum Zeitpunkt 0

#### 3.1.6.4.1 Verneblung der Fluoreszenzfarbstoffe

Für die Versuche mit den Fluoreszenzfarbstoffen CF, MPTS und R6G (je n = 4) wurden je 3 ml der Farbstofflösung mit dem Aeroneb<sup>®</sup> Professional (Verneblungsdauer ca. 8 min) in die Lunge vernebelt (Perfusion dabei mit IIN-Perfusat). Über einen Zeitraum von 300 min wurden dann alle 10 min jeweils 0,7 ml Perfusatproben entnommen und gemessen. Zusätzlich zu den Perfusatproben wurde bei diesen Versuchen auch die Farbstoffkonzentration in der aufgefangenen Tropfflüssigkeit (ca. 8 ml/300 min) und in einer Lungenlavage bestimmt. Die Lungenlavage erfolgte mit insgesamt 150 ml Elektrolytlösung, die in drei Fraktionen zu je 50 ml je 3x in die Lunge instilliert und wieder abgesaugt wurde. Insgesamt konnten so 80-95% der verwendeten Lavageflüssigkeit zur Bestimmung des in der Lunge verbliebenen Farbstoffgehalts wieder aus der Lunge zurückgewonnen werden. Im Falle des lipophilen Farbstoffs R6G wurde nach dieser Lavage noch eine zusätzliche Lavage mit 50 ml 99,6 % igem Ethanol durchgeführt.

#### 3.1.6.4.2 Carboxyfluorescein-Verneblung unter Verwendung von 1/3 Perfusat

Zusätzlich zu den beschriebenen Versuchen mit IIN-Perfusat, wurde eine Verneblung von CF in die Kaninchenlunge (n = 4) unter Verwendung von 1/3-Perfusat durchgeführt, um den Einfluss des Perfusionsmediums auf den CF-Übertritt zu untersuchen. Bis auf die Verwendung eines anderen Perfusats gestalteten sich diese Versuche wie die zuvor beschriebenen CF-Verneblungen. In dieser Versuchsreihe wurde bei zwei Versuchen eine Lungenlavage durchgeführt.

#### 3.1.6.4.3 Carboxyfluorescein-Übertritt nach Instillation

Eine weitere Versuchsreihe (n = 2) diente dazu, einen Vergleich im Übertritt zwischen vernebeltem und instilliertem Farbstoff anzustellen. Dazu wurden 200 µg CF in 2 ml PBS gelöst und über einen vorher in die Trachea eingebrachten Katheter mit Dreiwegehahn in die Lunge instilliert. Während der Instillation wurde die Lunge durch Abklemmen der Beatmungsschläuche in maximaler Inspiration statisch gebläht. Es wurde IIN-Elektrolytlösung zur Perfusion verwendet. Probenentnahme (über 270 min), Lavagieren und Auffangen der Tropfflüssigkeit wurde wie bereits beschrieben durchgeführt.

#### 3.1.6.4.4 Verneblung von Salbutamolösungen mit dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System

Für die Verneblung von Salbutamolösungen der Konzentrationen 100, 10 und 1 mg/ml (je n = 4) mit dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System in die Lunge, musste die Beatmung auf 26 Atemzüge/min reduziert und das Beatmungsvolumen zum Ausgleich auf 35 ml erhöht werden. Die Verneblung erfolgte während 10 min inspirationsgetriggert für jeweils 0,7 s pro Atemzug. Bei lediglich drei der vier Versuche mit 10 mg/ml Salbutamol standen auswertbare Lavagen zur Verfügung.

#### 3.1.6.4.5 Verneblung von Salbutamolpulver

Nach der Pulververneblung (s. Kapitel 3.1.3) mit dem DP-4 und dem Aerosol Dispenser (je n = 4) wurde am Ende des Versuchs der expiratorische Teil des Beatmungssystems gründlich mit Aqua dest. gespült und der Salbutamolgehalt mittels HPLC gemessen. Zur Berechnung der in der Lunge deponierten Pulvermenge wurde dann die exhalierte Menge von der angenommenen inhalierten Menge (ermittelt durch die vorherigen Filterversuche, bzw. für den DP-4 durch Wiegen) abgezogen.

Wegen der aufwändigen und zeitintensiven HPLC-Messungen erfolgte die Probenentnahme während aller Salbutamolversuche über einen Zeitraum von 240 min. Um die Anzahl der zu messenden Proben noch weiter zu reduzieren, wurden hier in der ersten Stunde alle 10 min, in der zweiten Stunde alle 20 min und danach alle 30 min Proben mit einem Volumen von 0,8 ml entnommen. Es folgte eine Lavage mit 150 ml der verwendeten Elektrolytlösung wie bereits beschrieben. Auf eine Messung der Tropfflüssigkeit mittels HPLC musste allerdings verzichtet werden, da die zellreiche Flüssigkeit trotz Zentrifugation die HPLC-Säule zu stark geschädigt hätte.

#### 3.1.6.4.6 Berechnung der Stoffverteilung im Lungenmodell

Für alle Versuche wurde eine Gesamtbilanz erstellt. Dazu wurde der Stoffgehalt im Perfusat, in der Lavage und bei den Farbstoffversuchen auch in der Tropfflüssigkeit bestimmt und in Prozent (bezogen auf die jeweils deponierte Menge) umgerechnet. Außerdem wurde berechnet, wie viel der zu untersuchenden Modellschubstanz durch die Probenentnahme aus dem System entfernt wurde. Zur Berechnung des prozentualen Anteils im Perfusat wurde die gemessene Konzentration der letzten drei (für die Farbstoffe), bzw. zwei (für Salbutamol) Perfusatsproben gemittelt und mit der am Ende des Versuchs noch vorhandenen Perfusatsmenge multipliziert. Die dadurch erhaltene Stoffmenge wurde dann in Prozent der deponierten Menge umgerechnet. Um die Salbutamolversuche, bei denen unterschiedliche Mengen an Wirkstoff in der Lunge deponiert wurden vergleichen zu können, wurde der Perfusatsgehalt zusätzlich in Prozent der deponierten Menge berechnet. Im Gegensatz zur Ermittlung der Gesamtbilanz wurde dafür die korrigierte Konzentration zu dem jeweiligen Zeitpunkt mit der ursprünglich eingesetzten Perfusatskonzentration (300 ml) multipliziert und dann auf die jeweils deponierte Menge bezogen.

#### 3.1.7 Pulmonale Hypertonie an der isolierten Kaninchenlunge

Um einen Vergleich hinsichtlich des Stoffübertritts aus der Lunge ins Perfusionsmedium zwischen einer gesunden und einer pathologisch veränderten Lunge anstellen zu können, wurde das bereits mehrfach beschriebene Krankheitsmodell der pulmonalen Hypertonie (Walmrath et al., 1997; Schermuly et al., 2001a; 2001b; 2003) verwendet. Der Einfluss einer experimentell erzeugten pulmonalen Hypertonie (PH) auf die Absorption inhalativ verabreichten Carboxyfluoresceins wurde dabei durch die kontinuierliche Applikation des stabilen Thromboxan A<sub>2</sub>-Mimetikums U46619 (Paesel-Lorei, Frankfurt, Deutschland) und die damit verbundene Erhöhung des pulmonalarteriellen Drucks (pulmonary artery pressure, PAP) untersucht. Nachdem das Modell der isolierten Kaninchenlunge wie zuvor beschrieben aufgebaut wurde, begann nach Erreichen eines stabilen „steady state“ eine Dauerinfusion mit 2,5 µg/ml U46619 mittels Perfusor (Injectomat S, Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland) und einer individuellen Infusionsgeschwindigkeit von 1-2,5 ml/h während des gesamten Versuches in den pulmonalarteriellen Schenkel des Perfusionskreislaufes. Dies führte innerhalb von ca. 10 min zu einem PAP-Anstieg von ca. 8 mmHg auf ca. 25 mmHg. Nachdem so eine stabile Druckerhöhung erzeugt und aufrechterhalten wurde, wurden wie bei den vorangegangenen Versuchen 3 ml der CF-Lösung über ca. 8 min mit dem Aeroneb® Professional-System in die Lunge vernebelt (n = 4). Wie bei den Versuchen ohne

Druckerhöhung wurden auch hier alle 10 min Perfusatproben entnommen, Tropfflüssigkeit aufgefangen und eine abschließende Lungenlavage durchgeführt. Der einzige Unterschied im Ablauf zu den vorangegangenen Versuchen bestand, neben der kontinuierlichen U46619-Zufuhr, in einer verkürzten Versuchsdauer. Da es durch die Druckerhöhung in den pulmonalarteriellen Gefäßen schon früh zur Ausbildung von Lungenödem kam, wurde die Versuchsdauer von 300 auf 130 min verkürzt.

### 3.1.8 Nachweis der Modellsubstanzen

#### 3.1.8.1 Fluoreszenzmessungen

Die Messung der Fluoreszenz der verschiedenen Farbstoffe erfolgte sowohl für die Perfusat- und Lavageproben der Lungenversuche, als auch für die Bestimmung des Octanol/Wasserverteilungskoeffizienten mit einem Fluoreszenzreader (Fluorescence plate reader FL600, BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA). Folgende Filterpaare wurden für die drei Farbstoffe verwendet:

- CF:  $\lambda_{\text{ex}}$  485/20,  $\lambda_{\text{em}}$  530/25
- MPTS:  $\lambda_{\text{ex}}$  360/40,  $\lambda_{\text{em}}$  460/40
- R6G:  $\lambda_{\text{ex}}$  530/25,  $\lambda_{\text{em}}$  590/35

Für die Durchführung der Messungen wurde jede Probe in je drei Vertiefungen (Wells) einer Mikrotiterplatte (Assay Plate 96 Well, Costar Corp., Cambridge, Massachusetts, USA) pipettiert, von dem Gerät mit einer eingestellten Sensitivität von 75% (CF und R6G) gelesen und der Mittelwert der drei Messungen je Probe automatisch ermittelt. Die Volumina der Proben, welche in die 96 Well Platten pipettiert wurden, waren für die verschiedenen Farbstoffe aufgrund der unterschiedlich starken Fluoreszenz individuell gewählt. Das Probenvolumen für CF betrug 100 µl pro Well, MPTS dagegen benötigte aufgrund seiner etwas schwächeren Fluoreszenz 200 µl pro Well und eine Sensitivität von 100%, um nicht zu nahe an die untere Nachweisgrenze zu gelangen. Dem lipophilen Farbstoff R6G wurden zu 100 µl Probenvolumen je Well noch einmal je 100 µl Ethanol zugesetzt, wonach sich auch hier in jedem Well 200 µl befanden.

Die Eichung des Gerätes mit dem entsprechenden Farbstoff erfolgte vor jedem Versuch mit den gleichen Volumina und unter den gleichen Bedingungen wie die beschriebene Probenmessung. Das bedeutet, dass zur Messung der Perfusatproben und Lungenlavagen die Eichreihen entsprechend der Versuchsreihen mit dem selben Perfusionsmedium verdünnt werden mussten, welches auch im Kaninchenversuch zur Anwendung kam (Elektrolytlösung



1/3 oder IIN), bzw. es mussten zur Bestimmung des Octanol/Wasserverteilungskoeffizienten Eichreihen in Octanol und PBS angefertigt werden. Die für die Eichreihen verwendeten Farbstoffkonzentrationen wurden so gewählt, dass der erwartete Messbereich möglichst gut abgedeckt wurde. Für MPTS und R6G lagen die verwendeten Konzentrationen für die Eichreihe bei 0, 10, 25, 50, 100, 250 und 500 ng/ml und für CF, welches etwas höhere Perfusatkonzentrationen erreichte, wurden 0, 10, 50, 100, 250, 500 und 1000 ng/ml gewählt. Bei den ersten Versuchsreihen („CF mit 1/3 Perfusat“ und den ersten drei Versuchen der Versuchsreihe „CF mit pulmonaler Hypertonie“) enthielt die Eichgerade zusätzlich noch eine 2000 ng/ml Probe. Da die in den Versuchen erreichten Konzentrationen jedoch bei weitem nicht solch hohen Werten entsprachen, wurde schließlich zugunsten einer höheren Genauigkeit der tieferen Werte auf diese 2000 ng/ml-Stufe verzichtet. Die zu bestimmenden Proben wurden grundsätzlich nur auf solche Eichreihen bezogen, die eine hohe Linearität aufwiesen ( $r^2 \geq 0,99$ ).

### 3.1.8.2 HPLC

Die Bestimmung von Salbutamol erfolgte durch UV-Detektion mit Hilfe einer HPLC-Anlage (Agilent 1100, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Die Anlage besteht aus einer binären Pumpe (G1312A) und einem Dioden-Array-Detektor (G1315A). Als analytische Säule wurde eine LichroCart 250\*4mm – Säule, gefüllt mit Lichrospher 60 RP-select B (5µm) der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Dieser vorgeschaltet wurde eine Vorsäule (LichroCart-Kartusche 4\*4mm, Lichrospher RP-select B, 5µm; Merck, Darmstadt, Deutschland), die zum Schutz der analytischen Säule vorhandene Schmutzpartikel abtrennte. Bei der verwendeten mobilen Phase handelte es sich um Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 5,7 mit folgender Zusammensetzung: 500 ml deionisiertes Wasser, 1,52 g Triethylamin und 2,34 g Natriumdihydrogenphosphat. Nach Einstellung des pH-Wertes mittels Ortho-Phosphorsäure wurden der Lösung 50 ml Methanol zugefügt, anschließend wurde die mobile Phase durch zehnmütiges Einleiten von Helium entgast. Die Messungen erfolgten mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min bei einer Betriebstemperatur von 40 °C. Die Detektionswellenlänge betrug 227 nm. Die Proben wurden mit einem Injektionsvolumen von 20 µl durch einen automatischen Probengeber (Smartline Autosampler 3900, Knauer, Berlin, Deutschland) in die HPLC-Anlage eingespritzt. Die Retentionszeit von Salbutamol lag bei ca. 7 min und die Messdauer bei 12 min für jede Probe. Vor der Messung der Proben mussten diese aufgrund des hohen Anteils an z. B. Zellbestandteilen vorbehandelt werden. Dazu wurden die Proben erst 5 min lang mit 10.000 rpm zentrifugiert (Centrifuge

5424, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und anschließend filtriert (0,22 µm Filter, Millex GP, Millipore, Bedford, USA). Zur Messung und Auswertung der Proben wurde vor jeder Messung eine Standardreihe angefertigt, bei welcher Salbutamol unterschiedlicher Konzentrationen in dem jeweils gleichen Medium gelöst wurde, in dem auch die zu messenden Proben vorlagen. Dabei wurden nur solche Standardreihen verwendet, die eine hohe Linearität aufwiesen ( $r^2 \geq 0,999$ ).

#### 3.1.8.3 Messungen der Radioaktivität

Zur Bestimmung der Radioaktivität von  $^{99m}\text{Tc}$  wurde der zu messende Gegenstand in einem Abstand von 30 cm vor einem Gammacounter (Raytest, Straubenhardt, Deutschland) platziert und die Aktivität gemessen. Der genaue Ablauf der radioaktiven Messungen ist in Kapitel 3.1.5.1 (Verneblung von Technetium mittels AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System in die Lunge) beschrieben.

### 3.1.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Partikelgrößen und der Gesamtwiederfindung an Salbutamol nach Verneblung unterschiedlicher Konzentrationen erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SigmaSTAT<sup>®</sup> Version 3.5 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland). Dabei wurde der Vergleich der Partikelgrößen nach den beiden Pulververneblungen mittels Student's t-Test durchgeführt, während die Partikelgrößen nach Flüssigverneblung mittels Mann-Whitney-U-Test ausgewertet wurden, da die Bedingungen für einen Student's t-Test (Normalverteilung und gleiche Varianz) hier nicht bei allen Ergebnissen erfüllt waren. Die Aerosolpartikel (MMAD und GSD) der einzelnen Farbstoffe und Salbutamolkonzentrationen wurden dabei jeweils im Vergleich zur jeweiligen NaCl-Kontrolle beurteilt. Die statistische Untersuchung des Salbutamolgehalts in Perfusat und Lavage, sowie die Gesamtwiederfindung nach Verneblung unterschiedlich konzentrierter Salbutamollösungen erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Varianzanalyse. Zur Benennung der Signifikanzen wurde der jeweils berechnete p-Wert angegeben, bzw. erfolgte die Benennung in Abbildungen mittels Besternung: für  $p \leq 0,001$ : hochsignifikant (\*\*\*),  $p \leq 0,01$ : signifikant (\*\*),  $p \leq 0,05$ : schwach signifikant (\*) und  $p > 0,05$  nicht signifikant (n.s.).

### 3.2 Ergebnisse

#### 3.2.1 Bestimmung des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten

Die Messung des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten als Maß für die Lipophilität ergab für CF einen log P-Wert (s. Kap. 3.1.2) von  $-3,45 \pm 0,16$ , für MPTS  $-4,95 \pm 0,21$  und für R6G einen Wert von  $2,69 \pm 0,18$ . Die Ergebnisse der Einzelmessungen sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Bei den beiden Farbstoffen mit negativem log P-Wert CF und MPTS handelt es sich folglich um sehr hydrophile Stoffe, während R6G mit einem positiven Wert lipophil ist.

Tabelle 1: Farbstoffkonzentrationen in der wässrigen - und der Octanol-Phase sowie daraus errechnete log P-Werte.

<b>Eingesetzte Farbstoffe und ihre Konzentration</b>	<b>Octanol-Phase (µg/ml)</b>	<b>Wässrige Phase (µg/ml)</b>	<b>Log P</b>
<b>CF (n = 6)</b>			
3 mg/ml	1,34	2998,66	-3,35
3 mg/ml	0,98	2999,02	-3,49
2 mg/ml	1,04	1998,96	-3,28
2 mg/ml	0,52	1999,48	-3,59
1 mg/ml	0,49	999,51	-3,31
1 mg/ml	0,21	999,79	-3,67
<b>MPTS (n = 5)</b>			
4 mg/ml	0,09	3999,91	-4,66
2 mg/ml	0,02	1999,98	-4,96
2 mg/ml	0,02	1999,98	-4,96
2 mg/ml	0,02	1999,98	-4,91
1 mg/ml	0,01	999,99	-5,24
<b>R6G (n = 6)</b>			
3 mg/ml	2995,72	4,28	2,84
3 mg/ml	2992,04	7,96	2,58
3 mg/ml	2990,65	9,35	2,50
3 mg/ml	2990,67	9,33	2,51
1,5 mg/ml	1497,67	2,33	2,81
0,6 mg/ml	599,24	0,76	2,89

## Ergebnisse

### 3.2.2 Aerosolpartikelgrößen

#### 3.2.2.1 Partikelgrößen nach Verneblung mit dem Aeroneb® Professional

Wie in Abb. 14 gut zu erkennen ist, nahmen die Aerosolpartikel des Aeroneb® Professional-Verneblers unabhängig von der vernebelten Substanz bei höherem Luftfluss an Größe zu. Innerhalb der verwendeten Substanzen traten dabei nur geringe Größenunterschiede auf. Ein deutlicher Unterschied war jedoch in den Partikelgrößen nach Verwendung von 2 l/min und der Beatmungspumpe zu beobachten, obwohl der inspiratorische Luftfluss der Beatmungspumpe mit ca. 1,8 l/min keinen großen Unterschied zu den 2 l/min darstellt.

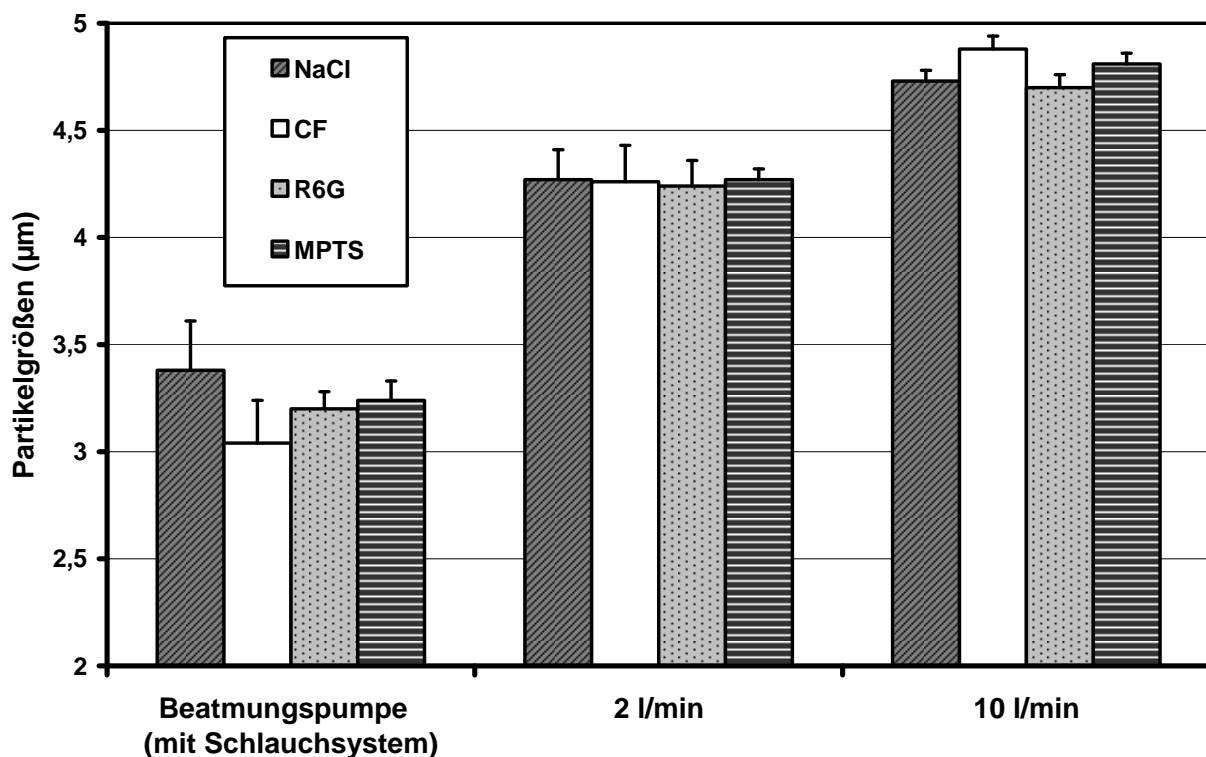


Abb. 14: Aerosolpartikelgrößen (MMAD) von isotoner Kochsalzlösung (NaCl) und den drei Fluoreszenzfarbstoffen CF, R6G und MPTS nach Verneblung mit dem Aeroneb® Professional-Vernebler unter Verwendung unterschiedlicher Luftflüsse (je n = 6). Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SD dargestellt.

## Ergebnisse

### 3.2.2.2 Partikelgrößen nach Verneblung mit dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB

In Abb. 15 sind die Aerosolpartikelgrößen nach Verneblung mittels AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass im Gegensatz zu den Verneblungen mit dem Aeroneb<sup>®</sup>Professional-Vernebler die Aerosolpartikel hier mit zunehmendem Gasfluss immer kleiner wurden. Außerdem wurden die Aerosolpartikel mit zunehmender Konzentration an Salbutamol kleiner – ein Phänomen, das bei Erhöhung des Luftstroms immer deutlicher zu erkennen war. Auch bei Verwendung der Beatmungspumpe (der Luftfluss lag hier bei 1,83 l/min während der Inspiration) waren die Aerosolpartikel des AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System größer als während der Versuche mit einem Luftfluss von 2 l/min ohne Beatmungssystem.

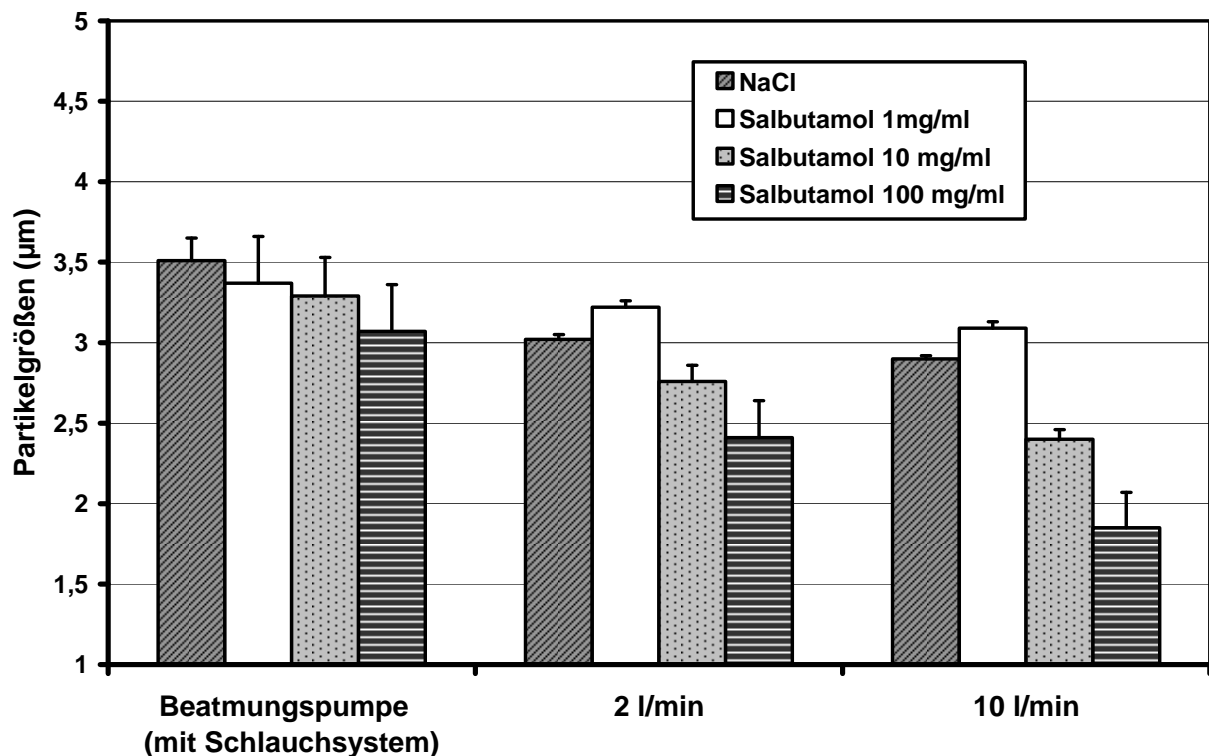


Abb. 15: Aerosolpartikelgrößen (MMAD) von isotoner Kochsalzlösung (NaCl) und Salbutamol nach Verneblung mit dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System unter Verwendung unterschiedlicher Luftflüsse (je n = 6). Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SD dargestellt.

## Ergebnisse

### 3.2.2.3 Vergleich AKITA<sup>2</sup>APIXNEB und Aeroneb<sup>®</sup>Professional mittels NaCl

Im direkten Vergleich der beiden Vernebler untereinander nach Verneblung von isotoner Kochsalzlösung (Abb. 16) ist deutlicher zu erkennen, dass die Partikelgrößen des Aeroneb<sup>®</sup>Professional-Verneblers mit zunehmender Flussgeschwindigkeit zu- und die des AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-Systems abnahmen. Obwohl die Aerosolpartikel des Aeroneb<sup>®</sup>Professional nach Austritt aus dem Vernebler deutlich größer waren als die Partikel des AKITA<sup>2</sup>APIXNEB, war am Ende des Schlauchsystems nach Verneblung mit der Beatmungspumpe kaum noch ein Unterschied hinsichtlich der Partikelgröße von isotoner Kochsalzlösung zu erkennen ( $p = 0,26$ ).

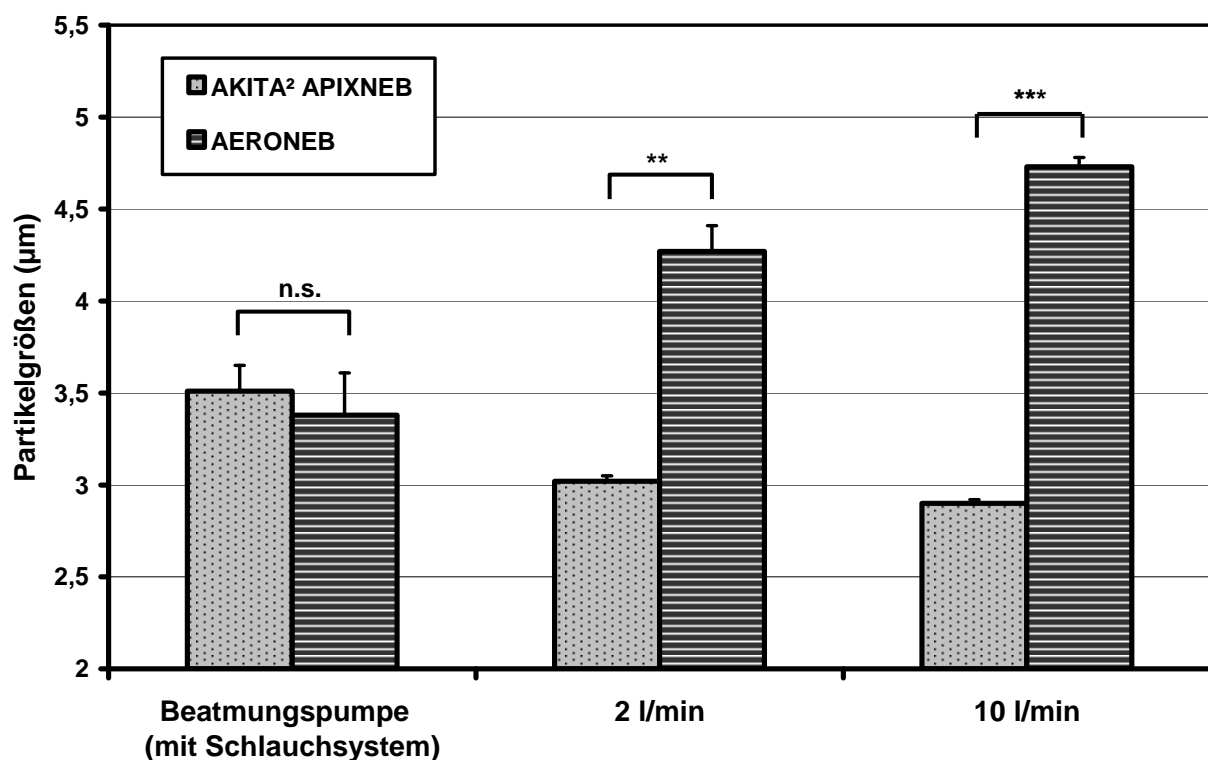


Abb. 16: Vergleich der Aerosolpartikelgrößen (MMAD) isotoner Kochsalzlösung (NaCl) nach Verneblung mit dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System und dem Aeroneb<sup>®</sup>Professional-Vernebler unter Verwendung unterschiedlicher Luftflüsse (je  $n = 6$ ). Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SD dargestellt. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; n.s. = nicht signifikant.

## Ergebnisse

### 3.2.2.4 Überblick über die Partikelgrößen der Flüssigaerosole

Alle Ergebnisse der Partikelgrößenmessungen von Flüssigaerosolen mit einem Laserdiffraktometer sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Aerosolpartikelgrößen verschiedener Substanzen nach Verneblung mit den beiden Verneblern bei unterschiedlichen Luftflüssen (je n = 6).

	<b>Beatmungspumpe (1,8 l/min)</b>		<b>2 l/min</b>		<b>10 l/min</b>	
	<b>MMAD (µm)</b>	<b>GSD</b>	<b>MMAD (µm)</b>	<b>GSD</b>	<b>MMAD (µm)</b>	<b>GSD</b>
<b>Aeroneb</b>						
<b>NaCl</b>	3,38 ± 0,23	1,73 ± 0,1	4,27 ± 0,14	1,92 ± 0,06	4,73 ± 0,05	2,04 ± 0,02
<b>CF</b>	3,04 ± 0,20 <i>(p=0,015)</i>	1,76 ± 0,03 <i>(n.s.)</i>	4,26 ± 0,17 <i>(n.s.)</i>	1,94 ± 0,07 <i>(n.s.)</i>	4,88 ± 0,06 <i>(p=0,002)</i>	1,99 ± 0,04 <i>(p=0,004)</i>
<b>R6G</b>	3,20 ± 0,08 <i>(n.s.)</i>	1,76 ± 0,01 <i>(n.s.)</i>	4,24 ± 0,12 <i>(n.s.)</i>	1,87 ± 0,13 <i>(n.s.)</i>	4,70 ± 0,06 <i>(n.s.)</i>	1,94 ± 0,03 <i>(p=0,002)</i>
<b>MPTS</b>	3,24 ± 0,09 <i>(n.s.)</i>	1,79 ± 0,03 <i>(n.s.)</i>	4,27 ± 0,05 <i>(n.s.)</i>	1,98 ± 0,13 <i>(n.s.)</i>	4,81 ± 0,05 <i>(p=0,015)</i>	2,02 ± 0,02 <i>(n.s.)</i>
<b>AKITA<sup>2</sup> APIXNEB</b>						
<b>NaCl</b>	3,51 ± 0,14	1,56 ± 0,04	3,02 ± 0,03	1,54 ± 0,02	2,90 ± 0,02	1,44 ± 0,00
<b>Salbutamol 1 mg/ml</b>	3,37 ± 0,29 <i>(n.s.)</i>	1,52 ± 0,10 <i>(n.s.)</i>	3,22 ± 0,04 <i>(p=0,002)</i>	1,48 ± 0,02 <i>(p=0,002)</i>	3,09 ± 0,04 <i>(p=0,002)</i>	1,48 ± 0,00 <i>(p=0,002)</i>
<b>Salbutamol 10 mg/ml</b>	3,29 ± 0,24 <i>(n.s.)</i>	1,59 ± 0,05 <i>(n.s.)</i>	2,76 ± 0,10 <i>(p=0,002)</i>	1,49 ± 0,09 <i>(n.s.)</i>	2,40 ± 0,06 <i>(p=0,002)</i>	1,60 ± 0,02 <i>(p=0,002)</i>
<b>Salbutamol 100 mg/ml</b>	3,07 ± 0,29 <i>(p=0,009)</i>	1,56 ± 0,07 <i>(n.s.)</i>	2,41 ± 0,23 <i>(p=0,002)</i>	1,38 ± 0,02 <i>(p=0,002)</i>	1,85 ± 0,22 <i>(p=0,002)</i>	1,60 ± 0,09 <i>(p=0,015)</i>

Dargestellt sind der Mediane Aerodynamische Massendurchmesser (MMAD) in µm und die Geometrische Standardabweichung (GSD). Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SD angegeben. Die p-Werte zur Benennung der Signifikanz der jeweiligen Substanzen im Vergleich zu NaCl sind kursiv gedruckt.



## Ergebnisse

### 3.2.2.5 Partikelgrößen von mikronisiertem Salbutamolpulver

Die Messungen der Aerosolpartikelgrößen von mikronisiertem Salbutamolpulver mittels Laserdiffraktometer (Abb. 17), ergaben für die Verneblung mit dem DP-4 (n = 6) einen MMAD von  $2,33 \pm 0,06 \mu\text{m}$  mit einem GSD von  $1,67 \pm 0,06$ . Das vom Aerosol Dispensor generierte Aerosol (n = 4) wies einen MMAD von  $2,65 \pm 0,05$  mit einem GSD von  $1,96 \pm 0,09$  auf.

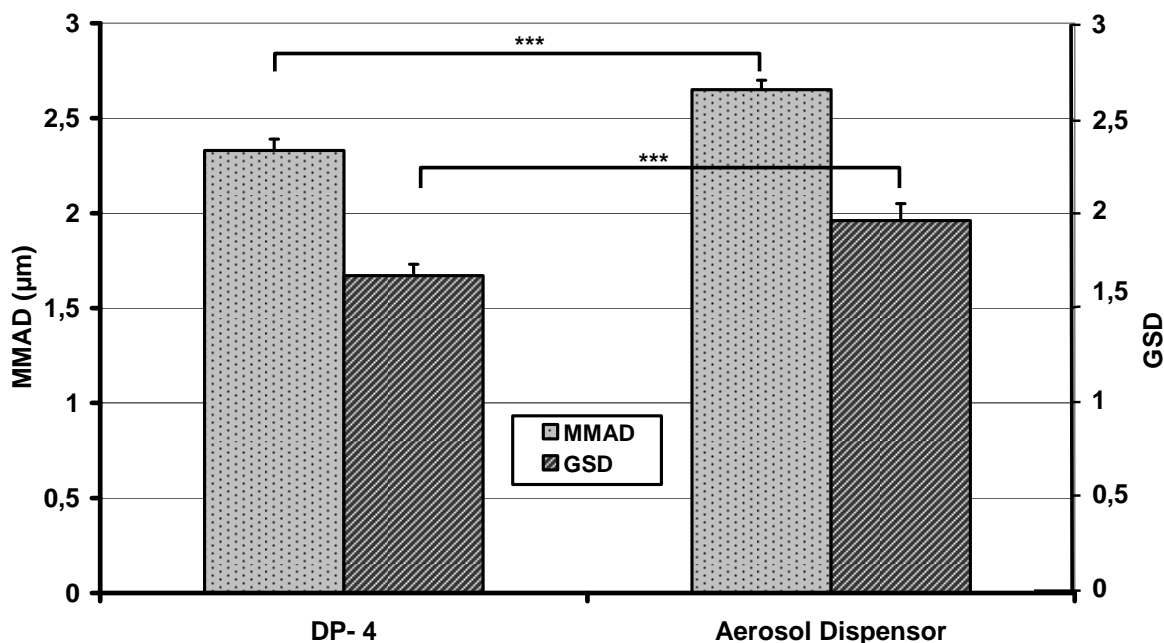


Abb. 17: Vergleich der Aerosolpartikelgrößen (MMAD) und der Geometrischen Standardabweichung (GSD) von mikronisiertem Salbutamolpulver nach Verneblung mit dem DP-4 (n = 6) und dem Aerosol Dispensor (n = 4). Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SD dargestellt. \*\*\* p = <0,001.

### 3.2.2.6 Partikelgrößenmessung mittels Andersen Impaktor

Nach Verneblung von mikronisiertem Salbutamolpulver mit dem Aerosol Dispensor (3 x 2 min) wurden im Andersen Impaktor, der sich am Ende des Beatmungssystems befand,  $1,64 \pm 0,07$  mg Salbutamol (n = 3) nachgewiesen. Der MMAD des Pulveraerosols betrug dabei  $2,73 \pm 0,06 \mu\text{m}$  mit einer geometrischen Standardabweichung (GSD) von  $1,53 \pm 0,06$ . Der Feinpartikelanteil (Partikel < 5 μm) des Aerosols lag bei  $91,3 \pm 2,0$  %. Ein Vergleich der Partikelgrößenmessung mit dem Laserdiffraktometer und dem Andersen-Impaktor ergibt somit keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des MMADs (p = 0,111). Die Geometrischen Standardabweichungen der Aerosolpartikel beider Messvarianten unterscheiden sich jedoch mit  $1,96 \pm 0,09$  nach Laserdiffraktometrie (s. 3.2.2.1.2) und  $1,53 \pm 0,06$  nach Verwendung des Andersen Impaktors signifikant (p = < 0,001) voneinander.

## Ergebnisse

### 3.2.3 Lungendeposition

#### 3.2.3.1 Verneblungen von Technetium mittels AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System in die Lunge

Bei der Verneblung von <sup>99m</sup>Tc markierter Kochsalzlösung wurden innerhalb von 10 min  $259,25 \pm 0,50$  Atemzüge mit einer jeweiligen Verneblungsdauer von 0,7 s generiert. Der durch vorheriges und anschließendes Wiegen bestimmte Output betrug dabei  $1,58 \pm 0,05$  ml. Der durch radioaktive Messung mittels Gammacounter ermittelte Output hingegen lag bei  $1,46 \pm 0,10$  ml. In der Lunge wurden dabei  $0,80 \pm 0,12$  ml deponiert. Im inspiratorischen Teil des Beatmungsschlauches befanden sich  $0,42 \pm 0,10$  ml und im expiratorischen Teil (Schlauch und Filter)  $0,24 \pm 0,04$  ml. Bezogen auf die durch Wiegen bestimmte vernebelte Menge von  $1,58 \pm 0,05$  ml bedeutet dies, dass im Mittel  $50,4 \pm 6,7$  % des Aerosols in der Lunge deponiert wurden und nur  $26,6 \pm 7,3$  % in den inspiratorischen und  $15,1 \pm 2,3$  % in den expiratorischen Schlauch gelangten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde bei allen folgenden Verneblungen mit dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System von einer Lungendeposition von 0,8 ml bei 10 minütiger Beatmung ausgegangen.

#### 3.2.3.2 Verneblungen von Salbutamolpulver mittels Aerosol Dispensor in einen Filter

Nach Aufbringen definierter Mengen Salbutamol auf die verwendeten Glasfaserfilter konnten  $73 \pm 12$  % des eingesetzten Salbutamols durch Spülen wieder aus dem Filter heraus gewaschen werden. Die somit im Filter verbliebenen 27 % wurden in den folgenden Versuchen der aus den Filtern heraus gewaschenen Menge zugerechnet und sind bei den Ergebnissen in Tabelle 3 bereits berücksichtigt. Durch die in Kapitel 3.1.3.4 beschriebenen Verbesserungen des Verneblungssystems konnte die im Filter deponierte Menge von  $0,58 \pm 0,22$  mg im „ursprünglichen System“ mit einer Verneblungszeit von 3 x 2 min auf  $2,13 \pm 0,50$  mg mit dem „neuen System“ und einer Verneblung von 4 x 3 min gesteigert werden. Obwohl bei der insgesamt 12-minütigen Verneblung höhere Filterdepositionen als bei der insgesamt 6-minütigen Verneblung erreicht werden konnte, wurde bei den folgenden Lungenversuchen das 3 x 2 minütige Schema durchgeführt, um die Verneblungszeit so kurz wie möglich zu halten. Bei Testung der 3 x 2-minütigen Verneblungen mit dem neuen System mit und ohne zusätzlich trockenem Gas gab es kaum Unterschiede hinsichtlich der Deposition und der Gesamtwiederfindung im System. Allerdings konnte die Standardabweichung der im Filter gefundenen Pulvermenge bei Verwendung einer zusätzlichen Gaszufuhr zur AKITA-Station verringert werden. Die folgenden Versuche an der isolierten Lunge wurden mit dem neuen System und zusätzlicher Gaszufuhr (Verneblung

## Ergebnisse

3 x 2 min) durchgeführt. Als die in der Lunge deponierte Menge wurde dabei die mittlere im Filter gefundene Menge von 1,71 mg (s. Tabelle 3) abzüglich der in jedem Versuch individuell im Expirationsschlauch gefundenen Menge angenommen.

Tabelle 3: Absolute Menge an Salbutamolpulver in mg, die nach verschiedenen Verneblungsvarianten mit dem Aerosoldispenser nachweisbar war.

	<b>3 x 2 min</b> „ursprüngliches System“	<b>3 x 2 min</b> „neues System“	<b>4 x 3 min</b> „neues System“	<b>3 x 2 min</b> „neues System, Verwendung von trockenem Gas“
<b>Filter</b>	0,58 ± 0,22	1,83 ± 0,50	2,13 ± 0,50	<b>1,71 ± 0,47</b>
<b>Inspiration</b>	0,94 ± 0,43	0,68 ± 0,17	0,60 ± 0,08	<b>0,62 ± 0,12</b>
<b>Expiration</b>	nicht bestimmt	0,10 ± 0,03	0,16 ± 0,16	<b>0,09 ± 0,02</b>
<b>Auslass</b>	0,36 ± 0,12	0,89 ± 0,19	1,19 ± 0,25	<b>0,77 ± 0,18</b>
<b>Spacer</b>	1,85 ± 0,71	3,45 ± 0,77	3,59 ± 0,56	<b>3,44 ± 0,65</b>
<b>HandiHaler®</b>	0,19 ± 0,06	0,26 ± 0,04	0,24 ± 0,06	<b>0,26 ± 0,05</b>
<b>Kapsel</b>	5,86 ± 0,88	2,08 ± 0,88	1,53 ± 0,36	<b>2,38 ± 0,72</b>
<b>Gesamt</b>	9,70 ± 1,18	9,29 ± 0,72	9,43 ± 0,63	<b>9,26 ± 0,28</b>
<b>Output</b>	4,69 ± 1,07	8,10 ± 0,48	8,47 ± 0,36	<b>7,36 ± 0,57</b>
<b>Versuchsanzahl</b>	<b><i>n = 3</i></b>	<b><i>n = 7</i></b>	<b><i>n = 4</i></b>	<b><i>n = 8</i></b>

Der Output wurde durch Wiegen der Kapsel vor und nach Verneblung, die restlichen Ergebnisse mittels HPLC-Messung bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SD dargestellt. Das fettgedruckte 3 x 2 minütige Verneblungsmuster (n = 8) wurde für die folgenden Versuche an der isolierten Kaninchenlunge verwendet.

## Ergebnisse

Einen anschaulichen Vergleich der Pulverdeposition nach verschiedenen Verneblungsmustern und Systemaufbauten bietet die Abb. 18.

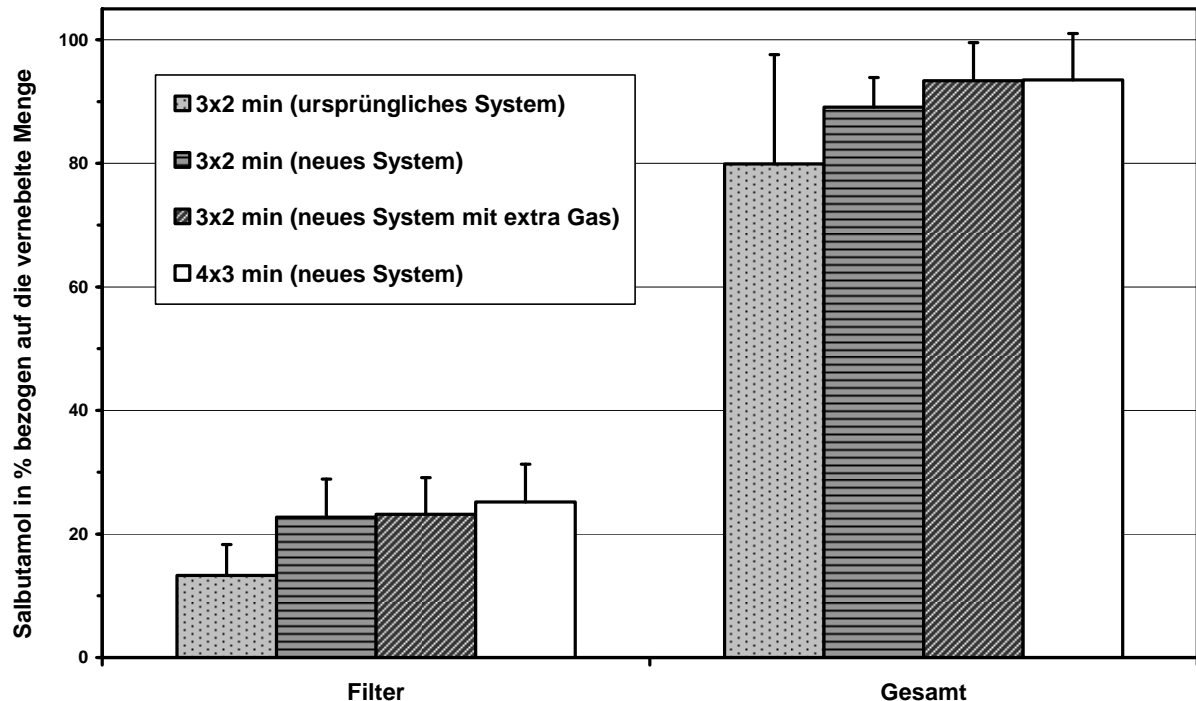


Abb. 18: Verteilung von Salbutamol-Pulver nach unterschiedlichen Verneblungsmustern mit dem Aerosol Dispensor. Die Ergebnisse sind in % bezogen auf die vernebelte Menge (bestimmt durch Wiegen der Kapsel vor und nach Verneblung) als Mittelwert + SD dargestellt.

### 3.2.4 Substanzübertritt am Modell der isolierten Kaninchenlunge

#### 3.2.4.1 Versuche mit dem Aeroneb<sup>®</sup>Professional-Vernebler

Die Verneblungszeit bei den durchgeführten Farbstoffversuchen mit dem Aeroneb<sup>®</sup>Professional-Vernebler betrug  $8,34 \pm 0,48$  min. In dieser Zeit wurden  $2,76 \pm 0,23$  ml der jeweiligen Farbstofflösung vernebelt. Mit einem Output von 0,3 ml/min entsprechen die Verneblungen den Ergebnissen der Charakterisierung des Systems mittels Technetium (s. Kapitel 3.1.3.1).

## Ergebnisse

### 3.2.4.1.1 Verneblung der Fluoreszenzfarbstoffe

Das Konzentrations-Zeit-Profil des Farbstoffübertritts aus der isolierten Lunge ins Perfusat (Abb. 19) zeigt im Falle des hydrophilen Farbstoffs CF einen schnellen, kontinuierlichen Anstieg wobei nach ca. 160 min ein Plateau bei etwa 400 ng/ml erreicht wird. Die CF-Konzentration nach 300 min liegt bei  $407 \pm 44$  ng/ml. Einen ähnlich schnellen Anstieg zeigt MPTS während der ersten 30 min, steigt dann aber schon nach ca. 60 min kaum noch und erreicht schließlich nach 120 min ein Plateau bei ca. 230 ng/ml ( $232 \pm 18$  ng/ml nach 300 min). Den geringsten Übertritt ins Perfusat zeigt der lipophile Farbstoff R6G, dessen Konzentration nach einem langsamen Anstieg in den ersten 30 min auf  $38 \pm 19$  ng/ml sogar wieder langsam aber kontinuierlich auf  $25 \pm 12$  ng/ml nach 300 min abfällt.

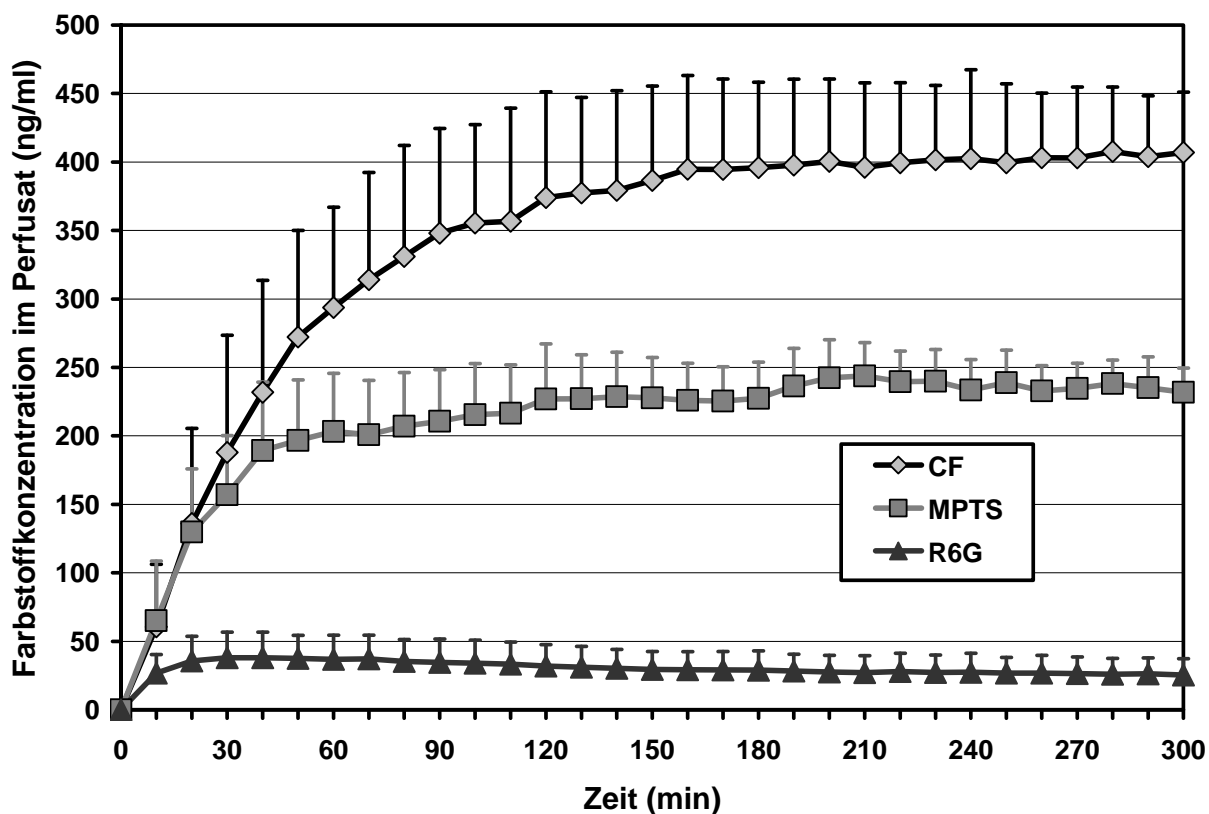


Abb. 19: Konzentrations-Zeit-Profil der Fluoreszenzfarbstoffe CF, MPTS und R6G in IIN-Perfusat (ng/ml) nach Verneblung von je 3 ml der Farbstofflösungen (500  $\mu$ g/ml) mit dem Aeroneb<sup>®</sup> Professional-Vernebler und einer Deposition von 0,4 ml (200  $\mu$ g Farbstoff) in der isolierten und perfundierten Kaninchenlunge (n = 4 für jeden Farbstoff). Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SD dargestellt.

## Ergebnisse

Eine Bilanz der im System insgesamt gefundenen Farbstoffmenge ist in Tabelle 4 dargestellt. Trotz des geringen Übertritts von R6G ins Perfusat ( $3,3 \pm 0,7 \%$ ), konnte durch die Lavage der Lunge mit Elektrolytlösung und mit Ethanol eine Gesamtwiederfindung von  $85,7 \pm 9,2 \%$  ( $171,4 \pm 18,5 \mu\text{g}$ ) erreicht werden. Eine hohe Wiederfindung von  $74,9 \pm 7,3 \%$  konnte auch für CF mit einem Perfusatanteil von  $53,4 \pm 6,8 \%$  erlangt werden. Der hydrophile Farbstoff MPTS hingegen konnte nur in ungenügendem Maße ( $43,2 \pm 2,4 \%$ ) wieder gefunden werden. Obwohl sich hier nur  $29,1 \pm 2,0 \%$  im Perfusat befanden, konnten auch durch die Lungenlavage nur weitere  $10 \%$  ermittelt werden.

Tabelle 4: Verteilung der Fluoreszenzfarbstoffe CF, MPTS und R6G im Modell der isolierten Kaninchenlunge (je n = 4).

	<b>CF</b>	<b>MPTS</b>	<b>R6G</b>
<b>Perfusat</b>	$106,9 \pm 13,7 \mu\text{g}$ <b><math>53,4 \pm 6,8 \%</math></b>	$58,2 \pm 3,9 \mu\text{g}$ <b><math>29,1 \pm 2,0 \%</math></b>	$6,6 \pm 1,3 \mu\text{g}$ <b><math>3,3 \pm 0,7 \%</math></b>
<b>Lavage</b>	$29,5 \pm 4,1 \mu\text{g}$ <b><math>14,8 \pm 2,0 \%</math></b>	$20,0 \pm 1,7 \mu\text{g}$ <b><math>10,0 \pm 0,9 \%</math></b>	$42,8 \pm 9,9 \mu\text{g}$ <b><math>21,4 \pm 5,0 \%</math></b>
<b>Ethanol-Lavage</b>	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	$121,2 \pm 12,4 \mu\text{g}$ <b><math>60,6 \pm 6,2 \%</math></b>
<b>Tropfen</b>	$5,7 \pm 4,9 \mu\text{g}$ <b><math>2,9 \pm 2,5 \%</math></b>	$1,1 \pm 0,7 \mu\text{g}$ <b><math>0,6 \pm 0,4 \%</math></b>	$0,1 \pm 0,1 \mu\text{g}$ <b><math>0,1 \pm 0,1 \%</math></b>
<b>Proben</b>	$7,8 \pm 1,4 \mu\text{g}$ <b><math>3,9 \pm 0,7 \%</math></b>	$7,4 \pm 1,4 \mu\text{g}$ <b><math>3,7 \pm 0,7 \%</math></b>	$0,7 \pm 0,2 \mu\text{g}$ <b><math>0,4 \pm 0,1 \%</math></b>
<b>Gesamt</b>	$149,9 \pm 14,6 \mu\text{g}$ <b><math>74,9 \pm 7,3 \%</math></b>	$86,5 \pm 4,8 \mu\text{g}$ <b><math>43,2 \pm 2,4 \%</math></b>	$171,4 \pm 18,5 \mu\text{g}$ <b><math>85,7 \pm 9,2 \%</math></b>

Zur Ermittlung des Farbstoffgehalts in % (fettgedruckt) wurde die deponierte Menge von  $200 \mu\text{g}$  Farbstoff gleich  $100 \%$  gesetzt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt.

## Ergebnisse

### 3.2.4.1.2 Carboxyfluorescein-Verneblung unter Verwendung von 1/3-Perfusat

Wie in Abb. 20 zu erkennen, trat CF bei Verwendung von 1/3-Perfusat etwas schneller ins Perfusat über und erreichte nach 300 min mit einer Endkonzentration von  $453 \pm 40$  ng/ml etwas höhere Werte als bei Verwendung von IIN-Perfusat ( $407 \pm 44$  ng/ml). Allerdings überschneiden sich die Standardabweichungen beider Versuche. Auch in der Gesamtbilanz (Tabelle 5) ist zu erkennen, dass trotz geringer Abweichungen in der Gesamtwiederfindung die Menge an Farbstoff im Perfusat bei beiden Versuchsreihen 53,4 % betrug. Der größte Unterschied zwischen den beiden Versuchen liegt im Farbstoffgehalt der Tropfflüssigkeit. Während bei den Versuchen mit IIN-Perfusat nur  $2,9 \pm 2,5$  % in den Tropfen gefunden werden konnte, befanden sich bei den 1/3-Perfusat-Versuchen  $12,3 \pm 2,0$  % CF in der Tropfflüssigkeit. Dieser Unterschied liegt neben einer höheren Konzentration an Farbstoff in den Tropfen auch darin begründet, dass bei den 1/3-Perfusat-Versuchen viel mehr Flüssigkeit ( $35 \pm 7$  ml) aus den Lungen tropfte als bei den Versuchen mit IIN-Perfusat ( $13 \pm 10$  ml).

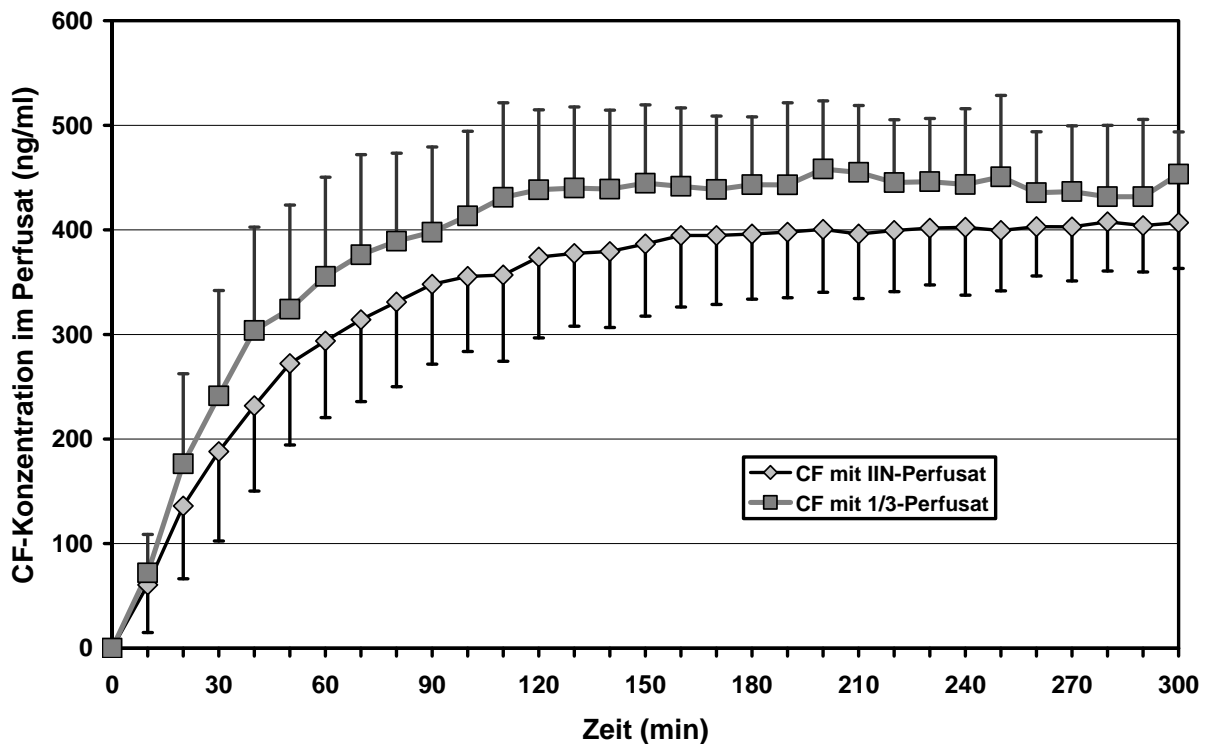


Abb. 20: Konzentrations-Zeit-Profil von CF im Perfusat in ng/ml nach Verneblung von je 3 ml einer CF-Lösung ( $500 \mu\text{g/ml}$ ) mit dem Aeroneb<sup>®</sup> Professional-Vernebler in die isolierte und perfundierte Kaninchenlunge unter Verwendung verschiedener Perfusionsmedien (je  $n = 4$ ). Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SD für die Versuche mit 1/3-Perfusat und als Mittelwert – SD für Versuche mit IIN-Perfusat dargestellt.

## Ergebnisse

### 3.2.4.1.3 Carboxyfluorescein-Übertritt nach Instillation

Auch der Vergleich der CF-Kinetiken (Abb. 21) nach Verneblung und nach Instillation (beide Versuchsreihen mit IIN-Perfusat) zeigt einen etwas unterschiedlichen Anstieg der Kurven. Nach Instillation stiegen die CF-Konzentrationen etwas langsamer, dafür aber länger und kontinuierlicher an als nach Verneblung. Da nur 2 Instillationsversuche durchgeführt wurden und sich die Konzentrations-Zeit-Profile der CF-Versuche nach Instillation größtenteils innerhalb der Standardabweichung der Verneblungsversuche befanden, wurde auf eine Prüfung auf statistische Unterschiede verzichtet.

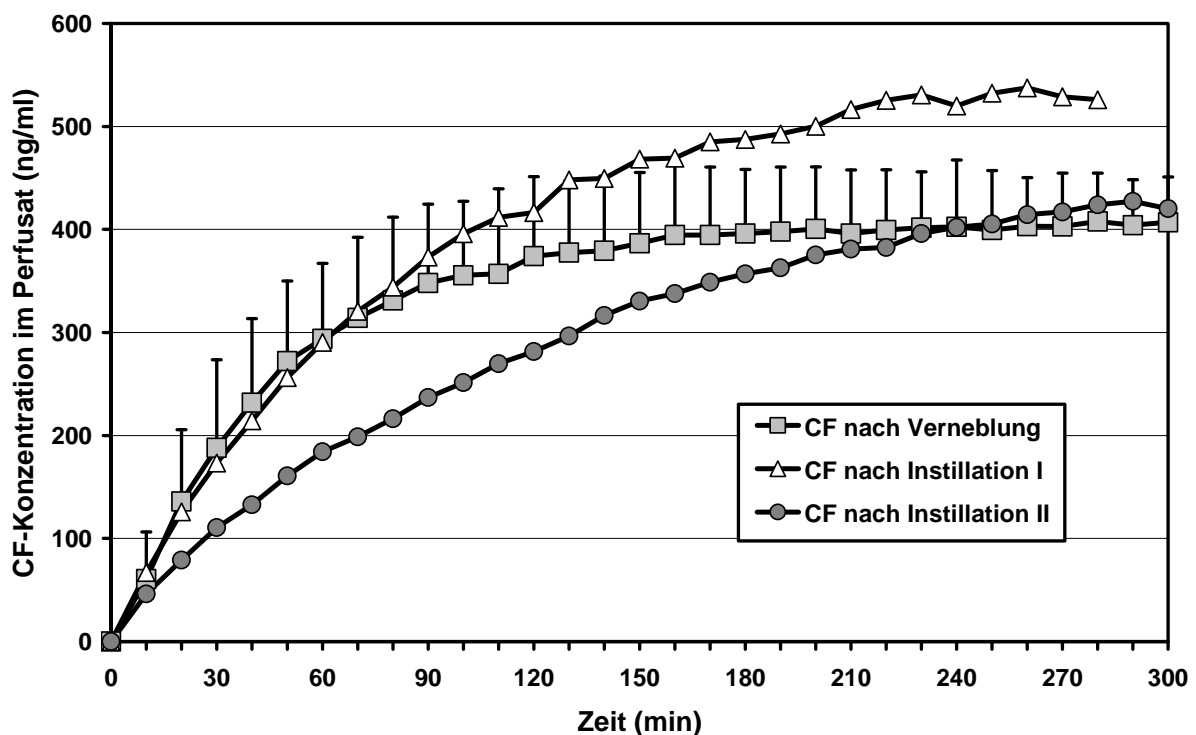


Abb. 21: Konzentrations-Zeit-Profil von CF im Perfusat in ng/ml nach Deposition von 200 µg des Farbstoffs durch Verneblung (n = 4) und Instillation (n = 2) in der isolierten und perfundierten Kaninchenlunge. Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SD für die Verneblung und als Einzelkurven für die Instillation dargestellt.



## Ergebnisse

Die Gesamtbilanzen der Instillationsversuche (Tabelle 5) mit einer Wiederfindung von 85,9 und 70,4 % ähneln den Versuchen nach CF-Verneblung, weisen jedoch eine etwas andere Verteilung im Modell der isolierten Kaninchenlunge auf.

Tabelle 5: Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffs CF im Modell der isolierten Kaninchenlunge nach Verwendung verschiedener Perfusionsmedien und verschiedener Depositionsmethoden.

	<b>CF (IIN- Perfusat) n = 4</b>	<b>CF (1/3-Perfusat) n = 4</b>	<b>CF (nach Instillation) n = 2</b>	
			<b>I</b>	<b>II</b>
<b>Perfusat</b>	106,9 ± 13,7 µg <b>53,4 ± 6,8 %</b>	106,7 ± 2,6 µg <b>53,4 ± 1,3 %</b>	144,4 µg <b>72,2 %</b>	113,9 µg <b>57,0 %</b>
<b>Lavage</b>	29,5 ± 4,1 µg <b>14,8 ± 2,0 %</b>	22,8 ± 0,2 µg <b>11,4 ± 0,1 %</b>	17,1 µg <b>8,5 %</b>	18,2 µg <b>9,1 %</b>
<b>Tropfen</b>	5,7 ± 4,9 µg <b>2,9 ± 2,5 %</b>	24,3 ± 4,0 µg <b>12,2 ± 2,0 %</b>	1,9 µg <b>0,9 %</b>	2,0 µg <b>1,0 %</b>
<b>Proben</b>	7,8 ± 1,4 µg <b>3,9 ± 0,7 %</b>	10,8 ± 1,3 µg <b>5,3 ± 0,6 %</b>	8,4 µg <b>4,2 %</b>	6,7 µg <b>3,3 %</b>
<b>Gesamt</b>	149,9 ± 14,6 µg <b>74,9 ± 7,3 %</b>	164,5 ± 2,5 µg <b>82,3 ± 1,2 %</b>	171,7 µg <b>85,9 %</b>	140,8 µg <b>70,4 %</b>

Zur Ermittlung des CF-Gehalts in % (fettgedruckt) wurde die deponierte Menge von 200 µg Farbstoff gleich 100 % gesetzt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SD bzw. bei der Instillation als Einzelmesswerte dargestellt.

## Ergebnisse

### 3.2.4.2 Verneblung von Salbutamolösungen mit dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB

Die Konzentrations-Zeit-Profile (Abb. 22 - Abb. 24) von Salbutamol im Perfusat nach zehnmütiger Verneblung mit dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System zeigen für alle verwendeten Konzentrationen (1, 10 und 100 mg) einen schnellen Anstieg der Perfusatkonzentration während der ersten 60 min, gefolgt von einem nur noch leichten Anstieg auf  $1,3 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$  (Verneblung von 1 mg/ml Salbutamol),  $16,2 \pm 5,8 \mu\text{g/ml}$  (10 mg/ml Salbutamol) und  $144,6 \pm 16,8 \mu\text{g/ml}$  nach 240 min.

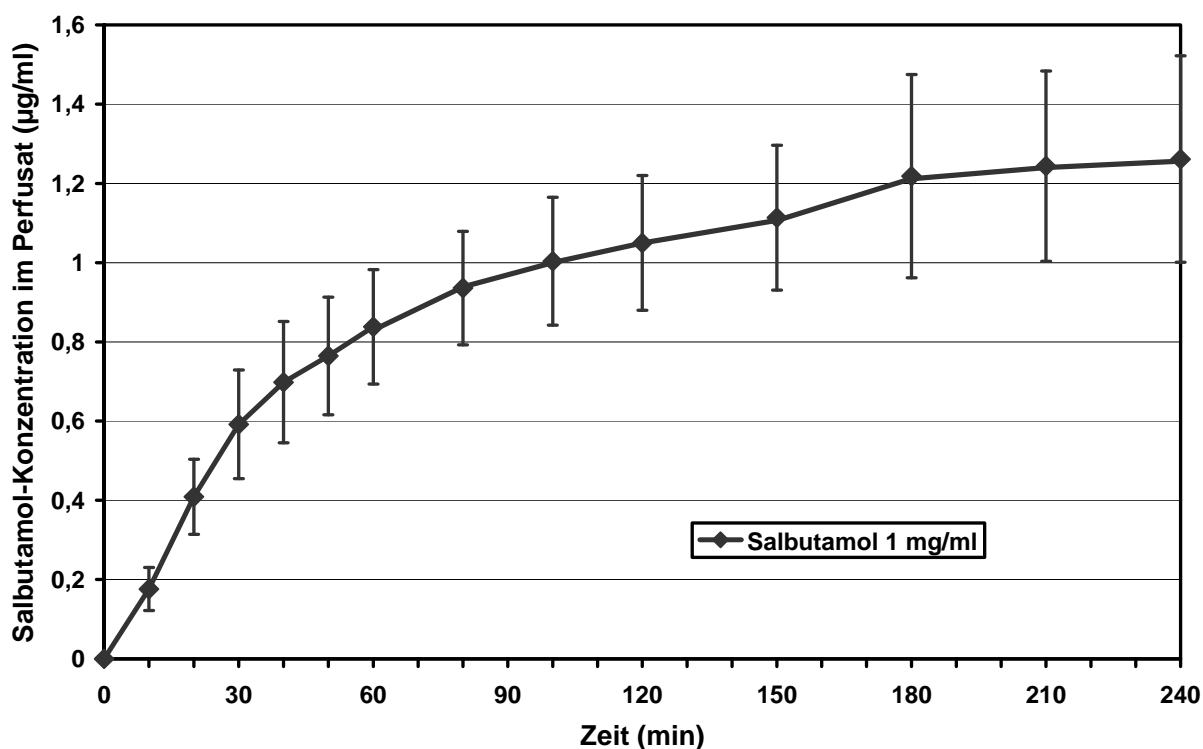


Abb. 22: Konzentrations-Zeit-Profil von Salbutamol im Perfusat in  $\mu\text{g/ml}$  nach zehnmütiger Verneblung von Salbutamol der Konzentration 1 mg/ml mit dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System in die isolierte und perfundierte Kaninchenlunge ( $n = 4$ ). Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt.

## Ergebnisse

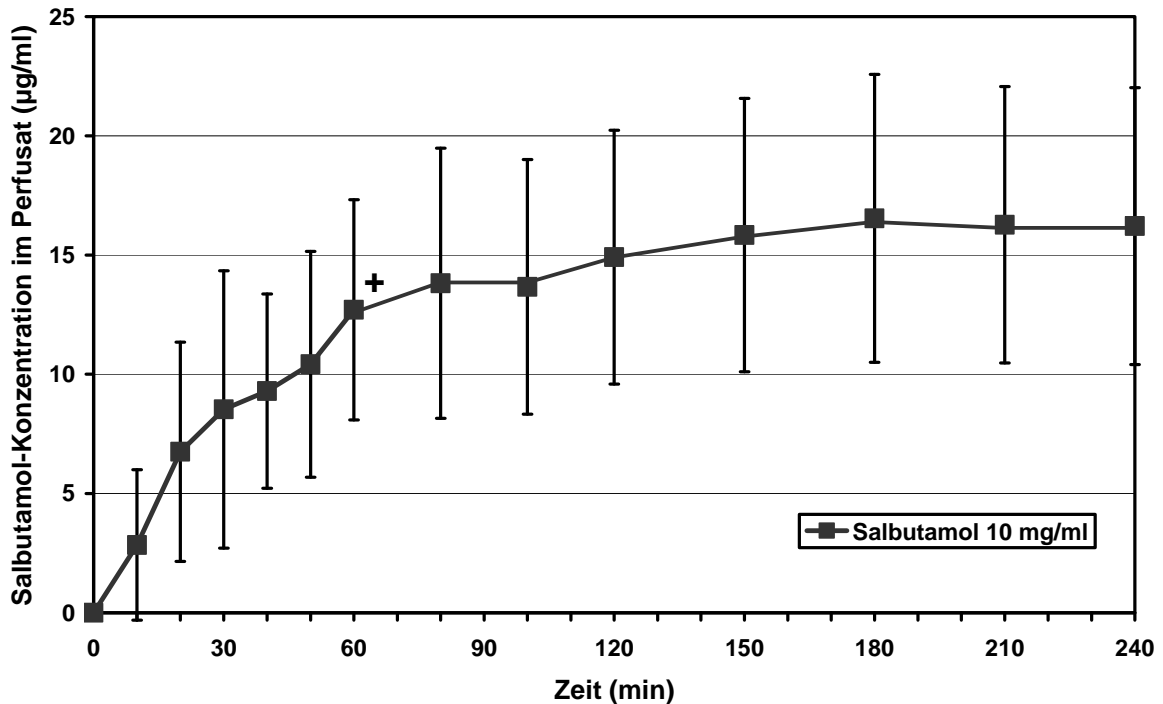


Abb. 23: Konzentrations-Zeit-Profil von Salbutamol im Perfusat in  $\mu\text{g/ml}$  nach zehnmütiger Verneblung von Salbutamol der Konzentration 10 mg/ml mit dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System in die isolierte und perfundierte Kaninchenlunge ( $n = 4$ ; + bei diesem Wert  $n = 3$ ). Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt.

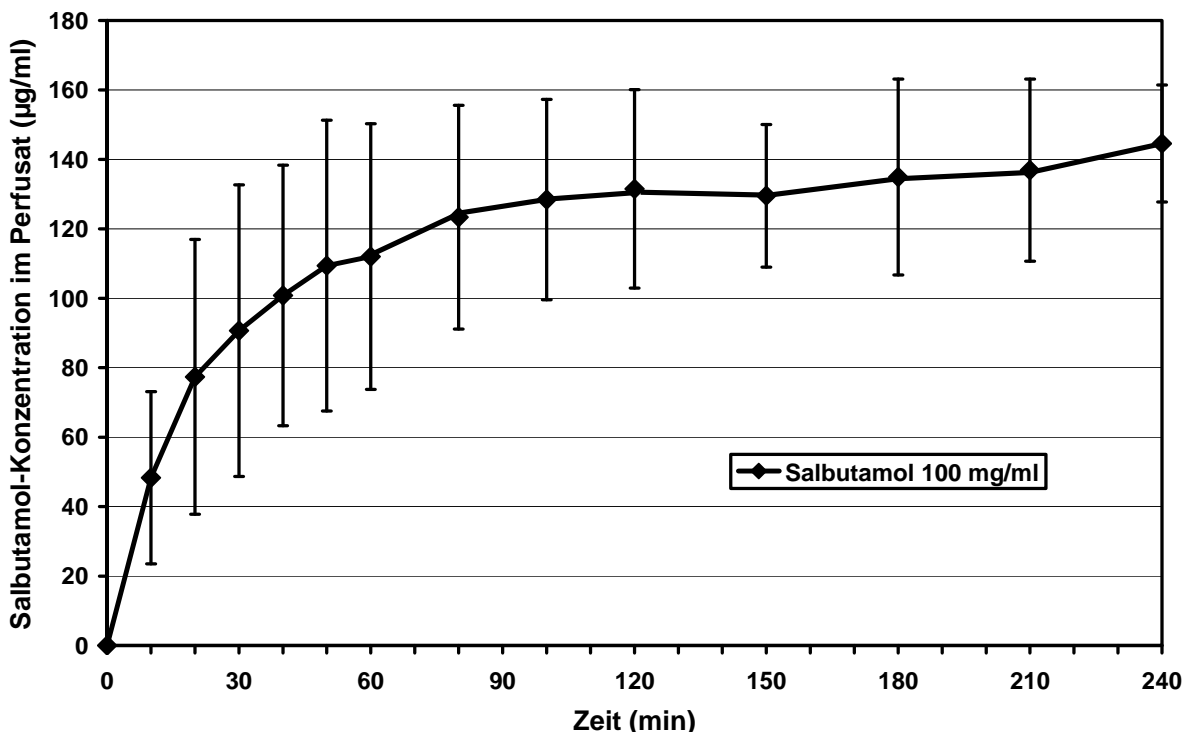


Abb. 24: Konzentrations-Zeit-Profil von Salbutamol im Perfusat in  $\mu\text{g/ml}$  nach zehnmütiger Verneblung von Salbutamol der Konzentration 100 mg/ml mit dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System in die isolierte und perfundierte Kaninchenlunge ( $n = 4$ ). Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt.

## Ergebnisse

Ein direkter Vergleich der Übertrittskinetiken der unterschiedlichen Salbutamolkonzentrationen ist durch die Berechnung des prozentualen Anteils an Salbutamol im Perfusat, bezogen auf die in der Lunge jeweils deponierte Salbutamolmenge möglich. So dargestellt weisen die Konzentrations-Zeit-Profile der drei unterschiedlichen Versuchsreihen (Abb. 25) eine sehr ähnliche Übertrittskinetik mit einem Endwert von ca. 41 – 49 % Salbutamol im Perfusat auf.

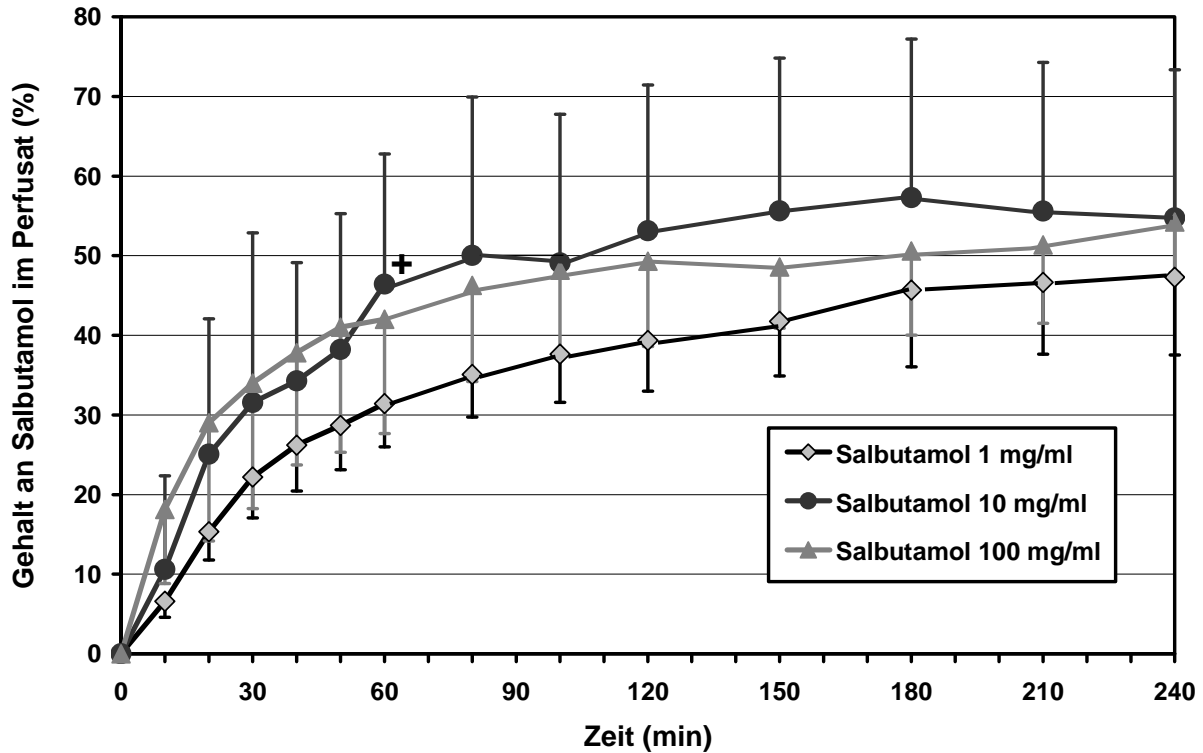


Abb. 25: Vergleich der Übertrittskinetiken von Salbutamol verschiedener Konzentrationen (1, 10 und 100 mg/ml) in % bezogen auf das deponierte Flüssigkeitsvolumen von 800  $\mu$ l nach zehnminütiger Verneblung mit dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System (je n = 4; + bei diesem Wert n = 3). Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SD für Salbutamol der Konzentration 10 mg/ml und als Mittelwert – SD für 1 und 100 mg/ml Salbutamol dargestellt.

## Ergebnisse

Die Gesamtbilanz in Tabelle 6 zeigt ebenfalls wie ähnlich sich die drei Versuchsreihen im Hinblick auf die Verteilung von Salbutamol im System sind. Lediglich im Perfusat der Versuche mit Salbutamol 1 mg/ml konnte relativ etwas weniger Salbutamol wieder gefunden werden als bei den beiden Versuchen mit höherer Konzentration. Dieser Verlust schlägt sich auch in der Gesamtwiederfindung von Salbutamol im gesamten System nieder. Diese Unterschiede sind nicht statistisch signifikant.

Tabelle 6: Verteilung von Salbutamol der Konzentrationen 1, 10 und 100 mg/ml im Modell der isolierten Kaninchenlunge (je n = 4).

	<b>Perfusat</b>	<b>Lavage</b>	<b>Proben</b>	<b>Gesamt</b>
<b>Salbutamol 100 mg/ml</b>	36,75 ± 5,71 mg <b>48,3 ± 7,1 %</b>	8,27 ± 2,49 mg <b>10,3 ± 3,1 %</b>	1,55 ± 0,43 mg <b>1,9 ± 0,5 %</b>	46,56 ± 5,19 mg <b>60,6 ± 9,8 %</b>
<b>Salbutamol 10 mg/ml</b>	3,89 ± 1,26 mg <b>48,7 ± 15,8 %</b>	0,86 ± 0,32 mg <b>10,8 ± 3,2 %</b>	0,21 ± 0,18 mg <b>2,7 ± 2,2 %</b>	4,97 ± 1,59 mg <b>62,1 ± 19,9 %</b>
<b>Salbutamol 1 mg/ml</b>	0,33 ± 0,08 mg <b>40,8 ± 10,2 %</b>	0,08 ± 0,01 mg <b>10,2 ± 1,1 %</b>	0,01 ± 0,00 mg <b>1,2 ± 0,2 %</b>	0,42 ± 0,08 mg <b>52,1 ± 10,2 %</b>

Zur Ermittlung des Salbutamolgehalts in % (fettgedruckt) wurde von einer Lungendeposition von 800 µl der jeweiligen Salbutamolösung ausgegangen. Somit wurden die deponierten Salbutamolmengen von 0,8 mg, 8 mg und 80 mg gleich 100 % gesetzt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SD dargestellt.

## Ergebnisse

### 3.2.4.3 Verneblung von Salbutamolpulver

Die Konzentrationen an Salbutamol im Perfusat nach Verneblung von mikronisiertem Salbutamolpulver mit dem DP-4 und dem Aerosol Dispensor sind in Abb. 26 dargestellt. Durch den Aerosol Dispensor gelangten  $1,71 \pm 0,47$  mg in die Lunge; nachdem im expiratorischen Schlauch- und Filtersystem die exhalierete Menge von  $0,46 \pm 0,03$  mg gefunden wurde, konnte von einer in der Lunge tatsächlich deponierten Menge von  $1,25 \pm 0,50$  mg ausgegangen werden. Der durch Wiegen bestimmte Output des DP-4 lag bei  $1,13 \pm 0,30$  mg. Hier wurden also nach Abzug der exhaliierten Menge von  $0,01 \pm 0,00$  mg  $1,12 \pm 0,30$  mg in der Lunge deponiert. Nach Verneblung des Pulvers mit dem Aerosol Dispensor stieg die Salbutamolkonzentration im Perfusat in den ersten 10 min erst rapide, dann nur noch langsam an und erreichte nach 100 min ein Plateau mit einem Endwert von  $0,98 \pm 0,23$   $\mu\text{g/ml}$  nach 240 min. Die Salbutamolkonzentration im Perfusat nach Verneblung mit dem DP-4, stieg dagegen wesentlich langsamer, dafür aber kontinuierlicher und bis zum Versuchsende ohne Erreichen eines Plateaus an und wies nach 240 min eine Konzentration von  $0,85 \pm 0,27$   $\mu\text{g/ml}$  auf.

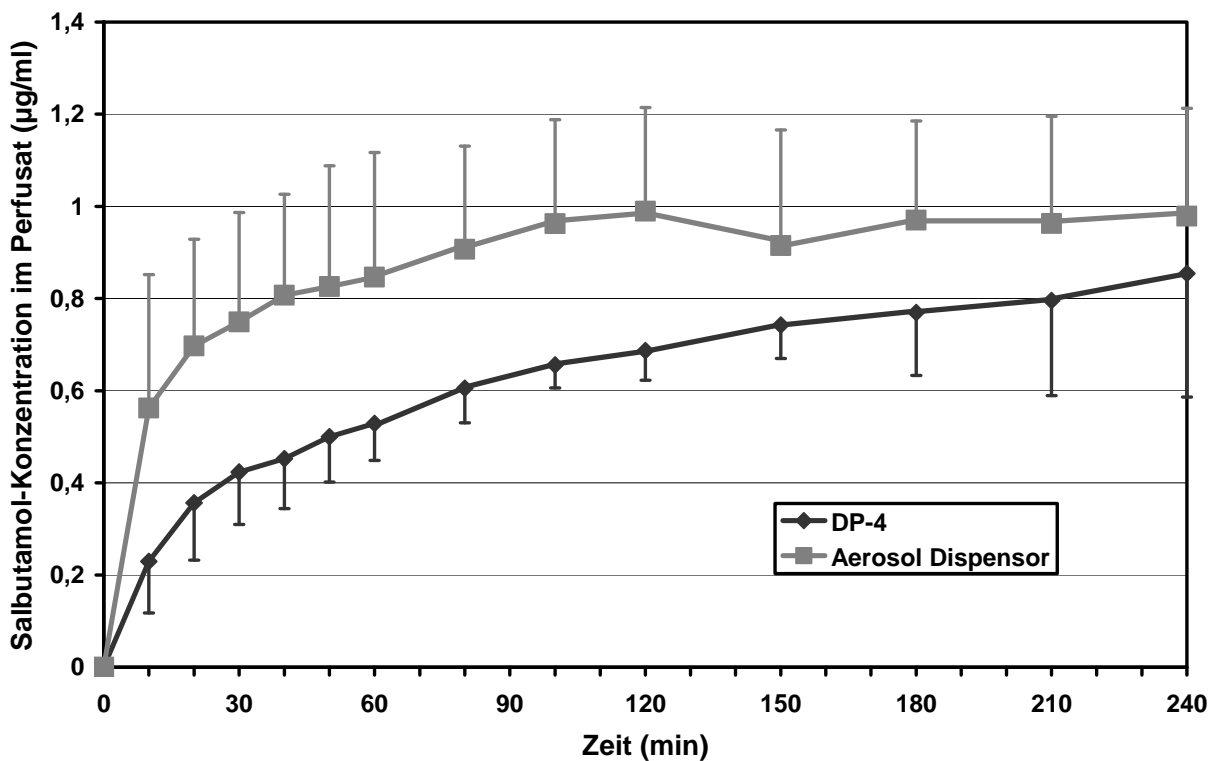


Abb. 26: Konzentrations-Zeit-Profil von Salbutamol im Perfusat in  $\mu\text{g/ml}$  nach Verneblung von Salbutamolpulver mit dem DP-4 und dem Aerosol Dispensor in die isolierte und perfundierte Kaninchenlunge (je  $n = 4$ ). Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SD für den Aerosol Dispensor und als Mittelwert - SD für den DP-4 dargestellt.

## Ergebnisse

Ein Vergleich des prozentualen Perfusatgehalts an Salbutamol nach den verschiedenen Verneblungen von Salbutamolpulver und -lösung zeigt, dass sich der Übertritt von Salbutamol nach Verneblung des Pulvers mit dem DP-4 und dem Aerosol Dispensor nicht in dem erreichten Endwert, wohl aber in dem Verlauf der Kinetik deutlich unterscheidet (Abb. 27). Völlig anders als der Übertritt nach Verneblung eines Pulvers stellt sich die Übertrittskinetik nach Deposition eines Flüssigaerosols mittels AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System dar. Obwohl diese Kurve in den ersten 10 min den gleichen Anstieg zeigt wie nach Verneblung mit dem DP-4, erreicht sie schon nach 20 min ähnliche Werte wie nach Verneblung mit dem Aerosol Dispensor. Nachdem die Konzentration weiterhin recht stark ansteigt, erreicht sie nach 240 min schließlich doppelt so hohe Werte im Perfusat wie die beiden Pulververneblungen.

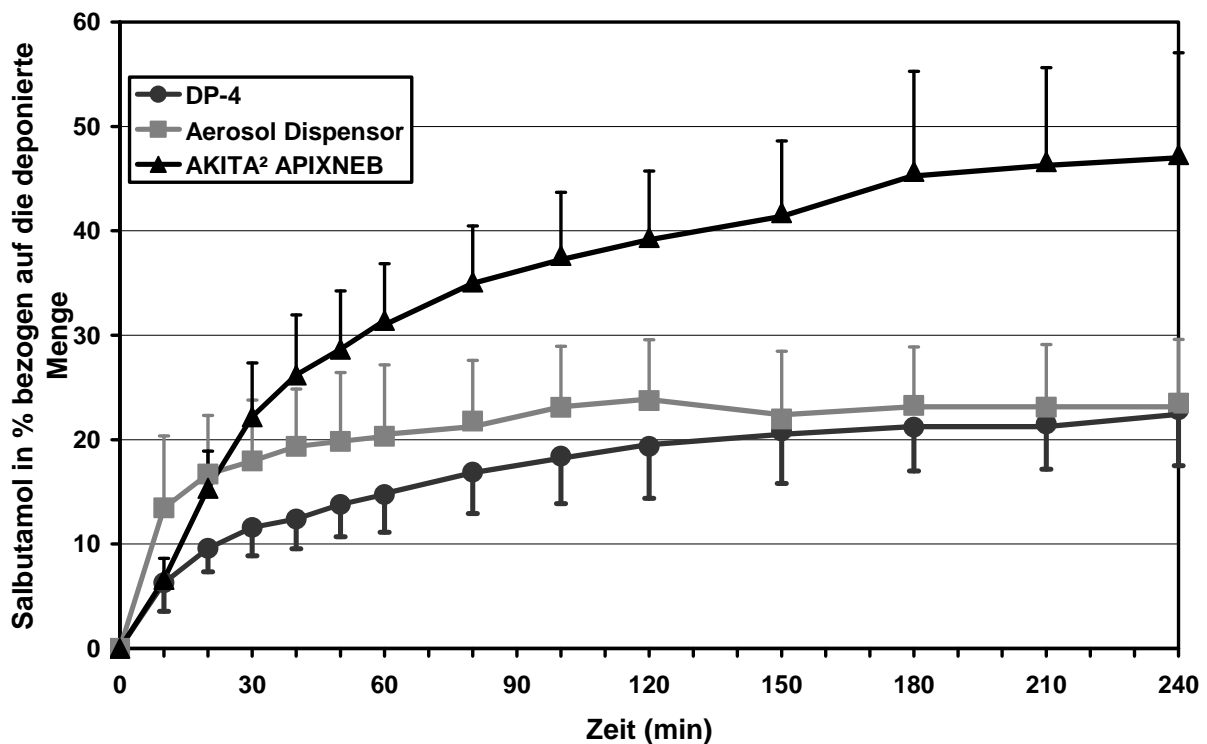


Abb. 27: Vergleich der Übertrittskinetiken von Salbutamol nach Verwendung verschiedener Vernebler in % bezogen auf die deponierte Menge (je n = 4). Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SD für die Versuche mit dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System (Lungendeposition ca. 0,8 mg) und dem Aerosol Dispensor (Lungendeposition ca. 1,25 mg) und als Mittelwert – SD für die Verneblung mit dem DP-4 (Lungendeposition ca. 1,12 mg) dargestellt.

## Ergebnisse

Die Gesamtbilanz in Tabelle 7 bestätigt die bereits beobachtete, unterschiedliche Verteilung von Salbutamol im Lungenmodell in Abhängigkeit der Verneblungsart. Wie bereits beschrieben konnte im Perfusat nach Flüssigverneblung doppelt so viel Salbutamol gefunden werden wie bei den beiden Pulververneblungen, die jeweils einen ähnlichen Gehalt im Perfusat aufwiesen. Starke Unterschiede gab es auch im Salbutamolgehalt in der Lavage. Hier konnte nach Verneblung mit dem DP-4 dreimal so viel Salbutamol wie bei den anderen beiden Verneblungsarten gefunden werden. Insgesamt konnten bei den Versuchen mit dem DP-4 und der Flüssigverneblung ca. 50 % des deponierten Salbutamols lokalisiert werden, nach Verneblung mit dem Aerosol Dispensor hingegen nur 30 %.

Tabelle 7: Verteilung von Salbutamol im Modell der isolierten Kaninchenlunge nach Verwendung verschiedener Vernebler (je n = 4).

<b>Vernebler</b>	<b>Perfusat</b>	<b>Lavage</b>	<b>Proben</b>	<b>Gesamt</b>
<b>DP-4</b>	0,24 ± 0,08 mg <b>21,0 ± 5,8 %</b>	0,34 ± 0,12 mg <b>29,9 ± 5,1 %</b>	0,01 ± 0,00 mg <b>0,6 ± 0,1 %</b>	0,58 ± 0,16 mg <b>51,4 ± 1,2 %</b>
<b>Aerosol Dispensor</b>	0,25 ± 0,06 mg <b>20,0 ± 5,1 %</b>	0,11 ± 0,05 mg <b>9,1 ± 4,5 %</b>	0,01 ± 0,0 mg <b>0,8 ± 0,2 %</b>	0,37 ± 0,11 mg <b>30,0 ± 9,5 %</b>
<b>AKITA<sup>2</sup> APIXNEB (1 mg/ml)</b>	0,33 ± 0,08 mg <b>40,8 ± 10,2 %</b>	0,08 ± 0,01 mg <b>10,2 ± 1,1 %</b>	0,01 ± 0,00 mg <b>1,2 ± 0,2 %</b>	0,42 ± 0,08 mg <b>52,1 ± 10,2 %</b>

Zur Ermittlung des Salbutamolgehalts in % (fettgedruckt) wurde die jeweils in der Lunge deponierte Menge gleich 100 % gesetzt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SD dargestellt.



## Ergebnisse

### 3.2.5 Medikamentenübertritt bei pulmonaler Hypertonie

Die Verneblungsparameter während der Versuche am Modell einer pulmonalen Hypertonie entsprachen mit einer Verneblung von  $2,69 \pm 0,12$  ml in  $8,64 \pm 0,20$  min (Output 0,3 ml/min) den vorangegangenen Versuchen mit dem AERONEB® Professional-Vernebler.

Wie in Abb. 28 ersichtlich, gab es außer der verkürzten Versuchsdauer von 130 statt 300 min keine Unterschiede in der Übertrittskinetik von CF zwischen den Versuchen mit normalem und erhöhtem pulmonalerarteriellen Druck. Auch die Werte der Gesamtbilanz in Tabelle 8 weisen keine großen Unterschiede hinsichtlich der CF-Verteilung im System auf. Lediglich der in der Lungenlavage gefundene Anteil an CF ist im Falle der Versuche mit pulmonalerarterieller Druckerhöhung deutlich höher, was damit erklärt werden kann, dass sich durch die fortschreitende Ödembildung am Ende dieser Versuche schon einige Milliliter Flüssigkeit in der Lunge befanden und mit der Lavage heraus gewaschen wurden.

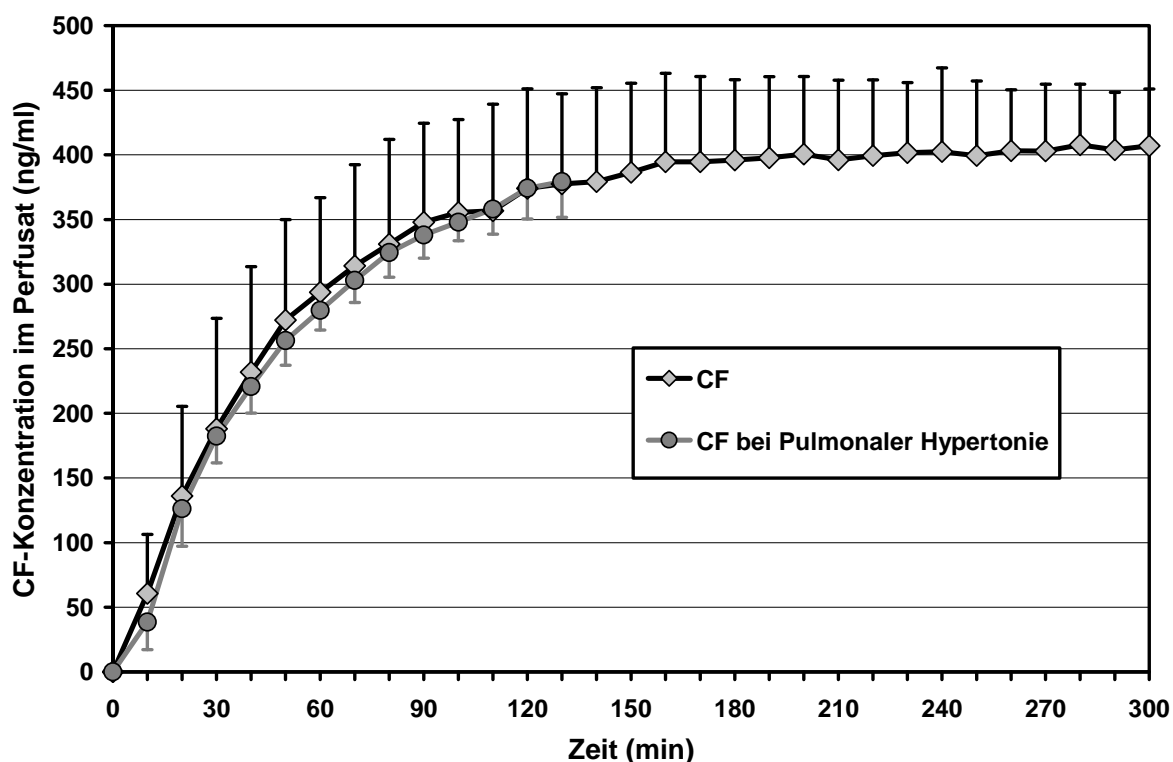


Abb. 28: Konzentrations-Zeit-Profil von CF im Perfusat nach Verneblung von je 3 ml einer CF-Lösung (500 µg/ml) mit dem AERONEB® Professional-Vernebler in die isolierte und perfundierte Kaninchenlunge mit und ohne pulmonale Hypertonie (je n = 4). Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SD für die Versuche ohne und als Mittelwert – SD für die Versuche mit pulmonaler Hypertonie dargestellt.

## Ergebnisse

Tabelle 8: Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffs CF im Modell der isolierten Kaninchenlunge mit und ohne pulmonaler Hypertonie (je n = 4).

	CF	CF (bei pulmonaler Hypertonie)
<b>Perfusat</b>	106,9 ± 13,7 µg <b>53,4 ± 6,8 %</b>	99,8 ± 8,1 µg <b>49,9 ± 4,1 %</b>
<b>Lavage</b>	29,5 ± 4,1 µg <b>14,8 ± 2,0 %</b>	45,5 ± 13,2 µg <b>22,8 ± 6,6 %</b>
<b>Tropfen</b>	5,7 ± 4,9 µg <b>2,9 ± 2,5 %</b>	7,7 ± 3,9 µg <b>3,9 ± 2,0 %</b>
<b>Proben</b>	7,8 ± 1,4 µg <b>3,9 ± 0,7 %</b>	3,1 ± 0,6 µg <b>1,6 ± 0,3 %</b>
<b>Gesamt</b>	149,9 ± 14,6 µg <b>74,9 ± 7,3 %</b>	156,2 ± 16,4 µg <b>78,1 ± 8,2 %</b>

Zur Ermittlung des CF-Gehalts in % (fettgedruckt) wurde die deponierte Menge von 200 µg Farbstoff gleich 100 % gesetzt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SD dargestellt.

## **4 DISKUSSION**

### **4.1 Diskussion der Methoden**

#### 4.1.1 Partikelgrößenmessung

Zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung von Aerosolen sind verschiedene Messverfahren möglich, wie z.B. die Trägheitsabscheidung (mittels Kaskadenimpaktor) oder optische Verfahren wie die Laserbeugung. Kaskadenimpaktoren ermöglichen dabei nicht nur die Größenklassifizierung des Aerosols durch Ermittlung des aerodynamischen Durchmessers, sondern geben auch unmittelbar die Masse der einzelnen Größenfraktionen (Gebhart, 1997) sowie die insgesamt ausgebrachte Masse wieder (Wyka et al., 2007). Die Messung der Partikelgrößenverteilung eines Aerosols mittels Kaskadenimpaktor ist nicht nur traditionell die am häufigsten verwendete Messmethode (Majoral et al., 2006; Mitchell et al., 2006), sondern auch zur Charakterisierung einer neuen inhalativen Pulverformulierung vor der Markteinführung vorgeschrieben. Die Verwendung von Kaskadenimpaktoren ist jedoch sehr zeit- und arbeitsintensiv und eignet sich daher schlecht als Screeningverfahren in der Entwicklungsphase neuer Produkte (Marriott et al., 2006). Ein weiterer Nachteil der Impaktoren bei der Messung von Flüssigaerosolen ist die mögliche Verdunstung der Partikel während ihrer Passage durch den Impaktor und die damit verbundene Abnahme der Partikelgröße (Berg et al., 2007; Waldrep et al., 2007). Dieses Problem ist bei der Partikelgrößenmessung durch Lichtstreuung mittels Laserdiffraktometer in der Regel weniger stark ausgeprägt, da die Messung hier unmittelbar nach Verlassen des Aerosols am Mundstück möglich ist. Die Laserdiffraktion weist dagegen andere Probleme, besonders im Bereich der Pulververneblung auf. Bei der Verwendung des Prinzips der Lichtstreuung, die primär ein Oberflächeneffekt ist, muss auf eine Volumen- bzw. Massenverteilung umgerechnet werden (Gebhart, 1997). Da bei dieser Berechnung von sphärischen Partikeln ausgegangen wird, können bei der Vermessung nichtsphärischer Partikel Messfehler auftreten. Geht man z.B. von einem ellipsenförmigen Teilchen aus, könnten sich - in Abhängigkeit von der Ausrichtung des Partikels im Messmedium - unterschiedliche Beugungsmuster für das gleiche Partikel ergeben und man würde eine Partikelgrößenverteilung zwischen den kürzesten und längsten Durchmessern erhalten.

Trotz einer großen Anzahl experimenteller Variablen, die die Qualität der Messung mittels Laserdiffraktometrie beeinflussen können (Mitchell et al., 2006), besteht meist eine gute Vergleichbarkeit zwischen Laserdiffraktometrie und Verwendung eines Kaskadenimpaktors und beide Messmethoden sind mit Berücksichtigung der individuellen Vor- und Nachteile gut

## Diskussion

zur Bestimmung des aerodynamischen Durchmessers von Aerosolpartikeln geeignet (Bitterle et al., 2007; Marriott et al., 2006; Martin et al., 2006; Mitchell et al., 2006; Zeng et al., 2006; Ziegler and Wachtel, 2005).

### 4.1.2 Lungendeposition

Es gibt viele verschiedene Verfahren, die Lungendeposition einer inhalativ verabreichten Substanz zu bestimmen. Dazu gehören z. B. theoretische Berechnungen, die sich u. a. auf die Partikelgröße, die Atemwegsgeometrie und das Atemmuster beziehen (Persons, et al. 1987; Smaldone, 2000). Auch in vivo-Studien an Menschen können durch Lungenfunktionstests oder das Auftreten systemisch wirksamer Stoffe oder ihrer Metaboliten in Blut oder Harn Hinweise auf die deponierte Medikamentenmenge geben (Hindle et al., 1997; Lipworth and Clark, 1998; Roth, 1997). Die einzige direkte Methode zur Bestimmung der Lungendeposition besteht jedoch in der Messung der Aktivität einer inhalierten radioaktiven Substanz (Dubus et al., 2001). Das zu diesem Zweck wohl am meisten verwendete Isotop ist  $^{99m}\text{Tc}$  (Dolovich and Labiris, 2004). Eine geeignete radioaktive Substanz zur Bestimmung der Lungendeposition muss eine Halbwertszeit besitzen, die lang genug ist, um ausführliche Messungen zu erlauben, gleichzeitig jedoch auch kurz genug, um unnötige radioaktive Belastungen zu vermeiden. Diese Anforderung erfüllt das auch in dieser Arbeit verwendete  $^{99m}\text{Tc}$ , welches eine Halbwertszeit von 360 min besitzt. Weiterhin sollte die in vivo-Depositionsstudien verwendete radioaktive Substanz lange genug in der Lunge verbleiben ohne in den Blutkreislauf überzutreten, was bei  $^{99m}\text{Tc}$  jedoch problematisch ist, da es ein kleines Molekül ist, welches in Blutgefäße übertreten kann. Zur Durchführung solcher in vivo-Versuche muss  $^{99m}\text{Tc}$  daher an größere Moleküle gebunden werden (Coates et al., 2007). Dies war jedoch bei den im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Versuchen nicht nötig, da die Perfusion während der Inhalation abgeklemmt und somit ein Verlust der Substanz aus der Lunge verhindert werden konnte. Eine Darstellung des deponierten Isotops, z.B. mittels SPECT (single photon emission computer tomography) oder PET (positron emission tomography) ermöglicht zwar ein genaues Bild über die Verteilung des Aerosols in der Lunge, gibt aber als nicht-quantitative Technik nur wenig Aufschluss über die exakte Menge der deponierten Substanz (Cryan et al., 2007). Da in der vorliegenden Arbeit jedoch die genaue Menge des deponierten Aerosols von größerem Interesse als die intrapulmonale Verteilung war, wurde auf eine bildliche Darstellung der Verteilung verzichtet und lediglich eine Quantifizierung mittels Gammacounter durchgeführt (s. Kapitel 4.2.2). Leider konnte nur die Lungendeposition der

## Diskussion

Flüssigaerosole durch diese direkte Methode ermittelt werden, da für die Trockenpulver keine radioaktiv-markierten Substanzen zur Verfügung standen. Aus diesem Grund musste bei der Pulververneblung auf eine Messung der inhalierten und exhalierten Aerosolmasse zur Berechnung der Lungendeposition ausgewichen werden. Dies kann sowohl durch eine photometrische Bestimmung der in- und exhalierten Aerosolmenge (Kim und Hu, 2006), als auch - wie in dieser Arbeit - durch Verwendung je eines Filters im in- und expiratorischen Luftstrom (Bennett et al., 1998) durchgeführt werden. Durch Messung der während einer Versuchsreihe im inhalativen Filter gefundenen Stoffmenge, abzüglich des Aerosols im expiratorischen Filter einer weiteren Versuchsreihe, konnte die in der Lunge verbliebene Aerosolmenge ermittelt werden (s. Kapitel 4.2.2).

Somit wurde in dieser Arbeit durch die Messung des deponierten radioaktiv markierten Flüssigaerosols eine häufig verwendete, exakte und direkte Methode zur Bestimmung der in der Lunge deponierten Aerosolmenge gewählt. Die Untersuchung der Pulverdeposition mittels indirekter Filtertechnik bietet - unter Inkaufnahme der geringen Schwankungen, die beim Herauslösen des Pulvers aus den Filtern entstanden – ebenfalls eine bewährte Methode zur Ermittlung der Lungendeposition.

### 4.1.3 Das Modell der isolierten Kaninchenlunge

Das Modell der isolierten, perfundierten und ventilierten Lunge bietet ein komplexes System zur Untersuchung verschiedener Prozesse (z.B. Absorption, Metabolismus) am intakten Lungengewebe ohne Beeinflussung durch extrapulmonale Faktoren (Mobley und Hochhaus, 2001; Niemeier, 1984; Tronde et al., 2002; 2003). Die Verabreichung verschiedener Substanzen kann dabei durch Zugabe zur Perfusion über die Zirkulation oder durch intratracheale Instillation oder Verneblung über die Lunge erfolgen (Ewing et al., 2006). Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen erfolgte sowohl die Applikation der Testsubstanzen als auch die Ventilation der isolierten Kaninchenlunge über einen intratrachealen Tubus. Die Verwendung eines solchen Tubus ermöglicht eine kontrollierte Passage des Totraumes (Niemeier, 1984) und erleichtert die Aerosolapplikation in die Lunge durch Umgehung der oberen Atemwege. Die Perfusion der isolierten Kaninchenlunge erfolgte in diesen Versuchen mit verschiedenen Elektrolytlösungen, obwohl Niemeier 1984 die Verwendung von autologem Vollblut empfiehlt. Obwohl die Verwendung von Blut ein System schaffen würde, das den in vivo-Bedingungen noch näher kommt und das den Übertritt und den Metabolismus verschiedener Substanzen (v.a. lipophiler Stoffe oder solche,

## Diskussion

die an Proteine oder andere Blutbestandteile binden oder mit ihnen interagieren) noch realistischer darstellt, bietet die Verwendung von Blut als Perfusionsmedium auch viele Nachteile. So kann es bei der Perfusion mit Blut über einen längeren Zeitraum z. B. zur Hämolyse, zur Bildung von Thromben und zu bakteriellem Wachstum kommen (Niemeier, 1984). Die Verwendung einer klaren Elektrolytlösung bietet dagegen den Vorteil einer störungsfreien, leichten Nachweisbarkeit schon geringer Konzentrationen an Testsubstanzen mittels Fluoreszenzreader oder HPLC und ermöglicht durch Vorhandensein hoher Mengen an Perfusat die Abnahme größerer Probenvolumen. Auch die Art der Perfusion spielt eine große Rolle für Versuche an der isolierten Kaninchenlunge. In dieser Arbeit wurde ein rezirkulierendes System zur Perfusion gewählt, da hierdurch zum einen viel weniger Perfusionsmedium benötigt wird als bei einem offenen System. Zum anderen würden die zum Teil sehr geringen Konzentrationen an Testsubstanz in einem offenen System unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Der Nachteil der rezirkulierenden Perfusion liegt jedoch darin, dass sich mit der Zeit ein Konzentrationsgleichgewicht einstellen oder sogar (wie im Falle des lipophilen Farbstoffes Rhodamin 6G) Testsubstanz aus dem Perfusat zurück in die Lunge gelangen kann. Trotz dieser Nachteile bietet das Modell der isolierten Lunge die Möglichkeit die Verteilung verschiedener Stoffe in der Lunge und ihre Absorption (Mobley und Hochhaus, 2001) in einem System zu untersuchen, dessen Integrität für mehrere Stunden erhalten bleibt und das weitgehend normale physiologische und biochemische Funktionen aufweist, die so gut wie möglich den Verhältnissen in vivo entsprechen (Niemeier, 1984).

### **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

#### 4.2.1 Aerosolpartikelgrößen

##### 4.2.1.1 Flüssigaerosole

Die Partikelgrößenverteilung eines Aerosols wird von zahlreichen Faktoren beeinflusst und kann daher großen Schwankungen unterliegen. Zu diesen Einflussfaktoren gehört z. B. die Verdunstung der Flüssigkeit aus wasserhaltigen Aerosoltröpfchen nach Verlassen des Verneblers, was sowohl abhängig von der Temperatur und der Luftfeuchtigkeit der Umgebung ist (Berg et al., 2007; Waldrep et al., 2007) als auch von dem zugeführten Luftfluss, der mit zunehmender Geschwindigkeit in der Regel zu einer leichten Abnahme der Partikelgrößen führt (Barry und O`Callaghan, 1999; O`Callaghan et al., 2007). Ebenfalls sehr großen Einfluss auf die Partikelgrößenverteilung hat die Wahl des Verneblers, da es schon innerhalb einer Verneblerklasse zu erheblichen Unterschieden in Output und Partikelgröße

## Diskussion

kommt (Barry und O`Callaghan, 1999). Aber nicht nur die Wahl des Verneblers, sondern auch der Winkel seiner Positionierung während der Verneblung kann sowohl den Output als auch die Größenverteilung des Aerosols beeinflussen (Harris und Smaldone, 2007). Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor ist die zu vernebelnde Flüssigkeit selbst, deren physikochemische Eigenschaften wie z. B. Viskosität, Ionenkonzentration und Oberflächenspannung große Auswirkungen auf die Aerosolbildung haben (Ghazanfari et al., 2007). Dieses Phänomen wird in der vorliegenden Arbeit besonders bei der Verneblung von Salbutamol-sulfat-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen sichtbar. Übereinstimmend mit den Beobachtungen von Ghazanfari et al. (2007), die zeigten, dass eine erhöhte Ionenkonzentration bei piezoelektrischen Verneblern zu einer Abnahme der Partikelgrößen führt, wurden auch bei den hier durchgeführten Versuchen die Partikel mit zunehmender Salbutamolkonzentration und somit steigender Zahl an Sulfat-Ionen immer kleiner. Die Tatsache, dass unterschiedliche Verneblertypen und verschiedene Flussgeschwindigkeiten die Aerosolpartikelgrößen beeinflussen, kann jedoch nicht erklären warum die Aerosolpartikel nach Verneblung mit dem AERONEB<sup>®</sup> Professional mit zunehmendem Luftfluss immer größer, bei Verwendung des AKITA<sup>2</sup>APIXNEB jedoch kleiner werden (Abb. 16). Obwohl der Grund dieses unterschiedlichen Verhaltens der beiden Vernebler bei zunehmendem Luftfluss unklar ist, liegt ein möglicher Erklärungsansatz in der Geometrie und der unterschiedlichen Anordnung der vibrierenden Membran. Hierbei spielt nicht nur der Einfluss des Winkels bei der Positionierung des Verneblers (Harris und Smaldone, 2007) eine Rolle, sondern auch die Richtung, aus der die zugeführte Luft auf das Aerosol trifft. Bei dem AERONEB<sup>®</sup> Professional strömt das Aerosol von der horizontal angebrachten Membran gerade nach unten und wird hier im T-Stück von dem Luftstrom aufgenommen, der im 90° Winkel auf das Aerosol auftrifft (Abb. 29).

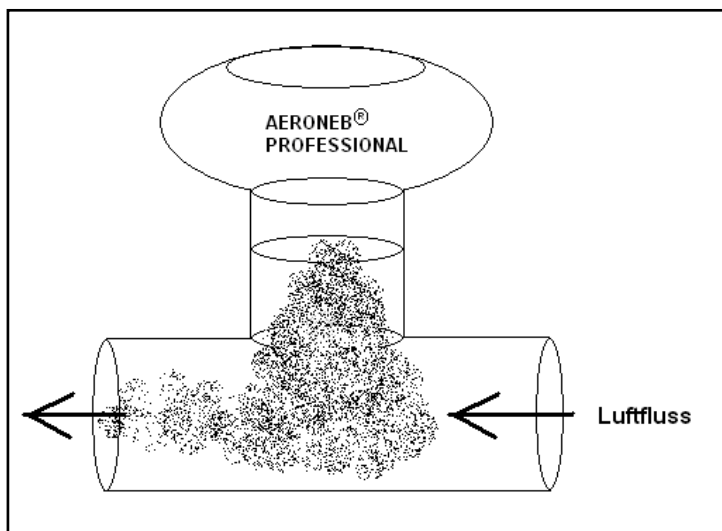


Abb. 29: Schematische Darstellung des AERONEB<sup>®</sup> Professional-Verneblers und Verlauf des Aerosol- und Luftflusses im T-Stück.

## Diskussion

Aufgrund dieser geometrischen Anordnung ist es möglich, dass mit zunehmender Luftgeschwindigkeit größere, herabsinkende Aerosolpartikel nicht mehr am Boden deponieren, sondern vom Luftstrom erfasst und mitgerissen werden, wodurch sich sowohl zunehmende Partikelgrößen als auch die breitere Größenverteilung (Tabelle 2) erklären lassen. Beim AKITA<sup>2</sup>APIXNEB Verneblungssystem wird der Luftstrom von der Seite kommend nicht unmittelbar in die Aerosolwolke gelenkt wird sondern umfließt den inneren Anteil des Gehäuses und bekommt somit die gleiche Flußrichtung wie die erzeugte Aerosolwolke. Es ist allerdings möglich, dass es mit zunehmender Luftgeschwindigkeit zu vermehrten Turbulenzen und Verwirbelungen kommt, wodurch vermehrt v.a. größere Partikel durch Impaktion schon im Verneblergehäuse abgeschieden werden (Abb. 30).

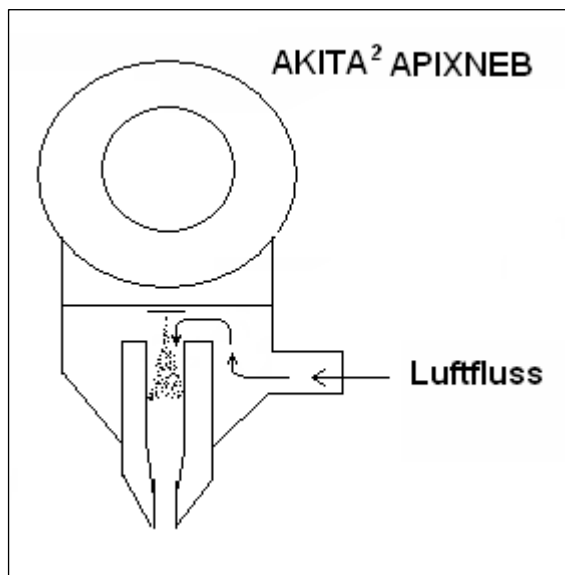


Abb. 30: Schematische Darstellung des AKITA<sup>2</sup> APIXNEB-Verneblers und Verlauf des Aerosol- und Luftflusses.

Der Größenunterschied der Aerosolpartikel nach Messung mit Beatmungspumpe und einem Luftstrom von 2 l/min (Tabelle 2) liegt dagegen weniger in der geringfügig unterschiedlichen Fließgeschwindigkeit, als viel mehr in der längeren Passage durch das Schlauchsystem begründet. Dabei ist zu beachten, dass während der kontinuierlichen Verneblung des Aeroneb<sup>®</sup>Professional-Verneblers eine größere Menge des Aerosols schon im Beatmungsschlauch abgeschieden wird. Folglich sind zwar die Partikel am Ende des Schlauchsystems deutlich kleiner als bei Verlassen des Verneblers, es kommt hier aber auch zu einem bedeutenden Aerosolverlust, was sich in der geringeren Lungendeposition des Aeroneb<sup>®</sup>Professional-Verneblers im Vergleich zum AKITA<sup>2</sup>APIXNEB - System widerspiegelt. Bei der atemzugsgetriggerten Verneblung mit dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB dagegen kommt es zu bedeutend geringeren Abscheidungen im Schlauchsystem, dadurch aber auch zu keiner Abnahme der Aerosolpartikelgrößen (Abb. 15).



## Diskussion

Entscheidend für die späteren Versuche an der isolierten Kaninchenlunge sind allerdings die Größen der Aerosolpartikel nach Verneblung mit Beatmungspumpe und Schlauchsystem, welche bei allen Substanzen und Verneblern zwischen ca. 3 und 3,5  $\mu\text{m}$  (Tabelle 2) liegen. Somit kann man davon ausgehen, dass bei allen durchgeführten Versuchen die vernebelten Substanzen mit Partikelgrößen in die Lungen gelangten, die vergleichbar sind und sich mit 3 – 3,5  $\mu\text{m}$  in einem Größenbereich befinden, der gut für eine pulmonale Deposition geeignet ist (Scheuch et al., 2006).

### 4.2.1.2 Pulveraerosole

Die Bestimmung der Partikelgrößen des Pulveraerosols aus dem Aerosol Dispensor ergab sowohl nach Messung mit dem Laserdiffraktometer (Abb. 17), als auch nach Verwendung des Andersen Impaktors einen vergleichbaren MMAD von etwa 2,7  $\mu\text{m}$ . In einem ähnlichen Größenbereich liegt mit ca. 2,3  $\mu\text{m}$  auch das mit dem DP-4 generierte Pulveraerosol. Dementsprechend liegen die Pulverpartikel in einem für die alveoläre Deposition besonders günstigen Größenbereich vor.

### 4.2.2 Lungendeposition

Der Vergleich der beiden piezoelektrischen Vernebler Aeroneb<sup>®</sup>Professional und AKITA<sup>2</sup>APIXNEB zeigt, dass der Output des AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-Verneblers deutlich höher ist als der des Aeroneb<sup>®</sup>Professional. Zwar vernebelt der AKITA<sup>2</sup>APIXNEB in 10 min lediglich ca. 1,5 ml, dies jedoch atemzugsgetriggert für nur 0,7 s pro Inspiration, so dass während dieser 10 min nur für etwa 3 min tatsächlich vernebelt wird. Somit ist der umgerechnete Output des AKITA<sup>2</sup>APIXNEB mit ca. 0,5 ml/min dem des Aeroneb<sup>®</sup>Professional mit nur etwa 0,3 ml/min deutlich überlegen. Ein weiterer Vorteil der atemsynchronen Verneblung des AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-Systems ist die höhere Lungendeposition von 0,8 ml in 10 Minuten Betriebszeit, was bedeutet, dass ca. 50 % der vernebelten Flüssigkeit in der Lunge deponiert wurden (s. Kapitel 3.2.3.1). Beim Aeroneb<sup>®</sup>Professional werden dagegen nur ca. 15 % des vernebelten Volumens in der Lunge deponiert (s. Kapitel 3.1.3.1), da es hier durch die kontinuierliche Verneblung zu größeren Aerosolabscheidungen im Schlauchsystem kommt. Die regionale Verteilung der Partikel sollte bei beiden Verneblern aufgrund der ähnlichen Partikelgrößen, die sie produzieren, vergleichbar sein. Da die ideale Partikelgröße zur Inhalation zwischen 2 und 6  $\mu\text{m}$  liegt (Biddiscombe et al., 2003) und mit Partikeln einer Größe von ca. 3  $\mu\text{m}$  eine maximale Deposition im Alveolarraum erreicht wird (Groneberg et al., 2003; Scheuch et al., 2006),

## Diskussion

sollte in diesen Versuchen eine gute alveoläre Substanzapplikation mit gleichmäßiger Verteilung gewährleistet sein, zumal es durch die intratracheale Verneblung zu keinerlei Verlusten in den oberen Atemwegen kommt. Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse der Lungendeposition der <sup>99m</sup>Tc-Kochsalzlösung auf die Farbstoff- und Salbutamolversuche übertragbar sind, da die Substanzen ähnliche Partikelgrößen aufweisen und andere mögliche Einflussfaktoren wie z. B. Atemfrequenz, Atemzugsvolumen, Atemminutenvolumen, Flußgeschwindigkeit und Beatmungsgas in allen Versuchen gleich gehalten wurden.

Auch die Trockenpulver, die eine Lungendeposition von 1,25 mg Salbutamol mit dem Aerosol Dispensor, bzw. 1,12 mg bei Verwendung des DP-4 erreichen, besitzen eine für die Inhalation gut geeignete Partikelgröße von ca. 2,7 bzw. 2,3 µm. Trotz vergleichbarer Partikelgrößen kann es bei den verschiedenen Pulververneblungen allerdings zu unterschiedlichen regionalen Verteilungen des Aerosols in der Lunge kommen, da das Aerosol des DP-4 erst in der Trachea versprüht wird, wodurch es aufgrund der kegelförmigen Ausbreitung der Sprühwolke schon zu großen Pulverabscheidungen in der Luftröhre kommt. Die Partikel des Aerosol Dispensors dagegen erreichen die Trachea bereits gleichmäßig im Luftstrom verteilt.

Ebenfalls eine etwas andere regionale Deposition wird durch die Instillation der CF-Lösung erreicht, da es hier im Vergleich zur Verneblung zu sehr unterschiedlichen, meist ungleichmäßigen Verteilungen der Flüssigkeit in der Lunge (Leong et al., 1998; Oberdörster et al., 1997) mit überwiegendem schwerkraftabhängigem Fluss der Lösung in die lagerungsbedingt unteren Regionen kommt.

### 4.2.3 Medikamentenübertritt am Modell der isolierten Kaninchenlunge

#### 4.2.3.1 Fluoreszenzfarbstoffe

##### 4.2.3.1.1 Vergleich des Übertritts verschiedener Farbstoffe

Die Untersuchung der Übertrittskinetiken der drei Fluoreszenzfarbstoffe CF, MPTS und R6G zeigt deutliche Unterschiede in der Absorption, die sich sowohl auf die Übertrittsgeschwindigkeit, als auch auf die insgesamt übergetretene Farbstoffmenge beziehen (Abb. 19). Faktoren, die den Übertritt von Substanzen aus der Lunge beeinflussen sind vielfältig und betreffen sowohl die zu vernebelnde Substanz als auch die Lunge selbst. Mögliche Unterschiede von Seiten der Lunge beziehen sich z.B. auf die Spezies (Schanker et al., 1986a; 1986b) oder das Alter (Folkesson et al., 1990), spielen aber in diesen Versuchen durch Verwendung etwa gleichaltriger männlicher Kaninchen derselben Rasse keine Rolle. Auch

## Diskussion

die Lungendeposition sollte - wie schon beschrieben - bei allen Farbstoffversuchen vergleichbar und daher ohne Einfluss auf die Übertrittskinetik sein. Weitere Einflussfaktoren betreffen die physikochemischen Eigenschaften der zu vernebelnden Substanz, wie z.B. Molekulargewicht (Folkesson et al., 1990; Tronde et al., 2003), Lipophilität (Schanker et al., 1986a; Tronde et al., 2003), Viskosität (Yamamoto et al., 2004), Ladung (Tronde et al., 2003),  $pK_a$ - (Anderson et al., 1973) und pH-Wert (Schanker and Less, 1977) und sind ursächlich für das unterschiedliche Verhalten der drei verschiedenen Farbstoffe. Ein großer Unterschied der drei niedermolekularen Fluoreszenzfarbstoffe liegt in ihrer Hydro- bzw. Lipophilität, welche für alle drei Substanzen mit Hilfe des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten bestimmt wurde. Der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient als Maß für die Lipophilität ist ein häufig verwendeter Parameter in der medizinischen Chemie und kann dazu beitragen, das Verhalten einer Substanz in einem komplexen biologischen System vorherzusagen (Roda et al., 1990). Hydrophile Stoffe können im Allgemeinen nur schwer durch eine Phospholipidmembran diffundieren und daher ist die Absorption einer Substanz umso schneller, je höher ihr Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient ist (Silbernagel und Despopoulos, 2001). Da die passive Diffusion den Hauptmechanismus bei der Absorption der meisten Stoffe darstellt (Tronde et al., 2003), sollte der lipophile Fluoreszenzfarbstoff R6G eigentlich deutlich schneller aus der Lunge ins Perfusat übertreten als die beiden hydrophilen Farbstoffe. Der im Vergleich zu CF und MPTS jedoch sehr geringe Übertritt von R6G aus der Lunge ins Perfusat (Abb. 19) kann dadurch erklärt werden, dass es sich bei R6G um ein lipophiles Amin handelt und die Lunge für die Akkumulation lipophiler Amine bekannt ist (Anderson et al., 1973; Roerig et al., 2004). Roerig et al. (2004) zeigten, dass nach Zugabe von R6G ins Perfusat einer isolierten Kaninchenlunge innerhalb von 120 min 67% des Farbstoffs das zirkulierende Perfusat verlassen haben und von der Lunge aufgenommen wurden. Des Weiteren zeigten Roerig et al. in dieser Studie, dass es durch den ATP-abhängigen P-gp-Transporter zu einem sättigbaren Efflux von R6G aus der Lunge hinaus zurück ins Perfusat kommt. Möglicherweise ist das Vorhandensein dieses Transporters in der Lunge der Grund dafür, dass in unseren Versuchen überhaupt R6G ins Perfusat übertritt. Auch die Tatsache, dass im Verlauf der Versuche der Gehalt an R6G im Perfusat wieder abnimmt, könnte dafür sprechen, dass der Farbstoff nach Sättigung des P-Glycoprotein-Transporters wieder in die Lunge zurückgelangt. Für eine Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes im Lungengewebe spricht auch, dass mit einer Lungenlavage kaum Farbstoff aus der Lunge gelöst werden konnte und erst nach Durchführung einer zusätzlichen Lavage mit Ethanol der Großteil der Substanz wiedergewonnen werden konnte (Tabelle 4).

## Diskussion

Der hydrophile Farbstoff CF tritt im Gegensatz zu R6G in hohem Maße (ca. 53 %; Tabelle 4) ins Perfusat über und erreicht hier nach ca. 160 min ein Plateau (Abb. 19). Wie in einem Überblick von Von Wichert und Seifart (2005) gezeigt wurde, gibt es eine Vielzahl von Transportmechanismen zur Absorption der verschiedensten Substanzen. Der in dieser Arbeit verwendete Versuchsaufbau gibt keine Antwort darauf, wie genau CF aus der Lunge absorbiert wird. Andere Studien jedoch lassen schon mehr Spekulationen über mögliche Absorptionsmechanismen zu. Woolfrey et al. (1986) sind z.B. der Meinung, dass das schnelle Erreichen einer Peak-Konzentration im Blut nach intratrachealer Instillation von CF in Rattenlungen dafür spricht, dass der Transport von CF über mehr als einen Mechanismus erfolgen muss. Da es diese Autoren für unwahrscheinlich halten, dass der hydrophile Farbstoff durch die Lipidregion einer Membran diffundiert nehmen sie an, dass der CF-Transport zum einen durch Poren in der Epithelmembran und zum anderen durch aktiven Transport erfolgt. Pohl et al. (1998) nutzen konfokale Fluoreszenzmikroskopie (confocal laser scanning fluorescence microscopy = CLSFM) um die Verteilung von CF in der Rattenlunge nach intratrachealer Instillation darzustellen. Damit konnten sie zeigen, dass CF den Luftraum sehr schnell verlässt und sich in den extrazellulären Regionen im Interstitium hinter Pneumozyten-Typ II ansammelt. Die Autoren halten es für möglich, dass 3 Alveoli in dichter Formation eine „trijunctional pore“ bilden, durch die CF durchtritt. Sie postulieren, dass für die Passage durch solche Poren zum einen die Schnelligkeit des CF Übertritts spricht und zum anderen die Tatsache, dass es mit Erscheinen von CF zu einer Ausdehnung des Interstitiums kommt. Diese Ausdehnung kann dadurch erklärt werden, dass es mit dem CF-Transport entlang eines osmotischen Gradienten zu einem Wassereinstrom kommt (Pohl et al. 1998). Noch mehr Fragen wirft allerdings der zweite hydrophile Farbstoff MPTS auf, der im Vergleich zu CF nicht nur einen geringeren Übertritt ins Perfusat (Abb. 19), sondern mit nur ca. 43 % auch eine deutlich geringere Gesamtwiederfindung (Tabelle 4) aufweist. Der restliche Farbstoff, der weder im Perfusat noch in der Lungenlavage enthalten ist, kann in diesen Versuchen nicht lokalisiert werden. Es besteht die Möglichkeit, dass sich die Substanz noch in der Lunge befindet oder dass der Fluoreszenzfarbstoff gequenchet wurde. Ein solcher Verlust an Fluoreszenz erscheint sehr wahrscheinlich, da MPTS und verwandte anionische Ether dafür bekannt sind, dass ihre Fluoreszenz durch zahlreiche Substanzen wie z.B. kationische Tenside oder verschiedene Metallionen, u.a. Fe(III), statisch gequenchet wird (Cordes et al., 2005; Marhold et al., 1990). In diesem Fall könnte es also sein, dass MPTS zwar in hohem Maße übertritt, durch den Verlust an Fluoreszenz aufgrund von

## Diskussion

Komplexbildungen mit z.B. Surfactantbestandteilen oder in Blutresten enthaltenen Eisenionen jedoch nur in geringem Umfang nachweisbar ist.

Aufgrund der in dieser Studie erzielten Ergebnisse hinsichtlich des Farbstoffübertritts am Modell der isolierten Kaninchenlunge ist von den untersuchten Fluoreszenzfarbstoffen CF am besten als Modellsubstanz für Freisetzungsversuche aus Controlled Release-Formulierungen geeignet.

### 4.2.3.1.2 Stoffübertritt unter Verwendung verschiedener Perfusionsmedien

Der Vergleich des CF-Übertritts nach Verwendung zweier unterschiedlicher Perfusionsmedien zeigt zwar einen etwas schnelleren Anstieg mit geringfügig höheren Endkonzentrationen bei Perfusion mit Elektrolytlösung 1/3, allerdings überschneiden sich die Ergebnisse beider Versuchsreihen erheblich (Abb. 20) und auch der insgesamt im Perfusat gefundene Farbstoffgehalt ist bei beiden Versuchen mit ca. 53 % gleich (Tabelle 5). Dementsprechend zeigen CF-Versuche mit beiden Perfusionsmedien ähnliche Übertrittskinetiken. Die Unterschiede in der Gesamtmenge an Farbstoff in der Tropfflüssigkeit liegen in diesen Versuchen weniger an einer höheren Farbstoffkonzentration als viel mehr an dem mit 35 ml deutlich größerem Volumen an Tropfflüssigkeit während der Versuche mit Elektrolytlösung 1/3. Die Tatsache, dass bei Verwendung von IIN-Perfusat weniger Tropfflüssigkeit die Lunge verlässt (ca. 8 ml/300 min), wird an dem höheren osmotischen Druck liegen, der durch die Hydroxyethylstärke im IIN-Perfusat entsteht und einen Flüssigkeitsausstrom aus den Gefäßen im Gegensatz zu 1/3-Perfusat reduziert. Dementsprechend können sich durch Verwendung von IIN-Perfusat Flüssigkeitsverluste durch Tropfflüssigkeit vermindern lassen ohne dass dadurch der Stoffübertritt aus der Lunge ins Perfusat stark beeinflusst wird.

### 4.2.3.1.3 Carboxyfluorescein bei pulmonaler Hypertonie

Wie in Abb. 28 ersichtlich, gibt es bis auf die verkürzte Laufzeit der Hypertonie-Versuche aufgrund von methodisch bedingter Ödembildung keine Unterschiede in der Übertrittskinetik zwischen dem Krankheitsmodell und den Kontrollversuchen. Daraus lässt sich zum einen schließen, dass die experimentelle Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes keinen Einfluss auf die Gesamtdeposition und die Verteilung des vernebelten Farbstoffes in der Lunge hat. Zum anderen wird deutlich, dass die mit einer pulmonalen Hypertonie einhergehende Erhöhung des hydrostatischen Druckes keine Auswirkungen auf den CF-Übertritt hat. Die Erklärung hierfür liegt wohl darin begründet, dass Thromboxan und sein Analogon nur durch

## Diskussion

Vasokonstriktion und damit verbundener Erhöhung des hydrostatischen Druckes zur Ausbildung von Ödemen führen, ohne dabei jedoch die Gefäßpermeabilität zu beeinflussen (Shibamoto et al., 1995; Wakerlin et al., 1991). Da es durch die Hypertonie zu keiner Veränderung des CF-Übertritts kommt, ist dieser Farbstoff für Studien am Modell der isolierten Kaninchenlunge mit pulmonaler Hypertonie geeignet. Gleichzeitig ist dieses Krankheitsmodell geeignet für die inhalative Verabreichung da es keinen Einfluss auf die Übertrittskinetik des inhalierten Farbstoffes hat.

### 4.2.3.1.4 Vergleich Verneblung und Instillation von Carboxyfluorescein

Obwohl das Konzentrations-Zeit-Profil der CF-Versuche nach Instillation sich weitgehend mit den Ergebnissen der Versuche nach Verneblung überschneidet, ist hier eine veränderte Kinetik mit flacherem Kurvenverlauf zu erkennen (Abb. 21). Dieser langsamere Anstieg nach Instillation spricht - wie erwartet - für eine schlechtere Verteilung des Farbstoffes in der Lunge. Da Flüssigkeiten aus den alveolären Bereichen der Lunge schneller absorbiert werden als aus bronchialen Regionen (Brown und Schanker, 1983), deutet der schnellere Anstieg nach Verneblung auf eine höhere alveoläre Deposition des Aerosols im Vergleich zu dem Instillat hin.

### 4.2.3.2 Salbutamol

#### 4.2.3.2.1 Verneblung von Salbutamollösungen

Die Verneblung der Salbutamollösungen mit dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System in die isolierte Kaninchenlunge führte bei allen drei verwendeten Konzentrationen zu ähnlichen Übertrittskinetiken (Abb. 25) mit einem Gesamtübertritt von ca. 41 - 49 % des deponierten Salbutamols ins Perfusat (Tabelle 6). Angesichts dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass auch die geringfügigen Unterschiede in den Partikelgrößen (Abb. 15) nach Verneblung von Salbutamol unterschiedlichster Konzentration mit dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB keinen Einfluss auf die regionale Lungendeposition haben. Außerdem sprechen die proportional zur Dosis ansteigenden Salbutamolkonzentrationen im Perfusat dafür, dass dieser Transportvorgang (zumindest im Größenbereich der deponierten Menge von bis zu 80 mg) nicht sättigbar ist. Ähnliches beobachteten Perreault et al. (1992) in den Plasmaproben von lebenden Kaninchen.

Die Gesamtwiederfindung dieser Versuche liegt bei 52 - 62 % (Tabelle 6). Auch hier können die durchgeführten Versuche keine Antwort auf den exakten Ort des Verbleibs des restlichen Salbutamols in der Lunge geben. Es ist jedoch durchaus möglich, dass der Restbetrag

## Diskussion

entweder gebunden im Lungengewebe verbleibt oder dass ein Teil des inhalierten Salbutamols einem Metabolismus in der Lunge unterliegt und daher nicht mehr nachweisbar ist (Perreault et al., 1992).

Obwohl die Gesamtmenge an deponiertem Salbutamol in dieser Studie nicht eindeutig lokalisiert werden konnte, eignet sich Salbutamolsulfat gut als Modellmedikament, da die regionale Lungendeposition der Salbutamollösung unabhängig von ihrer Konzentration ist, der Übertritt ins Perfusat proportional zur Dosis und die Übertrittskinetik für alle Konzentrationen vergleichbar ist.

### 4.2.3.2.2 Verneblung von Salbutamolpulver

Der Vergleich zwischen Salbutamolverneblungen mittels kommerziell erhältlichem DP-4 und dem neu entwickelten Aerosol Dispensor zeigt, dass die Perfusatkonzentration nach Verneblung mit dem Aerosol Dispensor deutlich schneller ansteigt als nach Verneblung mit dem DP-4 (Abb. 26). Die Tatsache, dass die Salbutamolspiegel im Perfusat beider Versuche sehr ähnliche Endwerte erreichen, dass jedoch der Anstieg der Kurve nach Verneblung mit dem DP-4 flacher verläuft, deutet auf eine bessere Verteilung der Aerosolpartikel in der Lunge durch den Aerosol Dispensor hin und lässt vermuten, dass nach Verneblung mit dem DP-4 eher zentrale Lungendepositionen mit hohen Ablagerungen im Tracheobronchialbereich erreicht werden. Für hohe Beträge an Salbutamol in diesem Bereich nach Applikation mittels DP-4 spricht auch die große Menge an Salbutamol, die mittels Lavage aus der Lunge entfernt werden konnte. Die Versuche mit dem Aerosol Dispensor weisen dagegen einen deutlich geringeren Salbutamolgehalt in der Lavage und dadurch auch eine wesentlich geringere Gesamtwiederfindung auf (Tabelle 7). Obwohl auch hier der Verbleib des restlichen Salbutamols und die insgesamt niedrige Gesamtwiederfindung nicht geklärt werden können, wird durch diese Versuche deutlich, dass der Aerosol Dispensor eine bessere Verteilung des Aerosols in der Lunge ermöglicht, während der Gebrauch des DP-4 durch Bildung des Aerosols direkt in der Trachea eher an eine Instillation als an eine Verneblung erinnert. Die ähnlichen Endkonzentrationen an Salbutamol trotz unterschiedlicher regionaler Deposition sprechen dafür, dass auch nach Verneblung mit dem DP-4 mit möglicherweise größeren Ablagerungen im Tracheobronchialbereich die gesamte deponierte Menge zur Absorption zur Verfügung steht. Diese Beobachtung machten auch Tronde et al. (2003), die der Meinung sind, dass aufgrund der von Kröll et al. (1987) gezeigten guten Perfusion der tracheobronchialen Mikrozirkulation im isolierten Lungenmodell durch zahlreiche bronchopulmonale Anastomosen das isolierte Lungenmodell genutzt werden kann, um die

## Diskussion

Absorption sowohl aus der pulmonalen als auch aus der tracheobronchialen Region zu untersuchen.

Vergleicht man nun die Verneblung des Salbutamolpulvers und der -lösung zwischen den beiden neu entwickelten Geräten, so stellt man fest, dass das Pulver in den ersten 10 min deutlich schneller übertritt als die Lösung (Abb. 27) und dass diese erst nach über 20 min höhere Werte erreicht als das Pulver. Der zu Beginn schnelle Anstieg der Salbutamolkonzentration im Perfusat nach Pulververneblung stimmt mit der von Bur und Lehr (2007) bei in vitro-Versuchen an pulmonalen Epithelzellen gemachten Beobachtung überein, dass die Transportrate von hoch wasserlöslichem Salbutamolsulfat mit abnehmender Menge an Flüssigkeit zunimmt und am höchsten für das wasserfreie, reine Pulver ist. Die mit zunehmender Salbutamolkonzentration ebenfalls zunehmende Übertrittsgeschwindigkeit liegt im ersten Fickschen Diffusionsgesetz begründet, nach dem der Diffusionsstrom direkt proportional zum Konzentrationsgradienten ist.



## 5 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Mit allen verwendeten Verneblern und Substanzen ist es möglich, reproduzierbar Partikel zu generieren, die für die alveoläre Deposition gut geeignet sind. Dabei ermöglicht der Aerosol Dispensor bei ähnlichen Partikelgrößen und ähnlicher Gesamtdeposition eine deutlich bessere alveoläre Deposition als der DP-4. Der Aerosol Dispensor ist daher zur Pulververneblung in die isolierte Kaninchenlunge besser geeignet als der DP-4, dessen Gebrauch eher mit einer Instillation vergleichbar ist. Ein Vergleich der beiden piezoelektrischen Flüssigvernebler zeigt, dass der neu entwickelte, atemzuggetriggerte AKITA<sup>2</sup>APIXNEB eine deutlich höhere Lungendeposition mit weniger Aerosolverlusten ermöglicht.

Aus den Ergebnissen zur Untersuchung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe am Modell der isolierten, perfundierten und ventilierten Kaninchenlunge lässt sich schließen, dass CF dank seines schnellen Übertritts und der hohen Gesamtwiederfindung sehr gut als Modellsubstanz für Controlled Release-Formulierungen geeignet ist. R6G dagegen zeigt zwar eine hohe Gesamtwiederfindung, tritt jedoch nur in geringem Maße ins Perfusat über und wird aus diesem sogar wieder rückresorbiert. Hinzu kommt ein möglicherweise verändertes Verhalten des verkapselten Farbstoffes in Bezug auf den P-gp-Transporter, weswegen dieser Farbstoff als weniger gut geeignete Modellsubstanz angesehen wird. MPTS scheint ebenfalls schlecht geeignet für Übertrittsversuche an der isolierten Kaninchenlunge zu sein, da hier nur ein Teil des Farbstoffes wieder gefunden werden kann und die Möglichkeit besteht, dass die Fluoreszenz des Farbstoffes gequenchet wurde.

Auch das mittels HPLC nachweisbare Salbutamol eignet sich gut als Modellmedikament. Die Verneblungen von Salbutamollösungen haben gezeigt, dass der Übertritt von Salbutamol ins Perfusat proportional zur Dosis ist und dass der Verlauf der Kinetik für alle Konzentrationen gleich ist. Die Verneblung von Salbutamolpulver führt zu einem schnelleren Anstieg, jedoch zu weniger hohen Endkonzentrationen an Salbutamol im Perfusat im Vergleich zur Flüssigverneblung.

Die Verwendung verschiedener Elektrolytlösungen zur Perfusion der Kaninchenlunge hat nur einen geringen Einfluss auf den Übertritt des Fluoreszenzfarbstoffes CF. Allerdings lassen sich durch Verwendung von IIN-Perfusat Flüssigkeitsverluste in Form von Tropfflüssigkeit reduzieren. Die experimentelle Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes zeigt keinerlei Einflüsse auf die Lungendeposition und die Übertrittskinetik von intratracheal vernebeltem CF und stellt somit ein geeignetes Krankheitsmodell bei der Untersuchung von Übertrittskinetiken dar..

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Inhalation bietet dank eines direkten Zugangs zur Lunge die Möglichkeit einer gezielten intra- und transpulmonalen Medikamentenapplikation. Viele der heutigen inhalativen Therapiestrategien sind jedoch mit dem Nachteil einer nur kurzen Wirkdauer behaftet. Aus diesem Grund könnte eine gezielte, retardierte Wirkstofffreisetzung aus inhalierbaren Carriersystemen, wie z. B. Liposomen oder bioabbaubaren Nanopartikeln von großem Nutzen sein. Für die Entwicklung solcher Controlled Release-Formulierungen ist es essentiell, dass sowohl geeignete Modellsubstanzen als auch geeignete Vernebler zur Verfügung stehen. Ziel dieser Arbeit war es daher geeignete Modellsubstanzen und Geräte zur späteren Verneblung von Controlled Release-Formulierungen zu finden. Zu diesem Zweck wurden die drei Fluoreszenzfarbstoffe 5(6)-Carboxyfluorescein (CF), Trinatrium 8-Methoxypyren-1,3,6-Trisulfonsäure (MPTS) und Rhodamin 6G (R6G) mit einem piezoelektrischen Vernebler (Aeroneb® Professional) in die isolierte Kaninchenlunge vernebelt und hinsichtlich ihres Übertritts ins Perfusat sowie der Gesamtwiederfindung miteinander verglichen. Zusätzlich wurde untersucht, inwieweit ein Perfusionsmedium mit höherem osmotischen Druck, eine Instillation des Farbstoffes in die Kaninchenlunge und die Erzeugung einer experimentellen pulmonalen Hypertonie die Übertrittskinetik von CF beeinflussen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden weiterhin die in der eigenen Arbeitsgruppe entwickelten Aerosolgeneratoren Small Animal Dry Powder Aerosol Dispenser (Pulververnebler) und AKITA<sup>2</sup>APIXNEB (piezoelektrischer Flüssigvernebler) hinsichtlich Partikelgrößenverteilung und Lungendeposition mit kommerziell erhältlichen Geräten (DP-4 Dry Powder Insufflator<sup>TM</sup> und Aeroneb® Professional) verglichen. Im Falle des piezoelektrischen Verneblers wurde die Lungendeposition mit einer <sup>99m</sup>Tc-Kochsalzlösung bestimmt, während die Lungendeposition des Small Animal Dry Powder Aerosol Dispenser durch Filterversuche ermittelt wurde. Die Medikamentenapplikation in die Lunge und die Übertrittskinetik des Wirkstoffes wurden für den AKITA<sup>2</sup>APIXNEB durch Verneblung von Salbutamollösungen unterschiedlicher Konzentrationen und für die Pulververnebler durch Applikation von mikronisiertem Salbutamolpulver untersucht.

Der Vergleich der drei Fluoreszenzfarbstoffe ergab, dass CF mit einem schnellen Übertritt von ca. 53 % der deponierten Menge ins Perfusat eine geeignete Modellsubstanz für die Verkapselung in Controlled Release-Formulierungen darstellt. R6G dagegen zeigte mit nur ca. 3 % einen ungenügenden Farbstoffübertritt und MPTS konnte trotz eines Perfusatgehalts von fast 30 % nur zu insgesamt etwa 43 % wiedergefunden werden und erscheint daher

## Zusammenfassung

ebenfalls als ungeeignet. Die Verwendung eines anderen Perfusionsmediums hatte kaum einen und die Erzeugung einer pulmonalen Hypertonie keinen Einfluss auf die Übertrittskinetik von CF. Obwohl die CF-Instillation aufgrund der schlechteren intrapulmonalen Verteilung des Farbstoffes zu etwas langsamer ansteigenden Perfusatkonzentrationen führte als die Verneblung, waren die Unterschiede auch hier nur gering.

Die Partikelgrößenmessungen ergaben, dass die Aerosolpartikel beider piezoelektrischer Vernebler bei Eintritt in die Lunge einen medianen aerodynamischen Massendurchmesser (MMAD) von 3 - 3,5 µm aufwiesen, während mit den verwendeten Pulverformulierungen die Partikel des DP-4 Dry Powder Insufflator<sup>TM</sup> 2,3 und die des Small Animal Dry Powder Aerosol Dispensor 2,7 µm betragen. Durch Verwendung des AKITA<sup>2</sup>APIXNEB konnten etwa 50 %, mittels Aeroneb<sup>®</sup> Professional jedoch nur um die 15 % der vernebelten Flüssigkeit in der Lunge deponiert werden. Nach Verneblung der Salbutamollösungen mittels AKITA<sup>2</sup>APIXNEB zeigte sich ein konzentrationsunabhängiger Übertritt von etwa 41 – 49 % des deponierten Salbutamols ins Perfusat. Die unterschiedlichen Übertrittskinetiken nach den Pulververneblungen mit deutlich schnellerem Anstieg nach Verwendung des Small Animal Dry Powder Aerosol Dispensor lassen vermuten, dass dieser im Vergleich zum DP-4 Dry Powder Insufflator<sup>TM</sup> bei ähnlicher totaler Lungendeposition eine bessere Verteilung des Aerosols in den tiefen Regionen der Lunge erzielte.

So konnten im Rahmen dieser Arbeit mit CF ein geeigneter Modellfarbstoff für die Verkapselung in Controlled Release-Formulierungen gefunden und mit dem Small Animal Dry Powder Aerosol Dispensor und dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB geeignete Pulver- und Flüssigvernebler zur Verneblung solcher Formulierungen am isolierten Lungenmodell entwickelt werden.

## 7 SUMMARY

Drug delivery via inhalation offers the possibility of a specific intra- and transpulmonary drug deposition as a result of the immediate access to the lung. Nevertheless, many of today's inhalation strategies are afflicted with the disadvantage of a short duration of action. Therefore, a controlled drug release from respirable carrier systems like liposomes or biodegradable nanoparticles could be very useful. In order to develop controlled release formulations the availability of model drugs and suitable nebulizer-systems are essential. Hence, it was the aim of this thesis to find suitable model substances for future development of controlled release formulations as well as devices for the nebulization of such formulations. For this purpose the pulmonary absorption as well as the total recovery of three fluorescent dyes, namely 5(6)-carboxyfluorecein (CF), 8-methoxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (MPTS) and rhodamine 6G (R6G), were compared after nebulization with a vibrating mesh nebulizer (Aeroneb<sup>®</sup>Professional) in the isolated rabbit lung. Additionally, it was examined, whether the use of a perfusion fluid with higher osmotic pressure, the instillation of the model substance and the generation of an experimental pulmonary hypertension may influence the absorption of the fluorescent dye CF. Furthermore, this work compared the aerosol generators, named Small Animal Dry Powder Aerosol Dispenser and AKITA<sup>2</sup>APIXNEB, which were developed from our group to the commercially available devices DP-4 Dry Powder Insufflator<sup>™</sup> and Aeroneb<sup>®</sup>Professional concerning particle sizes and lung deposition. In case of the vibrating mesh nebulizer the lung deposition was determined using <sup>99m</sup>Tc, while the lung deposition of the Small Animal Dry Powder Aerosol Dispenser was investigated by using filter experiments. The drug application into the lung and the absorption kinetics were examined for the AKITA<sup>2</sup>APIXNEB by nebulization of salbutamol-solutions with different concentrations and for the dry powder inhalation devices by application of micronized salbutamol powders.

The comparison of the three fluorescent markers suggested that CF was a suitable model drug for the encapsulation into controlled release formulations because of the rapid absorption of approximately 53 % of the deposited amount from the lung into the perfusate. In contrast, R6G showed an insufficient absorption rate of only circa 3 %. Despite an amount of nearly 30 % of the dye in the perfusate, MPTS demonstrated an insufficient total recovery of only circa 43 % and therefore seemed to be unsuitable. The use of the second perfusion fluid had almost no effect and the generation of a pulmonary hypertension did not influence the lung absorption of CF at all. Although the CF instillation caused a slower increase of the dye

## Summary

concentration in the perfusate - due to the worse intrapulmonary distribution in comparison to the nebulization - the differences were also negligible.

Measurements of particle sizes proved that both of the two vibrating mesh nebulizers created aerosol particles of a mass median aerodynamic diameter (MMAD) of 3 - 3.5  $\mu\text{m}$  while entering the lung, whereas the particle sizes of the powders were 2.3  $\mu\text{m}$  for the DP-4 Dry Powder Insufflator<sup>TM</sup> and 2.7  $\mu\text{m}$  for the Small Animal Dry Powder Aerosol Dispenser. Using the AKITA<sup>2</sup>APIXNEB almost 50 % of the nebulized drug solution was deposited into the lung. The similar experiments with the Aeroneb<sup>®</sup> Professional showed a much lower lung deposition of about 15 %. The nebulizations of the salbutamol solutions with the AKITA<sup>2</sup>APIXNEB led to concentration-independent drug absorptions of about 41 - 49 % of the deposited salbutamol. The differences in the salbutamol absorption kinetics with rapid increase after the use of the Small Animal Dry Powder aerosol Dispenser indicated a similar total deposition but a better distribution in the deeper lung after dry powder aerosolization with the Small Animal Dry Powder aerosol Dispenser in comparison to the DP-4 Dry Powder Insufflator<sup>TM</sup>.

Thus, CF is a suitable model drug for the encapsulation in controlled release formulations and the Small Animal Dry Powder Aerosol Dispenser and the AKITA<sup>2</sup>APIXNEB offer suitable devices for nebulizing powders and liquids.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Adachi, Y.S., T. Itazawa, M. Nakabayashi, T. Fuchizawa, Y. Okabe, Y. Ito, Y. Adachi, G. Murakami and T. Miyawaki. 2006. Safety and usefulness of a novel eMotion<sup>®</sup> electric mesh nebulizer in children with asthma. *Allergol. Int.* 55 (2), 167-171.
- Agu, R.U., M.I. Ugwoke, M. Armand, R. Kinget and N. Verbeke. 2001. The lung as a route for systemic delivery of therapeutic proteins and peptides. *Respir. Res.* 2, 198-209.
- Anderson, P.J. 2005. History of aerosol therapy: Liquid nebulization to MDIs to DPIs. *Respir. Care* 50 (9), 1139-1149.
- Azoulay, E., S. Herigault, M. Levame, L. Brochard, B. Schlemmer, A. Harf and C. Delclaux. 2003. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on bleomycin-induced acute lung injury and pulmonary fibrosis. *Crit. Care Med.* 31 (5), 1442-1448.
- Babcock, D.F. 1983. Examination of the intracellular ionic environment and of ionophore action by null point measurements employing the Fluorescein chromophore. *J. Biol. Chem.* 25, 6380-6389.
- Barry, P.W. and C. O'Callaghan. 1999. An in vitro analysis of the output of salbutamol from different nebulizers. *Eur. Respir. J.* 13, 1164-1169.
- Basset, G., C. Crone and G. Saumon. 1987. Significance of active ion transport in transalveolar water absorption: a study on isolated rat lung. *J. Physiol.* 384, 311-324.
- Bennett, W.D., G. Scheuch, K.L. Zeman, J.S. Brown, C. Kim, J. Heyder and W. Stahlhofen. Bronchial airway deposition and retention of particles in inhaled boluses: effect of anatomic dead space. *J. Appl. Physiol.* 85 (2), 685-694.
- Berg, E., J.O. Svensson and L. Asking. 2007. Determination of nebulizer droplet size distribution: a method based on impactor refrigeration. *J. Aerosol Med.* 20 (2), 97-104.
- Biddiscombe, M.F., O.S. Usmani and P.J. Barnes. 2003. A system for the production and delivery of monodisperse salbutamol aerosols to the lung. *Int. J. Pharm.* 254, 243-253.
- Bitterle, E., K. Reul, A. Luithlen, D. Mueller, O. Denk and M. Keller. 2007. Correlation of laser diffraction and cascade impactor data upon nebulization of IMIU colistinmethate sodium/3ml by eFlow<sup>®</sup> nebulizer configurations. *J. Aerosol Med.* 20 (2), 185 (P068).
- Bland, R.D. 1990. Lung epithelial ion transport and fluid movement during the perinatal period. *Am. J. Physiol.* 259 (2 Pt 1), L30-37.

## Literaturverzeichnis

- Bosquillon, C., N.J. Clear, J. Bennett and B. Forbes. 2007a. Drug permeability in airway cell lines correlates with absorption from the rat lung. *J. Aerosol Med.* 20 (2), 186 (P071).
- Bosquillon, C., M. Madlova, N.J. Clear and B. Forbes. 2007b. Can a simplified isolated perfused lung model be a useful drug absorption screen? *J. Aerosol Med.* 20 (2), 190 (P086).
- Boulton, D.W. and J.P. Fawcett. 2001. The pharmacokinetics of levosalbutamol: what are the clinical implications? *Clin. Pharmacokinet.* 40 (1), 23-40.
- Bourges J.-L., S.E. Gautier, F. Delie, R.A. Bejjani, J.-C. Jeanny, R. Gurny, D. BenEzra and F.F. Bebar-Coben. 2003. Ocular drug delivery targeting the retina and retinal pigment epithelium using polylactide nanoparticles. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 3562-3569.
- Broadley, K.J. 2006.  $\beta$ -Adrenoceptor responses of the airways: For better or worse? *Eur. J. Pharmacol.* 533, 15-17.
- Broeders, M.E.A.C., J. Molema, N.A. Vermue and H.Th.M. Folgering. 2001. Peak inspiratory flow rate and slope of the inhalation profiles in dry powder inhalers. *Eur. Respir. J.* 18, 780-783.
- Brown, R.E., J.D. Brain and N. Weng. 1997. The avian respiratory system: a unique model for studies of respiratory toxicosis and for monitoring air quality. *Environ. Health Perspect.* 105, 188-200.
- Brown, R.A. Jr. and L.S. Schanker. 1983. Absorption of aerosolized drugs from the rat lung. *Drug. Metab. Dispos.* 11 (4), 355-360.
- Bur, M. and C.M. Lehr. 2007. Between deposition and absorption: water solubility, particle size, and apical liquid volume as critical factors to epithelial transport of aerosol drugs. *J. Aerosol. Med.* 20 (2), 180 (P053).
- Byron, P.R. 2004. Drug delivery devices. Issues in drug development. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 1, 321-328.
- Campbell, I. and J. Waterhouse. 2005. Fluid balance and non-respiratory functions of the lung. *Anaesth. Intensive Care.* 6 (11), 370-371.
- Carneiro, J. 2005. Histologie. 6., neu übersetzte, überarbeitete und aktualisierte Auflage. *Springer Medizin Verlag, Heidelberg.*
- Coates, A.L., M. Green, K. Leung, E. Louca, M. Tservistas, J. Chan, N. Ribeiro and M. Charron. 2007. The challenges of quantitative measurements of lung deposition using  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA from delivery systems with very different delivery times. *J. Aerosol Med.* 20 (3), 320-330.
- Cogo, P.E., G.M. Toffolo, C. Ori, A. Vianello, M. Chierici, A. Gucciardi, C. Cobelli, A. Baritussio and V.P. Carnielli. 2007. Surfactant disaturated-phosphatidylcholine

## Literaturverzeichnis

kinetics in acute respiratory distress syndrome by stable isotopes and a two compartment model. *Respir. Res.* 8 (13).

- Cordes, D.B., A. Miller, S. Gamsey, Z. Sharrett, P. Thoniyot, R. Wessling, and B. Singaram. 2005. Optical glucose detection across the visible spectrum using anionic fluorescent dyes and a viologen quencher in a two-component saccharide sensing system. *Org. Biomol. Chem.* 3, 1708-1713.
- Crocker, S.H., B.D. Lowery, D.O. Eddy, B.L. Wismar, W.J. Buesching and R.N. Obenauf. 1981. Pulmonary clearance of blood-borne bacteria. *Surg. Gynecol. Obstet.* 153 (6), 845-851.
- Cryan, S.-A., N. Sivadas and L. Garcia-Contreras. 2007. In vivo animal models for drug delivery across the lung mucosal barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 1133-1151.
- Desaphy, J.-F., S. Pierno, A. de Luca, P. Didonna and D. Conte Camerino. 2002. Different ability of Clenbuterol and Salbutamol to block sodium channels predicts their therapeutic use in muscle excitability disorders. *Mol. Pharmacol.* 63 (3), 659-670.
- Dhand, R. 2004. New frontiers in aerosol delivery during mechanical ventilation. *Respir. Care.* 49 (6), 666-677.
- Dolovich, M. and R. Labiris. 2004. Imaging drug delivery and drug responses in the lung. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 1, 329-337.
- Dorris, A.M. and P.A. Valberg. 1992. Heterogeneity of phagocytosis for inhaled versus instilled material. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146 (4), 831-837.
- Dubus, J.C., R. Rhem, S. Monkman and M. Dolovich. 2001. Delivery of salbutamol pressurized metered-dose inhaler administered via small-volume spacer devices in intubated, spontaneously breathing rabbits. *Pediatr. Res.* 50 (3), 384-389.
- Dubus, J.C., L. Vecellio, M. de Monte, J.B. Fink, D. Grimbert, J. Montharu, C. Valat, N. Behan and P. Diot. 2005. Aerosol deposition in neonatal ventilation. *Pediatr. Res.* 58 (1), 10-14.
- Duvvuri, M., Y. Gong, D. Chatterji, and J.P. Krise. 2004. Weak base permeability characteristics influence the intracellular sequestration site in the multidrug-resistant human leukemic cell line HL-60. *J. Biol. Chem.* 279 (31), 32367-32372.
- Everard, M.L., S.G. Devadason and P.N. Le Souëf. 1997. Flow early in the inspiratory manoeuvre affects the aerosol particle size distribution from a Turbohaler. *Respir. Med.* 91 (10), 624-628.
- Ewing, P., B. Blomgren, A. Ryrfeldt and P. Gerde. 2006. Increasing exposure levels cause an abrupt change in the absorption and metabolism of acutely inhaled benzo(a)pyrene in the isolated, ventilated, and perfused lung of the rat. *Toxicol. Sci.* 91 (2), 332-340.
- Fishman, A.P. 1977. Nonrespiratory Functions of the lung. *Chest* 72 (1), 84-89.



## Literaturverzeichnis

- Fok, T.-F., M. Al-Essa, S. Monkman, M. Dolovich, L. Girard, G. Coates and H. Kirpalani. 1997. Pulmonary deposition of salbutamol aerosol delivered by metered dose inhaler, jet nebulizer, and ultrasonic nebulizer in mechanically ventilated rabbits. *Pediatr. Res.* 42 (5), 721-727.
- Folkesson, H.G. and M.A. Matthay. 2006. Alveolar Epithelial Ion and Fluid Transport. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 35, 10-19.
- Folkesson, H.G., A. Norlin and D.L. Baines. 1998. Salt and water transport across the alveolar epithelium in the developing lung: Correlations between function and recent molecular biology advances. *Int. J. Mol. Med.* 2 (5), 515-531.
- Folkesson, H.G., B.R. Weström and B.W. Karlsson. 1990. Permeability of the respiratory tract to different-sized macromolecules after intratracheal instillation in young and adult rats. *Acta Physiol. Scand.* 139, 347-354.
- Forbes, B., A. Shah, G.P. Martin and A.B. Lansley. 2003. The human bronchial epithelial cell line 16HBE14o- as a model system of the airways for studying drug transport. *Int. J. Pharm.* 257, 161-167.
- Forsgren, P., J. Modig, B. Gerdin, B. Axelsson and M. Dahlbäck. 1990. Intrapulmonary deposition of aerosolized evans blue dye and liposomes in an experimental porcine model of early ARDS. *Uppsala J. Med. Sci.* 95, 117-136.
- Garcia-Contreras, L. and A.J. Hickey. 2007. Inhaled rifampicin biodegradable microspheres for the treatment of tuberculosis in an animal model. *J. Aerosol Med.* 20 (2), 174 (P033).
- Gebhart, J. 1997. Methoden zur Erzeugung und Charakterisierung therapeutischer Aerosole. S. 49-61 in: Aerosole in der Inhalationstherapie. Grundlagen und Anwendungen. Herausgegeben von G. Scheuch, Gemünden. *Dustri-Verlag Dr. Karl Feistl, München-Deisenhofen.*
- Gessler, T., K. Lahnstein, U. Rüsçh, M. Rieger, W. Seeger and T. Schmehl. 2007. Pulmonary absorption of aerosolized fluorescent markers in an isolated lung model. *J. Aerosol Med.* 20 (2), 206-207 (P139).
- Gessler, T., T. Schmehl, M.M. Hoepfer, F. Rose, H.A. Ghofrani, H. Olschewski, F. Grimminger and W. Seeger. 2001. Ultrasonic versus jet nebulization of iloprost in severe pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 17, 14-19.
- Gessler T., T. Schmehl, H. Olschewski, F. Grimminger and W. Seeger. 2002. Aerosolized vasodilators in pulmonary hypertension. *J. Aerosol Med.* 15 (2), 117-122.
- Gessler T., W. Seeger and T. Schmehl. 2008. Inhaled prostanoids in the therapy of pulmonary hypertension. *J. Aerosol. Med. Pulm. Drug Deliv.* 21 (1), 1-12.
- Ghazanfari, T., A.M.A. Elhissi, Z. Ding and K.M.G. Taylor. 2007. The influence of fluid physicochemical properties on vibrating-mesh nebulization. *Int. J. Pharm.* 339, 103-111.

## Literaturverzeichnis

- Ghofrani, H.A., M.G. Kohstall, N. Weissmann, T. Schmehl, R.T. Schermuly, W. Seeger and F. Grimminger. 2001. Alveolar epithelial barrier functions in ventilated perfused rabbit lungs. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 280, L896-L904.
- Gillis, C.N. 1987. Measurement of endothelial metabolic functions in vivo. *Ann. Biomed. Eng.* 15, 183-188.
- Gorin, A.B. and P.A. Stewart. 1979. Differential permeability of endothelial and epithelial barriers to albumin flux. *J. Appl. Physiol.* 47 (6), 1315-1324.
- Groneberg, D.A., C. Witt, U. Wagner, K.F. Chung and A. Fischer. 2003. Fundamentals of pulmonary drug delivery. *Respir. Med.* 97, 382-387.
- Gupta, M.K. and M. Singh. 2007. Evidence based review on levosalbutamol. *Indian J. Pediatr.* 74, 161-167.
- Haagsman, H.P. and L.M.G. van Golde. 1991. Synthesis and assembly of lung surfactant. *Annu. Rev. Physiol.* 53, 441-464.
- Harris, K. and G. Smaldone. 2007. Functional testing of the omron microair, a vibrating mesh nebulizer. *J. Aerosol Med.* 20 (2), 164-165 (P003).
- Harvey, C.J., M.J. O`Doherty, C.J. Page, S.H.L. Thomas, T.O. Nunan and D.F. Treacher. 1997. Comparison of jet and ultrasonic nebulizer pulmonary aerosol deposition during mechanical ventilation. *Eur. Respir. J.* 10, 905-909.
- Heinemann, H.O. and A.P. Fishman. 1969. Nonrespiratory functions of mammalian lung. *Physiol. Rev.* 49 (1), 1-47.
- Heyder, J. 1997. „Deponierung von Aerosolteilchen im Atemtrakt des Menschen” S. 1-10 in: *Aerosole in der Inhalationstherapie. Grundlagen und Anwendungen.* Herausgegeben von G. Scheuch, Gemünden. *Dustri-Verlag Dr. Karl Feistl, München-Deisenhofen.*
- Hindle, M., E.M. Peers, M. Parry-Billings and H. Chrystyn. 1997. Relative bioavailability of salbutamol to the lung following inhalation via a novel dry powder inhaler and a standard metered dose inhaler. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 43, 336-338.
- <http://probes.invitrogen.com/servlets/structure?item=395> (abgerufen am 05.12.2007).
- <http://www.biotium.com/prodindex/other-ion/pH/51013.htm> (abgerufen am 05.12.2007).
- <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/FLUKA/21877> (abgerufen am 05.12.2007).
- <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/FLUKA/65325> (abgerufen am 05.12.2007).

## Literaturverzeichnis

- <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIAL/252433> (abgerufen am 05.12.2007).
- Ischenko, A., B.P. Nikolaev, T.V. Kotova, E.V. Vorobeychikov, V.G. Konusova and L.Y. Yakovleva. 2007. IL-1 receptor antagonist as an aerosol in inflammation. *J. Aerosol Med.* 20 (4), 445-459.
- Iwasawa, Y., C.N. Gillis and G. Aghajanian. 1973. Hypothermic inhibition of 5-Hydroxytryptamine and Norepinephrine uptake by lung: cellular location of amines after uptake. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 186 (3), 498-507.
- Iwasawa, Y. and C.N. Gillis. 1974. Pharmacological analysis of Norepinephrine and 5-Hydroxytryptamine removal from the pulmonary circulation: differentiation of uptake sites for each amine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 188 (2), 386-393.
- Johnson, M.D., J.H. Widdicombe, L. Allen, P. Barbry and L.G. Dobbs. 2002. Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99 (4), 1966-1971.
- Johnson, M.D. 2007. Ion transport in alveolar type I cells. *Mol. Biosyst.* 3 (3), 178-186.
- Junod, A.F. 1976. The metabolic activity of pulmonary endothelial cells (Review). *Pneumologie* 153, 169-175.
- Kappley, F. und C. Albers. 1963. Der Einfluss der relativen Feuchte auf die Auslösung des Hechelns beim wachen Hund. *Pflügers Archiv* 278 (3), 262-272.
- Kikkawa, Y., M. Kaibara, E.K. Motoyama, M.M. Orzalesi and C.D. Cook. 1971. Morphologic development of fetal rabbit lung and its acceleration with cortisol. *Amer. J. Path.* 64, 423-442.
- Kim, C.S. and S.-C. Hu. 2006. Total respiratory tract deposition of fine micrometer-sized particles in healthy adults: empirical equations for sex and breathing pattern. *J. Appl. Physiol.* 101, 401-412.
- Kleemann, E., T. Schmehl, T. Gessler, U. Bakowsky, T. Kissel and W. Seeger. 2007. Iloprost-containing liposomes for aerosol application in pulmonary arterial hypertension: formulation aspects and stability. *Pharm. Res.* 24 (2), 277-287.
- Kleinstreuer, C., H. Shi, and Z. Zhang. 2007. Computational analyses of a pressurized metered dose inhaler and a new drug-aerosol targeting methodology. *J. Aerosol Med.* 20 (3), 294-309.
- Knowlton, F.P. and E.H. Starling. 1912. The influence of variations in temperature and blood-pressure on the performance of the isolated mammalian heart. *J. Physiol.* 44, 206-219.
- Köster, W. 2003. Das Surfactant-System der Lunge. *Notfallmedizin.* 29, 412-415.

## Literaturverzeichnis

- Kröll, F., J.A. Karlsson and C.G. Persson. 1987. Tracheobronchial microvessels perfused via the pulmonary artery in guinea-pig isolated lungs. *Acta Physiol. Scand.* 129 (3), 445-446.
- Lahnstein, K., T. Schmehl, U. Rüsçh, M. Rieger, W. Seeger and T. Gessler. 2007. Pulmonary absorption of aerosolized fluorescent markers in the isolated rabbit lung. *Int. J. Pharm.* 351 (1-2), 158-64.
- Le Brun, P.P.H., A.H. de Boer, H.G.M. Heijerman and H.W. Frijlink. 2000. A review of the technical aspects of drug nebulization. *Pharm. World Sci.* 22 (3), 75-81.
- Leong, B.K.J., J.K. Coombs, C.P. Sabaitis, D.A. Rop and C.S. Aaron. 1998. Quantitative morphometric analysis of pulmonary deposition of aerosol particles inhaled via intratracheal nebulization, intratracheal instillation or nose-only inhalation in rats. *J. Appl. Toxicol.* 18, 149-160.
- Leuchte, H.H. 2001. Beeinflussung der pulmonalen Hypertonie mit inhalativen Prostanoiden und einem selektiven Phosphodiesterase-Inhibitor in einem Modell der isolierten ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge. *Inaugural-Dissertation. Medizin. Justus-Liebig-Universität Gießen.*
- Lipworth, B.J. 1996. Pharmacokinetics of inhaled drugs. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 42, 697-705.
- Lipworth, B.J. and D.J. Clark. 1998. Early lung absorption profile of non-CFC salbutamol via small and large volume plastic spacer devices. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 46, 45-48.
- Liu, T., M.J. Chung, M. Ullenbruch, H. Yu, H. Jin, B. Hu, Y.Y. Choi, F. Ishikawa and S.H. Phan. 2007. Telomerase activity is required for bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J. Clin. Invest.* 117 (12), 3800-3809.
- Löfdahl, J.M., J. Wahlström and C.M. Sköld. 2006. Different inflammatory cell pattern and macrophage phenotype in chronic obstructive pulmonary disease patients, smokers and non-smokers. *Clin. Exp. Immunol.* 145 (3), 428-437.
- Lohrmann, M. 2005. Adhäsionskräfte in interaktiven Mischungen für Pulverinhalatoren. *Inaugural-Dissertation. Pharmazie. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.*
- Majoral, C., A. Le Pape, P. Diot and L. Vecellio. 2006. Comparison of various methods for processing cascade impactor data. *Aerosol Sci. Technol.* 40, 672-682.
- Manocha, S., A.C. Gordon, E. Salehifar, H. Groshaus, K.R. Walley and J.A. Russell. 2006. Inhaled beta-2 agonist salbutamol and acute lung injury: an association with improvement in acute lung injury. *Crit. Care* 10 (1), R12.
- Marhold, S., E. Koller, I. Meyer, and O. Wolfbeis. 1990. A sensitive fluorimetric assay for cationic surfactants. *Fresenius J. Anal. Chem.* 336, 111-113.

## Literaturverzeichnis

- Maris, N.A., K.F. van der Sluijs, S. Florquin, A.F. de Vos, J.M. Pater, H.M. Jansen and T. van der Poll. 2004. Salmeterol, a  $\beta_2$ -receptor agonist, attenuates lipopolysaccharide-induced lung inflammation in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 286, L1122-L1128.
- Marriott, C., H.B. MacRitchie, X.M. Zeng and G.P. Martin. 2006. Development of a laser diffraction method for the determination of the particle size of aerosolised powder formulations. *Int. J. Pharm.* 326 (1-2), 39-49.
- Martin, G.P., H.B. MacRitchie, C. Marriott and X.M. Zeng. 2006. Characterisation of a carrier-free dry powder aerosol formulation using inertial impaction and laser diffraction. *Pharm. Res.* 23 (9), 2210-2219.
- Matalon, S. 1991. Mechanisms and regulation of ion transport in adult mammalian alveolar type II pneumocytes. *Am. J. Physiol.* 261, C727-738.
- Mathia, N.R., J. Timoszyk, P.I. Stetsko, J.R. Megill, R.L. Smith and D.A. Wall. 2002. Permeability characteristics of calu-3 human bronchial epithelial cells: in vitro-in vivo correlation to predict lung absorption in rats. *J. Drug Target.* 10 (1), 31-40.
- Matthay, M.A., H.G. Folkesson and A.S. Verkman. 1996. Salt and water transport across alveolar and distal airway epithelia in the adult lung. *Am. J. Physiol.* 270), L487-503.
- Matthay, M.A., H.G. Folkesson and C. Clerici. 2002. Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiol. Rev.* 82, 569-600.
- Matthay, M.A., L. Robriquet and X. Fang. 2005. Alveolar Epithelium. Role in Lung Fluid Balance and Acute Lung Injury. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2, 206-213.
- Maus, U., S. Rosseau, W. Seeger and J. Lohmeyer. 1997. Separation of human alveolar macrophages by flow cytometry. *Am. J. Physiol.* 272, L 566-571.
- Michaut, P., C. Planes, B. Escoubet, A. Clement, C. Amiel and C. Clerici. 1996. Rat lung alveolar type II cell line maintains sodium transport characteristics of primary culture. *J. Cell Physiol.* 169 (1), 78-86.
- Mitchell, J.P., M.W. Nagel, S. Nicholas and O. Nerbrink. 2006. Laser diffractometry as a technique for the rapid assessment of aerosol particle size from inhalers. *J. Aerosol Med.* 19 (4), 409-433.
- Mobley, C. and G. Hochhaus. 2001. Methods used to assess pulmonary deposition and absorption of drugs. *Drug Discov. Today.* 6 (7), 367-375.
- Morrow, W.G. 1975. A method for intratracheal instillation in the rat. *Lab. Anim. Sci.* 25 (3), 337-340.
- Newhouse, M.I., M. Jordana and M. Dolovich. 1987. Evaluation of lung epithelial permeability. *Eur. J. Nucl. Med.* 13, 58-62.

## Literaturverzeichnis

- Newman, S.P., G.R. Pitcairn, G. Hooper and M. Knoch. 1994. Efficient drug delivery to the lungs from a continuously operated open-vent nebulizer and low pressure compressor system. *Eur. Respir. J.* 7, 1177-1181.
- Nickel, R., A. Schummer und E. Seiferle. 1999. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band II Eingeweide. 8., vollständig neubearbeitete Auflage. *Parey Buchverlag Berlin*.
- Niemeier, R.W. 1984. The isolated perfused lung. *Environ. Health Perspect.* 56, 35-41.
- Nikander, K., M. Turpeinen and P. Wollmer. 2000. Evaluation of pulsed and breath-synchronized nebulization of budesonide as a means of reducing nebulizer wastage of drug. *Pediatr. Pulmonol.* 29, 120-126.
- Niven, R.W., A.Y. Ip, S. Mittelman, S.J. Prestrelski and T. Arakawa. 1995. Some factors associated with the ultrasonic nebulization of proteins. *Pharm. Res.* 12 (1), 53-59.
- Norris Reinero, C.R., K.C. Decile, R.D. Berghaus, K.J. Williams, C.M. Leutenegger, W.F. Walby, E.S. Schelegle, D.M. Hyde and L.J. Gershwin. 2004. An experimental model of allergic asthma in cats sensitized to house dust mite or bermuda grass allergen. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* 135 (2), 117-131.
- Oberdörster, G. 1994. Macrophage-associated responses to chrysotile. *Ann. Occup. Hyg.* 38 (4), 601-615.
- Oberdörster, G., C. Cox and R. Gelein. 1997. Intratracheal instillation versus intratracheal inhalation of tracer particles for measuring lung clearance function. *Exp. Lung Res.* 23 (1), 17-34.
- O'Callaghan, C. and P.W. Barry. 1997. The science of nebulised drug delivery. *Thorax* 52, 31-44.
- O'Callaghan, C., J. White, J. Jackson, D. Crosby, B. Dougill and H. Bland. 2007. The effects of Heliox on the output and particle-size distribution of salbutamol using jet and vibrating mesh nebulizers. *J. Aerosol Med.* 20 (4), 434-444.
- O'Donnell, D.E., N. Voduc, M. Fitzpatrick and K.A. Webb. 2004. Effect of salmeterol on the ventilatory response to exercise in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* 24, 86-94.
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals. 1995. No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method. *OECD*.
- Okamoto, H., H. Todo, K. Iida and K. Danjo. 2002. Dry powders for pulmonary delivery of peptides and proteins. *KONA* 20, 71-83.

## Literaturverzeichnis

- Osier, M., R.B. Baggs and G. Oberdörster. 1997. Intratracheal instillation versus intratracheal inhalation: influence of cytokines on inflammatory response. *Environ. Health Perspect.* 105 (Supplement 5), 1265-1271.
- Page, C.P. and J. Morley. 1999. Contrasting properties of albuterol stereoisomers. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104, S31-41.
- Parchet, V., F. Sprenger und A. Méan. 1951. Über die Segmentanatomie der Lungen und ihre klinische Bedeutung. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 157 (4), 365-391.
- Pérez-Gil, J. and K.M.W. Keough. 1998. Interfacial properties of surfactant proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1408, 203-217.
- Perreault, S., H. Ong and P. du Souich. 1992. Salbutamol disposition and dynamics in conscious rabbits: influence of the route of administration and of the dose. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 20 (5), 461-476.
- Persons, D.D., G.D. Hess, W.J. Muller and P.W. Scherer. 1987. Airway deposition of hygroscopic heterodispersed aerosols: results of a computer calculation. *J. Appl. Physiol.* 63 (3), 1195-1204.
- Phalen, R. 2007. Relevance of animal models for aerosol deposition and toxicology. *J. Aerosol Med.* 20 (2), 210 (OC 003).
- Pohl, R., P.A. Kramer and R.S. Thrall. 1998. Confocal laser scanning fluorescence microscopy of intact unfixed rat lungs. *Int. J. Pharm.* 168, 69-77.
- Pohl, R., R.S. Thrall, R.A. Rogers and P.A. Kramer. 1999. Confocal imaging of peripheral regions of intact rat lungs following intratracheal administration of 6-Carboxyfluorescein, FITC-insulin, and FITC-dextran. *Pharm. Res.* 16(2), 327-332.
- Pollitzer, H., E. Stolz und B. Brill. 1924. Über den Einfluss der Leber und der Lunge auf den Wasserhaushalt. *Klin. Wochenschr.* 3 (36), 1616-1618.
- Rau, J.L. 2002. Design principles of liquid nebulization devices currently in use. *Respir. Care.* 47 (11), 1257-1275.
- Rau, J.L. 2005. The inhalation of drugs: advantages and problems. *Respir. Care* 50 (3), 367-382.
- Robertshaw, D. 2006. Mechanisms for the control of respiratory evaporation heat loss in panting animals. *J. Appl. Physiol.* 101, 664-668.
- Roda, A., A. Minutello, M.A. Angellotti and A. Fini. 1990. Bile acid structure-activity relationship: evaluation of bile acid lipophilicity using 1-octanol/water partition coefficient and reverse phase HPLC. *J. Lipid. Res.* 31, 1433-1443.
- Roerig, D.L., S.H. Audi and S.B. Ahlf. 2004. Kinetic characterization of P-Glycoprotein-mediated efflux of rhodamine 6G in the intact rabbit lung. *Drug Metab. Dispos.* 32, 953-958.

## Literaturverzeichnis

- Rohen, J.W. und E. Lütjen-Drecoll. 2000. Funktionelle Histologie. 4. Auflage. *F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart*.
- Rohen, J.W. und E. Lütjen-Drecoll. 2001. Funktionelle Anatomie des Menschen. Zehnte, völlig neu gestaltete und erweiterte Auflage. *F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart*.
- Rosenthal, F.S. 2007. Aerosol probes of emphysema progression in dogs treated with *all trans* retinoic acid - an exploratory study. *J. Aerosol Med.* 20 (2), 83-96.
- Roth, C. 1997. „Methoden der Aerosoldosimetrie“ S. 62-72 in: *Aerosole in der Inhalationstherapie. Grundlagen und Anwendungen*. Herausgegeben von G. Scheuch, Gemünden. *Dustri-Verlag Dr. Karl Feistl, München-Deisenhofen*.
- Roy, I., T.Y. Ohulchansky, D.J. Bharali, H.E. Pudavar, R.A. Mistretta, N. Kaur and P.N. Prasad. 2004. Optical tracking of organically modified silica nanoparticles as DNA carriers: A nonviral, nanomedicine approach for gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102 (2), 279-284.
- Ryan, J.W., J. Roblero and J.M. Stewart. 1968. Inactivation of Bradykinin in the Pulmonary Circulation. *Biochem. J.* 110, 795-797.
- Sano H., H. Sohma, T. Muta, S. Nomura, D.R. Voelker and Y. Kuroki. 1999. Pulmonary surfactant protein A modulates the cellular response to smooth and rough lipopolysaccharides by interaction with CD14. *J. Immunol.* 163, 387-395.
- Schanker, L.S. and M.J. Less. 1977. Lung pH and pulmonary absorption of non-volatile drugs in the rat. *Drug Metab. Dispos.* 5 (2), 174-178.
- Schanker, L.S., E.W. Mitchell and R.A. Jr. Brown. 1986a. Species comparison of drug absorption from the lung after aerosol inhalation or intratracheal injection. *Drug Metab. Dispos.* 14 (1), 79-88.
- Schanker, L.S., E.W. Mitchell and R.A. Jr. Brown. 1986b. Pulmonary absorption of drug in the dog: comparison with other species. *Pharmacology.* 32 (3), 176-180.
- Schermuly, R.T., A. Günther, N. Weissmann, H.A. Ghofrani, W. Seeger, F. Grimminger, and D. Walmrath. 2000. Differential impact of ultrasonically nebulized versus tracheal-instilled surfactant on ventilation-perfusion (Va/Q) mismatch in a model of acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 152-159.
- Schermuly, R.T., E. Krupnik, H. Tenor, C. Schudt, N. Weissmann, F. Rose, F. Grimminger, W. Seeger, D. Walmrath, and H.A. Ghofrani. 2001a. Coaerosolization of phosphodiesterase inhibitors markedly enhances the pulmonary vasodilatory response to inhaled iloprost in experimental pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164, 1694 -1700.
- Schermuly, R.T., H. Leuchte, H.A. Ghofrani, N. Weissmann, F. Rose, M. Kohstall, H. Olschewski, C. Schudt, F. Grimminger, W. Seeger, and D. Walmrath. 2003.



## Literaturverzeichnis

Zardaverine and aerosolised iloprost in a model of acute respiratory failure. *Eur. Respir. J.* 22, 342-347.

- Schermuly, R.T., A. Roehl, N. Weissmann, H.A. Ghofrani, H. Leuchte, F. Grimminger, W. Seeger, and D. Walmrath. 2001b. Combination of nonspecific PDE inhibitors with inhaled prostacyclin in experimental pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 281, L1361-L1368.
- Schermuly, R.T., T. Schmehl, A. Günther, F. Grimminger, W. Seeger, and D. Walmrath. 1997. Ultrasonic nebulization for efficient delivery of surfactant in a model of acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156, 445-453.
- Scheuch, G. 1997. Die Partikelgröße, der wichtigste Parameter für die Inhalierbarkeit und Deposition von Aerosolteilchen. S. 11-26 in: *Aerosole in der Inhalationstherapie. Grundlagen und Anwendungen.* Herausgegeben von G. Scheuch, Gemünden. *Dustri-Verlag Dr. Karl Feistl, München-Deisenhofen.*
- Scheuch, G., M.J. Kohlhaeufl, P. Brand and R. Siekmeier. 2006. Clinical perspectives on pulmonary systemic and macromolecular delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 996-1008.
- Schlaudraff, J.-M. 2005. Experimentelle Untersuchung an einem durch Endotoxin und Exotoxin induzierten Modell der septischen Lunge: NO als Regulator der Vasomotorik. *Inaugural-Dissertation. Medizin. Justus-Liebig-Universität Gießen.*
- Schöttle, I.A. 2006. Sprühgetrocknete Polylaktid, Poly(laktid-co-glykolid) Mikropartikel zur Steuerung der Freisetzung aus pulmonalen Arzneiformen. *Inaugural-Dissertation. Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.*
- Seeger, W., D. Walmrath, M. Menger, and H. Neuhof. 1986. Increased lung vascular permeability after arachidonic acid and hydrostatic challenge. *J. Appl. Physiol.* 61 (5), 1781-1789.
- Shibamoto, T., H.G. Wang., Y. Yamaguchi, T. Hayashi, Y. Saeki, S. Tanaka and S. Koyama. 1995. Effects of thromboxane A2 analogue on vascular resistance distribution and permeability in isolated blood-perfused dog lungs. *Lung*, 173 (4), 209-221.
- Silbernagel, S. und A. Despopoulos. 2001. Taschenatlas der Physiologie. 5., komplett überarbeitete und neu gestaltete Auflage. *Georg Thieme Verlag Stuttgart und Deutscher Taschenbuch Verlag GmbH & Co.KG, München.*
- Smaldone, G.C. 2000. Physiological and pathological considerations for aerosol deposition: expiration and models of deposition. *J. Aerosol Med.* 13 (4), 387-391.
- Stahlhofen, W. 1997. „Die Aufenthaltszeit von Aerosolteilchen in den Atemwegen der Lunge.“ S. 41-48 in: *Aerosole in der Inhalationstherapie. Grundlagen und Anwendungen.* Herausgegeben von G. Scheuch, Gemünden. *Dustri-Verlag Dr. Karl Feistl, München-Deisenhofen.*

## Literaturverzeichnis

- Steckel, H. and F. Eskandar. 2003. Factors affecting aerosol performance during nebulization with jet and ultrasonic nebulizers. *Eur. J. Pharm. Sci.* 19 (5), 443-455.
- Stuart, B. 1976. Deposition and clearance of inhaled particles. *Environ. Health Perspect.* 16, 41-53.
- Thauer, R. 1955. Physiologie der Wärmeregulation. *Acta Neuroveg.* 11 (1-4), 12-37.
- Tronde, A., E. Krondahl, H. von Euler-Chelpin, P. Brunmark, U.H. Bengtsson, G. Ekström and H. Lennernäs. 2002. High airway-to-blood transport of an opioid tetrapeptide in the isolated rat lung after aerosol delivery. *Peptides* 23, 469-478.
- Tronde, A., B. Nordén, A.-B. Jeppsson, P. Brunmark, E. Nilsson, H. Lennernäs and H. Bengtsson. 2003. Drug absorption from the isolated perfused rat lung – correlation with drug physicochemical properties and epithelial permeability. *J. Drug Target.* 11 (1), 61-74.
- Trošić, I., M. Matausić-Pisl, V. Brumen and N. Hors. 1996. The role of intratracheal instillation and bronchoalveolar lavage in the investigation of mechanisms underlying lung disorders – an animal model. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 47 (4), 397-404.
- Vick, A., R. Wolff, A. Koester, R. Reams, D.R. Deaver and S. Heidel. 2007. A 6-month inhalation study to characterize the toxicity, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of human insulin inhalation powder (HIIP) in beagle dogs. *J. Aerosol Med.* 20 (2), 112-126.
- von Wichert, P. and C. Seifart. 2005. The lung, an organ for absorption? *Respiration* 72, 552-558.
- Voshaar, T., E.M. App, D. Berdel, R. Buhl, J. Fischer, T. Gessler, P. Haidl, J. Heyder, D. Köhler, M. Kohlhäufel, C.-M. Lehr, H. Lindemann, H. Matthys, T. Meyer, H. Olschewski, K.D. Paul, K. Rabe, F. Raschke, G. Scheuch, T. Schmehl, G. Schultze-Werninghaus, D. Ukena and H. Worth. 2001. Empfehlungen für die Auswahl von Inhalationssystemen zur Medikamentenverabreichung. *Pneumologie* 55, 579-586.
- Voshaar, T., T. Hausen, P. Kardos, D. Köhler, G. Schultze-Werninghaus, W. Schürmann and C. Vogelmeier. 2005. Inhalationstherapie mit dem Respimat® Soft Inhaler bei Asthma und COPD. *Pneumologie* 59, 25-32.
- Wakerlin, G.E. Jr., G.V. Benson and R.G. Pearl. 1991. A thromboxane analog increases pulmonary capillary pressure but not permeability in the perfused rabbit lung. *Anesthesiology* 75 (3), 475-480.
- Waldrep, J.C., A. Berlinski and R. Dhand. 2007. Comparative analysis of methods to measure aerosols generated by a vibrating mesh nebulizer. *J. Aerosol Med.* 20 (3), 310-319.

## Literaturverzeichnis

- Walmrath, D., R. König, C. Ernst, H. Brückner, F. Grimminger, and W. Seeger. 1992. Ventilation-perfusion relationships in isolated blood-free perfused rabbit lungs. *J. Appl. Physiol.* 72 (1), 374-382.
- Walmrath, D., R. Schermuly, J. Pilch, F. Grimminger, W. Seeger. 1997. Effects of inhaled versus intravenous vasodilators in experimental pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 10, 1084-1092.
- Wang, T., S. Noonberg, R. Steigerwalt, M. Lynch, R.A. Kovelesky, C.A. Rodríguez, K. Sprugel and N. Turner. 2007. Preclinical safety evaluation of inhaled cyclosporine in propylene glycol. *J. Aerosol Med.* 20 (4), 417-428.
- Waschkowitz E. 2002. Darstellung und Charakterisierung einer liposomalen Depotform zur inhalativen pulmonalen Applikation. *Wettenberg: VVB Laufersweiler.*
- Weinstein, J.N., R. Blumenthal and R.D. Klausner. 1986. Carboxyfluorescein leakage assay for lipoprotein-liposome interaction. *Methods Enzymol.* 128, 657-668.
- Winkler, J., G. Hochhaus and H. Derendorf. 2004. How the lung handles drugs. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 1, 356-363.
- Woolfrey, S.G., G. Taylor, I.W. Kellaway, and A. Smith. 1986. Pulmonary absorption of Carboxyfluorescein in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* 38, 304-306.
- Wyka, B., T. Tougas, J. Mitchell, H. Strickland, D. Christopher and S. Lyapustina. 2007. Comparison of two approaches for treating cascade impaction mass balance measurements. *J. Aerosol Med.* 20 (3), 236-257.
- Yamamoto, A., K. Yamada, H. Muramatsu, A. Nishinaka, S. Okumura, N. Okada, T. Fujita, and S. Muranishi. 2004. Control of pulmonary absorption of water-soluble compounds by various viscous vehicles. *Int. J. Pharm.* 282, 141-149.
- Yu, S.-H. and F. Possmayer. 2003. Lipid compositional analysis of pulmonary surfactant monolayers and monolayer-associated reservoirs. *J. Lipid Res.* 44, 621-629.
- Zeng, X.M., H.B. Mac Ritchie, C. Marriott and G.P. Martin. 2006. Correlation between inertial impaction and laser diffraction sizing data for aerosolized carrier-based dry powder formulations. *Pharm. Res.* 23 (9), 2200-2209.
- Zeng, X.M., G.P. Martin and C. Marriott. 1995. The controlled delivery of drugs to the lung. Invited Review. *Int. J. Pharm.* 124, 149-164.
- Ziegler, J. and H. Wachtel. 2005. Comparison of cascade impaction and laser diffraction for particle size distribution measurements. *J. Aerosol Med.* 18 (3), 311-324.

## 9 ANHANG

### 9.1 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Farbstoffkonzentrationen in der wässrigen- und der Octanol-Phase sowie daraus errechnete log P-Werte.	53
Tab. 2:	Aerosolpartikelgrößen verschiedener Substanzen nach Verneblung mit den beiden Verneblern bei unterschiedlichen Luftflüssen (je n = 6).	57
Tab. 3:	Absolute Menge an Salbutamolpulver in mg, die nach verschiedenen Verneblungsvarianten mit dem Aerosol Dispensor nachweisbar war.	60
Tab. 4:	Verteilung der Fluoreszenzfarbstoffe CF, MPTS und R6G im Modell der isolierten Kaninchenlunge (je n = 4).	63
Tab. 5:	Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffs CF im Modell der isolierten Kaninchenlunge nach Verwendung verschiedener Perfusionsmedien und verschiedener Depositionsmethoden.	66
Tab. 6:	Verteilung von Salbutamol der Konzentrationen 1, 10 und 100 mg/ml im Modell der isolierten Kaninchenlunge (je n = 4).	70
Tab. 7:	Verteilung von Salbutamol im Modell der isolierten Kaninchenlunge nach Verwendung verschiedener Vernebler (je n = 4).	73
Tab. 8:	Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffs CF im Modell der isolierten Kaninchenlunge mit und ohne pulmonaler Hypertonie (je n = 4).	75

## Abbildungsverzeichnis

### 9.2 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1:	Ventrale Ansicht des Bronchialbaumes der linken Hälfte einer menschlichen Lunge (Latexguss). Deutlich zu erkennen ist die Aufzweigung der Trachea (A) in die Stammbronchen (B linker Stammbronchus) und die weiteren Aufzweigungen in Lappen- und Segmentbronchen bis hin zu den terminalen Ästen des Bronchialbaumes (modifiziert nach Brown et al., 1997).	3
Abb. 2:	Schematische Darstellung der Lungenalveolen mit umgebenden elastischen Fasern und Kapillargeflecht mit zu- und abführenden Blutgefäßen (modifiziert nach Rohen und Lütjen-Drecoll, 2001).	4
Abb. 3:	Schematische Darstellung des Salz- und Wassertransportes im Alveolarepithel (modifiziert nach Matthay et al., 2002).	6
Abb. 4:	Schematische Darstellung der drei wichtigsten Mechanismen zur Abscheidung von Aerosolpartikel an den Wänden des Atemtrakts.	11
Abb. 5:	Strukturformel von Salbutamolsulfat (Lohrmann, 2005)	26
Abb. 6:	Darstellung der Integration des piezoelektrischen Verneblers Aeroneb <sup>®</sup> Professional in das Beatmungssystem am Modell der isolierten Kaninchenlunge.	29
Abb. 7:	Darstellung des AKITA <sup>2</sup> APIXNEB-Systems im Beatmungssystem am Modell der isolierten Kaninchenlunge.	31
Abb. 8:	Darstellung des DP-4 Dry Powder Insufflator <sup>™</sup> im Beatmungstubus der isolierten Kaninchenlunge.	32
Abb. 9:	Darstellung des Aerosol Dispensor mit einem Anschluss für den Dispersionsimpuls im Deckel (A), Gehäuse für den HandiHaler <sup>®</sup> (B), HandiHaler <sup>®</sup> (C) und Verneblerkammer (D) [Foto: Activaero GmbH, München, Deutschland].	33
Abb. 10:	Zeit/Fluss-Diagramm des Dispersionsimpulses der AKITA(1) [Activaero GmbH, München, Deutschland].	34
Abb. 11:	Darstellung des Pulververneblers im Beatmungssystem am Modell der isolierten Kaninchenlunge.	35
Abb. 12:	Darstellung des Modells der isolierten, perfundierten und ventilierten Kaninchenlunge.	43
Abb. 13:	Bild einer isolierten Kaninchenlunge mit Perfusatzufluss über einen deutlich zu erkennenden Katheter in der Pulmonalarterie (A) und -abfluss über einen Schlauch im linken Ventrikel (B).	45

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 14: Aerosolpartikelgrößen (MMAD) von isotoner Kochsalzlösung (NaCl) und den drei Fluoreszenzfarbstoffen CF, R6G und MPTS nach Verneblung mit dem Aeroneb® Professional-Vernebler unter Verwendung unterschiedlicher Luftflüsse (je n = 6). Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SD dargestellt. 54
- Abb. 15: Aerosolpartikelgrößen (MMAD) von isotoner Kochsalzlösung (NaCl) und Salbutamol (1, 10 und 100 mg/ml) nach Verneblung mit dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System unter Verwendung unterschiedlicher Luftflüsse (je n = 6). Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SD dargestellt. 55
- Abb. 16: Vergleich der Aerosolpartikelgrößen (MMAD) isotoner Kochsalzlösung (NaCl) nach Verneblung mit dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System und dem Aeroneb® Professional-Vernebler unter Verwendung unterschiedlicher Luftflüsse (je n = 6). Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SD dargestellt. 56
- Abb. 17: Vergleich der Aerosolpartikelgrößen (MMAD) und der Geometrischen Standardabweichung (GSD) von mikronisiertem Salbutamolpulver nach Verneblung mit dem DP-4 (n = 6) und dem Aerosol Dispensor (n = 4). Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SD dargestellt. \*\*\* p = <0,001 58
- Abb. 18: Verteilung von Salbutamol-Pulver nach unterschiedlichen Verneblungsmustern mit dem Aerosol Dispensor. Die Ergebnisse sind in % bezogen auf die vernebelte Menge (bestimmt durch Wiegen der Kapsel vor und nach Verneblung) als Mittelwert + SD dargestellt. 61
- Abb. 19: Konzentrations-Zeit-Profil der Fluoreszenzfarbstoffe CF, MPTS und R6G im Perfusat (ng/ml) nach Verneblung von je 3 ml der Farbstofflösungen (500 µg/ml) mit dem Aeroneb® Professional-Vernebler und einer Deposition von 0,4 ml (200 µg Farbstoff) in der isolierten und perfundierten Kaninchenlunge (n = 4 für jeden Farbstoff). Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SD dargestellt. 62
- Abb. 20: Konzentrations-Zeit-Profil von CF im Perfusat in ng/ml nach Verneblung von je 3 ml einer CF-Lösung (500 µg/ml) mit dem Aeroneb® Professional-Vernebler in die isolierte und perfundierte Kaninchenlunge unter Verwendung verschiedener Perfusionsmedien (je n = 4). Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SD für die Versuche mit 1/3-Perfusat und als Mittelwert – SD für Versuche mit IIN-Perfusat dargestellt. 64
- Abb. 21: Konzentrations-Zeit-Profil von CF im Perfusat in ng/ml nach Deposition von 200 µg des Farbstoffs durch Verneblung (n = 4) und Instillation (n = 2) in der isolierten und perfundierten Kaninchenlunge. Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SD für die Verneblung und als Mittelwert – SD für die Instillation dargestellt. 65

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 22: Konzentrations-Zeit-Profil von Salbutamol im Perfusat in  $\mu\text{g/ml}$  nach zehnminütiger Verneblung von Salbutamol der Konzentration 1 mg/ml mit dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB und einer Deposition von 0,8 ml (800  $\mu\text{g}$  Salbutamol) in der isolierten und perfundierten Kaninchenlunge (n = 4). Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt. 67
- Abb. 23: Konzentrations-Zeit-Profil von Salbutamol im Perfusat in  $\mu\text{g/ml}$  nach zehnminütiger Verneblung von Salbutamol der Konzentration 10 mg/ml mit dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB und einer Deposition von 0,8 ml (8 mg Salbutamol) in der isolierten und perfundierten Kaninchenlunge (n = 4; \* bei diesem Wert wegen Verlust einer Probe nur n = 3). Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt. 68
- Abb. 24: Konzentrations-Zeit-Profil von Salbutamol im Perfusat in  $\mu\text{g/ml}$  nach zehnminütiger Verneblung von Salbutamol der Konzentration 100 mg/ml mit dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB und einer Deposition von 0,8 ml (80 mg Salbutamol) in der isolierten und perfundierten Kaninchenlunge (n = 4). Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt. 68
- Abb. 25: Vergleich der Übertrittskinetiken von Salbutamol verschiedener Konzentrationen (1, 10 und 100 mg/ml) in % bezogen auf das deponierte Flüssigkeitsvolumen von 800  $\mu\text{l}$  nach zehnminütiger Verneblung mit dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB (je n = 4; \* bei diesem Wert wegen Verlust einer Probe nur n = 3). Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SD für Salbutamol der Konzentration 10 mg/ml und als Mittelwert – SD für 1 und 100 mg/ml Salbutamol dargestellt. 69
- Abb. 26: Konzentrations-Zeit-Profil von Salbutamol im Perfusat in  $\mu\text{g/ml}$  nach Verneblung von Salbutamolpulver mit dem DP-4 und dem Aerosol Dispensor in die isolierten und perfundierten Kaninchenlunge (je n = 4). Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SD für den Aerosol Dispensor und als Mittelwert – SD für den DP-4 dargestellt. 71
- Abb. 27: Vergleich der Übertrittskinetiken von Salbutamol nach Verwendung verschiedener Vernebler in % bezogen auf die deponierte Menge (je n = 4). Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SD für die Versuche mit dem AKITA<sup>2</sup>APIXNEB-System (Lungendeposition ca. 0,8 mg) und dem Aerosol Dispensor (Lungendeposition ca. 1,25 mg) und als Mittelwert – SD für die Verneblung mit dem DP-4 (Lungendeposition ca. 1,12 mg) dargestellt. 72
- Abb. 28: Konzentrations-Zeit-Profil von CF im Perfusat nach Verneblung von je 3 ml einer CF-Lösung (500  $\mu\text{g/ml}$ ) mit dem Aeroneb<sup>®</sup> Professional-Vernebler in die isolierte und perfundierte Kaninchenlunge mit und ohne pulmonale Hypertonie (je n = 4). Die Ergebnisse sind als Mittelwert + SD für die Versuche ohne und als Mittelwert – SD für die Versuche mit pulmonaler Hypertonie dargestellt. 74

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 29: Schematische Darstellung des AERONEB<sup>®</sup> Professional-Verneblers und Verlauf des Aerosol- und Luftflusses im T-Stück. 80
- Abb. 30: Schematische Darstellung des AKITA<sup>2</sup> APIXNEB-Verneblers und Verlauf des Aerosol- und Luftflusses. 81



## Material

### 9.4 Materialverzeichnis

#### 9.4.1 Substanzliste:

Aqua ad injectabilia	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Braunol <sup>®</sup>	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Brij-35	überlassen von Activaero GmbH, München, Deutschland
5(6)-Carboxyfluorescein	Fluka, Buchs, Schweiz
Chloroform (119,38 g/mol)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Druckluft (UN 1002)	Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Ethanol 99,6 %	Stockmeier Chemie, Dillenburg, Deutschland
Helium	Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Heparin	Heparin-Natrium-25000-ratiopharm, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Isotone Kochsalzlösung (0,9%)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Ketavet <sup>®</sup> (Ketamin)	Pharmacia, Erlangen, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
MPTS	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Natriumbicarbonat 1M, 8,4 %	Serag-Wiesner KG, Naila/Bayern, Deutschland
Natriumchlorid	Karl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid 10M	Merck, Darmstadt, Deutschland
normoxisches Gasgemisch (21% O <sub>2</sub> , 5.3% CO <sub>2</sub> , 73.7% N <sub>2</sub> )	Messer Griesheim GmbH, Krefeld, Deutschland
1-Octanol	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ortho-Phosphorsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS-Puffer (pH 7,4)	80,0 g NaCl Karl Roth, Karlsruhe, D 2,00 g KCl Merck, Darmstadt, D 11,5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O Merck, Darmstadt, D 2,00 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (174,18 g/mol) Merck, Darmstadt, D
Elektrolytlösung 1/3	Serag-Wiessner, Naila, Deutschland
Elektrolytlösung IIN	Serag -Wiessner, Naila, Deutschland
Rhodamin 6G	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Rompun <sup>®</sup> 2% (Xylacin)	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Salbutamolsulfat	zur Verfügung gestellt von Boehringer-Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
<sup>99m</sup> Tchnetium-Perchnetat	Abteilung für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH, Giessen, Deutschland
Triethylamin	Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland
U 46619	Paesel-Lorei, Frankfurt, Deutschland
Xylocain <sup>®</sup> 2 % (Lidocain)	AstraZeneca, Wedel, Deutschland

## Material

### 9.4.2 Geräteliste:

ABL Radiometer Copenhagen	Radiometer GmbH, Willich, Deutschland
Aeroneb® Professional	Aerogen, Dangan, Galway, Irland
Aerosol Dispensor	Entwickelt in Zusammenarbeit mit Activaero GmbH, München, Deutschland
AKITA <sup>2</sup> APIXNEB	Entwickelt in Zusammenarbeit mit Activaero GmbH, München, Deutschland
Andersen Cascade Impactor	Copley Scientific, Nottingham, England
Beatmungspumpe (Cat/Rabbit Ventilator)	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Centrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
DP-4 Dry Powder Insufflator™	PennCentury™, Philadelphia, USA
Druckumwandler (Combitrans)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Flowmeter	Fischer & Porter GmbH, Göttingen, Deutschland
Fluorescence plate reader (FL600)	BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA
Frigomix BU	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Gammacounter (Mucha)	Raytest, Straubenhardt, Deutschland
Gewichtsschreiber (Rikadenki R50)	Rikadenki Electronics, Freiburg, Deutschland
HPLC-Anlage Agilent 1100	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Laserdiffraktometer	Sympatec, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland
Magnetrührer Typ 162C	Mercateo, Köthen, Deutschland
Messverstärker (Plugsys DBA 660)	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Perfusor (Injectomat S)	Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland
Peristaltikpumpe (Roller Pump BP 742)	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Pumpe (HCP 5)	Copley Scientific, Nottingham, England
Reinstwasseranlage (Seralpur UV/UF)	USF Elga, Ransbach-Baumbach, Deutschland
Smartline Autosampler 3900	Knauer, Berlin, Deutschland
Severin 1300 electronic Staubsauger	Severin, Sundern, Deutschland
Thermostat (Thermomix BU)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Ultraschallbad (Sonorex TK30)	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Vortexer IKA® MS 3 basic	AL-Labortechnik, Amstetten, Österreich
Waage (Mettler AJ 100)	Mettler Toledo GmbH, Giessen, Deutschland

## Material

Wägezelle Typ U1	Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
9.4.3 Verbrauchsmaterial und Sonstiges:	
Aerosolfilter (ISO-Gard Depht Filter)	Hudson RCI, Temecula, California, USA
Alufolie 0,2 mm	Merck, Darmstadt, Deutschland
Blasenfalle	Dahlhausen & Co. GmbH, Köln, Deutschland
Dreiwegehähne Discifix <sup>®</sup> C	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Einmalhandschuhe	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Einmalspritzen	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Filter, Pall Cardioplegia Plus 0,2 µm	Pall Biomedical Corp., Fajardo, USA
Filter, Millex GP, 0,22 µm	Millipore, Bedford, USA
Glasfaservorfilter GF 92	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Glasgefäße Schott Duran <sup>®</sup>	Schott AG, Mainz, Deutschland
HPLC-Säule (LichroCart 250*4mm)	Merck, Darmstadt, Deutschland
HPLC-Vorsäule (LichroCart 4*4mm)	
Kanülen BD Microlance <sup>™</sup> 3	BD Drogheda, Drogheda, Irland
Klebstreifen 3M <sup>™</sup> Durapore <sup>™</sup>	3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland
Schlauchklemmen	Cole-Parmer, Vernon Hills, Illinois, USA
Mikrotiterplatten (Assay Plate 96 Well)	Costar Corp., Cambridge, Massachusetts, USA
Nadel-Faden-Kombination Mersilene 4, 1 SH	Ethicon, Norderstedt, Deutschland
Pipetten (Eppendorf Research) 10-100 µl und 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen (200 µl, gelb und 1000 µl, blau)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PP-Röhrchen (50 ml und 15 ml)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Rundkolben 250 ml und 500 ml	Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz
Schläuche (Tygon, Kalensee)	Tygon, Gießen, Deutschland
Schläuche PVC	Sorin Biomedica, Düsseldorf, Deutschland
Schlauchübergänge	NORMA Germany GmbH, Frankfurt am Main,

## Material

Normaplast®	Deutschland
Schlinggazettupfer	Fuhrmann, Much, Deutschland
Perfuline® Infusionsleitung	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen, Deutschland
Perfusorspritzen OPS 50 ml	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Venenpunktionsbesteck	Butterfly Eloflo, Gelnhausen, Deutschland

## Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei all Jenen herzlichst bedanken, die mich durch diese Doktorarbeit begleitet und mich auf die unterschiedlichste Weise unterstützt haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Werner Seeger für die Überlassung des Themas und der Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen.

Gleichermaßen möchte ich Frau PD Dr. Kerstin Fey für die Betreuung dieser Arbeit, die gewissenhafte Korrektur und die hilfreichen Anregungen beim Fertigstellen meiner Dissertation danken.

Ganz besonderer Dank gebührt meinen beiden Arbeitsgruppenleitern Dr. Thomas Schmehl und Dr. Tobias Gessler, die den größten Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben. Ohne ihre - sowohl wissenschaftliche als auch seelische und moralische - Unterstützung wäre die Durchführung dieser Arbeit undenkbar gewesen. Danke, dass ihr mir immer geduldig mit Rat und Tat zur Seite gestanden habt und für ein stets gutes Klima in der Arbeitsgruppe gesorgt habt.

Vielen Dank an die Arbeitskollegen aus dem „Labor Seeger“ und besonders an unsere Arbeitsgruppe (Moni, Helene, Nadine, Julia, Moritz, Susanne, Juliane) sowie an die Mitglieder der DFG- und BMBF- Arbeitsgruppen (insbesondere an Tobias Kolb und Tobias Hoffmann) für die gute und produktive Zusammenarbeit.

Ich möchte mich außerdem bei all den besonderen Menschen bedanken, die ich meine Freunde nennen darf, insbesondere:

- meinen lieben und langjährigen, „daheimgebliebenen“ Freundinnen Katrin, Ina und Cordula.
- meinen Studienkollegen und – freunden, v.a. Anja, Susan und Simone und in ganz besonderem Maße Christina, Linn und Caro, die mir das Studium verschönert und jede Prüfung erträglich gemacht haben und die auch jetzt noch immer für mich da sind. Danke für die schöne Zeit!
- Moni, Helene, Nadine und Julia, mit denen die Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe besonders viel Spaß gemacht hat und die mir – nicht erst nach Tours, Ingelheim und München – mehr als nur Kollegen wurden.

Danke, dass ihr immer für mich da seid und mich stets unterstützt – obwohl es bestimmt nicht immer ganz einfach mit mir ist.

Letztendlich gilt mein besonderer Dank meiner Familie: meiner Mutter Renate, meinem Vater Georg, meinen Geschwistern Britta und Dominik, sowie Kristina, meiner Oma Agneta und all meinen Tanten (auch den kleinen), Onkel, Cousinsen und Cousins. Danke für alles!

# Veröffentlichungen

## Artikel

**Lahnstein, K.**, T. Schmehl, U. Rüsç, M. Rieger, W. Seeger and T. Gessler. 2007. Pulmonary absorption of aerosolized fluorescent markers in the isolated rabbit lung. *Int. J. Pharm.* 351 (1-2), 158-64.

Beck-Broichsitter M., Gauß J., Packhäuser C., **Lahnstein K.**, Schmehl T., Seeger W., Kissel T. and Gessler T. 2008.

Pulmonary drug delivery with aerosolizable nanoparticles in an ex vivo lung model. *Int. J. Pharm.* 367 (1-2), 169-178.

Packhaeuser C., **Lahnstein K.**, Sitterberg J., Schmehl T., Gessler T., Bakowsky U., Seeger W. and Kissel T. 2009.

Stabilization of aerosolizable nano-carriers by freeze-drying: effects on the physicochemical properties of aerosols and nano-carriers.

*Pharm. Res.* 26 (1), 129-138.

## Abstract

Gessler, T., **K. Lahnstein**, U. Rüsç, M. Rieger, W. Seeger and T. Schmehl. 2007. Pulmonary absorption of aerosolized fluorescent markers in an isolated lung model. *J. Aerosol Med.* 20 (2), 206-207 (P139).

## Patent

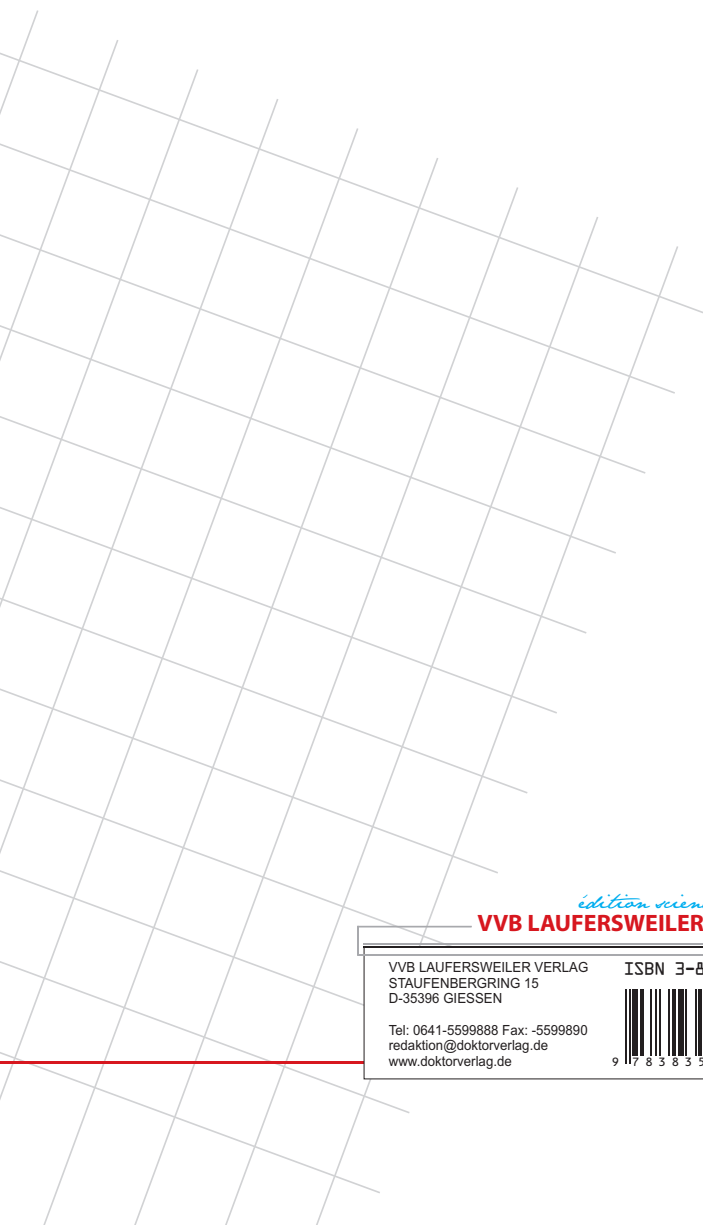
Schmehl T., Gessler T., **Lahnstein K.**, Kolb T., Hoffmann T., Scheuch G.

Systeme und Verfahren zur Applikation inhalierbarer Stoffe in ein Tierlungenmodell.

Patentanmeldung *DE 10 2008 050 218 A1*

## **Erklärung**

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



*édition scientifique*

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5562-4

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de



9 17838351955622