



Herstellung und Charakterisierung eines liposomalen Carriersystems für die inhalative Applikation von Sildenafil

LAURA SATTLER

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 2012

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.

1st Edition 2012

© 2012 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

www.doktorverlag.de

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

und

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

**Herstellung und Charakterisierung
eines liposomalen Carriersystems
für die inhalative Applikation von Sildenafil**

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

eingereicht von
Laura Sattler
Tierärztin aus Marburg

Gießen 2012

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

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

Tag der Disputation: 17.07.2012

*Schläft ein Lied in allen Dingen,
Die da träumen fort und fort,
Und die Welt hebt an zu singen,
Triffst du nur das Zauberwort.*

(Joseph Freiherr von Eichendorff)

INHALTSVERZEICHNIS..... I-III

1 EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT 1

2 LITERATURÜBERSICHT..... 3

2.1	Aerosol-Therapie.....	3
2.1.1	Behandlung respiratorischer Erkrankungen.....	3
2.1.2	Inhalative Verabreichung von Arzneimitteln bei Tieren.....	4
2.2	Liposomen.....	5
2.2.1	Phospholipide und Sterole.....	6
2.2.2	Bildung und Klassifizierung von Liposomen.....	8
2.2.3	Anwendungsmöglichkeiten von Liposomen.....	9
2.2.4	Liposomen zur pulmonalen Applikation.....	11
2.2.4.1	Liposomen als Retardformulierungen zur pulmonalen Applikation.....	14
2.2.4.2	Schicksal von Liposomen im Respirationstrakt.....	19
2.2.5	Einsatz von Liposomen in der Veterinärmedizin.....	20
2.3	Pulmonale arterielle Hypertonie.....	24
2.3.1	Einsatz von Sildenafil zur Behandlung der PAH.....	26
2.3.2	Pulmonale Hypertonie bei Tieren.....	28

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN..... 30

3.1	MATERIAL UND METHODEN.....	30
3.1.1	Substanzen und Lösungen.....	30
3.1.1.1	DPPC.....	30
3.1.1.2	Cholesterol.....	30
3.1.1.3	Rhodamin 6G.....	31
3.1.1.4	Sildenafil.....	31
3.1.1.5	Elektrolytlösungen.....	32
3.1.1.6	Albumin-Lösung.....	33
3.1.2	Vernebler.....	33
3.1.2.1	Aeroneb [®] Solo.....	33
3.1.2.2	Pari LC Sprint [®] Star.....	34
3.1.2.3	MicroSprayer [®]	34
3.1.3	Bestimmung der Aerosolpartikelgrößen.....	35
3.1.4	Verneblerleistung.....	36
3.1.5	Liposomen mit Rhodamin 6G.....	36
3.1.5.1	Herstellung der Liposomen.....	36
3.1.5.1.1	Filmmethode.....	37
3.1.5.1.2	Ethanolinjektions-Methode.....	38
3.1.5.1.3	Extrusion.....	39
3.1.5.1.4	Zentrifugation.....	39
3.1.5.6	Charakterisierung.....	40
3.1.5.6.1	Größenmessung.....	40
3.1.5.6.2	Bestimmung von Verkapselungseffizienz und Verkapselungsrate.....	40
3.1.5.6.3	Verneblungsstabilität.....	42
3.1.6	Nachweis von Sildenafil mittels HPLC.....	43
3.1.7	Untersuchungen zur Wiederfindung von Sildenafil.....	43
3.1.7.1	Sildenafil in Eppendorf-Reaktionsgefäßen.....	44
3.1.7.2	Sildenafil in Falcon Tubes.....	44
3.1.7.3	Sildenafil in Glasgefäßen mit Schläuchen.....	44

3.1.7.4 Clear C-FLEX [®] System	46
3.1.8 Liposomen mit Sildenafil	47
3.1.8.1 Herstellung der Liposomen	47
3.1.8.2 Verneblung mit Pari LC Sprint [®] Star und Microsprayer	47
3.1.8.3 Charakterisierung	49
3.1.8.3.1 Größenmessung	49
3.1.8.3.2 Bestimmung von Verkapselungseffizienz und Verkapselungsrate	49
3.1.8.3.3 Wiederfindung nach Verneblung	50
3.1.8.4 In vitro Freisetzungsversuche	50
3.1.8.5 Untersuchungen an der isolierten, ventilierten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge	51
3.1.8.5.1 Das Modell	51
3.1.8.5.2 Präparation, Perfusion und Ventilation der Lunge	52
3.1.8.5.3 Versuchsdurchführung	53
3.1.8.5.4 Aufbereitung der Proben und Lavagen	55
3.1.8.5.5 Berechnung der Stoffverteilung im Lungenmodell	55
3.1.9 Statistische Auswertung	56
3.2 ERGEBNISSE	57
3.2.1 Charakterisierung der Vernebler	57
3.2.1.1 Aerosolpartikelgrößen	57
3.2.1.2 Output	57
3.2.2 Liposomen mit Rhodamin 6G	58
3.2.2.1 Charakterisierung der Liposomen nach Extrusion und Verneblung	59
3.2.2.1.1 Verkapselungseffizienz	59
3.2.2.1.2 Wiederfindung nach Verneblung	59
3.2.2.1.3 Verkapselungsrate	60
3.2.2.1.4 Medianer Volumendurchmesser	62
3.2.2.2 Vergleich der Verneblereigenschaften des Aeroneb [®] Solo bei der Verneblung von R6G-Liposomen und isotoner Kochsalzlösung	63
3.2.2.2.1 Aerosolpartikelgrößen	63
3.2.2.2.2 Verneblungsdauer	64
3.2.2.2.3 Output	65
3.2.3 Ergebnisse zur Wiederfindung von Sildenafil	65
3.2.3.1 Sildenafil in Eppendorf-Reaktionsgefäßen	65
3.2.3.2 Sildenafil in Falcon Tubes	66
3.2.3.3 Sildenafil in Glasgefäßen mit Schläuchen	67
3.2.3.4 Clear C-FLEX [®] System	70
3.2.4 Liposomen mit Sildenafil	71
3.2.4.1 Charakterisierung der Liposomen nach Herstellung und Verneblung	71
3.2.4.1.1 Verkapselungseffizienz	72
3.2.4.1.2 Wiederfindung nach Verneblung	72
3.2.4.1.3 Verkapselungsrate	72
3.2.4.1.4 Medianer Volumendurchmesser	73
3.2.4.2 Eigenschaften von MicroSprayer [®] und Pari LC Sprint [®] Star bei Verneblung der Sildenafil-Liposomen im Vergleich zu Aqua dest./ NaCl	74
3.2.4.2.1 Aerosolpartikelgrößen Pari LC Sprint [®] Star	74
3.2.4.2.2 Output von MicroSprayer [®] und Pari LC Sprint [®] Star	74
3.2.4.3 Freisetzung aus den Sildenafil-Liposomen in vitro	76
3.2.4.3.1 Kontrolle Gesamtgehalt	76
3.2.4.3.2 Kinetik der Sildenafilfreisetzung aus den Liposomen	77

3.2.4.4	Substanzübertritt von freiem und liposomal verkapseltem Sildenafil am Modell der isolierten Kaninchenlunge	78
3.2.4.4.1	Deposition von Sildenafil in der Lunge nach MicroSprayer®-Verneblung	78
3.2.4.4.2	Übertrittskinetiken von Sildenafil ins Perfusat	79
3.2.4.4.3	Wiederfindung des in der Lunge deponierten Sildenafils	81
4	<i>DISKUSSION</i>	82
4.1	KRITISCHE BETRACHTUNG DER METHODEN	82
4.1.1	Verwendung von DPPC und Cholesterol zur Herstellung der Liposomen	82
4.1.2	Verwendung von R6G zur Herstellung und Charakterisierung von Liposomen	84
4.1.3	Methoden zur Herstellung der Liposomen mit R6G	85
4.1.4	Herstellung von Liposomen mit Sildenafil	86
4.1.5	Verneblung der Liposomen mit verschiedenen Verneblern	87
4.1.6	Inhalative Applikation von Sildenafil	90
4.1.7	Das Modell der isolierten, ventilerten, perfundierten Kaninchenlunge	91
4.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	96
4.2.1	Liposomen mit R6G	96
4.2.1.1	Charakterisierung der R6G-Liposomen nach Extrusion und nach Verneblung	96
4.2.1.2	Verneblereigenschaften bei der Verneblung der R6G-Liposomen	97
4.2.2	Wiederfindung von Sildenafil und Auswahl eines geeigneten Schlauchmaterials	99
4.2.3	Liposomen mit Sildenafil	101
4.2.3.1	Charakterisierung der Liposomen vor und nach Verneblung	101
4.2.3.2	Verneblereigenschaften bei der Verneblung der Sildenafil-Liposomen	103
4.2.3.3	In vitro Freisetzungsversuche	104
4.2.3.4	Substanzübertritt am Modell der isolierten Kaninchenlunge	106
5	<i>ZUSAMMENFASSUNG</i>	111
6	<i>SUMMARY</i>	113
7	<i>LITERATURVERZEICHNIS</i>	115
8	<i>ANHANG</i>	130
8.1	Abkürzungen	130
8.2	Abbildungsverzeichnis	133
8.3	Tabellenverzeichnis	135
8.4	Materialverzeichnis	137
8.4.1	Substanzliste	137
8.4.2	Geräteliste	138
8.4.3	Verbrauchsmaterialien und sonstiges	140

1 EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Die pulmonale arterielle Hypertonie (PAH) ist eine fortschreitende Erkrankung des Menschen, die durch einen erhöhten pulmonalarteriellen Druck charakterisiert ist, der zu Rechtsherzversagen führt (Chin und Rubin 2008). Die Pathogenese der PAH ist komplex und unvollständig verstanden, sie beinhaltet aber sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren, die die pulmonale vaskuläre Struktur und Funktion verändern (Badesch et al. 2007). Der Anstieg des pulmonalen Gefäßwiderstandes wird durch eine Kombination aus verschiedenen Mechanismen bedingt, zu denen Vasokonstriktion, proliferatives und obstruktives Remodelling der pulmonalen Gefäßwände, Entzündung und Thrombose gehören (Galié et al. 2009). Das rechte Herz passt sich dem erhöhten pulmonalarteriellen Druck bis zu einem gewissen Grad an, schließlich kommt es aber zu einer Überlastung des rechten Ventrikels mit nachfolgender Hypertrophie, Dilatation, eventuell Rechtsherzversagen und damit zum Tod (Olschewski et al. 2001; Galié et al. 2009).

Die PAH ist eine chronische Erkrankung, die nicht geheilt werden kann (Olschewski et al. 2007; Chin und Rubin 2008; Galié et al. 2009). Durch eine supportive und medikamentelle Mono- oder Kombinationstherapie können aber Symptome, körperliche Belastbarkeit und Lebenserwartung der Patienten signifikant verbessert und eine klinische Verschlechterung verzögert werden (McLaughlin 2002; McLaughlin et al. 2006; Olschewski et al. 2007; Galié et al. 2009). Arzneimittel, die zur Behandlung der PAH eingesetzt werden, umfassen Kalziumkanalblocker, Prostanoiden, Endothelinrezeptor-Antagonisten und Phosphodiesterase (PDE)-Typ-5 Inhibitoren. Sie alle zeigen vasodilatative Effekte in der Lunge und alle außer den Kalziumkanalblockern haben auch antiproliferative Eigenschaften (Chin und Rubin 2008).

NO, ein potenter Vasodilatator, spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation des pulmonalen Gefäßtonus. Sildenafil, ein oral zu verabreichender Phosphodiesterase (PDE)-5-Inhibitor, zielt auf den Stickstoffmonoxid (NO)-Weg ab, indem es Effekte verstärkt, die der NO-vermittelten Initiierung der Vasodilatation nachgeschaltet sind (Ramani und Park 2010). Sildenafil ist seit 2005 unter dem Handelsnamen Revatio[®] (Pfizer) zur oralen Behandlung der PAH zur Verbesserung der Leistungsfähigkeit zugelassen (Ramani und Park 2010; Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft 2009). Nach oraler Einnahme liegt die Bioverfügbarkeit von Sildenafil nur bei ca. 41 % (Nichols et al. 2002; Sheu et al. 2003). Ein maximaler Effekt tritt erst nach 60 Minuten ein (Ghofrani et al. 2004c) und trotz der pulmonalen Selektivität des Wirkstoffs (Michelakis et al. 2003; Barnett und Machado 2006)

konnte bei Versuchen mit Schafen bei höheren Dosen auch eine unerwünschte Senkung des systemischen arteriellen Druckes beobachtet werden (Weimann et al. 2000).

Daraus ergibt sich die Überlegung, den Wirkstoff durch Inhalation direkt in die Lunge zu verbringen. Der Vorteil der Inhalationstherapie besteht darin, dass hohe lokale Wirkstoffkonzentrationen bei minimalen systemischen Nebeneffekten erreicht werden. Außerdem wird durch die Inhalation ein schneller Wirkungseintritt erzielt (Le Brun et al. 2000; Khilnani und Banga 2008).

Bei einer tierexperimentellen Studie mit Schafen mit induzierter pulmonaler Hypertonie konnte durch die Inhalation von vernebeltem freiem Sildenafil eine innerhalb von zwei Minuten nach der Inhalation einsetzende selektive Senkung des pulmonalarteriellen Druckes (pulmonary artery pressure, PAP) erzielt werden. Ein Nachteil war aber die kurze Wirkdauer. Der PAP stieg nach Beendigung der Inhalation innerhalb weniger Minuten wieder auf den Ausgangswert (Ichinose et al. 2001). Mit Controlled Release-Formulierungen, wie zum Beispiel Liposomen, kann die Wirkdauer von Medikamenten in der Lunge verlängert werden (Shek et al. 1994; Zeng et al. 1995).

Ziel dieser Arbeit war es daher, eine liposomale Formulierung des lipophilen PDE 5-Inhibitors Sildenafil herzustellen und diese hinsichtlich ihrer Eignung als Controlled Release-Formulierung zur pulmonalen Applikation zu untersuchen. Hierfür wurden zunächst Liposomen mit einer einfach nachweisbaren Modellsubstanz, dem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G, nach vier Methoden hergestellt. Die Vesikel wurden hinsichtlich ihrer Farbstoffbeladung, Größe und Verneblungsstabilität untersucht. Die Methode, die am besten zur Herstellung der Liposomen geeignet war, wurde gewählt und weiter optimiert, um Liposomen mit Sildenafil herzustellen. Nach Charakterisierung und Prüfung ihrer Verneblungsfähigkeit wurde die Sildenafilfreisetzung aus den Liposomen in vitro und am Modell der isolierten, ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge getestet.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Aerosol-Therapie

2.1.1 Behandlung respiratorischer Erkrankungen

Dass die Inhalation den schlüssigen therapeutischen Ansatz zur Behandlung respiratorischer Erkrankungen darstellt, ist schon lange bekannt. Bereits vor 4000 Jahren wurden in Indien Blätter der Pflanze *Atropa belladonna*, die eine Form des Bronchodilatators Atropin enthalten, als Hustenmittel geraucht (Grossman 1994). Inhalation von Seeluft, heißen Dämpfen und Aerosolen waren Heilmethoden, die Hippokrates (ca. 460 v. Chr. bis ca. 370 v. Chr.) zur Behandlung von obstruktiven Lungenerkrankungen einsetzte. In der Zeit der industriellen Revolution wurden wahrscheinlich erstmals „Asthma-Zigaretten“ (Gonda 2000) eingesetzt. Diese enthielten Stramonium aus dem weißen Stechapfel (*Datura stramonium*). In der 2. Hälfte des 20. Jahrhunderts wurden schließlich zahlreiche effektive Medikamente zur Behandlung von Asthma in handlichen Verneblersystemen entwickelt, sodass die direkte Verabreichung von Arzneistoffen in die Lunge zur Therapie von respiratorischen Erkrankungen immer wichtiger wurde (Gonda 2000). In den letzten 20 Jahren wurden weitere Fortschritte in der Aerosolforschung gemacht, was zu einem besseren Verständnis der Mechanismen geführt hat, die der Partikelinhalation und der pulmonalen Partikeldeposition zugrunde liegen (Scheuch et al. 2006). So können inzwischen viele respiratorische Erkrankungen über Aerosole behandelt werden. Am weitesten verbreitet ist die Verneblung von Bronchodilatoren und Antiinflammatorika zur Behandlung von obstruktiven Lungenerkrankungen wie Asthma und COPD. Durch hohe lokale Wirkstoffkonzentrationen wird eine maximale Wirksamkeit bei minimalen systemischen Nebeneffekten erreicht. Außerdem wird durch die Inhalation ein schneller Wirkungseintritt erzielt (Khilnani und Banga 2008). Weitere Beispiele für Medikamente, die in Form von Aerosolen zur topischen Therapie von Lungenerkrankungen eingesetzt werden können, sind Antibiotika (Lambros et al. 1997; Klepser 2004; Traini und Young 2009; Falagas et al. 2010), antivirale Medikamente, Immunsuppressiva, Vaccinen, Surfactant, Proteasen und Prostaglandine (Zeng et al. 1995; Groneberg et al. 2003) sowie Antioxidantien (Borok et al. 1991; Buhl und Vogelmeier 1994; Prousky 2008) und Cytostatika (Juliano und McCullough 1980). Bei der Genterapie von pulmonalen Erkrankungen, zum Beispiel von Lungenkrebs oder cystischer Fibrose, handelt es sich um eine weitere medizinisch interessante Anwendungsmöglichkeit (Laube 2005).

2.1.2 Inhalative Verabreichung von Arzneimitteln bei Tieren

Laut Lehrbuch können zur inhalativen Behandlung von Pferden Ultraschall-, Piezo- und Düsenvernebler sowie die für die Humanmedizin entwickelten Dosiersprays zur Inhalation eingesetzt werden, um Wirkstoffe in die Bronchioli zu verbringen. Der große Vorteil dieser Applikationsart besteht in der im Vergleich zur systemischen Gabe oftmals möglichen Dosisreduktion und damit im geringeren Risiko unerwünschter Arzneimittelwirkungen. Dies ist vor allem bei der langfristigen Applikation von Glukokortikoiden interessant. Weiter mögliche Einsatzgebiete von Aerosolen sind parasympholytisch wirksame Bronchodilatoren und in einzelnen Fällen evtl. die Mastzellstabilisatoren Cromoglycinsäure oder Nedocromil zur Behandlung der equinen chronisch obstruktiven Bronchitis (Fey 2006).

Ein Nachteil der Inhalationstherapie besteht darin, dass ein Teil der inhalativ verabreichten Wirkstoffe resorbiert wird, sei es über die Mukosa der Atemwege oder nach Abschlucken von Tracheobronchialsekret über den Magen-Darm-Trakt. In der Humanmedizin wird versucht, Fehlapplikationen durch ein Training der sich selbst behandelnden Patienten möglichst gering zu halten, indem die Betroffenen lernen, in welcher Phase der Einatmung sie das Aerosol aus dem Dosierer freigeben müssen. Da dies bei Pferden ebenso wenig möglich ist wie eine Inhalation über die Mundhöhle, muss regelmäßig mit Fehlapplikationen und somit mit einem Verlust an Aerosol und damit einer Dosierungsungenauigkeit gerechnet werden (Fey 2006).

Weiterhin muss bei der inhalativen Verabreichung von Arzneimitteln an Pferde beachtet werden, dass mit einer Kontamination der Luft in der Nähe des Patienten zu rechnen ist, da diverse Masken und Aerosolapplikatoren, die auf dem Markt erhältlich sind, in der Regel nicht dicht am Pferdekopf abschließen. Außerdem weist die Ausatemluft regelmäßig noch erhebliche Substratkonzentrationen auf. Unproblematisch ist hingegen die inhalative Verabreichung von isotonen Salzlösungen. Sie entfalten auf der Bronchialschleimhaut eine osmotische Wirkung, so dass über das Bronchialepithel Wasser in das Bronchiallumen ausgeschieden wird (Fey 2006).

Bei Katzen können Glukokortikoide wie beispielsweise Fluticasonpropionat mittels Dosieraerosolgeräten (Dosierzerstäuber, metered dose inhalator, MDI) mit Zwischenstück direkt in den Atemwegen appliziert werden. Vorteile sind auch hier die geringeren systemischen Nebenwirkungen sowie die im Vergleich zur Tabletteneingaben bei vielen Katzen einfachere Applikation. Alternativ ist eine speziell für Katzen entwickelte Inhalationsmaske erhältlich. Beim Auslösen des MDI gelangt das Aerosol in den eingebauten Spacer (Hawkins 2010). Spacer stellen einen Raum dar, in dem das vom MDI abgegebene Aerosol aufgefangen wird. Von dort aus wird es dann vom Patienten inhaliert. Dies hat den

Vorteil, dass Aerosolerzeugung und Inhalation nicht exakt koordiniert werden müssen. Außerdem wird bei der Passage durch den Spacer die Geschwindigkeit und die Partikelgröße des Aerosols reduziert, wodurch ein größerer Anteil in die peripheren Regionen der Lunge gelangt. Schließlich werden durch einen Spacer größere Aerosolpartikel abgefangen, die sonst im Oropharynx deponieren würden. Dadurch werden Nebenwirkungen und lokale Irritationen in diesem Bereich reduziert (Lavorini und Fontana 2009). Nach dem Auslösen des MDI wird die Maske sofort vor das Gesicht der Katze gehalten, sodass Nase und Maul vollständig bedeckt sind. Die nächsten sieben bis zehn Atemzüge sollte die Maske so verbleiben, um zu gewährleisten, dass möglichst viel des im Spacer enthaltenen Aerosols eingeatmet wird und der Wirkstoff in die Atemwege gelangt. Bei akuter Atemnot können auch Bronchodilatoren via MDI als Notfalltherapie zum Einsatz kommen (Hawkins 2010).

Durch die Verneblung von Kochsalzlösung kann auch bei Hunden und Katzen mit Pneumonie eine Befeuchtung der Atemwege erreicht werden (Hawkins 2010).

2.2 Liposomen

Am „Institute of Animal Physiology“ in Babraham bei Cambridge (Großbritannien) haben sich zahlreiche Forscher aus unterschiedlichen Bereichen ausführlich mit der Geschichte, den Eigenschaften und den Einsatzmöglichkeiten von Liposomen beschäftigt. Eine poetische Beschreibung der Vesikel hat Gregory Gregoriadis in *Liposome Letters* verfasst (Bangham 1993):

“Little fatty vesicles of bilayer fame
protean and elusive, fragile all the same,
aloof and enigmatic beneath your many skins,
unyielding to the vigour of thousands of spins,
descended from the pasture of Babraham we are told,
you never ceased to wrinkle, expand and then to fold
embracing sodium ions and such electrolytes.
Twinkling guide stars to throngs of acolytes
desirous of your membranous semi-barriers.
Precursors of bion, potential drug carriers.”

2.2.1 Phospholipide und Sterole

Liposomen wurden erstmals 1965 beschrieben (Bangham et al. 1965). Es handelt sich dabei um (sub-)mikroskopische Vesikel, deren Durchmesser im Bereich von 20 nm bis zu 10 µm liegen kann. Sie entstehen spontan, wenn Phospholipide in wässriger Phase gelöst werden. Dabei entstehen Vesikel aus einer oder mehreren Lipid-Doppelschichten, die ein wässriges Kompartiment einschließen (Ulrich 2002).

Die Lipid-Doppelschichten ähneln biologischen Membranen. Die am häufigsten zur Herstellung von Liposomen eingesetzten Lipide sind Phospholipide, die in komplexer Mischung die Hauptbestandteile der Zellmembranen von Tieren, Pflanzen und Bakterienzellen darstellen. Liposomen werden meist nur aus einem einzigen Phospholipid oder einer Mischung aus zwei bis drei Phospholipiden hergestellt. Phospholipide zeichnen sich dadurch aus, dass sie eine hydrophile oder polare Kopfgruppe und einen hydrophoben Schwanz haben, sie sind also amphiphil. Die allgemeine chemische Struktur der Phospholipide ist in Abb. 1 dargestellt. Die polare Gruppe besteht aus einem GlycerinGrundgerüst, dessen dritte Hydroxylgruppe mit einem Phosphorsäurerest verestert ist. Eine der übrigen Sauerstoffgruppen der Phosphorsäure kann weiter verestert sein mit unterschiedlichen organischen Molekülen wie Glycerin, Cholin, Ethanolamin, Serin oder Inositol. Die Hydroxylgruppen an Position 1 und 2 des Glycerins sind mit langkettigen Fettsäuren verestert, die aus 10 bis 24 Kohlenstoffatomen mit 0 bis 6 Doppelbindungen bestehen, wobei die Länge der Ketten und die Anzahl der Doppelbindungen entscheidende Einflüsse auf die Eigenschaften der Phospholipide haben (Kulkarni et al. 1995; Vemuri und Rhodes 1995).

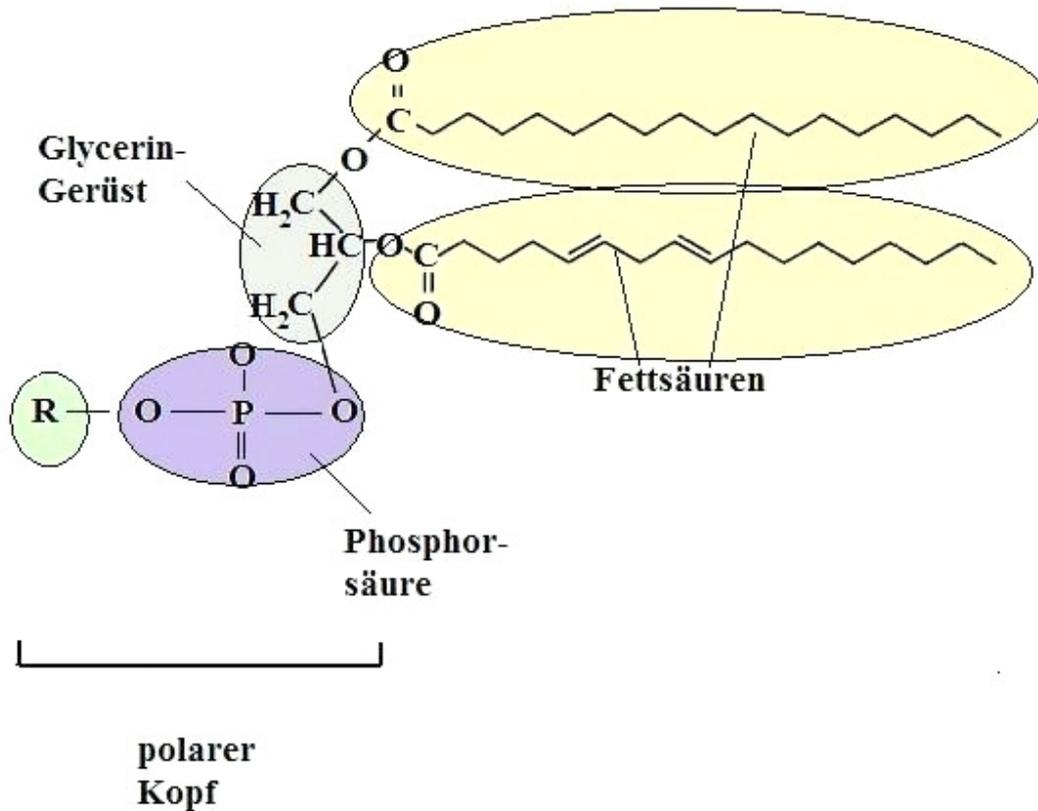


Abb. 1: Schematischer Aufbau eines Phospholipids (modifiziert aus Vemuri und Rhodes 1995)

Durch Variationen der Kopfgruppe und der Fettsäuren ergeben sich viele verschiedene Phospholipide, sowohl natürliche als auch synthetische, die zur Herstellung von Liposomen genutzt werden können. Man kann zwischen kationischen, anionischen und neutralen Lipiden unterscheiden, wobei die Wahl der einzusetzenden Lipide von der zu verkapselnden Substanz und dem therapeutischen Ziel abhängt. Kationische Lipide werden oft bei der Gentherapie eingesetzt, anionische und neutrale Lipide finden Verwendung bei der Herstellung von wirkstoffbeladenen Vesikeln (Sharma und Sharma 1997), wobei neutrale und positiv geladene Liposomen nach intravenöser Applikation den Vorteil haben, dass sie weniger schnell aus dem Blut entfernt werden (Juliano und Stamp 1975; Gregoriadis und Davis 1979).

Zusätzlich zu den Phospholipiden wird auch oft Cholesterol in unterschiedlichen Mengen zur Herstellung von Liposomen verwendet, um die Membranstabilität zu verbessern. In Zellmembranen von Säugetieren ist Cholesterol das am häufigsten vorkommende Sterol (Demel und de Kruffy 1976). Durch die Inkorporation von Cholesterol in die Membran von Liposomen wird die Dichte der Fettsäureketten erhöht und ihre Mobilität reduziert. Dadurch wird die Permeabilität wasserlöslicher Moleküle durch die Membran reduziert. Die Abnahme

der Permeabilität ist in der Regel proportional zur Cholesterolkonzentration (Demel und de Kruffyff 1976; Sharma und Sharma 1997; Barenholz 2001; Kraske und Mountcastle 2001). Außerdem verbessert Cholesterol die Stabilität der Membran in Gegenwart biologischer Flüssigkeiten wie Blut oder Plasma (Gregoriadis und Davis 1979; Kirby et al. 1980; Damen et al. 1981).

2.2.2 Bildung und Klassifizierung von Liposomen

Wenn Phospholipide in ein wässriges Medium gebracht werden, lagern sich die Fettsäureketten einander an, wodurch das Wasser aus dieser hydrophoben Region ausgeschlossen wird. Die hydrophilen Interaktionen der Phospholipid-Kopfgruppen mit Wasser führen zur Bildung von Lipid-Doppelschichten in Form von multi- oder unilamellaren Systemen, sogenannten Vesikeln (Lasic 1988; Vemuri und Rhodes 1995). Diese Interaktionen macht man sich bei der erstmals von Bangham 1965 beschriebenen, auch in der eigenen Arbeit angewendeten Filmmethode zunutze (Bangham et al. 1965). Dabei werden die Phospholipide in einem organischen Lösungsmittel gelöst, dann unter Vakuum getrocknet und der so entstandene dünne Lipidfilm schließlich unter Rühren oberhalb der Phasenübergangstemperatur der Lipide hydriert. Dabei entstehen große multilamellare Vesikel (MLV) mit sehr heterogener Größenverteilung und Lamellenanzahl, die bei Bedarf durch unterschiedliche Methoden wie Ultraschallbehandlung oder Extrusion durch Polycarbonatfilter weiterbehandelt werden können, um uniforme Liposomen zu erhalten (Ulrich 2002).

Für die Klassifizierung der Liposomen stehen drei verschiedene Nomenklaturen zur Verfügung (Vemuri und Rhodes 1995). So können Liposomen beschrieben werden anhand

- ihrer Größe: SUV (small unilamellar vesicles) sind ca. 0,025 – 0,05 µm groß, LUV (large unilamellar vesicles) ca. 0,1 µm;
- der Anzahl der Lipiddoppelschichten: MLV (multilamellare Vesikel), die ca. 0,05 – 10 µm groß sind und ULV (unilamellare Vesikel) mit einer Größe von ca. 0,025 – 0,1 µm;
- der Herstellungsmethode: z. Bsp. REV (reversed-phase evaporation vesicle, ca. 0,5 µm groß), FPV (French press vesicle, ca. 0,05 µm groß), EIV (ether injection vesicle, ca. 0,2 µm groß). Dieses Klassifizierungsmerkmal ist weniger gebräuchlich als die beiden anderen.

2.2.3 Anwendungsmöglichkeiten von Liposomen

Nach der zufälligen Entdeckung der Liposomen wurde schon bald ihr potentieller Nutzen als Vehikel zur systemischen Medikamentenapplikation erkannt und kontinuierlich weiter erforscht (Sessa und Weissmann 1968; Gregoriadis 1976; Lasic 1998). In den 1970er Jahren entstand erstmals die Idee, dass Liposomen als Medikamententräger genutzt werden können, um den therapeutischen Index von Medikamenten zu modifizieren, indem deren Toxizität reduziert und/ oder ihre Effizienz erhöht wird. Intensive Forschung in den 80er und 90er Jahren (Übersicht bei Gregoriadis 2008) brachte ein detaillierteres Verständnis, das zu Liposomen mit erhöhter Stabilität *in vitro* und *in vivo*, verbesserter Biodistribution und optimierter Verweildauer der Liposomen im Organismus führte (Lian und Ho 2001). Die vielversprechenden Ergebnisse gaben Anlass zu weiteren Untersuchungen (allein im Jahr 2003 wurden fast 2000 paper und 150 reviews über Liposomen veröffentlicht, s. Torchilin 2005), sodass heute liposomale Formulierungen für eine Reihe von Wirkstoffen zur Verfügung stehen, vor allem für Chemotherapeutika, Antibiotika und Impfstoffe (Lasic 1998). Der Einsatz von Liposomen in der Medizin eröffnet vielfältige therapeutische Möglichkeiten, von denen hier die wichtigsten genannt werden sollen (Kulkarni et al. 1995; Sharma und Sharma 1997; Lasic 1998; Goyal et al. 2005):

- durch die Verkapselung von Medikamenten in Liposomen können unerwünschte Arzneimittelwirkungen auf gesundes Gewebe vermieden und so Nebenwirkungen der Therapie minimiert werden;
- durch die unterschiedlichen Kompartimente können sowohl hydrophile (im inneren wässrigen Kompartiment) als auch lipophile Substanzen (in der Lipidschicht) verkapselt werden (s. Abb. 2);
- die physikochemischen Eigenschaften der Liposomen können verändert werden, sodass sowohl geladene als auch ungeladene Stoffe aufgenommen werden können;
- Liposomen werden aus natürlichen Bestandteilen hergestellt. Sie sind also bioabbaubar, wenig immunogen und zeigen höchstens eine geringe systemische Toxizität;
- für unterschiedliche Anwendungsbereiche können verschiedene Größen der Liposomen hergestellt werden;
- durch die liposomale Verkapselung von Medikamenten kann eine kontrollierte und verzögerte Arzneimittelfreisetzung und außerdem ein Schutz der Medikamente vor zu schnellem Abbau erzielt werden;

- ein Targeting, zum Beispiel über Antikörper auf der Liposomenmembran, erlaubt eine gezielte Ansprache von erkrankten Geweben und eine erhöhte Aufnahme der Vesikel durch die Zielzellen unter Schonung des Gesamtorganismus (s. Abb. 2);
- die Verweildauer der Liposomen und somit der Medikamente im Blut oder anderen Kompartimenten des Körpers kann durch Oberflächenmodifikationen der Liposomen, z. B. durch Anlagerung von Polyethylenglykol (PEG), verlängert werden (s. Abb. 2).

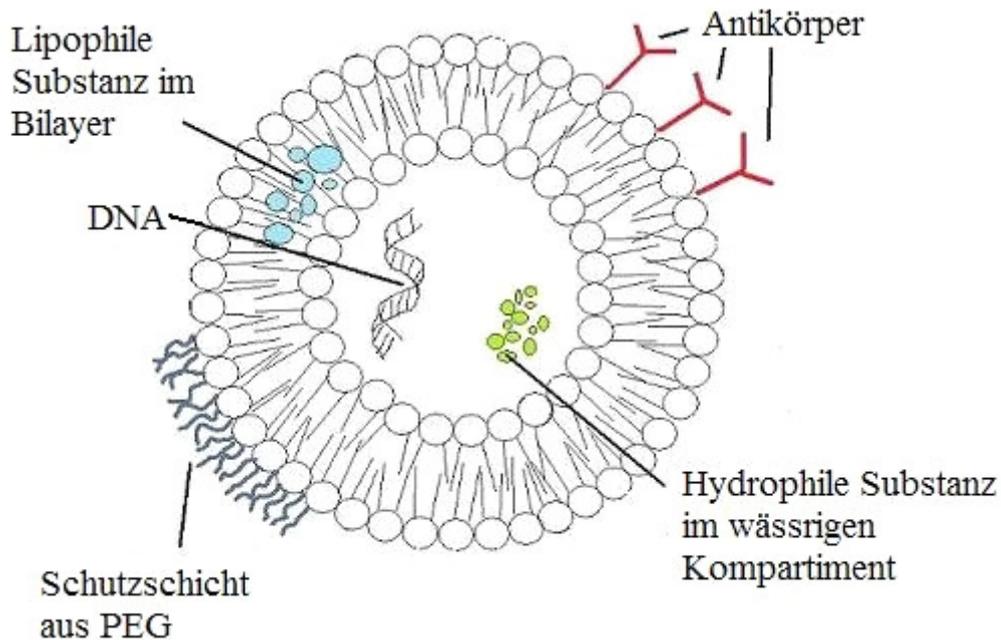


Abb. 2: Modellhafte Darstellung der Verkapselung einiger Substanzen in unterschiedlichen Kompartimenten eines unilamellaren Liposoms sowie verschiedener Möglichkeiten der Oberflächenmodifikation. PEG: Polyethylenglykol

Nachteile des Systems können u.a. sein:

- Freisetzung der verkapselten Substanzen während der Lagerung,
- langsame Freisetzung und Absorption, wodurch der Wirkungseintritt verzögert werden kann,
- Schwierigkeit einer genauen Dosierung,
- Aufnahme der Liposomen durch das retikuloendotheliale System,
- Variationen zwischen einzelnen Chargen,
- Probleme bei der Herstellung großer Mengen und bei einer eventuell notwendigen Sterilisation.

Durch die große Variabilität der Liposomen in Bezug auf Lipidzusammensetzung, Größe, Ladung, Verkapselung unterschiedlichster Substanzen und vielfältiger Modifikationen der Oberfläche können die Vesikel Anforderungen erfüllen, die verschiedene Applikationsformen stellen. So können liposomale Formulierungen inhalativ, intravenös, transdermal oder oral angewendet werden (Ulrich 2002). Im Folgenden wird schwerpunktmäßig die für die eigene Arbeit relevante inhalative Verabreichung der Liposomen näher betrachtet.

2.2.4 Liposomen zur pulmonalen Applikation

Die pulmonale Verabreichung von Liposomen als Aerosol kann sowohl bei respiratorischen Erkrankungen als auch zur systemischen Therapie zum Einsatz kommen. Liposomen sind eines der am intensivsten erforschten Systeme zur kontrollierten Verabreichung von Medikamenten in die Lunge.

Eines der ersten pharmazeutischen Produkte auf Liposomenbasis, die auf den Markt kamen, war das Alveofact[®] (Dr Karl Thomae GmbH, Biberach, Deutschland), ein synthetisches Lungensurfactant zur pulmonalen Instillation zur Behandlung des Respiratory-Distress-Syndroms (RDS) (Müller et al. 2000). Durch die Verkapselung von Wirkstoffen in Liposomen soll ihre pulmonale Anwendbarkeit verbessert werden. Untersucht wurde dies zum Beispiel mit Zytostatika, Bronchodilatoren, antimikrobiellen und antiviralen Medikamenten, Antiasthmatica, Antioxidantien und Substanzen mit systemischer Wirkung (Zeng et al. 1995; Salama et al. 2009). Die inhalative Therapie infektiöser, immunologischer und genetischer Erkrankungen der Lunge hat gegenüber systemischer Behandlung den Vorteil, dass die pulmonale Deposition der Wirkstoffe systemische Nebeneffekte deutlich reduzieren kann (Schreier 1994). Grundsätzliche Schwierigkeiten der inhalativen Applikation bestehen aber darin, dass

- Patienten trainiert werden müssen, um das Atmen und die Inhalation der Aerosole koordinieren zu können;
- viele Wirkstoffe durch eine schnelle Elimination aus der Lunge eine kurze Wirkdauer haben. Dies macht ein häufiges Nachdosieren nötig, was wiederum oft für systemische Nebeneffekte verantwortlich ist;
- einige schlecht wasserlösliche Medikamente lokale Irritationen und Entzündungen der Luftwege verursachen können oder eine Anwendung als Aerosol ganz ausschließen;
- intrazelluläre Pathogene durch unzureichende cytosolische Penetration nur schwer erreicht werden können.

Durch Liposomen können einige dieser Probleme, die bei der Verabreichung konventioneller Aerosole auftreten, reduziert werden, da Liposomen

- für eine relativ uniforme Verteilung der Wirkstoffe in den Alveolen sorgen;
- als Lösungsmatrix für schlecht lösliche Substanzen dienen können;
- ein pulmonales Reservoir für verzögerte Freisetzung sein können;
- die intrazelluläre Aufnahme von Medikamenten, vor allem in Alveolarmakrophagen, erleichtern können.

Somit können

- lokale Irritationen des Lungengewebes verhindert und eine pulmonale Toxizität reduziert;
- lokal länger therapeutische Wirkstoffspiegel erhalten und die Behandlungsfrequenz reduziert sowie
- höhere intrazelluläre Wirkstoffkonzentrationen erzeugt werden (Schreier et al. 1993; Mansour et al. 2009).

Bevor liposomale Aerosole als Vehikel für den Arzneimitteltransport für klinische Zwecke genutzt werden können, musste natürlich gezeigt werden, dass die Vehikel selbst ungefährlich sind. Auch wenn davon ausgegangen werden kann, dass die Inhalation von Liposomen nicht toxisch ist, da das Phospholipid Dipalmitoyl-Phosphocholin (DPPC), das häufig für die Herstellung von Liposomen verwendet wird, ungefähr 70-80% des natürlichen Surfactantpools darstellt, könnte die langfristige Inhalation von Liposomen theoretisch zu unerwünschten Wirkungen führen. Durch die exogenen Phospholipide können zum Beispiel Lipidpneumonien, Zellschädigungen (Peroxidation mit der Produktion freier Fettsäuren), schädliche Auswirkungen auf die Luftwege (Bronchospasmen) oder Suppression von Alveolarmakrophagen ausgelöst werden (Myers et al. 1993). Daher haben sich zahlreiche Studien mit den akuten und chronischen Auswirkungen von Liposomen bzw. liposomalen Aerosolen auf Zellen, Tiere oder Menschen befasst.

In einer Studie wurde die *in vitro* Toxizität von Liposomen und ihre funktionellen und morphologischen Interaktionen mit Lungenalveolarmakrophagen von Ratten untersucht, indem die Alveolarmakrophagen 1 bis 24 Stunden lang unterschiedlichen Konzentrationen von Liposomen (1 bis 10 μmol) ausgesetzt wurden. Dabei konnten keine schädlichen Auswirkungen der Liposomen auf die Makrophagen in Bezug auf die untersuchten Parameter

Viabilität, Phagocytose- und Tötungsaktivität festgestellt werden (Gonzalez-Rothi et al. 1991).

Diese Beobachtungen konnten in tierexperimentellen Studien bestätigt werden. Dabei inhalierten Mäuse für eine Stunde am Tag fünf Tage pro Woche über einen Zeitraum von vier Wochen Liposomen oder Salzlösung. Es zeigten sich keine negativen Auswirkungen auf die Gesundheit oder das Überleben der Tiere, keine histopathologischen Veränderungen der Lungen und keine Veränderungen in Funktion oder Morphologie der Alveolarmakrophagen (Myers et al. 1993). Eine andere tierexperimentelle Untersuchung befasste sich mit den Auswirkungen von inhalierten liposomalen Aerosolen auf Lungenfunktion und Blutgase. Die Forscher ließen Schafe 30 Minuten lang über einen Tracheotubus Liposomen mit unterschiedlicher Lipidzusammensetzung bzw. Salzlösung als Kontrolle inhalieren und analysierten dabei die dynamische Compliance der Lunge, die Lungenresistance sowie die Blutgase (p_{aO_2} und p_{aCO_2}). Während des gesamten Beobachtungszeitraums von sechs Stunden post inhalationem blieben alle Parameter im normalen physiologischen Bereich (Schreier et al. 1992).

Auch zur Wirkung von liposomalen Aerosolen bei Menschen gibt es Untersuchungen. Bei fünf Freiwilligen, die eine Stunde lang Liposomen inhaliert hatten, die die antivirale Substanz Enviroxim enthielten, konnten keine ungünstigen Effekte beobachtet werden (Gilbert et al. 1988). In einer anderen Studie mit zehn Freiwilligen, die eine Stunde lang Liposomen ohne Wirkstoffe inhalierten, konnte gezeigt werden, dass Lungenfunktion und Allgemeinbefinden durch die Inhalation nicht beeinträchtigt wurden (Thomas et al. 1991). Eine weitere Untersuchung zeigte an gesunden Freiwilligen, dass die Inhalation von mit Beclomethason beladenen Liposomen, die aus dem Phospholipid Dilauroyl-Phosphatidylcholin (DLPC) hergestellt worden waren, gut toleriert wurde und keine pulmonalen oder systemischen Nebeneffekte auftraten (Waldrep et al. 1997). Bei gesunden Freiwilligen, die Amikacin-haltige Liposomen inhalierten, die mit ^{99m}Tc markiert waren, konnten keine signifikanten Veränderungen in Labor-, Vital- oder Lungenfunktionsparametern der Probanden festgestellt werden (Weers et al. 2009).

In weiteren Studien konnten sogar positive Effekte der liposomalen Verkapselung von Wirkstoffen in Bezug auf Verträglichkeit und Wirkdauer im Vergleich zum freien Wirkstoff nachgewiesen werden. Eine Studie zeigte, dass die liposomale Formulierung des Virostatikums Enviroxim 10 bis > 50-fach weniger toxisch auf Zellen aus Gewebekulturen gewirkt hat als freies Enviroxim. Dabei zeigten sich in vivo keine histopathologischen Veränderungen in Lungen von Mäusen, die 24 bzw. 72 Stunden vorher mit vernebelten leeren

bzw. Enviroxim-haltigen Liposomen behandelt worden waren (Wyde et al. 1988). Eine andere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass all-trans-Retinsäure (all-trans-retinoic acid, ATRA), die zur Krebstherapie eingesetzt wird, in liposomal verkapselter Form von Mäusen in deutlich höherer Konzentration toleriert wird als der freie Wirkstoff. Außerdem wurde durch die Verkapselung der zelluläre und mikrosomale Metabolismus von ATRA reduziert. Nach ein- oder mehrfacher Behandlung der Mäuse mit liposomalem ATRA wurden keine makro- oder mikroskopischen Veränderungen der Lunge festgestellt, und auch die Leberfunktionstests waren unauffällig. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass liposomales ATRA im Vergleich zur freien Form nicht toxisch ist (Parthasarathy et al. 1999).

Obwohl sich die meisten Untersuchungen auf eine kurzzeitige bzw. einmalige Anwendung von Liposomen beschränken, bestätigt zumindest die tierexperimentelle Studie, die über einen Zeitraum von vier Wochen durchgeführt wurde (Myers et al. 1993) die Behauptung von Schreier et. al., dass die pulmonale Applikation von Liposomen auch bei langfristiger Anwendung ungefährlich ist (Schreier et al. 1993).

2.2.4.1 Liposomen als Retardformulierungen zur pulmonalen Applikation

Die Inhalation von vernebelten Medikamenten ist eine gängige Methode zur Behandlung pulmonaler Erkrankungen. Da die Wirkdauer der Medikamente aber oft relativ kurz ist, sind häufig mindestens drei bis vier Inhalationen pro Tag nötig. Bei der Behandlung der pulmonalen Hypertonie mit Iloporost-Aerosolen sind es sogar sechs bis zwölf Inhalationen täglich (Olschewski et al. 2000). Mit Controlled Release-Formulierungen, wie zum Beispiel Liposomen, kann die Wirkdauer der Medikamente in der Lunge verlängert werden (Shek et al. 1994; Zeng et al. 1995). Dadurch kann die Behandlungsfrequenz gesenkt werden, was zu einer Reduktion von systemischen Nebeneffekten führt (Taylor und Newton 1992; Mansour et al. 2009).

Über die Geschwindigkeit der Wirkstofffreisetzung kann die Wirkdauer gesteuert werden. Es sind einige Faktoren bekannt, die die Wirkstofffreisetzung und die Absorption der verkapselten Moleküle in der Lunge beeinflussen (Zeng et al. 1995), wie Lipidmenge und Ladung der Liposomen (Woolfrey et al. 1988) oder Lipidzusammensetzung, Cholesterolgehalt und Größe der Vesikel (Abra et al. 1990; Fielding und Abra 1992).

Auch Faktoren, die die Deposition der Liposomen im Respirationstrakt bestimmen, können Effekte auf die Freisetzung und Absorption von Wirkstoffen aus den Vesikeln haben. Die Partikelgröße und Größenverteilung des Aerosols, die Art der Aerosolapplikation und das Atemmuster des Patienten bestimmen die Clearance und somit die Verweildauer der

inhalierten Partikel (Zeng et al. 1995). In unterschiedlichen Bereichen der Lungen wirken unterschiedliche Reinigungsmechanismen, die inhalierte Partikel unterschiedlich schnell entfernen. Der mukoziliäre Transport nimmt zu den tieferen Atemwegen hin ab. Partikuläre Carrier, die in Regionen mit ausgeprägtem mukociliärem Transport deponiert werden, werden also schnell entfernt. Damit Retardformulierungen wie zum Beispiel Liposomen ihre Wirkung entfalten können, müssen sie also in den tieferen Regionen der Lunge deponiert werden, wo der mukoziliäre Transport minimal und ihre Verweildauer in der Lunge somit länger ist (Taylor und Newton 1992; Zeng et al. 1995). Da der Gesamtquerschnitt der Atemwege mit zunehmender Eindringtiefe in den Atemtrakt zunimmt, wodurch die Strömungsgeschwindigkeit abnimmt, strömt ein Aerosol schnell durch die zentralen Atemwege und langsam durch die peripheren Strukturen des Atemtrakts. Die geschwindigkeitsabhängige Impaktion führt also vor allem zur Abscheidung von großen Partikeln in den zentralen Atemwegen. Dagegen sind die zeitabhängigen Transportmechanismen Diffusion und Sedimentation überwiegend für die Deposition von kleineren Teilchen in der Lungenperipherie verantwortlich. Im Bereich der kleinen Atemwege führen alle drei Mechanismen zur Abscheidung von Teilchen. Daraus wird ersichtlich, dass der Ort der Teilchenablagerung im Atemtrakt mit zunehmender Teilchengröße aus der Lungenperipherie in Richtung zentraler Atemwege verschoben wird. Um bei einer therapeutischen Anwendung von Aerosolen die Deponierung von Teilchen in der gewünschten Region des Atemtraktes zu maximieren, kann man die physiologischen Parameter, also die Strömungsverhältnisse im Atemtrakt, die abhängig sind von Atemzugdauer und Strömungsgeschwindigkeit, über Atemmanöver regulieren. Die physikalischen Parameter, also die Teilcheneigenschaften wie Größe und Dichte, können ebenfalls variiert werden (Scheuch et al. 2006). Dabei ist eine periphere Deposition bei einer Partikelgröße von 3 – 5 µm maximal (Voshaar et al. 2001; Scheuch et al. 2006).

Durch Variation dieser Parameter soll eine optimale Freisetzungsgeschwindigkeit erreicht werden, die eine maximale Wirkdauer gewährleistet. Eine zu schnelle Freisetzung führt zu einer verkürzten Wirkdauer. Eine zu langsame Freisetzung kann bei Wirkstoffen mit einer minimalen effektiven Dosis dazu führen, dass kein therapeutisches Level am Wirkort erreicht wird (Fielding und Abra 1992).

Mit Hilfe der Gammaszintigraphie können Deposition und Clearance von radioaktiv markierten Liposomen im Respirationstrakt untersucht werden. Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass Liposomen effektiv in der Lunge deponiert werden, wo sie auch für längere Zeit intakt verbleiben (Taylor und Newton 1992). Mit DPPC-Liposomen, die mit ^{99m}Tc markiert

waren und die von Freiwilligen inhaliert wurden, konnte gezeigt werden, dass 20 Stunden nach der Inhalation noch ca. 60 % der deponierten Aktivität in den Alveolen vorhanden war (Farr et al. 1985). Passend dazu konnte eine andere Arbeitsgruppe 24 bzw. 48 Stunden nach der Inhalation von Liposomen aus DPPC und Cholesterol noch 60,4 % bzw. 38,3 % der deponierten Radioaktivität in den Lungen der Probanden nachweisen (Weers et al. 2009). Bei einer weiteren Studie waren es nach 24 Stunden noch 79 % bzw. 83 % für Liposomen aus den beiden Phospholipiden DPPC und DLPC (Saari et al. 1999). Dass bei der Studie von Saari et al. nach 24 Stunden noch ca. 80 % der Radioaktivität nachgewiesen werden konnten, während es bei Farr et al. und Weers et al. nur jeweils ca. 60 % waren, kann an der Lokalisation der Deposition der Partikel liegen, da diese die Clearance der Partikel beeinflusst (Farr et al. 1985). Die Deposition ist von der Aerosolpartikelgröße und dem Atemmuster der Probanden abhängig. Da bei allen drei Studien Düsenvernebler verwendet wurden und die Aerosolpartikel bei Weers et al. und Saari et al. mit 1,6 µm bzw. 1,3 µm ähnlich groß waren, kommen die Unterschiede wahrscheinlich durch die individuellen Atemmanöver zustande.

Bei diesen Studien ist allerdings nicht geklärt, ob die Lipide frei oder noch in Form von Liposomen vorliegen. Aufschlussreicher scheint für diese Fragestellung eine Studie zu sein, bei der ebenfalls gesunde Freiwillige Liposomen aus Phosphatidylcholin (PC) inhalierten, die in ihrem wässrigen Kompartiment den radioaktiven Marker ^{99m}Tc -DTPA (Diethylenaminpentaessigsäure) enthielten. Hier konnten nach 24 Stunden noch ca. 45 % der deponierten Radioaktivität in der Lunge nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass noch intakte Vesikel in den Alveolen vorhanden waren, die den Marker enthielten, da freies ^{99m}Tc -DTPA mit einer Halbwertszeit von 75 Minuten aus den Atemwegen entfernt wird (Barker et al. 1994).

Auch durch direkte Messungen des pulmonal applizierten Wirkstoffes lässt sich eine längere Verweildauer von liposomal verkapseltem im Vergleich zu freiem Wirkstoff feststellen. Dazu untersuchten zum Beispiel Demaeyer et al. bronchoalveoläre Lavagen (BAL) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach intratrachealer Applikation von radioaktiv markiertem Gentamicin in Kaninchenlungen. Dabei zeigte sich eine Stunde nach der Instillation sowohl für das freie, als auch für das liposomale Gentamicin (Liposomen aus PC) eine Peak-Konzentration in der BAL (freies Gentamicin: $1572 \pm 139 \mu\text{g}$; liposomales Gentamicin: $1214 \pm 330 \mu\text{g}$). Nach einem Tag konnte aber nur für den verkapselten Wirkstoff noch messbare Radioaktivität in der BAL detektiert werden (Demaeyer et al. 1993). Eine andere Arbeitsgruppe analysierte die Menge von radioaktiv markiertem, endotracheal in Kaninchen appliziertem freiem sowie in ebenfalls radioaktiv markierten Liposomen verkapseltem

Fentanyl in den Lungen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Applikation entnommen wurden. Es wurden drei verschiedene Liposomenformulierungen untersucht. Dabei waren 50 %, 70 % bzw. 90 % der in der Formulierung enthaltenen Radioaktivität in den Liposomen aus DPPC verkapselt, der Rest lag in Form von freiem Fentanyl vor. Nach der Applikation von 300 µg freiem bzw. liposomalem Wirkstoff fiel die Wirkstoffmenge in den Lungen umso langsamer ab, je mehr Wirkstoff ursprünglich liposomal verkapselt war. Nach 24 Stunden konnten schließlich bei den Tieren, die mit freiem Fentanyl behandelt worden waren, nur noch $0,0023 \pm 0,00013$ µg Fentanyl in den Lungen gemessen werden. Bei der Liposomenformulierung, die 50 % des enthaltenen Wirkstoffs verkapselt hatte, waren es $2,7 \pm 0,49$ µg und bei der Formulierung mit 70 % verkapseltem Wirkstoff $26,9 \pm 12,6$ µg. Bei den Liposomen, die 90 % des enthaltenen Wirkstoffs verkapselt hatten, konnten nach 24 Stunden noch $77,1 \pm 47,3$ µg Fentanyl in den Lungen gemessen werden. Hierbei konnten sogar nach 48 Stunden noch $55,6 \pm 16,8$ µg gefunden werden (Tan et al. 1996). Mit einer ähnlichen Methode wurde die Verweildauer von freiem Atropin und dem Wirkstoff in Liposomen aus dem Phospholipid DPPC und Cholesterol in Kaninchenlungen untersucht. Auch hier wurde die freie Substanz deutlich schneller aus den Lungen entfernt, als die liposomal verkapselte. Eine Stunde nach der Applikation konnten nur noch 18,8 % der applizierten Menge des freien Wirkstoffs in den Lungen wiedergefunden werden, während es bei den Liposomen 53,2 % waren. Nach 48 Stunden waren es bei der liposomalen Formulierung noch 20,9 %, während sich nur noch 4,1 % bei dem freien Wirkstoff nachweisen ließen (Meisner et al. 1989). Juliano et al. untersuchten zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Lungen von Ratten, nachdem diesen radioaktiv markiertes freies bzw. liposomal verkapseltes Cytosin-Arabinosid appliziert worden war. Sie stellten fest, dass die liposomale Verkapselung des Wirkstoffs zu einer Verlängerung der Verweildauer in der Lunge mit einer Halbwertszeit von 8 Stunden führte, während der freie Wirkstoff mit einer Halbwertszeit von 40 Minuten aus der Lunge entfernt wurde (Juliano und McCullough 1980).

Neben der Messung der Verweildauer von Liposomen bzw. liposomal verkapselten Wirkstoffen in der Lunge können auch Unterschiede in der Pharmakokinetik von pulmonal applizierten freien bzw. liposomal verkapselten Wirkstoffen gemessen werden. In der oben genannten Studie von Juliano et al. an Rattenlungen konnte auch gezeigt werden, dass das Plasmalevel nach Applikation von freiem Cytosin-Arabinosid schnell anstieg, ein Maximum nach ca. einer Stunde erreichte und dann wieder abfiel. Mit der liposomalen Formulierung wurde ein langsamer Anstieg über ca. eine Stunde auf ein Level, das bei ca. 20 % des Peak-Levels von freiem Wirkstoff lag, erreicht. Diese Konzentration blieb über mehrere Stunden

relativ konstant (Juliano und McCullough 1980). Ähnliche Ergebnisse berichteten Meisner et al. in ihrer Studie nach pulmonaler Applikation von Atropin (Meisner et al. 1989). In weiteren Untersuchungen mit gesunden Freiwilligen konnte gezeigt werden, dass die liposomale Verkapselung von Cromoglycat zu einer verlängerten Nachweisbarkeit des inhalierten Wirkstoffes im Plasma im Vergleich zu seiner freien Form führte. Der freie Wirkstoff bewirkte eine maximale Plasmakonzentration von ca. 30 ng/ml nach zwei Stunden, die danach wieder relativ steil abfiel. 24 Stunden nach der Inhalation konnte die Substanz im Plasma der Probanden nicht mehr nachgewiesen werden. Nach Inhalation des liposomalen Cromoglycats entstand nach einer Stunde ein Plasmapeak bei ca. 5 ng/ml. Die Plasmakonzentration fiel über sechs bis acht Stunden auf ca. 1 ng/ml ab und bildete dort ein Plateau. Auch nach 24 und 25 Stunden war noch knapp 1 ng/ml des Wirkstoffs im Plasma messbar (Taylor et al. 1989). In einer Studie mit Schafen konnte gezeigt werden, dass die Plasmahalbwertszeit von pulmonal appliziertem Amikacin von 117 Minuten bei freiem auf über 3 bzw. über 10 Stunden bei liposomal verkapseltem Wirkstoff verlängert werden konnte, abhängig vom Cholesterolgehalt der Liposomen (Schreier et al. 1992). Demaeyer et al. zeigten neben der verlängerten Nachweisbarkeit des Gentamicins in der bronchoalveoläre Lavage als weitere Folge der liposomalen Verkapselung des Wirkstoffs ein niedrigeres und konstantes Plasmalevel im Vergleich zu freiem Gentamicin. Der freie Wirkstoff erzeugte ca. 30 Minuten nach der intrabronchialen Verabreichung eine Peak-Konzentration im Plasma von ca. 1,5 µg/ml, während die liposomale Form keinen Peak bewirkte und ein Plasmalevel von 0,25 µg/ml während des gesamten untersuchten Zeitraums von 24 Stunden nicht überschritt (Demaeyer et al. 1993).

Schließlich führt die Verkapselung von Wirkstoffen in Liposomen auch zu einer veränderten Pharmakodynamik. Dies gilt sowohl für systemisch wirkende Substanzen wie Insulin als auch für Wirkstoffe mit lokaler Wirkung in der Lunge. Huang et al. berichten, dass das Blutglukoselevel von diabetischen Mäusen nach Inhalation von einer Mischung aus freiem Insulin und Liposomen um ca. 80 % nach zwei Stunden gesenkt werden konnte. Fünf Stunden nach der Inhalation hatte es wieder das Ausgangsniveau erreicht. War das Insulin hingegen in den Liposomen verkapselt, sank das Blutglukoselevel über einen Zeitraum von fünf Stunden kontinuierlich um insgesamt 200 % und war auch nach sechs Stunden noch auf diesem Niveau (Huang und Wang 2006). Bei einer durch Verneblung von Histamin induzierten Bronchokonstriktion bei Meerschweinchen führte die liposomale Verkapselung der β_2 -Agonisten Metaproterenol-Sulfat (MPS) bzw. Albuterol nicht nur zu einer Senkung der kardiovaskulären Nebenwirkungen, sondern auch zu einer deutlichen Verlängerung der

bronchodilatatorischen Wirkung im Vergleich zu den freien Wirkstoffen. Während der bronchodilatatorische Effekt von freiem MPS nach zwei Stunden nachließ und zehn bis zwölf Stunden nach der Verabreichung wieder den Kontrollwert erreicht hatte, persistierte der bronchodilatatorische Effekt des liposomalen MPS noch nach zehn bis zwölf Stunden (McCalden et al. 1989). Bei Albuterol konnte durch die liposomale Verkapselung des Wirkstoffs lediglich eine Verlängerung der Wirkdauer von ein bis zwei auf zwei bis drei Stunden erreicht werden, bei höheren Dosen auch bis zum Versuchsende nach vier Stunden (McCalden und Radhakrishnan 1991).

Insgesamt verdeutlichen diese Studien, dass die liposomale Verkapselung die pulmonale Retention von Wirkstoffen erhöhen und ihre Wirkdauer verlängern kann, während extrapulmonale Effekte vermindert werden.

2.2.4.2 Schicksal von Liposomen im Respirationstrakt

Die Dauer der Wirkstofffreisetzung aus Liposomen wird in vivo stark von deren Stabilität und Aufenthaltsdauer in der Lunge beeinflusst (Taylor und Farr 1993). Wie Liposomen aus dem Respirationstrakt beseitigt werden hängt wie bei anderen inhalierten Partikeln davon ab, an welche Stelle sie deponiert werden (McCalden 1990), was wiederum weniger von der Größe der Liposomen, sondern im Wesentlichen von der Größe der Aerosoltröpfchen bestimmt wird (Farr et al. 1985; Taylor und Newton 1992; Schreier et al. 1993). Physikochemische Eigenschaften der Liposomen wie Hygroskopizität und elektrische Ladung können aber sehr wohl einen Einfluss auf die Deposition eines liposomalen Aerosols haben. Da Liposomen empfindlich gegenüber osmotischen Einflüssen sind und außerdem eine positive oder negative Ladung tragen können, können Wasserverlust oder elektrostatische Interaktionen aufgrund von Verdunstung sowohl die Deposition der Liposomen als auch die Retention verkapselter Substanzen beeinflussen. Bei lyophilisierten Liposomen, die in Form von Pulvern vernebelt werden, kann es außerdem zur Aggregation der Pulverpartikel kommen. Dies führt zu einer vermehrten Deposition in den größeren Atemwegen und weniger in den peripheren Lungenregionen (Schreier et al. 1993).

Inhalierte Partikel, also auch Liposomen, die im Tracheobronchialbaum deponiert werden, werden durch die mukoziliäre Clearance in Richtung Oropharynx transportiert, wo sie zusammen mit direkt im Oro-/ Nasopharynx deponierten Partikeln ausgehustet oder verschluckt werden (Farr et al. 1985; Myers et al. 1993; Schreier et al. 1993).

Der wichtigste Reinigungsmechanismus in den Alveolen ist die Aufnahme von Partikeln in Alveolarmakrophagen (Kellaway und Farr 1990; McCalden 1990; Schreier et al. 1993). Die

Aufnahme von Liposomen in diese Zellen konnte sowohl an isolierten Alveolarmakrophagen (Gonzalez-Rothi et al. 1991; Poelma et al. 2002) als auch in vivo mit vernebelten Liposomen an Mäusen (Myers et al. 1993) und instillierten Liposomen an Ratten (Poelma et al. 2002) gezeigt werden.

Neben diesen beiden Mechanismen, die auch andere inhalierte Partikel betreffen, existiert für Liposomen noch ein weiterer Reinigungsmechanismus. Mit radioaktiv markierten Liposomenkomponenten konnte nachgewiesen werden, dass die Übertrittskinetiken von liposomalen Phospholipiden und Cholesterol aus den Alveolen über das Lungengewebe in die Zirkulation zwar etwas langsamer, aber doch vergleichbar zu nicht-liposomalem Surfactant sind. Das lässt vermuten, dass die Liposomen in den Alveolen abgebaut werden und in den Pool von Surfactant-Phospholipiden aufgenommen werden (McCalden 1990). Liposomale und endogene Phospholipide werden dann vor allem von Typ-II-Alveolarzellen aufgenommen und dort recycelt oder abgebaut (Kellaway und Farr 1990; Schreier et al. 1993; Poelma et al. 2002).

2.2.5 Einsatz von Liposomen in der Veterinärmedizin

Einige der Effekte, die durch die Verkapselung von Wirkstoffen in Liposomen entstehen, konnten auch bei der Anwendung von Liposomen in der Veterinärmedizin gezeigt werden.

- a) Vermehrte Aufnahme von Wirkstoffen in erkrankte Gewebe unter Reduktion systemischer Nebenwirkungen:
 - Bei Pferden wurde in zahlreichen Studien der Einfluss der liposomalen Verkapselung von Diclofenac zur topischen Behandlung von degenerativen Gelenkerkrankungen (Lynn et al. 2004) oder experimentell induzierten subkutanen Infektionen (Caldwell et al. 2004; Levine et al. 2009) bzw. Osteoarthritiden (Frisbie et al. 2009) untersucht, bei denen das nichtsteroidale Antiphlogistikum (NSAID) in Form einer Creme auf die Haut aufgetragen wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch die liposomale Formulierung lokal ein länger anhaltender therapeutischer Wirkstoffspiegel erzielt werden kann, während die Wirkstoffkonzentration im Plasma reduziert wird. Somit sinkt das Risiko für systemische Nebenwirkungen wie gastrointestinale Ulzera, renale Toxizität und lokale Reaktionen an der Injektionsstelle, die nach systemischer Applikation von NSAIDs auftreten können (Anderson et al. 2005).
 - Nach intravenöser Applikation beim Pferd zeigten radioaktiv markierte Liposomen eine gute Verträglichkeit und ein reproduzierbares Organverteilungsmuster bei

gesunden Tieren. Untersuchungen zur Biodistribution zeigten eine Anreicherung des radioaktiven ^{99m}Tc in Lunge, Nieren, Leber und Milz. Da man aufgrund von Untersuchungen an anderen Spezies davon ausgehen kann, dass sich ungebundenes ^{99m}Tc nicht in Lunge, Leber und Milz anreichert, könnten Liposomen eingesetzt werden, um Wirkstoffe gezielt in diese Organe zu bringen (Targeting). Durch Anlagerung einer Schutzschicht aus Polyethylenglycol (PEG) an die Liposomen wird eine lange Verweildauer der Vesikel im Gefäßsystem erreicht. Durch diese lange vaskuläre Phase der Liposomen und ihre Fähigkeit zur Paravasation in Gewebe mit erhöhter vaskulärer Permeabilität können radioaktiv markierte Vesikel außerdem eine nützliche Methode zur Detektion von Infektionen, Entzündungen und Neoplasien mittels Szintigraphie darstellen (Underwood et al. 2011).

- Da Liposomen neben einer langen Verweildauer im Gefäßsystem auch eine selektive intratumorale Akkumulation aufweisen, gibt es auch einen vielversprechenden Ansatz, liposomales Doxorubicin als Radiosensitizer zur Behandlung des fortgeschrittenen feline Fibrosarkoms zu nutzen (Kleiter et al. 2010).
 - Die dermale Anwendung des Lokalanästhetikums Lidocain, das in Liposomen verkapselt war, führte in einer Untersuchung an Katzen nicht zu toxischen Plasmakonzentrationen des Wirkstoffs (Fransson et al. 2002).
- b) Vermehrte Aufnahme liposomal verkapselter Substanzen in Zielzellen:
- Bei Schafen, die mit freiem und liposomal verkapseltem Ampicillin behandelt worden waren, zeigte sich bei der liposomalen Formulierung eine bessere Aufnahme des Antibiotikums in neutrophile Granulozyten und Monocyten, in denen der Wirkstoff zudem vier mal so lange nachgewiesen werden konnte wie nach Behandlung mit dem freien Wirkstoff (Yazar et al. 2006).
 - Auch die Aufnahme von Enrofloxazin in Neutrophile und Makrophagen, die aus anatolischen Hirtenhunden isoliert worden waren, war bei liposomalem Enrofloxazin effektiver im Vergleich zu der freien Form. Dies verbesserte die antibakterielle Wirksamkeit des Antibiotikums gegenüber intrazellulären Staphylococcus aureus-Infektionen (Baş et al. 2002; Degim et al. 2002).
 - Die liposomale Verkapselung des Immunmodulators Muramyltripeptid-Phosphatidylethanolamin, der zur Behandlung des caninen Hämangiosarkoms der Milz eingesetzt wird, führt zu einer vermehrten Aufnahme des Wirkstoffs in Monozyten und Makrophagen und verlängert seine Halbwertszeit in der Zirkulation. Dadurch wird die tumorizide Aktivität der Monozyten erhöht. Außerdem steigen die

Plasmakonzentrationen von TNF- α und IL-6 sowie anderer Zytokine. In Kombination mit einer Splenektomie und einer systemischen Chemotherapie können durch eine Behandlung mit dem liposomalen Immunmodulator die krankheitsfreie Zeit und die Überlebenszeit erkrankter Hunde signifikant verlängert werden. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass liposomales Muramyltripeptid-Phosphatidylethanolamin eine signifikante antimetastatische Aktivität bei hochgradig malignen, kaum auf Chemotherapie reagierenden, spontan auftretenden Hämangiosarkomen der Milz beim Hund hat (Vail et al. 1995).

c) Verlängerung der Verweildauer und Wirkdauer liposomal verkapselter Substanzen im Körper:

- Nach der intravenösen Behandlung von Kühen mit Ceftiofur und liposomalem Ceftiofur zeigte sich bei den mit der liposomalen Formulierung behandelten Tieren eine Plasmahalbwertszeit des Antibiotikums von über 30 Stunden. Dies entspricht einer Verdoppelung der Plasmahalbwertszeit von freiem Ceftiofur. Dadurch könnte die Behandlung der bovinen Mastitis auf eine einmalige Applikation des Wirkstoffs reduziert werden. In der Folge könnten die Behandlungskosten gesenkt, die Behandlungcompliance verbessert, der Stress für die Tiere reduziert und das Wohlbefinden der Tiere gefördert werden (Liu et al. 2011).
- Bei der lokalen Schmerztherapie von Blaukronenamazonen mit Butorphanol wurde durch die Verkapselung des Wirkstoffs in Liposomen eine Verlängerung der Wirkdauer im Vergleich zu freiem Butorphanol erzielt. Bei der liposomalen Formulierung konnten über drei bis fünf Tage analgetische Effekte beobachtet werden, während sich das Schmerzverhalten von Tieren, die mit freiem Butorphanol behandelt worden waren, nicht signifikant von dem der mit Kochsalzlösung behandelten Kontrolltiere unterschied. Der Vergleich dieser Ergebnisse wird allerdings durch den Einsatz von unterschiedlichen Konzentrationen und Applikationsformen zur Behandlung der Tiere erschwert (liposomale Formulierung: 10 mg/kg oder 15 mg/kg subkutan; freies Butorphanol: 5 mg/kg intramuskulär). Auch anhand der Plasmakonzentrationen konnte eine Wirkstofffreisetzung aus den Liposomen über fünf Tage gezeigt werden. Die Plasmakonzentrationen des freien Wirkstoffs waren schon nach 24 Stunden vernachlässigbar. Auch hier unterschieden sich aber die eingesetzten Wirkstoffdosen (liposomale Formulierung: 15 mg/kg; freies Butorphanol: 2 mg/kg). Der Einsatz der liposomalen Formulierung könnte ebenfalls dazu beitragen, über eine

verminderte Injektionsfrequenz den Behandlungsstress für die Tiere zu reduzieren (Sladky et al. 2006).

- Bei Hunden konnte eine längere Verweildauer von Hydromorphon im Plasma durch Verkapselung des Wirkstoffs in Liposomen erzielt werden. Aus einer früheren Studie war bekannt, dass Hydromorphon in konventionellen Formulierungen sowohl nach intravenöser als auch nach subkutaner Applikation schnell eliminiert wurde. Die Halbwertszeit lag dosisabhängig bei 0,6 (applizierte Dosis: 0,1 mg/kg) bis 1,1 (applizierte Dosis: 0,5 mg/kg) Stunden. Nach intravenöser Applikation von 0,5 mg/kg Hydromorphon in Liposomen lag die Halbwertszeit ebenfalls nur bei 0,52 Stunden. Nach der subkutanen Verabreichung von 1,0 mg/kg des Wirkstoffs konnte durch die Verkapselung in Liposomen eine Halbwertszeit von 5,22 Stunden erreicht werden, bei einer verabreichten Dosis von 2,0 mg/kg waren es 31,5 Stunden und bei einer Dosis von 3,0 mg/kg wurde der Wirkstoff mit einer Halbwertszeit von 24,1 Stunden eliminiert (Smith et al. 2008).

d) Reduktion der Toxizität schlecht verträglicher Substanzen:

- Durch die liposomale Verkapselung von Cisplatin, einem sowohl in der Human- als auch der Veterinärmedizin weit verbreitet eingesetzten Chemotherapeutikum, konnte an klinisch gesunden Hunden gezeigt werden, dass durch diese Formulierung die Toxizität des Wirkstoffs reduziert wurde. Unverkapseltes Cisplatin führt dosisabhängig zu toxischen Effekten. Durch die Verkapselung in Liposomen konnte das Doppelte der maximal tolerierten Dosis von freiem Wirkstoff sicher verabreicht werden (Marr et al. 2004).
- In der Geflügelindustrie stellen Infektionen mit *Escherichia coli* ein großes ökonomisches Problem dar. Dagegen könnte eine nicht serotyp-spezifische Vakzine eingesetzt werden. Dafür bietet sich die innere Oligosaccharid-Lipid A Region bakterieller Lipopolysaccharide (LPS) an, da sie gut konserviert und stark immunogen ist. Diese ist aber toxisch. Durch die Verkapselung der LPS-Komponenten in Liposomen konnte ihre Toxizität *in vitro* signifikant reduziert werden. Hühner, die mit dem liposomalen LPS geimpft worden waren, vertrugen die Impfung gut und bildeten einen konzentrationsabhängigen Antikörpertiter aus. Nach Infektion der Tiere mit einem virulenten *E. coli*-Stamm zeigten geimpfte Tiere signifikant weniger infektionsbedingte klinische Symptome, eine niedrigere Mortalität und weniger postmortale Veränderungen als ungeimpfte Tiere (Dissanayake et al. 2010).

- e) Steigerung der Effizienz immunologischer Adjuvantien durch Regulation der humoralen und zellulären Immunität:
- In zwei Studien konnte durch die liposomale Verkapselung von Glycyrrhizinsäure bzw. Epimediumpolysacchariden plus Propolisflavonen die Wirkung dieser immunologischen Adjuvantien verstärkt werden. Dazu wurden 14 Tage alte Hühner gegen die Newcastle-Krankheit geimpft. Anschließend wurden ihnen die Adjuvantien in freier bzw. liposomal verkapselter Form injiziert. Durch die Gabe der Epimediumpolysaccharide plus Propolisflavone wurden die Antikörper-Titer, die Proliferation der T-Lymphocyten und die Konzentrationen von Interferon- γ und Interleukin-6 erhöht. Durch die liposomale Verkapselung dieser Substanz konnten diese Effekte nochmals signifikant verstärkt werden. Außerdem waren Mortalität und Morbidität geringer als in den Kontrollgruppen (Fan et al. 2012). Durch die Glycyrrhizinsäure wurden die Antikörpertiter und die Konzentrationen der Immunglobuline IgG und IgM in den geimpften Tieren erhöht. Außerdem wurden die Lymphocytenproliferation und die Anteile von CD4- und CD8-positiven Zellen verstärkt. Auch diese Effekte konnten durch die liposomale Verkapselung des Wirkstoffs signifikant verstärkt werden (Zhao et al. 2011).

2.3 Pulmonale arterielle Hypertonie

Die pulmonale arterielle Hypertonie (PAH) des Menschen ist eine fortschreitende Erkrankung, die charakterisiert ist durch einen erhöhten pulmonalarteriellen Druck, der zu Rechtsherzversagen führt. Unter der Bezeichnung PAH werden Krankheiten subsummiert, die durch eine primäre Veränderung der kleinen Pulmonalarterien gekennzeichnet sind (Chin und Rubin 2008). Diesen Veränderungen können verschiedene Auslöser zugrunde liegen, aufgrund derer das Krankheitsbild der PAH in fünf verschiedene Kategorien eingeteilt wird (Simonneau et al. 2009):

- idiopathisch,
- erblich (Mutationen im BMPR2-Gen, Mutationen im ALK-1 oder Endoglin-Gen oder unbekannte Ursachen),
- medikamenten- oder toxininduziert,
- assoziiert mit verschiedenen Krankheiten (Kollagenosen, HIV-Infektionen, portale Hypertension, kongenitale Herzerkrankungen, Schistosomiasis, chronische hämolytische Anämie),
- als persistierende pulmonale Hypertonie der Neugeborenen.

Die der PAH zugrunde liegenden Gefäßveränderungen treten sowohl bei der idiopathischen Form als auch in Assoziation mit anderen Erkrankungen oder Expositionen auf. Sie stellen wahrscheinlich eine Reaktion auf die oben genannten umwelt- oder krankheitsbedingten Auslöser gekoppelt mit genetisch determinierten Prädispositionen dar (Chin und Rubin 2008). Der PAH liegt eine multifaktorielle Pathogenese zugrunde, bei der Vasokonstriktion, Remodeling der pulmonalen Gefäßwände und Thrombose zu einem erhöhten Gefäßwiderstand beitragen (Humbert et al. 2004).

Es handelt sich bei der PAH um eine chronische Erkrankung, die nicht geheilt werden kann (Olschewski et al. 2007; Chin und Rubin 2008; Galié et al. 2009). Vor Einführung der Therapie mit Vasodilatoren führte progressives Rechtsherzversagen meist zum Tod der Patienten innerhalb von 2,8 Jahren nach Diagnosestellung (D'Alonzo et al. 1991). Die Behandlung der PAH hat sich aber in den letzten 15 Jahren rasant weiterentwickelt (Ramani und Park 2010). Vor 1996 hat sich die Therapie auf eine symptomatische Kontrolle, die ein Management des Rechtsherzversagens mit Diuretika und Digoxin, Sauerstofftherapie zur Korrektur der Hypoxämie und den Einsatz von Kalziumkanalblockern beinhaltete, fokussiert. Die Erkenntnis, dass das Fortschreiten der PAH charakterisiert ist durch Gefäß-Remodeling und ein Ungleichgewicht zwischen proliferativen und anti-inflammatorischen Mediatoren führte zur Anerkennung der Wichtigkeit von Endothelin, Prostacyclin und Stickstoffmonoxid (NO) in Initiation und Progression der Erkrankung. Diese Schlüssel-Signalwege dienen jetzt als Ziele für krankheitsspezifische Behandlungen, die das PAH-Management revolutioniert haben (Ramani und Park 2010).

So bilden heute Wirkstoffe aus drei Klassen die Säulen der spezifischen medikamentellen Therapie der PAH: Prostazyklin-Analoga, Endothelinrezeptor-Antagonisten und Phosphodiesterase (PDE)-5-Inhibitoren. Ein aktueller, ausführlicher Überblick über den Einsatz dieser Arzneimitteln kann der einschlägigen Literatur entnommen werden (Galié et al. 2009; Agarwal und Gomberg-Maitland 2011; Fukumoto und Shimokawa 2011; Stamm et al. 2011).

Alle diese Wirkstoffe zeigen vasodilatative und antiproliferative Effekte in der Lunge (Chin und Rubin 2008). Im Folgenden wird auf den PDE-5-Inhibitor Sildenafil näher eingegangen, da dieser im experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde.

2.3.1 Einsatz von Sildenafil zur Behandlung der PAH

Sildenafil, ein oral zu verabreichender Phosphodiesterase (PDE)-5-Inhibitor, zielt auf den Stickstoffmonoxid (NO)-Weg ab, indem es Effekte verstärkt, die der NO-vermittelten Initiierung der Vasodilatation nachgeschaltet sind (Ramani und Park 2010).

NO wird in der Lunge konstitutiv durch die NO-Synthase (NOS), die in Gefäßendothelzellen und Atemwegsepithelzellen lokalisiert ist, aus L-Arginin produziert (Ghofrani et al. 2004a; Ramani und Park 2010). Das labile Gas NO diffundiert dann frei über Kapillarmembranen in die glatten Gefäßmuskelzellen und aktiviert dort Guanylatcyclasen, die auf zellulärer Ebene die Konversion von GTP zu cGMP stimulieren. Intrazelluläres cGMP hat viele Effekte auf die Zellphysiologie, die in Abb. 3 dargestellt sind (Barnett und Machado 2006; Ramani und Park 2010). Insbesondere sind dies:

- Regulation von Ionenkanälen, die in einer Vasodilatation resultiert;
- Veränderung der Konzentration intrazellulärer zyklischer Nukleotide (cyklisches Adenosinmonophosphat, cAMP). Indem die Konversion von cAMP zu AMP gehemmt wird, steigt die cAMP-Konzentration, was eine Vasodilatation bewirkt;
- Aktivierung von Proteinkinasen (PKA und PKB) durch cGMP und cAMP, wodurch die Proliferation glatter Muskelzellen gehemmt wird.

Die intrazellulären Spiegel der second Messenger cAMP und cGMP werden durch Phosphodiesterasen reguliert. Zurzeit sind elf verschiedene Isoenzyme der PDE-Familie identifiziert, die in ihrer Substratspezifität, Gewebelokalisation und ihren Wirkmechanismen variieren (Kass et al. 2007). PDE-5 wird in der systemischen Zirkulation kaum exprimiert (Ramani und Park 2010), die Expression in den glatten Muskeln der pulmonalen Gefäße ist aber weit verbreitet. Es ist das am häufigsten vorkommende cGMP-metabolisierende Enzym in der Lunge. Dort limitiert es die vasodilatativen und antiproliferativen Effekte von cGMP-induzierten vasoaktiven Faktoren wie NO und natriuretischen Peptiden auf die pulmonalen Blutgefäße (Sebkhi 2003). Diese Eigenschaft und die Tatsache, dass es bei der PAH zu einer Hochregulierung von PDE-5 kommt (MacLean et al. 1997; Black et al. 2001; Murray et al. 2002; Rondelet 2004; Wharton et al. 2005), machen das Enzym zu einem attraktiven Ziel für die pharmakologische Manipulation von Tonus und Struktur der pulmonalen Gefäße (Sebkhi 2003). Da PDE-Inhibitoren die Spiegel von cAMP und cGMP regulieren, können sie therapeutisch genutzt werden, um Prostanoid- und NO-vermittelte vaskuläre Effekte zu verstärken und zu verlängern (Ghofrani et al. 2004a). Sildenafil bewirkt durch eine selektive Hemmung der PDE-5 den Abbau von cGMP und verlängert so dessen Wirkung (Barnett und Machado 2006). Da dies nur in Gefäßen mit signifikanter NO-Produktion, also in gut

ventilierten Lungenbereichen geschieht, entsteht kein Ventilations-Perfusions-Ungleichgewicht (Chin und Rubin 2008).

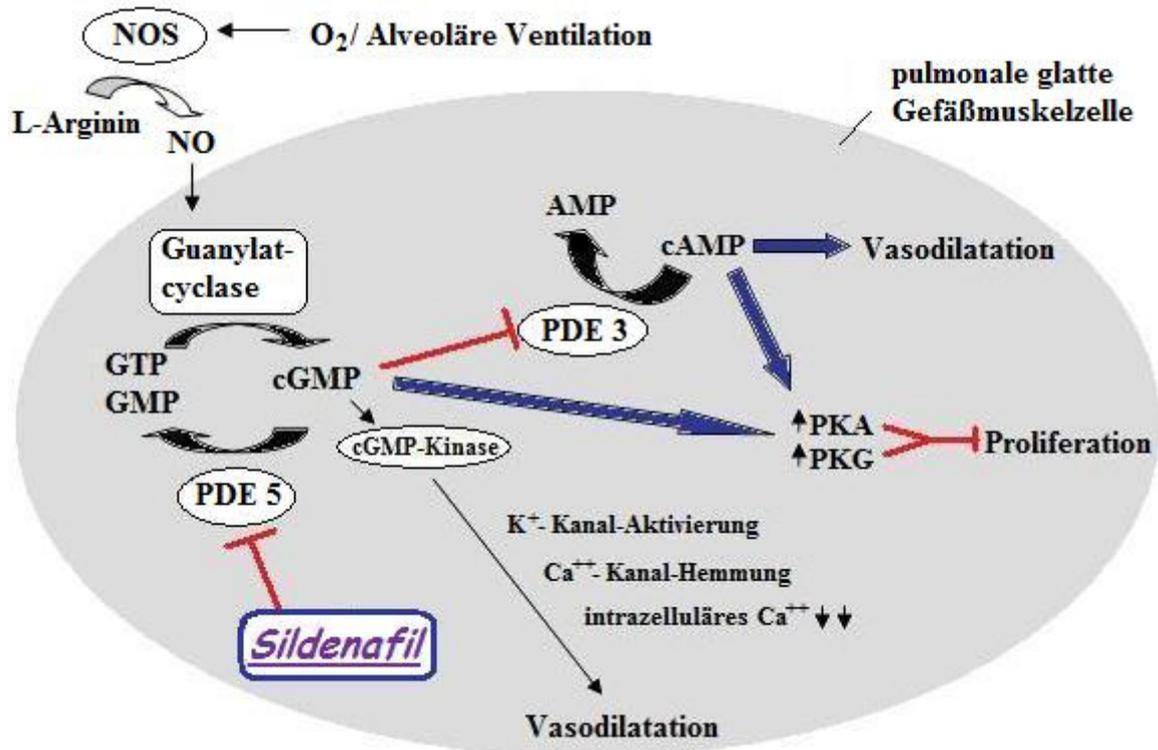


Abb 3: Schematische Darstellung der vasodilatativen und antiproliferativen Effekte von Sildenafil (modifiziert und kombiniert aus Barnett und Machado 2006 und Ghofrani et al. 2004a)

AMP:	Adenosinmonophosphat
Ca ⁺⁺ :	Calcium
cAMP:	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP:	cyclisches Guanosinmonophosphat
GMP:	Guanosinmonophosphat
GTP:	Guanosintriphosphat
K ⁺ :	Kalium
NO:	Stickstoffmonoxid
NOS:	NO-Synthase
O ₂ :	Sauerstoff
PDE:	Phosphodiesterase
PKA:	Proteinkinase A
PKG:	Proteinkinase G

Inzwischen konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass Sildenafil effektiv den pulmonalen Gefäßwiderstand reduziert. Ergebnisse dazu liefern tierexperimentelle Studien an Lämmern mit U46619-induzierter PAH (Weimann et al. 2000) und an Mäusen mit Hypoxie-induzierter (Zhao et al. 2001) bzw. Monocrotalin-induzierter PAH (Schermyly 2003). Zudem wurde der Effekt in klinischen Studien an Patienten mit chronischer (Wilkens et al. 2001; Michelakis 2002) bzw. Hypoxie-induzierter PAH (Zhao et al. 2001; Ghofrani et al. 2004b;

Richalet 2004) nachgewiesen. Da die PDE-5 als Angriffspunkt von Sildenafil in der systemischen Zirkulation kaum, in den glatten Muskeln der pulmonalen Gefäße aber stark exprimiert wird, führt Sildenafil nicht zu systemischen Blutdruckabfällen, sondern weist eine pulmonale Selektivität auf (Weimann et al. 2000; Michelakis 2002; Michelakis et al. 2003; Barnett und Machado 2006). Außerdem weist Sildenafil eine intrapulmonale Selektivität auf (Ghofrani et al. 2004a; Ghofrani et al. 2004c). Diese wird erreicht, indem Sildenafil vermehrt in solchen Lungenbezirken wirkt, die ausreichend ventiliert werden. Durch Ventilation und die Anwesenheit von Sauerstoff wird vermehrt NO produziert (Ghofrani et al. 2004a). Eine verstärkte Perfusion ventiliert Bereiche bewirkt eine verbesserte arterielle Oxygenierung. Tierexperimentelle Studien konnten zeigen, dass eine orale Behandlung mit Sildenafil nicht nur vasodilatativ wirkt, sondern auch die Neomuskularisierung sowohl in Hypoxie-, als auch in Monocrotalin-Modellen der PAH in Ratten reduziert (Itoh 2003; Schermuly 2003; Sebkhi 2003) und die Mediaverdickung der Pulmonalarterien limitiert (Rondelet 2004). Hinweise auf einen antiproliferativen Effekt von PDE-5-Inhibitoren gibt es auch an humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (Wharton et al. 2005; Wang et al. 2008a). Diese in vitro Ergebnisse an humanen Zellen beantworten zwar nicht direkt die Frage, ob es durch eine PDE-5-Inhibition möglich ist, das Gefäß-Remodeling in vivo zu beeinflussen, sie geben aber einen Hinweis darauf, dass eine chronische PDE-5-Inhibition einen antiproliferativen Effekt bei Patienten mit schwerer PAH haben kann (Wharton et al. 2005). Nach Kenntnis der Autorin liegt bislang lediglich eine tierexperimentelle Studie zu inhalativen Effekten von Sildenafil vor (Ichinose et al. 2001), auf die in der Diskussion näher eingegangen wird.

2.3.2 Pulmonale Hypertonie bei Tieren

Im Gegensatz zur Humanmedizin, wo die pulmonale Hypertonie mit Faktoren wie Fehlfunktionen des Endothels, Gefäßneubildungen und in-situ-Thrombosen in Zusammenhang gebracht wird, ist diese Erkrankung bei Tieren laut Lehrbüchern am ehesten als Folge von obstruktiven Atemwegserkrankungen oder Behinderungen des pulmonal-venösen Blutflusses bekannt. Beispiele für auslösende Atemwegserkrankungen sind chronische Bronchitiden, die besonders häufig bei Pferden (hier meist in Form einer chronisch obstruktiven Bronchitis), Hunden und Katzen auftreten, sowie idiopathische Lungenfibrosen und allergisch bedingte Bronchospasmen bei Rindern. Behinderungen des venösen Blutflusses können bei Kleintieren im Zuge von Kardiopathien, erhöhten Druckverhältnissen infolge kongenitaler Herzerkrankungen oder erhöhtem Widerstand in den Lungengefäßen,

zum Beispiel durch Lungenembolien oder Herzwurminfektionen, entstehen. Durch die Ungleichverteilung der Ventilation und erhebliche Ventilations-Perfusions-Verteilungsstörungen kommt es zu einer arteriellen Hypoxämie. Diese führt zu einer hypoxischen Vasokonstriktion in den schlecht belüfteten Lungenarealen und so schließlich zur pulmonalen Hypertonie (Gros 2000; Hawkins 2010).

Die Therapie der pulmonalen Hypertonie bei Tieren besteht in der Identifikation und Behandlung der zugrunde liegenden Krankheitsprozesse. Für Tiere, bei denen keine Grunderkrankung identifiziert werden konnte oder bei denen konservative Maßnahmen zur Verbesserung der intraarteriellen Druckverhältnisse fehlgeschlagen sind, ist ein direkter Therapieansatz empfehlenswert. Das dabei am häufigsten eingesetzte Medikament bei Hunden ist Sildenafil, z. B. als Präparat Viagra[®], Pfizer (Bach et al. 2006; Brown et al. 2010; Hawkins 2010).

Bei Broilern ist das pulmonale Hochdruck Syndrom auch als Aszitiesyndrom bekannt. Ursache ist ein erhöhter Blutfluss. Dieser wird bei den schnell wachsenden Fleischrasen benötigt, um den für den erhöhten Metabolismus benötigten Sauerstoffbedarf decken zu können. Um das Blut durch die Kapillargefäße in der Lunge transportieren zu können, wird bei vermehrtem Fluss ein erhöhter Druck benötigt. So kommt es zum pulmonalen Hochdruck. Die dadurch entstehende vermehrte Belastung des rechten Ventrikels führt sporadisch zu Rechtsherzversagen und Aszites. Hühner haben eine dickere respiratorische Membran als andere Vögel. Dabei ist die respiratorische Membran von Broilern noch mal dicker als die von Hühnern der Rasse Leghorn. Dadurch ist der Übertritt von Sauerstoff ins Blut bei Broilern erschwert. Neben genetischen Faktoren können eine Reihe weiterer Komponenten an der Entstehung des Aszitiesyndroms beteiligt sein. Dazu gehören unter anderem Kälte, Hitze, bestimmte Nährstoffe oder Chemikalien. Andere Faktoren wie eine erhöhte Viskosität des Blutes, ein erhöhte Rigidität der roten Blutzellen oder eine reduzierte vaskuläre Kapazität in der Lunge verursachen pulmonalen Hochdruck und Aszites, indem sie den Fließwiderstand des Blutes in den Lungen erhöhen. Die Inzidenz der Erkrankung kann gesenkt werden, indem Umgebungstemperatur und Belüftung optimiert werden (Julian 2000; Baghbanzadeh und Decuypere 2008).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 MATERIAL UND METHODEN

3.1.1 Substanzen und Lösungen

3.1.1.1 DPPC

Die Fettsäureketten des Phospholipids 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DPPC, Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) bestehen aus 16 Kohlenstoffatomen und besitzen keine Doppelbindungen. DPPC (CAS-Nummer 63-89-8) hat folgende chemische Eigenschaften (Anderson und Omri 2004; Khan et al. 2008, Herstellerangaben):

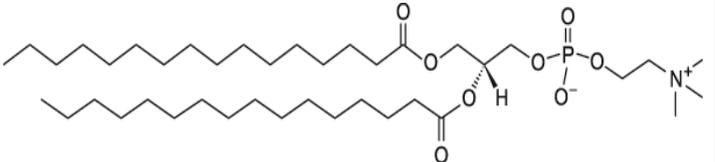
<ul style="list-style-type: none"> - Summenformel: $C_{40}H_{80}NO_8P$ - Molekulargewicht: 734,039 g/mol - Phasenübergangstemperatur: 41 °C - Ladung: bei pH 7,4 ungeladen 	
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------

Abb. 4: Chemische Eigenschaften und Strukturformel von DPPC

In der Lunge stellt DPPC ungefähr 70 – 80 % des natürlichen Surfactantpools dar (Myers et al. 1993).

3.1.1.2 Cholesterol

Cholesterol (CH) wurde von Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA, bezogen. Das Molekül mit der CAS-Nummer 57-88-5 hat folgende chemische Eigenschaften (Vemuri und Rhodes 1995, Herstellerangaben):

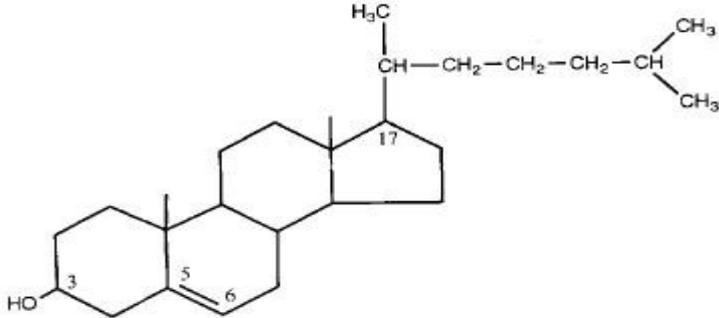
<ul style="list-style-type: none"> - Summenformel: $C_{27}H_{46}O$ - Molekulargewicht: 386,654 g/mol 	
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------

Abb. 5: Chemische Eigenschaften und Strukturformel von Cholesterol

Cholesterol ist ein Sterol, das oft zusätzlich zu den Phospholipiden in unterschiedlichen Mengen zur Herstellung von Liposomen verwendet wird, um deren Membranstabilität zu verbessern. Es reduziert die Permeabilität wasserlöslicher Moleküle durch die Liposomenmembran (Demel und de Kruffy 1976; Sharma und Sharma 1997; Barenholz 2001; Kraske und Mountcastle 2001) und verbessert die Stabilität der Membran in Gegenwart biologischer Flüssigkeiten wie Blut oder Plasma (Gregoriadis und Davis 1979; Kirby et al. 1980; Damen et al. 1981). Cholesterol kommt auch natürlich in Zellen von Säugetieren vor, wo es das am häufigsten vorkommende Sterol ist (Demel und de Kruffy 1976).

3.1.1.3 Rhodamin 6G

Rhodamin 6G (R6G, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) ist ein lipophiler Fluoreszenzfarbstoff, der bereits erfolgreich in Liposomen verkapselt werden konnte (Moscho et al. 1996; Khan et al. 2008). R6G (CAS-Nummer 989-38-8) besitzt folgende chemische Eigenschaften (Khan et al. 2008; Lahnstein et al. 2008):

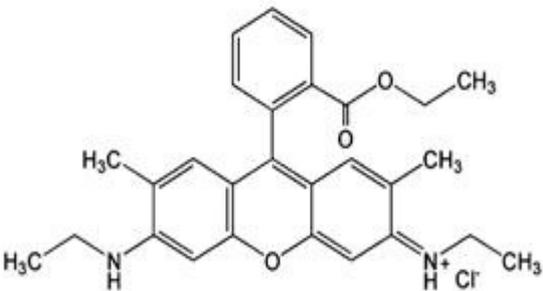
<ul style="list-style-type: none"> - Summenformel: C₂₈H₃₁ClN₂O₃ - Molekulargewicht: 479,02 g/mol - pK_s: 7,5 - Oktanol/ Wasser-Verteilungskoeffizient: log P = 2,69 ± 0,18 - λ_{ex}: 528 nm - λ_{em}: 551 nm 	
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------

Abb. 6: Chemische Eigenschaften und Strukturformel von Rhodamin 6G

3.1.1.4 Sildenafil

Sildenafil ist ein potenter und selektiver Phosphodiesterase-5-Inhibitor (Galié et al. 2009), der zur oralen Behandlung der erektilen Dysfunktion bei Männern eingesetzt wird (Boolell et al. 1996a; Boolell et al. 1996b). Seit 2005 ist Sildenafil unter dem Handelsnamen Revatio® auch zur Behandlung der pulmonal-arteriellen Hypertonie (PAH) zur Verbesserung der Leistungsfähigkeit zugelassen, ursprünglich nur bei Patienten mit PAH der WHO-Funktionsklasse III. Seit 2009 wurde die Indikation für die PAH der WHO-Funktionsklasse II erweitert (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft 2009; Ramani und Park 2010).

Die in dieser Arbeit verwendete Sildenafil Base (CAS-Nummer 139755-83-2) wurde von zwei verschiedenen Herstellern bezogen (AK Scientific, Inc., USA und bioKEMIX, Hazel Grove, Großbritannien). Die Substanz ist relativ hydrophob, wobei die Löslichkeit vom pH-Wert abhängig ist und bei pH-Werten unter 6 und über 10 ansteigt (Al Omari et al. 2006; Wang et al. 2008b). Weitere chemische Eigenschaften dieses weißen kristallinen Pulvers sind nachstehend aufgeführt (Gobry et al. 2000; Melnikov et al. 2003, Herstellerangaben):

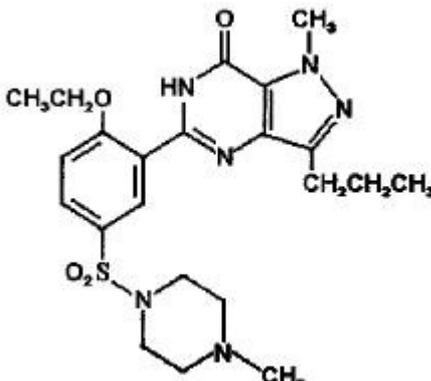
<ul style="list-style-type: none"> - Summenformel: C₂₂H₃₀N₆O₄S - Dichte: 1,17 g/cm³ - Molekulargewicht: 474,6 g/mol - Oktanol/ Wasser-Verteilungs- koeffizient: log P = 3,18 ± 0,01 	 <p>The image shows the chemical structure of Sildenafil Base. It consists of a central pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5(1H)-one ring system. This core is substituted with an ethoxy group (-OCH₂CH₃) at the 7-position, a propyl group (-CH₂CH₂CH₃) at the 4-position, and a methyl group (-CH₃) at the 3-position. Additionally, a piperazine ring is attached to the 5-position of the core via a sulfonamide group (-SO₂-N-piperazine-CH₃).</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Abb. 7: Chemische Eigenschaften und Strukturformel von Sildenafil

3.1.1.5 Elektrolytlösungen

Die Elektrolytlösungen wurden von Serag-Wiessner (Naila, Deutschland) hergestellt. Die Lösung II N enthielt folgende Bestandteile: NaCl 120 mM, KCl 4,3 mM, KH₂PO₄ 1,1 mM, CaCl₂ 2,4 mM, MgCl₂ 1,3 mM, Glucose 13,32 mM und Hydroxyethylstärke 50g/l.

Die Lösung 1/3 enthielt CaCl₂ 2,4 mM, MgCl₂ 1,3 mM, KCl 4,3 mM, KH₂PO₄ 1,1 mM, NaCl 125 mM und Glucose 13,32 mM.

Die Elektrolytlösung II N wurde für die Versuche zur Wiederfindung von Sildenafil verwendet. Mit der Elektrolytlösung 1/3 wurden die Kaninchenlungen während der Präparation perfundiert, bevor die Lösung in einem Perfusatwechsel durch die in den Lungenversuchen verwendete Albumin-Lösung ersetzt wurde. Um bei den Versuchen und der Isolation der Kaninchenlungen einen physiologischen pH-Wert aufrecht erhalten zu können, war es nötig, die Lösungen zu puffern. Dafür wurden zu 975 ml der jeweiligen Lösung 23,5 ml Natriumbicarbonat (Natriumhydrogencarbonat 1 molar 8,4 %, Serag-Wiessner, Naila, Deutschland) zugegeben.

3.1.1.6 Albumin-Lösung

Die vierprozentige Albumin-Lösung wurde für die in vitro Freisetzungsversuche und die Versuche mit der isolierten Kaninchenlunge benötigt. Zur Herstellung der Lösung für die Lungenversuche wurden 16 g Albumin (Albumin Fraktion V, CAS-Nr. 90604-29-8, Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland) in 390 ml Elektrolytlösung 1/3 gegeben. Bis sich das Albumin makroskopisch gelöst hatte, wurde die Flüssigkeit ca. 30 Minuten auf einem Magnetrührer (IKA[®] Model Big Squid, IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) gerührt. Um ein vollständiges Lösen des Albumins zu gewährleisten, wurde dieser Ansatz über Nacht bei 4 °C gelagert und erst am Folgetag im Versuch eingesetzt. Vor Befüllen des Systems wurden der Albumin-Lösung noch 10 ml Natriumbicarbonat zugegeben. Zudem wurde sie in einem beheizbaren Ultraschall-Bad (Bandelin Sonorex Digitec DT 52 H, Badelin electronic, Berlin, Deutschland) 15 Minuten bei 35 °C vorgewärmt und entgast.

Da für die in vitro Freisetzungsversuche weniger Flüssigkeit benötigt wurde als bei den Lungenversuchen, wurden für einen kleineren Ansatz 2 g Albumin in 49 ml der Elektrolytlösung 1/3 wie oben beschrieben gelöst und vor dem Versuch mit ca. 1 ml Natriumbicarbonat auf einen pH-Wert von 7,4 titriert.

3.1.2 Vernebler

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Verneblern handelte es sich um einen piezoelektrischen Vernebler (Aeroneb[®] Solo, Aerogen, Dangan, Galway, Irland), einen Düsenvernebler (Pari LC Sprint[®] Star, PARI GmbH, Starnberg, Deutschland) und einen MicroSprayer[®] (Model IA-1B, Penn-Century, Inc., Pennsylvania, USA).

3.1.2.1 Aeroneb[®] Solo

Bei den Vibrating mesh Verneblern wird das Aerosol durch ein vibrierendes Netz oder eine Platte mit zahlreichen Löchern generiert. Zu den Vibrating mesh Verneblern gehören unter anderem der Aeroneb[®] Pro der Firma Aerogen, der für den Einsatz während mechanischer Beatmung konstruiert wurde, und der Aeroneb[®] Solo, der auf dem gleichen Prinzip basiert, aber laut Herstellerangaben für den Einpatientengebrauch konzipiert ist. Der Aeroneb[®] Pro besteht aus einem Vibrationselement und einer gewölbten Lochplatte. In der Platte befinden sich ca. 1000 kegelförmige Löcher, deren weite Öffnungen der Flüssigkeit, die in ein Reservoir über dieser Platte eingefüllt wird, zugewandt sind, und die sich zur Unterseite hin

verjüngen. Bei Anlegen von elektrischer Spannung wird das keramische Vibrationselement dazu angeregt, sich auszudehnen und wieder zusammenzuziehen, wodurch sich die gewölbte Platte jeweils einige Mikrometer auf und ab bewegt. Durch diese Mikropumpenbewegung wird die Flüssigkeit durch die Löcher extrudiert, wodurch das Aerosol entsteht (Dhand 2004).

3.1.2.2 Pari LC Sprint® Star

Beim Pari LC Sprint® Star handelt es sich um einen Düsenvernebler. Diese nutzen den Venturi- bzw. Bernoullieffekt aus, um mithilfe von Druckluft ein Aerosol zu erzeugen (Voshaar et al. 2001). Ein geringer Anteil des so generierten primären Aerosols besteht aus Tröpfchen, die klein genug sind, um inhaliert werden zu können, und verlässt den Vernebler direkt. Die verbleibenden großen Tropfen impaktieren an strategisch positionierten Blenden oder an den Wänden der Verneblerkammer und werden wieder dem Flüssigkeitsreservoir zugeführt (O'Callaghan und Barry 1997; Bridges und Taylor 1998).

3.1.2.3 MicroSprayer®

Der MicroSprayer® der Firma PennCentury basiert auf einer Sonde aus Edelstahl, an deren Spitze sich eine Düse befindet, und wird hydraulisch durch eine Plastikspritze ausgelöst (s. Abb. 8). Die Sonde kann tief in die Trachea geschoben werden, wodurch das Aerosol direkt in die Lunge gelangt.

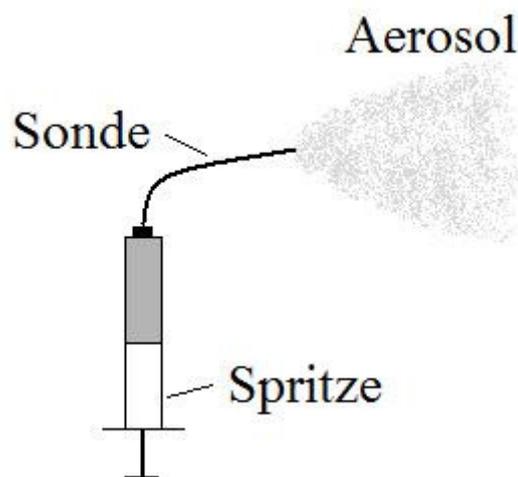


Abb. 8: Aufbau des MicroSprayers®

3.1.3 Bestimmung der Aerosolpartikelgrößen

Die Größe der Aerosolpartikel wurde mittels eines Laserdiffraktometers (Sympatec, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland) bestimmt. Grundlage der Laserdiffraktometrie ist die Beugung des Lichts, wobei je nach Form und Größe des Teilchens, an dem das Licht gebeugt wird, unterschiedliche Beugungsbilder entstehen. Die Intensität des gebeugten Lichts wird von einem Detektor erfasst und im Computer ausgewertet. Die Software ermöglicht dabei, je nach Größe und Form der zu messenden Partikel, eine Auswertung nach der Fraunhofer- bzw. der Mie-Theorie. Es können aber nur kugelförmige Teilchen unverfälscht analysiert werden, denn nur diese ergeben ein radialsymmetrisches Beugungsbild (Müller und Schuhmann 1996).

Bei nicht sphärischen Partikeln wird deren Größe oft in Form von Äquivalentdurchmessern angegeben, zum Beispiel auf Basis von gleichen Volumina, gleichen Massen oder gleichem Luftwiderstand. Bei Aerosolen bietet sich hierfür der aerodynamische Durchmesser an, da er sowohl die Partikeldichte als auch den Luftwiderstand berücksichtigt (Lippmann et al. 1980). Der aerodynamische Durchmesser ist definiert als der Durchmesser einer Kugel mit der Dichte 1 g/cm^3 , die in Luft genauso schnell fällt wie das beobachtete Teilchen (Yeh et al. 1976). Da Aerosole meistens Teilchen unterschiedlicher Größen enthalten, wird die Größenverteilung durch den medianen aerodynamischen Massendurchmesser (MMAD) angegeben (Groneberg et al. 2003). Der MMAD gibt den Partikeldurchmesser an, bei dem 50 % der Aerosolmasse in größeren und 50 % in kleineren Tröpfchen enthalten sind (Khilnani und Banga 2008). Die Größenverteilung wird durch die geometrische Standardabweichung (GSD) angegeben (O'Callaghan und Barry 1997; Rubin 2010).

Zur Bestimmung der Aerosolpartikelgrößen des Aeroneb[®] Solo und des Pari LC Sprint[®] Star wurden die Vernebler mit je 3 ml isotoner Kochsalzlösung oder Liposomensuspension gefüllt. Die Vernebler wurden dann in ein Stativ eingespannt und so positioniert, dass sie sich in ca. 3 cm Abstand zum Laserstrahl befanden und die Aerosolwolke vom Laserstrahl mittig durchquert wurde. Das Aerosol wurde von einem Staubsaugerrohr, das sich ca. 10 cm hinter dem Laserstrahl befand, abgesaugt, um Verwirbelungen und Mehrfachmessungen der Aerosolpartikel zu vermeiden. Bei allen Messungen wurde eine R2 Linse (Brennweite 50 mm; Messbereich 0,25 bis 87,5 μm) verwendet. Für jede Messung wurden sechs Einzelmessungen durchgeführt. Für jede Einzelmessung wurden geräteintern während einer Messzeit von fünf Sekunden 100 Messungen mit einer Zykluszeit von 50 Millisekunden gemittelt.

Um die Aerosolpartikelgrößen des MicroSprayers[®] zu bestimmen, wurde die Spritze des Verneblers mit 1 ml Aqua dest. befüllt. Zur Verneblung wurde die Spitze der Sonde ca. 3 cm über den Laserstrahl gehalten. Da die Verneblungsdauer beim Microsprayer mit ca. zwei Sekunden sehr kurz ist, wurde die Messzeit auf 0,5 Sekunden reduziert.

3.1.4 Verneblerleistung

Der Output der Vernebler wurde gravimetrisch bestimmt, indem die Vernebler jeweils vor und nach der Verneblung gewogen wurden. Beim MicroSprayer[®] wurden Spritze und Sonde separat gewogen. Da nicht die ganze Flüssigkeit, die die Spritze verlassen hatte, als vernebelt betrachtet werden konnte, weil immer ein kleiner Rest in der Sonde verblieb, wurde das in der Sonde ermittelte Residuum vom Output der Spritze abgezogen.

Bei Verneblungen mit dem Aeroneb[®] Solo wurde außerdem die Verneblungsdauer bis zur vollständigen Verneblung des eingefüllten Volumens protokolliert. Bei Verneblungen mit dem Pari LC Sprint[®] Star wurde die Verneblung nach 15 Minuten gestoppt. Auf diese Weise wurde sicher gestellt, dass bei der Verneblung von Liposomen ein ausreichender Rückstand im Vernebler verblieb, aus dem Proben zur Charakterisierung der Liposomen entnommen werden konnten.

3.1.5 Liposomen mit Rhodamin 6G

3.1.5.1 Herstellung der Liposomen

Es wurden Liposomen der Zusammensetzung DPPC : CH mit R6G nach vier verschiedenen Methoden (A, B, C und D) hergestellt. Bei allen Methoden wurden das Phospholipid DPPC und Cholesterol in einem molaren Verhältnis von 7 : 3 eingesetzt. Aus den Molekulargewichten der eingesetzten Lipide und einem R6G-Gehalt von 0,03 % (w/v) errechnet sich somit für einen Ansatz von 10 ml pro Charge und einem Gesamtlipidgehalt der Liposomensuspension von 2 % (w/v) folgende Einwaage:

- DPPC 163,17 mg
- CH 36,83 mg
- R6G 3,00 mg

3.1.5.1.1 Filmmethode

Die Methoden A, B und C basieren auf der Filmmethode. Bei dieser Methode wird ein dünner Lipidfilm an der Wand eines Rundkolbens hergestellt. Nach Zugabe einer wässrigen Phase und unter Zuführung mechanischer Energie bilden sich daraus spontan multilamellare Vesikel (Lasic 1988; Lasch et al. 2002).

Die benötigten Lipidkomponenten wurden in einen 500 ml-Rundkolben eingewogen und in 40 ml eines organischen Lösungsmittelgemisches aus Chloroform und Methanol (Volumenverhältnis 2 : 1) gelöst. Der Kolben wurde kurz geschwenkt, bis die Lipide vollständig gelöst waren, und dann in einen Rotationsevaporator (Büchi Rotavapor R-114, Büchi, Flawil, Schweiz) eingespannt und in ein auf 60 °C temperiertes Wasserbad (Büchi Waterbath B-480, Büchi, Flawil, Schweiz) abgesenkt. Bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 120 Umdrehungen pro Minute wurde das Lösungsmittel verdampft. Dazu wurde an den Rotationsevaporator eine Vakuumpumpe (Membran-Vakuumpumpe MD 1C, Vacuumbrand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland) angeschlossen und der Druck im Kolben alle zehn Minuten schrittweise reduziert, sodass nach einer Stunde ein Vakuum hergestellt war. Der Lipidfilm, der sich dabei an der Wand des Rundkolbens bildete, wurde eine weitere Stunde unter Vakuum vollständig getrocknet. Im Anschluss wurde der Kolben abgenommen und der Film wurde je nach Methode mit 10 ml der unterschiedlichen R6G-Lösungen hydriert, die zuvor auf 60 °C temperiert worden waren.

Für Liposomen der **Methode A** wurde der Lipidfilm mit einer wässrigen R6G-Lösung hydriert. Dafür wurden 3 mg R6G in 10 ml Aqua dest. gelöst.

Bei der **Methode B** wurde das R6G in Form einer ethanolischen Lösung zugegeben (López-Pinto et al. 2005; Bendas und Tadros 2007; Dubey et al. 2007b). Zur Herstellung dieser Lösung wurden 3 mg R6G in 10 ml eines Ethanol-Aqua dest.-Gemisches (30 % Ethanol (v/v)) gelöst.

Zur Herstellung der Liposomen nach **Methode C** wurde das R6G in den Lipidfilm eingearbeitet, indem es zusammen mit den Lipiden in den Kolben eingewogen und im Lösungsmittelgemisch gelöst wurde (Touitou et al. 2001; Ulrich 2002; López-Pinto et al. 2005; Dubey et al. 2007a; Bhalaria et al. 2009). Nachdem das Lösungsmittelgemisch verdampft und der R6G-haltige Lipidfilm unter Vakuum getrocknet war, wurde er mit 10 ml Aqua dest. rehydriert.

Nach Zugabe der jeweiligen R6G Lösung bzw. des Aqua dest. wurde der Kolben mit Parafilm verschlossen und für eine weitere Stunde bei einer Wasserbadtemperatur von 60 °C und 90 Umdrehungen pro Minute in den Rotationsevaporator eingespannt. Danach wurde der Kolben

abgenommen, fünf Minuten gevortext (Lab dancer S40, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) und anschließend auf Eis gelagert.

3.1.5.1.2 Ethanolinjektions-Methode

Dieses Verfahren wurde angewendet, um Liposomen der **Methode D** herzustellen. Es handelt sich dabei um eine etablierte Methode zur Herstellung von wirkstoffbeladenen Vesikeln, die auch als Ethosomen bezeichnet werden (Dayan und Touitou 2000; Touitou et al. 2000; Touitou et al. 2001; Paolino et al. 2005; Dubey et al. 2007a; Elsayed et al. 2007; Jain et al. 2007). Die Lipide und das R6G wurden in ein Glasgefäß eingewogen und in 3 ml Ethanol gelöst. Nach Zugabe eines Magnetrührstäbchens wurde das Gefäß gut verschlossen, in ein auf 60 °C temperiertes Wasserbad auf einen beheizbaren Magnetrührer (Heidolph MR 3002, Heidolph Instruments GmbH und Co KG, Schwabach, Deutschland) gestellt und bei 700 Umdrehungen pro Minute wenige Minuten gerührt, bis die Feststoffe vollständig gelöst waren. Durch den Deckel des Gefäßes wurde dann eine Kanüle so weit eingestochen, bis sie in die Flüssigkeit eintauchte. Eine 50 ml Spritze, die zuvor mit 7 ml Aqua dest. befüllt und in einen Perfusor (Injectomat S, Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland) eingelegt worden war, wurde über eine ebenfalls mit Aqua dest. befüllte Heidelberger Verlängerung mit der Kanüle verbunden. Das Aqua dest. aus der Spritze wurde dann langsam mit einer Flussgeschwindigkeit von 200 µl pro Minute der ethanolschen Lösung zugegeben, die dabei weiterhin über den Magnetrührer gerührt wurde. Nachdem die 7 ml Aqua dest. auf diese Weise vollständig zugegeben worden waren, wurde die Lösung weitere fünf Minuten gerührt und dann auf Eis gelagert.

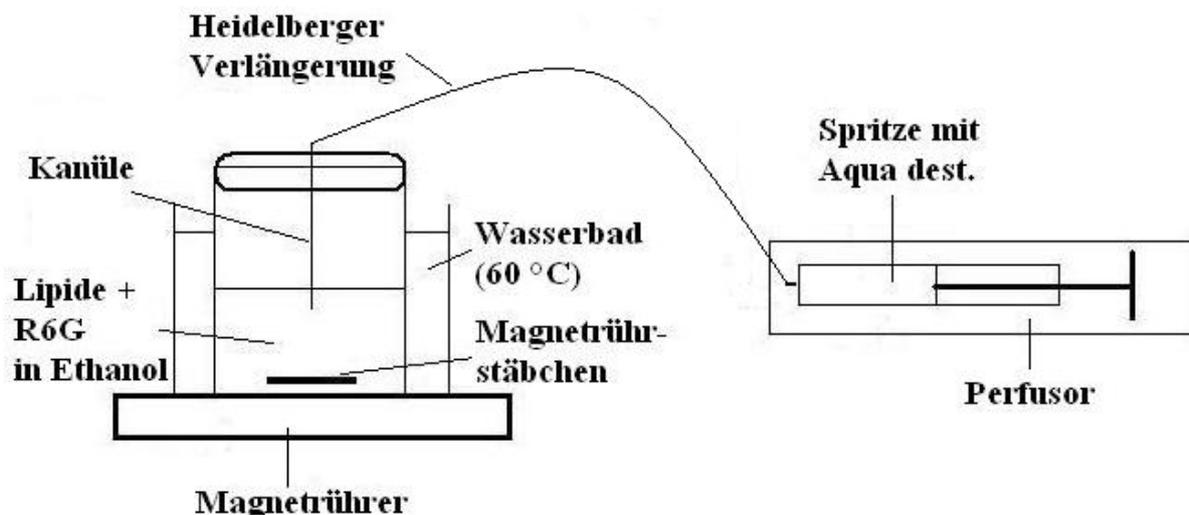


Abb. 9: Herstellung der Liposomen nach der Ethanolinjektions-Methode

3.1.5.1.3 Extrusion

Um eine Reduktion der Lamellenzahl und somit eine Verkleinerung der Vesikel sowie eine homogenere Größenverteilung zu erreichen, erfolgte die Extrusion der nach den unterschiedlichen Methoden hergestellten Liposomen durch eine Polycarbonatmembran mit 400 nm Porengröße (Olson et al. 1979; Mayer et al. 1986; MacDonald et al. 1991). Der Extruder (LiposoFast-Extruder, Avestin, Ottawa, Kanada) wurde im Wärmeschrank (Thermo Scientific Heraeus Function Line, Typ UT 12, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland) auf 70 °C vorgewärmt. Vor dem Einbau der Polycarbonatmembran in den Extruder wurde sie 30 Minuten in Aqua dest. eingelegt. Dann wurde jeweils 1 ml der Liposomensuspension blasenfrei in eine gasdichte Glasspritze aufgezogen, für fünf Minuten mit dem Extruder im Wärmeschrank auf 70 °C temperiert und schließlich 21 mal durch die Membran in eine gegenüberliegende Spritze gedrückt. Die extrudierten Liposomen wurden in einem Falcon Tube gesammelt und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

3.1.5.1.4 Zentrifugation

Nachdem die Liposomen über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert worden waren, wurden sie am darauf folgenden Tag zentrifugiert. Dieser Prozess diente der Entfernung von nicht liposomal verkapseltem R6G (Lasch et al. 2002). Dazu wurden die Liposomen in Eppendorfgefäße umgefüllt und mit einer Tischzentrifuge (Mikro 200 R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) vier mal 45 Minuten bei 4 °C und 15000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils abgenommen und das verbleibende Pellet mit einer entsprechenden Menge Aqua dest. resuspendiert. Danach erfolgte die Lagerung der Liposomen bis zur Charakterisierung und Verneblung wieder bei 4 °C im Kühlschrank.

3.1.5.6 Charakterisierung

Um die Liposomensuspension zu charakterisieren, wurden Größe, Verkapselungseffizienz, Verkapselungsrate und Verneblungsstabilität der Liposomen bei Verneblung mit dem Aeroneb[®] Solo untersucht.

3.1.5.6.1 Größenmessung

Die Größe der Liposomen (mittlerer Volumendurchmesser, VMD) sowie ihre Partikelgrößenverteilung (geometrische Standardabweichung, GSD) wurden mit einem Laserdiffraktometer (Sympatec, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland) und der zugehörigen Software untersucht. Es wurde eine R2 Linse (Brennweite 50 mm; Messbereich 0,25 bis 87,5 μm) verwendet. Die Messzeit betrug wie bei der Messung der Aerosolpartikelgrößen fünf Sekunden bei einer Zykluszeit von 50 Millisekunden.

Für die Messungen wurde eine Glasküvette mit ca. 40 ml Aqua dest. befüllt und im Laserstrahl platziert. Nach einer Referenzmessung wurden 100 μl der Liposomensuspension in die Küvette pipettiert. Durch ein Magnetrührstäbchen in der Küvette, das sich mit 50 RPM bewegte, wurde eine rasche Verteilung der Liposomen gewährleistet und ihr Sedimentieren verhindert. Nachdem sich die Liposomen so nach wenigen Sekunden homogen in der Küvette verteilt hatten, wurden pro Probe sechs Messungen durchgeführt, die von der zugehörigen Software im Fraunhofer-Modus ausgewertet wurden.

3.1.5.6.2 Bestimmung von Verkapselungseffizienz und Verkapselungsrate

Bei der Herstellung der Liposomen wird nicht das gesamte eingesetzte R6G in die Liposomen verkapselt. Ein Großteil des nicht verkapselten Farbstoffs wird bei der Zentrifugation entfernt. Ein Rest verbleibt in der Liposomensuspension. Um die Verkapselungseffizienz und die Verkapselungsrate zu bestimmen, wurden die Gesamtmenge sowie die Menge an liposomal verkapseltem R6G in der Liposomensuspension mittels eines Fluoreszenzreaders (Synergy 2, BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA) bestimmt. Dafür wurde ein Filterpaar mit λ_{ex} 530/25 nm und λ_{em} 600/40 nm verwendet.

Der Fluoreszenzreader wurde vor jeder Messung mit einer Eichreihe geeicht. Für die Eichreihe wurden ein Nullwert und fünf R6G-Konzentrationen eingesetzt (100, 75, 50, 25 und 10 ng/ml). Da die zu messenden Proben aus neun Teilen Ethanol und einem Teil R6G in Aqua dest. bestanden, wurden die Eichlösungen im gleichen Verhältnis hergestellt. Von jeder R6G-Konzentration wurde 1 ml hergestellt. Dazu wurde 1 mg R6G in 10 ml Aqua dest. gelöst.

Diese Stammlösung der Konzentration 100 µg/ml wurde in Aqua dest. auf eine Konzentration von 1 µg/ml verdünnt und dann zur Herstellung der Eichreihe verwendet. In Eppendorfgläsern wurden jeweils 900 µl Ethanol vorgelegt. Daraufhin wurden entsprechende Volumina der R6G-Lösung zugegeben und mit Aqua dest. auf 1 ml aufgefüllt.

R6G-Konzentration (ng/ml)	Ethanol (µl)	R6G-Lösung 1 µg/ml (µl)	Aqua dest. (µl)
Null	900	0	100
100	900	100	0
75	900	75	25
50	900	50	50
25	900	25	75
10	900	10	90

Tab. 1: Zusammensetzung der R6G-Eichreihe

Sowohl von der Eichreihe als auch von den Liposomenproben wurden von jeder Probe je 100 µl in Dreifachbestimmung auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Costar Assay Plate, 96 Well, Corning Incorporated, Corning, USA) pipettiert und nach der Messung automatisch gemittelt. Zur Bestimmung des Gesamt-R6G-Gehalts in der Liposomensuspension wurden 100 µl der Liposomensuspension in einem Eppendorfglas mit 900 µl Ethanol versetzt und für zehn Minuten bei 15 Hertz auf eine Rüttelplatte (TopMix FB15024, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) gestellt, um eine Zerstörung der Liposomen und hierdurch die vollständige Freisetzung des R6G zu erreichen.

Um das verkapselte R6G bestimmen zu können, wurden zuvor 200 µl der Liposomensuspension mit der Tischzentrifuge bei 4 °C und 15000 RPM für 45 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit einer entsprechenden Menge Aqua dest. resuspendiert. Dann wurden 100 µl des resuspendierten Pellets analog der zur Bestimmung des Gesamtgehaltes beschriebenen Methode behandelt.

Aus den gemessenen Werten konnten die Verkapselungseffizienz (VE) und die Verkapselungsrate (VR) in der Liposomenprobe berechnet werden.

Die VE gibt an, wie viel des zur Herstellung eingesetzten R6G in den Vesikeln enthalten ist und berechnet sich nach folgender Formel:

$$VE (\%) = \frac{\text{verkapseltes R6G (mg / ml)} * 100}{\text{zur Herstellung eingesetztes R6G (0,3 mg / ml)}}$$

Die VR gibt den Anteil an verkapseltem Farbstoff, bezogen auf den Gesamtfarbstoffgehalt in der Liposomensuspension, an:

$$VR (\%) = \frac{\text{verkapseltes R6G (mg / ml)} * 100}{\text{Gesamt-R6G-Gehalt in der Liposomensuspension (mg / ml)}}$$

3.1.5.6.3 Verneblungsstabilität

Die Stabilität der Liposomen gegenüber der Verneblung mit dem Aeroneb wurde untersucht, indem 3 ml der Liposomensuspension mit dem Aeroneb[®] Solo vernebelt wurden. Vor der Verneblung wurden die Liposomensuspensionen mit Aqua dest. auf definierte R6G-Konzentrationen von 5 oder 10 µg/ml verdünnt.

Die Messung der bei der Verneblung generierten Aerosolpartikel erfolgte wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben. Der Rest der vernebelten Liposomensuspension wurde aufgefangen, indem der Vernebler auf ein Falcon Tube aufgesetzt wurde, an dessen Wand sich das Aerosol abscheiden konnte. Außerdem wurden Output und Verneblungsdauer erhoben.

Von den im Falcon Tube aufgefangenen Liposomen wurden Größe und Verkapselungsrate wie in Kapitel 3.1.5.6.1 und 3.1.5.6.2 beschrieben bestimmt. Außerdem konnte durch Messung des Gesamt-R6G-Gehalts die Wiederfindung nach der Verneblung unter Zugrundelegung der folgenden Formel berechnet werden:

$$\text{Wiederfindung (\%)} = \frac{\text{Gesamt-R6G im aufgefangenen Aerosol (mg / ml)} * 100}{\text{Gesamt-R6G in der Liposomensuspension vor Verneblung (mg / ml)}}$$

3.1.6 Nachweis von Sildenafil mittels HPLC

Zum quantitativen Nachweis von Sildenafil wurden alle Proben nach der Entnahme bis zu ihrer Messung in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -20 °C gelagert. Die Sildenafil-Bestimmung erfolgte in einer HPLC-Anlage (Agilent 1100, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) durch UV-Detektion bei einer Detektionswellenlänge von 230 nm. Mit einem Injektionsvolumen von 100 µl wurden die Proben durch einen automatischen Probengeber (Smartline Autosampler 3900, Knauer, Berlin, Deutschland) in die Anlage, die aus einer binären Pumpe und einem Dioden-Array-Detektor besteht, eingespritzt. Nach Passage einer Vorsäule (LiChroCART®-Kartusche 4*4 mm, LiChrospher® RP-18e, 5 µm, Merck, Darmstadt, Deutschland) zur Abtrennung von Schmutzpartikeln gelangten die Proben zur analytischen Säule (LiChroCART® 125*4 mm Säule, gefüllt mit LiChrospher® 100, RP-18e, 5 µm, Merck, Darmstadt, Deutschland). Die mobile Phase bestand aus einem Phosphatpuffer (4,0826 g KH₂PO₄ in einem Liter Aqua dest.), der mit NaOH auf einen pH-Wert von 6 titriert wurde und Acetonitril. Diese beiden Anteile wurden gefiltert, durch Einleitung von Helium entgast und in einer Mischung aus 55 % Phosphatpuffer und 45 % Acetonitril in die Anlage geleitet. Bei einer Betriebstemperatur von 40 °C und einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min lag die Retentionszeit von Sildenafil bei ca. neun Minuten. Zur Messung und Auswertung der Proben wurde vor jeder Messung eine Standardreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen von Sildenafil angefertigt. Dazu wurde Sildenafil in dem Lösungsmittel gelöst, in dem sich später auch die Proben befanden, und mit mobiler Phase auf definierte Konzentrationen verdünnt.

3.1.7 Untersuchungen zur Wiederfindung von Sildenafil

In Versuchen der Arbeitsgruppe der Verfasserin war ein zeitabhängiger Verlust von Sildenafil in einem Modellsystem der isolierten Kaninchenlunge aufgefallen. Da dieser Verlust auch in dem kurzgeschlossenen System ohne Lunge auftrat, wurde angenommen, dass es zur Adhäsion des Sildenafils an die Wände der Schläuche kam. Da für eine quantitative Sildenafil-Analytik ein Verlust der Substanz ausgeschlossen werden musste, wurden in einer Versuchsreihe die zur Aufbewahrung der Sildenafillösungen, der Sildenafil-Liposomensuspensionen und der Proben verwendeten Gefäße untersucht. Um die Wiederfindung der Substanz bei den Versuchen mit der isolierten Kaninchenlunge zu gewährleisten, wurden Schläuche aus unterschiedlichen Materialien getestet, um anschließend ein System aus einem geeigneten Schlauch herstellen zu können.

3.1.7.1 Sildenafil in Eppendorf-Reaktionsgefäßen

Bei zwei Versuchen wurden je 1,5 mg Sildenafil (Base, AK Scientific, USA) in 10 ml Aqua dest. gelöst. Für jeden Versuch wurden vier Eppendorf-Reagiergefäße mit je 1 ml dieser Lösung gefüllt. Diese wurden unterschiedlich lange bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Nach 0, 60, 180 und 300 Minuten wurde je ein Reagiergefäß pro Versuch entnommen. Es wurden die Sildenafilgehalte in den eingesetzten Sildenafillösungen sowie in den zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommenen Eppendorf-Gefäßen bestimmt. Die prozentuale Sildenafil-Wiederfindung in den zu den definierten Zeitpunkten entnommenen Proben wurde auf die Sildenafilgehalte in den eingesetzten Sildenafillösungen bezogen.

3.1.7.2 Sildenafil in Falcon Tubes

Die Nachweisbarkeit des Sildenafil (Base, AK Scientific, USA) in Falcon Tubes wurde zusätzlich bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht. Dazu wurde 1 mg Sildenafil in 10 ml Aqua dest. gelöst. Je 1 ml aus dieser Sildenafillösung der Konzentration 100 µg/ml wurde in drei mit 30 ml gepufferter Elektrolytlösung (II N) gefüllte Falcon Tubes aus Polypropylen (Blue Max[®] Polypropylene Conical Tube, 50 ml, Becton Dickinson Labware) pipettiert. Je ein Ansatz wurde bei 4 °C, 25 °C bzw. 37 °C über einen Zeitraum von fünf Stunden inkubiert (je ein Versuch pro Temperatur). Nach 0, 10, 30, 60, 120, 180 und 300 Minuten wurden Proben von je 1 ml aus jedem Gefäß entnommen. Es wurden die Sildenafilgehalte in der eingesetzten Sildenafillösung sowie in den zu den genannten Zeitpunkten entnommenen Proben bestimmt. Die Sildenafilkonzentration in der direkt nach Sildenafilzugabe und gründlichem Durchmischen entnommenen Null-Probe entspricht bei der Berechnung der prozentualen Wiederfindung einer Wiederfindung von 100 % im jeweiligen Falcon Tube.

3.1.7.3 Sildenafil in Glasgefäßen mit Schläuchen

Es wurden Schläuche aus den Materialien Teflon, Polyurethan, Polytetrafluorethylen (PTFE) und C-FLEX[®] getestet. Um nicht aus jedem getesteten Schlauchmaterial ein System bauen zu müssen, wurden Proben der verschiedenen Schläuche in Glasgefäßen mit Sildenafillösung inkubiert. Da die getesteten Schlauchstücke unterschiedlich lang waren und unterschiedliche Durchmesser besaßen, musste das Verhältnis von eingesetzter Schlauchoberfläche zu Volumen der Sildenafillösung vereinheitlicht werden. Die Länge der Schläuche wurde so gewählt, dass alle Schlauchstücke eine Gesamtoberfläche von 90,8 cm² hatten. Dies entsprach einem Zehntel der berechneten Innenfläche des für die Lungenversuche erforderlichen

Systems. Dabei musste beachtet werden, dass bei den hier beschriebenen Versuchen sowohl die Innen- als auch die Außenfläche der aufgeschnittenen Schläuche mit der Sildenafillösung in Kontakt kam. Daher berechnete sich die einzusetzende Schlauchlänge nach folgender Formel (unter Vernachlässigung der Schnittflächen):

$$\text{Schlauchlänge (cm)} = \frac{\text{Oberfläche (90,8 cm}^2\text{)}}{2 * \pi * (d_i + d_a)}$$

d_i = Innendurchmesser des Schlauches

d_a = Außendurchmesser des Schlauches

	Teflon	Polyurethan	PTFE	C-FLEX®
Innendurchmesser (cm)	0,5	0,6	0,5	0,3
Außendurchmesser (cm)	0,6	1,0	0,7	0,7
Errechnete Schlauchlänge (cm)	13	18	24	29

Tab. 2: Berechnung der Schlauchlängen für die Versuche zur Sildenafil-Wiederfindung

Vom PTFE-Schlauch konnten nicht die errechneten 24 cm, sondern nur 14 cm eingesetzt werden, da ausreichendes Schlauchmaterial nicht zur Verfügung stand.

Die Schläuche wurden der Länge nach aufgeschnitten und in Glasgefäßen mit 30 ml Sildenafillösung inkubiert. Dies entsprach ebenfalls einem Zehntel des in den Lungenversuchen eingesetzten Perfusatvolumens. Für die Sildenafillösung wurde 1 mg Sildenafil (Base, AK Scientific, Inc., USA) in 1 ml Aqua dest. gelöst. Daraus wurden 40 µl in 200 ml gepufferte Elektrolytlösung (II N) pipettiert, um eine Konzentration von 200 ng/ml zu erreichen. Aus dieser Lösung wurden je 30 ml in Glasgefäße gefüllt. Schließlich wurden die aufgeschnittenen Schläuche zugegeben, die Gefäße wurden mit Parafilm verschlossen und auf einem Schwenktisch (Nutating Mixer, VWR international, Löwen, Belgien) fünf Stunden in einem Wärmeschrank (IR 1500, Flow Laboratories, Irvine, Großbritannien) bei 37 °C inkubiert. Vor Zugabe der Schläuche sowie sofort nach Zugabe (0) und 60, 180 und 300 Minuten danach wurde aus jedem Gefäß je 1 ml Probe entnommen. Um einen Einfluss des Glases auf die Sildenafilkonzentration auszuschließen, wurde außerdem ein Kontrollansatz ohne Schläuche mitgeführt, aus dem nur zu Beginn und am Ende des Versuches eine Probe entnommen wurde. Mit jedem Schlauchstück wurden drei Versuche durchgeführt. Die

prozentuale Wiederfindung des Sildenafilis bezieht sich auf die vor Schlauchzugabe im jeweiligen Gefäß gemessene Sildenafilkonzentration.

3.1.7.4 Clear C-FLEX[®] System

Aus Clear C-FLEX[®] - Schläuchen unterschiedlicher Durchmesser wurde ein System gebaut, wie es später für die Versuche mit der isolierten Kaninchenlunge benötigt wurde. Die Sildenafil-Wiederfindung in diesem System wurde sowohl mit der Sildenafil Base von AK Scientific (n=4), als auch mit der Sildenafil Base von bioKEMIX (n=6), die später für die Versuche verwendet wurde, untersucht. Dafür wurde 1 mg Sildenafil in 1 ml Aqua dest. gelöst. Da das Sildenafil von bioKEMIX schlecht wasserlöslich war, musste das Aqua dest. zuvor durch Zugabe von HCl auf einen pH-Wert von 2 titriert werden. Aus den so hergestellten Sildenafillösungen wurden je 60 µl zu 300 ml gepufferter Elektrolytlösung (II N) zugegeben, sodass sich wie bei den Versuchen mit den Schlauchstücken eine Sildenafilkonzentration von 200 ng/ml ergab. Nach gründlichem Durchmischen wurde die Lösung in das geschlossene System gefüllt, wo sie fünf Stunden zirkulierte, wobei das System auf 40 °C temperiert wurde. Nach 0 (direkt nach Befüllen des Systems), 60, 180 und 300 Minuten wurden Proben von je einem ml aus dem System entnommen. Vor Einfüllen der sildenafilhaltigen Elektrolytlösung ins System wurde bei jedem Versuch die darin enthaltene Wirkstoffkonzentration gemessen. Diese entspricht in der Berechnung der prozentualen Wiederfindung in den zu den definierten Zeitpunkten entnommenen Proben 100 %.

3.1.8 Liposomen mit Sildenafil

3.1.8.1 Herstellung der Liposomen

Die Liposomen wurden in Anlehnung an die Liposomen mit R6G, **Methode C**, nach der in Kapitel 3.1.5.1.1 beschriebenen Filmmethode hergestellt. Dazu wurden DPPC und Cholesterol in einem molaren Verhältnis von 8 : 2 sowie das Sildenafil (Base, bioKEMIX) in einen Glasrundkolben eingewogen und in 32 ml eines Lösungsmittelgemisches aus Chloroform und Methanol im Verhältnis 2 : 1 (v/v) gelöst. Aus den Molekulargewichten der Lipide und einem Sildenafilgehalt von einem mg/ml errechnet sich somit für einen Ansatz von 8 ml folgende Einwaage:

- DPPC 141,38 mg
- CH 18,62 mg
- Sildenafil 8,00 mg

Der Kolben wurde dann in den Rotationsevaporator eingespannt, wo bei einer Wasserbadtemperatur von 60 °C über eine Stunde, während der der Druck schrittweise reduziert wurde, das Lösungsmittelgemisch verdampft wurde. Der Lipidfilm mit dem Sildenafil, der sich dabei an der Wand des Rundkolbens bildete, wurde eine weitere Stunde unter Vakuum vollständig getrocknet. Schließlich wurde der Film mit 8 ml PBS (pH 7,4) hydriert und nach Verschließen des Kolbens mit Parafilm eine weitere Stunde bei 60 °C rotiert. Um ein vollständiges Ablösen des Films und eine homogenere Größenverteilung der Liposomen zu erreichen, wurde der Kolben anschließend 15 Minuten unter leichter manueller Rotation in ein Ultraschallbad, das ebenfalls auf 60 °C temperiert war, gehalten. Eine Extrusion der Liposomen war nicht möglich, da bei dem Versuch, die Suspension mit der Spritze durch die Membran des Extruders zu drücken, ein ungewöhnlich hoher Widerstand auftrat. Die Liposomensuspension wurde in ein 15 ml Falcon Tube gefüllt und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

3.1.8.2 Verneblung mit Pari LC Sprint® Star und Microsprayer

Die mit Sildenafil beladenen Liposomen wurden mit dem Pari LC Sprint® Star und dem MicroSprayer® vernebelt.

Zur Verneblung mit dem Pari LC Sprint® Star wurde der Vernebler mit 3 ml der Liposomensuspension befüllt. Es wurden die Aerosolpartikelgrößen und der Output des

Verneblers nach 15 Minuten Verneblungsdauer bestimmt. Die Verneblungsdauer wurde auf 15 Minuten begrenzt, da sich so noch ausreichend Rückstand im Vernebler befand, der zur Charakterisierung der darin enthaltenen Liposomen entnommen werden konnte. Nach der Messung der Aerosolpartikelgrößen wurde das Aerosol aufgefangen, um die darin enthaltenen Liposomen ebenfalls charakterisieren zu können. Da das Aerosol, das aus dem Vernebler austrat, zu langsam war, um aufgefangen werden zu können, wurde auf die Austrittsöffnung des Verneblers ein Aufsatz aufgesetzt. Dieser bestand aus einem abgesägten unteren Ende eines 15 ml Falcon Tubes mit abgesägter Spitze. Durch diese Verkleinerung der Austrittsöffnung wurde die Austrittsgeschwindigkeit des Aerosols erhöht, an der Wand eines davor gehaltenen Eppendorf-Reaktionsgefäßes kam es zur Impaktion, und das Aerosol konnte so aufgefangen werden.

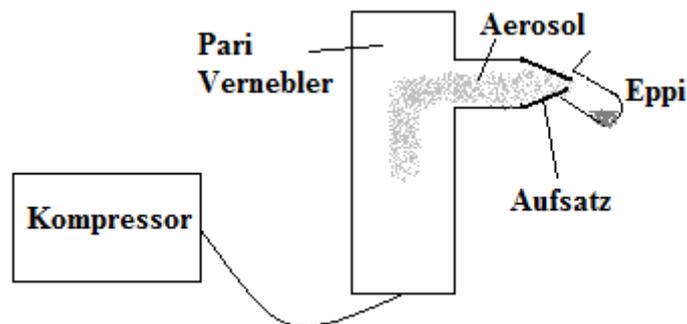


Abb. 10: Auffangen des Aerosols aus dem Pari LC Sprint® Star

Bei der Verneblung der Liposomen mit dem MicroSprayer® wurde aufgrund des damit verbundenen hohen Materialverbrauches auf eine Messung der Aerosolpartikelgrößen verzichtet. Die Sonde des mit 1 ml der Liposomensuspension befüllten MicroSprayers® wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gehalten, sodass das Aerosol darin aufgefangen werden konnte. Es wurden der Output aus der Spritze sowie das nach der Verneblung in der Sonde verbleibende Residuum gravimetrisch bestimmt.

3.1.8.3 Charakterisierung

Um die Liposomensuspension zu charakterisieren, wurden Größe, Verkapselungseffizienz, Verkapselungsrate und Verneblungsstabilität der Liposomen bei Verneblung mit dem MicroSprayer[®] und dem Pari LC Sprint[®] Star untersucht.

3.1.8.3.1 Größenmessung

Nach Zugabe von 30 µl der Liposomensuspension in die mit Aqua dest. befüllte Küvette erfolgte die Messung des medianen Volumendurchmessers (VMD) und der zugehörigen geometrischen Standardabweichung (GSD) der Liposomen wie in Kapitel 3.1.5.6.1 beschrieben. Die Messungen wurden nach der Herstellung, in den aufgefangenen Aerosolen nach Verneblung mit dem Pari LC Sprint[®] Star und dem MicroSprayer[®] sowie in der aus dem Rückstand des Pari LC Sprint[®] Star entnommenen Liposomensuspension durchgeführt.

3.1.8.3.2 Bestimmung von Verkapselungseffizienz und Verkapselungsrate

Zur Bestimmung von Verkapselungseffizienz (VE) und Verkapselungsrate (VR) wurden die Gesamt-Sildenafilkonzentrationen sowie das nicht liposomal verkapselte Sildenafil in den Liposomensuspensionen nach der Herstellung, in den aufgefangenen Aerosolen nach Verneblung mit dem Pari LC Sprint[®] Star und dem MicroSprayer[®] sowie in der aus dem Rückstand des Pari LC Sprint[®] Star entnommenen Liposomensuspension mittels HPLC bestimmt.

Um den Gesamt-Sildenafilgehalt der Liposomensuspension bestimmen zu können, mussten die Liposomen zuvor zerstört werden, sodass das liposomal verkapselte Sildenafil freigesetzt wurde. Dazu wurden 100 µl der Liposomensuspension in einem Eppendorfgefäß mit 900 µl Methanol versetzt und für zehn Minuten bei 15 Hertz auf eine Rüttelplatte gestellt.

Das freie Sildenafil wurde im Überstand nach Zentrifugation von 200 µl der Liposomen mit der Tischzentrifuge bei 4 °C und 15000 RPM für 60 Minuten bestimmt. Zur Verbesserung der Messbarkeit wurden 50 µl des Überstandes mit 450 µl Methanol verdünnt. Das verkapselte Sildenafil wurde aus der Differenz zwischen dem Gesamtgehalt und dem freien Sildenafil berechnet.

Aus den gemessenen Werten konnten die Verkapselungseffizienz (VE) und die Verkapselungsrate (VR) in der Liposomenprobe berechnet werden.

Die Verkapselungseffizienz (VE) gibt an, wie viel des zur Herstellung eingesetzten Sildenafil in den Vesikeln enthalten ist und berechnet sich nach folgender Formel:

$$VE (\%) = \frac{\text{verkapseltes Sildenafil (mg / ml)} * 100}{\text{zur Herstellung eingesetztes Sildenafil (1 mg / ml)}}$$

Die Verkapselungsrate (VR) gibt den Anteil an verkapseltem Sildenafil, bezogen auf den Gesamtsildenafilgehalt in der Liposomensuspension, an:

$$VR (\%) = \frac{\text{verkapseltes Sildenafil (mg / ml)} * 100}{\text{Gesamtsildenafilgehalt in der Liposomensuspension (mg / ml)}}$$

3.1.8.3.3 Wiederfindung nach Verneblung

Die Sildenafilwiederfindung in den aufgefangenen Aerosolen bzw. in dem aus dem Pari LC Sprint® Star entnommenen Rückstand bezieht sich auf die Gesamtsildenafilgehalte der Suspensionen. Dabei entspricht der nach der Herstellung gemessene Sildenafilgehalt 100 % der jeweiligen Charge. Die Wiederfindung (WF) berechnet sich somit nach folgender Formel:

$$WF (\%) = \frac{\text{Gesamtsildenafilgehalt im Aerosol bzw. Rückstand (mg / ml)} * 100}{\text{Gesamtsildenafilgehalt in der Liposomensuspension nach Herstellung (mg / ml)}}$$

3.1.8.4 In vitro Freisetzungsversuche

Die Sildenafil-Freisetzung aus den Liposomen wurde in vitro in vierprozentiger Albumin-Lösung untersucht. Um Sink-Bedingungen zu erreichen, wurden Falcon-Tubes mit 14,4 ml Albumin-Lösung befüllt, zu denen dann je 0,6 ml der Liposomensuspension zugegeben wurden. Durch diese Verdünnung wird ein Konzentrationsgefälle erreicht, das eine Freisetzung des Sildenafil aus den Liposomen über einen längeren Zeitraum ermöglicht. Die Ansätze wurden im Wärmeschrank (IR 1500, Flow Laboratories, Irvine, Großbritannien) bei 37 °C auf einem Schwenktisch über fünf Stunden inkubiert. Sofort nach Zugabe der Liposomen (Zeitpunkt 0) sowie nach 5, 10, 20, 30 und im weiteren Verlauf alle 30 Minuten bis zum Ende des Versuches nach 300 Minuten wurden je 550 µl Proben entnommen, die nach der Entnahme sofort auf Eis gelagert wurden. Um das freigesetzte Sildenafil bestimmen zu können, wurden die in den Proben noch enthaltenen Liposomen in einer Tischzentrifuge

bei 4 °C und 15000 RPM für 60 Minuten abzentrifugiert. Aus jeder Probe wurden 500 µl Überstand zur Bestimmung des Sildenafilgehalts mittels HPLC entnommen. Nachdem die Proben bis zur Messung bei -20 °C gelagert worden waren, wurden sie direkt vor der Messung wie in Kapitel 3.1.8.5.4 beschrieben behandelt.

Zusätzlich wurden zum Zeitpunkt 0 sowie nach 150 und 300 Minuten Proben zur Kontrolle des Gesamtsildenafilgehaltes im Versuchsansatz entnommen. Dazu wurden 50 µl Probe entnommen, die zur Zerstörung der Liposomen und vollständigen Freisetzung des Sildenafils mit 450 µl Methanol versetzt und zehn Minuten auf die Rüttelplatte gestellt wurden.

Der prozentuale Anteil an freigesetztem Sildenafil bezieht sich auf den im jeweiligen in vitro-Versuch gemessenen Gesamt-Sildenafilgehalt (Mittelwert aus den drei Messungen pro Versuch zu verschiedenen Zeitpunkten).

3.1.8.5 Untersuchungen an der isolierten, ventilerten und blutfrei perfundierten

Kaninchenlunge

3.1.8.5.1 Das Modell

Die isolierte, ventilerte und blutfrei perfundierte Kaninchenlunge ist ein in der Arbeitsgruppe bereits gut etabliertes Modell, das Untersuchungen von Pharmakokinetik und –dynamik inhalativ verabreichter Farb- und Wirkstoffe ohne störende zentrale, humorale und metabolische Einflüsse erlaubt (Seeger et al. 1994; Lahnstein et al. 2008; Beck-Broichsitter et al. 2009; Lahnstein 2009; Beck-Broichsitter et al. 2010; Rüscher 2010). Da es bei früheren Versuchen in der eigenen Arbeitsgruppe zu einem zeitabhängigen Verlust von Sildenafil in einem Modellsystem, das für die Versuche mit der isolierten Kaninchenlunge verwendet wurde, gekommen war, wurden zunächst verschiedene Schlauchmaterialien getestet (s. Kapitel 3.1.7.3 und 3.1.7.4). Für die in der eigenen Arbeit durchgeführten Versuche mit Sildenafil wurde das Perfusionssystem dann aus Clear C-FLEX®-Schläuchen gebaut, da der Wirkstoff in diesem System ohne Verluste nachweisbar war (s. Kapitel 3.2.3.4).

Aus zwei doppelwandigen Vorratsgefäßen, die gleichzeitig oder alternierend in den Kreislauf eingeschaltet werden konnten, wurde das Perfusionsmedium durch eine Peristaltikpumpe (Roller Pump BP 742, Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) rezirkulierend durch das System gepumpt. Dabei passierte es erst einen Pallfilter (Pall Cardioplegia Plus 0,2 µm, Pall Biomedical Corp., Fajardo, USA) zum Schutz vor Embolien und dann eine Blasenfalle zur Eliminierung evtl. noch vorhandener Luftblasen, bevor es über die Arteria pulmonalis in die Lunge gelangte. Über einen in den linken Ventrikel eingenähten Ablauf verlief es das

Organmodell dann wieder und floss durch einen zur Probenentnahme zwischengeschalteten Dreiwegehahn zurück in die Vorratsgefäße. Diese konnten, da sie doppelwandig waren, über einen Wärmeregler (Thermomix BU, Braun, Melsungen, Deutschland) auf 40 °C temperiert werden, ebenso wie die Kammer, in der die Lunge hing und eine Glasspirale, die das Perfusat vor Eintritt in die Lunge passierte.

3.1.8.5.2 Präparation, Perfusion und Ventilation der Lunge

Das Perfusionssystem wurde für den Versuch vorbereitet, indem Gefäße und Schläuche erst mit 500 ml Aqua dest, dann mit 500 ml isotoner Kochsalzlösung und schließlich mit 500 ml gepufferter Elektrolytlösung (1/3) gespült wurden, wobei Luftblasen entfernt wurden. Danach wurden beide Vorratsgefäße mit der Elektrolytlösung befüllt.

Nach Punktion einer Ohrvene von männlichen Kaninchen der Rasse New Zealand White mit einem Gewicht von 2,5 - 3,2 kg wurde eine Allgemeinanästhesie intravenös durch ein Gemisch aus Xylazin (Xylazin 2 %, Veva Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf, Deutschland) und Ketamin (Ketamin 10 %, bela-pharm GmbH & Co. KG, Vechta, Deutschland) im Verhältnis 2 : 1 eingeleitet und während der Operation aufrecht erhalten. Eine Antikoagulation wurde durch die intravenöse Gabe von 5000 I.E. Heparin (Heparin 25000 I.E., ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) erzielt. Nach Erreichen der Bewusstlosigkeit des Tieres erfolgte eine Fixation des Kaninchens auf dem Tisch in Rückenlage. Nach prätrachealer subkutaner Applikation von 8 ml eines Lokalanästhetikums (Xylocain® 1 %, AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland) wurde die Trachea frei präpariert, eröffnet und intubiert. Nun konnten die Kaninchen über eine Beatmungspumpe (cat/ rabbit Ventilator, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) mit einer Frequenz von 30 Atemzügen pro Minute und einem Atemzugvolumen von 30 ml mit Raumluft beatmet werden. Nach erfolgter Laparotomie ca. 1 cm caudal des Sternums wurde durch vorsichtige Inzision des Zwerchfells ein Pneumothorax angelegt. Dadurch kollabierte die Lunge, sodass das Diaphragma entlang der Rippen abgelöst und eine mediane Sternotomie durchgeführt werden konnte. Die Thoraxhälften wurden gespreizt und seitlich fixiert, der Thymus wurde stumpf abpräpariert und der Herzbeutel eröffnet. Nun wurde der rechte Ventrikel eröffnet, ein flüssigkeitsgefüllter Perfusionskatheter wurde blasenfrei in die Pulmonalarterie vorgeschoben und dort mit einer Ligatur fixiert. Zu diesem Zeitpunkt startete die Perfusion der Lunge mit der auf 4 °C gekühlten gepufferten Elektrolytlösung (1/3) bei einem Fluss von 10 ml pro Minute. Um einen Abfluss des Perfusats zu gewährleisten, wurde sofort im Anschluss die Herzspitze vom Herz abgetrennt.

Mit Beginn der artifiziellen Perfusion begann die Beatmung mit einem Gasgemisch aus Kohlendioxid (5,3 %), Sauerstoff (21 %) und Stickstoff (73,7 %). Nach erfolgter Ligatur der Aorta konnten Trachea, Lunge und Herz zusammenhängend aus dem Brustkorb entnommen werden. Schließlich wurden der rechte Ventrikel und die Papillarmuskeln im linken Ventrikel entfernt, das linke Herzohr wurde abgebunden und ein Abfluss wurde mittels Tabaksbeutelnaht in den linken Ventrikel eingenäht. Damit konnte der Perfusionskreislauf geschlossen werden. Die Lungen wurden in einer auf 4 °C temperierten Kammer frei aufgehängt, sodass über eine Wägezelle (Typ U1, Hottinger Baldwin Messtechnik, Deutschland) mit angeschlossenem Messverstärker (Plugsys DBA 660, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) das Lungengewicht auf einem Schreiber (Rikadenki R 50 Series, Rikadenki Electronics, Freiburg, Deutschland) aufgezeichnet werden konnte. Während die Temperatur der Perfusionsflüssigkeit und der Kammer auf 40 °C erhöht wurde, erfolgte eine schrittweise Erhöhung der Perfusionsgeschwindigkeit auf 100 ml/min. Der linksventrikuläre Druck (LVP) wurde auf 1,4 – 1,6 mmHg und der end-expiratorische Druck (PEEP) auf 1 cm Wassersäule eingestellt. Danach wurde ein Perfusatwechsel durchgeführt, bei dem die bei der Präparation verwendete Elektrolytlösung durch vorgewärmte, entgaste Albumin-Lösung ersetzt wurde. Zu Versuchsbeginn betrug das Perfusativolumen 300 ml. Pulmonalarterieller Druck (PAP) und LVP wurden während des Versuches über zwei mit Perfusat gefüllte Katheter in den Perfusatschläuchen kurz vor der Pulmonalarterie bzw. dem linken Ventrikel aufgenommen. Zusammen mit dem Beatmungsdruck, der im expiratorischen Schenkel des Beatmungssystems gemessen wurde, wurden die Drucksignale durch elektromechanische Druckumwandler (Combitrans, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in elektrische Signale umgewandelt und auf dem angeschlossenen Computer aufgezeichnet. Der pH-Wert des Perfusats wurde während des Versuches regelmäßig kontrolliert und lag bei 7,3 – 7,4.

Für die Versuche wurden nur solche Lungen verwendet, die ein gleichmäßiges weißes Aussehen ohne Anzeichen von Hämostase oder Atelektasen aufwiesen und einen PAP und LVP im normalen Bereich hatten. Auch eine Ödembildung, die sich durch eine Gewichtszunahme der Lunge von mehr als 10 g über den Versuchszeitraum von fünf Stunden zeigte, war ein Ausschlusskriterium.

3.1.8.5.3 Versuchsdurchführung

Vor dem Perfusatwechsel wurde der Pallfilter abgeklemmt und das Perfusat wurde während des Versuches über einen Bypass geleitet. Für die Lungenversuche wurden je 1 ml freies

Sildenafil (Base, bioKEMIX, 1 mg/ml, gelöst in Aqua dest bei pH 2; n=4) oder liposomal verkapseltes Sildenafil (n=4) mit dem MicroSprayer[®] vernebelt. Dessen Sonde war schon bei der Präparation in den Trachealtubus integriert. Die Spitze der Sonde endete mit dem Tubus ca. 1,5 cm vor der Bifurkation der Trachea.

Die Verneblung erfolgte während der Inspiration. Dazu wurde die Atemfrequenz kurzzeitig auf fünf Atemzüge pro Minute reduziert. Vor der Verneblung wurde eine Perfusatprobe (Null-Probe) entnommen. Der Output aus der MicroSprayer[®]-Spritze wurde gravimetrisch bestimmt. Die Sonde wurde nach der Applikation aus der Trachea entfernt.

Nach der Applikation wurden nach 5, 10, 20, 30 und im weiteren Versuchsverlauf alle 30 Minuten bis zum Ende des Versuches nach 300 Minuten je 1,1 ml Probe aus dem Perfusat entnommen. Während den Experimenten kam es durch Probenentnahmen, Verdunstung und Tropfenbildung zu einem Perfusatverlust. Da die im Perfusat gemessenen Wirkstoffkonzentrationen somit falsch zu hoch waren, wurden die gemessenen Werte rechnerisch durch folgende, in der Arbeitsgruppe der Verfasserin entwickelte Formel korrigiert (Lahnstein 2009):

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

$C_{corr}(t)$ = korrigierte Wirkstoffkonzentration im Perfusat zum Zeitpunkt (t)

$C(t)$ = gemessene Wirkstoffkonzentration im Perfusat zum Zeitpunkt (t)

$V_p(t)$ = Perfusatvolumen zum Zeitpunkt (t)

$V_p(0)$ = Perfusatvolumen zum Zeitpunkt 0

Mithilfe dieser Formel konnte der Wirkstoffübertritt aus der Lunge ins Perfusat bestimmt werden.

Um das nach Versuchsende in der Lunge verbleibende Sildenafil quantifizieren zu können, wurden die Lungen lavagiert. Die Lavagen wurden zunächst mit drei mal 50 ml gepufferter Elektrolytlösung durchgeführt. Um eine bessere Wiederfindung des schlecht wasserlöslichen Wirkstoffs zu erzielen, wurden die Lungen anschließend noch mit 50 ml Methanol lavagiert. Von den Elektrolyt-Lavagen wurden sofort nach ihrer Gewinnung aus jeder der drei pro Versuch durchgeführten Lavagen je 2 ml entnommen, gepoolt und mit 6 ml Methanol versetzt. Dies verbesserte die Messbarkeit der Substanz mittels HPLC. Alle Lavagen wurden anschließend, wie auch die Proben, bis zur Messung bei -20 °C gelagert.

3.1.8.5.4 Aufbereitung der Proben und Lavagen

Um den Sildenafilgehalt in den Proben aus den in vitro Freisetzungsversuchen und den Lungenversuchen mittels HPLC messen zu können, musste das Sildenafil zuvor aus den Proben extrahiert werden. Dies geschah in Anlehnung an ein von Sheu et al. entwickeltes Protokoll zur Messung von Sildenafilkonzentrationen in humanem Plasma (Sheu et al. 2003). Dazu wurden 500 µl jeder Probe mit 50 µl des internen Standards Butylparaben (Butyl 4-Hydroxybenzoat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) versetzt. Dieser war in einer Konzentration von 20 µg/ml in Methanol gelöst. Zusätzlich wurden 50 µl einmolare NaOH und 500 µl Methanol zugegeben. Anschließend wurden die Proben gründlich gevortext. Die Methanol-Zugabe entfiel bei den Lavagen, da diese bereits ausreichend Methanol enthielten. Nachdem den Proben in zwei Extraktionsschritten insgesamt 3 ml Ethylacetat zugegeben und diese kurz durchmischt worden waren, wurden sie kurz ruhen gelassen, um eine Phasentrennung zu erreichen. Dann wurde die organische Phase entnommen, in ein neues Reagenzglas überführt und bei 40 °C unter Stickstoff vollständig evaporiert. Das Residuum wurde in 500 µl mobiler Phase aufgenommen und gründlich gevortext. Schließlich wurde die Probe in ein Eppendorf-Gefäß überführt und eine Minute bei 10000 RPM zentrifugiert. Der Sildenafilgehalt wurde im Überstand bestimmt.

Bei dieser relativ aufwändigen Probenaufarbeitung war davon auszugehen, dass es durch die Eintrocknungs- und Extraktionsschritte zu einem Verlust von Sildenafil in den Proben kam. Um diesen Verlust quantifizieren zu können, wurde sowohl den Proben als auch der Standardreihe der interne Standard Butylparaben, der sich in den Proben ähnlich verhält wie das zu messende Sildenafil, in definierter Menge zugegeben und mittels HPLC gemessen. Da die ursprünglich in der Probe enthaltene Butylparabenmenge bekannt war, konnte durch den Vergleich der Messergebnisse mit der erwarteten Menge die Wiederfindungsrate dieser Substanz nach erfolgter Analyse bestimmt werden. Da die Butylparabenkonzentration durch das Verfahren abnahm, wurde angenommen, dass sich die Sildenafilkonzentration in gleicher Weise verändert hatte. Die Messergebnisse von Sildenafil wurden dann mit der Wiederfindungsrate von Butylparaben korrigiert.

3.1.8.5.5 Berechnung der Stoffverteilung im Lungenmodell

Nach Bestimmung der Sildenafilgehalte in den Perfusatproben und den Lavagen wurde für alle Versuche eine Gesamtbilanz erstellt. Die Sildenafilgehalte in den einzelnen Kompartimenten wurden prozentual auf die jeweils deponierte Menge, die sich aus der Sildenafilkonzentration der vernebelten Lösung bzw. Liposomensuspension und dem Output

ergab, bezogen. Zur Berechnung des prozentualen Anteils im Perfusat wurde die gemessene Konzentration der letzten zwei Proben gemittelt und mit dem am Ende des Versuches noch vorhandenen Perfusativolumen verrechnet.

3.1.9 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden mit dem Test nach Grubbs auf Ausreißer untersucht.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Verwendung des Statistikprogramms SigmaSTAT[®] Version 3.5 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland).

Bei den nach unterschiedlichen Methoden hergestellten R6G-Liposomen wurden die Verkapselungsraten mittels Varianzanalyse untereinander verglichen. Der Vergleich der Partikelgrößen der Liposomen (VMD) wurde mittels Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, da durch die fehlende Varianzhomogenität eine der Voraussetzungen für die Varianzanalyse nicht erfüllt war. Die Vergleiche von Verkapselungsraten der Liposomen vor und nach Verneblung sowie Verneblungsdauer und Output von isotoner Kochsalzlösung und R6G-Liposomen wurden mittels Student's t-Test durchgeführt. Zum Vergleich des MMAD bei der Verneblung von isotoner Kochsalzlösung und R6G-Liposomen sowie des VMD der Liposomen vor und nach Verneblung wurde ein Mann-Whitney Rangsummentest durchgeführt, da die Voraussetzungen für einen Student's t-Test durch fehlende Varianzhomogenität nicht erfüllt waren.

Im Falle der Sildenafil-Liposomen wurden die Verkapselungsraten und der VMD der Liposomen nach MicroSprayer[®], im aufgefangenen Aerosol und im Rückstand des Pari LC[®] Sprint Star jeweils mittels Student's t-Test mit den entsprechenden Werten nach Herstellung verglichen. Auch für die Vergleiche des Output bei der Verneblung von Liposomen mit den jeweiligen Werten von Aqua dest. (MicroSprayer[®]) bzw. isotoner Kochsalzlösung (Pari LC[®] Sprint Star) wurde dieser Test verwendet. Bei der Wiederfindung nach Verneblung war eine Normalverteilung nicht gegeben, sodass die Ergebnisse mittels Mann-Whitney Rangsummentest ausgewertet wurden.

Die Stoffverteilung im Lungenmodell sowie die AUC nach der Applikation der Liposomen wurde jeweils mittels Student's t-Test mit den jeweiligen Werten nach Applikation von freiem Sildenafil verglichen.

Zur Benennung der Signifikanzen wurde der jeweils berechnete p-Wert angegeben. In den Abbildungen erfolgte die Darstellung der Signifikanzen entweder mit den entsprechenden p-Werten oder mit * für $p \leq 0,05$ bzw. n.s. für nicht signifikant ($p > 0,05$).

3.2 ERGEBNISSE

3.2.1 Charakterisierung der Vernebler

Im Rahmen der Verneblercharakterisierung wurden die Aerosolpartikelgrößen der von den in dieser Arbeit verwendeten Verneblern bei der Verneblung von NaCl bzw. Aqua dest. generierten Aerosole laserdiffraktometrisch bestimmt. Der Output wurde gravimetrisch ermittelt.

Einen Überblick über die Ergebnisse der untersuchten Parameter bietet Tab. 3.

	MMAD (μm)	GSD	Output (ml)	Output (ml/min)
Aeroneb[®] Solo (n=6)	4,71 \pm 0,16	1,73 \pm 0,08	2,85 \pm 0,01	0,52 \pm 0,02
Pari LC Sprint[®] Star (n=4)	3,92 \pm 0,04	1,92 \pm 0,02	1,21 \pm 0,02	0,08 \pm 0,00
MicroSprayer[®] (n=4)	20,1 \pm 3,54	1,91 \pm 0,08	0,87 \pm 0,01	n.d.

Tab. 3: Ergebnisse (MW \pm SD) der Verneblung von isotoner Kochsalzlösung (Aeroneb[®] Solo und Pari LC Sprint[®] Star) bzw. Aqua dest. (MicroSprayer[®]). MMAD: Medianer aerodynamischer Massendurchmesser; GSD: Geometrische Standardabweichung

3.2.1.1 Aerosolpartikelgrößen

Die Aerosolpartikelgrößen der von den Verneblern generierten Aerosole wurden mittels Laserdiffraktometrie bestimmt. Die bei der Verneblung von isotoner Kochsalzlösung mit dem Aeroneb[®] Solo und dem Pari LC Sprint[®] Star generierten Aerosole sind mit einem medianen aerodynamischen Massendurchmesser (MMAD) von unter fünf μm klein genug, um in die peripheren Lungenregionen gelangen zu können. Die bei vier Verneblungen von Aqua dest. mit dem MicroSprayer[®] generierten Aerosolpartikel sind mit einem MMAD von 20,1 \pm 3,54 μm deutlich größer als die Aerosolpartikel der beiden anderen Vernebler (s. Tab. 3).

3.2.1.2 Output

Der Output der Vernebler (s. Tab. 3) wurde gravimetrisch bestimmt, indem die Vernebler jeweils vor und nach der Verneblung gewogen wurden.

Bei der Verneblung von isotoner Kochsalzlösung mit dem Aeroneb[®] Solo wurden von 3 ml, die in den Vernebler eingefüllt worden waren, bei sechs Versuchen im Mittel 2,85 \pm 0,01 ml vernebelt. Der Vernebler benötigte dafür 5,54 \pm 0,23 Minuten. Daraus berechnet sich ein Output von 0,52 \pm 0,02 ml/min.

Die Verneblung mit dem Pari LC Sprint® Star wurde nach 15 Minuten beendet. In dieser Zeit wurden bei vier Versuchen im Mittel $1,21 \pm 0,02$ ml der eingefüllten 3 ml Kochsalzlösung vernebelt. Somit liegt sowohl der absolute Output, als auch der auf die Verneblungsdauer bezogene Output mit $0,08 \pm 0,00$ ml deutlich niedriger als beim Aeroneb® Solo.

Bei vier Verneblungen von je einem Milliliter Aqua dest. mit dem MicroSprayer® lag der Output aus der Spritze des Verneblers im Mittel bei $0,96 \pm 0,00$ ml. Da bei den Verneblungen ein gravimetrisch bestimmtes Residuum von $0,09 \pm 0,01$ ml in der Sonde des Verneblers verblieb, errechnete sich aus der Differenz ein effektiver Output von $0,87 \pm 0,01$ ml.

3.2.2 Liposomen mit Rhodamin 6G

Die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G beladenen Liposomen wurden nach vier unterschiedlichen Methoden hergestellt. Dabei wurden nach Methode A, B und C jeweils zwei, nach Methode D eine Charge gefertigt und charakterisiert.

Außerdem wurde die Stabilität der Liposomen gegenüber der Verneblung mit dem Aeroneb® Solo untersucht. Dafür wurden je 3 ml der Liposomensuspension vernebelt. Das Aerosol wurde zur Charakterisierung der darin enthaltenen Liposomen in einem Falcon Tube aufgefangen.

Vor der Verneblung mit dem Aeroneb® Solo wurden die Liposomensuspensionen auf definierte R6G-Konzentrationen verdünnt. Die Verdünnungen wurden zur Kontrolle analysiert. Die vor der Verneblung gemessenen R6G-Konzentrationen in den jeweiligen Ansätzen zeigt Tab. 4:

Methode	A	B		C	D
Errechnete Konzentration (µg/ml)	10,0	5,0	10,0	5,0	5,0
Gemessene R6G-Konzentration (µg/ml) vor Verneblung	9,88	5,31	10,13	5,13	4,75
	9,66	4,80		5,18 4,72	5,59

Tab. 4: R6G-Konzentrationen in den zur Verneblung hergestellten Verdünnungen der nach unterschiedlichen Methoden hergestellten Liposomensuspensionen

3.2.2.1 Charakterisierung der Liposomen nach Extrusion und Verneblung**3.2.2.1.1 Verkapselungseffizienz**

Die Verkapselungseffizienz (VE) der nach den unterschiedlichen Methoden aus den gleichen Ausgangssubstanzen hergestellten Liposomen wurde nach der Extrusion bestimmt und gibt an, wie viel des zur Herstellung eingesetzten R6G in den Liposomen enthalten ist. Die Ergebnisse sind in Tab. 5 dargestellt.

Methode Chargennummer	A		B		C		D
	1	2	1	2	1	2	1
VE (%)	2,92	7,02	3,20	7,09	6,95	7,85	3,80
	-	7,97	3,10	7,06	-	7,95	3,70
MW		7,50	3,15	7,08		7,90	3,75

Tab. 5: Verkapselungseffizienzen (VE) der nach den unterschiedlichen Methoden hergestellten, mit R6G beladenen Liposomen

Die Verkapselungseffizienzen (VE) der Liposomen lagen zwischen 2,92 % (Methode A) und 7,90 % (Methode C). Beim Vergleich der VE von zwei Chargen jeweils einer Methode fällt auf, dass es bei den Methoden A und B deutliche Unterschiede zwischen den Chargen gibt, während die VE bei den nach Methode C hergestellten Liposomen besser reproduzierbar erschien.

3.2.2.1.2 Wiederfindung nach Verneblung

Durch die Messung des Gesamt-R6G-Gehalts in den aufgefangenen Liposomensuspensionen konnte die Farbstoffwiederfindung nach der Verneblung berechnet werden. Die in Tab. 6 angegebene prozentuale Wiederfindung berechnet sich aus dem Gesamt-R6G-Gehalt im aufgefangenen Aerosol, bezogen auf den in der Liposomensuspension vor Verneblung enthaltenen, in Tab. 4 absolut angegebenen Gesamt-R6G-Gehalt.

Methode	A	B		C	D
Wiederfindung (%)	97,2	96,8	79,0	96,5	88,0
	94,0	97,7	85,6	88,4	100,0
	-	-	-	95,3	-
MW	95,6	97,3	82,3	93,4	94,0

Tab. 6: Prozentuale Farbstoffwiederfindung nach Verneblung der mit R6G beladenen Liposomen mit dem Aeroneb® Solo

Bei den Liposomen der Methode B, die vor der Verneblung auf eine R6G-Konzentration von 10 µg/ml verdünnt worden waren, konnten nach der Verneblung nur 82,3 % des Farbstoffs wiedergefunden werden. Bei allen anderen vernebelten Liposomensuspensionen war die Wiederfindung mit über 90 % des zur Verneblung eingesetzten Farbstoffs deutlich höher. Die Liposomen verließen den Vernebler also nahezu vollständig.

3.2.2.1.3 Verkapselungsrate

Die Verkapselungsrate (VR) gibt den Anteil an verkapseltem Farbstoff, bezogen auf den Gesamtfarbstoffgehalt in der Liposomensuspension, an. Die VR der Liposomensuspensionen wurden nach der Extrusion sowie nach der Verneblung im aufgefangenen Aerosol bestimmt und sind in Tab. 7 dargestellt.

Methode	A		B		C		D	
	n. Extr.	n. Vern.						
VR (%)	99,0	96,7	98,0	98,8	98,7	94,1	96,6	93,8
	98,4	100,0	97,0	93,6	99,1	92,8	93,8	91,0
	93,3	-	102,5	97,1	99,0	-	-	-
	-	-	101,0	96,0	-	-	-	-
MW ±	96,9 ±	98,4 ±	99,2 ±	96,4 ±	98,9 ±	94,0 ±	95,2 ±	92,4 ±
SD	3,1	2,3	2,9	2,2	0,2	1,1	2,0	2,0

Tab. 7: Verkapselungsraten (VR) der nach unterschiedlichen Methoden hergestellten, mit R6G beladenen Liposomen nach Herstellung und nach Verneblung

Die Verkapselungsraten nach **Extrusion** waren mit 95,2 % (Methode D) bis 99,2 (Methode B) bei allen Liposomen ähnlich hoch (s. Abb. 11). Das bedeutet, dass fast der gesamte in der Liposomensuspension enthaltene Farbstoff in liposomal verkapselter Form vorlag, während

nur ein geringer Anteil an freiem R6G enthalten war. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Methoden waren statistisch nicht signifikant ($p = 0,2$).

Wie aus Abb. 11 weiterhin ersichtlich ist, waren die Verkapselungsraten auch nach der **Verneblung** mit über 90 % bei allen Liposomenformulierungen ähnlich hoch wie nach der Extrusion. Lediglich bei der Methode C war die VR nach der Verneblung mit $94,0 \pm 1,1$ % signifikant niedriger als nach der Extrusion, wo sie $98,9 \pm 0,2$ % betrug ($p = 0,002$). Da aber immer noch ein Großteil des Farbstoffs in den Liposomen enthalten war, ist dieser Unterschied als nicht relevant anzusehen. Es kam durch die Verneblung also nicht zu einer Freisetzung des Farbstoffs aus den Vesikeln.

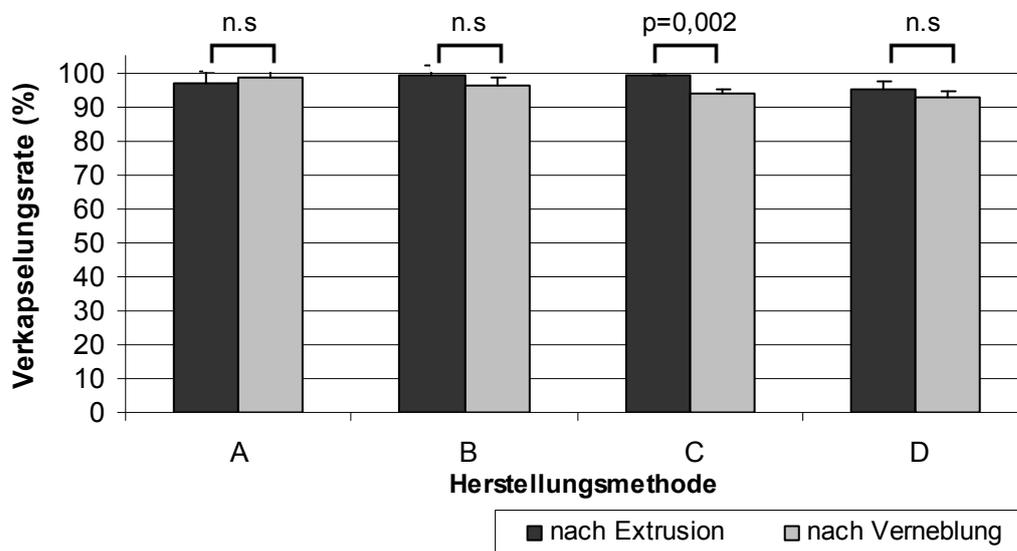


Abb. 11: Verkapselungsraten (MW + SD) der Liposomen nach Extrusion und nach Verneblung. n.s. = nicht signifikant

3.2.2.1.4 Medianer Volumendurchmesser

Die medianen Volumendurchmesser (VMD) der nach unterschiedlichen Methoden hergestellten Liposomen wurden nach Extrusion und nach Verneblung im aufgefangenen Aerosol bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 8 dargestellt.

Methode	A		B		C		D	
	n. Extr.	n. Vern.						
VMD (μm)	0,66	0,50	0,79	0,65	0,62	0,61	0,71	0,73
[GSD]	[1,88]	[1,54]	[1,86]	[1,71]	[1,71]	[1,72]	[2,13]	[1,92]
	0,53	0,53	0,70	0,65	0,59	0,59	-	0,72
	[1,60]	[1,62]	[1,79]	[1,71]	[1,70]	[1,63]	-	[1,92]
	-	-	-	-	-	0,60	-	-
	-	-	-	-	-	[1,72]	-	-
MW VMD	0,60	0,52	0,75	0,65	0,61	0,60	-	0,73

Tab. 8: Medianer Volumendurchmesser (VMD) und geometrische Standardabweichung (GSD) der mit R6G beladenen Liposomen nach Extrusion und nach Verneblung mit dem Aeroneb[®] Solo

Der mediane Volumendurchmesser (VMD) der Liposomen, die nach den Methoden A und B hergestellt worden waren, war nach der Verneblung etwas kleiner als nach der Extrusion. Diese Unterschiede stellten sich bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse mittels Mann-Whitney-Rangsummentest aber als statistisch nicht signifikant heraus. Der VMD der nach den Methoden C und D hergestellten Liposomen änderte sich durch die Verneblung nicht.

Aufgrund der guten Gesamtwiederfindung des Farbstoffs nach der Verneblung von ca. 82 – 97 %, der auch nach Verneblung sehr hohen Verkapselungsrate von 92 – 98 % und der nur marginalen Größenveränderung der Vesikel durch die Verneblung kann davon ausgegangen werden, dass die mit R6G beladenen Liposomen den Vernebler intakt verließen und somit stabil gegenüber der Verneblung sind.

3.2.2.2 Vergleich der Verneblereigenschaften des Aeroneb® Solo bei der Verneblung von R6G-Liposomen und isotoner Kochsalzlösung

Methode	NaCl (n=6)	A (n=2)	B (n=4)	C (n=3)	D (n=2)
MMAD (µm)	4,71 ± 0,16	4,77 ± 0,26 (n.s.)	4,36 ± 0,10 (p=0,02)	5,08 ± 0,05 (p=0,02)	4,73 ± 0,27 (n.s.)
[GSD]	[1,73 ± 0,08]	[1,67 ± 0,05]	[1,7 ± 0,1]	[1,79 ± 0,04]	[1,76 ± 0,04]
Verneblungsdauer (min)	5,54 ± 0,23	6,41 ± 0,13 (p=0,003)	6,73 ± 0,30 (p<0,001)	6,47 ± 0,05 (p<0,001)	6,48 ± 0,51 (p=0,008)
Output (ml)	2,85 ± 0,01	2,92 ± 0,02 (p=0,001)	2,87 ± 0,05 (n.s.)	2,85 ± 0,06 (n.s.)	2,86 ± 0,01 (n.s.)

Tab. 9: Bei der Verneblung der Liposomen untersuchte Parameter im Vergleich zur Verneblung von NaCl (MW ± SD). MMAD: medianer aerodynamischer Massendurchmesser; GSD: geometrische Standardabweichung. Die p-Werte im Vergleich zu NaCl sind in runden Klammern angegeben.

3.2.2.2.1 Aerosolpartikelgrößen

Bei der Verneblung von Liposomen der Methode B wurde bei der laserdiffraktometrischen Partikelgrößenmessung des Aerosols bei vier Messungen im Mittel ein medianer aerodynamischer Massendurchmesser (MMAD) von $4,36 \pm 0,1 \mu\text{m}$ gemessen. Die Aerosolpartikel waren somit signifikant kleiner als die bei sechs Verneblungen von NaCl generierten Aerosolpartikel, bei denen ein MMAD von $4,71 \pm 0,2 \mu\text{m}$ gemessen worden war ($p = 0,02$). Bei der Verneblung von Liposomen der Methode C war der MMAD, der bei drei Messungen im Mittel bei $5,08 \pm 0,1 \mu\text{m}$ lag, signifikant größer als bei NaCl ($p = 0,02$). Die Aerosolpartikelgrößen der Liposomen der Methoden A und D unterschieden sich bei Doppelmessungen mit $4,77 \pm 0,3 \mu\text{m}$ und $4,73 \pm 0,3 \mu\text{m}$ nicht signifikant von NaCl (s. Abb. 12).

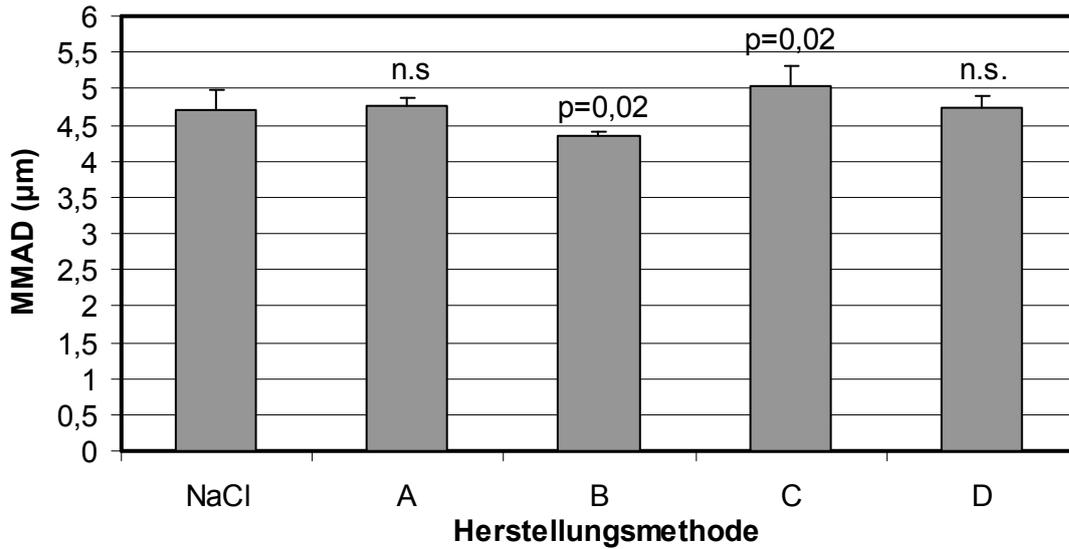


Abb. 12: Aerosolpartikelgrößen (MW + SD) der bei der Verneblung von NaCl und der nach unterschiedlichen Methoden hergestellten Liposomen mit einem Aeroneb® Solo generierten Aerosole. MMAD: medianer aerodynamischer Massendurchmesser. Die Signifikanzangaben beziehen sich auf den Vergleich der liposomalen Aerosolpartikel zu NaCl.

3.2.2.2.2 Verneblungsdauer

Wie in Abb. 13 gut erkennbar ist, lag die Verneblungsdauer von je 3 ml der Liposomenformulierungen mit über 6 Minuten (s. Tab. 9) deutlich über der Verneblungsdauer von 3 ml NaCl. Die Unterschiede zu NaCl waren bei allen Formulierungen statistisch signifikant.

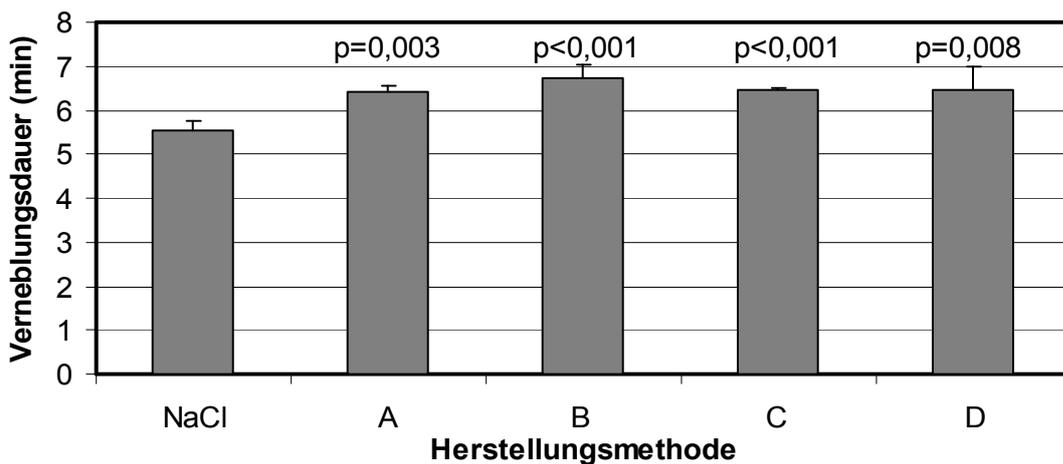


Abb. 13: Verneblungsdauer bei der Verneblung von NaCl und mit R6G beladenen Liposomen mit dem Aeroneb® Solo. Die Signifikanzangaben beziehen sich auf den Vergleich der jeweiligen Liposomen zu NaCl.

3.2.2.2.3 Output

Der Output betrug bei sechs Verneblungen von NaCl im Mittel $2,85 \pm 0,01$ ml. Bei der Verneblung von Liposomen der Methode A war er mit $2,92 \pm 0,02$ ml (Doppelmessung) signifikant größer ($p = 0,001$). Bei Liposomen der anderen Methoden konnte kein signifikanter Unterschied zu NaCl festgestellt werden (s. Tab. 9).

Aus der Verneblungsdauer und dem Output in Milliliter wurde der Output in Milliliter pro Minute berechnet. Dieser betrug bei der Verneblung von NaCl bei sechs Messungen $0,52 \pm 0,02$ ml/min. Bei der Verneblung der Liposomenformulierungen lag er aufgrund der längeren Verneblungsdauer bei allen Methoden mit $0,43$ ml/min (Methoden A und B) bzw. $0,44$ ml/min (Methoden C und D) signifikant niedriger.

Aufgrund des gleichbleibenden Outputs des Aeroneb[®] Solo bei der Verneblung der Liposomen kann davon ausgegangen werden, dass die mit R6G beladenen Liposomen bei etwas verlängerter Verneblungsdauer (ca. 1 Minute bei 3 ml Befüllung) nahezu vollständig vernebelt wurden.

3.2.3 Ergebnisse zur Wiederfindung von Sildenafil

In Versuchen der Arbeitsgruppe der Verfasserin war ein zeitabhängiger Verlust von Sildenafil in einem Modellsystem, das für die Versuche mit der isolierten Kanichenlunge verwendet wurde, aufgefallen. Um die Übertrittskinetiken von inhalativ appliziertem Sildenafil aus der Lunge in das Perfusat bestimmen zu können, musste die Wiederfindung der Substanz im System bei diesen Versuchen gewährleistet sein. Daher wurden Schläuche aus unterschiedlichen Materialien getestet, um schließlich ein System aus geeigneten Schläuchen bauen zu können.

Da für eine quantitative Sildenafil-Analytik ein Verlust der Substanz auch in den zur Aufbewahrung der Sildenafillösungen, der Sildenafil-Liposomensuspensionen und der Proben verwendeten Gefäße ausgeschlossen werden musste, wurden zuvor in einer Versuchsreihe diese Behältnisse untersucht.

3.2.3.1 Sildenafil in Eppendorf-Reaktionsgefäßen

Für diese Wiederfindungsversuche wurden Sildenafillösungen der Konzentration $150 \mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Bei zwei Versuchen (V 1 und V 2) betrug die gemessenen Sildenafilkonzentrationen in den eingesetzten Lösungen vor Versuchsbeginn $143,0 \mu\text{g/ml}$ und

149,8 µg/ml. Die prozentuale Wiederfindung dieser Konzentrationen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen zu definierten Zeitpunkten nach Inkubation bei 37°C zeigt Tab. 10:

Zeit (min)	0	60	180	300
Wiederfindung (%)				
V 1	102,1	102,1	104,9	104,2
V 2	100,1	102,1	100,8	90,8

Tab. 10: Prozentuale Wiederfindung von Sildenafil in Eppendorf-Reaktionsgefäßen nach Inkubation bei 37 °C, bezogen auf die in der eingesetzten Lösung gemessene Sildenafilkonzentration

Da das Sildenafil in den Gefäßen während des gesamten untersuchten Zeitraums nahezu vollständig nachgewiesen werden konnte, erschienen die Gefäße zur Aufbewahrung der Wirkstofflösungen geeignet.

3.2.3.2 Sildenafil in Falcon Tubes

Für die Versuche wurde eine Sildenafillösung der Konzentration 100 µg/ml hergestellt. Gemessen wurde eine Sildenafilkonzentration von 104,64 µg/ml. Je ein Milliliter dieser Lösung wurde in drei Falcon Tubes gegeben, die mit 30 ml gepufferter Elektrolytlösung befüllt waren. Nach gründlichem Durchmischen lagen die in den sofort danach entnommenen Null-Proben gemessenen Konzentrationen bei 3,3 µg/ml (4 °C-Ansatz) und 3,5 µg/ml (25 °C- und 37 °C-Ansatz). Die prozentuale Wiederfindung dieser Sildenafilkonzentrationen in den Falcon Tubes zu definierten Zeitpunkten nach Inkubation von je einem Tube bei 4 °C, 25 °C bzw. 37 °C zeigt Tab. 11:

Zeit (min)	0	10	30	60	120	180	300
Wiederfindung (%)							
4 °C	100,00	100,91	103,03	100,30	101,52	101,52	100,61
25 °C	100,00	100,29	99,71	100,57	101,14	99,19	101,71
37 °C	100,00	99,43	101,99	99,72	100,00	100,00	101,14

Tab. 11: Prozentuale Wiederfindung von Sildenafil in Falcon Tubes bei verschiedenen Temperaturen, bezogen auf die sofort nach Zugabe ins Gefäß gemessene Sildenafilkonzentration

Der Wirkstoff konnte über den untersuchten Zeitraum von fünf Stunden sowohl in den Eppendorf-Reaktionsgefäßen, als auch in den Falcon Tubes sehr gut reproduzierbar nachgewiesen werden. Die Gefäße waren somit gut zur Aufbewahrung sildenafilhaltiger Lösungen geeignet.

3.2.3.3 Sildenafil in Glasgefäßen mit Schläuchen

Die Wiederfindung von Sildenafil wurde nach Inkubation von Schläuchen aus den Materialien Teflon, Polyurethan, Polytetrafluorethylen (PTFE) und C-FLEX[®] getestet. Um nicht aus jedem getesteten Schlauchmaterial ein System bauen zu müssen, wurden Proben der verschiedenen Schläuche in Glasgefäßen mit Sildenafillösung inkubiert. Als Kontrolle diente ein mit Sildenafillösung gefülltes Glas ohne Schlauch. Die Versuche wurden für jedes Schlauchmaterial drei mal durchgeführt (V 1 bis V 3). Die vor Schlauchzugabe in den Glasgefäßen gemessenen Sildenafilgehalte der gepufferten Elektrolytlösung, die rechnerisch 200 ng/ml betragen sollten, sind Tab. 12 zu entnehmen.

Sildenafilkonzentration (ng/ml)	Kontrolle	Teflon	Polyurethan	PTFE	C-FLEX[®]
V 1	180	177	187	176	181
V 2	163	155	162	163	168
V 3	195	197	201	193	198

Tab. 12: Sildenafilkonzentrationen der gepufferten Elektrolytlösung vor Schlauchzugabe

Die prozentuale Wiederfindung dieser Sildenafilkonzentrationen nach Zugabe von Schlauchstücken aus unterschiedlichen Materialien während Inkubation bei 37 °C zeigt Tab. 13:

t (min)	Teflon (%)			Polyurethan (%)			PTFE (%)			C-FLEX[®] (%)		
	V 1	V 2	V 3	V 1	V 2	V 3	V 1	V 2	V 3	V 1	V 2	V 3
0	100,0	102,6	99,5	96,2	101,9	99,5	99,4	101,8	100,5	104,4	98,8	99,5
60	100,6	102,6	100,0	97,3	89,5	70,1	100,0	103,1	101,6	125,4	100,0	100,0
180	101,1	103,9	100,0	94,7	67,3	61,2	101,7	102,5	102,1	123,8	98,2	99,0
300	101,7	103,9	100,0	92,5	58,6	45,8	101,1	103,1	102,1	127,6	98,2	99,0

Tab. 13: Prozentuale Wiederfindung von Sildenafil bei Inkubation von Schlauchstücken aus unterschiedlichen Materialien in Sildenafillösungen. Die prozentuale Wiederfindung bezieht sich auf die vor Schlauchzugabe im jeweiligen Gefäß gemessene Sildenafilkonzentration.

Bei dem **Kontrollansatz** ohne Schlauch lag die Wiederfindung bei drei Versuchen nach 300 Minuten im Mittel bei $100,6 \pm 1,5$ %. Die Glasgefäße selbst verursachten also keinen Sildenafilverlust.

In dem Versuchsansatz mit **Teflon** wurden bei allen drei Versuchen zu allen Zeitpunkten etwa 100 % des eingesetzten Sildenafils wiedergefunden. Am Ende des Versuchs nach 300 Minuten betrug die Wiederfindung im Mittel $101,9 \pm 1,94$ %.

Auch nach Inkubation von **PTFE**-Schlauchstücken in der Sildenafillösung konnten bei allen drei Versuchen bei allen untersuchten Proben ca. 100 % des eingesetzten Sildenafils wiedergefunden werden. Bei Versuchsende nach fünf Stunden lag die Wiederfindung im Mittel bei $102,1 \pm 1$ %.

Mit **Polyurethan** konnte beim ersten Versuch eine relativ geringe Abnahme über die Zeit auf 92,5 % nach fünf Stunden beobachtet werden. Bei den beiden Folgeversuchen war der Verlust deutlicher. Dabei konnten nach 300 Minuten nur noch 58,6 % bzw. 45,8 % des eingesetzten Sildenafils nachgewiesen werden (s. Abb. 14).

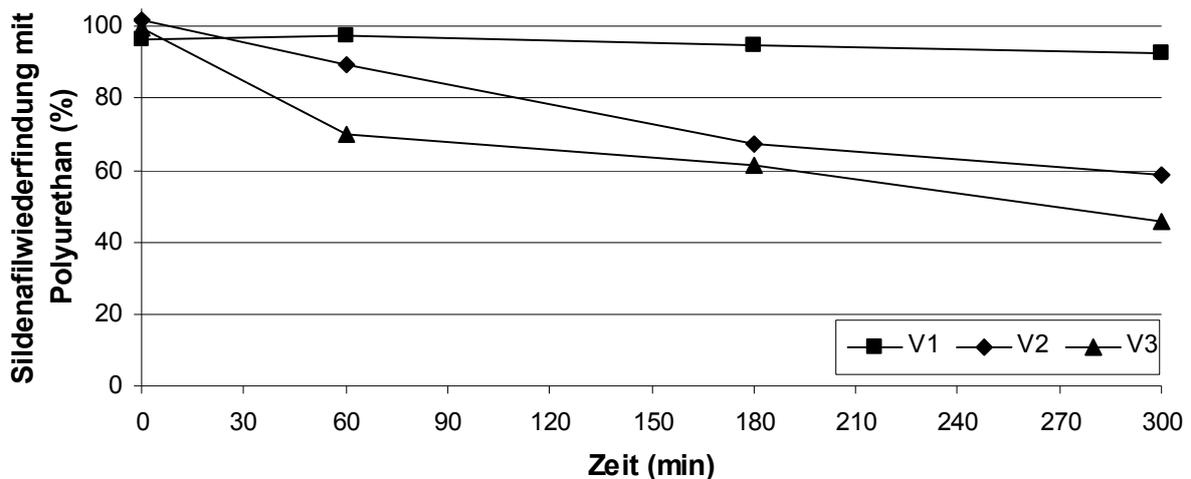


Abb. 14: Prozentuale Wiederfindung von Sildenafil bei Inkubation von Schlauchstücken aus Polyurethan in Sildenafillösung

In dem mit **C-FLEX[®]-Schlauch** bestückten Ansatz lag die Wiederfindung beim ersten Versuch nach 60 Minuten bei 125,4 %, nach 300 Minuten war diese weiter angestiegen auf 127,6 % (s. Abb. 15). Bei den beiden Folgeversuchen wurden über die gesamte Versuchsdauer 98-100 % des eingesetzten Sildenafilis wiedergefunden. Nach fünf Stunden lag die Wiederfindung bei diesen beiden Versuchen im Mittel bei $98,6 \pm 0,5$ %.

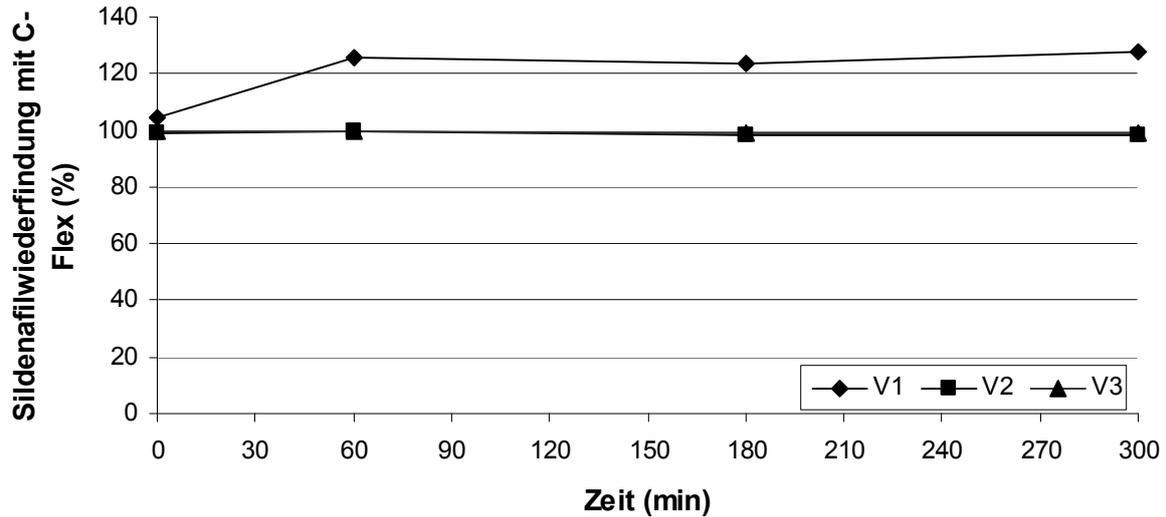


Abb. 15: Prozentuale Wiederfindung von Sildenafil bei Inkubation von Schlauchstücken aus C-FLEX[®] in Sildenafillösung.

Der Schlauch aus Polyurethan war aufgrund der schlechten Sildenafilwiederfindung nicht für den Einsatz im Modellsystem geeignet. In Anwesenheit von Teflon- und PTFE-Schläuchen war Sildenafil zwar ohne Verluste nachweisbar, die Materialien waren aber nicht flexibel genug, um daraus ein System für die Versuche an der isolierten Kaninchenlunge bauen zu können. Der C-FLEX[®]-Schlauch war zwar, von den Auffälligkeiten beim ersten Versuch abgesehen, aufgrund der Wiederfindung und der Flexibilität gut geeignet, er war aber trüb, was einen Einsatz im System ebenfalls ausschloss. Mit dem Clear C-FLEX[®] Schlauch stand eine transparente Alternative zu Verfügung, die daher in den folgenden Versuchen weiter getestet wurde.

3.2.3.4 Clear C-FLEX[®] System

Da davon ausgegangen wurde, dass mit dem Clear C-FLEX[®] Schlauch die gleiche Wiederfindungsrate wie mit dem undurchsichtigen C-FLEX[®]-Schlauch erzielt werden konnte, wurde auf Wiederfindungsversuche mit Stücken dieses transparenten Schlauches verzichtet. Es wurde gleich ein System mit Clear C-FLEX[®] gebaut, wie es für die Lungenversuche benötigt wurde. Die Wiederfindung wurde anschließend mit in diesem System zirkulierender Sildenafillösung untersucht.

Vor Befüllen des Schlauchsystems mit den Sildenafillösungen (Zeitpunkt -2 Minuten), die auf eine errechnete Sildenafilkonzentration von 200 ng/ml verdünnt worden waren, wurde in den Lösungen mit der Sildenafil Base von AK Scientific bei vier Versuchen im Mittel ein Sildenafilgehalt von $220,8 \pm 13,6$ ng/ml gemessen, in den Lösungen mit der Sildenafil Base von bioKEMIX waren es bei sechs Versuchen $217,8 \pm 20,5$ ng/ml.

Die prozentuale Wiederfindung dieser Sildenafilkonzentrationen in den im System rezirkulierenden Lösungen zu definierten Zeitpunkten zeigt Tab. 14.

Zeit (min)	-2	0	60	180	300
Wiederfindung (%)					
Sildenafil AK Scientific (n=4)	100,0	$99,8 \pm 0,9$	$99,6 \pm 0,7$	$100,2 \pm 0,8$	$99,5 \pm 0,7$
Sildenafil bioKEMIX (n=6)	100,0	$98,2 \pm 4,0$	$98,2 \pm 3,9$	$99,6 \pm 3,1$	$99,3 \pm 3,9$

Tab. 14: Prozentuale Wiederfindung (MW \pm SD) von Sildenafil bei Zirkulation der Sildenafillösungen in einem Schlauchsystem aus Clear C-FLEX[®] Schlauch. t = -2 min: Sildenafilkonzentration in der Lösung vor Befüllen des Schlauchsystems

Es konnten von beiden Substanzen über die gesamte Versuchsdauer von fünf Stunden annähernd 100 % der eingesetzten Sildenafilkonzentration wiedergefunden werden. Das aus Clear C-FLEX[®] Schlauch gebaute System war somit geeignet für die Versuche zur Untersuchung der Übertrittskinetiken von pulmonal appliziertem Sildenafil aus der Lunge in das Perfusat.

3.2.4 Liposomen mit Sildenafil

Bei den Versuchen zur liposomalen Verkapselung des Fluoreszenzfarbstoffs R6G hat sich gezeigt, dass die Methode, den Farbstoff zusammen mit den Lipiden in den Glaskolben einzuwiegen und im organischen Lösungsmittel zu lösen (**Methode C**) am besten geeignet ist, das lipophile R6G in Liposomen zu verkapseln. Im Vergleich zu den anderen Methoden war die Verkapselungseffizienz (VE) bei Methode C höher und vor allem besser reproduzierbar, wohingegen die VE bei den anderen Methoden deutliche Schwankungen zwischen verschiedenen Chargen zeigte. Da sich die nach Methode C hergestellten R6G-Liposomen zudem weitgehend intakt und vollständig vernebeln ließen, wurde das direkte Einwiegen des Wirkstoffs mit den Lipiden gewählt, um Liposomen mit Sildenafil herzustellen.

Es wurden fünf Chargen der mit Sildenafil beladenen Liposomen hergestellt und charakterisiert. Außerdem wurde die Verneblerleistung des Düsenverneblers Pari LC Sprint® Star und des MicroSprayers® bei Verneblung der Liposomen im Vergleich zur Verneblung von Aqua dest. und NaCl untersucht. Eine Verneblung der Liposomen mit dem Aeroneb® Solo war nicht möglich (s. Kapitel 4.1.5).

3.2.4.1 Charakterisierung der Liposomen nach Herstellung und Verneblung

Die Ergebnisse der Charakterisierung der Liposomen nach Herstellung, nach Verneblung mit dem MicroSprayer® und dem Pari LC Sprint® Star sowie im aus dem Pari LC Sprint® Star entnommenen Rückstand sind in Tab. 15 dargestellt.

	nach Herstellung	nach MicroSprayer®	Pari® Aerosol	Pari® Rückstand
Gesamt-Sildenafil (mg/ml)	1,08 ± 0,05	1,07 ± 0,03 (n.s.)	1,15 ± 0,08 (n.s.)	1,36 ± 0,17 (p = 0,008)
Verkapseltes Sildenafil (mg/ml)	1,05 ± 0,06	1,05 ± 0,03 (n.s.)	1,13 ± 0,08 (n.s.)	1,34 ± 0,17 (p = 0,008)
VMD (µm)	3,08 ± 0,79	3,07 ± 0,85 (n.s.)	2,54 ± 0,32 (n.s.)	2,94 ± 0,95 (n.s.)
[GSD]	[1,84 ± 0,19]	[1,96 ± 0,47]	[1,68 ± 0,12]	[1,83 ± 0,17]

Tab. 15: Charakterisierung der mit Sildenafil beladenen Liposomen (MW ± SD, n=5). VMD: medianer Volumendurchmesser; GSD: geometrische Standardabweichung. Die p-Werte im Vergleich zu den Daten nach Herstellung sind in runden Klammern angegeben.

3.2.4.1.1 Verkapselungseffizienz

Nach der Herstellung hatten die Liposomen zwischen 0,96 und 1,1 mg/ml Sildenafil verkapselt. Somit lag die Verkapselungseffizienz (VE) der fünf Chargen im Mittel bei $105,3 \pm 5,6$ % der zur Herstellung eingesetzten Wirkstoffmenge von 1 mg/ml.

3.2.4.1.2 Wiederfindung nach Verneblung

Bezogen auf die Gesamt-Sildenafilkonzentrationen in den jeweiligen Suspensionen lag die Wiederfindung nach der Verneblung mit dem MicroSprayer[®] bei fünf Versuchen im Mittel bei $99,4 \pm 3,3$ %. Im bei Verneblung der Liposomen mit dem Pari LC Sprint[®] Star aufgefangenen Aerosol war die Sildenafilkonzentration mit $107,2 \pm 7,5$ % der zur Verneblung eingesetzten Konzentration zwar etwas höher, der Unterschied zu der nach Herstellung gemessenen Sildenafilkonzentration war aber statistisch nicht signifikant. Wie in Abb. 16 deutlich zu erkennen ist, lag die Sildenafilkonzentration in der Liposomensuspension, die aus dem Rückstand des Pari LC Sprint[®] Star entnommen wurde, mit $127,1 \pm 23,3$ % signifikant über der nach Herstellung gemessenen Konzentration ($p = 0,008$).

3.2.4.1.3 Verkapselungsrate

Die Verkapselungsrate (VR) der Sildenafil-Liposomen lag bei den fünf Chargen direkt nach der Herstellung im Mittel bei $97,7 \pm 0,5$ %. Somit lag ein Großteil des in der Liposomensuspension enthaltenen Sildenafils in liposomal verkapselter Form und nur ein geringer Teil von < 3 % als freies Sildenafil vor. Nach Verneblung der Liposomen mit dem MicroSprayer[®] und dem Pari LC Sprint[®] Star waren die Verkapselungsraten der Vesikel in den aufgefangenen Aerosolen unverändert im Vergleich zur vor der Verneblung gemessenen VR. Die VR der aus dem Rückstand des Pari LC Sprint[®] Star entnommenen Liposomensuspension lag mit $98,4 \pm 0,2$ % signifikant höher ($p = 0,008$) (s. Abb. 16).

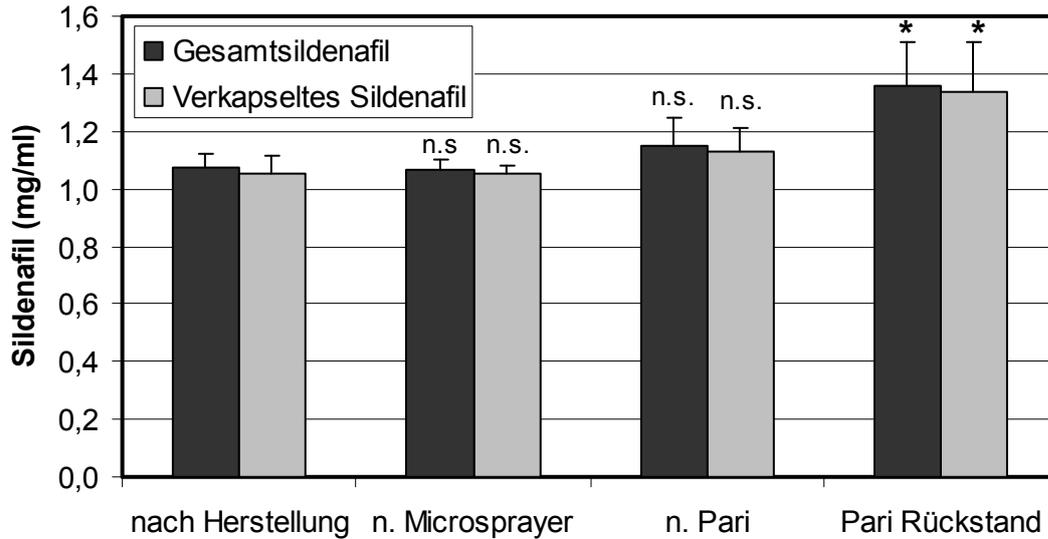


Abb. 16: Sildenafilkonzentrationen (MW + SD, n=5) der Liposomensuspensionen vor und nach Verneblung mit dem MicroSprayer[®] bzw. dem Pari LC Sprint[®] Star. * p < 0,05 im Vergleich zu den nach Herstellung gemessenen Werten; n.s. = nicht signifikant

Aus Abb. 16 wird deutlich, dass es durch die Verneblung der Liposomen mit dem Düsenvernebler zu einer Aufkonzentrierung des Wirkstoffs im Verneblerrückstand kam. Die Verneblung der Vesikel führte aber bei keinem der beiden untersuchten Vernebler zu einer Freisetzung des verkapselten Wirkstoffs aus den Liposomen.

3.2.4.1.4 Medianer Volumendurchmesser

Nach der Herstellung betrug der mediane Volumendurchmesser (VMD) der Liposomen bei den fünf Chargen im Mittel $3,08 \pm 0,79 \mu\text{m}$. Weder die Verneblung mit dem MicroSprayer[®], noch mit dem Pari LC Sprint[®] Star bewirkten eine statistisch signifikante Änderung des VMD der Vesikel.

3.2.4.2 Eigenschaften von MicroSprayer® und Pari LC Sprint® Star bei Verneblung der Sildenafil-Liposomen im Vergleich zu Aqua dest./ NaCl

	MicroSprayer®		Pari LC Sprint® Star	
	Aqua dest. (n=4)	Liposomen (n=5)	NaCl (n=4)	Liposomen (n=5)
MMAD (µm)	20,14 ± 3,54	n.d.	3,92 ± 0,04	3,53 ± 0,32
[GSD]	[1,91 ± 0,08]	n.d.	[1,92 ± 0,02]	[1,98 ± 0,1]
Output (ml)	0,87 ± 0,007	0,9 ± 0,003	1,21 ± 0,02	1,15 ± 0,06

Tab. 16: Verneblereigenschaften (MW ± SD) von MicroSprayer® und Pari LC Sprint® Star. MMAD: medianer aerodynamischer Massendurchmesser; GSD: geometrische Standardabweichung

3.2.4.2.1 Aerosolpartikelgrößen Pari LC Sprint® Star

Bei fünf Verneblungen der Sildenafil-Liposomen mit dem Pari LC Sprint® Star wurde bei der laserdiffraktometrischen Partikelgrößenmessung des Aerosols ein medianer aerodynamischer Massendurchmesser (MMAD) von $3,53 \pm 0,32 \mu\text{m}$ gemessen. Die Aerosolpartikel waren somit signifikant kleiner als die bei vier Verneblungen von NaCl generierten Aerosolpartikel, bei denen ein MMAD von $3,92 \pm 0,04 \mu\text{m}$ gemessen worden war ($p = 0,016$).

3.2.4.2.2 Output von MicroSprayer® und Pari LC Sprint® Star

Der für den MicroSprayer® in Tab. 16 angegebene Output berechnet sich aus der Differenz zwischen dem gravimetrisch bestimmten Output aus der Spritze und dem nach der Verneblung in der Sonde verbleibenden Residuum. Die Ergebnisse aus fünf Liposomenverneblungen und vier Verneblungen von Aqua dest. sind in Tab. 17 dargestellt

	Output Spritze (ml)	Residuum Sonde (ml)	Output (ml)
Aqua dest. (n=4)	0,96 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,87 ± 0,01
Liposomen (n=5)	0,96 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,90 ± 0,03

Tab. 17: Bestimmung des Outputs (MW ± SD) aus dem MicroSprayer® bei der Verneblung von Aqua dest. und Liposomen

Der bei fünf Verneblungen von Liposomen berechnete Output von $0,90 \pm 0,03$ ml unterscheidet sich nicht signifikant von dem bei vier Verneblungen von Aqua dest. errechneten Output ($0,87 \pm 0,01$ ml).

Bei der Verneblung mit dem Pari LC Sprint® Star konnte ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Output von Liposomen und von NaCl festgestellt werden. Somit ergab sich auch bei dem auf eine Verneblungsdauer von 15 Minuten bezogenen Output, der für die Liposomen bei $0,077 \pm 0,004$ Milliliter pro Minute und für NaCl bei $0,081 \pm 0,002$ Milliliter pro Minute lag, kein statistisch signifikanter Unterschied.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Sildenafil-Liposomen neben sehr hohen Verkapselungseffizienzen und Verkapselungsraten eine gute Stabilität bei der Verneblung mit dem MicroSprayer® und dem Pari LC Sprint® Star zeigten. Da sich VR und VMD auch durch die Verneblung nicht signifikant änderten, kann angenommen werden, dass die Vesikel die Vernebler intakt verlassen. Der Output der Vernebler, der sich bei Verneblung der Liposomen nicht signifikant von dem bei Verneblung von Aqua dest. bzw. NaCl gemessenen Output unterscheidet, zeigt, dass die Vesikel nahezu vollständig und effizient vernebelt werden können.

3.2.4.3 Freisetzung aus den Sildenafil-Liposomen in vitro

Um die Sildenafil-Freisetzung aus den Liposomen in vitro zu untersuchen, wurden je 0,6 ml der Liposomensuspension in 14,4 ml vierprozentiger Albumin-Lösung verdünnt und über fünf Stunden bei 37 °C inkubiert. Dies wurde mit jeder der vier Liposomenchargen je einmal durchgeführt.

3.2.4.3.1 Kontrolle Gesamtgehalt

Um die prozentuale Freisetzung des Wirkstoffs aus den Liposomen in den in vitro Versuchen über die Zeit berechnen zu können, musste zuvor der in den Versuchen enthaltene Gesamtsildenafilgehalt bestimmt werden. Die Gesamtsildenafilgehalte im Versuch wurden nach 0, 150 und 300 Minuten gemessen und für jeden Versuch gemittelt (s. Tab. 18).

t (min)	Charge 1	Charge 2	Charge 3	Charge 4	MW ± SD
0	n.d.	39,4	38,4	40,4	39,4 ± 1,0
150	38,6	39,5	41,8	40,1	40,0 ± 1,3
300	41,7	37,9	38,0	38,3	39,0 ± 1,8
MW ± SD	40,2 ± 2,2	38,9 ± 0,9	39,4 ± 2,1	39,6 ± 1,2	

Tab. 18: Gesamtsildenafilgehalte (µg/ml) in den in vitro Freisetzungsversuchen

Über die Zeit betrachtet, blieben die Sildenafilgehalte in den Versuchen konstant. Sie lagen für die vier Versuche zu Versuchsbeginn bei 39,4 µg/ml, nach 150 Minuten bei 40,0 µg/ml und zum Versuchsende nach 300 Minuten bei 39,0 µg/ml. Somit konnte gezeigt werden, dass während der Versuche kein Sildenafilverlust auftrat. Dies war Voraussetzung für die Berechnung der prozentualen Freisetzung des Wirkstoffs aus den Liposomen über die Zeit.

3.2.4.3.2 Kinetik der Sildenafilfreisetzung aus den Liposomen

Um das freigesetzte Sildenafil in den *in vitro* Versuchen bestimmen zu können, wurden die entnommenen Proben zentrifugiert, um die in den Proben enthaltenen Liposomen abzutrennen. Das freie Sildenafil wurde anschließend im Überstand bestimmt. Die in diesen Proben gemessenen Sildenafil-Konzentrationen wurden zur Berechnung der prozentualen Sildenafil-Freisetzung auf den mittleren, im jeweiligen Versuch gemessenen Gesamt-Sildenafilgehalt (s. Tab. 18) bezogen. Wie in Abb. 17 zu sehen ist, lagen bei den vier Versuchen im Mittel zu Versuchsbeginn bereits $28,2 \pm 3,7$ % des gesamt enthaltenen Sildenafils frei vor. Im weiteren Versuchsverlauf stieg die Konzentration an freiem Sildenafil kontinuierlich an, bis nach 270 Minuten ein Plateau bei $62,5 \pm 6,2$ % erreicht wurde. Am Ende des Versuches nach fünf Stunden lag die Freisetzung bei $62,1 \pm 8$ %.

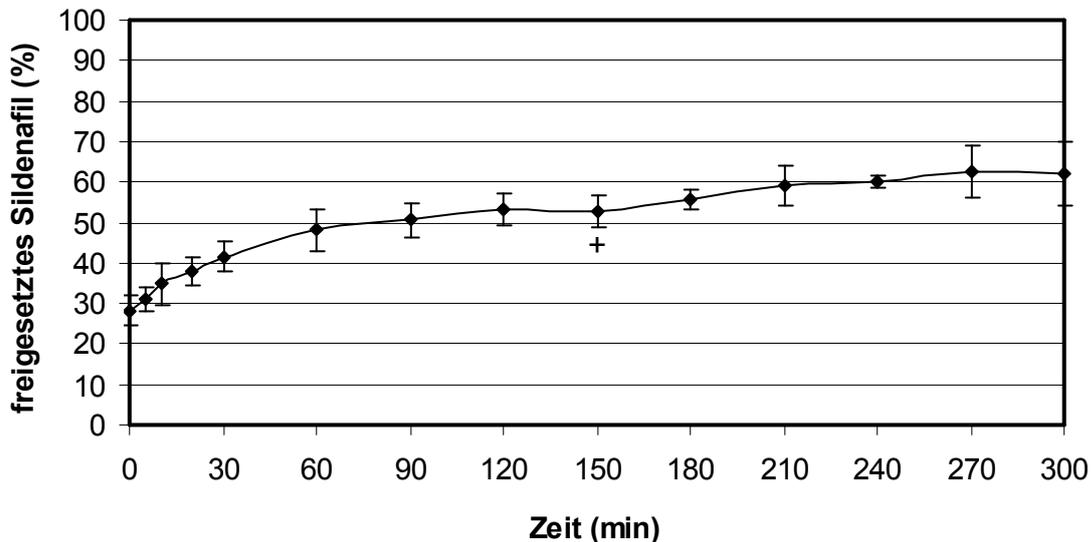


Abb. 17.: *In vitro* aus den Liposomen freigesetztes Sildenafil in Prozent (MW ± SD, n=4; + bei 150 min n=3), bezogen auf den gemessenen mittleren Gesamt-Sildenafilgehalt im jeweiligen Versuch

3.2.4.4 Substanzübertritt von freiem und liposomal verkapseltem Sildenafil am Modell der isolierten Kaninchenlunge

Durch die verzögerte Wirkstofffreisetzung aus den Liposomen in vitro war die Voraussetzung für den Einsatz der Liposomen als Retardformulierung erfüllt, sodass diese am Modell der isolierten Kaninchenlunge getestet wurden.

3.2.4.4.1 Deposition von Sildenafil in der Lunge nach MicroSprayer®-Verneblung

Die Sildenafillösungen bzw. die mit Sildenafil beladenen Liposomen wurden während der Inspiration mit dem MicroSprayer® in die isolierte Kaninchenlunge vernebelt. Der Output aus der Spritze des Verneblers wurde gravimetrisch bestimmt. Davon wurde das zuvor bei der Verneblung von Aqua dest. bzw. Liposomen ermittelte, in der Sonde verbliebene Residuum abgezogen.

3.2.4.4.1.1 Freies Sildenafil

Bei den vier Verneblungen von freiem Sildenafil mit dem MicroSprayer® in die Kaninchenlungen lag der Output aus der MicroSprayer®-Spritze im Mittel bei $0,95 \pm 0,01$ ml. Nach Abzug des vorab bei der Verneblercharakterisierung mit Aqua dest. ermittelten Residuums in der Sonde, das $0,09 \pm 0,01$ ml betrug (s. Kapitel 3.2.1.2) ergab sich ein in der Lunge deponierter Output von $0,86 \pm 0,01$ ml. Die Sildenafil-Konzentration der vernebelten Lösungen betrug im Mittel $1,1 \pm 0,03$ mg/ml. Somit wurden bei den Versuchen mit freiem Sildenafil im Mittel $0,95 \pm 0,02$ mg Sildenafil in der Lunge deponiert.

3.2.4.4.1.2 Liposomal verkapseltes Sildenafil

Bei den vier Verneblungen der Sildenafil-Liposomen verließen im Mittel $0,97 \pm 0,01$ ml die MicroSprayer®-Spritze. Hier wurde als Residuum in der Sonde der bei der Charakterisierung der Verneblereigenschaften bei Verneblung der Liposomen ermittelte Wert von $0,06 \pm 0,01$ ml zugrunde gelegt (s. Kapitel 3.2.4.2.2). Der errechnete, bei der Verneblung der Liposomen in der Lunge deponierte Output lag somit bei $0,91 \pm 0,01$ ml. Die Gesamt-Sildenafilkonzentration der vernebelten Liposomensuspensionen lag im Mittel bei $1,1 \pm 0,02$ mg/ml. Daraus ergibt sich eine in der Lunge deponierte Sildenafilemenge von $1,0 \pm 0,02$ mg.

3.2.4.4.2 Übertrittskinetiken von Sildenafil ins Perfusat

Die nach der Verneblung in den Perfusatproben gemessenen, mit der Korrekturformel korrigierten Sildenafilkonzentrationen der je vier Versuche (V 1 bis V 4) mit freiem und liposomal verkapseltem Sildenafil sind in Tab. 19 und Tab. 20 dargestellt.

t (min)	Perfusatkonzentrationen (µg/ml)				MW	SD
	V 1	V 2	V 3	V 4		
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	1,12	1,29	1,54	1,02	1,24	0,23
10	1,07	1,48	1,48	1,31	1,33	0,19
20	1,06	1,41	1,38	0,99	1,21	0,21
30	1,07	1,30	1,32	1,08	1,19	0,14
60	1,05	1,23	1,45	0,92	1,16	0,23
90	1,12	1,22	1,40	0,90	1,16	0,21
120	1,02	1,23	1,50	0,92	1,17	0,26
150	1,05	1,22	1,48	0,91	1,16	0,25
180	1,06	1,22	1,50	0,91	1,17	0,25
210	1,03	1,19	1,52	1,03	1,19	0,23
240	1,00	1,23	1,52	0,96	1,18	0,26
270	1,05	1,30	1,53	0,95	1,20	0,26
300	1,03	1,31	1,50	0,96	1,20	0,25

Tab. 19: Sildenafilkonzentrationen im Perfusat nach Verneblung von freiem Sildenafil in das Modell der isolierten Kaninchenlunge

t (min)	Perfusatkonzentrationen (µg/ml)				MW	SD
	V 1	V 2	V 3	V 4		
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	1,43	1,03	0,88	1,03	1,09	0,24
10	1,45	0,87	0,75	0,87	0,98	0,31
20	1,43	0,88	0,68	0,88	0,97	0,33
30	1,47	0,99	0,61	1,00	1,02	0,35
60	1,31	1,05	0,74	1,05	1,04	0,23
90	1,29	1,19	0,67	1,19	1,08	0,28
120	1,21	1,21	0,67	1,21	1,07	0,27
150	1,16	1,22	0,67	1,22	1,07	0,27
180	1,18	1,23	0,71	1,23	1,09	0,25
210	1,18	1,30	0,75	1,30	1,13	0,26
240	1,17	1,27	0,76	1,27	1,12	0,25
270	1,09	1,34	0,79	1,34	1,14	0,26
300	1,10	1,29	0,80	1,29	1,12	0,23

Tab. 20: Sildenafilkonzentrationen im Perfusat nach Verneblung von liposomal verkapseltem Sildenafil in das Modell der isolierten Kaninchenlunge

Da die bei der Verneblung von freiem und liposomal verkapseltem Sildenafil in der Lunge deponierten Wirkstoffmengen mit $0,95 \pm 0,02$ mg bzw. $1,0 \pm 0,02$ mg trotz statistisch signifikanten ($p=0,01$) Unterschieds in einer sehr ähnlichen Größenordnung liegen, wurden die nach Übertritt des Sildenafil ins Perfusat erreichten Perfusatkonzentrationen direkt miteinander verglichen (s. Abb. 18).

Die Konzentrations-Zeit-Kurve von liposomal verkapseltem Sildenafil liegt zwar insgesamt etwas unterhalb der Kurve von freiem Sildenafil, die Kinetiken der beiden Kurven sind aber ähnlich. In beiden Verläufen ist initial ein sehr schneller Anstieg der Sildenafilkonzentration im Perfusat mit anschließender Plateaubildung zu sehen.

So wird zehn Minuten nach der Verneblung von freiem Sildenafil ein maximaler Sildenafilgehalt von $1,33 \pm 0,19$ $\mu\text{g/ml}$ im Perfusat erreicht. Danach fällt die Konzentration wieder auf $1,16 \pm 0,23$ $\mu\text{g/ml}$ nach 60 Minuten. Auf diesem Niveau stellt sich ein Plateau ein. Bei Versuchsende nach fünf Stunden werden $1,20 \pm 0,25$ $\mu\text{g/ml}$ Sildenafil im Perfusat gemessen. Die AUC bei den Versuchen mit freiem Sildenafil beträgt $352,27 \pm 68,15$ ($\mu\text{g/ml}$) * min.

Nach der Verneblung von liposomal verkapseltem Sildenafil wird bereits nach fünf Minuten eine maximale Perfusatkonzentration von $1,09 \pm 0,24$ $\mu\text{g/ml}$ gemessen. Danach bleibt die Perfusatkonzentration über fünf Stunden relativ konstant bei ca. 1,0 bis 1,1 $\mu\text{g/ml}$. Am Ende des Versuchs liegt sie bei $1,12 \pm 0,23$ $\mu\text{g/ml}$. Aus den Perfusatkonzentrationen der Versuche mit liposomal verkapseltem Sildenafil berechnet sich eine AUC von $321,75 \pm 72,19$ ($\mu\text{g/ml}$) * min. Der Unterschied zu der bei den Versuchen mit freiem Sildenafil errechneten AUC ist statistisch nicht signifikant.

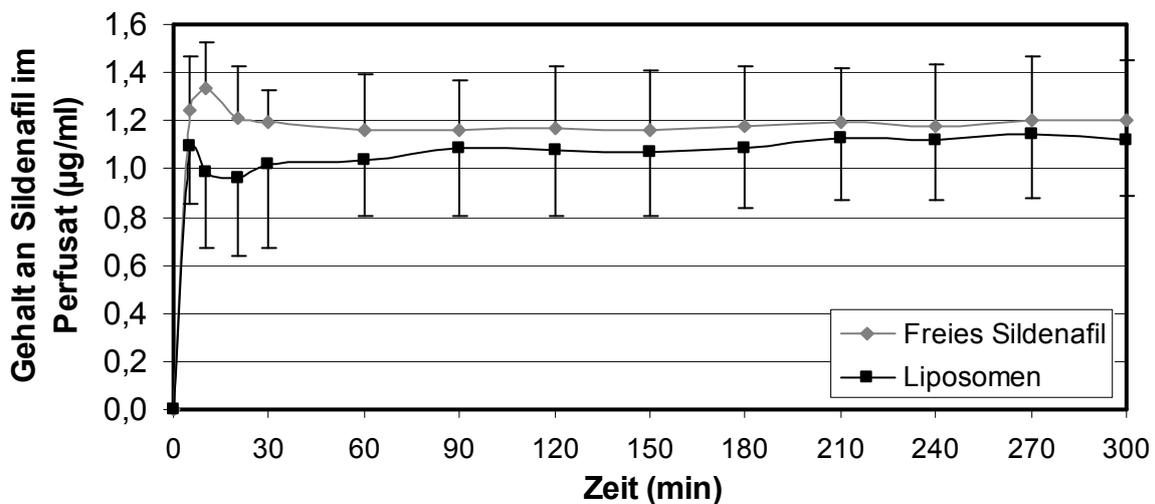


Abb. 18: Vergleich der Übertrittskinetiken von freiem und liposomal verkapseltem Sildenafil (je $n=4$) am Modell der isolierten Kaninchenlunge nach Verneblung mit dem MicroSprayer[®]. Freies Sildenafil: MW + SD; liposomales Sildenafil: MW – SD

3.2.4.4.3 Wiederfindung des in der Lunge deponierten Sildenafil

Die Verteilung des vernebelten Sildenafil in den unterschiedlichen Kompartimenten des Modellsystems ist in Tab. 21 dargestellt

	Freies Sildenafil		Liposomen	
	μg	%	μg	%
Deponiert	950,1 ± 18,3	100 %	999,4 ± 19,2	100 %
Perfusat	322,1 ± 78,3	33,8 ± 7,6	286,3 ± 64,8	28,6 ± 6,2
Lavage	91,1 ± 9,3	9,6 ± 0,8	85,4 ± 11,8	8,5 ± 1,1
Methanol-Lavage	118,2 ± 30,6	12,5 ± 3,4	101,3 ± 30,0	10,2 ± 3,1
Proben	17,9 ± 3,2	1,9 ± 0,3	15,3 ± 3,4	1,5 ± 0,3
Gesamt	549,3 ± 63,8	57,7 ± 5,6	488,2 ± 58,0	48,8 ± 5,3

Tab. 21: Verteilung des Sildenafil im Modell der isolierten Kaninchenlunge nach Verneblung von freiem bzw. liposomal verkapseltem Sildenafil (MW ± SD, jeweils n=4)

Sowohl nach der Verneblung von freiem als auch von liposomal verkapseltem Sildenafil war das Perfusat das Kompartiment mit der höchsten Wiederfindung ($33,8 \pm 7,6$ bzw. $28,6 \pm 6,2$ % der jeweils deponierten Sildenafilmenge). Nachdem sich in den Lavagen in beiden Fällen knapp 10 % des deponierten Sildenafil befanden, enthielten die danach gewonnenen Methanol-Lavagen nochmals gut 10 %. In den Proben befand sich aufgrund des geringen Volumens mit 1,5 – 2 % nur sehr wenig Sildenafil. Nach der Verneblung von freiem Sildenafil konnten so ca. 42 % des Wirkstoffs nicht wiedergefunden werden, während es bei den Versuchen mit den Sildenafil-Liposomen ca. 51 % waren. Dieser Unterschied ist aber, ebenso wie die Unterschiede in den einzelnen Kompartimenten, statistisch nicht signifikant.

4 DISKUSSION

4.1 KRITISCHE BETRACHTUNG DER METHODEN

4.1.1 Verwendung von DPPC und Cholesterol zur Herstellung der Liposomen

Bei einer Retardformulierung sollen verkapselte Wirkstoffe nicht schon während oder sofort nach der Verabreichung freigesetzt werden. Bei der Verneblung von Liposomen und der späteren Freisetzung der in ihnen enthaltenen Substanzen haben die Lipidzusammensetzung (Ladung und Kettenlänge der Lipide) sowie der Cholesterolgehalt der Liposomen einen starken Einfluss auf den Grad und den Zeitverlauf der Freisetzung verkapselter Wirkstoffe (Abra et al. 1990; Niven und Schreier 1990; Fielding und Abra 1992).

Phospholipide erfahren bei einer für jedes Phospholipid charakteristischen Temperatur einen Phasenübergang von der Gelphase in die flüssig-kristalline Phase (Kulkarni et al. 1995). Diese Phasenübergangstemperatur (T_m) steigt mit zunehmender Fettsäurekettenlänge der Lipide (Ulrich 2002). Die T_m der Lipide wiederum bestimmt die Stabilität der aus den Lipiden hergestellten Liposomen in vitro und in vivo. Ein weites Spektrum von prinzipiell verwendbaren Phospholipiden mit einer Reihe von Phasenübergangstemperaturen bietet, alleine oder in Kombination mit Sterolen, eine hohe Variabilität der Membranfluidität. Die Permeabilität der liposomalen Membran gegenüber verkapselten Substanzen, ihre Stabilität sowie ihr Verhalten in vivo können über die Auswahl der Phospholipide bzw. Sterole kontrolliert werden (Gregoriadis 1991; Anderson und Omri 2004). Bei Temperaturen unterhalb der T_m liegen Vesikel in der stabilen Gelphase vor, wohingegen sie oberhalb dieser Temperatur in den flüssigen Zustand übergehen (Kulkarni et al. 1995). Deshalb nimmt die Barrierefunktion einer Lipidmembran in der Nähe der T_m schnell ab. Die Gel-artigen Strukturen von Phospholipiden mit Phasenübergangstemperaturen oberhalb der Körpertemperatur sind daher stabiler als solche mit kurzen oder ungesättigten Fettsäureketten und daher niedriger T_m . Die T_m vom auch in den eigenen Untersuchungen verwendeten DPPC liegt mit 41 – 42 °C (Lasic 1998; Ulrich 2002; Kleemann et al. 2007) über der physiologischen Körpertemperatur. Zudem sind Liposomen aus DPPC stabiler gegenüber der Verneblung als Vesikel aus Lipiden mit niedrigeren Phasenübergangstemperaturen (Bridges und Taylor 1998). Allerdings kann es durch die Inkorporation von Cholesterol oder die Verkapselung von Wirkstoffen in die Liposomen zu Veränderungen der T_m kommen (Tomita et al. 1989; Darwis und Kellaway 2001; Jutila et al. 2001; Kleemann et al. 2007; Deniz et al. 2010). Da es sich bei dem in der eigenen Arbeit verwendeten Farbstoff Rhodamin 6G und

dem Wirkstoff Sildenafil um lipophile Substanzen handelt, kann man davon ausgehen, dass diese sich nach der Verkapselung in Liposomen bevorzugt in der Lipidmembran der Vesikel befinden (Khan et al. 2008). Durch diese Inkorporation ist auch eine Veränderung der T_m sehr wahrscheinlich. Diese wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Bei der interessierenden Verneblungsstabilität und dem Verhalten der Vesikel im Modell der isolierten Kaninchenlunge handelt es sich um komplexe Prozesse, die von mehreren Faktoren abhängig sind. Einen wesentlichen Faktor stellt die Art des verwendeten Verneblers dar, sodass das Verhalten der Liposomen auch mit Kenntnis der genauen T_m nicht hätte vorhergesagt werden können.

Eine Stabilisierung der Membran wird durch eine Inkorporation von Cholesterol (CH) erreicht. Wie in Kapitel 3.1.1.2 beschrieben, handelt es sich dabei um ein Sterol, das die Permeabilität wasserlöslicher Moleküle durch die Liposomenmembran reduziert (Demel und de Kruffyff 1976; Sharma und Sharma 1997; Barenholz 2001; Kraske und Mountcastle 2001) und die Stabilität der Membran in Gegenwart biologischer Flüssigkeiten wie Blut oder Plasma stabilisiert (Gregoriadis und Davis 1979; Kirby et al. 1980; Damen et al. 1981). Cholesterol kommt auch natürlich in Zellen von Säugetieren vor, wo es das am häufigsten vorkommende Sterol ist (Demel und de Kruffyff 1976). Bei der liposomalen Verkapselung von amphiphilen oder lipophilen Substanzen kann ein höherer Cholesterolgehalt allerdings zu einer sinkenden Verkapselungseffizienz führen, da die zu verkapselnde Substanz durch das Cholesterol aus der Membran verdrängt wird (Moribe et al. 1999; Zhang et al. 2005; Yang et al. 2007; Zaru et al. 2007; Deniz et al. 2010). Bei der Herstellung von Liposomen zur inhalativen Applikation muss aber eine ausreichende Membranstabilität sichergestellt werden, da Liposomen durch den Prozess der Verneblung einer nicht zu vernachlässigenden physikalischen Belastung ausgesetzt werden und eine vorzeitige Freisetzung des Wirkstoffs bei der Verneblung den Retardeffekt beeinträchtigen würde. Daher ist bei der Herstellung von Liposomen zur inhalativen Applikation ein optimaler Cholesterolgehalt von entscheidender Bedeutung (Leung 1996; Bridges und Taylor 1998; Abu-Dahab et al. 2001; Zaru et al. 2007).

In der eigenen Arbeit wurden Liposomen aus dem Phospholipid DPPC und dem Sterol Cholesterol (CH) im Verhältnis von 7 : 3 (zur Verkapselung des Fluoreszenzfarbstoffs R6G) bzw. 8 : 2 (zur Verkapselung des Wirkstoffs Sildenafil) hergestellt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Liposomen aus DPPC und CH stabil gegenüber der Verneblung sind (Bridges und Taylor 1998; Kleemann et al. 2007). Weiterhin haben sich Liposomen dieser Zusammensetzung als geeignet für den Einsatz als Retardformulierung gezeigt, da die Pharmakokinetik vernebelter Substanzen sowie deren Verweildauer in der Lunge durch ihre

Verkapselung in Liposomen aus DPPC und CH sowohl ex vivo am Modell der isolierten Kaninchenlunge als auch in vivo modifiziert werden konnte. So konnte Rüsç eine verzögerte Freisetzung des hydrophilen Fluoreszenzfarbstoffs Carboxyfluorescein aus DPPC:CH-Liposomen (DPPC:CH im Verhältnis 7 : 3) nach Verneblung der Liposomen am Modell der isolierten, ventilerten und blutfrei perfundierten Kaninchenlunge zeigen (Rüsç 2010). Taylor et al. konnten durch die Verkapselung von Cromoglycat in Liposomen (DPPC:CH im Verhältnis 1 : 1) bei gesunden Freiwilligen, die die Substanz inhaliert hatten, eine verlängerte Verweildauer und veränderte Pharmakokinetik des Wirkstoffs in den Lungen im Vergleich zum freien Wirkstoff feststellen. Nach der Inhalation des liposomal verkapselten Cromoglycats konnte der Wirkstoff noch nach 24 und 25 Stunden im Plasma der Probanden festgestellt werden, während nach der Inhalation von freiem Cromoglycat ein deutlich höherer anfänglicher Plasmapeak mit einer anschließenden raschen Abnahme der Wirkstoffkonzentration beobachtet wurde, sodass das Cromoglycat nach 24 und 25 Stunden nicht mehr im Plasma nachweisbar war (Taylor et al. 1989). Mit Liposomen aus DPPC und CH, die mit ^{99m}Tc markiert waren und die von Freiwilligen inhaliert wurden, konnten Weers et al. nach 24 bzw. 48 Stunden noch 60,4 bzw. 38,3 % der ursprünglich deponierten Radioktivität in der Lunge nachweisen (Weers et al. 2009).

Daher wurde davon ausgegangen, dass durch die selbst hergestellten Liposomen aus DPPC und CH eine verzögerte Freisetzung des Wirkstoffs Sildenafil erzielt werden kann.

4.1.2 Verwendung von R6G zur Herstellung und Charakterisierung von Liposomen

Ziel dieser Arbeit war es, eine liposomale Formulierung zu entwickeln, mit der Sildenafil effizient verkapselt werden kann und die durch die Verneblung möglichst wenig Veränderung hinsichtlich der Wirkstoffbeladung erfährt. Im Hinblick auf die spätere Verkapselung und Verneblung von Sildenafil in Liposomen wurde der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G (R6G) als Modellsubstanz gewählt. Bei R6G handelt es sich um eine Substanz, die, ebenso wie Sildenafil, lipophil ist (Khan et al. 2008; Lahnstein et al. 2008), aber durch fluorimetrische Messungen deutlich einfacher nachweisbar ist. Außerdem konnte R6G bereits erfolgreich in Liposomen verkapselt werden (Moscho et al. 1996; Khan et al. 2008). Da die bislang verwendeten Liposomen nicht zur Verneblung eingesetzt wurden, sollte in der eigenen Arbeit zunächst die Vernebelbarkeit der Vesikel untersucht werden.

4.1.3 Methoden zur Herstellung der Liposomen mit R6G

In der eigenen Arbeit wurden vier unterschiedliche Methoden ausgewählt, um mit lipophilem R6G, das als Modellsubstanz für Sildenafil diente, beladene Liposomen herzustellen. Durch den Vergleich der Charakterisierungsergebnisse der nach diesen Methoden hergestellten Vesikel sollte ein Verfahren zur optimalen Verkapselung des R6G in Liposomen gefunden werden. Außerdem sollten die Liposomen bei der späteren Verneblung eine möglichst geringe Menge des verkapselten Farbstoffes freisetzen.

Eine der gewählten Herstellungsmethoden ist die Filmmethode (in der vorliegenden Arbeit als „**Methode A**“ bezeichnet). Dabei handelt es sich um eine etablierte, relativ einfache Methode zur Herstellung multilamellarer Vesikel (MLV). MLV können aus verschiedenen Phospholipiden hergestellt werden und eignen sich zur Verkapselung einer Vielzahl von Substanzen. Ein großer Nachteil der so hergestellten Liposomen ist ihr geringer wässriger Inhalt, bezogen auf den Lipidanteil, der eine geringe Verkapselungseffizienz hydrophiler Substanzen bedingt (Szoka und Papahadjopoulos 1980). Wenn schlecht wasserlösliche Farb- oder Wirkstoffe verkapselt werden sollen, ist bei dieser Methode das Erreichen ausreichender Stoffkonzentrationen im wässrigen Kompartiment der Liposomen limitiert.

Durch den Einsatz von hydroethanolischen Lösungsmitteln kann die Löslichkeit lipophiler Farb- oder Wirkstoffe verbessert werden. Daher wurde dieses Verfahren auch in der eigenen Arbeit zur Verkapselung des lipophilen Farbstoffs R6G angewendet (in der vorliegenden Arbeit als „**Methode B**“ bezeichnet). Die so gelösten Substanzen werden im wässrigen Kompartiment der Vesikel eingeschlossen (López-Pinto et al. 2005). So konnten bereits Liposomen mit Minoxidil (López-Pinto et al. 2005), Methotrexat (Dubey et al. 2007b) und Salbutamol (Bendas und Tadros 2007) für die dermale Anwendung erfolgreich hergestellt werden.

Eine weitere Möglichkeit (in der vorliegenden Arbeit als „**Methode C**“ bezeichnet) ist die Zugabe der zu verkapselnden lipophilen Stoffe zu den Lipiden, die dann zusammen in einem organischen Lösungsmittel gelöst werden (Szoka und Papahadjopoulos 1980). Dadurch sind die Farb- bzw. Wirkstoffe schon im Lipidfilm enthalten und werden bei der Bildung von Liposomen in deren Membran integriert (Lasic 1988; Touitou et al. 2001; Ulrich 2002; López-Pinto et al. 2005; Dubey et al. 2007a; Bhalaria et al. 2009).

Bei der Ethanolinjektions-Methode (in der eigenen Arbeit als „**Methode D**“ bezeichnet) schließlich handelt es sich um ein von Touitou et al. entwickeltes Verfahren zur Herstellung von Ethosomen (Touitou et al. 2000), das inzwischen erfolgreich zur Verkapselung und somit Verbesserung der dermalen Penetration von sowohl lipophilen als auch hydrophilen

Substanzen wie Minoxidil und Testosteron (Touitou et al. 2000), Trihexyphenidyl (Dayan und Touitou 2000), Fluoreszenzfarbstoffen (Touitou et al. 2001), Ammoniumglycyrrhizinat (Paolino et al. 2005), Ketotifen (Elsayed et al. 2007), Melatonin (Dubey et al. 2007a) oder Lamivudin (Jain et al. 2007) eingesetzt werden konnte. Lipophile Substanzen sind dabei sowohl in den Lipidmembranen der multilamellaren Vesikel, als auch im ethanolhaltigen Inneren zu finden (Touitou et al. 2000).

Die anschließende Extrusion der nach den oben beschriebenen Methoden selbst hergestellten, mit R6G beladenen Liposomen wurde durchgeführt, um eine Reduktion der Vesikelgröße zu erreichen. Große Vesikel können zwar effektiver hydrophile Substanzen verkapseln, sind aber weniger stabil gegenüber der Verneblung. Durch eine Reduktion der Größe durch Extrusion oder Ultraschall werden die Vesikel stabiler (Taylor et al. 1990; Niven et al. 1991; Taylor und Newton 1992; Taylor und Elhissi 2006). Der Grund hierfür ist, dass bei der Passage durch den Vernebler Scherkräfte auf die Liposomen wirken, die dazu führen, dass Liposomen und Liposomenaggregate zerbrechen, was in einem Verlust der verkapselten Substanz (Bridges und Taylor 1998) und einer signifikanten Reduktion ihrer mittleren Größe resultiert (Farr et al. 1985; Taylor et al. 1990; Gilbert et al. 1988). Auf die Größenverteilung von kleinen Liposomen (0,2 µm) hat die Verneblung hingegen kaum einen Einfluss (Schreier et al. 1993).

4.1.4 Herstellung von Liposomen mit Sildenafil

Durch die Versuche mit R6G hat sich gezeigt, dass die Methode, den Farbstoff zusammen mit den Lipiden in den Glaskolben einzuwiegen und im organischen Lösungsmittel zu lösen („**Methode C**“), am besten geeignet ist, das lipophile R6G in Liposomen zu verkapseln. Die mit dieser Methode erzielten Ergebnisse waren gut reproduzierbar, wohingegen die Verkapselungseffizienzen bei den anderen Methoden deutliche Schwankungen zwischen verschiedenen Chargen zeigten. Da sich die nach dieser Methode hergestellten R6G-Liposomen zudem effizient und nahezu intakt vernebeln ließen (s. Kapitel 3.2.2.1.4 und 3.2.2.2.3), wurde diese Methode gewählt, um Liposomen mit Sildenafil herzustellen.

Die mit Sildenafil beladenen Liposomen wurden wie die Liposomen mit R6G aus DPPC und Cholesterol (CH) im molaren Verhältnis von 7 : 3 hergestellt, die wässrige Phase bestand aus Phosphatpuffer (PBS, pH 7,4). Bei dem Versuch, die Sildenafil-Liposomen zu extrudieren, entstand ein so großer Widerstand im Extruder, dass es durch diesen Schritt zu einem Sildenafilverlust von ca. 50 % kam. Auch bei einem Ansatz, bei dem als wässrige Phase anstatt PBS Aqua dest. wie bei den R6G-Liposomen gewählt wurde, trat dieses Phänomen auf. Deniz et al. hatten bereits bei Liposomen aus dem Phospholipid Distearyl

Phosphatidylcholin (DSPC), die Celecoxib enthielten, beobachtet, dass die Vesikel sich mit einem höheren Cholesterolgehalt (molares Verhältnis DSPC zu Cholesterol von 2 : 1) nicht extrudieren ließen, während sich Liposomen mit weniger oder gar keinem Cholesterol gut extrudieren ließen (Deniz et al. 2010). Daher wurde der Cholesterol-Gehalt der Sildenafil-Liposomen zunächst von 30 auf 20 Molprozent reduziert. Aber auch die Liposomen mit dieser Zusammensetzung konnten nicht extrudiert werden, ebenso wenig wie Liposomen ganz ohne Cholesterol. Wahrscheinlich kam es, wie in Kapitel 4.2.3.3 ausführlicher diskutiert, durch die Inkorporation des Sildenafil in die Liposomenmembran oder die Komplexbildung von Sildenafil an der Oberfläche der Liposomen zu strukturellen Veränderungen der Membran, die dazu führten, dass diese zu rigide wurde. Eine ausreichende Fluidität der Lipidmembran, die zur Passage der Poren der Extruder-Membran vonnöten ist, war nicht mehr gegeben. Es ist bekannt, dass hydrophobe Substanzen durch ihre direkte Interaktion mit der Liposomenmembran die physikalischen Eigenschaften von Liposomen verändern können, wenn sie in großen Mengen enthalten sind (Kulkarni et al. 1995). Diese Beobachtung wird durch Ergebnisse aus mehreren Studien bestätigt, die zeigen konnten, dass bei der Verkapselung von amphiphilen oder lipophilen Substanzen deren Inkorporation in die Liposomenmembran einen stabilisierenden Effekt auf die Membran hat (Fatouros und Antimisiaris 2001, 2002; Mohammed et al. 2004; Bhatia et al. 2004).

Für die eigenen Untersuchungen hatte dies zur Folge, dass im Hinblick auf die Verneblungsstabilität und das Freisetzungsverhalten der Liposomen bei den weiteren Chargen ein Cholesterolgehalt von 20 Molprozent beibehalten wurde. Da auf eine Extrusion verzichtet werden musste, wurden die Liposomen nach der Herstellung mit Ultraschall behandelt. Dies ist eine alternative Methode zur Größenreduktion (Sharma und Sharma 1997), die außerdem zu einer vollständigen Ablösung des Lipidfilms vom Glaskolben und somit zu einer verbesserten Verkapselungseffizienz führte. Allerdings waren die so behandelten Vesikel noch deutlich größer (VMD $3,08 \pm 0,79 \mu\text{m}$) und wiesen eine weniger homogene Größenverteilung auf (GSD $1,84 \pm 0,19$) als die extrudierten Liposomen mit R6G (VMD $0,61 \mu\text{m}$; GSD $1,71$) (s. Kapitel 3.2.4.1 und 3.2.2.1.4).

4.1.5 Verneblung der Liposomen mit verschiedenen Verneblern

Bei der Entwicklung einer liposomalen Depotformulierung zur pulmonalen Applikation gibt es mindestens fünf wichtige Faktoren, die evaluiert werden müssen. Dazu gehören die Partikelgröße, die Verkapselungseffizienz, die Freisetzungsgeschwindigkeit, die Stabilität und die Wahl des Verneblers (Zeng et al. 1995). Neben einer effizienten Wirkstoffbeladung, die

bei allen Liposomen eine Rolle spielt, müssen Liposomen, die zur inhalativen Therapie eingesetzt werden sollen, auch eine ausreichende Stabilität gegenüber der Verneblung aufweisen, da der Prozess der Verneblung einen merklichen Einfluss auf die Retention von verkapselten Substanzen haben kann. Eine zu schnelle Freisetzung der Wirkstoffe aus den Liposomen durch die Verneblung kann die Effektivität solch einer Formulierung, ob zur kontrollierten systemischen Absorption oder zur Verlängerung der lokalen Wirkung eingesetzt, reduzieren oder gar ganz aufheben. Wenn eine liposomale Formulierung zur Inhalation als Aerosol verwendet werden soll, sollte also gezeigt werden, dass die Wirkstofffreisetzung während der Verneblung minimal ist (Niven und Schreier 1990). Vor allem, wenn amphiphile Substanzen in Liposomen verkapselt und diese dann vernebelt werden sollen, ist die Verneblungsstabilität solcher Formulierungen nicht leicht vorherzusagen, da es durch Interaktionen zwischen dem Wirkstoff und Membrankomponenten der Liposomen zu Veränderungen der Rigidität und Integrität der Vesikelmembran kommen kann (Zaru et al. 2007). Um eine Beschädigung der Vesikel zu minimieren, müssen also einige Gesichtspunkte sowohl seitens der Formulierung, als auch bezüglich des Verneblers beachtet werden (Taylor und Elhissi 2006; Zaru et al. 2007).

Die R6G-Liposomen wurden mit einem Vibrating mesh Vernebler, dem AERONEB® Solo, vernebelt. Diese Vernebler bieten einige Vorteile gegenüber Düsen- und Ultraschallverneblern, die detailliert bei Dhand, 2004 beschrieben werden. So erzeugen sie Aerosole mit einem ausgeprägten Feinpartikelanteil und sie bringen die Medikamente effizienter in den Respirationstrakt als konventionelle Düsen- oder Ultraschallvernebler. Außerdem sind sie tragbar, batteriebetrieben, relativ leise, können sowohl Lösungen als auch Suspensionen effizient vernebeln und haben ein minimales Residualvolumen. Die Verneblungsdauer ist in der Regel kürzer als bei konventionellen Verneblern. Einige Modelle sind atem-getriggert, wodurch die Freisetzung von vernebeltem Wirkstoff in die Umgebung minimiert wird. Da der Temperaturanstieg der Medikamentenlösung oder -suspension im Vergleich zu Ultraschallverneblern minimal ist, können auch temperaturempfindliche Wirkstoffe wie Proteine, Peptide oder Antibiotika vernebelt werden, ohne dass es zur Denaturierung bzw. Reduktion der Aktivität kommt. Außerdem benötigt der AERONEB zur Aerosolerzeugung keine Druckluft. Die Scherspannung ist daher minimal und die Wirkstofffreisetzung durch Beschädigung von Liposomen gering (Dhand 2004). Dies konnten auch Elhissi et al. zeigen, die Liposomen mit einem Düsen- und verschiedenen Vibrating mesh Verneblern vernebelten. Zwar kam es bei allen Verneblern zu einer Beschädigung der Liposomen und einem signifikanten Verlust des verkapselten Salbutamolsulfats, dies war bei den Vibrating mesh

Verneblern aber weniger stark ausgeprägt als bei den Düsenverneblern (Elhissi et al. 2006; Elhissi et al. 2007). Auch Kleemann et al., die carboxyfluorescein- bzw. iloprosthaltige Liposomen mit je einem Ultraschall-, Düsen- und Vibrating mesh Vernebler aerosolisierten, konnten zeigen, dass die Verneblung mit dem Vibrating mesh Vernebler die Liposomen weniger beschädigte als die beiden anderen Vernebler (Kleemann et al. 2007). Diese neue Verneblergeneration ist somit gut zur effizienten Verneblung von Liposomen geeignet (Dhand 2004; Elhissi et al. 2006; Kleemann et al. 2007). Allerdings wird die Leistung von Vibrating mesh Verneblern stärker von Eigenschaften der zu vernebelnden Formulierung wie Ionenstärke, Dichte, Oberflächenspannung und Viskosität beeinflusst, als dies bei Düsenverneblern der Fall ist (Elhissi et al. 2006; Elhissi et al. 2007; Ghazanfari et al. 2007; Zhang et al. 2007). Außerdem kann es auch bei der Verneblung von Liposomen mit Vibrating mesh Verneblern, wie auch bei Düsen- und Ultraschallverneblern, zu einer Akkumulation der Phospholipide im Vernebler kommen (Elhissi et al. 2006; Elhissi et al. 2007).

So bildeten sich bei einem ersten Versuch, die Sildenafil-Liposomen wie die R6G-Liposomen mit dem Aeronob[®] Solo zu vernebeln, makroskopisch erkennbare Rückstände im Vernebler, während das aufgefangene Aerosol deutlich klarer war als die eingefüllte Liposomensuspension. Das aufgefangene Aerosol enthielt nur noch ca. 38 % der eingefüllten Sildenafilkonzentration, im Verneblerrückstand konnten hingegen 371 % gemessen werden. Daraus musste geschlossen werden, dass sich die Liposomen mit dem Aeronob[®] Solo nicht vernebeln ließen. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass sich die Liposomen kaum extrudieren ließen, da die Verneblung mit einem Vibrating mesh Vernebler auf dem Prinzip der Extrusion beruht (Dhand 2004). Durch die Inkorporation des Sildenafil in die Liposomenmembran oder die Komplexbildung von Sildenafil mit den Lipiden an der Liposomenoberfläche scheint die Membran der Vesikel so rigide geworden sein, dass die Vesikel die Poren weder in der Polycarbonat-Membran des Extruders noch im Netz des Verneblers passieren konnten. Daher wurden die Sildenafil-Liposomen zur Untersuchung der Verneblungsstabilität mit dem Düsenvernebler Pari LC Sprint[®] Star vernebelt.

Bei der Verneblung von Liposomen mit einem Düsenvernebler muss beachtet werden, dass Scherkräfte vorhanden sind, die eine Beschädigung von Liposomen und ein Zerschneiden von Liposomenaggregaten bewirken und so zur Freisetzung der verkapselten Substanz führen können (Taylor et al. 1990; Niven et al. 1991; Taylor und Elhissi 2006). Auch die Impaktion von Liposomen an den Blenden im Vernebler kann die Vesikel beschädigen und zur Wirkstofffreisetzung führen (Dhand 2004). Dies ist bei der Verneblung von mit lipophilen Substanzen beladenen Liposomen aber weniger kritisch, da die Substanzen mit der

Lipidmembran assoziiert sind (Taylor et al. 1990; Taylor und Newton 1992; Taylor und Farr 1993). Daher führte die Verneblung der Sildenafil-Liposomen mit dem Düsenvernebler auch nicht zu einer Freisetzung des Wirkstoffs aus den Vesikeln (s. Kapitel 4.2.3.1).

Der MicroSprayer[®] wurde für die intratracheale Aerosolapplikation in die isolierte Kaninchenlunge eingesetzt. Dadurch kam es innerhalb weniger Sekunden zur Deposition der gesamten applizierten Sildenafilmenge. Dies erleichterte die Auswertung der Kinetikdaten, da es bei einer Verneblung des Wirkstoffs zu einer Verzerrung der Ergebnisse durch den mehrere Minuten andauernden Verneblungsprozess gekommen wäre. Die Applikation mit dem MicroSprayer[®] erfolgte während der Inspiration. Dabei wurde die Atemfrequenz von 30 auf 5 Atemzüge pro Minute reduziert. Durch die verlängerte Inspirationsphase mit herabgesetzter Flussgeschwindigkeit sollte eine Deposition des Aerosols in den peripheren Lungenbezirken erleichtert werden (Beck-Broichsitter et al. 2010). Untersuchungen der regionalen Verteilung von mittels MicroSprayer[®] in die Lungen von Rhesusaffen verbrachten Aerosolen bestätigten eine periphere Lungendeposition von ca. 40 % mit annähernd gleichmäßiger Verteilung zwischen rechter und linker Lunge. Dabei war diese Methode bezüglich der Lungendeposition 50 – 100 mal effektiver als die Verneblung mit konventionellen Verneblern (Beck et al. 2002). Durch die zuverlässige Applikation, verbunden mit der schnellen, einfachen Handhabung, eignet sich der MicroSprayer[®] gut zur experimentellen Behandlung von Mäusen (Bivas-Benita et al. 2005) und Ratten (Suarez et al. 2001; Chandener et al. 2009). Auch Liposomen wurden schon mithilfe des MicroSprayers[®] intratracheal in Ratten (Wijagkanalan et al. 2008) und Mäuse (Kuronuma et al. 2009) appliziert.

In der Arbeitsgruppe der Verfasserin wurde der MicroSprayer[®] bereits erfolgreich zur Untersuchung von Salbutamol-beladenen Nanopartikeln am Modell der isolierten Kaninchenlunge eingesetzt (Beck-Broichsitter et al. 2010).

4.1.6 Inhalative Applikation von Sildenafil

Der Phosphodiesterase (PDE)-5-Inhibitor Sildenafil wird zur oralen Behandlung der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH) des Menschen eingesetzt (Barnett und Machado 2006). Nach der Einnahme tritt ein maximaler Effekt nach 60 Minuten ein (Ghofrani et al. 2004c). Die Halbwertszeit beträgt vier Stunden (Buckley et al. 2010). Da die Bioverfügbarkeit von Sildenafil nach oraler Applikation nur bei ca. 41 % liegt (Nichols et al. 2002; Sheu et al. 2003), könnte durch pulmonale Applikation des Wirkstoffs eine Steigerung der Effizienz erzielt werden. Außerdem weist Sildenafil zwar eine pulmonale Selektivität auf (Michelakis 2002; Michelakis et al. 2003; Barnett und Machado 2006). Aber Weimann et al. konnten bei

Versuchen mit Schafen neben einer Senkung des pulmonalarteriellen Druckes (pulmonary artery pressure, PAP), dessen Erhöhung zuvor durch ein Thromboxan-Analogon (U46619) induziert worden war, bei höheren Sildenafilosen auch eine Senkung des systemischen arteriellen Drucks (systemic artery pressure, SAP) beobachten (Weimann et al. 2000). Durch die inhalative Verabreichung des PDE 5-Inhibitors sollen diese unerwünschten Nebenwirkungen reduziert werden. So konnte in einer weiteren Studie ebenfalls bei Schafen mit U46619-induzierter pulmonaler Hypertonie durch Inhalation von vernebeltem Sildenafil eine selektive Senkung des PAP erzielt werden, ohne dass es zu systemischen Nebenwirkungen wie Senkung des SAP, des systemischen Gefäßwiderstandes oder einer Steigerung des Herzzeitvolumens kam. Außerdem wurden die Plasma-Sildenafilspiegel nach dieser inhalativen Behandlung mit den von Weimann et al. nach oraler Behandlung gemessenen Werten verglichen. Während bei oraler Applikation eine Sildenafilosis von 30 mg erforderlich war, um den PAP um 8 mmHg zu senken, wurden für den gleichen Effekt bei Inhalation nur 25 mg des Wirkstoffs benötigt und nur zwei Drittel der nach enteraler Applikation gemessenen Plasmakonzentration erreicht. Da nur der Anteil des Sildenafils, der systemisch absorbiert wird, den systemischen Gefäßtonus beeinflusst, lässt diese Untersuchung vermuten, dass vernebeltes Sildenafil im Vergleich zur enteralen Anwendung eine verbesserte pulmonale Selektivität aufweist (Ichinose et al. 2001). Ein weiterer Vorteil ist der schnelle Wirkungseintritt nach inhalativer Anwendung. Die Vasodilation begann innerhalb von zwei Minuten nach Beginn der Verneblung. Ein Nachteil ist aber die kurze Wirkdauer. Der PAP stieg bei den untersuchten Schafen dosisabhängig nach Beendigung der Inhalation mit einer Halbwertszeit von $4,3 \pm 0,7$ Minuten (nach Beendigung der Verneblung von 10 mg Sildenafil) bzw. $6,9 \pm 1,2$ Minuten (nach Beendigung der Verneblung von 30 mg Sildenafil) wieder auf den Ausgangswert (Ichinose et al. 2001).

Daher sollte in dieser Arbeit versucht werden, durch die Verkapselung des PDE 5-Inhibitors in Liposomen eine Retardformulierung mit verlängerter Wirkstofffreisetzung zur pulmonalen Applikation zu entwickeln.

4.1.7 Das Modell der isolierten, ventilierten, perfundierten Kaninchenlunge

Das Modell der isolierten, perfundierten Lunge (IPL) wird schon seit langem zur Untersuchung physiologischer, biochemischer und metabolischer Aspekte dieses komplexen Organs verwendet (Seeger et al. 1994). In den frühen 1970er Jahren wurden dafür zuerst Kaninchenlungen verwendet. Bald darauf wurde das System weiter entwickelt und verfeinert

für den Einsatz mit Ratten- und Meerschweinchenlungen modifiziert (Niemeier 1984). Dieses Modell bietet folgende Vorteile (Seeger et al. 1994; Tronde et al. 2008):

- Die Untersuchungen werden an einem intakten Organ mit physiologischer Anordnung von Zellen und extrazellulärer Matrix durchgeführt, wobei physiologische Regulationsmechanismen wie Vasoreaktivität, Ventilations-Perfusions-Verhältnis, Permeabilitätsbarrieren und Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen aufrecht erhalten bleiben, während systemische Absorption, Distribution, Metabolisierung und Elimination ausgeschlossen werden. Daher konnte in der vorliegenden Arbeit der Übertritt pulmonal applizierter Substanzen von der Lunge in das Perfusat direkt beobachtet werden.
- Der Einfluss plasmagetragener Mediatoren, Hormone und zirkulierender Blutzellen kann leicht kontrolliert bzw. wie bei dem in der eigenen Arbeit verwendeten blutfrei perfundierten Modell ganz eliminiert werden. Um die Löslichkeit des schlecht wasserlöslichen Sildenafil im Perfusat zu verbessern, wurde dem Perfusat Albumin zugesetzt. Dies vermittelt eine Löslichkeit durch die Bindung des Wirkstoffs an das Protein. Somit wurde der Übertritt des lipophilen Sildenafil aus der Lunge in das Perfusat erleichtert. Die Bindung einer lipophilen Substanz (Propranolol) an Albumin konnte schon an isolierten Rattenlungen gezeigt werden. Bei Perfusion der Lunge mit dem Propranolol- und Albumin-haltigen Perfusat verblieb der Betablocker im Gefäßsystem, während er bei den mit Dextran-Perfusat perfundierten Lungen in den Lungen sequestriert wurde (Liu et al. 2009).
- Ein weiterer Vorteil besteht in der Möglichkeit, hämodynamische Parameter sowie Ventilation und Perfusion der Lunge kontrollieren zu können und relevante physiologische Variablen wie Gefäßdruck, Membranpermeabilität, Flüssigkeitshaushalt und Gasaustausch messen zu können. Dies geschah auch in der eigenen Arbeit, wo linksventrikulärer und pulmonalarterieller Gefäßdruck, Beatmungsdruck und -volumen sowie Gewicht der Lunge gemessen und zur Beurteilung der Viabilität der Lunge herangezogen wurden.
- Eine Freisetzung von Mediatoren sowie metabolische Veränderungen können durch Analysen des Puffermediums beobachtet werden. Dies geschah in der eigenen Arbeit durch die Kontrolle des pH-Wertes des Perfusats.
- Im Vergleich zu in vivo Modellen wird im Modell der IPL die Applikation von Wirkstoffen in die Lunge erleichtert, multiple Probenentnahmen aus dem Perfusat und ein Lavagieren der Lungen sind leicht durchzuführen. Eine multiple Probenentnahme war in der eigenen Arbeit wichtig, um den zeitlichen Verlauf des Wirkstoffübertritts von der Lunge in das

Perfusat verfolgen zu können. Auch das Lavagieren der Lungen am Ende der Versuche wurde durchgeführt, um die Wiederfindung des Sildenafil in den einzelnen Kompartimenten des Modellsystems berechnen zu können.

Nachteile bestehen in der Zusammensetzung des Organs aus unterschiedlichen Zelltypen, die eine Zuordnung physiologischer oder biochemischer Ereignisse zu einem bestimmten Zelltyp oder interzellulären Interaktionen verhindert. Außerdem können auch nach intensivem Spülen der Gefäße Leukozyten am Endothelium haften bleiben und so im Gefäßbett verbleiben. Weiterhin sind Langzeitstudien mit diesem Modell nicht möglich. Die Viabilität der Lungen beträgt in der Regel maximal fünf Stunden. Daher wurde die Versuchsdauer in den eigenen Untersuchungen auf diesen Zeitraum beschränkt. Schließlich kann es durch die (neuronalen) Isolation und Perfusion der Lunge zu Veränderungen wie Aktivierung biochemischer und metabolischer Stoffwechselwege kommen.

Wenn diese Punkte beachtet werden, können Informationen, die aus diesem Modell gewonnen werden, Hinweise auf in vivo Bedingungen in diesem komplexen Organ geben. Somit nimmt die perfundierte Lunge eine wichtige Position zwischen Zellkulturversuchen und Untersuchungen an intakten Tieren ein.

Bei der Interpretation von an der isolierten Lunge erhobenen Ergebnissen muss aber beachtet werden, dass es einige morphologische Unterschiede in der Lungenanatomie zwischen verschiedenen Tierspezies und vor allem zwischen Tieren und dem Menschen gibt. In einer Studie wurden Länge, Durchmesser und Verzweigungswinkel der ersten sechs Teilungsgenerationen des Bronchialbaumes von Ratten, Hamstern, Hunden, Eseln und Kaninchen mit denen von Menschen verglichen (Schlesinger und La McFadden 1981). Andere Autoren verglichen die Bronchialbäume von Menschen, Hunden, Ratten und Hamstern (Phillips und Kaye, SR 1995). Dabei zeigte sich, dass sich die Geometrie der menschlichen Atemwege deutlich von jener der anderen Spezies unterscheidet, wobei der menschliche Bronchialbaum am symmetrischsten in Bezug auf Durchmesser und Verzweigungswinkel ist. Bei Esel und Kaninchen war eine monopodiale Verzweigung des Bronchialbaumes zu erkennen. Dabei zieht von der Trachea aus je ein langer, gebogener Ast zu den kaudalen Rändern der Lunge, der zur Peripherie hin immer dünner wird. Von diesen beiden Luftwegen gehen lateral und ventral die Lappenbronchien ab, die sich dann weiter aufteilten (Schlesinger und La McFadden 1981). Die Unterschiede zwischen der dichotomen Aufzweigung einer menschlichen Lunge und der monopodialen Aufzweigung sind schematisch in Abb. 19 dargestellt.

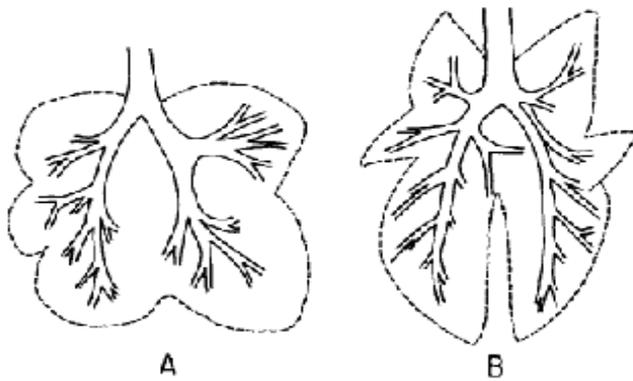


Abb. 19: Schematische Darstellung der Aufzweigung des Bronchialbaumes einer menschlichen Lunge (A) und der monopodialen Aufzweigung (Esel oder Kaninchen) (B) (Schlesinger und La McFadden 1981)

Die terminalen Bronchiolen von Kaninchen teilen sich schließlich dichotom auf in respiratorische Bronchiolen, die dann weiter über Ductuli alveolares zu den Alveolen führen (s. Abb. 20). Diese Aufzweigung unterscheidet sich wiederum von derjenigen des Menschen, wo sich die respiratorischen Bronchiolen, die sowohl luftleitende als auch gasaustauschende Funktion haben, sukzessiv immer weiter teilen und mit jeder Teilungsgeneration mehr alveolarisiert werden (Murray 2010).

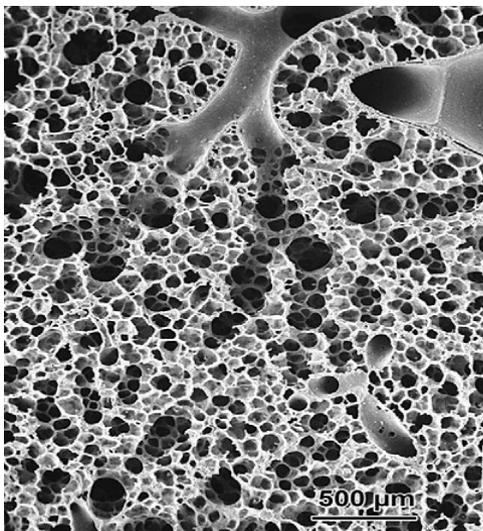


Abb. 20: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Kaninchenlunge, auf normales Atemvolumen aufgebläht. Zu erkennen sind die dichotome Aufzweigung einer terminalen Bronchiolen, teilweise alveolarisierte respiratorische Bronchiolen, Ductuli alveolares und Alveolen (Murray 2010)

Die tierartlichen Unterschiede im Verzweigungsmuster können sich unter anderem auf die Deposition inhalierter Partikel auswirken und müssen daher bei der Interpretation von Versuchsergebnissen beachtet werden. Für die Partikeldeposition sind vor allem die Geometrie der Atemwege und der unter anderem davon abhängige Luftfluss verantwortlich. Daher führt ein inhaliertes Aerosol bei verschiedenen Tieren zu unterschiedlichen Depositionsmustern. Da der Aufbau des oberen Bronchialbaums von Hunden dem des

Menschen am ähnlichsten ist, halten Schlesinger et al. aufgrund dieser theoretischen Überlegungen das Hundemodell für Depositionsstudien am besten geeignet (Schlesinger und La McFadden 1981). Dagegen verglichen Lippmann et al. Ergebnisse aus Studien, die den Einfluss der Partikelgrößen auf die totale bzw. regionale pulmonale Deposition inhalierter Partikel bei Affen, Meerschweinchen, Kaninchen, Hunden und Eseln. Dazu gibt es bisher nur wenige Daten. Basierend auf diesen Ergebnissen scheinen Kaninchenlungen im Hinblick auf die bronchiale Deposition inhalierter Partikel dem Menschen ähnlicher zu sein als Hunde oder Esel (Lippmann 2011). Eine Übertragung der Ergebnisse aus den eigenen Untersuchungen auf den Menschen wird aber neben den tierartlichen Unterschieden auch durch die nicht physiologische vertikale Position der Kaninchenlunge im Versuch und die Applikation der Substanzen mit dem Microprayer[®] erschwert. Um das Übertrittsverhalten von Sildenafil von der Lunge in das Perfusat in Gegenwart von intaktem Lungewebe zu beobachten, ist das Modell aber aufgrund der oben genannten Vorteile gut geeignet.

Für die Perfusion der Lunge wurde ein rezirkulierendes System gewählt. Dies hat im Vergleich zu einem offenen System die Vorteile, dass weniger Perfusativolumen benötigt wird, dass bei der Bestimmung von Übertrittskinetiken im Perfusat höhere Konzentrationen der pulmonal applizierten Substanz erreicht werden und dass sich ähnlich wie in vivo ein Gleichgewicht zwischen Medium und Gewebe einstellen kann (Rhoades 1984).

4.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

4.2.1 Liposomen mit R6G

4.2.1.1 Charakterisierung der R6G-Liposomen nach Extrusion und nach Verneblung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es mit allen vier untersuchten Methoden möglich war, Liposomen mit R6G herzustellen.

Die Verkapselungseffizienzen (VE) lagen mit 2,9 % (Methode A) bis 7,9 % (Methode C) ähnlich hoch bzw. etwas höher als die in der Arbeitsgruppe der Verfasserin bei der Verkapselung von 6-Carboxyfluorescein (CF) und Salbutamol in Liposomen aus DPPC und CH erreichten Verkapselungseffizienzen (s. Tab. 22).

Verkapselte Substanz		Verkapselungseffizienz (%)	Autor
Carboxyfluorescein (CF)		2,4 ± 0,2	Waschkowitz 2002
		4,6 ± 0,3	Kleemann et al. 2007
		1,75 ± 0,25	Rüsch 2010
Iloprost, Phosphatpuffer pH 7,4		1,7 ± 0,5	Kleemann et al. 2007
Iloprost, Acetatpuffer pH 4,7		4,4 ± 0,3	
Rhodamin 6G	Methode A	2,9 – 7,5	Eigene Untersuchungen
	Methode B	3,2 – 7,1	
	Methode C	7,0 – 7,9	
	Methode D	3,75	

Tab. 22: Verkapselungseffizienzen von DPPC : CH - Liposomen für CF, Iloprost und R6G

Die in der eigenen Arbeit für das R6G gemessenen höheren Verkapselungseffizienzen können durch den lipophilen Charakter des Farbstoffs erklärt werden, der dadurch leichter in die Lipidmembran der Liposomen aufgenommen werden konnte (Ulrich 2002).

Dies führt auch zu den bei allen R6G-haltigen Liposomensuspensionen zu hohen Verkapselungsraten (VR) von ca. 95 bis 99 %. Somit liegt in der fertigen Liposomensuspension nahezu das gesamte in der Suspension enthaltene R6G in den Liposomen verkapselt vor und nur ein sehr geringer Anteil ist als freies R6G enthalten. Bei den Liposomen der Methoden A, B und D veränderten sich die Verkapselungsraten durch die Verneblung nicht signifikant. Bei Liposomen der Methode C war die VR nach der Verneblung mit $93,97 \pm 1,11$ % signifikant niedriger als vor der Verneblung ($98,93 \pm 0,21$ %). Der signifikante Unterschied kann dadurch erklärt werden, dass bei dieser Methode der

Farbstoff bei der Herstellung der Liposomen zusammen mit den Lipiden in den Glaskolben eingewogen und im Lösungsmittelgemisch gelöst worden war. Dadurch befand er sich bei den fertigen Liposomen wahrscheinlich weniger R6G im Kern der Vesikel, sondern vermehrt außen in der Liposomenmembran. Somit war er weniger geschützt und wurde bei der mechanischen Belastung der Membran durch die Verneblung vermehrt freigesetzt. Da aber immer noch ein Großteil des Farbstoffs in den Liposomen enthalten war, erscheint dieser Unterschied wenig relevant. Somit waren die R6G-Liposomen stabiler gegenüber der Verneblung mit einem Vibrating mesh Vernebler als die mit CF oder Salbutamol beladenen Vesikel, bei denen die VR von ca. 97 – 99 % vor der Verneblung auf ca. 70 % nach der Verneblung fiel (Kleemann et al. 2007; Rüsçh 2010).

Auch die Größe der R6G-Liposomen änderte sich durch die Verneblung kaum. Die Größen der Vesikel nach der Verneblung unterschieden sich nicht signifikant von den jeweiligen Werten vor der Verneblung.

4.2.1.2 Verneblereigenschaften bei der Verneblung der R6G-Liposomen

Bei der Betrachtung der Aerosolpartikelgrößen des Aeroneb[®] Solo bei der Verneblung der Liposomen fällt auf, dass die bei der Verneblung von Liposomen der Methode C generierten Aerosolpartikel signifikant größer sind als die Aerosolpartikel der zum Vergleich vernebelten Kochsalzlösung. Die Aerosolpartikelgrößen der anderen Liposomensuspensionen sind etwas kleiner (Methode B) oder annähernd gleich groß wie die Aerosolpartikelgrößen von NaCl. Diese Differenzen können durch Unterschiede der physikochemischen Eigenschaften der vernebelten Suspensionen erklärt werden, da die Leistung von Vibrating mesh Verneblern stärker von Eigenschaften der zu vernebelnden Formulierung beeinflusst wird, als dies zum Beispiel bei Düsenverneblern der Fall ist (Elhissi et al. 2006; Elhissi et al. 2007). Von den von Ghazanfari et al. untersuchten Eigenschaften (Viskosität, Oberflächenspannung und Ionenkonzentration) haben vor allem die Viskosität und Oberflächenspannung einen deutlichen Einfluss auf die Aerosolpartikelgrößen bei Verneblung mit Vibrating Mesh Verneblern. Dabei sind sie umgekehrt proportional zum VMD der Vesikel (Ghazanfari et al. 2007). Daher könnte es sein, dass diese beiden Parameter bei Liposomen der Methode C niedriger waren als bei NaCl und den anderen Liposomen, was in entsprechend größeren Aerosolpartikeln resultierte. Bei der Verneblung von Ethanol produzierte der Vibrating Mesh Vernebler Aerosolpartikel, die wahrscheinlich aufgrund der geringeren Oberflächenspannung von Ethanol kleiner waren als die bei Verneblung der anderen Flüssigkeiten erzeugten Aerosolpartikel (Ghazanfari et al. 2007). Dadurch kann erklärt werden, warum die Liposomen

der Methode B, die Ethanol enthielten, kleiner waren. Bei Liposomen der Methode D hatte das enthaltene Ethanol wahrscheinlich durch ein Zusammenwirken von mehreren Faktoren, die sich gegenseitig aufhoben, keinen Einfluss auf die Aerosolpartikelgröße, sodass diese sich kaum von den bei der Verneblung von NaCl erzeugten Aerosolpartikeln unterschieden.

Trotz dieser Unterschiede ist aber allen bei der Verneblung der Liposomen erzeugten Aerosolpartikeln gemein, dass sie mit einem MMAD von unter bzw. nur knapp über 5 µm klein genug sind, um in die peripheren Lungenregionen gelangen zu können. Eine periphere Deposition ist bei einer Partikelgröße von 3 – 5 µm maximal (Voshaar et al. 2001; Scheuch et al. 2006).

Eine Beeinträchtigung der Verneblerleistung zeigt sich bei einem Vergleich von Verneblungsdauer und Output pro Minute bei der Verneblung von Liposomen und Kochsalzlösung. Zur Verneblung von jeweils 3 ml der Liposomensuspension benötigte der Vernebler ca. 1 Minute, also fast 18 % länger als zur Verneblung der Kochsalzlösung. Bei vergleichbarem absolutem Output errechnet sich daraus ein geringerer Output pro Minute. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Kochsalzlösung die Poren des Verneblers leichter passieren kann als die partikulären Liposomen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass

- 90 bis 96 % des Farbstoffs nach der Verneblung wiedergefunden werden konnten,
- ein hoher Output bei der Verneblung der Liposomen erzielt wurde,
- die Verkapselungsrate der Liposomen auch nach der Verneblung bei deutlich über 90 % lag und
- es durch die Verneblung nur zu einer marginalen Größenänderung der Vesikel kam.

Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Liposomen intakt und nahezu vollständig vernebelt wurden.

Durch diese Versuche mit R6G hat sich gezeigt, dass alle untersuchten Herstellungsmethoden geeignet sind, verneblungsstabile Liposomen herzustellen. Die Methode, den Farbstoff zusammen mit den Lipiden in den Glaskolben einzuwiegen und im organischen Lösungsmittel zu lösen („**Methode C**“) wurde zur Herstellung der Sildenafil-Liposomen gewählt, da die Verkapselungseffizienz gut reproduzierbar war, während sie bei den anderen Methoden deutliche Schwankungen aufwies.

4.2.2 Wiederfindung von Sildenafil und Auswahl eines geeigneten Schlauchmaterials

Da in Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe ein zeitabhängiger Verlust von Sildenafil in einem Modellsystem, das für die Versuche mit der isolierten Kaninchenlunge verwendet wurde, aufgefallen war, wurden Schläuche aus unterschiedlichen Materialien getestet, um schließlich ein System aus geeigneten Schläuchen zur Untersuchung der Übertrittskinetik von Sildenafil in das Perfusat bauen zu können.

Zuvor wurden in einer Versuchsreihe die zur Aufbewahrung der Sildenafillösungen, der Sildenafil-Liposomensuspensionen und der Proben verwendeten Gefäße untersucht, da für eine quantitative Sildenafil-Analytik ein Verlust der Substanz auch in diesen Behältnissen ausgeschlossen werden musste.

In den Eppendorf-Reaktionsgefäßen konnte das zugegebene Sildenafil auch nach fünf Stunden nahezu komplett nachgewiesen werden. Auch in den bei unterschiedlichen Temperaturen inkubierten Falcon Tubes wurde nach fünf Stunden kein Verlust der Substanz nachgewiesen. Somit hat sich gezeigt, dass diese Gefäße geeignet waren zur Aufbewahrung der Sildenafil-Lösungen, Liposomensuspensionen und Proben aus den Versuchen.

Obwohl alle untersuchten Schläuche laut Herstellerangaben chemisch beständig und für Laborzwecke geeignet waren, zeigten sich teilweise deutliche Unterschiede in der Sildenafilwiederfindung.

Bei der Inkubation von Schlauchstücken mit Sildenafil zeigte sich bei den Schläuchen aus Teflon und PTFE über den gesamten Zeitraum von fünf Stunden eine Wiederfindung von ca. 100 %. Aufgrund dieser Ergebnisse wären diese Schläuche also für das Modellsystem geeignet. Da das Material, aus dem ein System für die isolierte Kaninchenlunge gebaut werden sollte, über eine gewisse Flexibilität verfügen mussten, kamen Teflon und PTFE nicht infrage, da sie zu starr waren.

Im Falle des Polyurethan-Schlauches kam es bereits beim ersten Versuch zu einer Abnahme der Sildenafil-Konzentration auf 92,5 % des eingesetzten Sildenafils nach fünf Stunden. Beim zweiten Versuch konnten nach 300 Minuten nur noch 58,6, beim dritten Versuch sogar nur noch 45,8 % des Sildenafils wiedergefunden werden. Es ist anzunehmen, dass es durch die Versuche selbst oder durch das Waschen des Schlauchstückes nach dem Versuch mit heißem Wasser zu einer Beschädigung der Schlauchoberfläche kam, sodass sich das Sildenafil in den folgenden Versuchen vermehrt dort anlagern konnte. Daher war der Schlauch aus Polyurethan nicht für einen Einsatz im Modellsystem geeignet.

Beim C-FLEX[®]-Schlauch konnte beim ersten Versuch in den Proben nach 60, 180 und 300 Minuten ein Sildenafilgehalt von ca. 125 % gemessen werden. Da in der zu Versuchsbeginn entnommenen Probe 104 % der eingesetzten Sildenafilmenge gemessen worden waren, kann davon ausgegangen werden, dass es nicht schon beim Herstellen der Sildenafil-Lösung für den Versuch zu Verdünnungsfehlern und somit einer höheren als der errechneten Sildenafilkonzentration gekommen war. Da außerdem eine weitere Zugabe von Sildenafil in den Ansatz während des Versuches, zum Beispiel durch eine Kontamination bei der Probenentnahme, ausgeschlossen werden konnte, scheint es möglich, dass während des ersten Versuchs ein Bestandteil des Schlauches herausgelöst wurde, der zur selben Retentionszeit wie das Sildenafil bei der Messung mittels HPLC detektiert wurde und somit zu einer scheinbaren Erhöhung der Sildenafilkonzentration führte. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass bei den beiden Folgeversuchen, nachdem der Schlauch nach dem ersten Versuch gründlich gewaschen worden war, dieses Phänomen nicht mehr auftrat und in beiden Versuchen über die gesamte Versuchsdauer annähernd 100 % des eingesetzten Sildenafils detektiert werden konnten. Dieser Schlauch war also ausreichend stabil gegenüber Sildenafil und außerdem flexibel genug, um ein System daraus bauen zu können. Nachteilig war allerdings, dass er milchig-trüb war. Dies hätte bei einem System aus diesem Schlauch zu Problemen geführt, da das Perfusionssystem vor Integration der Lunge luftblasenfrei gespült werden muss, um Luftembolien in der Lunge zu verhindern. Die trübe Färbung des Schlauches hätte ein Erkennen und Entfernen eventuell enthaltener Luftblasen erschwert oder verhindert. Da mit dem Clear C-FLEX[®] Schlauch eine transparente Alternative zur Verfügung stand, wurde dieser Schlauch gewählt, um daraus ein System zu bauen, das vor dem ersten Versuch sowie nach jedem Versuch gespült wurde.

Um nachzuweisen, dass der Clear C-FLEX[®] Schlauch genauso geeignet ist wie der Schlauch aus C-FLEX[®], und um einen Einfluss anderer im System enthaltener Teile, wie Verbindungsstücke oder Dreiwegehähne, auszuschließen, wurde die Wiederfindung in einem aus Clear C-FLEX[®] Schläuchen unterschiedlicher Durchmesser gebauten System sowohl mit der in den oben aufgeführten Versuchen verwendeten Sildenafil-Base von AK scientific, als auch mit der später für die Versuche verwendeten Base von bioKEMIX untersucht. Da für beide Substanzen eine Wiederfindung von annähernd 100 % über die gesamte Versuchsdauer erreicht werden konnte, wurde dieses Modellsystem für die folgenden Untersuchungen von Übertrittskinetiken inhalativ applizierter Sildenafil-Lösungen bzw. Liposomensuspensionen am Modell der isolierten Kaninchenlunge eingesetzt.

4.2.3 Liposomen mit Sildenafil

4.2.3.1 Charakterisierung der Liposomen vor und nach Verneblung

Die Verkapselungseffizienz (VE) der Sildenafil-Liposomen lag bei $105,3 \pm 5,6$ %. Das bedeutet, dass das gesamte bei der Herstellung eingesetzte Sildenafil in der Liposomensuspension enthalten war. Dass die VE deutlich über der bei den R6G-Liposomen gemessenen VE lag, kann zum einen durch die etwas veränderte Herstellungsmethode erklärt werden. Durch die zusätzliche Behandlung des Kolbens mittels Ultraschallbad kam es bei den Sildenafil-Liposomen zu einem nahezu vollständigen Ablösen des Lipidfilms von der Innenwand des Kolbens, wohingegen bei den R6G-Liposomen noch Reste von Lipiden und Farbstoff am Kolben haften geblieben sein könnten, die auch die Schwankungen der VE zwischen den einzelnen Chargen der R6G-Liposomen erklären würden. Ein weiterer Grund ist wahrscheinlich die Struktur des Sildenafil-Moleküls, das lipophiler als R6G ist, was am höheren Oktanol/ Wasser-Verteilungskoeffizienten abgelesen werden kann. Dadurch kam es zu einer nahezu vollständigen Assoziation der Substanz mit der Lipidmembran der Liposomen, während in der wässrigen Umgebung der Vesikel nur sehr geringe Konzentrationen des schlecht wasserlöslichen Wirkstoffs gemessen wurden. Verkapselungseffizienzen von 94 – 100 % konnten auch für das schlecht wasserlösliche Paclitaxel erzielt werden (Zhang et al. 2005). Durch die starke Lipidbindung und schlechte Wasserlöslichkeit des Sildenafils kann auch die hohe Verkapselungsrate (VR) von ca. 98 % direkt nach der Herstellung erklärt werden, die ein Zentrifugieren der Suspension zur Abtrennung von freiem Sildenafil überflüssig machte. Da die Sildenafil-Liposomen nicht extrudiert werden konnten (s. Kapitel 4.1.4), lag der mediane Volumendurchmesser (VMD) der Vesikel mit ca. 3,1 μm deutlich über dem VMD der R6G-Liposomen (ca. 0,6 μm). Da mit Düsenverneblern auch eine Verneblung von relativ großen Partikeln möglich ist (Bridges und Taylor 1998) und die Deposition von liposomalen Aerosolen weniger von der Größe der Liposomen, sondern im Wesentlichen von der Größe der Aerosoltröpfchen bestimmt wird (Farr et al. 1985; Taylor und Newton 1992; Schreier et al. 1993), schließt der große VMD eine pulmonale Applikation der Liposomen nicht aus. Es gibt sogar Hinweise darauf, dass die Verweildauer von nicht extrudierten Liposomen (mittlere Partikelgröße 3,9 μm) in Rattenlungen nach intratrachealer Instillation länger ist als die von kleineren, extrudierten Vesikeln (mittlere Partikelgröße 0,27 μm) der gleichen Lipidzusammensetzung. Die unextrudierte Formulierung hatte eine Halbwertszeit von 14,5 Stunden, bei der extrudierten Formulierung waren es nur 5,4 Stunden. Dadurch konnte die Verweildauer des in den Liposomen enthaltenen Terbutalins durch die unextrudierten Liposomen effektiver verlängert

werden. Dieser Effekt kann durch die reduzierte Lamellenanzahl und somit erhöhte Permeabilität in den extrudierten Liposomen erklärt werden (Fielding und Abra 1992).

Nach der Verneblung der Liposomen mit dem MicroSprayer® konnten über 99 % der eingesetzten Sildenafilkonzentration wiedergefunden werden. Da sich durch die Verneblung auch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der untersuchten Parameter VR und VMD zeigten, konnte davon ausgegangen werden, dass die Liposomen den Vernebler nahezu vollständig und intakt verlassen und es nicht zu einer Freisetzung der verkapselten Substanz durch die Verneblung kommt. Dies war eine Voraussetzung für den Einsatz der Liposomen und die Wahl des Verneblers für die Versuche an der isolierten Kaninchenlunge.

Bei der Verneblung der Liposomen mit dem Pari LC Sprint® Star konnte ein Anstieg der Sildenafilkonzentration im Aerosol und im Verneblerrückstand beobachtet werden. Im Aerosol war dieser mit einer Wiederfindung von ca. 107 % des eingesetzten Sildenafil nicht sehr stark ausgeprägt. In der Liposomensuspension, die nach einer Verneblungsdauer von 15 Minuten aus dem Rückstand im Vernebler entnommen worden war, kam es aber zu einer deutlichen Aufkonzentrierung des Wirkstoffs, so dass dort ca. 27 % mehr Sildenafil wiedergefunden werden konnte, als in Form der Liposomensuspension in den Vernebler eingefüllt worden war. Diese Aufkonzentrierung kommt durch ein Verdunsten von Flüssigkeit während der Verneblung zustande. Der Aerosol-Output eines Düsenverneblers enthält aerosolisierte Tropfen und Lösungsmitteldampf, der die durchfließende Luft sättigt. Dadurch steigt die Konzentration der Lösung im Vernebler kontinuierlich, während ihre Temperatur abnimmt (Wood et al. 1986; O'Callaghan und Barry 1997; Bridges und Taylor 1998). Bei der Verneblung von Liposomen trägt außerdem eine Retention von großen Liposomen oder Liposomenaggregaten im Vernebler, die zu einer Akkumulation von Phospholipiden führt, zur Aufkonzentrierung bei (Bridges und Taylor 1998; Elhissi et al. 2006). Die geringe, nicht signifikante Reduktion des VMD der Vesikel von ca. 3,1 µm nach der Herstellung auf ca. 2,5 µm im Aerosol kann durch die Scherkräfte erklärt werden, die bei der Passage der Liposomen durch die Düse des Verneblers auf die Vesikel wirken. Dadurch zerbrechen Liposomen und Liposomenaggregate, was in einer Reduktion ihrer mittleren Größe resultiert. Liposomen, die danach noch zu groß sind, um den Vernebler mit dem primären Aerosol zu verlassen, reassoziieren und gelangen wieder in das Verneblerreservoir. Auf diese Weise werden sie so lange recycelt, bis sie klein genug sind, um den Vernebler über das sekundäre Aerosol verlassen zu können (Farr et al. 1985; Gilbert et al. 1988; Taylor et al. 1990; Bridges und Taylor 1998). Daher ist der VMD der im Rückstand enthaltenen Vesikel mit 2,9 µm auch etwas kleiner als vor der Verneblung.

Bei den Sildenafil-Liposomen führte die Verneblung allerdings nicht zu einer Freisetzung der verkapselten Substanz aus den Vesikeln. Die Verkapselungsrate (VR) der Sildenafil-Liposomen wurde kaum beeinflusst, sie stieg sogar leicht an. Der geringe Anstieg der VR im Aerosol war nicht signifikant. Der Anstieg im Rückstand von $97,7 \pm 0,5 \%$ auf $98,4 \pm 0,2 \%$ war statistisch signifikant, was aber in dieser Größenordnung als nicht relevant betrachtet werden kann. Dies ist mit der Lipophilität des Sildenafil zu erklären. Da hydrophobe Substanzen mit der Lipidmembran assoziiert sind, ist ein Zerschneiden der Liposomen während der Verneblung weniger kritisch als bei verkapselten hydrophilen Substanzen (Taylor et al. 1990; Taylor und Newton 1992). Daher zeigten die mit dem lipophilen Sildenafil beladenen Liposomen trotz ihrer Größe bei der Nutzung des Düsenverneblers eine ausreichende Verneblungsstabilität. Somit wirkte es sich nicht negativ auf das Freisetzungverhalten der Vesikel während der Verneblung aus, dass die Extrusion nicht durchgeführt werden konnte.

4.2.3.2 Verneblereigenschaften bei der Verneblung der Sildenafil-Liposomen

Die bei der Verneblung der Sildenafil-Liposomen mit dem Pari LC Sprint[®] Star generierten Aerosolpartikel waren mit einem mittleren aerodynamischen Durchmesser (MMAD) von ca. $3,5 \mu\text{m}$ signifikant kleiner als die bei der Verneblung von Kochsalzlösung generierten Aerosolpartikel, bei denen ein MMAD von ca. $3,9 \mu\text{m}$ gemessen wurde. Mit diesen Aerosolpartikelgrößen waren die Partikel ebenso wie die mit dem Aeroneb[®] Solo bei der Verneblung der R6G-Liposomen generierten Aerosole gut zur peripheren Deposition in der Lunge geeignet (Voshaar et al. 2001; Scheuch et al. 2006).

Bei dem Vergleich des Outputs ergaben sich im Gegensatz zur Verneblung der R6G-Liposomen mit dem Aeroneb[®] Solo weder für den absoluten Output in ml, noch für den bei einer Verneblungsdauer von 15 Minuten errechneten Output in ml pro Minute signifikante Unterschiede bei der Verneblung der Sildenafil-Liposomen und isotoner Kochsalzlösung. Bridges et al. untersuchten den Einfluss der Lipidkonzentration bei der Verneblung von Liposomensuspensionen mit Düsenverneblern. Bei einem Pari LC-Vernebler führte eine Steigerung der Lipidkonzentration von 5 mg/ml auf 80 mg/ml zu einer Reduktion des Outputs um 10 bis 37 %, abhängig von der Größe der vernebelten Liposomen (Bridges und Taylor 2000). Wahrscheinlich gab es in der eigenen Arbeit keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Output der Kochsalzlösung und dem der Liposomen, weil die vernebelte Liposomensuspension mit einer Lipidkonzentration von 20 mg/ml noch zu niedrig war, um einen signifikanten Einfluss auf den Output zu besitzen.

Zusammen mit den oben genannten Ergebnissen der im Aerosol gemessenen Sildenafil-Konzentration und VR der aufgefangenen Liposomen (s. Kapitel 4.2.3.1) zeigt dies, dass die Liposomen mit dem Düsenvernebler effizient vernebelt werden können.

Bei der Verneblung von 1 ml der Sildenafil-Liposomen mit dem MicroSprayer[®] betrug der Output ca. 0,9 ml und unterschied sich somit nicht signifikant von dem bei der Verneblung von Aqua dest. gemessenen Output. Dadurch konnte gezeigt werden, dass sich die Liposomensuspension komplett vernebeln lässt und es nicht zu Rückständen, zum Beispiel durch Verstopfen der Düse an der Spitze der Sonde durch die Liposomen kommt. Auf eine Messung der Aerosolpartikelgrößen bei der Verneblung der Liposomen wurde verzichtet, da dies einen sehr großen Materialverbrauch bedeutet hätte. Nach Kenntnis der Autorin wurden derartige Messungen bereits mit Nanopartikeln durchgeführt. Dabei lagen bei der Untersuchung der Aerosolpartikel bei der Verneblung von isotoner Kochsalzlösung, Salbutamol-Lösung und zwei unterschiedlichen Nanopartikel-Suspensionen mit dem MicroSprayer[®] die Partikelgrößen alle in einem Bereich von 27 bis 32 µm mit einer GSD von 1,9 bis 2,2 (Beck-Broichsitter et al. 2010). Unterschiede waren bei diesem Vernebler, in dem die zu vernebelnde Lösung durch mechanischen Druck eine Düse passiert, auch für Liposomen nicht zu erwarten. Auch die Verneblungsdauer, die mit ca. 2 Sekunden sowohl bei Aqua dest. als auch bei den Liposomen sehr kurz war, wurde nicht genauer bestimmt.

Bei den Versuchen mit der isolierten Kaninchenlunge wurde der Output aus der MicroSprayer[®]-Spritze gravimetrisch bestimmt. Die Sonde wurde zwar nach der Applikation aus der Trachea entfernt, bei einer gravimetrischen Bestimmung des Residuums in der Sonde wäre es aber zu Fehlern durch anhaftende Blut- und Gewebereste gekommen. Daher wurde vom Spritzenoutput das zuvor bei der Verneblung von Aqua dest. bzw. Liposomen ermittelte Residuum abgezogen.

4.2.3.3 In vitro Freisetzungsversuche

Um die Sildenafil-Freisetzung aus den Liposomen in vitro zu untersuchen, wurden je 0,6 ml der Liposomensuspension in 14,4 ml vierprozentiger Albumin-Lösung über fünf Stunden bei 37 °C inkubiert. Dies wurde mit jeder der vier Liposomenchargen je einmal durchgeführt. Das freigesetzte Sildenafil wurde nach Zentrifugation der aus den Ansätzen entnommenen Proben im Überstand bestimmt.

Um die prozentuale Freisetzung des Wirkstoffs aus den Liposomen in den in vitro Versuchen über die Zeit berechnen zu können, musste zuvor der in den Versuchen enthaltene Gesamtsildenafilgehalt bestimmt werden. Die Gesamtsildenafilgehalte im Versuch wurden

nach 0, 150 und 300 Minuten gemessen und für jeden Versuch gemittelt. Dabei konnten über die gesamte Versuchsdauer von fünf Stunden ca. 90 % der aus den Gesamt-Sildenafilgehalten der Liposomenchargen errechneten Sildenafilkonzentration gefunden werden. Dass nicht das gesamte eingesetzte Sildenafil wiedergefunden werden konnte, kann an Pipettierungenauigkeiten bei der Zugabe der Liposomen in den Albumin-Ansatz oder beim Verdünnen der Proben mit Methanol liegen. Für die Auswertung der Versuche erschien es aber nicht relevant, da für die Bestimmung der Kinetik der prozentuale Anteil an freigesetztem Sildenafil berechnet wurde. Dafür war es wichtig, dass die Gesamt-Sildenafilkonzentration sich während des Versuches nicht änderte. Durch die drei im Laufe des Versuches entnommenen Proben zur Bestimmung des Gesamt-Sildenafilkonzentration konnte gezeigt werden, dass diese konstant blieb.

Bei der Auswertung der Kinetik fällt auf, dass schon zu Versuchsbeginn 30 % des Sildenafil in Form von freiem Sildenafil vorliegen. Dies kann daran liegen, dass ein Teil des liposomal verkapselten Wirkstoffs nicht fest in die Lipidmembran der Vesikel integriert war, sondern Komplexe mit den Kopfgruppen der Lipide an der Oberfläche der Liposomen gebildet hat. Solche Komplexe entstehen, wenn Liposomen mit lipophilen Wirkstoffen hergestellt werden und überschüssige, nicht verkapselte lipophile Moleküle sich nicht im umgebenden wässrigen Medium bzw. Puffer lösen können (Szoka und Papahadjopoulos 1980). Diese Hypothese wird von Ergebnissen einer Arbeitsgruppe unterstützt, die Beclomethason, ein unlösliches Glukokortikoid, in Liposomen verkapselt haben. Da es bei der Extrusion dieser Liposomen zu einer Freisetzung von Beclomethason kam nahmen die Forscher an, dass der Wirkstoff nicht in den Liposomen enthalten, sondern äußerlich an die Membran gebunden war und sich diese Bindung bei der Passage der Liposomen durch die Membranporen des Extruders löste (Darwis und Kellaway 2001). Übertragen auf die eigenen Ergebnisse mit Sildenafil-Liposomen kann daher davon ausgegangen werden, dass bei der Aufbewahrung der Liposomen in konzentrierter Form die Bindung von Sildenafil an die Vesikelmembran stabil blieb, da sich der lipophile Wirkstoff nicht in ausreichender Menge in der wässrigen Umgebung lösen konnte. Es ist anzunehmen, dass bei der Inkubation der Liposomen im Freisetzungsmedium durch die Verdünnung und das zugesetzte Albumin das nur oberflächlich gebundene Sildenafil schnell die Liposomenmembran verließ und sich an das Albumin binden konnte. In ähnlicher Weise konnte eine Bindung des lipophilen Amins Propranolol an Albumin schon bei Versuchen mit isolierten Rattenlungen beobachtet werden (Liu et al. 2009).

Außerdem kann durch die Inkorporation von Cholesterol und Sildenafil in die DPPC-Vesikel deren Phasenübergangstemperatur herabgesetzt worden sein, sodass es schon bei 37 – 38 °C zu einer signifikanten Freisetzung kommen konnte (s. Kapitel 4.1.1).

Im Versuchsverlauf ist ein weiterer Anstieg der Konzentration an freiem Sildenafil auf gut 60 % der enthaltenen Wirkstoffkonzentration zu beobachten. Dieser Anstieg kann dadurch erklärt werden, dass es sich bei den Liposomen aufgrund ihrer Größe wahrscheinlich um multilamellare Vesikel gehandelt hat (Vemuri und Rhodes 1995). Das heißt, dass nach Zugabe der Vesikel in die Albumin-Lösung erst nur das in der äußeren Lipidschicht enthaltene Sildenafil freigesetzt wurde, während die inneren Schichten weiterhin geschützt waren. Eine Diffusion des in den inneren Membranen integrierten Sildenafils würde durch die zwischen den Schichten befindlichen Wassermoleküle verzögert. Mit dieser Hypothese wurde schon von Fielding et al. erklärt, warum große, nicht extrudierte Liposomen besser als kleine Liposomen geeignet sind, die Verweildauer von liposomal verkapseltem, intratracheal instilliertem Terbutalin in der Lunge von Meerschweinchen zu verlängern (Fielding und Abra 1992).

Nach 270 Minuten wird ein Plateau erreicht. Eine vollständige Freisetzung des Sildenafils wird wahrscheinlich durch eine weiterhin bestehende Bindung des lipophilen Wirkstoffs an die vesikulären Lipide verhindert. Durch diese verzögerte Wirkstofffreisetzung aus den Liposomen über einen Zeitraum von 4,5 Stunden *in vitro* war die Voraussetzung für den Einsatz der Liposomen als Retardformulierung erfüllt, sodass diese weiter am Modell der isolierten Kaninchenlunge getestet wurden.

4.2.3.4 Substanzübertritt am Modell der isolierten Kaninchenlunge

Bei den Versuchen mit freiem Sildenafil zeigte sich ein sehr schneller Anstieg der Wirkstoffkonzentration im Perfusat mit einem Peak nach zehn Minuten und anschließend wieder eine leichte Abnahme. Dass Pharmazeutika nach tiefer Inhalation und Deposition in den peripheren Lungenregionen schnell absorbiert werden können, liegt an der großen Oberfläche der Lunge (beim Menschen 80 – 140 m²), ihrer guten Vaskularisation, dem dünnen Alveolarepithel (dieses ist in den meisten Regionen der Lunge nur 0,1 – 0,2 µm dick) und ihrer großen Kapazität für Flüssigkeitsaustausch (Scheuch et al. 2006). Dabei kann die Lunge eine ganze Reihe verschiedener Substanzen wie Wasser, Elektrolyte, Lipide, Zucker, Proteine und Peptide absorbieren. Dazu stehen verschiedene Absorptionsmechanismen zur Verfügung, wie para- und transzelluläre Diffusion, aktiver und passiver Transport über Ionenkanäle oder vesikelvermittelte Transzytose, die zum Teil rezeptorvermittelt abläuft (von

Wichert und Seifart 2005). Wie schnell und über welchen Mechanismus Moleküle absorbiert werden, hängt von dem Ort ihrer Deposition sowie ihren physikochemischen Eigenschaften wie ihrem Molekulargewicht, ihrem Oktanol/ Wasser-Verteilungskoeffizienten, ihrer Ladung, ihrer Löslichkeit und ihrer chemischen und enzymatischen Stabilität ab (Tronde et al. 2008). Kleine hydrophile Stoffe werden vor allem über parazellulären Transport über mehrere Minuten absorbiert. Kleine lipidlösliche Substanzen werden schnell (innerhalb weniger Sekunden bis Minuten) durch transzellulären Transport absorbiert. Dabei werden sie in die Lipiddoppelmembran, die die Zellen umgibt, integriert und wandern darin von der apikalen zur basolateralen Zellseite (Patton et al. 2004; Patton und Byron 2007).

Über diesen Mechanismus könnte das lipophile Sildenafil sehr schnell in das Perfusat übergetreten sein. Bereits zehn Minuten nach der Verneblung konnte im Perfusat eine Sildenafilkonzentration von 1,33 µg/ml gemessen werden. Dies entspricht ca. 42 % des verabreichten Sildenafil. Die anschließende leichte Abnahme der Sildenafilkonzentration im Perfusat auf ca. 1,16 µg/ml (ca. 37 % der deponierten Menge) kann durch eine Redistribution der lipophilen Substanz aus dem wässrigen Perfusat zurück in die Lunge erklärt werden, wo es in den Zellen akkumulierte und im Lungengewebe verblieb. Ein ähnliches Verhalten wurde bereits für die ähnlich lipophile Substanz Propranolol (Oktanol/ Wasser-Verteilungskoeffizient $\log P = 3,0$) beschrieben. Nachdem die Substanz intratracheal über einen Katheter in isolierte Rattenlungen appliziert worden war, konnte ein schneller Übertritt in das albuminhaltige Perfusat beobachtet werden. Bereits nach fünf Minuten wurde dort eine Peak-Konzentration von 21 % der applizierten Dosis gemessen. Danach nahm die Perfusatkonzentration wieder ab und erreichte nach 40 Minuten ein Plateau (9 % der applizierten Dosis), das bis zum Ende des Versuches nach 120 Minuten konstant blieb. Dieses Verhalten wurde mit einer Bindung der Substanz an das Lungengewebe erklärt (Tronde et al. 2003).

Eine weitere Erklärung für die Abnahme der Sildenafilkonzentration im Perfusat wäre ein Metabolismus der Substanz in der Lunge. Sildenafil wird über Cytochrom P450-Enzyme metabolisiert (Hyland et al. 2001). Diese Enzyme werden auch in der Lunge exprimiert (Anttila et al. 1997). Die Hauptrolle im Metabolismus von Sildenafil kommt dem Enzym-Typ CYP3A4 zu (Warrington et al. 2000). Die Expression dieses Enzyms in humanen Lungen unterliegt beträchtlichen interindividuellen Unterschieden und wurde nur bei 20 % der untersuchten Individuen nachgewiesen (Anttila et al. 1997). Nach Kenntnis der Autorin liegen keine Daten zum Vorkommen der Cytochrom P450-Enzyme in Lungen von Kaninchen vor.

Daher ist ein Metabolismus von Sildenafil in der Kaninchenlunge während des Versuchs möglich, kann aber nicht genau quantifiziert werden.

Von der rechnerisch ermittelten, in der Lunge deponierten Sildenafilmenge konnten in den eigenen Versuchen insgesamt ca. 56 % wiedergefunden werden. Dies ist deutlich weniger als nach Verneblung des hydrophilen Fluoreszenzfarbstoffs 6-Carboxyfluoreszein (CF), wo eine Wiederfindung von 75 % erzielt werden konnte (Lahnstein et al. 2008). Auch nach Verneblung des lipophilen Farbstoffs Rhodamin 6G (R6G) konnten vor allem durch die Lavagen insgesamt $85,7 \pm 9,2$ % wiedergefunden werden (Lahnstein et al. 2008). Für die eigenen Versuche bedeutet dies, dass ca. 44 % des deponierten Sildenafils in der Lunge und somit am Wirkort verblieben, wo der Wirkstoff wahrscheinlich nicht frei in der Lunge vorlag, sondern fest in das Lungengewebe integriert war.

Ein direkter Vergleich der Übertrittskinetiken von freiem und liposomal verkapseltem Sildenafil nach Verneblung mit dem MicroSprayer® in das Modell der isolierten Kaninchenlunge ist möglich, da die in der Lunge deponierten Sildenafilmengen mit $0,95 \pm 0,02$ mg bzw. $1,0 \pm 0,02$ mg trotz statistisch signifikanten ($p=0,01$) Unterschieds in einer sehr ähnlichen Größenordnung liegen. Dabei zeigte sich für das liposomal verkapselte Sildenafil anfangs eine ähnliche Übertrittskinetik wie für den freien Wirkstoff. Fünf Minuten nach der Applikation wird im Perfusat eine Konzentration von $1,09 \mu\text{g/ml}$ (ca. 32 % der deponierten Wirkstoffmenge) erreicht. Im Versuchsverlauf zeigt die Perfusatkonzentration ein Plateau bei ca. $1,1 \mu\text{g/ml}$ bis zum Ende des Versuches. Der schnelle Anstieg kann zum einen daran liegen, dass, wie schon in Kapitel 4.2.3.3 diskutiert, ein Teil des liposomalen Sildenafils nicht fest in die Membran integriert wurde. Wenn es nur oberflächliche Komplexe mit den Lipiden gebildet hat, könnte es bei Kontakt mit dem Lungengewebe schnell freigesetzt worden sein und wie das freie Sildenafil schnell ins Perfusat übertreten, wo es sich an das Albumin band. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der in vitro-Freisetzungsvorläufe überein, wo schon zu Versuchsbeginn ca. 30 % der enthaltenen Wirkstoffmenge in freier Form vorlagen. Wenn davon ausgegangen wird, dass wirklich ca. 30 % des liposomalen Sildenafils nicht fest verkapselt waren und daher schnell ins Perfusat übertreten konnten, reicht dies aber noch nicht aus, um eine Perfusatkonzentration zu erreichen, die bei ca. 75 % der nach der Verneblung von freiem Sildenafil erreichten Wirkstoffkonzentration liegt. Es muss auch zu einer raschen Freisetzung der in die Liposomen integrierten Moleküle gekommen sein. Verkapselte Substanzen sollten vom Phospholipid-Bilayer eingeschlossen bleiben und langsam durch die Membran diffundieren (Vemuri und Rhodes 1995). Inhalierbare Liposomen kommen aber nach Deposition in der Lunge schnell in Kontakt mit

Bronchoalveolarflüssigkeit, die neben Surfactantproteinen auch Serumkomponenten wie Albumin und Immunglobuline enthält, welche die Stabilität der Liposomen beeinflussen können (Shek et al. 1994). So wurde bei Inkubation von amikacinhaltigen Liposomen mit Lavageflüssigkeit *in vitro* eine rasche Freisetzung der verkapselten Substanzen aus den Liposomen festgestellt (Wichert et al. 1992). In der Lunge *in vivo* bzw. *ex vivo* kann es zu einem Abbau der Vesikel in den Alveolen oder in Alveolarmakrophagen, Fusion der Liposomen mit Epithelzellen oder Fusion und Austausch von Phospholipiden zwischen Liposomen und Surfactant kommen. Dies kann eine durch Diffusion von Substanzen durch die Liposomenmembran bedingte Wirkstofffreisetzung verstärken. Die freigesetzten Substanzen können schnell aus der Lunge übertreten und einen raschen Anstieg des Plasmalevels bewirken (Taylor und Newton 1992). Bei der Verneblung des liposomal verkapselten hydrophilen Fluoreszenzfarbstoffs 6-CF in die isolierte Kaninchenlunge konnte ein langsamerer Anstieg der Farbstoffkonzentration im Plasma, verglichen mit der Kinetik nach der Verneblung des freien Farbstoffs, erzielt werden (Rüsch 2010). Für den Farbstoff, der sich dabei ausschließlich im wässrigen Kern der Liposomen befand, stellt die Lipidmembran eine deutliche Barriere dar, die eine schnelle Diffusion der hydrophilen Substanz verhinderte (Elsayed et al. 2007; Khan et al. 2008). Das lipophile Sildenafil befand sich im Gegensatz dazu in der Liposomenmembran und konnte somit schnell von dort über das Lungengewebe ins Perfusat übertreten.

Da hydrophobe Substanzen problemlos von den Kohlenwasserstoffketten des Bilayers aufgenommen werden, werden Liposomen intuitiv als exzellente Träger für lipophile Substanzen betrachtet. Es hat sich aber gezeigt, dass sich hydrophobe Stoffe innerhalb weniger Minuten von ihren Trägern loslösen und sich über Austauschmechanismen ein Gleichgewicht zwischen allen lipidartigen Strukturen in der Umgebung einstellt (Ulrich 2002). Wahrscheinlich verhindert dieses Verhalten eine verzögerte Freisetzung des Wirkstoffs aus den selbst hergestellten Liposomen. Da das in den eigenen Versuchen verwendete Perfusat Albumin enthielt, konnte das Sildenafil auch durch Bindung an dieses Protein ins Perfusat übertreten.

Die Wiederfindung bei den Liposomenversuchen im Vergleich zu den Versuchen mit freiem Sildenafil war etwas geringer. Die Unterschiede waren aber in allen untersuchten Kompartimenten (Perfusat, Lavagen, Methanol-Lavagen und Proben) nicht statistisch signifikant. Auch hier kann also davon ausgegangen werden, dass das Sildenafil zum Teil ins Lungengewebe aufgenommen wurde und nicht wiedergewonnen werden konnte.

Da durch die Liposomen keine Verzögerung des Übertritts von Sildenafil aus der Lunge in das Perfusat erreicht werden konnte, ist die in der eigenen Arbeit untersuchte Formulierung nicht als Retardformulierung zur inhalativen Verabreichung des PDE-Inhibitors geeignet. Eine bessere Verkapselung könnte eventuell erzielt werden, indem weniger Sildenafil zur Herstellung der Liposomen eingesetzt wird und somit der Anteil an nicht verkapseltem Wirkstoff reduziert wird. Weiterhin könnte nicht verkapseltes Sildenafil entfernt werden, indem die Liposomen nach der Herstellung in Albumin-Lösung inkubiert und anschließend abzentrifugiert werden. An die Liposomenmembran angelagertes Sildenafil würde dabei in die Albumin-Lösung übertreten. Bei einer Messung des Sildenafil-Gehaltes in den abzentrifugierten Liposomen würde dann nur der verkapselte Wirkstoff gemessen.

Um die Stabilität der Liposomen in der Lunge zu verbessern, könnten Formulierungen mit anderen Phospholipiden untersucht werden. Eine weitere Stabilisierung könnte durch eine Schutzschicht, zum Beispiel aus Polyethylenglykol, erzielt werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die pulmonale arterielle Hypertonie (PAH) des Menschen ist eine chronische Erkrankung, die nicht geheilt werden kann (Olschewski et al. 2007; Chin und Rubin 2008; Galié et al. 2009). Sildenafil ist seit 2005 unter dem Handelsnamen Revatio[®] (Pfizer) zur oralen Behandlung der PAH zur Verbesserung der Leistungsfähigkeit zugelassen (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft 2009; Ramani und Park 2010). Nachteile der oralen Behandlung sind die mäßige Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs (Nichols et al. 2002; Sheu et al. 2003) und der verzögerte maximale Wirkeffekt, der erst 60 Minuten nach der Einnahme eintritt (Ghofrani et al. 2004c). Zudem konnte trotz der pulmonalen Selektivität des Wirkstoffs (Michelakis 2002; Michelakis et al. 2003; Barnett und Machado 2006) bei Versuchen mit Schafen bei höheren Dosen auch eine Senkung des systemischen arteriellen Druckes beobachtet werden (Weimann et al. 2000). Daraus ergibt sich die Überlegung, den Wirkstoff durch Inhalation direkt in die Lunge zu verbringen. Dadurch können hohe lokale Wirkstoffkonzentrationen bei minimalen systemischen Nebeneffekten erreicht werden. Außerdem wird durch die Inhalation ein schneller Wirkungseintritt erzielt (Le Brun et al. 2000; Khilnani und Banga 2008). Bei Schafen mit induzierter pulmonaler Hypertonie konnte durch die Inhalation von vernebeltem Sildenafil eine noch während der Inhalation eintretende selektive Senkung des pulmonalarteriellen Druckes (pulmonary artery pressure, PAP) erzielt werden, ohne dass es zu systemischen Nebenwirkungen kam. Ein Nachteil war aber die kurze Wirkdauer: der PAP stieg nach Beendigung der Inhalation innerhalb weniger Minuten wieder auf den Ausgangswert (Ichinose et al. 2001).

Ziel dieser Arbeit war es daher, eine liposomale Formulierung des lipophilen PDE 5-Inhibitors Sildenafil herzustellen und diese hinsichtlich ihrer Eignung als Controlled Release-Formulierung zur pulmonalen Applikation zu untersuchen.

Vorbereitend wurden Liposomen mit dem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G als Modellsubstanz nach vier verschiedenen Methoden hergestellt. Die Verkapselungseffizienzen (VE) lagen bei ca. 3,8 bis 7,6 %. Die Verkapselungsraten (VR) unterschieden sich mit ca. 95 bis 99 % kaum voneinander, ebenso wie die medianen Volumendurchmesser (VMD), die bei ca. 0,6 bis 0,8 µm lagen. Durch die Verneblung mit dem Vibrating Mesh-Vernebler Aeroneb[®] Solo veränderten sich die Charakteristika der Vesikel kaum. Aus der Farbstoffwiederfindung nach Aerosolisierung von ca. 90 bis 96 % konnte geschlossen werden, dass die Vesikel nahezu intakt und vollständig vernebelt werden konnten.

Mit der Herstellungsmethode, bei der der Farbstoff direkt in den Lipidfilm eingearbeitet wurde, war die VE am besten reproduzierbar. Diese Methode wurde daher gewählt und weiter optimiert, um damit Liposomen mit Sildenafil herzustellen. Diese wurden bezüglich ihrer Verkapselungseigenschaften und Größenverteilung charakterisiert. Die VE lag bei ca. 105 % und die VR bei ca. 98 %. Da die Vesikel nicht extrudiert werden konnten, lag der VMD mit ca. 3 µm deutlich über dem der Rhodamin 6G-Liposomen. Da sich die Sildenafil-Liposomen aus methodischen Gründen nicht mit dem Aeroneb® Solo vernebeln ließen, wurde die Verneblungsstabilität mit dem Düsenvernebler Pari LC Sprint® Star untersucht. Dabei änderten sich VR und VMD der Vesikel kaum. Die Wiederfindung des Wirkstoffs lag aufgrund der verneblerspezifischen Aufkonzentrierung durch Verdunstung bei ca. 107 % im aufgefangenen Aerosol und ca. 127 % im Verneblerrückstand. Der mittlere aerodynamische Massendurchmesser des mit dem Düsenvernebler generierten Aerosols lag bei ca. 3,5 µm. Auch diese Liposomen waren somit stabil gegenüber der Verneblung und das Aerosol schien gut für eine Deposition in peripheren Lungenregionen geeignet.

Bei in vitro Freisetzungsversuchen fiel auf, dass bereits zu Beginn der Versuche knapp 30 % des liposomal eingesetzten Sildenafil als freies Sildenafil vorlag. Im weiteren Versuchsverlauf kam es zu einem langsamen Anstieg des freien Sildenafil auf gut 60 % nach 270 Minuten.

Durch diese verzögerte Freisetzung erschienen die Liposomen geeignet, um im Modell der isolierten, ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge getestet zu werden. Dafür wurden die Übertrittskinetiken von freiem und liposomal verkapseltem Sildenafil verglichen. Bei den Versuchen mit freiem Sildenafil trat der Wirkstoff erwartungsgemäß sehr schnell in das Perfusat über, sodass bereits nach zehn Minuten eine maximale Konzentration von 1,33 µg/ml (ca. 42 % der deponierten Menge) erreicht wurde. Danach blieb die Konzentration relativ konstant bis zum Versuchsende nach fünf Stunden. Die Konzentrations-Zeit-Kurve von liposomal verkapseltem Sildenafil lag insgesamt etwas unterhalb der Kurve von freiem Sildenafil, die Kinetiken der beiden Kurven waren aber ähnlich. Bereits nach fünf Minuten wurde eine Konzentration von 1,09 µg/ml (ca. 32 % der deponierten Menge) erreicht, die bis zum Ende des Versuches relativ konstant bei 1,1 µg/ml blieb. Die AUC der Versuche mit liposomalem Sildenafil unterschied sich nicht signifikant von der AUC der Versuche mit freiem Wirkstoff. In der Lunge muss es also zu einer schnellen Freisetzung des Wirkstoffs aus den Vesikeln gekommen sein, weshalb diese sich trotz der vielversprechenden in vitro-Vorversuche nicht als Retardformulierung zur inhalativen Applikation von Sildenafil eignen.

6 SUMMARY

Human Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a chronic disease without cure (Olschewski et al. 2007; Chin und Rubin 2008; Galié et al. 2009). Sildenafil (Revatio[®]; Pfizer) was approved in 2005 for the oral treatment of PAH with the aim of strengthening the patients' physical endurance (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft 2009; Ramani und Park 2010). Drawbacks of an oral treatment are the rather poor bioavailability of the agent (Nichols et al. 2002; Sheu et al. 2003) and the delay of 60 minutes after intake until its maximum effect unfolds (Ghofrani et al. 2004c). Furthermore, despite the agent's pulmonary selectivity (Michelakis 2002; Michelakis et al. 2003; Barnett und Machado 2006), a decrease in systemic artery pressure was observed in trials with sheep, when high doses were administered (Weimann et al. 2000). This led to the conclusion that the drug should rather be directly conveyed into the lung by means of inhalation. As a result, a high local drug concentration can be achieved with concurrent reduction of systemic side effects. Also, the inhalation ensures a rapid onset of effects (Le Brun et al. 2000; Khilnani und Banga 2008). The inhalation of aerosolized Sildenafil caused a selective decrease of pulmonary artery pressure (PAP) in sheep with induced pulmonary hypertension during inhalation without the occurrence of systemic side effects. However, the treatment's effect was very short: the PAP rose back to its initial level a few minutes after the inhalation had ceased (Ichinose et al. 2001).

The aim of this study therefore was to produce a liposomal carrier of the lipophilic PDE 5-inhibitor Sildenafil and to analyse this formulation with regard to its aptitude as a controlled release formulation for pulmonary application.

In first experiments, liposomes with a model substance, the lipophilic fluorescence dye rhodamine 6G, were prepared using four different production processes. The encapsulation efficiencies amounted to 3.8 to 7.6 %. Both, the encapsulation rates (approximately 95 – 99 %) and the volume mean diameters (VMD of 0.6 to 0.8 µm) varied only slightly. The nebulization of the liposomes, for which a vibrating mesh-nebulizer (Aeroneb[®] Solo, Aerogen, Dangan, Galway, Ireland) was used, had hardly any effect on the characteristics of the vesicles. The recovery of the fluorescent dye after aerosolization, which was 90 – 96 %, indicates that the vesicles were aerosolized nearly intact and complete.

The most appropriate method for producing liposomes with a reproducible encapsulation efficiency proved to be the direct application of the fluorescent dye into the lipid film. Consequently, this method was chosen and further improved for preparing Sildenafil

containing liposomes. These were characterised in terms of their encapsulation properties and size distribution. An encapsulation efficiency of about 105 % and an encapsulation rate of 98 % was determined. Since the extrusion of these liposomes proved impossible, the VMD of 3 μm considerably exceeded that of the Rhodamine 6G-liposomes. The stability towards nebulization was tested by means of a jet nebulizer (Pari LC Sprint[®] Star, PARI GmbH, Starnberg, Germany), because technical reasons prevented the nebulization of the sildenafil liposomes with the Aeroneb[®] Solo. In the process, the encapsulation rate and VMD of the vesicles were only slightly altered. The recovery of the drug attained a level of approximately 107 % in the collected aerosol and approximately 127 % in the residue of the nebulizer. The increase in drug concentration was due to the solvent evaporation specific to the nebulizer. The mass median aerodynamic diameter of the aerosol produced by the jet nebulizer was approximately 3.5 μm . These liposomes, too, were therefore proved to be stable during nebulization and the aerosol seemed to be well suited for deposition in periphery lung regions. During in vitro drug release, it was established that even at the beginning of the experiment, nearly 30 % of free Sildenafil was detected, indicating that the substance was no longer incorporated in the liposomes. In the course of the experiments, a slow further increase of the free Sildenafil to 60 % of the incorporated substance ensued after 270 minutes.

As a consequence of this controlled release, the liposomes seemed to be suited for being tested in the isolated, ventilated and perfused rabbit lung. The absorption kinetics of free and liposomally encapsulated Sildenafil were compared. As expected, in experiments with free Sildenafil the drug was rapidly absorbed into the perfusion fluid. As early as ten minutes into the experiment, a maximum concentration of 1.33 $\mu\text{g/ml}$ (approximately 42 % of the deposited amount) was reached. Afterwards, the concentration remained relatively constant until the end of the experiment after five hours. The concentration over time curve for the liposomally encapsulated Sildenafil ran below the curve for free Sildenafil, but the kinetics of the curves were similar. After five minutes already, a concentration of 1.09 $\mu\text{g/ml}$ (approximately 32 % of the liposomally deposited amount) was reached. A steady-state was established at 1.1 $\mu\text{g/ml}$, which lasted up to the end of the experiment. The AUC of the experiments with liposomally encapsulated Sildenafil did not differ significantly from the AUC of the experiments with the free drug. It therefore has to be assumed that in the lung the drug was rapidly set free from the vesicles. In conclusion, despite the promising preliminary tests in vitro, these liposomes were not suited as a controlled release formulation for Sildenafil inhalation.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abra, R.; Mihalko, P.J.; Schreier, H. (1990): The effect of lipid composition upon the encapsulation and in vitro leakage of metaproterenol sulfate from 0.2 μ m diameter, extruded, multilamellar liposomes. *J. Controlled Release* 14 (1), S. 71–78.
- Abu-Dahab, R.; Schafer, U.F.; Lehr, C.M. (2001): Lectin-functionalized liposomes for pulmonary drug delivery: effect of nebulization on stability and bioadhesion. *Eur. J. Pharm. Sci.* 14 (1), S. 37–46.
- Agarwal, R.; Gomberg-Maitland, M. (2011): Current therapeutics and practical management strategies for pulmonary arterial hypertension. *Am. Heart J.* 162 (2), S. 201–213.
- Al Omari, M.M.; Zughul, M.B.; Davies, J.E.D.; Badwan, A.A. (2006): Sildenafil/cyclodextrin complexation: stability constants, thermodynamics, and guest-host interactions probed by 1H NMR and molecular modeling studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (3), S. 857–865.
- Anderson, D.; Kollias-Baker, C.; Colahan, P.; Keene, R.O.; Lynn, R.C.; Hepler, D.I. (2005): Urinary and serum concentrations of diclofenac after topical application to horses. *Vet Ther.* 6 (1), S. 57–66.
- Anderson, M.; Omri, A. (2004): The effect of different lipid components on the in vitro stability and release kinetics of liposome formulations. *Drug Deliv.* 11 (1), S. 33–39.
- Anttila, S.; Hukkanen, J.; Hakkola, J.; Stjernvall, T.; Beaune, P.; Edwards, R.J. et al. (1997): Expression and localization of CYP3A4 and CYP3A5 in human lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* 16 (3), S. 242–249.
- Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (2009): Revatio® (Sildenafil). Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft. Online verfügbar unter <http://www.akdae.de/Arzneimitteltherapie/NA/Archiv/2009008-Revatio.pdf>, zuletzt aktualisiert am 26.10.2009.
- Bach, J.F.; Rozanski, E.A.; MacGregor, J.; Betkowski, J.M.; Rush, J.E. (2006): Retrospective evaluation of sildenafil citrate as a therapy for pulmonary hypertension in dogs. *J. Vet. Intern. Med* 20 (5), S. 1132–1135.
- Badesch, D.B.; Abman, S.H.; Simonneau, G.; Rubin, L.J.; McLaughlin, V.V. (2007): Medical therapy for pulmonary arterial hypertension: updated ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 131 (6), S. 1917–1928.
- Baghbanzadeh, A.; Decuyper, E. (2008): Ascites syndrome in broilers: physiological and nutritional perspectives. *Avian Pathol.* 37 (2), S. 117–126.
- Bangham, A.D. (1993): Liposomes: the Babraham connection. *Chem. Phys. Lipids* 64 (1-3), S. 275–285.
- Bangham, A.D.; Standish MM; Watkins JC (1965): Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13 (1), S. 238–252.
- Barenholz, Y. (2001): Liposome application: problems and prospects. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 6, S. 66–77.
- Barker, S.; Taylor, K.; Short, M. (1994): The deposition and clearance of liposome entrapped ^{99m}Tc-DTPA in the human respiratory tract. *Int. J. Pharm.* 102 (1-3), S. 159–165.

- Barnett, C.F.; Machado, R.F. (2006): Sildenafil in the treatment of pulmonary hypertension. *Vasc. Health Risk Manag.* 2 (4), S. 411–422.
- Baş, L.A.; Simşek, A.; Corlu, M.; Yazar, E.; Elmas, M.; Değim, Z.G. (2002): Determination of intracellular concentrations of free and two types of liposome-encapsulated enrofloxacin in anatolian shepherd dog monocytes. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 49 (6), S. 289–293.
- Beck, S.E.; Laube, B.L.; Barberena, C.I.; Fischer, A.C.; Adams, R.J.; Chesnut, K. et al. (2002): Deposition and expression of aerosolized rAAV vectors in the lungs of Rhesus macaques. *Mol. Ther.* 6 (4), S. 546–554.
- Beck-Broichsitter, M.; Gauss, J.; Gessler, T.; Seeger, W.; Kissel, T.; Schmehl, T. (2010): Pulmonary targeting with biodegradable salbutamol-loaded nanoparticles. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 23 (1), S. 47–57.
- Beck-Broichsitter, M.; Gauss, J.; Packhaeuser, C.; Lahnstein, K.; Schmehl, T.; Seeger, W. et al. (2009): Pulmonary drug delivery with aerosolizable nanoparticles in an ex vivo lung model. *Int. J. Pharm.* 367 (1-2), S. 169–178.
- Bendas, E.R.; Tadros, M.I. (2007): Enhanced transdermal delivery of salbutamol sulfate via ethosomes. *AAPS PharmSciTech* 8 (4), S. 213–220.
- Bhalaria, M.K.; Naik, S.; Misra, A.N. (2009): Ethosomes: a novel delivery system for antifungal drugs in the treatment of topical fungal diseases. *Indian J. Exp. Biol.* 47 (5), S. 368–375.
- Bhatia, A.; Kumar, R.; Katare, O. (2004): Tamoxifen in topical liposomes: development, characterization and in-vitro evaluation. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 7 (2), S. 252–259.
- Bivas-Benita, M.; Zwieter, R.; Junginger, H.E.; Borchard, G. (2005): Non-invasive pulmonary aerosol delivery in mice by the endotracheal route. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 61 (3), S. 214–218.
- Black, S.M.; Sanchez, L.S.; Mata-Greenwood, E.; Bekker, J.M.; Steinhorn, R.H.; Fineman, J.R. (2001): sGC and PDE5 are elevated in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 281 (5), S. L1051-7.
- Boolell, M.; Allen, M.J.; Ballard, S.A.; Gepi-Attee, S.; Muirhead, G.J.; Naylor, A.M. et al. (1996a): Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Int. J. Impot. Res.* 8 (2), S. 47–52.
- Boolell, M.; Gepi-Attee, S.; Gingell, J.C.; Allen, M.J. (1996b): Sildenafil, a novel effective oral therapy for male erectile dysfunction. *Br. J. Urol.* 78 (2), S. 257–261.
- Borok, Z.; Buhl, R.; Grimes, G.J.; Bokser, A.D.; Hubbard, R.C.; Holroyd, K.J. et al. (1991): Effect of glutathione aerosol on oxidant-antioxidant imbalance in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 338 (8761), S. 215–216.
- Bridges, P.A.; Taylor, K.M. (1998): Nebulisers for the generation of liposomal aerosols. *Int. J. Pharm.* 173 (1-2), S. 117–125.
- Bridges, P.A.; Taylor, K.M. (2000): An investigation of some of the factors influencing the jet nebulisation of liposomes. *Int. J. Pharm.* 204 (1-2), S. 69–79.
- Brown, A.J.; Davison, E.; Sleeper, M.M. (2010): Clinical efficacy of sildenafil in treatment of pulmonary arterial hypertension in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 24 (4), S. 850–854.

- Buckley, M.S.; Feldman, J.; Wicks, L.; Staib, R. (2010): Phosphodiesterase-5 inhibitors in management of pulmonary hypertension: Safety, tolerability, and efficacy. *Drug Healthc. Patient Saf.* (2), S. 151.
- Buhl, R.; Vogelmeier, C. (1994): Therapie von Lungenkrankheiten mit Antioxidantien. *Pneumologie* 48 (2), S. 50–56.
- Caldwell, F.J.; Mueller, P.O.E.; Lynn, R.C.; Budsberg, S.C. (2004): Effect of topical application of diclofenac liposomal suspension on experimentally induced subcutaneous inflammation in horses. *Am. J. Vet. Res.* 65 (3), S. 271–276.
- Chandenier, J.; Bernard, S.; Montharu, J.; Bailly, E.; Fetissov, F.; Monte, M. de et al. (2009): The utility of a nebulised intra-tracheal rat model of invasive pulmonary aspergillosis. *Mycoses* 52 (3), S. 239–245.
- Chin, K.M.; Rubin, L.J. (2008): Pulmonary Arterial Hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51 (16), S. 1527–1538.
- D'Alonzo, G.E.; Barst, R.J.; Ayres, S.M.; Bergofsky, E.H.; Brundage, B.H.; Detre, K.M. et al. (1991): Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann. Intern. Med* 115 (5), S. 343–349.
- Damen, J.; Regts, J.; Scherphof, G. (1981): Transfer and exchange of phospholipid between small unilamellar liposomes and rat plasma high density lipoproteins. Dependence on cholesterol content and phospholipid composition. *Biochim. Biophys. Acta* 665 (3), S. 538–545.
- Darwis, Y.; Kellaway, I.W. (2001): Nebulisation of rehydrated freeze-dried beclomethasone dipropionate liposomes. *Int. J. Pharm.* 215 (1-2), S. 113–121.
- Dayan, N.; Touitou, E. (2000): Carriers for skin delivery of trihexyphenidyl HCl: ethosomes vs. liposomes. *Biomaterials* 21 (18), S. 1879–1885.
- Degim, Z.; Degim, T.; Bas, L.; Elmas, M. (2002): The use of liposomal enrofloxacin for intracellular infections in Kangal dogs and visualization of phagocytosis of liposomes. *J. Biomed. Mater. Res.* 61 (2), S. 246–251.
- Demaeyer, P.; Akodad, E.M.; Gravet, E.; Schietecat, P.; van Vooren, J.P.; Drowart, A. et al. (1993): Disposition of liposomal gentamicin following intrabronchial administration in rabbits. *J. Microencapsulation* 10 (1), S. 77–88.
- Demel, R.A.; Kruyff, B. de (1976): The function of sterols in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 457 (2), S. 109–132.
- Deniz, A.; Sade A.; Severcan, F.; Keskin, D.; Tezcaner, A.; Banerjee, S. (2010): Celecoxib-loaded liposomes: effect of cholesterol on encapsulation and in vitro release characteristics. *Biosci. Rep.* 30 (5), S. 365–373.
- Dhand, R. (2004): New frontiers in aerosol delivery during mechanical ventilation. *Respir. Care* 49 (6), S. 666–677.
- Dissanayake, D.; Wijewardana, T.; Gunawardena, G.; Poxton, I. (2010): Potential use of a liposome-encapsulated mixture of lipopolysaccharide core types (R1, R2, R3 and R4) of *Escherichia coli* in controlling colisepticaemia in chickens. *J. Med. Microbiol.* 59 (Pt 1), S. 100–107.
- Dubey, V.; Mishra, D.; Jain, N. (2007a): Melatonin loaded ethanolic liposomes: Physicochemical characterization and enhanced transdermal delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67 (2), S. 398–405.

- Dubey, V.; Mishra, D.; Dutta, T.; Nahar, M.; Saraf, D.K.; Jain, N.K. (2007b): Dermal and transdermal delivery of an anti-psoriatic agent via ethanolic liposomes. *J. Controlled Release* 123 (2), S. 148–154.
- Elhissi, A.M.; Faizi, M.; Naji, W.F.; Gill, H.S.; Taylor, K.M. (2007): Physical stability and aerosol properties of liposomes delivered using an air-jet nebulizer and a novel micropump device with large mesh apertures. *Int. J. Pharm.* 334 (1-2), S. 62–70.
- Elhissi, A.M.A.; Karnam, K.K.; Danesh-Azari, M.-R.; Gill, H.S.; Taylor, K.M.G. (2006): Formulations generated from ethanol-based proliposomes for delivery via medical nebulizers. *J. Pharm. Pharmacol.* 58 (7), S. 887–894.
- Elsayed, M.M.; Abdallah, O.Y.; Naggar, V.F.; Khalafallah, N.M. (2007): Deformable liposomes and ethosomes as carriers for skin delivery of ketotifen. *Pharmazie* 62 (2), S. 133–137.
- Falagas, M.E.; Michalopoulos, A.; Metaxas, E.I. (2010): Pulmonary drug delivery systems for antimicrobial agents: facts and myths. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35 (2), S. 101–106.
- Fan, Y.; Wang, D.; Hu, Y.; Liu, J.; Han, G.; Zhao, X. et al. (2012): Liposome and epimedium polysaccharide-propolis flavone can synergistically enhance immune effect of vaccine. *Int. J. Biol. Macromol.* 50 (1), S. 125–130.
- Farr, S.; Kellaway, I.; Parry-Jones, D.; Woolfrey, S. (1985): 99m-Technetium as a marker of liposomal deposition and clearance in the human lung. *Int. J. Pharm.* 26 (3), S. 303–316.
- Fatouros, D.G.; Antimisiaris, S.G. (2001): Physicochemical properties of liposomes incorporating hydrochlorothiazide and chlorothiazide. *J. Drug Target.* 9 (1), S. 61–74.
- Fatouros, D.G.; Antimisiaris, S.G. (2002): Effect of amphiphilic drugs on the stability and zeta-potential of their liposome formulations: a study with prednisolone, diazepam, and griseofulvin. *J. Colloid Interface Sci.* 251 (2), S. 271–277.
- Fey, K. (2006): Nichtinfektiöse Krankheiten der tiefen Atemwege und der Lunge. Chronisch obstruktive Bronchi(oli)tis. In: Olof Dietz (Hg.): Handbuch Pferdepraxis. 131 Tabellen : 18 Übersichten. 3. Aufl. Stuttgart: Enke, S. 332.
- Fielding, R.M.; Abra, R.M. (1992): Factors Affecting the Release Rate of Terbutaline from Liposome Formulations After Intratracheal Instillation in the Guinea Pig. *Pharm. Res.* 09 (2), S. 220–223.
- Fransson, B.A.; Peck, K.E.; Smith, J.K.; Anthony, J.A.; Mealey, K.L. (2002): Transdermal absorption of a liposome-encapsulated formulation of lidocaine following topical administration in cats. *Am. J. Vet. Res.* 63 (9), S. 1309–1312.
- Frisbie, D.D.; McIlwraith, C.W.; Kawcak, C.E.; Werpy, N.M.; Pearce, G.L. (2009): Evaluation of topically administered diclofenac liposomal cream for treatment of horses with experimentally induced osteoarthritis. *Am. J. Vet. Res.* 70 (2), S. 210–215.
- Fukumoto, Y.; Shimokawa, H. (2011): Recent progress in the management of pulmonary hypertension. *Circ. J.* 75 (8), S. 1801–1810.
- Galié, N.; Hoepfer, M.M.; Humbert, M.; Torbicki, A.; Vachiery, J.-L.; Barbera, J.A. et al. (2009): Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur. Heart J.* 30 (20), S. 2493–2537.

- Ghazanfari, T.; Am Elhissi; Ding, Z.; Taylor, K.M. (2007): The influence of fluid physicochemical properties on vibrating-mesh nebulization. *Int. J. Pharm.* 339 (1-2), S. 103–111.
- Ghofrani, H.; Pepke-Zaba, J.; Barbera, J.; Channick, R.; Keogh, A.; Gomez-Sanchez, M. et al. (2004a): Nitric oxide pathway and phosphodiesterase inhibitors in pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 43 (12 Suppl. S), S. 68S-72S.
- Ghofrani, H.A.; Reichenberger, F.; Kohstall, M.G.; Mrosek, E.H.; Seeger, T.; Olschewski, H. et al. (2004b): Sildenafil increased exercise capacity during hypoxia at low altitudes and at Mount Everest base camp: a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover trial. *Ann. Intern. Med* 141 (3), S. 169–177.
- Ghofrani, H.A.; Voswinckel, R.; Reichenberger, F.; Olschewski, H.; Haredza, P.; Karadaş, B. et al. (2004c): Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension. *J. Amer. College Cardiology* 44 (7), S. 1488–1496.
- Gilbert, B.E.; Six, H.R.; Wilson, S.Z.; Wyde, P.R.; Knight, V. (1988): Small particle aerosols of enviroxime-containing liposomes. *Antiviral Res.* 9 (6), S. 355–365.
- Gobry, V.; Bouchard, G.; Carrupt, P.-A.; Testa, B.; Girault, H.H. (2000): Physicochemical Characterization of Sildenafil: Ionization, Lipophilicity Behavior, and Ionic-Partition Diagram Studied by Two-Phase Titration and Electrochemistry. *Helv. Chim. Acta* 83 (7), S. 1465–1474.
- Gonda, I. (2000): The ascent of pulmonary drug delivery. *J. Pharm. Sci.* 89 (7), S. 940–945.
- Gonzalez-Rothi, R.J.; Straub, L.; Cacace, J.L.; Schreier, H. (1991): Liposomes and pulmonary alveolar macrophages: functional and morphologic interactions. *Exp. Lung Res.* 17 (4), S. 687–705.
- Goyal, P.; Goyal, K.; Vijaya Kumar, S.G.; Singh, A.; Katare, O.P.; Mishra, D.N. (2005): Liposomal drug delivery systems--clinical applications. *Acta Pharm.* 55 (1), S. 1–25.
- Gregoriadis, G. (1976): The carrier potential of liposomes in biology and medicine (second of two parts). *N. Engl. J. Med.* 295 (14), S. 765–770.
- Gregoriadis, G. (1991): Overview of liposomes. *J. Antimicrob. Chemother.* 28 (Suppl. B), S. 39–48.
- Gregoriadis, G. (2008): Liposome research in drug delivery: the early days. *J. Drug Target.* 16 (7), S. 520–524.
- Gregoriadis, G.; Davis, C. (1979): Stability of liposomes in vivo and in vitro is promoted by their cholesterol content and the presence of blood cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89 (4), S. 1287–1293.
- Groneberg, D.A.; Witt, C.; Wagner, U.; Chung, K.F.; Fischer, A. (2003): Fundamentals of pulmonary drug delivery. *Respir. Med.* 97 (4), S. 382–387.
- Gros, G. (2000): Atmung. Vergleichende Pathophysiologie der Lungenfunktion der Haustiere. Obstruktive Lungenerkrankungen. In: W.v Engelhardt und G. Breves (Hg.): Physiologie der Haustiere. Stuttgart: Enke, S. 245–246.
- Grossman, J. (1994): The evolution of inhaler technology. *J. Asthma* 31 (1), S. 55–64.
- Hassoun, P.M.; Mouthon, L.; Barberà, J.A.; Eddahibi, S.; Flores, S.C.; Grimminger, F. et al. (2009): Inflammation, Growth Factors, and Pulmonary Vascular Remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* 54 (1), S. S10.

- Hawkins, E.C.: Erkrankungen der Atemwege. Pulmonale Hypertonie. In: Richard W. Nelson und C. Guillermo Couto (Hg.): Innere Medizin der Kleintiere, 2. Auflage, 2010, S. 335–336.
- Hawkins, E.C.: Erkrankungen der Atemwege. Erkrankungen von Trachea und Bronchien. In: Richard W. Nelson und C. Guillermo Couto (Hg.): Innere Medizin der Kleintiere, 2. Auflage, 2010, S. 312–314.
- Hawkins, E.C.: Erkrankungen der Lungenparenchyms und der Lungengefäße. Bakterielle Pneumonie. In: Richard W. Nelson und C. Guillermo Couto (Hg.): Innere Medizin der Kleintiere, 2. Auflage, 2010, S. 324–325.
- Huang, Y.Y.; Wang, C.H. (2006): Pulmonary delivery of insulin by liposomal carriers. *J Control Release* 113 (1), S. 9–14.
- Humbert, M.; Morrell, N.W.; Archer, S.L.; Stenmark, K.R.; MacLean, M.R.; Lang, I.M. et al. (2004): Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll. Cardiol.* 43 (12), S. S13.
- Hyland, R.; Roe, E.G.H.; Jones, B.C.; Smith, D.A. (2001): Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the N-demethylation of sildenafil. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 51 (3), S. 239–248.
- Ichinose, F.; Erana-Garcia, J.; Hromi, J.; Raveh, Y.; Jones, R.; Krim, L. et al. (2001): Nebulized sildenafil is a selective pulmonary vasodilator in lambs with acute pulmonary hypertension. *Crit. Care Med.* 29 (5), S. 1000–1005.
- Itoh, T. (2003): A Combination of Oral Sildenafil and Beraprost Ameliorates Pulmonary Hypertension in Rats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169 (1), S. 34–38.
- Jain, S.; Tiwary, A.K.; Sapra, B.; Jain, N.K. (2007): Formulation and evaluation of ethosomes for transdermal delivery of lamivudine. *AAPS PharmSciTech* 8 (4), S. E111.
- Julian, R.J. (2000): Physiological, management and environmental triggers of the ascites syndrome: a review. *Avian Pathol.* 29 (6), S. 519–527.
- Juliano, R.L.; McCullough, H.N. (1980): Controlled delivery of an antitumor drug: localized action of liposome encapsulated cytosine arabinoside administered via the respiratory system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 214 (2), S. 381–387.
- Juliano, R.L.; Stamp, D. (1975): The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63 (3), S. 651–658.
- Jutila, A.; Soderlund, T.; Pakkanen, A.L.; Huttunen, M.; Kinnunen, P.K. (2001): Comparison of the effects of clozapine, chlorpromazine, and haloperidol on membrane lateral heterogeneity. *Chem. Phys. Lipids* 112 (2), S. 151–163.
- Kass, D.; Takimoto, E.; Nagayama, T.; Champion, H. (2007): Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling. *Cardiovasc. Res.* 75 (2), S. 303–314.
- Kellaway, I.W.; Farr, S.J. (1990): Liposomes as drug delivery systems to the lung. *Adv. Drug Deliv. Reviews* 5 (1-2), S. 149–161.
- Khan; Rezler, E.M.; Lauer-Fields, J.; Fields, G.B. (2008): Effects of drug hydrophobicity on liposomal stability. *Chem. Biol. Drug Des.* 71 (1), S. 3–7.
- Khilnani, G.; Banga A. (2008): Aerosol Therapy. *Indian J. Chest Dis. Allied Sci.* (50), S. 209–219.

- Kirby, C.; Clarke, J.; Gregoriadis, G. (1980): Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro. *Biochem. J.* 186 (2), S. 591–598.
- Kleemann, E.; Schmehl, T.; Gessler, T.; Bakowsky, U.; Kissel, T.; Seeger, W. (2007): Iloprost-containing liposomes for aerosol application in pulmonary arterial hypertension: formulation aspects and stability. *Pharm. Res.* 24 (2), S. 277–287.
- Kleiter, M.; Tichy, A.; Willmann, M.; Pagitz, M.; Wolfesberger, B. (2010): Concomitant liposomal doxorubicin and daily palliative radiotherapy in advanced feline soft tissue sarcomas. *Vet. Radiol. Ultrasound* 51 (3), S. 349–355.
- Klepser, M. (2004): Role of nebulized antibiotics for the treatment of respiratory infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 17 (2), S. 109–112.
- Kraske, W.V.; Mountcastle, D.B. (2001): Effects of cholesterol and temperature on the permeability of dimyristoylphosphatidylcholine bilayers near the chain melting phase transition. *Biochim. Biophys. Acta* 1514 (2), S. 159–164.
- Kulkarni, S.B.; Betageri, G.V.; Singh, M. (1995): Factors affecting microencapsulation of drugs in liposomes. *J. Microencapsul.* 12 (3), S. 229–246.
- Kuronuma, K.; Mitsuzawa, H.; Takeda, K.; Nishitani, C.; Chan, E.D.; Kuroki, Y. et al. (2009): Anionic Pulmonary Surfactant Phospholipids Inhibit Inflammatory Responses from Alveolar Macrophages and U937 Cells by Binding the Lipopolysaccharide-interacting Proteins CD14 and MD-2. *J. Biol. Chem.* 284 (38), S. 25488–25500.
- Lahnstein, K.; Schmehl, T.; Rusch, U.; Rieger, M.; Seeger, W.; Gessler, T. (2008): Pulmonary absorption of aerosolized fluorescent markers in the isolated rabbit lung. *Int. J. Pharm.* 351 (1-2), S. 158–164.
- Lahnstein, Kerstin (2009): Charakterisierung verschiedener Verneblersysteme und Untersuchung der Übertrittskinetiken von inhalativ verabreichten Fluoreszenzfarbstoffen sowie von Salbutamol am Modell der isolierten Kaninchenlunge. 1. Aufl. Giessen: VVB Laufersweiler.
- Lambros, M.P.; Bourne, D.W.; Abbas, S.A.; Johnson, D.L. (1997): Disposition of aerosolized liposomal amphotericin B. *J. Pharm. Sci.* 86 (9), S. 1066–1069.
- Lasch J.; Weissig, V.; Brandl, M. (2002): General methods. Preparation of liposomes. Preparation methods. In: Vladimir Petrovitch Tortchiline und Volkmar Weissig (Hg.): Liposomes. 2. Aufl. Oxford ; New York: Oxford University Press, S. 4–23.
- Lasic, D.D. (1988): The mechanism of vesicle formation. *Biochem. J.* 256 (1), S. 1–11.
- Lasic, D.D. (1998): Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol.* 16 (7), S. 307–321.
- Laube, B.L. (2005): The expanding role of aerosols in systemic drug delivery, gene therapy, and vaccination. *Respir. Care* 50 (9), S. 1161–1176.
- Lavorini, F.; Fontana, G.A. (2009): Targeting drugs to the airways: The role of spacer devices. *Expert Opin. Drug Deliv.* 6 (1), S. 91–102.
- Le Brun, P.P.; Boer, A.H. de; Heijerman, H.G.; Frijlink, H.W. (2000): A review of the technical aspects of drug nebulization. *Pharm. World Sci.* 22 (3), S. 75–81.
- Leung, K. (1996): The stability of liposomes to ultrasonic nebulisation. *Int. J. Pharm.* 145 (1-2), S. 95–102.

- Levine, D.G.; Epstein, K.L.; Neelis, D.A.; Ross, M.W. (2009): Effect of topical application of 1% diclofenac sodium liposomal cream on inflammation in healthy horses undergoing intravenous regional limb perfusion with amikacin sulfate. *Am. J. Vet. Res* 70 (11), S. 1323–1325.
- Lian, T.; Ho, R.J. (2001): Trends and developments in liposome drug delivery systems. *J. Pharm. Sci.* 90 (6), S. 667–680.
- Lippmann, M. (2011): Regional Deposition of Particles in the Human Respiratory Tract. *Comprehensive Physiology*, S. 213–232.
- Lippmann, M.; Yeates, D.B.; Albert, R.E. (1980): Deposition, retention, and clearance of inhaled particles. *Br. J. Ind. Med.* 37 (4), S. 337–362.
- Liu, S.; Guo, D.; Guo, Y.; Zhou, W. (2011): Preparation and pharmacokinetics of ceftiofur sodium liposomes in cows. *J. Vet. Pharmacol. Ther* 34 (1), S. 35–41.
- Liu, X.; Wang, J.Y.; Khlentzos, A.M.; Fontaine, F.; Nikolovski, J.; Goh, L.-A.; Roberts, M.S. (2009): Influence of perfusate composition on drug disposition in the in-situ perfused rat lung. *Int. J. Pharm.* 382 (1-2), S. 192–197.
- López-Pinto, J.; González-Rodríguez, M.; Rabasco, A. (2005): Effect of cholesterol and ethanol on dermal delivery from DPPC liposomes. *Int. J. Pharm.* 298 (1), S. 1–12.
- Lynn, R.C.; Hepler, D.I.; Kelch, W.J.; Bertone, J.J.; Smith, B.L.; Vatisas, N.J. (2004): Double-blinded placebo-controlled clinical field trial to evaluate the safety and efficacy of topically applied 1% diclofenac liposomal cream for the relief of lameness in horses. *Vet. Ther.* 5 (2), S. 128–138.
- MacDonald, R.C.; MacDonald, R.I.; Menco, B.P.; Takeshita, K.; Subbarao, N.K.; Hu, L.R. (1991): Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* 1061 (2), S. 297–303.
- MacLean, M.R.; Johnston, E.D.; McCulloch, K.M.; Pooley, L.; Houslay, M.D.; Sweeney, G. (1997): Phosphodiesterase isoforms in the pulmonary arterial circulation of the rat: changes in pulmonary hypertension. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283 (2), S. 619–624.
- Mansour, H.M.; Rhee, Y.S.; Wu, X. (2009): Nanomedicine in pulmonary delivery. *Int. J. Nanomedicine* 4, S. 299–319.
- Marr, A.K.; Kurzman, I.D.; Vail, D.M. (2004): Preclinical evaluation of a liposome-encapsulated formulation of cisplatin in clinically normal dogs. *Am. J. Vet. Res* 65 (11), S. 1474–1478.
- Mayer, L.D.; Hope, M.J.; Cullis, P.R. (1986): Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim. Biophys. Acta* 858 (1), S. 161–168.
- McCalden, T.A. (1990): Particulate systems for drug delivery to the lung. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 5 (3), S. 253–263.
- McCalden, T.A.; Radhakrishnan, R. (1991): A comparative study of the bronchodilator effect and duration of action of liposome encapsulated beta-2 adrenergic agonists in the guinea-pig. *Pulm. Pharmacol.* 4 (3), S. 140–145.
- McCalden, T.A.; Abra, R.M.; Mihalko, P.J. (1989): Bronchodilator Efficacy of Liposome Formulations of Metaproterenol Sulfate in the Anesthetized Guinea Pig. *J. Liposome Res.* 1 (2), S. 211–222.
- McLaughlin, V.V. (2002): Survival in Primary Pulmonary Hypertension: The Impact of Epoprostenol Therapy. *Circulation* 106 (12), S. 1477–1482.

- McLaughlin, V.V.; Oudiz, R.J.; Frost, A.; Tapson, V.F.; Murali, S.; Channick, R.N. et al. (2006): Randomized Study of Adding Inhaled Iloprost to Existing Bosentan in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 174 (11), S. 1257–1263.
- Meisner, D.; Pringle, J.; Mezei, M. (1989): Liposomal pulmonary drug delivery I. In vivo disposition of atropine base in solution and liposomal form following endotracheal instillation to the rabbit lung. *J. Microencapsul.* 6 (3), S. 379–387.
- Melnikov, P.; Corbi, P.; Cuin, A.; Cavicchioli, M.; Guimaraes, W. (2003): Physicochemical properties of sildenafil citrate (Viagra) and sildenafil base. *J. Pharm. Sci.* 92 (10), S. 2140–2143.
- Michelakis, E. (2002): Oral Sildenafil Is an Effective and Specific Pulmonary Vasodilator in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension: Comparison With Inhaled Nitric Oxide. *Circulation* 105 (20), S. 2398–2403.
- Michelakis, E.D.; Tymchak, W.; Noga, M.; Webster, L.; Wu, X.-C.; Lien, D. et al. (2003): Long-term treatment with oral sildenafil is safe and improves functional capacity and hemodynamics in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 108 (17), S. 2066–2069.
- Mohammed, A.R.; Weston, N.; Coombes, A.G.; Fitzgerald, M.; Perrie, Y. (2004): Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability. *Int. J. Pharm.* 285 (1-2), S. 23–34.
- Moribe, K.; Maruyama, K.; Iwatsuru, M. (1999): Encapsulation characteristics of nystatin in liposomes: effects of cholesterol and polyethylene glycol derivatives. *Int. J. Pharm.* 188 (2), S. 193–202.
- Moscho, A.; Orwar, O.; Chiu, D.T.; Modi, B.P.; Zare, R.N. (1996): Rapid preparation of giant unilamellar vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93 (21), S. 11443–11447.
- Müller, R.H.; Mäder, K.; Gohla, S. (2000): Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (1), S. 161–177.
- Müller, Rainer H.; Schuhmann, Raimund (1996): Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis. Kurzes Lehrbuch mit Einführung in die Theorie: Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) - Laserdiffraktometrie (LD) - Coulter-Messprinzip (CM) und Messbeispielen aus dem Schwerpunktbereich der Koaleszenzuntersuchungen: - Turbidimetrie vs. Coulter-Counter-Assay ; erstellt anlässlich: Colloidal drug carriers (cdc), 3rd expert meeting, Workshop "Particle Sizing", 29-31 May 1997, Berlin ; mit 21 Tabellen. Unter Mitarbeit von Kai Thode. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.
- Murray, F.; MacLean, M.R.; Pyne, N.J. (2002): Increased expression of the cGMP-inhibited cAMP-specific (PDE3) and cGMP binding cGMP-specific (PDE5) phosphodiesterases in models of pulmonary hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 137 (8), S. 1187–1194.
- Murray, J.F. (2010): The structure and function of the lung. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 14 (4), S. 391–396.
- Myers, M.A.; Thomas, D.A.; Straub, L.; Soucy, D.W.; Niven, R.W.; Kaltenbach, M. et al. (1993): Pulmonary effects of chronic exposure to liposome aerosols in mice. *Exp. Lung. Res.* 19 (1), S. 1–19.
- Nichols, D.J.; Muirhead, G.J.; Harness, J.A. (2002): Pharmacokinetics of sildenafil after single oral doses in healthy male subjects: absolute bioavailability, food effects and dose proportionality. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 53 (Suppl. 1), S. 5S-12S.
- Niemeier, R.W. (1984): The isolated perfused lung. *Environ. Health Perspect.* 56, S. 35–41.

- Niven, R.W.; Schreier, H. (1990): Nebulization of Liposomes. I. Effects of Lipid Composition. *Pharm. Res.* 07 (11), S. 1127–1133.
- Niven, R.W.; Speer, M.; Schreier, H. (1991): Nebulization of Liposomes. II. The Effects of Size and Modeling of Solute Release Profiles. *Pharm. Res.* 08 (2), S. 217–221.
- O'Callaghan, C.; Barry, P.W. (1997): The science of nebulised drug delivery. *Thorax* 52 (Suppl. 2), S. S31.
- Olschewski, H.; Ghofrani, H.A.; Schmehl, T.; Winkler, J.; Wilkens, H.; Hoper, M.M. et al. (2000): Inhaled iloprost to treat severe pulmonary hypertension. An uncontrolled trial. German PPH Study Group. *Ann. Intern. Med.* 132 (6), S. 435–443.
- Olschewski, H.; Hoepfer, M.M.; Borst, M.M.; Ewert, R.; Grünig, E.; Kleber, F.-X. et al. (2007): Diagnostik und Therapie der chronischen pulmonalen Hypertonie. *Clin. Res. Cardiol.* 96 (5), S. 301–330.
- Olschewski, H.; Rose, F.; Grünig, E.; Ghofrani, H.A.; Walmrath, D.; Schulz, R. et al. (2001): Cellular pathophysiology and therapy of pulmonary hypertension. *J. Lab. Clin. Med.* 138 (6), S. 367–377.
- Olson, F.; Hunt, C.A.; Szoka, F.C.; Vail, W.J.; Papahadjopoulos, D. (1979): Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 557 (1), S. 9–23.
- Paolino, D.; Lucania, G.; Mardente, D.; Alhaique, F.; Fresta, M. (2005): Ethosomes for skin delivery of ammonium glycyrrhizinate: in vitro percutaneous permeation through human skin and in vivo anti-inflammatory activity on human volunteers. *J. Control. Release* 106 (1-2), S. 99–110.
- Parthasarathy, R.; Gilbert, B.; Mehta, K. (1999): Aerosol delivery of liposomal all-trans-retinoic acid to the lungs. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 43 (4), S. 277–283.
- Patton, J.S.; Byron, P.R. (2007): Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs. *Nat Rev Drug Discov* 6 (1), S. 67–74.
- Patton, J.S.; Fishburn, C.S.; Weers, J.G. (2004): The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery. *Proc Am. Thorac. Soc.* 1 (4), S. 338–344.
- Phillips, C.G.; Kaye, SR (1995): Diameter-based analysis of the branching geometry of four mammalian bronchial trees. *Respir. Physiol.* 102 (2-3), S. 303–316.
- Poelma, D.L.; Zimmermann, L.J.; Scholten, H.H.; Lachmann, B.; van, I. (2002): In vivo and in vitro uptake of surfactant lipids by alveolar type II cells and macrophages. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 283 (3), S. L648-54.
- Prousny, J. (2008): The treatment of pulmonary diseases and respiratory-related conditions with inhaled (nebulized or aerosolized) glutathione. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 5 (1), S. 27–35.
- Ramani, G.V.; Park, M.H. (2010): Update on the clinical utility of sildenafil in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Drug Des. Devel. Ther.* 4, S. 61–70.
- Rhoades, R.A. (1984): Isolated perfused lung preparation for studying altered gaseous environments. *Environ. Health Perspect.* 56, S. 43–50.
- Richalet, J.-P. (2004): Sildenafil Inhibits Altitude-induced Hypoxemia and Pulmonary Hypertension. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 171 (3), S. 275–281.
- Rondelet, B. (2004): Signaling Molecules in Overcirculation-Induced Pulmonary Hypertension in Piglets: Effects of Sildenafil Therapy. *Circulation* 110 (15), S. 2220–2225.

- Rubin, B. (2010): Air and soul: the science and application of aerosol therapy. *Respir. Care* 55 (7), S. 911–921.
- Rüsçh, Ute (2010): Herstellung und Anwendung von liposomalen Carriersystemen für die inhalative Applikation von Iloprost. 1. Aufl. Giessen: VVB Laufersweiler.
- Saari, M.; Vidgren, M.T.; Koskinen, M.O.; Turjanmaa, V.M.; Nieminen, M.M. (1999): Pulmonary distribution and clearance of two beclomethasone liposome formulations in healthy volunteers. *Int. J. Pharm.* 181 (1), S. 1–9.
- Salama, R.; Traini, D.; Chan, H.-K.; Young, P.M. (2009): Recent Advances in Controlled Release Pulmonary Therapy. *Curr. drug deliv.* 6 (4), S. 404–414.
- Schermuly, R.T. (2003): Chronic Sildenafil Treatment Inhibits Monocrotaline-induced Pulmonary Hypertension in Rats. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 169 (1), S. 39–45.
- Scheuch, G.; Kohlhaeufel, M.J.; Brand, P.; Siekmeier, R. (2006): Clinical perspectives on pulmonary systemic and macromolecular delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (9-10), S. 996–1008.
- Schlesinger, R.B.; La McFadden (1981): Comparative morphometry of the upper bronchial tree in six mammalian species. *Anat. Rec.* 199 (1), S. 99–108.
- Schreier, H. (1994): Pulmonary Delivery of Liposomal Drugs. *J. Liposome Res.* 4 (1), S. 229–238.
- Schreier, H.; Gonzalez-Rothi, R.J.; Stecenko, A.a. (1993): Pulmonary delivery of liposomes. *J. controlled release* 24, S. 209–223.
- Schreier, H.; McNicol, K.J.; Ausborn Michael; Soucy David M.; Derendorf Hartmut; Stecenko Arlene a; Gonzalez-Rothi Ricardo J (1992): Pulmonary delivery of amikacin liposomes and acute liposome toxicity in the sheep. *Int. J. Pharm.* 87, S. 183–193.
- Sebkhii, A. (2003): Phosphodiesterase Type 5 as a Target for the Treatment of Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Circulation* 107 (25), S. 3230–3235.
- Seeger, W.; Walmrath, D.; Grimminger, F.; Rosseau, S.; Schutte, H.; Kramer, H.J. et al. (1994): Adult respiratory distress syndrome: model systems using isolated perfused rabbit lungs. *Methods Enzymol.* 233, S. 549–584.
- Sessa, G.; Weissmann, G. (1968): Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J. Lipid Res.* 9 (3), S. 310–318.
- Sharma, A.; Sharma, U.S. (1997): Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *Int. J. Pharm.* 154 (2), S. 123–140.
- Shek, P.N.; Suntres, Z.E.; Brooks, J.I. (1994): Liposomes in pulmonary applications: physicochemical considerations, pulmonary distribution and antioxidant delivery. *J. Drug Target* 2 (5), S. 431–442.
- Sheu, M.-T.; Wu, A.-B.; Yeh, G.-C.; Hsia, A.; Ho, H.-O. (2003): Development of a liquid chromatographic method for bioanalytical applications with sildenafil. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 791 (1-2), S. 255–262.
- Simonneau, G.; Robbins, I.M.; Beghetti, M.; Channick, R.N.; Delcroix, M.; Denton, C.P. et al. (2009): Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 54 (1), S. S43.
- Sladky, K.K.; Krugner-Higby, L.; Meek-Walker, E.; Heath, T.D.; Paul-Murphy, J. (2006): Serum concentrations and analgesic effects of liposome-encapsulated and standard butorphanol tartrate in parrots. *Am. J. Vet. Res* 67 (5), S. 775–781.

- Smith, L.J.; KuKanich, B.; Hogan, B.K.; Brown, C.; Heath, T.D.; Krugner-Higby, L.A. (2008): Pharmacokinetics of a controlled-release liposome-encapsulated hydromorphone administered to healthy dogs. *J. Vet. Pharmacol. Ther* 31 (5), S. 415–422.
- Stamm, J.A.; Risbano, M.G.; Mathier, M.A. (2011): Overview of current therapeutic approaches for pulmonary hypertension. *Pulm. Circ.* 1 (2), S. 138–159.
- Suarez, S.; Garcia-Contreras, L.; Sarubbi, D.; Flanders, E.; O'Toole, D.; Smart, J.; Hickey, A.J. (2001): Facilitation of pulmonary insulin absorption by H-MAP: pharmacokinetics and pharmacodynamics in rats. *Pharm. Res* 18 (12), S. 1677–1684.
- Szoka, F.; Papahadjopoulos, D. (1980): Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annu. Rev. Biophys. Bioeng* 9, S. 467–508.
- Tan, S.; Hung, O.; Whynot, S.; Mezei, M. (1996): Sustained tissue drug concentrations following inhalation of liposome-encapsulated fentanyl in rabbits. *Drug Deliv.* 3 (4), S. 251–254.
- Taylor, K.; Elhissi, A. (2006): Preparation of Liposomes for Pulmonary Delivery Using Medical Nebulizers. In: *Liposome Technology, Third Edition, Volume I: Liposome Preparation and Related Techniques*, S. 67–84.
- Taylor, K.; Taylor, G.; Kellaway, I.; Stevens, J. (1990): The stability of liposomes to nebulisation. *Int. J. Pharm.* 58, S. 57–61.
- Taylor, K.M.; Farr, S.J. (1993): Liposomes for Drug Delivery to the Respiratory Tract. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 19 (1-2), S. 123–142.
- Taylor, K.M.; Newton, J.M. (1992): Liposomes for controlled delivery of drugs to the lung. *Thorax* 47 (4), S. 257–259.
- Taylor, K.M.; Taylor, G.; Kellaway, I.W.; Stevens, J. (1989): The influence of liposomal encapsulation on sodium cromoglycate pharmacokinetics in man. *Pharm. Res.* 6 (7), S. 633–636.
- Thomas, D.A.; Myers, M.A.; Wichert, B.; Schreier, H.; Gonzalez-Rothi, R.J. (1991): Acute effects of liposome aerosol inhalation on pulmonary function in healthy human volunteers. *Chest* 99 (5), S. 1268–1270.
- Tomita, T.; Watanabe, M.; Takahashi, T.; Kumai, K.; Tadakuma, T.; Yasuda, T. (1989): Temperature-sensitive release of adriamycin, an amphiphilic antitumor agent, from dipalmitoylphosphatidylcholine-cholesterol liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 978 (2), S. 185–190.
- Torchilin, V.P. (2005): Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2), S. 145–160.
- Touitou, E.; Dayan, N.; Bergelson, L.; Godin, B.; Eliaz, M. (2000): Ethosomes — novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *J. Controlled Release* 65 (3), S. 403–418.
- Touitou, E.; Godin, B.; Dayan, N.; Weiss, C.; Piliponsky, A.; Levi-Schaffer, F. (2001): Intracellular delivery mediated by an ethosomal carrier. *Biomaterials* 22 (22), S. 3053–3059.
- Traini, D.; Young, P. (2009): Delivery of antibiotics to the respiratory tract: an update. *Expert Opin. Drug Deliv.* 6 (9), S. 897–905.

- Tronde, A.; Bosquillon, C.; Forbes, B. (2008): The Isolated Perfused Lung for Drug Absorption Studies. In: Carsten Ehrhardt und Kwang-Jin Kim (Hg.): *Biotechnology: Pharmaceutical Aspects*. Boston, MA: Springer US (VII), S. 135–163.
- Tronde, A.; Nordén, B.; Jeppsson, A.-B.; Brunmark, P.; Nilsson, E.; Lennernäs, H.; Bengtsson, U.H. (2003): Drug absorption from the isolated perfused rat lung--correlations with drug physicochemical properties and epithelial permeability. *J. Drug Target.* 11 (1), S. 61–74.
- Ulrich, A.S. (2002): Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Biosci. Rep.* 22 (2), S. 129–150.
- Underwood, C.; van Eps, A.W.; Ross, M.W.; Laverman, P.; van Bloois, L.; Storm, G.; Schaer, T.P. (2011): Intravenous technetium-99m labelled PEG-liposomes in horses: A safety and biodistribution study. *Equine Vet. J.* 44 (2), S.196-202.
- Vail, D.M.; MacEwen, E.G.; Kurzman, I.D.; Dubielzig, R.R.; Helfand, S.C.; Kisseberth, W.C. et al. (1995): Liposome-encapsulated muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine adjuvant immunotherapy for splenic hemangiosarcoma in the dog: a randomized multi-institutional clinical trial. *Clin. Cancer Res.* 1 (10), S. 1165–1170.
- Vemuri, S.; Rhodes, C.T. (1995): Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm. Acta Helv.* 70 (2), S. 95–111.
- Voshaar, T.; App, E.M.; Berdel, D.; Buhl, R.; Fischer, J.; Gessler, T. et al. (2001): Recommendations for the Choice of Inhalatory Systems for Drug Prescription. *Pneumologie* 55 (12), S. 579–586.
- Waldrep, J.C.; Knight, C.M.; Black, M.B.; Gilbert, B.E.; Knight, V.; Eschenbacher, W.; Scherer, P.W. (1997): Pulmonary Delivery of Beclomethasone Liposome Aerosol in Volunteers: Tolerance and Safety. *Chest* 111 (2), S. 316–323.
- Wang, C.; Wang, J.; Zhao, L.; Wang, Y.; Liu, J.; Shi, L.; Xu, M. (2008a): Sildenafil inhibits human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation by decreasing capacitative Ca²⁺ entry. *J. Pharmacol. Sci.* 108 (1), S. 71–78.
- Wang, Y.; Chow, M.S.; Zuo, Z. (2008b): Mechanistic analysis of pH-dependent solubility and trans-membrane permeability of amphoteric compounds: Application to sildenafil. *Int. J. Pharm.* 352 (1-2), S. 217–224.
- Warrington, J.S.; Shader, R.I.; Moltke, L.L. von; Greenblatt, D.J. (2000): In vitro biotransformation of sildenafil (Viagra): identification of human cytochromes and potential drug interactions. *Drug Metab. Dispos.* 28 (4), S. 392–397.
- Waschowitz, Esther (2002): Darstellung und Charakterisierung einer liposomalen Depotform zum inhalativen pulmonalen Applikation. 1. Aufl. Wetztenberg: VVB Laufersweiler.
- Weers, J.; Metzheiser, B.; Taylor, G.; Warren, S.; Meers, P.; Perkins, W.R. (2009): A Gamma Scintigraphy Study to Investigate Lung Deposition and Clearance of Inhaled Amikacin-Loaded Liposomes in Healthy Male Volunteers. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 22 (2), S. 131–138.
- Weimann, J.; Ullrich, R.; Hromi, J.; Fujino, Y.; Clark, M.W.; Bloch, K.D.; Zapol, W.M. (2000): Sildenafil is a pulmonary vasodilator in awake lambs with acute pulmonary hypertension. *Anesthesiology* 92 (6), S. 1702–1712.

- Wharton, J.; Strange, J.W.; Moller, G.M.; Growcott, E.J.; Ren, X.; Franklyn, A.P. et al. (2005): Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172 (1), S. 105–113.
- Wichert, B.V.; Gonzalez-Rothi, R.J.; Straub, L.E.; Wichert, B.M.; Schreier, H. (1992): Amikacin liposomes: characterization, aerosolization, and in vitro activity against *Mycobacterium avium-intracellulare* in alveolar macrophages. *Int. J. Pharm.* 78 (1-3), S. 227–235.
- Wichert, P. von; Seifart, C. (2005): The lung, an organ for absorption? *Respiration* 72 (5), S. 552–558.
- Wijagkanalan, W.; Higuchi, Y.; Kawakami, S.; Teshima, M.; Sasaki, H.; Hashida, M. (2008): Enhanced anti-inflammation of inhaled dexamethasone palmitate using mannosylated liposomes in an endotoxin-induced lung inflammation model. *Mol. Pharmacol.* 74 (5), S. 1183–1192.
- Wilkens, H.; Guth, A.; König, J.; Forestier, N.; Cremers, B.; Hennen, B. et al. (2001): Effect of inhaled iloprost plus oral sildenafil in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 104 (11), S. 1218–1222.
- Wood, J.A.; Wilson, R.S.; Bray, C. (1986): Changes in salbutamol concentration in the reservoir solution of a jet nebulizer. *Br. J. Dis. Chest* 80 (2), S. 164–169.
- Woolfrey, S.G.; Taylor, G.; Kellaway, I.W.; Smith, A. (1988): Pulmonary absorption of liposome-encapsulated 6-Carboxyfluorescein. *J. controlled release* 5, S. 203–209.
- Wyde, P.R.; Six, H.R.; Wilson, S.Z.; Gilbert, B.E.; Knight, V. (1988): Activity against rhinoviruses, toxicity, and delivery in aerosol of enviroxime in liposomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32 (6), S. 890–895.
- Yang, T.; Cui, F.-D.; Choi, M.-K.; Lin, H.; Chung, S.-J.; Shim, C.-K.; Kim, D.-D. (2007): Liposome formulation of paclitaxel with enhanced solubility and stability. *Drug Deliv.* 14 (5), S. 301–308.
- Yazar, E.; Bas, A.; Birdane, Y.; Yapar, K.; Tras, B. (2006): Determination of intracellular (neutrophil and monocyte) concentrations of free and liposome encapsulated ampicillin in sheep. *Veterinari Medicina* 51 (2), S. 51–54.
- Yeh, H.C.; Phalen, R.F.; Raabe, O.G. (1976): Factors influencing the deposition of inhaled particles. *Environ. Health Perspec.* 15, S. 147–156.
- Zaru, M.; Mourtas, S.; Klepetsanis, P.; Am Fadda; Antimisiaris, S.G. (2007): Liposomes for drug delivery to the lungs by nebulization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67 (3), S. 655–666.
- Zeng, X.M.; Martin, G.P.; Marriott, C. (1995): The controlled delivery of drugs to the lung. *Int. J. Pharm.* 124 (2), S. 149–164.
- Zhang, G.; David, A.; Wiedmann, T.S. (2007): Performance of the vibrating membrane aerosol generation device: Aeroneb Micropump Nebulizer. *J. Aerosol Med.* 20 (4), S. 408–416.
- Zhang, J.A.; Anyarambhatla, G.; Ma, L.; Ugwu, S.; Xuan, T.; Sardone, T.; Ahmad, I. (2005): Development and characterization of a novel Cremophor® EL free liposome-based paclitaxel (LEP-ETU) formulation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 59 (1), S. 177–187.
- Zhao, L.; Mason, N.A.; Morrell, N.W.; Kojonazarov, B.; Sadykov, A.; Maripov, A. et al. (2001): Sildenafil Inhibits Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Circulation* 104 (4), S. 424–428.

- Zhao, X.; Fan, Y.; Wang, D.; Hu, Y.; Guo, L.; Ruan, S. et al. (2011): Immunological adjuvant efficacy of glycyrrhetic acid liposome against Newcastle disease vaccine. *Vaccine* 29 (52), S. 9611–9617.

8 ANHANG

8.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATRA	All-trans-retinoic acid (all-trans-Retinsäure)
BAL	bronchoalveoläre Lavage
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
Ca ⁺⁺	Calcium
ca.	cirka
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAS	Chemical Abstracts Service
CF	5(6)-Carboxyfluorescein
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CH	Cholesterol
Cl ⁻	Chlor
COB	chronisch obstruktive Bronchitis
COPD	chronic obstructive pulmonary disease (chronisch obstruktive Lungenerkrankung)
C _{corr} (t)	korrigierte Wirkstoffkonzentration im Perfusat zum Zeitpunkt (t)
C(t)	gemessene Wirkstoffkonzentration im Perfusat zum Zeitpunkt (t)
d _a	Außendurchmesser
d _i	Innendurchmesser
DLPC	1,2-Dilauroyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DSPC	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
GMP	Guanosinmonophosphat
GSD	Geometric standard deviation (Geometrische Standardabweichung)
GTP	Guanosintriphosphat

H	Wasserstoff
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRLD	High Resolution Laser Diffraction
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IPL	isolierte, perfundierte Lunge
K ⁺	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{ex}	Anregungswellenlänge
logP	dekadischer Logarithmus des Oktanol/ Wasser-Verteilungskoeffizienten
LPS	Lipopolysaccharide
LVP	left ventricular pressure (linksventrikulärer Druck)
MDI	metered dose inhaler (Dosieraerosole)
MgCl	Magnesiumchlorid
MLV	multilamellare Vesikel
mM	millimolar
MMAD	Mass median aerodynamic diameter (medianer aerodynamischer Massendurchmesser)
MPS	Metaproterenol-Sulfat
MW	Mittelwert
n	Anzahl
N	Stickstoff
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
n.d.	nicht durchgeführt
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
n.s.	nicht signifikant
NSAID	non steroidal anti inflammatory drug (nichtsteroidales Antiphlogistikum)

O	Sauerstoff
P	Phosphor
$p_a\text{CO}_2$	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PAH	pulmonale arterielle Hypertonie
PAP	pulmonary artery pressure (pulmonalarterieller Druck)
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PDE	Phosphodiesterase
PEEP	Positive endexpiratory pressure (positiver endexpiratorischer Druck)
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PH	pulmonale Hypertonie
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
pK_s	Säuredissoziationskonstante
$p_a\text{O}_2$	arterieller Sauerstoffpartialdruck
RPM	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
R6G	Rhodamin 6G
S	Schwefel
SAP	systemic artery pressure (systemischer arterieller Druck)
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
^{99m}Tc	^{99m}Tc Technetium-Per technetat
T_m	Phasenübergangstemperatur
UV	ultraviolette Strahlung
V	Versuch
v. Chr.	vor Christus
VE	Verkapselungseffizienz
VMD	Volume mean diameter (medianer Volumendurchmesser)
$V_p(t)$	Perfusatvolumen zum Zeitpunkt (t)
$V_p(0)$	Perfusatvolumen zum Zeitpunkt 0
VR	Verkapselungsrate
v/v (%)	Volumenprozent
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
w/v (%)	Massenprozent

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematischer Aufbau eines Phospholipids (modifiziert aus Vemuri und Rhodes 1995)	S. 7
Abb. 2	Modellhafte Darstellung der Verkapselung einiger Substanzen in unterschiedlichen Kompartimenten eines unilamellaren Liposoms sowie verschiedener Möglichkeiten der Oberflächenmodifikation. PEG: Polyethylenglykol	S. 10
Abb. 3	Schematische Darstellung der vasodilatativen und antiproliferativen Effekte von Sildenafil (modifiziert und kombiniert aus Barnett und Machado 2006 und Ghofrani et al. 2004a) AMP: Adenosinmonophosphat Ca ⁺⁺ : Calcium cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat cGMP: cyclisches Guanosinmonophosphat GMP: Guanosinmonophosphat GTP: Guanosintriphosphat K ⁺ : Kalium NO: Stickstoffmonoxid NOS: NO-Synthase O ₂ : Sauerstoff PDE: Phosphodiesterase PKA: Proteinkinase A PKG: Proteinkinase G	S. 27
Abb. 4	Chemische Eigenschaften und Strukturformel von DPPC	S. 30
Abb. 5	Chemische Eigenschaften und Strukturformel von Cholesterol	S. 30
Abb. 6	Chemische Eigenschaften und Strukturformel von Rhodamin 6G	S. 31
Abb. 7	Chemische Eigenschaften und Strukturformel von Sildenafil	S. 32
Abb. 8	Aufbau des MicroSprayers [®]	S. 34
Abb. 9	Herstellung der Liposomen nach der Ethanolinjektions-Methode	S. 38
Abb. 10	Auffangen des Aerosols aus dem Pari LC Sprint [®] Star	S. 48
Abb. 11	Verkapselungsraten (MW + SD) der Liposomen nach Extrusion und nach Verneblung. n.s. = nicht signifikant	S. 61

Abb. 12	Aerosolpartikelgrößen (MW + SD) der bei der Verneblung von NaCl und der nach unterschiedlichen Methoden hergestellten Liposomen mit einem Aeroneb [®] Solo generierten Aerosole. MMAD: medianer aerodynamischer Massendurchmesser. Die Signifikanzangaben beziehen sich auf den Vergleich der liposomalen Aerosolpartikel zu NaCl	S. 64
Abb. 13	Verneblungsdauer bei der Verneblung von NaCl und mit R6G beladenen Liposomen mit dem Aeroneb [®] Solo. Die Signifikanzangaben beziehen sich auf den Vergleich der jeweiligen Liposomen zu NaCl.	S. 64
Abb. 14	prozentuale Wiederfindung von Sildenafil bei Inkubation von Schlauchstücken aus Polyurethan in Sildenafillösung	S. 69
Abb. 15	prozentuale Wiederfindung von Sildenafil bei Inkubation von Schlauchstücken aus C-FLEX [®] in Sildenafillösung	S. 68
Abb. 16	Sildenafilkonzentrationen (MW + SD, n=5) der Liposomensuspensionen vor und nach Verneblung mit dem MicroSprayer [®] bzw. dem Pari LC Sprint [®] Star. * p < 0,05 im Vergleich zu den nach Herstellung gemessenen Werten; n.s. = nicht signifikant	S. 73
Abb. 17	In vitro aus den Liposomen freigesetztes Sildenafil in Prozent (MW ± SD, n=4; + bei 150 min n=3), bezogen auf den gemessenen mittleren Gesamt-Sildenafilgehalt im jeweiligen Versuch	S. 77
Abb. 18	Vergleich der Übertrittskinetiken von freiem und liposomal Sildenafil (je n=4) am Modell der isolierten Kaninchenlunge nach Verneblung mit dem MicroSprayer [®] . Freies Sildenafil: MW + SD; liposomales Sildenafil: MW – SD	S. 80
Abb. 19	Schematische Darstellung der Aufzweigung des Bronchialbaumes einer menschlichen Lunge (A) und der monopodialen Aufzweigung (Esel oder Kaninchen) (B) (Schlesinger und La McFadden 1981)	S. 94
Abb. 20	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Kaninchenlunge, auf normales Atemvolumen aufgebläht. Zu erkennen sind die dichotome Aufzweigung einer terminalen Bronchiole, teilweise alveolarisierte respiratorische Bronchiolen, Ductuli alveolares und Alveolen (Murray 2010)	S. 94

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Zusammensetzung der R6G-Eichreihe	S. 41
Tab. 2	Berechnung der Schlauchlängen für die Versuche zur Sildenafil-Wiederfindung	S. 45
Tab. 3	Ergebnisse (MW \pm SD) der Verneblung von isotoner Kochsalzlösung (Aeroneb [®] Solo und Pari LC Sprint [®] Star) bzw. Aqua dest. (MicroSprayer [®]). MMAD: Medianer aerodynamischer Massendurchmesser; GSD: Geometrische Standardabweichung	S. 57
Tab. 4	R6G-Konzentrationen in den zur Verneblung hergestellten Verdünnungen der nach unterschiedlichen Methoden hergestellten Liposomensuspensionen	S. 58
Tab. 5	Verkapselungseffizienzen (VE) der nach den unterschiedlichen Methoden hergestellten, mit R6G beladenen Liposomen	S. 59
Tab. 6	prozentuale Farbstoffwiederfindung nach Verneblung der mit R6G beladenen Liposomen mit dem Aeroneb [®] Solo	S. 60
Tab. 7	Verkapselungsraten (VR) der nach unterschiedlichen Methoden hergestellten, mit R6G beladenen Liposomen nach Herstellung und nach Verneblung	S. 60
Tab. 8	Medianer Volumendurchmesser (VMD) und geometrische Standardabweichung (GSD) der mit R6G beladenen Liposomen nach Extrusion und nach Verneblung mit dem Aeroneb [®] Solo	S. 62
Tab. 9	Bei der Verneblung der Liposomen untersuchte Parameter im Vergleich zur Verneblung von NaCl (MW \pm SD). MMAD: medianer aerodynamischer Massendurchmesser; GSD: geometrische Standardabweichung. Die p-Werte zur Benennung der Signifikanz der jeweiligen Methode im Vergleich zu NaCl sind in runden Klammern angegeben.	S. 63
Tab. 10	Prozentuale Wiederfindung von Sildenafil in Eppendorf-Reaktionsgefäßen nach Inkubation bei 37 °C, bezogen auf die in der eingesetzten Lösung gemessene Sildenafilkonzentration	S. 66
Tab. 11	Prozentuale Wiederfindung von Sildenafil in Falcon Tubes bei verschiedenen Temperaturen, bezogen auf die sofort nach Zugabe ins Gefäß gemessene Sildenafilkonzentration	S. 66
Tab. 12	Sildenafilkonzentrationen der gepufferten Elektrolytlösung vor Schlauchzugabe	S. 67

Tab. 13	Prozentuale Wiederfindung von Sildenafil bei Inkubation von Schlauchstücken aus unterschiedlichen Materialien in Sildenafillösungen. Die prozentuale Wiederfindung bezieht sich auf die vor Schlauchzugabe im jeweiligen Gefäß gemessene Sildenafilkonzentration.	S. 67
Tab. 14	Prozentuale Wiederfindung (MW \pm SD) von Sildenafil bei Zirkulation der Sildenafillösungen in einem Schlauchsystem aus C-FLEX [®] Clear Schlauch. t = -2 min: Sildenafilkonzentration in der Lösung vor Befüllen des Schlauchsystems	S. 70
Tab. 15	Charakterisierung der mit Sildenafil beladenen Liposomen (MW \pm SD, n=5). VMD: medianer Volumendurchmesser; GSD: geometrische Standardabweichung. Die p-Werte im Vergleich zu den jeweiligen Daten nach Herstellung sind in runden Klammern angegeben.	S. 71
Tab. 16	Verneblereigenschaften (MW \pm SD) von MicroSprayer [®] und Pari LC Sprint [®] Star. MMAD: medianer aerodynamischer Massendurchmesser; GSD: geometrische Standardabweichung	S. 74
Tab. 17	Bestimmung des Outputs (MW \pm SD) aus dem MicroSprayer [®] bei der Verneblung von Aqua dest. und Liposomen	S. 74
Tab. 18	Gesamtsildenafilgehalte ($\mu\text{g/ml}$) in den in vitro Freisetzungsversuchen	S. 76
Tab. 19	Sildenafilkonzentrationen im Perfusat nach Verneblung von freiem Sildenafil in das Modell der isolierten Kaninchenlunge	S. 79
Tab. 20	Sildenafilkonzentrationen im Perfusat nach Verneblung von liposomal verkapseltem Sildenafil in das Modell der isolierten Kaninchenlunge	S. 79
Tab. 21	Verteilung des Sildenafil im Modell der isolierten Kaninchenlunge nach Verneblung von freiem bzw. liposomal verkapseltem Sildenafil (MW \pm SD, jeweils n=4)	S. 81
Tab. 22	Verkapselungseffizienzen von DPPC : CH - Liposomen für CF, Iloprost und R6G	S. 96

8.4 Materialverzeichnis

8.4.1 Substanzliste

Acetonitril	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Braunoderm [®]	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Aqua dest. (<i>Aqua Ecotainer[®]</i>)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Butylparaben (<i>Butyl 4-Hydroxybenzoate</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Chloroform	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Cholesterol	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Dipalmitoyl-Phosphocholin (<i>DPPC</i>)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Elektrolytlösungen (<i>1/3 und IIN</i>)	Serag Wiessner, Naila, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylacetat	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
HCl (<i>1 mol/l; 1 N</i>)	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Helium	Linde Gas, Leuna, Deutschland
Heparin 25000 I.E	ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Isotone Kochsalzlösung (<i>0,9 %</i>)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Ketamin 10 %	bela-pharm GmbH & Co. KG, Vechta, Deutschland
Methanol	Avantor [™] Performance Materials B.V, Deventer, Niederlande
NaOH	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogen- carbonat (<i>1 molar 8,4 %</i>)	Serag-Wiessner, Naila, Deutschland
normoxisches Gasgemisch (<i>21% O₂, 5.3% CO₂, 73.7% N₂</i>)	Linde Gas, Leuna, Deutschland
PBS-Puffer pH 7,4	80,0 g NaCl Karl Roth, Karlsruhe, Deutschland 2,0 g KCl Merck, Darmstadt, Deutschland 11,5 g Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O Merck, Darmstadt, Deutschland

	2,0 g KH ₂ PO ₄ Merck, Darmstadt, Deutschland
Phosphatpuffer für HPLC	4,0826 g KH ₂ PO ₄ (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) in 1 Liter Aqua dest.
Rodamin 6G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Sildenafil	AK Scientific, Inc., USA und bioKEMIX, Hazel Grove, Großbritannien
Stickstoff 4.6	Linde Gas, Leuna, Deutschland
Xylazin 2 %	Veva Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Xylocain [®] 1 %	AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland

8.4.2 Geräteliste

Aeroneb [®] Solo	Aerogen, Dangan, Galway, Ireland
automatischer Probengeber (<i>Smartline Autosampler 3900</i>)	Knauer, Berlin, Deutschland
Beatmungspumpe (<i>cat/ rabbit Ventilator</i>)	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
beheizbarer Magnetrührer (<i>Heidolph MR 3002</i>)	Heidolph Instruments GmbH und Co KG, Schwabach, Deutschland
elektromechanische Druckumwandler (<i>Combitrans</i>)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Extruder (<i>LiposoFast</i>)	Avestin, Ottawa, Kanada
Feinwaage (<i>Mettler H20T</i>)	Mettler Toledo; Mettler Waagen GmbH, Gießen, Deutschland
Fluoreszenzreader (<i>Synergy 2</i>)	BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA
Gewichtsschreiber (<i>Rikadenki R 50 Series</i>)	Rikadenki Electronics, Freiburg, Deutschland
HPLC-Anlage (<i>Agilent 1100</i>)	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Laserdiffraktometer	Sympatec, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland
Magnetrührer (<i>IKA[®] Model Big Squid</i>)	IKA [®] -Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Messverstärker (<i>Plugsys DBA 660</i>)	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland

MicroSprayer [®] (<i>Model IA-1B</i>)	Penn-Century, Inc., Pennsylvania, USA
Pari LC Sprint [®] Star	PARI GmbH, Starnberg, Deutschland
Perfusor (<i>Injectomat S</i>)	Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland
Peristaltikpumpe (<i>Roller Pump BP 742</i>)	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
pH/ Blood Gas Analyzer (<i>RAPIDLAB 348</i>)	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Deutschland
pH-Meter (<i>Labor- pH-Meter 766 Calimatic[®]</i>)	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Rotationsevaporator (<i>Büchi Rotavapor R-114</i>)	Büchi, Flawil, Schweiz
Rüttelplatte (<i>TopMix FB15024</i>)	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Schwenktisch (<i>Nutating Mixer</i>)	VWR international, Löwen, Belgien
Staubsauger (<i>Miele S 6350 Compact</i>)	Miele & Cie. KG, Gütersloh, Deutschland
Tischzentrifuge (<i>Mikro 200 R</i>)	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Ultraschall-Bad (<i>Bandelin Sonorex Digitec DT 52 H</i>)	Badelin electronic, Berlin, Deutschland
Vakuumpumpe (<i>Membran-Vakuumpumpe MD 1C</i>)	Vacuumbrand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
Vortexer (<i>Lab dancer S40</i>)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Waage (<i>Analysenwaage Modell ALJ 220-4NM</i>)	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommen, Deutschland
Wägezelle (<i>Typ U1</i>)	Hottinger Baldwin Messtechnik, Deutschland
Wärmeregler (<i>Thermomix BU</i>)	Braun, Melsungen, Deutschland
Wärmeschrank (<i>IR 1500</i>)	Flow Laboratories, Irvine, Großbritannien
Wärmeschrank (<i>Thermo Scientific Heraeus Function Line, Typ UT 12</i>)	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland

Wasserbad Büchi, Flawil, Schweiz
(*Büchi Waterbath B-480*)

8.4.3 Verbrauchsmaterialien und sonstiges

Aerosolfilter TeleFLEX Medical, High Wycombe, Großbritannien
(*ISO-Gard[®] Filter S*)

Dreivegehähne B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
(*Discofix[®] C*)

Einmalhandschuhe B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
(*Vasco[®] Nitril white*)

Einmalspritzen B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Eppendorf-ReagiergefäÙe Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
(*1,5 ml*)

Falcon Tubes Becton Dickinson Labware
(*Blue Max[®] Polypropylene Conical Tube, 50 ml*)

Filter Pall Biomedical Inc., Fajardo, USA
(*Pall[®] Cardioplegia Plus[®] 0,2 µm*)

GlasgefäÙe Schott AG, Mainz, Deutschland
(*Schott Duran[®]*)

Heidelberger Verlängerung B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

HPLC-analytische Säule Merck, Darmstadt, Deutschland
(*LiChroCART[®] 124*4 mm Säule, gefüllt mit LiChrospher[®] 100, RP-18e, 5 µm*)

HPLC-Vorsäule Merck, Darmstadt, Deutschland
(*LiChroCART[®]-Kartusche 4*4 mm, LiChrospher[®] RP-18e, 5 µm*)

Kanülen BD Medical Systemes, Drogheda, Irland
(*BD MicrolanceTM 3*)

Mikrotiterplatte Corning Incorporated, Corning, USA
(*Costar Assay Plate, 96 Well*)

Nadel-Faden-Kombination Ethicon, Norderstedt, Deutschland
(*Mersilene 4, 1 SH*)

Parafilm[®] M Pechiney Plastic Packaging Company, Chicago, USA

Perfusor[®]-Spritzen B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
(*OPS 50 ml*)

Pipetten (<i>Eppendorf Research</i>)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Polycarbonatmembran (400 nm)	Avestin Europe GmbH, Mannheim, Deutschland
Schläuche	
- <i>C-FLEX</i> [®] , <i>Clear C-FLEX</i> [®] , Cole-Parmer [®] Instrument Company, Illinois, USA <i>C-FLEX</i> [®] <i>MasterFLEX</i> (Pumpenschlauch)	
- Polyurethan, PTFE	LIQUID-scan GmbH & Co.KG, Überlingen, Deutschland
Venenpunktionsbesteck (Ecoflo [®])	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen, Deutschland

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Ein herzliches Dankeschön gebührt meiner Erstbetreuerin, Fr. Prof. Dr. Kerstin Fey, für die angenehme und hilfreiche Zusammenarbeit und die konstruktiven Diskussionen, vor allem in der Endphase der Arbeit. Danke auch für das in mich gesetzte Vertrauen.

Hr. Prof. Dr. Werner Seeger danke ich für die Überlassung des Promotionsthemas und für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen.

Zu danken habe ich weiterhin der Arbeitsgruppe Schmehl/ Gessler. Dabei gilt mein Dank im Einzelnen

- Thomas, Tobias und Moritz für die fachliche Unterstützung (danke, Thomas, für „Alles wird gut.“!)
- Helene für ihre unendliche Geduld und die viele praktische Hilfe
- Katharina für immer wieder leckere Aufmunterung in Form von Kuchen oder Schokolade
- Julia für die vielen lustigen Stunden, die wir zusammen im Labor verbracht haben
- allen anderen aus unserer AG und dem Labor, die ich hier nicht alle namentlich erwähnt habe.

Ein riesiges Dankeschön geht – last but not least – an alle Freunde und an meine Familie, die mich während der Bearbeitungszeit mit ihren Höhen und Tiefen unterstützt und motiviert haben. Dabei danke ich vor allem Armand, der es auch in schwierigen Phasen immer wieder geschafft hat, mich zum Durchhalten zu ermutigen; Danke für Deine Geduld!

ERKLÄRUNG

Ich erkläre: „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

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

ISBN: 978-3-8359-5933-0



9 783835 959330