Der Einfluss von Nanopartikelstabilisatoren auf die Flüssigkeitszerstäubung mittels Druckluft-, Ultraschall- und Lochmembranverneblern

Inaugural dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

> vorgelegt von Kleimann, Pia aus München

> > Gießen 2014

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. Werner Seeger

- 1. Gutachter: Prof. Dr. W. Seeger
- 2. Gutachter: Prof. Dr. J. Schneider

Tag der Disputation: 4.11.2014

Inhalt:

1. Einleitung

2. Grundlagen

- 2.1. Verneblung von Flüssigkeiten mit unterschiedlichen Verneblern
 - 2.1.1. Definition und Eigenschaften von Aerosolen
 - 2.1.2. Aerosolerzeugung mittels Düsenvernebler (Pari LC Star®)
 - 2.1.3. Aerosolerzeugung mittels Ultraschallvernebler (Optineb[®]-ir)
 - 2.1.4. Aerosolerzeugung mittels Mikropumpenvernebler (Aeroneb®Pro)
- 2.2. Aerosoldeposition in der menschlichen Lunge
- 2.3.Polymere Nanopartikel als Trägersysteme für Medikamente zur pulmonalen Applikation
- 2.4. Nanopartikelstabilisierungsmaßnahmen

3. Material und Methoden

- 3.1. Chemische Substanzen
- 3.2. Herstellung von polymeren Nanopartikeln
- 3.3. Charakterisierung der Nanopartikel mittels dynamischer Lichtstreuung
- 3.4. Visualisierung der Nanopartikel mittels Rasterelektronen- und Rasterkraftmikroskopie
- 3.5.Lyophilisation der Nanopartikel
- 3.6. Verneblungsexperimente
- 3.7. Bestimmung der Verneblerausstoßrate
- 3.8. Aerosolpartikelgrößenbestimmung mittels Laserdiffraktometrie
- 3.9. Temperaturbestimmung der Flüssigkeit im Verneblerreservoir während der Verneblung
- 3.10. Konzentrationsbestimmung der Flüssigkeit im Verneblerreservoir während der Verneblung mittels eines internen Standards
- 3.11. Bestimmung der Dichte
- 3.12. Bestimmung der Viskosität

- 3.13. Bestimmung der Oberflächenspannung
- 3.14. Auswertung der dynamischen Viskosität und der Oberflächenspannung nach Eötvös und Arrhenius-Andrade
- 3.15. Statistische Auswertung

4. Ergebnisse

- 4.1. Eigenschaften der Nanopartikel
 - 4.1.1. Zustand der Nanopartikel vor der Gefriertrocknung
 - 4.1.2. Zustand der Nanopartikel nach der Gefriertrocknung mit und ohne Zusatz von Stabilisatoren
- 4.2. Einfluss der eingesetzten Stabilisatoren auf die Verneblungseigenschaften
 - 4.2.1. Massenausstoß der Vernebler für unterschiedliche Stabilisatorlösungen
 - 4.2.2. Partikelgrößen der durch unterschiedliche Vernebler erzeugten Aerosole
 - 4.2.3. Temperaturverlauf im Verneblerreservoir während der Verneblung
 - 4.2.4. Konzentration der Stabilisatorlösungen im Verlauf des Verneblungsexperimentes
 - 4.2.5. Dichte der Stabilisatorlösungen im Verlauf des Verneblungsexperimentes
 - 4.2.6. Viskosität der Stabilisatorlösungen im Verlauf des Verneblungsexperimentes
 - 4.2.7. Oberflächenspannung der Stabilisatorlösungen im Verlauf des Verneblungsexperimentes
 - 4.2.8. Auswertung der Oberflächenspannung und der dynamischen Viskosität in Abhängigkeit von der Temperatur

5. Diskussion

- 5.1.Einfluss der Gefriertrocknung und des Einsatzes der Stabilisatoren auf die Eigenschaften der Nanopartikel
- 5.2.Einfluss der eingesetzten Stabilisatoren auf den Massenstrom und die Aerosolpartikelgrößen
- 5.3.Einfluss der Temperatur- und Konzentrationsänderung der Stabilisatorlösungen auf ihre Dichte, Viskosität und Oberflächenspannung (in Abhängigkeit vom Verneblerdesign)

5.4. Einfluss der physikochemischen Parameter auf die Aerosoleigenschaften

- 6. Schlussfolgerung
- 7. Ausblick
- 8. Zusammenfassung
- 9. Summary
- 10. Abkürzungsverzeichnis
- 11. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis
- 12. Quellenangaben
- 13. Anhang
- 14. Publikationsverzeichnis

1. Einleitung

Die Lunge des Erwachsenen weist eine Fläche von etwa 75-140m² auf, die direkt mit der Umwelt in Verbindung steht. Sie gehört zu den am stärksten durchbluteten Organen des menschlichen Körpers: Die Alveolen werden mit ca. 5 l Blut pro Minute versorgt (Herold, 2007). Die Dicke der Luft-Blut-Barriere im Alveolarlumen der Lunge beträgt meist weniger als 400 nm (Yang et al., 2008). Diese große potentielle Austauschfläche der Lunge, die intensive Durchblutung und Nähe zum Blutkreislauf stellen ideale Bedingungen für eine rasche Absorption von Medikamenten dar (Scheuch et al., 2006).

Aufgrund dieser Eigenschaften wird die menschliche Lunge als Applikationsort von Medikamenten mit lokaler und systemischer Wirkung immer wichtiger. Zur topischen Therapie von Lungenerkrankungen wird die Inhalation von gelösten Medikamenten oder Pulvern schon länger als Behandlungsform eingesetzt. Bei Asthma werden z.B. gelöstes Salbutamol zur Bronchodilatation oder inhalative Steroide angewandt (Sears et al., 1990).

Aerosolisierte Antibiotika kommen z.B. bei der Therapie der Pneumonie zum Einsatz (Montgomery et al., 1987). Die Therapie der pulmonalen Hypertonie erfolgt unter anderem mit inhalierbarem Iloprost und Treprostinil (Olschewski et al., 1996; Voswinckel et al., 2006).

Aber auch zur systemischen Therapie bestimmter Krankheiten können Medikamente per Inhalation in die Lunge verabreicht werden. So wurde beispielsweise Insulin in inhalierbarer Form zur Anwendung bei Typ I- und Typ II-Diabetes entwickelt (Klonoff, 1999; Cefalu et al., 2001; Quattrin et al., 2004). Die inhalative Therapie dieser Erkrankungen hat viele Vorteile: Die Verabreichungsform ist für die Patienten recht angenehm, da sie nicht invasiv ist. Die Wirkung der Substanzen tritt schnell ein, im Vergleich zu anderen Verabreichungswegen ist die proteolytische Aktivität in der Lunge gering und der First-Pass-Effekt in der Leber wird vermieden (Azarmi et al., 2008). Allerdings ist die Therapie durch pulmonale Verabreichung auch mit vielen Problemen behaftet. Oft wirken die eingesetzten Medikamente nur kurz, was zu zahlreichen Inhalationen pro Tag führen kann (Zeng et al., 1995). Häufige

1

Medikamentenverabreichungen können zu mangelnder Compliance und geringerer Akzeptanz von Seiten der Patienten führen und somit die Therapie gefährden. Außerdem ist die Stabilität vieler Medikamente oder Formulierungen während der Verabreichung nicht immer gegeben. Es kann unter Umständen zur Inaktivierung der Wirkstoffe während oder nach der Verneblung kommen (Scheuch et al., 2006). Ein weiteres Problem ist, dass die Absorption der Wirksubstanzen nicht immer gut kontrolliert werden kann. Sie unterliegt großen Schwankungen und wird von verschiedensten Faktoren beeinflusst. Sehr kleine Proteine und Peptide werden schnell von den lokal vorhandenen Enzymen angegriffen und verdaut, so dass sie ihre Wirkung nicht entfalten können (Baginski et al., 2011; Baginski et al., 2012). Kurze Peptide verweilen nur kurz in den Alveolen und werden sehr schnell in die Blutbahn aufgenommen, was nicht immer erwünscht ist (Patton et al., 1994). Zudem beeinflusst die Ladung der Moleküle, wie stark sie an das Lungengewebe binden und ob die Substanzen somit vornehmlich lokal oder systemisch wirken (Patton und Platz, 2007). Die Pharmakokinetik der in die Lunge eingebrachten Medikamente ist somit teilweise ganz anders als die der oral oder intravenös verabreichten gleichen Wirkstoffe und es kann schlecht vorhergesagt werden, wie schnell, wann und wo die Substanzen wirken.

Aufgrund dieser Unsicherheiten bezüglich der Verfügbarkeit, der Dauer und dem Ort der Wirkung der Substanzen wurde nach Wegen gesucht, mit denen die Wirkstoffe zielgenau in die Lunge appliziert und dann kontrolliert ihre Wirkung entfalten können.

Eine Möglichkeit dazu bietet der Einschluss der Wirksubstanzen in neue Trägermaterialien. In den letzten Jahren wurde das Wissen aus den Materialwissenschaften und der Nanotechnologie genutzt, um neue Carrier-Systeme wie Mikro- und Nanopartikel, Liposomen und mizellare Systeme herzustellen (Pison et al., 2006). Ein ideales Trägersystem sollte einen sicheren Einschluss und eine kontrollierte Freisetzung des Wirkstoffes gewährleisten, lange haltbar sein und natürlich eine geringe Toxizität aufweisen. Polymere, bioabbaubare Nanopartikel sind in dieser Hinsicht als äußerst vielversprechend anzusehen: Sie erhöhen die Stabilität eingeschlossener Medikamente und zeigen zugleich kontrollierbare Freisetzungseigenschaften (Soppimath et al., 2001). Es ist meist unproblematisch, sie in Aerosolform zu überführen, außerdem können mit ihnen bestimmte Zielgewebe genau behandelt und unerwünschte Nebenwirkungen vermieden werden (Rytting et al., 2008).

Es wurde gezeigt, dass Nanopartikel als Trägersysteme für Salbutamol (Rytting et al., 2010) und von Medikamenten zur Behandlung der Tuberkulose (Ahmad et al., 2006) oder Krebs (Mitra et al., 2001) dienen oder auch als Carrier-Systeme für die Gen-Therapie (Dailey et al., 2004) eingesetzt werden können. Bis zum tatsächlichen Einsatz dieser potentiellen Trägersysteme in der Aerosoltherapie müssen jedoch noch einige praktische Probleme gelöst werden. Im Vordergrund steht hierbei die Lagerungsstabilität. Die Herstellung der bioabbaubaren Nanopartikel in wässrigem Medium führt zu physikalischer (Aggregation) und chemischer (Hydrolyse der Polymere, Entweichen der Medikamente aus den Partikeln) Instabilität dieser Trägersysteme. Dies beeinträchtigt demgemäß ihre Lagerungsfähigkeit, was eine der größten Hürden für ihren praktischen Gebrauch darstellt (Abdelwahed et al., 2006a). Dieses Problem macht eine Stabilisierung der Partikel, zum Beispiel durch Gefriertrocknung (Lyophilisation), nötig. Der Prozess aus Gefrieren und Trocknen stellt jedoch auch eine Belastung für die Nanopartikel dar, was zu einer unerwünschten Veränderung ihrer physikochemischen Eigenschaften führen kann (Choi et al., 2004). Es hat sich gezeigt, dass Hilfsstoffe gezielt eingesetzt werden können, um die Nanopartikel während der Lyophilisation zu stabilisieren und in eine feste, lagerungsfähige Matrix einzubetten (Abdelwahed et al., 2006b). Erwünscht ist hierbei, dass die Nanopartikel den Gefrier- und Trocknungsprozess möglichst unverändert überstehen.

Stabilisatoren, die Nanopartikel während der Gefriertrocknung schützen, sind unter den Zuckern, Aminosäuren und Polymeren zu finden. Am häufigsten werden Zucker und Zuckeralkohole wie Glucose, Laktose, Mannitol und Saccharose oder Polymere wie Polyvinylalkohol (PVA) oder Polyethylenglykol (PEG) verwendet. Oft sind hohe Stabilisatorkonzentrationen von über 5% notwendig (Bozdag et al., 2005; Hirsjärvi et al., 2006), um die eingebetteten Naopartikel ausreichend zu schützen.

Es wurden also schon einige Hilfsstoffe mit den gewünschten Eigenschaften zur Stabilisierung von Nanopartikeln bei der Gefriertrocknung identifiziert, allerdings ist über ihren Einfluss auf den Verneblungsprozess bisher nur wenig bekannt. Es ist noch unklar, wie sie sich im Vernebler verhalten und die Eigenschaften des produzierten Aerosols, und damit auch dessen Deposition in der Lunge, beeinflussen.

Ziel dieser Arbeit war es demnach, zunächst die Eigenschaften verschiedener Stabilisatoren während des Verneblungsprozesses in drei Verneblern unterschiedlichen Designs zu untersuchen. Zu den hierbei analysierten Parametern gehörten unter anderem die Temperatur, die Konzentration, die Dichte, die Viskosität und die Oberflächenspannung der Stabilisatorlösungen während der Verneblung. Außerdem war zu zeigen, wie gut die Stabilisatoren die Form und Struktur der Nanopartikel während des Prozesses der Gefriertrocknung schützen können, was mittels dynamischer Lichtstreuung, Rasterelektronen- und Rasterkraftmikroskopie evaluiert wurde. Schließlich wurde noch der Massenausstoß der Vernebler und die Partikelgrößen der Aerosoltröpfchen untersucht, um zu zeigen, welchen Einfluss der Zusatz der Hilfsstoffe auf die Aerosolerzeugung aus den Nanosuspensionen und auf die Aerosoleigenschaften hat.

2. Grundlagen

2.1. Verneblung von Flüssigkeiten mit unterschiedlichen Verneblern

2.1.1. Definition und Eigenschaften von Aerosolen

Ein Aerosol ist als ein disperses System, bestehend aus Partikeln und einem Trägergas, definiert. Man unterscheidet zwischen Rauch/Stäuben und Nebel: Rauch und Stäube bestehen aus festen Partikeln und dem Trägergas, wohingegen ein Nebel aus flüssigen Partikeln (Tröpfchen) und einem Trägergas zusammengesetzt ist. Aerosole lassen sich nach der Größe ihrer Partikel unterscheiden: Aerosole, die Partikel gleicher Größe enthalten, heißen monodispers, Aerosole mit Partikeln unterschiedlicher Größe werden als polydispers bezeichnet (Gessler, 1999).

2.1.2. Aerosolerzeugung mittels Düsenvernebler (Pari LC Star®)

Düsenvernebler (Kompressorvernebler) zerstäuben Flüssigkeit durch Pressluft, die auf die zu vernebelnde Flüssigkeit geleitet wird.

Im PariBoy LC Star[®]-Vernebler (Pari GmbH, Starnberg, Deutschland) wird durch einen elektrischen Kompressor Pressluft erzeugt und durch eine enge Düse (Venturi-Düse) geleitet. Hinter der Venturi-Düse (Durchmesser $\approx 420 \,\mu$ m), wo die Pressluft austritt, entsteht ein Unterdruck, der die Flüssigkeit aus dem Reservoir durch zwei Kapillaren (Durchmesser $\approx 960 \ \mu m$) ansaugt (Bernoulli-Effekt) (Bridges und Taylor, 2000). Die angesaugte Flüssigkeit wird durch das Gas in feine Tröpfchen zerteilt. Hinter der Düse befindet sich eine Prallplatte, auf die die Tröpfchen treffen und zusätzlich zerkleinert werden. Ein kleiner Anteil der produzierten Aerosoltröpfchen verlässt den Vernebler sofort, während der verbleibende Anteil an großen, nicht-respirablen Tropfen an der Prallplatte oder den Wänden des Verneblers impaktiert und dann zurück in das Flüssigkeitsreservoir gelangt (McCallion et al., 1996a).

Das Aerosol, das den Vernebler verlässt, vermischt sich mit der Raumluft und wird durch ein Mundstück inhaliert. Die Partikelgrößen dieses "sekundären" Aerosols werden durch die Prallplatten im Vernebler, Aggregation der Tropfen, Verdunstung und Kondensation noch einmal stark verändert. Da ein starker Luftstrom durch den Vernebler hindurchgeleitet wird, verdunstet relativ viel Flüssigkeit. Durch die Verdunstung ist die austretende Luft mit Wasserdampf gesättigt und das Gerät kühlt sich im Verlauf durch die Verdunstungskälte ab, so dass ein recht kühles Aerosol von 10-15°C inhaliert wird. Die Temperatur des Aerosols wird außerdem von der Raumtemperatur und der Ausgangstemperatur der vernebelten Flüssigkeit beeinflusst und kann zusätzlich durch Vorheizen der Flüssigkeit oder des Verneblers verändert werden (Stelliou et al., 1993). Durch die niedrige Temperatur der Flüssigkeit kann die Löslichkeit der darin vorhandenen Medikamente beeinträchtigt werden, z. B. bei Mucolytika (Taylor et al., 1992), außerdem erhöhen sich Viskosität und Oberflächenspannung der Flüssigkeit. Die Verdunstung während der Verneblung führt außerdem zu einer Steigerung der Konzentration der gelösten Medikamente in der Reservoirflüssigkeit (O'Callaghan und Barry, 1997). Dieser Effekt kann etwas gemindert werden, indem man statt Raumluft wasserdampfgesättigte Luft durch den Vernebler leitet (Wood et al., 1986). Ein weiterer Nachteil dieses Verneblers besteht darin, dass nicht die gesamte im Reservoir befindliche Flüssigkeit vernebelt wird, sondern meist etwa 1 ml Rückstand im Vernebler verbleibt (Kleemann et al., 2004). Der mediane aerodynamische Massendurchmesser für Aerosole des PariBoy LC Star[®] wird mit 2,2 µm angegeben (http://www.pari.de).



Abb. 1: Pari-LC-Star[®]-Vernebler (Quelle: http://www.pari.de)

2.1.3. Aerosolerzeugung mittels Ultraschallvernebler (Optineb[®]-ir) Der Optineb®-ir-1,6 MHz-Vernebler (NEBU-TEC, Elsenfeld, Deutschland) stellt ein typisches Beispiel für einen Ultraschallvernebler dar. Bei Ultraschallverneblern werden hochfrequente elektrische Schwingungen über einen piezoelektrischen Kristall in mechanische Schwingungen umgewandelt. Das vibrierende Piezoelement überträgt die Schwingungen auf die zu vernebelnde Flüssigkeit. In Zwei-Kammer-Systemen wie dem Optineb[®]-ir-Vernebler geschieht dies nicht direkt, sondern über destilliertes Wasser, das als Transfermedium in einer Zwischenkammer dient. An der Oberfläche der Flüssigkeit im Medikamenten-Reservoir entsteht durch die Schwingungen eine Art konische Flüssigkeitserhebung, von deren oberem Ende ein Nebel kleiner Tröpfchen emittiert wird (Gessler, 1999). Durch einen Zustrom von Luft durch den Vernebler werden die Aerosoltropfen nach außen transportiert und zur Inhalation zur Verfügung gestellt (Yeo et al., 2010). Zur Erklärung der Entstehung der Aerosoltröpfchen an der Flüssigkeitsoberfläche gibt es zwei Theorien. Die Kapillarwellentheorie beschreibt die Bildung von Kapillarwellen an der Oberfläche von durch Ultraschall angeregten Flüssigkeiten, von deren Spitzen dann kleine Aerosoltropfen abbrechen, wenn die Anregungsenergie hoch genug ist.

Mit der Kavitationstheorie wird die Entstehung von Aerosolen an der Oberfläche von Flüssigkeiten mit der Bildung von hydraulischen Stößen, die durch das Zusammenbrechen von Kavitationsblasen entstehen, erklärt (Taylor und McCallion, 1997). Die produzierten Partikelgrößen sind umgekehrt proportional zur eingesetzten akustischen Frequenz (O'Callaghan und Barry, 1997). Auch beim Ultraschallvernebler impaktieren die größeren Partikel auf Prallplatten innerhalb des Gehäuses des Verneblers. Es besteht die Möglichkeit, beim Optineb®ir-Vernebler verschiedene Prallplatten zur Erzeugung verschiedener Partikelgrößenverteilungen einzusetzen. In dieser Arbeit wurde stets die blaue Prallplatte verwendet, für die ein MMAD von 3,3µm für 0,9% NaCl angegeben wird (http://www.nebu-tec.de). Während der Verneblung erhöht sich die Temperatur der Flüssigkeiten im Vernebler (Transfermedium und Flüssigkeit im Medikamentenbecher) um fast 10°C (Kleemann et al., 2007). Hochvisköse Flüssigkeiten können von Ultraschallverneblern nur schlecht aerosolisiert werden, da das Entstehen von stehenden Wellen hier erschwert ist bzw. mehr Energie zu ihrer Erzeugung benötigt wird (Phipps et al., 1990).



Abb. 2: Optineb[®]-ir-Ultraschallvernebler (Quelle:http:// www.nebu-tec.de)

2.1.4. Aerosolerzeugung mittels Mikropumpenvernebler (Aeroneb[®]Pro) Die neueste Methode zur Aerosolisierung von Flüssigkeiten bedient sich der Mikropumpentechnologie, wie sie beispielsweise im Aeroneb[®]Pro-Vernebler (Aerogen, Galway, Irland) verwirklicht ist.

In diesem Vernebler befindet sich das sogenannte OnQTM-Element, das aus einer kuppelförmigen Schwingmembran mit über 1000 kleinen Öffnungen besteht und von einem "Schwingungselement", einem piezoelektrischen Kristall, umgeben ist. Durch das Anlegen von elektrischer Spannung beginnt der piezoelektrische Kristall mit einer Frequenz von 128 kHz zu vibrieren und die Membran wird in eine leichte vertikale Schwingung versetzt (Zhang et al., 2007) Durch die Auf-und-Ab-Bewegung der Schwingmembran um wenige Mikrometer wird die Flüssigkeit durch die feinen Öffnungen extrudiert und es werden Aerosoltröpfchen erzeugt (Elhissi et al., 2007). Es wurde gezeigt, dass Mikropumpenvernebler gut geeignet sind zur Aerosolierung von Suspensionen und auch bei der Verneblung von empfindlichen Strukturen wie z.B. Liposomen eingesetzt werden können (Elhissi et al., 2006; Kleemann et al., 2007) Auch zur Verneblung von Medikamenten bei mechanischer Beatmung lassen sie sich aufgrund ihrer hohen Ausstoßrate und ihrer Zuverlässigkeit gut verwenden (Ghazanfari et al., 2007, Fink et al., 2001). Der durchschnittliche MMAD des produzierten Aerosols liegt laut Aerogen Inc. unter 3 μm.



Abb. 3: Aeroneb[®]Pro-Mikropumpenvernebler (Quelle:http:// www.aerogen.com)

2.2. Aerosoldeposition in der menschlichen Lunge

Der menschliche Respirationstrakt wird funktionell in einen luftleitenden Teil (Nasenhöhle, Trachea, Bronchien und Bronchiolen) und einen gasaustauschenden Anteil (*Bronchioli terminales* und Alveolen) eingeteilt. Die oberen Luftwege liegen extrathorakal und erstrecken sich von der Nasenhöhle über den Pharynx bis zum Kehlkopf, die unteren Atemwege liegen im Thorax und bestehen aus Trachea, Bronchien und Alveolen.

Die Trachea teilt sich an der *Bifurcatio tracheae* auf Höhe des 4. Brustwirbels in einen linken und einen rechten *Bronchus principalis*. Der rechte Hauptbronchus teilt sich, entsprechend der Anzahl der Lappen der Lunge, in drei *Bronchi lobares* auf, der linke Hauptbronchus in zwei *Bronchi lobares*. Die Lappenbronchen teilen sich wiederum in *Bronchi segmentales* (rechts 10, links 9) auf, welche sich dann 6-12 Mal in *Bronchioli* dichotom aufteilen. Die *Bronchioli* können in respiratorisch und nichtrespiratorisch eingeteilt werden. Die *Bronchioli respiratorii* weisen bereits vereinzelt Alveolen in ihren Wänden auf und gehören meist zu den letzten Aufzweigungen der Bronchiolen. Die *Bronchioli terminales* stellen den Übergang zu den *Ductus alveolares* und den *Sacculi alveolares*, die aus mehreren Alveolen bestehen, dar. Der Austausch der Atemgase zwischen Luftraum und Blut erfolgt in den Alveolarwänden (Schiebler, 2005).

Von der Nasenhöhle bis zu den *Bronchioli terminales* sind die Atemwege von einem mehrreihigen Flimmerepithel bedeckt. Dieses besteht vor allem aus Becherzellen, die Schleim produzieren und abgeben und aus Flimmerzellen, die Kinozilien tragen. Der Schlag der Zilien ist rachenwärts gerichtet und transportiert den Schleim und anhaftende Partikel mit einer Geschwindigkeit von ca. 15mm/min. In den *Bronchioli respiratorii* ist das Epithel prismatisch bis kubisch, in den *Ductus alveolares* rein kubisch. Die Alveolaroberfläche besteht zu 95 % aus Pneumozyten Typ I. Die restlichen 5 % werden von Pneumozyten Typ II bedeckt. Die Pneumozyten Typ I liegen eng an ihrer Basalmembran an, die wiederum an die Basalmembran des Endothels der Kapillaren des Alveolarseptums angrenzt. Häufig verschmelzen die beiden Basalmembranen zu einer gemeinsamen. Die Blut-Luft-Schranke besteht also aus dem Epithel der Pneumozyten Typ I, dem Endothel der Kapillaren und ihren Basalmembranen und ist im Durchschnitt nur 2,2 \pm 0,2 μ m dick (Welsch, 2003). Die Pneumozyten Typ II spielen eine wichtige Rolle, da sie Produzenten des *Surfactant* sind und ihn mittels Exocytose in das Alveolarlumen freigeben. *Surfactant* besteht zu 80-90% aus Phospholipiden und zu ca. 10 % aus Protein. Er setzt die Oberflächenspannung der wässrigen Oberfläche der Alveolen erheblich herab (Junqueira und Carneiro, 2005).

Die Deposition von Aerosolen, die durch Inhalation in die Lunge gelangen, wird von zahlreichen Faktoren beeinflusst.

Es müssen die physikalischen Mechanismen, die zur Abscheidung von Partikeln aus einem Trägergas führen, berücksichtigt werden, sowie die Bedingungen, die durch das Atemmuster des Menschen und die Geometrie der Atemwege vorgegeben sind. Außerdem müssen die chemischen Eigenschaften des Partikels bzw. des Medikaments, das appliziert werden soll, beachtet werden (Heyder et al., 1986). Die physikalischen Mechanismen, die im Respirationstrakt vorwiegend die Partikeldeposition beeinflussen, sind Sedimentation, Diffusion und Impaktion (Gessler, 1999). Welcher Depositionsmechanismus jeweils zur Abscheidung des Partikels führt, hängt stark von der Partikelgröße ab (Scheuch, 1997).

Sind die Partikel kleiner als 0,5 µm, so spielt die Diffusion die größte Rolle. Alle Partikel werden ständig von Molekülen des Trägergases angestoßen und bewegen sich somit zufällig im Raum. Diese Bewegung der Partikel wird als Brown'sche Molekularbewegung bezeichnet und ihre Bewegung dadurch im Kollektiv als Diffusion. Je kleiner der Partikel, desto stärker ist der Einfluss des Molekülstoßes auf ihn. Durch Diffusion werden die Teilchen durch das Trägergas transportiert bis sie an eine Wand des Respirationstraktes abgeschieden werden. Mit sinkender Partikelgröße nimmt der Anteil der Diffusion als Depositionsmechanismus zu (Crowder et al., 2003).

Bei einer Größe über 0,5 µm spielt ein anderer Depositionsmechanismus die Hauptrolle. Alle Partikel in einem Gas werden durch die Gravitation beeinflusst, die zu deren Absinken führt. Dieser Mechanismus heißt Sedimentation. Je größer und je schwerer ein Partikel, desto stärker ist der Einfluss der Gravitation. Mit steigender Größe steigt die Sinkgeschwindigkeit eines Partikels und somit seine Depositionswahrscheinlichkeit. Diese erhöht sich auch bei zunehmender Verweildauer im Atemtrakt. Deshalb spielt der Mechanismus der Sedimentation im Nasen- und Rachenraum, wo eine hohe Strömungsgeschwindigkeit vorherrscht und die Teilchen nur kurz verweilen, kaum eine Rolle. In den unteren Atemwegen, besonders in den feinen Strukturen der Alveolen und Bronchiolen, ist die Sedimentation jedoch ein wichtiger Prozess zur Abscheidung, da die Strömungsgeschwindigkeit dort gering und die Räume eng sind (Heyder et al., 1986).

Ab einem Partikeldurchmesser von etwa 3 μ m wird die Impaktion (Trägheitsabscheidung) immer wichtiger. Ändert der Gasstrom seine Richtung, so können größere Teilchen ihm aufgrund ihrer Trägheit schlechter folgen, bewegen sich also abweichend von der Stromrichtung und impaktieren schließlich an den Wänden des Respirationstrakts (Scheuch et al., 2006). Je größer die Partikel und je höher die Flussgeschwindigkeit, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit für die Deposition durch Impaktion. Daraus lässt sich folgern, dass große Partikel (10 μ m und größer) wahrscheinlich schon in den oberen Atemwegen des Nasen-Rachen-Bereichs abgeschieden werden.

Die regionale Verteilung des deponierten Aerosols hängt somit stark von der Partikelgröße und den Atmungsparametern ab. Teilchen mit einem aerodynamischen Durchmesser von 8-10 µm werden vor allem im extrathorakalen Teil der Atemwege, vorwiegend durch Impaktion, abgeschieden (Gonda und Byron, 1978). Aerosolpartikel ab einer Größe von ca. 6 µm werden als lungengängig bezeichnet, erreichen zu 50 % die Luftröhre und die Bronchien und deponieren vorwiegend durch Sedimentation (Gerrity et al., 1979). Partikel mit einem Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD, medianer aerodynamischer Massendurchmesser) von 3-5 µm zeigen eine höhere Deposition im Alveolarbereich und werden als alveolargängig bezeichnet (Stahlhofen et al., 1983). Die maximale alveoläre Deposition wurde bei Partikeln mit einem aerodynamischen Durchmesser von ca. 3µm beobachtet (Groneberg et al., 2003). Teilchen unter 2 µm deponieren auch hauptsächlich in den Alveolen, werden jedoch zum Teil auch wieder ausgeatmet. Partikel, die kleiner als 1 µm sind, werden sogar zu ungefähr 80 % ohne Deposition wieder exhaliert (Heyder und Rudolf, 1984).

Auch das Atemmuster des Patienten, zu dem Atemfrequenz, Atemzugvolumen, Atemfluss und das Inspirations-/Expirationsverhältnis zählen, beeinflusst die Deposition des Aerosols. Sie hat demnach eine hohe intra- und interindividuelle Variabilität (Gonda und Byron, 1978). Weitere Eigenschaften des Aerosols, wie Hygroskopizität, Polydispersität und Ladung der Partikel, spielen ebenfalls eine Rolle (Gonda, 1990). Die Morphologie der Atemwege (variierend z.B. durch Krankheiten wie Mukoviszidose oder COPD, durch Geschlecht oder Alter) und ihre Auswirkung auf die Aerosoldeposition müssen außerdem berücksichtigt werden (Lippmann et al., 1980).

2.3. Polymere Nanopartikel als Trägersysteme für Medikamente zur pulmonalen Applikation

Medikamente, die in wässriger Lösung als Aerosol in die Lunge gelangen, werden oft nur schlecht absorbiert. Sie werden teilweise durch Phagozytose von Makrophagen oder durch proteolytische Spaltung durch Enzyme aus den Clara-Zellen, den Alveolarepithelzellen Typ II oder den Makrophagen eliminiert. In den höheren Atemwegen wird die systemische Aufnahme der Wirkstoffe vor allem durch die Schleimschicht und den mukociliären Transport verhindert (Patton und Platz, 1992).

Um diese Clearance-Mechanismen zu minimieren und eine gezielte Applikation und kontrollierte Freisetzung von inhalierten Medikamenten zu erreichen, werden in letzter Zeit verstärkt bioabbaubare polymere Nanopartikel untersucht. Nanopartikel sind klein genug, um von Makrophagen nicht mehr, dafür aber transepithelial verstärkt aufgenommen zu werden. Man verspricht sich von ihnen eine verzögerte, verlängerte Freisetzung der Wirkstoffe und dadurch eine geringere Anwendungsfrequenz (Sung et al., 2007). Des Weiteren können Nebenwirkungen reduziert und die *Compliance* der Patienten erhöht werden (Mansour et al., 2009).

Nanopartikel, zu denen Nanokapseln und Nanosphärulen gehören, sind feste kolloidale Partikel mit einer Größe zwischen 10 und 1000 nm (Mora-Huertas et al., 2010). Je nach Herstellungsmethode kann zwischen Nanokapseln und Nanosphärulen unterschieden werden. Nanokapseln sind vesikuläre Systeme, in denen der Wirkstoff in einem Hohlraum, der von einer polymeren Membran umgeben ist, eingeschlossen ist (Abdelwahed et al., 2006c). Nanosphärulen hingegen sind Matrixsysteme, in denen der Wirkstoff gelöst auf das gesamte System verteilt vorliegt (Soppimath et al., 2001). Es werden natürliche und künstliche Polymere zur Synthetisierung von bioabbaubaren Nanopartikeln verwendet: Natürliche Polymere wie Albumin, Gelatine, Kollagen, Cyclodextrin oder Chitosan setzen den Wirkstoff relativ schnell frei, wohingegen künstliche Polymere wie Polymilchsäure (PLA), Polyglykolsäure (PGA), Polymilchsäure-co-glykolsäure (PLGA), Polyacrylate oder Polyanhydride die Freisetzung des Wirkstoffes über längere Zeit (Tage bis Wochen) hinauszögern können (Rytting et al., 2008). Der Abbau von PLA- und PLGA-Nanopartikeln ist weitestgehend bekannt. Die Polymere werden im menschlichen Körper hydrolysiert und bilden die biologisch abbaubaren Spaltprodukte Milchsäure und Glykolsäure, die durch den Zitronensäurezyklus eliminiert werden (Rytting et al., 2008). Für diese Arbeit wurden PLGA-Nanopartikel (Nanosphärulen) verwendet. Es gibt verschiedene Methoden zur Herstellung polymerer Nanopartikel. Zum einen können Nanopartikel aus bereits bestehenden Polymeren hergestellt werden, andererseits auch durch die Polymerisierung von Monomeren. Die letztere Technik hat sich als eher nachteilig erwiesen, weshalb hauptsächlich schon bestehende Polymere zur Herstellung verwendet werden (Soppimath et al., 2001). Dabei häufig verwendete Methoden sind die Herstellung mittels "emulsification solvent evaporation", "solvent displacement" und "emulsification-diffusion" (Jung et al., 2000). Die Entscheidung für eine spezifische Herstellungsweise hängt vor allem von den Eigenschaften des einzuschließenden Medikaments (Wasserlöslichkeit), der Applikationsroute und therapeutischen Zielen ab. Die Methode des "solvent displacement" (Nanopräzipitation) wurde zur Herstellung der Nanopartikel für diese Arbeit angewandt.

Bei der Nanopräzipitationsmethode werden die Nanopartikel gebildet, indem eine organische Phase (solvent) langsam unter leichtem Rühren in eine wässrige Phase (non-solvent) injiziert wird. Die organische Phase besteht dabei aus einem organischen Lösungsmittel (meistens Aceton), dem Polymer und der Wirksubstanz und, falls nötig, einem lipophilen Stabilisator wie z.B. Phospholipiden. Die wässrige Phase kann eventuell einen oberflächenaktiven Hilfsstoff enthalten (Quintanar-Guerrero et al., 1998). Die Nanopartikel entstehen spontan bei der Mischung der beiden Phasen und liegen dann in einer kolloidalen Suspension vor. Das organische Lösungsmittel wird dann entfernt, indem man es unter erniedrigtem Druck verdampfen lässt.

13

Bei jeder Art der Herstellung müssen die für das therapeutische Ziel benötigte Wirkstoffkonzentration, die Befreiung der Nanosuspensionen von potentiell schädlichen Lösungsmitteln, Salzen oder Stabilisatoren und die Stabilität der Nanopartikel sichergestellt werden (Mora-Huertas et al., 2010). Durch Variation der Herstellungsparameter lassen sich die physikochemischen Eigenschaften der Nanopartikel, Größe, Oberflächenbeschaffenheit, Verkapselungseffizienz, Freisetzung des Wirkstoffes und Stabilität gezielt beeinflussen. Diese Eigenschaften haben entscheidenden Einfluss auf das Verhalten der Nanopartikel am Depositionsort (Yang et al., 2008, Pilcer und Amighi, 2010).

Die meisten mit den erwähnten Methoden hergestellten Nanopartikel haben eine Größe zwischen 50 und 500 nm (Mora-Huertas et al., 2010) und würden alleine nicht durch Diffusion, Sedimentation oder Impaktion in der Lunge deponiert, sondern zu einem großen Teil wieder ausgeatmet werden. Da somit der Großteil dieser Nanopartikel die Alveolen als Einzelpartikel gar nicht erreichen würde, werden sie entweder aus Suspension oder als mikronisiertes Pulver appliziert. Die produzierten Aerosolpartikel besitzen idealerweise einen MMAD zwischen 1-5 μ m, damit sie die Alveolarregion erreichen können, wo das Medikament seine Wirkung entfalten kann (Yang et al., 2008).

Sobald die Nanopartikel in der Lunge deponiert sind, kommen sie in Kontakt mit der Schleimschicht in den Atemwegen oder der Schicht aus *Surfactant* in den Alveolen und tauchen in diese Oberflächensubstanzen ein (Geiser et al., 2003). Je kleiner der Nanopartikel, desto besser kann er in den *Surfactant*-Film eindringen (Yang et al., 2008).

Die Freisetzungscharakteristik des in den Nanopartikel eingeschlossenen Stoffes hängt von seinen eigenen und den Eigenschaften des Trägersystems ab. Bei Nanosphärulen vollzieht sich die Freisetzung des gleichmäßig verteilten Wirkstoffes durch Erosion der Matrix, worauf dann die Diffusion der freigesetzten Substanz folgt. Für den Fall, dass der Abbau der Matrix nur langsam vonstattengeht, kann die Freisetzung auch direkt durch Diffusion erfolgen (Niwa et al., 1993). In Nanokapseln muss der eingeschlossene Wirkstoff die Polymerhülle passieren, was vorrangig durch Diffusion geschieht (Cai et al., 2008). Der Ablauf dieser Prozesse wird durch eine große Anzahl von Faktoren beeinflusst: Zum einen von den Eigenschaften des eingeschlossenen Wirkstoffes, vor allem der Konzentration, Wasserlöslichkeit, und des Öl/Wasser-Koeffizienten, zum anderen von Eigenschaften der verwendeten Polymere wie Molekulargewicht, Abbaubarkeit und Konzentration. Außerdem wird die Freisetzungsrate von der Herstellungsmethode der Nanopartikel, ihrer Größe und der Dicke der Polymerhülle bestimmt (Mora-Huertas et al., 2010). Schon häufiger wurde bei *in-vitro*-Untersuchungen von Nanokapseln eine Freisetzung in zwei Phasen beobachtet. Dabei folgt auf eine erste Phase der raschen Wirkstofffreisetzung ("burst effect") eine zweite Phase, während der der Wirkstoff nur noch langsam entweicht (Beck-Broichsitter et al., 2009, Govender et al., 1999, Perez et al., 2001).

Hydrophobe Wirkstoffmoleküle mit niedrigem Molekulargewicht werden durch passive Diffusion schnell von den dünnen Alveolarepithelzellen absorbiert (Patton und Byron, 2007), hydrophile Moleküle mit niedrigem Molekulargewicht werden durch aktiven Transport durch spezifische Transporter oder durch tight junctions hindurch aufgenommen (Patton, 1996). Die Aufnahme durch aktiven Transport hängt stark von der regionalen Expression der Rezeptoren und Transporter ab. In den Atemwegen können Moleküle sehr viel schwerer absorbiert werden, da es dort eine viel dickere Epithelschicht aus Zylinderepithelellen gibt (Sung et al., 2007). Nichtlösliche Materialien der Nanopartikel werden durch die mukoziliäre Bewegung Richtung Larynx abtransportiert, durch Makrophagen phagozytiert oder durch Endocytose in Epithelzellen aufgenommen (Groneberg et al., 2003). Um die Verfügbarkeit und Wirkung der aktiven Substanzen in der Lunge zu verbessern, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Die Oberflächeneigenschaften der Nanopartikel spielen eine wichtige Rolle. Hydrophobe und negativ-geladene Nanopartikel werden eher phagozytiert, weshalb man versucht, die Oberflächen der Partikel mit hydrophilen Substanzen zu modifizieren. So wurde z.B. gezeigt, dass mit hydrophilen Molekülen, wie etwa Polyethylenglykol, überzogene Nanopartikel besser vor Makrophagen geschützt sind, weil durch eine hydrophile Oberfläche die Opsonisierung verringert werden kann (Torchilin, 1998; Zweers et al., 2007). Auch mit Cyclodextrin überzogene Nanopartikel sollen weniger stark phagozytiert werden (Soppimath et al., 2001). Substanzen wie Albumin und Lecithin auf/in der Oberfläche der Nanopartikel sorgen dafür, dass die Partikel von Alveolarepithelzellen verstärkt aufgenommen werden und dann in die Kapillaren gelangen (Kato et al., 2003).

15

Allerdings müssen auch die unerwünschten Auswirkungen bestimmter Eigenschaften der Partikel genau beachtet werden. Positiv-geladene Partikel haben eine stärkere inflammatorische Wirkung auf das Lungengewebe und zeigen auch eine vorübergehende systemische Toxizität, was bei negativ geladenen Nanopartikeln nicht gezeigt werden konnte (Harush-Frenkel et al., 2010). Vor allem ultrafeine Partikel (<100 nm) können eine hohe Toxizität aufweisen. Kurzfristig rufen sie eine Entzündungsreaktion in der Lunge hervor (Dailey et al., 2006), langfristig können sie zu Lungenfibrose und Tumoren führen (Oberdörster, 2001), wenn sie nicht von Makrophagen eliminiert werden können, sondern sich im Interstitium oder in Alveolarepithelzellen anreichern.

Außerdem können Nanopartikel durch Endozytose, Transzytose, neuronale, epitheliale oder zirkulatorische Translokation in andere Gewebe transportiert werden, wo ihre genaue Wirkung noch nicht klar ist. Sie können z.B. von der Lunge aus in andere Organe gelangen und dort potentiell Schäden hervorrufen (Donaldson et al., 2005). Auch die intrazelluläre Wirkung von manchen Partikeln ist nicht geklärt, z.B. ob sie an den Mitochondrien oxidativen Stress hervorrufen (Mansour et al., 2009).

2.4. Nanopartikelstabilisierungsmaßnahmen

Wie schon erwähnt, muss die Stabilität und Lagerungsfähigkeit der Nanopartikel gewährleistet werden.

Im Allgemeinen sind Nanopartikel nur schlecht für längere Zeit lagerungsstabil, da sie physikalischen und chemischen Veränderungsprozessen unterliegen. Die Aggregation bzw. Fusion von Partikeln in wässriger Suspension stellt ein Problem dar. Auch Prozesse wie die Hydrolyse der verwendeten Polymere, das Entweichen der aktiven Substanz aus dem Partikel und chemische Reaktionen der eingeschlossenen Medikamente während der Lagerung vermindern die Stabilität deutlich (Abdelwahed et al., 2006c). Obwohl durch die Auswahl geeigneter Polymere, das Einstellen des pH-Werts um 7 und niedrige Temperaturen die Beständigkeit der Nanopartikel verbessert werden kann, müssen weitere Maßnahmen zur Stabilisierung vorgenommen werden. Diese Maßnahmen basieren prinzipiell auf dem Entzug von Wasser aus den Nanopartikelformulierungen. Die trockenen Nanopartikel können dann entweder resuspendiert und mittels Verneblern appliziert werden, oder zu Pulvern gemahlen und mittels Pulverinhalatoren in die Lunge eingebracht werden (Packhäuser et al., 2009, Hinrichs et al., 2006). Methoden zur Stabilisierung von Nanopartikeln sind z.B. Sprührocknen, Sprühgefriertrocknen und Gefriertrocknen. Bei jeder dieser Methoden werden in der Regel Hilfsstoffe benötigt, um die Struktur der Nanopartikel während der Stabilisierungsprozesse nicht zu beeinträchtigen.

Beim Sprühtrocknen wird die Suspension aus Nanopartikeln, Wasser und Hilfsstoff durch eine Düse gepumpt und damit zerstäubt und gemeinsam mit einem erhitzten Trocknungsgas in eine Trockenkammer geleitet. Dort wird der zerstäubten Suspension das Wasser entzogen und es entsteht ein Pulver. Dieses wird dann in einen geeigneten Separator abgeschieden (Sham et al., 2004).

Die Sprühgefriertrocknungsmethode kombiniert Elemente aus den Sprühtrocknungs- und Gefriertrocknungstechniken. Dabei wird die Ausgangssuspension in eine Kammer mit flüssigem Stickstoff hinein zerstäubt und gefroren. Das Wasser wird dann, nachdem die flüssigen Partikel fest geworden sind, durch Sublimation entfernt und man erhält ein Pulver (Mansour et al., 2009). Am häufigsten wird allerdings die Gefriertrocknungsmethode (Lyophilisation) zur Stabilisierung von Nanopartikeln verwendet (Hirsjärvi et al., 2006). Sie besteht aus drei Schritten: Beim Gefrieren soll die gesamte Nanopartikelformulierung in einen festen Zustand überführt werden. Danach erfolgt die Primärtrocknung, wobei das Eis, das beim Gefrieren entstanden ist, bei erniedrigtem Druck durch Sublimation entfernt wird. Abschließend wird adsorbiertes Wasser durch einen Sekundärtrocknungsschritt entfernt (Abdelwahed et al., 2006c).

Der Prozess des Gefriertrocknens stellt für die Nanopartikel eine starke Belastung dar. Der Stress des Gefrierens und des Trocknens kann zur Aggregation und irreversiblen Fusion der Nanopartikel führen, außerdem kann das Entstehen von Eiskristallen die Nanopartikel mechanisch belasten und zu ihrer Destabilisierung beitragen. Deshalb müssen Hilfsstoffe eingesetzt werden, um die Ausgangseigenschaften der Nanopartikel zu erhalten und um für eine akzeptable Lagerungsfähigkeit zu sorgen (Holzer et al., 2009).

Die Hilfsstoffe, die zum Schutz vor dem Stress des Gefrierens (Kryoprotektion) und des Trocknens (Lyoprotektion) eingesetzt werden, erfüllen unterschiedliche Teilaufaufgaben: Sie dienen als Quellstoffe (Hydroxyethystärke, Trehalose, Mannitol, Lactose, Glycin), als Puffer (Phosphat, Tris-HCl, Citrat), können den osmotischen Druck kontrollieren (Mannitol, Saccharose, Glycin, Glycerol) oder die Kollaps-Temperatur verändern (Dextran, Hydroxypropyl-β-cyclodextrin, Polyethylenglykol, Polyvinylpyrrolidon) (Abdelwahed et al., 2006c). Manche dieser Hilfsstoffe haben mehrere Funktionen zugleich und werden dadurch häufiger eingesetzt. Dazu gehören z. B. Glucose, Saccharose, Trehalose, Laktose, Polyvinylalkohol und Polyvinylpyrrolidon. Die meisten Kryo- und Lyoprotektoren bilden eine glasartige Matrix um die Nanopartikel herum, immobilisieren sie und verhindern so ihre Aggregation (Abdelwahed et al., 2006b). Die benötigten Konzentrationen dieser Stabilisatoren sind relativ hoch und betragen bei den Zuckern zumeist 5-20 % (m/v), bei anderen Stoffen wie z.B. Polyvinylalkohol oder Polythylenglykol etwa 1-5 % (m/v) (Bozdag et al., 2005, Saez et al., 2000).

3. Material und Methoden

3.1.Chemische Substanzen

Poly(D,L-Milchsäure-co-Glykolsäure) (PLGA), Resomer® RG502H wurde von Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Deutschland) bezogen. Die Stabilisatoren Saccharose, Glucose, Laktose, Mannitol, Poly(vinyl-pyrrolidon) (PVP) (Mw = 10 kDa), Poly(Vinyl-Alkohol) (PVA) (Mw = 15 kDa), Poly(ethylen-glykol) (PEG) (Mw = 10 kDa) und Pluronic® F68 (Poloxamer 188) wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) erworben.

3.2.Herstellung von polymeren Nanopartikeln

Die PLGA-Nanopartikel wurden mittels Nanopräzipitation hergestellt (Beck-Broichsitter et al., 2010). Für diese Arbeit wurden nur Nanopartikel hergestellt, die nicht mit einem Wirkstoff beladen waren, da hauptsächlich die Eigenschaften der Nanopartikel an sich und der aus ihnen hergestellten Aerosole von Interesse waren. Zuerst wurden dafür 50 mg PLGA in 2 ml Aceton gelöst. Diese Polymerlösung wurde dann mit einer FineJect[®] -Injektionsnadel (0,6 x 30 mm) und einer peristaltischen Pumpe mit einer Förderrate von 10 ml/min in eine wässrige Phase aus 5 ml filtriertem und doppelt destilliertem Wasser, die mit einem Magnetrührer (500rpm) konstant gemischt wurde, injiziert. Bei der Mischung der beiden Phasen diffundiert das organische Lösungsmittel in die wässrige Phase und nimmt dabei Polymermoleküle mit, die immer noch darin gelöst sind. Diese Polymermoleküle stranden dann in der wässrigen Phase, aggregieren und bilden somit Nanopartikel, wenn das Lösungsmittel weiter in das Wasser hineindiffundiert (Galindo-Rodriguez et al., 2004).

Diese Bildung der Nanopartikel kann durch die Unterschiede der physikochemischen Eigenschaften (Viskosität, Oberflächenspannung) der beiden Phasen erklärt werden. Dieser Unterschied der Oberflächenspannungen verursacht Turbulenzen an der Grenzfläche und thermische Ungleichgewichte im System, was zu einer Verwirbelung der Kontaktfläche der beiden Phasen führt. Dadurch reißen kleinste Tröpfchen der organischen Phase von der Grenzfläche ab, durch die Löslichkeit der beiden Phasen diffundiert das organische Lösungsmittel in die wässrige Phase und die Polymere aggregieren und bilden Nanopartikel (Quintanar-Guerrero et al., 1998).

Das Lösungsmittel Aceton wurde dann über 3 Stunden unter vermindertem Druck mittels Verdampfung aus der Suspension entfernt (Rotavapor, Büchi GmbH, Essen, Deutschland).

3.3.Charakterisierung der Nanopartikel mittels dynamischer Lichtstreuung Die Größe und die Größenverteilung der frisch hergestellten Nanopartikel wurde mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) ermittelt.

Diese Methode nutzt das Streuungsmuster von Licht an Partikeln in kolloidalen Suspensionen, um die Größe der Partikel zu bestimmen:

Es wird die Veränderung des Intensitätsmusters von monochromatischem Licht gemessen, das durch eine Suspension aus sehr kleinen Teilchen, die der Brown'schen Bewegung unterworfen sind, geschickt wird (Pecora, 1985). Bei der DLS werden die zu verschiedenen Zeitpunkten ankommenden Photonen mit einem Photonenzählgerät registriert und in einem Korrelator weiterverarbeitet. Mittels der Autokorrelationsfunktion können die Intensitätsfluktuationen quantitativ und zeitaufgelöst errechnet werden. Anhand dieser Informationen wird dann der hydrodynamische Radius der Partikel berechnet. Der Bestimmung des hydrodynamischen Radius mit dieser Methode liegt die Anwendung der Stones-Einstein-Gleichung und die Kenntnis der Viskosität des flüssigen Mediums zugrunde (Holthoff et al., 1996).

Für die Messungen wurde ein Zetasizer NanoZS/ZEN3600 (Malvern Instruments, Herrenberg, Germany) verwendet. Die Proben wurden verdünnt, um Mehrfachstreuung zu vermeiden und bei 25°C vermessen. Um den durchschnittlichen Durchmesser (Z-Ave) der Partikel und die Breite der Gauss'schen Verteilung, die als Polydispersitätsindex (PDI) angegeben wird, zu berechnen, wurde die Software DTS V. 5.10 verwendet. Alle Größenmessungen wurden mindestens 10 Mal wiederholt und die Messungen generell als Triplikate direkt nach der Nanopartikelherstellung durchgeführt.

3.4. Visualisierung der Nanopartikel mittels Rasterelektronen- und

Rasterkraftmikroskopie

Die Morphologie der hergestellten Nanopartikel vor und nach Gefriertrocknung wurde durch Rasterelektronen- und Rasterkraftmikroskopie untersucht. Mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) ist es möglich, Material im Nanometerbereich optisch darzustellen. Von besonderem Vorteil ist, dass man dreidimensionale Bilder erzeugen und so die Topographie und Oberflächenbeschaffenheit unterschiedlichster organischer und anorganischer Materialien beurteilen kann.

In einem REM wird in einer Elektronenquelle ein feingebündelter Elektronenstrahl erzeugt und in einem Raster über die Oberfläche der Probe geschickt. Dies findet im Vakuum statt, um Interaktionen mit den Atomen und Molekülen der Luft zu verhindern. Trifft der Elektronenstrahl auf die Oberfläche der Probe, finden Interaktionen zwischen den Elektronen des Strahls und der Probe statt und es werden unterschiedliche Signale emittiert, deren Detektion Informationen über die Eigenschaften der Probe liefert. Bei der Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit der Probe entstehen unterschiedliche Signalarten: Die Sekundärelektronen liefern speziell Informationen über die Topographie des Probenmaterials und die Rückstreuelektronen können Aufschluss über die Materialzusammensetzung der Probe bieten, da ihre Intensität von der Ordnungszahl des Materials abhängt. Außerdem können noch die charakteristische Röntgenstrahlung oder die Katholumineszenz zur Beurteilung der Probe genutzt werden (Reimer, 2008; Goldstein, 2003).

Für die Untersuchung mit dem Rasterelektronenmikroskop wurde ein Tropfen verdünnter Nanopartikelsuspension auf einen Siliziumträger gegeben. Alle Proben wurden vor der Untersuchung im Vakuum getrocknet und dann mit einer Platinschicht überzogen, wofür ein Gatan Alto 2500 Sputter Coater (Gatan GmbH, München, Germany) zum Einsatz kam. Dieser Trocknungs- und Beschichtungsprozess dient dem Schutz der Proben vor der hohen Energie des Elektronenstrahls und den Vakuum-Bedingungen im REM, die die Struktur der Nanopartikel potentiell zerstören können. Außerdem erhöht die Beschichtung die Leitfähigkeit der Probe. Die Nanopartikel wurden dann mit dem Rasterelektronenmikroskop JSM-7500F (JEOL, Eching, Deutschland) betrachtet. Auch mit dem Rasterkraftmikroskop kann die Oberflächenstruktur von Materialien im Nanometerbereich beurteilt werden. Hier beruht die Bilderzeugung auf dem mechanischen Abtasten der Probe mit einem biegsamen Hebelarm, einem sogenannten Cantilever, auf dem eine feine Messspitze befestigt ist. Der Cantilever mit der feinen Spitze wird über die Probe bewegt, wobei Kräfte, die zwischen dem Probenmaterial und der Messspitze wirken, eine Auslenkung des Cantilevers verursachen. Diese Kräfte zwischen der Probe und der Spitze liegen im Bereich von 10⁻¹¹ und 10⁻⁶ N. Ein Detektor registriert die Auslenkung des *Cantilevers* und kann diese Information in Bilder umwandeln (Blanchard, 1996). Es gibt zwei unterschiedliche Methoden, die Probe zu scannen: Den Kontakt- und den Nicht-Kontakt-Modus. Im Nicht-Kontakt-Modus besteht ein Abstand von 10-100nm zwischen der Probe und der Messpitze und Van-der-Waals-Kräfte, elektrostatische, magnetische und Kapillarkräfte bewirken eine Auslenkung des Hebelarms, welche dann registriert wird und Informationen über die Oberflächenbeschaffenheit des Probenmaterials liefert. Der Nicht-Kontakt-Modus gehört zu den dynamischen Anregungsmodi, d.h. der *Cantilever* schwingt selbst, angeregt durch ein eingebautes Piezoelement, in einer bestimmten Frequenz (meist ist der Schwingkreis so geregelt, dass er in seiner Eigenfrequenz schwingt). Durch die Kraftwirkung zwischen der Probe und dem Hebelarm wird dieser abgelenkt, und seine Schwingfrequenz ändert sich. Diese Frequenzverschiebung wird dann verarbeitet und in Bilder umgewandelt. Im Kontakt-Modus berührt die Messspitze die Probe und Ionen-Abstoßungskräfte lenken sie ab, was die Abbildung des Oberflächenreliefs in hoher Auflösung ermöglicht. Bei dieser Methode muss bedacht werden, dass die Probe durch die Berührung der Messspitze verändert oder zerstört werden kann (Meyer, 1992). Außerdem gibt es noch den Intermittierenden Modus, der dem Nicht-Kontakt-Modus vom Prinzip her ähnlich ist. Allerdings ist hier die Schwingung des Cantilevers so geregelt, dass bei der Annäherung zwischen Probe und Spitze seine

Amplitude etwas höher ist und die Messpitze an jedem Minimum der Schwingung die Probenoberfläche berührt (Giessibl, 2003).

Auch für die Visualisierung mittels Rasterkraftmikroskopie (RKM) wurden Tropfen der Nanopartikelsuspension auf Siliziumträgern aufgebracht und dann für ca. 10 Minuten inkubiert. Daraufhin wurden die Träger mit den Nanopartikeln unter einem Trockenluftstrom getrocknet. Direkt nach dieser Behandlung wurden die Proben mit einem NanoWizard[®] (JPK Instruments, Berlin, Deutschland) im intermittierenden Modus untersucht. Dabei wurden Si₃N₄-Spitzen an I-Type-*Cantilevern* von 230 µm Länge und einer Federkonstanten von 40 N/m (NSC16 AlBS, Micromasch, Tallinn, Estland) verwendet. Die Abtastrate betrug etwa 0,5-1 Hz und war umgekehrt proportional zur Abtastgröße. Die so abgeleiteten Signale wurden dann im *Constant-Height*-Modus analysiert und in Bilder umgewandelt.

3.5.Lyophilisation der Nanopartikel

Die Gefriertrocknung (Lyophilisation) ist die häufigste Methode zur Stabilisierung von Nanopartikeln (Hirsjärvi et al., 2006). Sie besteht aus drei Schritten: Gefrieren (Verfestigung), primäres Trocknen (Sublimation von Eis) und sekundäres Trocknen (Entfernung des ungefrorenen Wassers) (Abdelwahed et al., 2006a). Im ersten Schritt werden die Nanopartikel in Glasbehältern bei meist unter -40°C gefroren. Die ideale Temperatur für den Schritt des Gefrierens liegt unter der Glasübergangstemperatur bei amorphen Formulierungen und unter der eutektischen Kristallisationstemperatur bei Formulierungen in der kristallinen Form, welche durch thermische Analyse ermittelt werden können (Abdelwahed et al, 2006b). Damit die gesamte Suspension in einen festen Zustand überführt wird, muss sie lange genug unter dieser Temperatur gefroren werden. Die Zeit, die dafür verwendet wird, variiert und hängt unter anderem von der Ausgangstemperatur, dem Volumen der Proben und den Gefrierbedingungen ab (Hinrichs et al., 2006, Choi et al., 2004, Quintanar-Guerrero et al 1998).

Im Schritt des primären Trocknens wird das Eis durch Sublimation entfernt. Dabei werden die Proben unter Vakuum gesetzt, was zum Entweichen des Eises durch Sublimation führt. Die Temperatur, bei der dieser Schritt durchgeführt wird, hängt von der Kollaps-Temperatur der verwendeten Formulierung ab. Die Kollaps-Temperatur kann durch Gefriertrocknungsmikroskopie ermittelt werden und ist die Temperatur, bei deren Überschreiten das Produkt während des Gefriertrockungsprozesses seine Struktur verliert und in sich zusammenfällt. Beim primären Trocknen darf die Nanopartikelformulierung also nicht über diese Temperatur hinaus erhitzt werden (Abdelwahed et al., 2006b). Der dritte Schritt heißt sekundäres Trocknen und besteht aus dem Entfernen des im Produkt absorbierten Wassers, das während des Gefrierens nicht zu Eis umgewandelt wurde und somit auch nicht durch Sublimation entweichen konnte. Dieses Wasser kann potentiell einen raschen Zerfall des Produktes bei Lagerung bei Zimmertemperatur verursachen. Nach dem primären Trocknen wird die Temperatur für den zweiten Trocknungsschritt unter noch stärkeren Vakuumbedingungen erhöht, damit das restliche Wasser entweichen kann. Dieser Schritt nimmt einige Stunden in Anspruch und wird meist bei Temperaturen von 25-50°C durchgeführt. Bei der Gefriertrocknung der Nanopartikelsuspensionen wurden verschiedene Zusatzstoffe eingesetzt, die die Stabilität der Nanopartikel während des Prozesses gewährleisten sollten. Diese Zusatzstoffe waren die Zucker Glukose, Laktose, Saccharose und Mannitol, die jeweils in Konzentrationen von 10 % (m/v) zugegeben wurden, Polyvinylalkohol (PVA) und Polyvinylpyrrolidon (PVP) in der Konzentration von 1 % (m/v) und außerdem Polyethylenglycol (PEG) und Pluronic[®] F68 in einer Konzentration von 5 % (m/v).

Nanopartikelsuspensionen mit einer definierten Menge an Nanopartikeln (2 mg/ml) wurden mit den Stabilisatorlösungen gemischt und dann für eine Stunde bei 25°C inkubiert. Dann wurden 1-ml-Proben entnommen und bei -40, -80, and -196°C eingefroren, bevor sie dann in einen Lyophilisator (ALPHA 1-4 LSC, Christ, Osterode, Deutschland) überführt wurden. Der erste Trocknungsschritt wurde bei -40°C und einem Druck von etwa 1,0 mbar über 72 Stunden durchgeführt. Die Sekundärtrocknung erfolgte bei einer Temperatur von 20°C und einem Druck von 0,01 mbar für 24 Stunden.

Nach der Gefriertrocknung wurden die Nanopartikel wieder im ursprünglichen Verhältnis mit destilliertem Wasser vermischt und 2 Minuten lang kräftig gerührt. Um den Zustand der Nanopartikel nach der Lyophilisation mit ihrem Zustand davor zu vergleichen, wurden sie abermals mittels DLS, Rasterelektronen- und Rasterkraftmikroskopie untersucht.

Als Kontrolle wurden Nanopartikel ohne Zusatzstoffe auf die gleiche Weise gefriergetrocknet und mit den gleichen Methoden beurteilt.

3.6. Verneblungsexperimente

In den Verneblungsexperimenten wurden die physikochemischen Eigenschaften der Stabilisatorlösungen, die zur Herstellung der Nanopartikel verwendet wurden, im zeitlichen Verlauf während der Verneblung untersucht. Zum Einsatz kamen hierbei die bereits oben genannten drei Vernebler Aeroneb[®]Pro, Optineb[®]-ir und Pari LC Star[®].

Zu den untersuchten Formulierungen gehörten jeweils die Zuckerlösungen aus Laktose 10 % (w/v), Glucose 10 % (w/v), Mannitol 10 % (w/v) und Saccharose 10 % (w/v), außerdem ein-prozentige (w/v) Lösungen aus Polyvinylalkohol (PVA), Polyvinylpyrrolidon (PVP) und fünf-prozentige (w/v) Lösungen aus Polyethylenglykol (PEG) und Pluronic[®] F68 (Poloxamer 188), die allerdings nicht in allen Verneblern eingesetzt werden konnten. Zum Vergleich wurden alle Verneblungsexperimente auch mit 0,9 % NaCl-Lösung durchgeführt. Zur Herstellung der Lösungen wurde stets destilliertes Wasser verwendet. In den Experimenten wurden die Partikelgrößen des Aerosols, die Temperatur im Verneblerreservoir und die Konzentrationsveränderung in der Reservoirflüssigkeit im zeitlichen Verlauf bestimmt. Die Gesamtverneblungszeit betrug immer zehn Minuten, wobei zu jeder Minute eine Einzelmessung durchgeführt wurde. Außerdem wurde die Ausstoßrate der unterschiedlichen Vernebler bestimmt. Bei allen Verneblern wurde ein Volumen von 6 ml zu vernebelnder Flüssigkeit eingesetzt. Alle Experimente wurden vier Mal wiederholt und der Mittelwert der Einzelmessungen bestimmt.

Aus der Kenntnis der Temperatur der Reservoirflüssigkeit und der Konzentrationen der Stabilisatoren zu den einzelnen Zeitpunkten konnten nun die weiteren Parameter Dichte, Viskosität und Oberflächenspannung für die jeweiligen Messzeitpunkte in den drei Verneblern untersucht werden. Dafür wurden für jede Minute des Verneblungsverlaufs Lösungen mit den zugehörigen Mittelwerten der gemessenen Konzentrationen des jeweiligen Stabilisators hergestellt. Bei den Messungen der Dichte, Viskosität und Oberflächenspannung wurde dann die eingesetzte Lösung auf die dem Zeitpunkt zugehörige Temperatur erhitzt bzw. abgekühlt. Auch diese Messungen wurden für jeden Zeitpunkt jeweils vier Mal wiederholt. So konnte die genaue Entwicklung und Veränderung der physikochemischen Parameter über die Zeit im Verneblerreservoir untersucht werden.

24

3.7.Bestimmung der Verneblerausstoßrate

Die Ausstoßrate des Verneblers wurde bestimmt, indem man den Vernebler nach dem Einpipettieren von 6 ml der Lösungen wog. Das Gewicht wurde registriert, danach erfolgte die Verneblung über genau 10 Minuten. Nach abgeschlossener Verneblung wurde der Vernebler erneut gewogen. Die Differenz der Gewichte entsprach der vernebelten Flüssigkeitsmenge und konnte auch, bei bekannter Verneblungszeit von 10 min, in die Ausstoßrate in g/min umgerechnet werden.

3.8.Aerosolpartikelgrößenbestimmung mittels Laserdiffraktometrie Die Bestimmung der Partikelgrößenverteilung der Aerosolpartikel wurde mittels eines Laserdiffraktometers (HELOS, Sympatec GmbH, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland) durchgeführt. Dieses Gerät besteht aus einem Laser (Helium-Neon-Laser mit λ =632,8 nm), einem Linsensystem zur Strahlaufweitung, einer Messzone, einer Sammellinse (Fourier-Linse) und einem Multielement-Photodetektor, die in dieser Reihenfolge nacheinander angeordnet sind. Die Aerosolpartikel werden vom Licht des Lasers beleuchtet, wodurch hinter dem Aerosol eine charakteristische Verteilung des Lichts entsteht, die dann vom Detektorsystem gemessen und verrechnet wird.

Prinzipiell gibt es vier Vorgänge, die beim Auftreffen von Licht auf Partikeln zu dessen Streuung führen: Beugung, Brechung, Absorption und Reflexion. (Haas, 2002)

Das Prinzip der Laserdiffraktometrie zur Größenbestimmung von Partikeln beruht auf der Theorie *Fraunhofers* über die Beugung von Lichtstrahlen. Diese beschreibt die Abhängigkeit des Beugungsmusters von Licht von der Größe des Partikels, auf die es trifft. Bei großen Partikeln kommt es zu engen Beugungswinkeln und Beugungsringen mit kleinem Durchmesser, bei kleinen Partikeln zu großen Beugungswinkeln und großen Beugungsringen (Keck und Müller, 2007). Die Größe des Beugungswinkels ist also umgekehrt proportional zur Größe des Partikels. Im Laserdiffraktometer entsteht also, abhängig von der Partikelgrößenverteilung, eine charakteristische Intensitätsverteilung des Lichts, die vom Detektor erfasst wird (Gessler, 1999). Die Intensitätsverteilung wird dann mittels des optischen Modells nach *Fraunhofer* in eine Größenverteilung umgerechnet, die der Partikelgrößenverteilung des untersuchten Aerosols entspricht (Mitchell et al., 2006). Die Berechnung der Partikelgröße mittels *Fraunhofer*-Theorie ist geeignet für Partikel über 2 µm, bietet aber auch für kleinere Partikel eine gute Näherung (Röthele et al., 1989).

Eine bessere Berechnung der Partikel im Bereich unter 2µm liefert jedoch die Theorie nach Mie. Diese berücksichtigt die Phänomene der Absorption, Brechung und Reflexion des Lichts und bietet die Möglichkeit zur Auswertung der charakteristischen Intensitätsverteilung auch von sehr kleinen Partikeln. Hierbei müssen jedoch der Brechungsindex und der Absorptionsindex des Probenmaterials bekannt sein (Van de Hulst, 1981). Damit die Auswertung nach Mie in den Experimenten möglich war, wurden die Absorption und der Brechungsindex aller untersuchten Formulierungen vorher bestimmt (siehe Anhang). Die wichtigsten ermittelten Parameter zur Charakterisierung des Aerosols sind der VMD/MMAD (Volume Median Diameter/Mass Median Aerodynamic Diameter), die geometrische Standardabweichung (GSD) und der Feinpartikelanteil (FPF), definiert als der Anteil der Partikel mit einer Größe unter 5,25 µm. Es kann angenommen werden, dass die Partikel der produzierten Aerosolwolke annähernd logarithmisch-normal verteilt sind (O'Callaghan und Barry, 1997). Der aerodynamische Durchmesser d_{ae} eines Partikels unregelmäßiger Form mit der Dichte ρ_x ist definiert als der Durchmesser einer Kugel mit der Einheitsdichte von 1 g/cm³ und mit dem gleichen Trägheitsverhalten, d.h. der gleichen Endsinkgeschwindigkeit, wie der betrachtete Partikel. Zur Berechnung des d_{ae} ist die Kenntnis der Dichte des Partikels notwendig:

$d_{ae} = d_p \sqrt{(\rho_n / \rho_0)}$

wobei d_p den Durchmesser des Partikels, ρ_n die Dichte des Partikels und ρ_0 die Einheitsdichte darstellen.

Es wird angenommen, dass die Aerosoltröpfchen annähernd kugelförmig sind und eine Dichte von 1 g/cm³ haben, so dass der aerodynamische Durchmesser gleich dem physikalischen bzw. geometrischen Durchmesser (Volume Mean Diameter, VMD) ist, der vom Laserdiffraktometer errechnet wird. (Die Dichtemessungen der Stabilisatorlösungen haben zwar ergeben, dass deren Dichte von 1g/cm³ abweichend ist, jedoch in einem so geringen Maß, dass diese Abweichungen in dieser Berechnung vernachlässigt werden können. Die Dichte der verwendeten Lösungen betrug, je nach zugesetztem Stabilisator und Konzentrationsgrad zwischen 0,999 und 1,054 g/cm³.)

Der Median der Volumenverteilung, X50, wurde also dem MMAD gleichgesetzt. Die GSD stellt die Breite der Verteilung dar und wurde nach folgender Formel berechnet

$$GSD = \sqrt{\frac{d_{_{84\%}}}{d_{_{16\%}}}}$$
 .

Hierbei stellt d_n den Durchmesser der Partikel auf der Perzentile n der Gesamtverteilung dar (Clark und Borgström, 2002).

Der jeweils eingesetzte Vernebler wurde mittels eines Stativs so aufgebaut, dass der Aerosolstrahl ca. 1 cm vom Laserstrahl entfernt und in der Mitte der Messzone den Vernebler verließ und den Lichtstrahl somit im 90°-Winkel traf. Damit das erzeugte Aerosol die Messzone schnell durchqueren konnte und sich dort nicht ansammelte, wurde es durch ein ca. 10 cm vom Messbereich entferntes Staubsaugerrohr abgesaugt. Des Weiteren wurde an den jeweiligen Vernebler ein Rohr angebracht, das einen Luftstrom mit der Flussgeschwindigkeit von 10 l/min aus einer Druckluftflasche an das Gerät anschloss. Die Verneblung erfolgte normalerweise 10 min lang, wobei jede Minute eine Messung durchgeführt wurde.

3.9. Temperaturbestimmung der Reservoirflüssigkeit

Die Temperatur der Flüssigkeit im Vernebler wurde mittels eines Data-Logger Thermometers 306 (Conrad Electronic GmbH, Hirschau, Deutschland) gemessen. Dazu wurde der dünne Temperaturfühler des Thermometers so in den jeweiligen Vernebler eingebracht, dass er sich zentral in der Flüssigkeit im Reservoir des Verneblers befand. Im Verlauf der Verneblung wurde die Temperatur jede Minute abgelesen und dokumentiert. Wie bei allen Messungen wurde auch hier Zuluft von 10l/min an den Vernebler angeschlossen. Die Verneblung oder der Verneblungsaufbau wurden durch den Temperaturfühler nicht beeinträchtigt oder verändert. 3.10.Konzentrationsbestimmung der Flüssigkeit im Verneblerreservoir während der Verneblung

Zur Bestimmung der Konzentrationsveränderung der Verneblungslösungen im Reservoir der Vernebler im Verneblungsverlauf von zehn Minuten wurde ein interner Standard (5,(6)-Carboxyfluoreszein (CF)), eingesetzt. Von diesem wasserlöslichen Molekül wurde erwartet, dass es sich während der Verneblung analog zu den ebenfalls wasserlöslichen Stabilisatoren verhält. Aufgrund seiner Fluoreszenz konnte die Konzentration von CF in Proben aus den eingesetzten Lösungen zu festgesetzten Zeitpunkten nach Verneblungsbeginn mittels Fluoreszenzspektroskopie (Synergy HT Multi Mode Microplate Reader, BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) bestimmt werden. Für die Versuche wurde CF, gelöst in 0,1M TRIS-Puffer-Lösung, zu der zu vernebelnden Ausgangslösung in der Konzentration von 2 µg/ml zugegeben. Es wurden dann jeweils 6 ml der erstellten Ausgangslösungen in das Verneblerreservoir eingefüllt und für jeweils 1, 2, 3....10 Minuten vernebelt. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden 100 µl-Proben der Lösungen entnommen und um den Faktor 10 mit 0,1 M TRIS-Puffer-Lösung verdünnt. Um die Anfangskonzentration bestimmen zu können, wurde stets eine 100 µl-Probe aus der jeweiligen Ausgangslösung entnommen und ebenfalls 1:10 verdünnt. Die Verdünnung der Proben erfolgte mit TRIS-Puffer-Lösung, da die Fluoreszenz von CF stark vom pH-Wert abhängig ist und somit für alle Messungen ein pH-Wert von etwa 7,4 erwartet werden konnte (Lahnstein et al., 2008). 100 µl der verdünnten Proben wurden jeweils als Triplikate in eine 96-well-Mikrotiterplatte gefüllt. Unter Einsatz von Filterpaaren mit Exzitations- und Emissionswellenlängen von λ_{ex} : 485nm/20nm und λ_{em} : 530nm/25nm wurden dann die Fluoreszenzintensitäten mit einer Sensitivität von 40 % vom Gerät gelesen und der Mittelwert der 3 Messungen pro Probe automatisch ermittelt. Mit Hilfe einer Eichgerade, die vor jeder Messung für CF-Konzentrationen zwischen 100 und 1000 ng/ml, was dem zu erwartenden Messbereich entsprach, erstellt wurde, konnten die Konzentrationen für die jeweiligen Verneblungszeitpunkte bestimmt werden. Prinzipiell wurden nur Eichgeraden verwendet, die eine hohe Linearität aufwiesen $(R^2 \ge 0.99)$. Die relativen prozentualen Konzentrationen in den Lösungen wurden auf die Ausgangskonzentration zum Zeitpunkt vor der Verneblung bezogen, die als 100 % definiert wurde. Demnach konnte die relative Konzentration von CF zu den einzelnen Zeitpunkten wie folgt berechnet werden:

28

Konz. *CF* [%] = $(c_{CF}(t)/c_{CF}(0)) \cdot 100$,

wobei $c_{CF}(t)$ die Konzentration von CF zum Zeitpunkt *t* und $c_{CF}(0)$ die Konzentration von CF bei Verneblungsbeginn darstellt.

3.11.Bestimmung der Dichte

Die Dichte der verschiedenen Flüssigkeiten wurde mit einem Dichtemessgerät (DMA 4100 M, Anton Paar, Graz, Österreich) mittels der Biegeschwingermethode gemessen. Die Probe wird dabei in ein U-förmiges Glasrohr, das den Messschwinger darstellt, eingefüllt, welches dann elektronisch zur Oszillation in seiner Eigenfrequenz angeregt wird. Die Eigenfrequenz ist abhängig von der eingefüllten Masse und damit von der Dichte der eingefüllten Flüssigkeit, da das Innenvolumen des Biegeschwingers konstant ist (Hradetzky und Sommer, 2002). Durch Messung der jeweiligen Frequenz des Schwingers kann die exakte Dichte der untersuchten Probe errechnet werden (http://www.anton-paar.com). In den vorherigen Versuchen zur Konzentrationsbestimmung war für jede jeweils vernebelte Formulierung für jede Minute (1, 2, 3...10) der Verneblungszeit in den jeweils drei Verneblern die Temperatur und Konzentration der gelösten Substanzen ermittelt worden. Für die einzelnen Zeitpunkte wurden nun Proben mit der zuvor bestimmten Temperatur und Konzentration hergestellt und jeweils die dazugehörige Dichte der Flüssigkeiten gemessen. Es wurden jeweils 4 Einzelmessungen durchgeführt, aus denen dann der Mittelwert errechnet wurde.

3.12.Bestimmung der Viskosität

Wie auch bei den Versuchen zur Dichtemessung wurde die Viskosität für die einzelnen Formulierungen für jede Minute der Verneblungszeit mit definierter, vorher ermittelter, Temperatur und Konzentration, bestimmt. Die Viskosität wurde mit einem Kapillarviskosimeter vom Ubbelohde-Typ (Schott, Mainz, Deutschland) bestimmt. Bei dieser Methode wird die Zeit t gemessen, die ein definiertes Flüssigkeitsvolumen V benötigt, um eine Kapillare mit bekannter Länge l und Radius r bei bekannter Druckdifferenz Δp zu durchströmen. Die kinematische Viskosität v ist dabei direkt proportional zur Durchflusszeit (Akagi, 1930) und kann mit der folgenden Formel berechnet werden:

29

$$v = \eta / \rho = K \Delta t$$
,

wobei *K* die Kapillarkonstante ist. Die Kapillarkonstante wird mir einer Eichmessung einer Flüssigkeit mit bekannter Viskosität vorher bestimmt (Schneider, 2007). Die dynamische Viskosität η ergibt sich dann aus der Formel

 $\eta = \rho v = \rho K \Delta t$

wobei ρ die Dichte der zu messenden Flüssigkeit darstellt. Aus jeweils vier Einzelmessungen wurde abermals der Mittelwert errechnet.

3.13.Bestimmung der Oberflächenspannung

Die Oberflächenspannung wurde mit einem temperaturkontrollierten Tensiometer (EasyDyne K11-Mk3, Krüss, Hamburg, Deutschland) untersucht. Die Lösungen mit den für den jeweiligen Zeitpunkt definierten Konzentrationen wurden im Tensiometer auf die für den Zeitpunkt ermittelte Temperatur erwärmt und die Oberflächenspannung mittels der DuNoüy-Ring-Methode bestimmt. Hierbei wird der DuNoüy-Ring, der von einem horizontalen Hebelarm herabhängt, in die Flüssigkeit eingetaucht und dann die Flüssigkeitsprobe langsam abgesenkt, so dass der Ring Kontakt mit der Flüssigkeitsoberfläche erhält. Danach wird der Flüssigkeitsbehälter weiter abgesenkt, so dass eine Flüssigkeitslamelle unter dem Ring entsteht. Wird die Probe weiter abgesenkt und die Lamelle gedehnt, so wird an einem bestimmten Punkt kurz vor dem Zerreißen der Flüssigkeitslamelle ein Kraftmaximum F_{max} durchlaufen, das vom Gerät gemessen wird (http://www.kruss.de). Bei diesem Kraftmaximum liegt der Kraftvektor genau parallel zur Bewegungsrichtung und der Kontaktwinkel θ beträgt 0°, so dass der Wert von $\cos \theta$ gleich 1 ist. Dabei korreliert die gemessene Kraft F_{max} mit der Oberflächenspannung σ . Die Berechnung der Oberflächenspannung σ erfolgt nach folgender Formel

 $\sigma = F_{max}$ - $F_V / L * \cos \theta$,
wobei F_V die Gewichtskraft des Flüssigkeitsvolumens unterhalb des Ringes und *L* die benetzte Länge des Rings ist. F_V kann durch die Formel

$$F_V = g * V (\rho_1 - \rho_a)$$

ermittelt werden, wobei g die Erdbeschleunigung, V das Volumen der Flüssigkeitslamelle, ρ_1 die Dichte der Flüssigkeit und ρ_a die Dichte der Luft darstellt (Menges et al., 2002).

Auch hier wurden jeweils vier Einzelmessungen durchgeführt, aus denen der Mittelwert ermittelt wurde.

3.14. Auswertung der dynamischen Viskosität und der Oberflächenspannung nach Arrhenius-Andrade und Eötvös

Mit der Gleichung nach Arrhenius-Andrade kann der lineare Zusammenhang des Logarithmus der dynamischen Viskosität η mit dem Kehrwert der Temperatur T beschrieben werden. Die Formel

 $\eta = A * e^{-b/T}$ bzw. $ln \eta = ln A * b/T$

stellt diesen Zusammenhang für Stoffe mit den definierten Konstanten *A* (Andrade-Konstante, festgelegt als die dynamische Viskosität bei $T = \infty$) und b (E_A , R, mit E_A als Aktivierungsenergie und *R* als allgemeiner Gaskonstante) dar (Andrade, 1930). Unter Verwendung dieser Gleichung konnte der Zusammenhang der beiden Parameter linear dargestellt werden. Die einzelnen Werte der Konstanten *A* und der Aktivierungsenergie E_A für die unterschiedlichen Flüssigkeiten wurden mittels linearer Regression errechnet und sind in Tabelle 2 im Ergebnisteil aufgeführt. Auch für die Oberflächenspannung besteht eine lineare Abhängigkeit von der Temperatur. Nach der Eötvös-Gleichung stellt sich diese folgendermaßen dar

 $\sigma V^{2/3} = k \left(T_C \text{-} T \right)$

wobei T_C die kritische Temperatur einer Flüssigkeit und V ihr molares Volumen sind (Eötvös, 1886). k ist eine Konstante und für verschiedene Stoffe unterschiedlich. Der Term $\sigma V^{2/3}$ wird auch als molare Oberflächenspannung σ_{mol} bezeichnet und stellt in der graphischen Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit die y-Achse dar (siehe Ergebnisteil). Eine Auflistung der Werte für k findet sich in Tabelle 3 im Ergebnisteil.

3.15.Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (S.D.) dargestellt, soweit nicht anders angegeben. Statistische Berechnungen wurden mit dem Programm SigmaStat 3.5 (STATCON, Witzenhausen, Deutschland) erstellt. Um statistisch signifikante Unterschiede darzustellen, wurde eine einfache ANOVA (Analysis of variance) mit dem Bonferroni-t-Test durchgeführt. Werte von p < 0.05 wurden als signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1. Eigenschaften der Nanopartikel

4.1.1. Zustand der Nanopartikel vor der GefriertrocknungDie frisch hergestellten PLGA-Nanopartikel wurden mittels DLS, REM und RKM

untersucht. Bei der Messung mittels DLS wurde eine durchschnittliche Größe von 123.3 ± 4.6 nm (Mittelwert \pm S.D., n = 12) und ein Polydispersitätsindex (PDI) von 0.085 ± 0.012 (Mittelwert \pm S.D., n = 12) ermittelt, was einer recht schmalen Größenverteilung entspricht.

Bei der Visualisierung durch REM und RKM konnten sphärische, gut voneinander abgrenzbare Partikel nachgewiesen werden (siehe Abb.4).



800 x 800 nm

Abb.4:Abbildung A zeigt ein Bild frisch hergestellter PLGA-Nanopartikel aufgenommen mit einem Rasterelektronenmikroskop. Der Maßstabsbalken entspricht 1µm.

Abbildung B zeigt ein Bild von PLGA-Nanopartikeln, das mittels Rasterkraftmikroskopie erstellt wurde.

4.1.2. Zustand der Nanopartikel nach der Gefriertrocknung mit und ohne Zusatz von verschiedenen Stabilisatoren

Die gefriergetrockneten Nanopartikel wurden nach dem Lyophilisationsprozess wieder in dem ursprünglichen Verhältnis mit destilliertem Wasser verdünnt und ihre Größe und Größenverteilung mittels DLS und ihre Morphologie mittels Rasterelektronen- und Rasterkraftmikroskopie untersucht. Die Stabilität der Nanopartikel bezüglich ihrer Größe wurde in dem Verhältnis aus der endgültigen Größe *Partikelgröße_f* nach dem Gefriertrocknen, zur ursprünglichen Größe *Partikelgröße_i* vor der Gefriertrocknung, in dem Index *Partikelgröße_f* / *Partikelgröße_i* ausgedrückt. Auch der Polydispersitätsindex PDI wurde in einem Verhältnis PDI_f/PDI_i , der die PDIs nach (PDI_f) und vor (PDI_i) der Gefriertrocknung beinhaltet, dargestellt.

Bei der Gefriertrocknung der NP ohne Zusatz von Stabilisatoren konnte eine Aggregation der Partikel beobachtet werden, die sich in relativ hohen Quotienten aus *Partikelgröße_f*/*Partikelgröße_i* und *PDI_f*/*PDI_i* bemerkbar machte.

Wurden bei der Gefriertrocknung Zusatzstoffe eingesetzt, konnten durchweg kleinere Werte bezüglich der Indices aus und *Partikelgröße*_f/*Partikelgröße*_i und PDI_{f}/PDI_{i} erzielt werden.

Der Einsatz der Zucker Saccharose, Laktose und Glucose (in einer Konzentration von 10% (w/v)) konnte die Aggregation verhindern und es resultierten *Partikelgröße_f/Partikelgröße_i-* und *PDI_f/PDI_i*-Quotienten von nahezu 1. Mit dem Zucker Mannitol (10% (m/v)) konnten allerdings nur

Partikelgröße_f/*Partikelgröße_i*- und *PDI_f*/*PDI_i*-Verhältnisse größer 1 erreicht werden. Beim Zusatz der Polymere PVA, PVP (Konzentration = 1% (m/v)), PEG und Poloxamer 188 (Konzentration = 5% (m/v)) konnten ebenfalls sehr gute *Partikelgröße_f*/*Partikelgröße_i*- und *PDI_f*/*PDIi*-Werte von ~1 erzielt werden. Die Zusatzstoffe konnten also alle in mehr oder weniger großem Ausmaß zum Erhalt der Eigenschaften der Nanopartikel über die Gefriertrocknung hinweg beitragen. Die Werte der Indices *Partikelgröße_f*/*Partikelgröße_i* und *PDI_f*/*PDI_i* der Untersuchungen mit Stabilisatoren unterschieden sich von den Ergebnissen ohne Stabilisatoren signifikant (p < 0.05).

Das Gefrieren der Nanopartikel vor der Lyophilisation auf unterschiedlich tiefe Temperaturen (-40 °C, -80 °C und -196 °C) hatte keinen größeren Einfluss auf die Eigenschaften der Partikel nach Lyophilisation.

Eine Zusammenfassung der Daten ist in der folgenden Abbildung dargestellt.



Abb.5: Stabilität der PLGA-Nanopartikel bei Gefriertrocknung in Gegenwart verschiedener Lyoprotektoren. Sie wird mit den Quotienten *Partikelgrößef/Partikelgrößei* (Verhältnis der endgültigen Größe zur ursprünglichen Größe, Bild A) und *PDIf/PDIi* (Verhältnis des PDI nach Gefriertrocknung zum PDI vor der Gefriertrocknung, Bild B) ausgedrückt. Es kann außerdem der Einfluss der unterschiedlichen Temperaturen, auf die die NP vor der Lyophilisation eingefroren wurden, entnommen werden ((-40 °C (weiße Balken), -80 °C (graue Balken), und -196 °C (schwarze Balken)).

Die gefriergetrockneten Nanopartikel wurden nach Resuspendierung außerdem mittels REM und RKM visualisiert. Es konnten dabei die Ergebnisse, die mittels DLS erzielt worden waren, bestätigt werden. Die Nanopartikel, die mit Hilfe von Zusatzstoffen gefriergetrocknet wurden, zeigten ähnliche Eigenschaften wie die Nanopartikel vor der Lyophilisation (Abb.6).



Abb.6: Bilder des Rastelektronenmikroskops (groß) und des Rasterkraftmikroskops (klein in der Ecke, in stärkerer Vergrößerung) zeigen die Morphologie der resuspendierten Nanopartikel nach Gefriertrocknung unter Zugabe von 10% (m/v) Saccharose-Lösung (A) und Zugabe von 1% (m/v) Polyvinylalkohol (B) als Stabilisatoren. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 1µm.

4.2. Einfluss der eingesetzten Stabilisatoren auf die Verneblungseigenschaften
In den Verneblungsexperimenten wurde der Einfluss, den die bei der
Gefriertrocknung eingesetzten Stabilisatoren auf die Eigenschaften der Flüssigkeiten
und auf die entstehenden Aerosole haben, untersucht. Da diese Zusatzstoffe in
relativ hohen Konzentrationen (zwischen 1-10 % (m/v)) zugegeben wurden, um
befriedigende Ergebnisse bei der Gefriertrocknung zu erreichen, bestand die

Möglichkeit, dass sie die physikochemischen Eigenschaften der zu vernebelnden Flüssigkeiten und der produzierten Aerosole deutlich verändern würden. Da man davon ausgehen konnte, dass die niedrige Konzentration der Nanopartikel in den zu vernebelnden Flüssigkeiten die physikochemischen Parameter derer nur gering verändert, wurden die Formulierungen aus unterschiedlichen Stabilisatoren zunächst ohne Zugabe von NP untersucht. Später wurde als Beispiel eine Formulierung (PVA 1 % (m/v)) mit Nanopartikeln in einer Konzentration von 2 mg/ml versetzt und alle Verneblungsexperimente mit dieser Nanosuspension durchgeführt, um zu zeigen, ob der NP-Zusatz einen Einfluss hat. Für die Verneblungsexperimente wurden die Formulierungen mit einem Düsenvernebler (Pari LC Star[®]), einem Ultraschallvernebler (Optineb[®]-ir) und einem Mikropumpenvernebler (Aeroneb[®] Pro) vernebelt. 0,9-prozentige NaCl-Lösung diente in allen Versuchen als Kontrolle.

4.2.1. Massenausstoß der Vernebler für unterschiedliche Stabilisatorlösungen Der Ausstoß und die Ausstoßrate der drei Vernebler wurden wie oben beschrieben bestimmt. Die höchste Ausstoßrate konnte mit dem Aeroneb[®] Pro erreicht werden: Sie betrug hier im Mittel immer über 470 mg/min. Beim Pari LC Star[®]-Düsenvernebler betrug die Ausstoßrate durchschnittlich zwischen 300 und 370 mg/min, beim Ultraschallvernebler Optineb[®]-ir lag sie zwischen 370 und 460 mg/min. Die Formulierungen aus PEG 5 % (m/v) und Poloxamer 188 5 % (m/v) konnten aufgrund ihrer hohen Viskosität mit dem Mikropumpen- und im Ultraschallvernebler nicht vernebelt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Nanopartikeln zur Stabilisatorlösung aus PVA 1 % (m/v) die Ausstoßrate im Aeroneb[®] Pro-Vernebler nicht beeinträchtigt.

Eine Zusammenfassung der Ausstoßdaten findet sich in Tab.1.

Formulierung	Konzentration	PARI LC STAR [®]	Optineb [®] -ir	Aeroneb [®] Pro
	[% (m/v)]			
NaCl	0.9	0.31 ± 0.01	0.38 ± 0.02	0.47 ± 0.02
Saccharose	10	0.34 ± 0.02	0.43 ± 0.04	0.47 ± 0.02
Glucose	10	0.33 ± 0.01	0.44 ± 0.01	0.49 ± 0.01
Lactose	10	0.33 ± 0.04	0.45 ± 0.02	0.48 ± 0.02
Mannitol	10	0.32 ± 0.02	0.46 ± 0.01	0.48 ± 0.03
PVA	1	0.37 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.48 ± 0.02
PVA+NP	1, 0.2	n.e.	n.e.	0.47 ± 0.02
PVP	1	0.34 ± 0.01	0.45 ± 0.02	0.49 ± 0.02
PEG	5	0.33 ± 0.01	n.v.	n.v.
Poloxamer	5	0.30 ± 0.01	n.v.	n.v.
188				

Tab.1: Die Austoßraten in g/min für die einzelnen Stabilisatorlösungen in den drei Verneblern.

Die Werte sind als Mittelwert \pm S.D. bei n = 4 angegeben.

n.e.: nicht ermittelt

n.v.: nicht vernebelbar

4.2.2. Partikelgrößen der durch unterschiedliche Vernebler erzeugten Aerosole Die Charakterisierung der Aerosole, die durch die drei verschiedenen Vernebler erzeugt wurden, erfolgte mittels Laserdiffraktometrie. Mit dieser Methode konnten der MMAD der Aerosoltröpfchen, die Breite der Größenverteilung (GSD) des Aerosols und die FPF bestimmt werden, die als der Anteil der Partikel festgelegt wurde, der kleiner als 5,25 μm ist.

Die Verneblung der unterschiedlichen Stabilisatorlösungen erfolgte 10 Minuten lang, wobei jede Minute eine Messung stattfand, wodurch die Aerosoleigenschaften auch im zeitlichen Verlauf beurteilt werden konnten.

Der MMAD der Aerosole betrug am Anfang der Verneblung mit dem Pari LC Star[®] zwischen 3.5 ± 0.2 und $4.0 \pm 0.1 \,\mu\text{m}$ (Mittelwert \pm S.D., n = 4), mit dem Optineb[®]-ir zwischen 5.3 ± 0.2 und $5.9 \pm 0.5 \,\mu\text{m}$ (Mittelwert \pm S.D., n = 4), und mit dem Aeroneb[®] Pro zwischen 5.8 ± 0.1 und $6.4 \pm 0.2 \,\mu\text{m}$ (Mittelwert \pm S.D., n = 4). Im Aerosol des Pari LC Star[®]-Düsenvernebler konnte während der Verneblung über 10 Minuten eine leichte Abnahme des MMAD um etwa 0,2 μ m festgestellt werden. Der MMAD des Aerosols des Ultraschallverneblers Optineb[®]-ir blieb über die ersten 7 Minuten der Verneblung hinweg konstant. In den letzten 3 Minuten der Verneblungszeit erfolgte jedoch ein starker Abfall des MMAD um etwa 1 μ m. Im Aerosol des Aeroneb[®] Pro-Verneblers konnte eine langsame, konstante Abnahme des MMAD im zeitlichen Verlauf festgestellt werden, die über 10 Minuten hinweg ~1 μ m betrug.

Die Darstellungen in Abb.7 geben die Entwicklung des MMAD über die Zeit wider.



Abb.7: Der MMAD der aus unterschiedlichen Formulierungen erzeugten Aerosole im zeitlichen Verlauf im Pari LC Star® (A), im Optineb®-ir (B) und im Aeroneb® Pro (C). Alle Werte sind als Mittelwert \pm S.D. bei n = 4 angegeben.

Die GSD in den Aerosolen lag bei allen Verneblern und vernebelten Stabilisatorlösungen zwischen 1,7 und 2,0. Einzig beim Aeroneb[®] Pro-Mikropumpenvernebler konnte über die Zeit von 10 Minuten ein leichter Abfall von 0,1 festgestellt werden. Eine Darstellung der Entwicklung der GSD in den drei Verneblern über die Zeit ist in Abbildung 8 zu finden.



Abb.8: Zeitlicher Verlauf der geometrischen Standardabweichung (GSD) der durch den Pari LC Star[®] (A), Optineb[®]ir (B) und AeronebPro[®] (C) vernebelten Formulierungen. Alle Werte sind als Mittelwert \pm S.D. mit *n* = 4 angegeben.

Die FPF der vom Pari LC Star[®] produzierten Aerosole war am größten. Sie lag stets bei über 70 %. Die FPF beim Optineb[®]-ir war zu Beginn der Verneblung deutlich kleiner bei Werten zwischen 40-50 %, stieg dann aber in den letzten 3 Minuten der Verneblung steil um etwa 15 % an. Beim Aeroneb[®] Pro nahm die FPF über die gesamte Verneblungszeit fast linear zu von etwa 40 % zu Beginn auf über 50 % am Ende (siehe Abb.9).



Abb.9: Die Fine Particle Fraction (FPF, definiert als der Anteil der Aerosolteilchen, der kleiner als 5,25 μ m ist) der Aerosole aus den verschiedenen Formulierungen, produziert durch den Pari LC Star[®] (A), den Optineb[®]-ir (B) und den Aeroneb[®] Pro (C). Die Werte sind dargestellt als Mittelwert±S.D. bei n = 4.

4.2.3. Temperaturverlauf im Verneblerreservoir während der Verneblung Um die Verhältnisse in den Reservoirs der Vernebler beurteilen zu können, wurde die Entwicklung der physikochemischen Eigenschaften der vernebelten Flüssigkeiten untersucht. Dazu gehörte die Bestimmung der Temperatur, der Konzentrationen, der Dichte, Viskosität und Oberflächenspannung im zeitlichen Verlauf.

Die Temperatur in den Reservoirs aller drei Vernebler wurde für die unterschiedlichen Stabilisatoren in jeder Minute der Verneblungszeit von 10 Minuten bestimmt.

Im Düsenvernebler konnte ein deutlicher Temperaturabfall von ~10°C in den ersten 3 Minuten festgestellt werden, der alle der unterschiedlichen Stabilisatorlösungen betraf. In den folgenden 7 Minuten der Verneblungszeit fiel die Temperatur nur noch leicht ab. Im Ultraschallvernebler fand ein starker Temperaturanstieg von ~10°C im Verneblungsverlauf statt. Auch im Mikropumpenvernebler konnte ein Ansteigen der Temperatur beobachtet werden, jedoch in etwas geringerem Ausmaß von ~5°C über 10 Minuten. Die Zugabe von Nanopartikeln zu einer ausgewählten Formulierung (PVA1% (m/v)) veränderte den Temperaturverlauf im Mirkropumpenvernebler Aeroneb[®]Pro nicht.

In Abb.10 sind diese Ergebnisse dargestellt.



Abb.10: Die Temperaturkurven der unterschiedlichen Formulierungen im Pari LC Star[®] (A), im Optineb[®]-ir (B) und im Aeroneb[®] Pro (C). Alle Werte sind als Mittelwert \pm S.D. bei *n* = 4 dargestellt.

4.2.4. Konzentration der Stabilisatorlösungen im Verlauf des Verneblungsexperimentes

Um die Konzentrationsveränderungen der Stabilisatorlösungen während des zeitlichen Verlaufs zu untersuchen, wurde, wie oben beschrieben, 5(6)-Carboxyfluoreszein (CF) als interner Standard verwendet, da er mittels Fluoreszenzspektroskopie quantitativ bestimmt werden konnte. Im Ultraschallvernebler stieg die Konzentration von CF im Verneblungsverlauf stark an: Von einer Anfangskonzentration, die als 100 Prozent festgelegt worden war auf 140.4 \pm 9.3 bis 155.6 \pm 8.8 % (Mittelwert \pm S.D., n = 4) nach 10 Minuten. Auch im Düsenvernebler fand ein Konzentrationsanstieg statt, allerdings etwas weniger stark. Hier wurden am Ende der Verneblung Werte zwischen 118.1 \pm 3.2 und 139.1 \pm 6.6 % (Mittelwert \pm S.D., n = 4) erreicht. Im Gegensatz dazu blieb die Konzentration des CF im Mikropumpenvernebler über die Zeit relativ konstant mit Werten von 98.7 \pm 1.1 – 107.8 \pm 7.6 % (Mittelwert \pm S.D., n = 4) nach der 10-minütigen Verneblung (siehe Abb.11).



Abb.11: Die Verläufe der CF-Konzentration in % in den diversen Stabilisatorlösungen über die Zeit im Pari LC Star[®] (A), im Optineb[®]-ir (B) und im Aeroneb[®] Pro (C). Alle Werte sind als Mittelwert \pm S.D. bei *n* = 4 dargestellt.

Die Zugabe von Nanopartikeln zu einer ausgewählten Formulierung (PVA 1 % (m/v)) beeinflusste die Konzentrationsverhältnisse im Aeroneb[®] Pro-Vernebler nicht, die Konzentration von CF betrug nach Verneblungsende 102.3 ± 7.1 % (Mittelwert ± S.D., n = 4, siehe auch Bild C).

4.2.5. Dichte der Stabilisatorlösungen im Verlauf des Verneblungsexperimentes Die Dichteentwicklung der vernebelten Flüssigkeiten im zeitlichen Verlauf wurde mit einem Dichtemessgerät mit der Biegeschwingermethode bestimmt. Dazu wurden Proben der Stabilisatorlösungen mit den vorher bestimmten Konzentrationen für die einzelnen Zeitpunkte hergestellt und bei der zugehörigen Temperatur gemessen.

Die Dichtewerte der Zuckerlösungen am Anfang der Verneblung betrugen zwischen 1,030 g/cm³ und 1,039 g/cm³. Die Dichte der Polymerlösungen war generell niedriger, nämlich zwischen 1,0004 g/cm³ und 1,0019 g/cm³ bei PVA1% (m/v) und PVP1% (m/v) und bei etwa 1,0006 g/cm³ bei PEG5% (m/v) und Poloxamer188 5% (m/v). Im Verlauf der Verneblung stieg die Dichte der Zuckerlösungen im Pari LC Star[®] um durchschnittlich 0,0096 \pm 0,0015 g/cm³ an, dies entspricht im Mittel 0,92%. Bei den Polymerlösungen aus PVA und PVP nahm sie um durchschnittlich 0,0017 \pm 0,0006 g/cm³ (0,17%) zu und bei den Polymerlösungen aus PEG und Poloxamer188 im Mittel um 0,0043 \pm 0,0005 g/cm³ (0,43%). Im Optineb[®]-ir stieg die Dichte der Zuckerlösungen am stärksten an, nämlich im Mittel um 0,0147 \pm 0,0015 g/cm³, was 1,42% entspricht. Bei den Lösungen aus PVP und PVA nahm sie im Optineb[®]-ir um 0,17% ab.

Im Verneblungsverlauf im Aeroneb[®]Pro konnte eine sehr geringe Abnahme der Dichte der Flüssigkeiten festgestellt werden. Bei den Zuckerlösungen betrug die durchschnittliche Abnahme 0,0014 \pm 0,0006 g/cm³, d.h. 0,14%, bei den Polymerlösungen 0,0013 \pm 0,0002 g/cm³ (0,13%). Die Zugabe von Nanopartikeln zur Formulierung aus PVA 1 % (m/v) beeinflusste die Dichte im Verneblungsverlauf nicht.

4.2.6. Viskosität der Stabilisatorlösungen im Verlauf des Verneblungsexperimentes Die dynamische Viskosität der Stabilisatorlösungen für die einzelnen Zeitpunkte der Verneblung wurde bestimmt, indem Proben mit den vorher ermittelten Konzentrationen bei der jeweilig zugehörigen Temperatur mit einem Ubbelohde-Viskosimeter gemessen wurden.

Für den Düsenvernebler konnte ein deutlicher Anstieg der dynamischen Viskosität im Verneblungsverlauf festgestellt werden (Abb.12, Bild A). Im

Ultraschallvernebler und auch im Mikropumpenvernebler wurden Abnahmen der dynamischen Viskositäten im zeitlichen Verlauf beobachtet (Abb.12, Bild B und C). Die Zugabe von Nanopartikeln zu einer ausgewählten Formulierung (PVA 1 % (m/v)) beeinflusste die Entwicklung der dynamischen Viskosität im Aeroneb[®] Pro-Vernebler nicht (Abb.12, Bild C).

Außerdem wurde beobachtet, dass die Stabiliatorlösungen mit dynamischen Viskositäten von über 2 mPa·s (PEG und Poloxamer 188: 5 % (m/v)) weder mit dem Ultraschall- noch mit dem Mikropumpenvernebler aerosolisiert werden konnten. Für diese Stabilisatorlösungen war eine Verneblung nur mit dem Düsenvernebler möglich.



Abb.12: Entwicklung der dynamischen Viskosität der verschiedenen Flüssigkeiten über die Zeit im Pari LC Star[®] (A), im Optineb[®]-ir (B) und im Aeroneb[®] Pro (C). Alle Werte sind als Mittelwert \pm S.D. bei *n* = 4 dargestellt.

4.2.7. Oberflächenspannung der Stabilisatorlösungen im Verlauf des Verneblungsexperimentes

Auch um die Entwicklung der Oberflächenspannung während der Verneblung zu untersuchen, wurden Proben mit den vorher ermittelten Konzentrationen für die einzelnen Zeitpunkte erstellt und bei den zugehörigen Temperaturen mit einem Tensiometer gemessen.

Generell hatten die Zuckerlösungen höhere Werte für die Oberflächenspannung (über 70 mN/m) als die Polymerlösungen (PVP und PEG: ~60 mN/m; PVA und Poloxamer 188: < 50 mN/m). In den ersten 4 Minuten der Verneblung konnte im Düsenvernebler ein leichter Anstieg der Oberflächenspannung von 2-3 mN/m, je nach Formulierung, festgestellt werden. Danach fand keine bemerkenswerte Veränderung mehr statt.

Im Ultraschall- und im Mikropumpenvernebler konnte eine stetige Abnahme der Oberflächenspannung der Flüssigkeiten beobachtet werden, sie sank bis zum Ende der Verneblung um ~3 mN/m. Durch Zugabe von Nanopartikeln zu der Stabilisatorlösung aus PVA 1% (m/v) wurde die Oberflächenspannung während des für den Aeroneb[®]Pro definierten Temperaturverlaufs nicht verändert (siehe Abb.13, Bild C).



Abb.13: Entwicklung der Oberflächenspannung der verschiedenen Flüssigkeiten über die Zeit im Pari LC Star[®] (A), im Optineb[®]-ir (B) und im Aeroneb[®] Pro (C). Alle Werte sind als Mittelwert \pm S.D. bei n = 4 dargestellt.

4.2.8. Auswertung der Oberflächenspannung und der dynamischen Viskosität in Abhängigkeit von der Temperatur

Da im Aeroneb[®]Pro-Vernebler nur ein Anstieg der Temperatur zu verzeichnen ist und keine nennenswerte Änderung der Konzentration der eingesetzten Flüssigkeiten wie in den anderen Verneblern, eignete sich dieser besonders, um zu zeigen, wie sich die physikochemischen Eigenschaften der Flüssigkeiten speziell in Abhängigkeit von der Temperatur verhalten.

Der nahezu lineare Abfall der Oberflächenspannung bei steigender Temperatur konnte mit der Formel von Eötvös, wie oben beschrieben, gezeigt werden (siehe Abb. 14).

Auch die lineare Abhängigkeit der dynamischen Viskosität einer Flüssigkeit von der Temperatur konnte mit der Gleichung nach Arrhenius-Andrade dargestellt werden. Mit steigender Temperatur fällt demnach die dynamische Viskosität konstant ab (siehe Abb. 14).



Abb.14: Die Graphen illustrieren die Abhängigkeit der Oberflächenspannung (A) und der dynamischen Viskosität (B) von der Temperatur. Im Reservoir des Aeroneb[®]Pro-Verneblers steigt die Temperatur im Verneblungsverlauf an, was eine Abnahme der Oberflächenspannung und der dyn. Viskosität zur Folge hat. Die Geraden stellen die lineare Anpassung der erhobenen Daten mir R^2 > 0,98 dar. Alle Werte sind als Mittelwert ±S.D. bei n = 4 angegeben

Der Zusammenhang zwischen der dynamischen Viskosität und der Temperatur konnte nur unter Kenntnis der Konstanten *A* und *b* der Andrade-Gleichung dargestellt werden. Diese wurden mittels linearer Regression errechnet. Für *A* (dynamische Viskosität bei $T=\infty$) und E_A (bei $b = E_A/R$ mit E_A als Aktivierungsenergie und *R* als allgemeine Gaskonstante) wurden für die verschiedenen Flüssigkeiten Werte zwischen 0,0014-0,0045 mPa·s bzw. 16,2-19,2 kJ/mol ermittelt (siehe Tab. 2)

Formulierung	Konzentration	\boldsymbol{A}	E_A
	[% (m/v)]	[mPa·s]	[kJ/mol]
NaCl	0.9	0.0014 ± 0.0004	16.2 ± 0.7
Saccharose	10	0.0023 ± 0.0003	19.1 ± 1.1
Glucose	10	0.0031 ± 0.0004	18.3 ± 0.6
Lactose	10	0.0045 ± 0.0001	17.8 ± 0.7
Mannitol	10	0.0038 ± 0.0005	18.2 ± 0.4
PVA	1	0.0015 ± 0.0001	17.0 ± 0.1
PVA+NP	1, 0.2	0.0034 ± 0.0006	14.6 ± 0.5
PVP	1	0.0015 ± 0.0002	16.8 ± 0.2

Tab.2.: Andrade-Konstanten für die unterschiedlichen Formulierungen, angegeben als Mittelwert \pm S.D.

Zur Bestimmung des Zusammenhangs zwischen der Oberflächenspannung und der steigenden Temperatur im Aeroneb[®]Pro musste die Konstante *k* der Eötvös-Gleichung bekannt sein. Für diese wurden für die verschiedenen Formulierungen Werte zwischen 1,8-4,6 x 10^{-4} mJ/(K mol^{2/3}) mittels linearer Regression errechnet (siehe Tab. 3).

Formulierung	Konzentration	k
	[% (m/v)]	[·10 ⁻⁴ mJ/(K·mol ^{2/3})]
NaCl	0.9	1.8 ± 0.2
Saccharose	10	3.1 ± 0.4
Glucose	10	2.0 ± 0.1
Lactose	10	3.0 ± 0.3
Mannitol	10	2.8 ± 0.2
PVA	1	4.6 ± 0.6
PVA+NP	1, 0.2	4.3 ± 0.4
PVP	1	3.7 ± 0.3

Tab.3: Eötvös-Konstanten für die einzelnen Formulierungen, angegeben als Mittelwert ± S.D.

5. Diskussion

5.1.Einfluss der Gefriertrocknung und des Einsatzes der Stabilisatoren auf die Eigenschaften der Nanopartikel

Wie in den Experimenten gezeigt werden konnte, verhindern die eingesetzten Stabilisatoren wie Zucker oder wasserlösliche Polymere die Aggregation von Nanopartikeln während der Gefriertrocknung, d.h. sie gewährleisten eine effektive Lyo- und Kryoprotektion. Sie stabilisieren die Nanopartikel und tragen zum Erhalt ihrer Eigenschaften bei, was durch die Größenmessung durch DLS und die Visualisierung mittels REM und RKM belegt werden konnte. Die Gefriertrocknung unter Einsatz von Stabilisatoren ist allgemein als Mittel zur langfristigen Stabilisierung von Nanopartikeln anerkannt und schon häufiger beschrieben worden (Abdelwahed et al. 2006a, Packhäuser et al. 2009).

Die Auswahl der Stabilisatoren hängt hauptsächlich von ihren Eigenschaften bezüglich der Toxizität im menschlichen Körper ab. Zucker sind in dieser Hinsicht oft beschrieben worden und mittlerweile als Zusatzstoffe in Formulierungen zur Inhalation zugelassen. Im Allgemeinen gelten auch hydrophile Polymere mit Molekulargewichten unter 15 kDa als biokompatibel, da sie durch renale Exkretion aus dem menschlichen Körper eliminiert werden können (Pilcer und Amighi, 2010). Wie schon oben beschrieben, sind relativ hohe Stabilisator/Nanopartikel-Verhältnisse von etwa 5/1 notwendig, um die Eigenschaften der Nanopartikel zu erhalten und ihre Redispersion zu ermöglichen (Hirsjärvi et al., 2006). Die Zucker verwandeln sich während des Gefrierens in einen glasigen Zustand, bilden somit eine glasige Matrix um die Nanopartikel herum, immobilisieren sie dadurch und verhindern so die Aggregation. Außerdem schützen sie sie vor dem mechanischen Stress, den Eiskristalle darstellen (Abdelwahed et al., 2006b). Beim Trocknungsschritt bilden sich zwischen den Stabilisatoren und der Oberfläche der Nanopartikel Wasserstoffbrückenbindungen. Dabei schützen die Stabilisatoren die Struktur der Nanopartikel, indem sie als Wasser-Ersatz dienen. Wichtig ist hierbei, dass der Stabilisator in einen amorphen Zustand übergeht, da dies eine maximale Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen erlaubt (Abdelwahed et al., 2006b). Der einzige Zusatzstoff, der weniger befriedigende Ergebnisse in den Experimenten zu dieser Arbeit erzielte, war der Zuckeralkohol Mannitol. Der schlechtere Schutz der Nanopartikel durch diesen Zucker wird durch sein Kristallisationsverhalten während des Gefrierens erklärt. Durch den kristallinen Zustand wird die Ausbildung von Wasserstoffbrücken erschwert, was dann zu einer stärkeren Aggregation der Partikel als bei anderen Zucken führt (Packhäuser et al., 2009).

Die Zusatzstoffe, mit denen der beste Schutz für die Nanopartikel erreicht werden konnte, waren wasserlösliche Polymere.

Der Grund, warum wasserlösliche Polymere die physikochemischen Eigenschaften der Nanopartikel so gut erhalten können, liegt darin, dass sie die NP mit einer oberflächlichen Schicht überziehen können und sie außerdem in einer hoch viskösen Umgebung einschließen (Abdelwahed et al., 2006a).

Natürlich können Nanopartikel auch in verschiedene andere Dosierungsformen, wie z.B. Mikropartikel oder Fasern aus Polymeren überführt werden, um ihre Stabilität zu erhalten (Lebhardt et al., 2011). Für die pulmonale Applikation muss allerdings gewährleistet sein, dass die NP in den Alveolen der Lunge deponiert werden, was hauptsächlich durch die Verneblung von wässrigen Nanopartikelsuspensionen mit adäquaten Aerosolpartikelgrößen gelingt.

5.2.Einfluss der eingesetzten Stabilisatoren auf den Massenstrom und die Aerosolpartikelgrößen

Wie die zugesetzten Stabilisatoren die Menge und die Eigenschaften des produzierten Aerosols beeinflussen, wurde mit der Messung des Ausstoßes der verschiedenen Vernebler und mit der Partikelgrößenmessung mittels Laserdiffraktion bestimmt.

Da die drei verschiedenen Vernebler Aerosole durch sehr unterschiedliche Techniken produzieren, wurden die physikochemischen Eigenschaften der vernebelten Flüssigkeiten auf verschiedene Weise beeinflusst und die Aerosoleigenschaften zeigten unterschiedliche Verläufe über die Verneblungszeit hinweg (wobei besonders beim Ultraschall- und beim Düsenvernebler Änderungen der Eigenschaften beobachtet werden konnten).

Allgemein konnte belegt werden, dass alle drei Vernebler aus allen eingesetzten Stabilisatorlösungen Aerosole produzieren konnten, für die eine Deposition in der Lungenperipherie, wie sie für eine adäquate Medikamentenwirkung notwendig ist, angenommen werden kann (Beck-Broichsitter et al., 2012b). Allerdings muss hinzugefügt werden, dass die Verneblung von PEG 5 % (m/v)- und Poloxamer188 5 % (m/v)-Lösungen im Ultraschall- und im Mikropumpenvernebler nicht möglich war, da sie eine zu hohe Ausgangsviskosität besitzen (Beck-Broichsitter et al. 2012a, Ghazanfari et al., 2007).

Jedoch ist nicht nur die adäquate Verneblung der Stabilisatorlösungen von Bedeutung, sondern auch der Erhalt der NP-Eigenschaften über die Verneblung hinweg und die ausreichende Aufnahme der NP in das Aerosol. Es konnte schon mehrfach gezeigt werden, dass Ultraschallvernebler und Düsenvernebler für diese Anforderungen keine ausreichenden Voraussetzungen bieten: Der Großteil der Partikel aus einer Suspension bleibt hier im Verneblerreservoir zurück oder aggregiert sogar während der Verneblung (Dailey et al., 2003, McCallion et al., 1996b; Beck-Broichsitter et al., 2013). Mikropumpenvernebler bieten bessere Bedingungen für die Verneblung von potentiell empfindlichen Nanostrukturen und werden somit als geeignete Geräte dafür angesehen (Beck-Broichsitter et al., 2009; Elhissi und Taylor, 2005). Deshalb wurde in den Experimenten, in denen Nanopartikel zu einer ausgewählten Stabilisatorlösung zugesetzt und ihr Einfluss auf die Verneblung untersucht wurde, nur der Aeroneb[®]Pro eingesetzt. Als ausgewählte Stabilisatorlösung wurde PVA 1% (m/v) verwendet, da hydrophile Polymere die Nanopartikel mit einer Schicht überziehen und so zusätzlich die Aggregation verhindern (Beck-Broichsitter et al., 2012a). Wie oben bereits beschrieben hatten die NP keinen Einfluss auf die Ausstoßleistung oder die Aerosoleigenschaften der vernebelten Flüssigkeit, da sie die physikochemischen Parameter derer kaum beeinflussen (Ghazanfari et al., 2007). Die Verneblung von Nanopartikelsuspensionen in Mikropumpenverneblern erzielt also insgesamt befriedigende Ergebnisse bezüglich der NP- und Aerosoleigenschaften. Das Verhalten der physikochemischen Parameter der Formulierungen im Verneblerreservoir über die Zeit hinweg ist jedoch von besonderem Interesse, da angenommen wird, dass die Veränderung derer durch die Schwankungen von Temperatur und Konzentration der Flüssigkeiten begründet ist und auch die Eigenschaften des Aerosols beeinflusst.

5.3.Einfluss der Temperatur- und Konzentrationsänderung der Stabilisatorlösungen auf ihre Dichte, Viskosität und Oberflächenspannung (in Abhängigkeit vom Verneblerdesign)

In allen Verneblern fand eine Temperaturveränderung während der Verneblungszeit von 10 Minuten statt. Im Ultraschall- und im Mikropumpenvernebler erhöhte sich die Temperatur, während sie im Düsenvernebler sank. Die Konzentration der Formulierungen, die mit dem internen Standard Carboxyfluoreszein ermittelt wurde, stieg im Ultraschall- und im Düsenvernebler über die Zeit deutlich an. Im Gegensatz dazu konnte im Mikropumpenvernebler keine Veränderung der Konzentration beobachtet werden. Diese Ergebnisse stimmen mit schon länger bekannten Erkenntnissen bezüglich der Verneblung in Düsen- und Ultraschallverneblern überein (McCallion et al., 1996a, Taylor und McCallion, 1997). Die Veränderung der Temperatur und der Konzentration im PariLCStar[®] und im Optineb[®]ir kann mit den Mechanismen der Aerosolerzeugung dieser Geräte erklärt werden. Im PariLCStar® wird Druckluft durch eine Düse geleitet, um die Flüssigkeit im Reservoir in Aerosoltröpfchen umzuwandeln. Dabei entsteht im Vernebler ein Unterdruck, wodurch Flüssigkeit aus dem Reservoir durch den Bernoulli-Effekt in zwei feine Kapillaren gezogen wird, als feine Fäden die Kapillaren verlässt und schließlich durch den Einfluss von Oberflächenspannung in kleine Tröpfchen zerfällt (McCallion et al., 1996a). Durch diese Art der Aerosolerzeugung verdunstet Flüssigkeit während der Verneblung, was zu einer Erniedrigung der Temperatur und

zu einer Erhöhung der Konzentration im Verneblerreservoir führt (Steckel und Eskandar, 2003). Im Ultraschallvernebler Optineb[®]ir werden elektrische Signale durch einen piezoelektrischen Kristall in mechanische Schwingungen umgewandelt und auf die Flüssigkeit im Reservoir übertragen. Durch die mechanische Vibration der Flüssigkeit reißt die Oberfläche auf und es entstehen feine Aerosoltröpfchen (Yeo et al., 2010). Durch die Übertragung der Ultraschallwellen kann auch die Temperaturerhöhung im Optineb[®]ir-Vernebler erklärt werden, die dann zu einer stärkeren Verdunstung der Flüssigkeit und einer Konzentrationserhöhung im Reservoir führt (Steckel und Eskandar, 2003).

Der Mechanismus der Aerosolerzeugung beruht beim Mikropumpenvernebler Aeroneb[®]Pro auf dem Einsatz einer perforierten Schwingmembran, die durch einen piezoelektrischen Kristall in Vibration versetzt wird. Durch die Schwingung der Membran wird die Flüssigkeit aus dem Reservoir durch die kleinen Öffnungen der Membran geleitet und es entstehen Aerosoltröpfchen (Elhissi et al., 2007). Hierbei kommt es im Gegensatz zur Ultraschall- und Düsenverneblung nicht zu einer Konzentrationserhöhung der Reservoirflüssigkeit und nur zu einer geringen Temperaturerhöhung (Fink et al., 2001, MacLoughlin et al., 2009). Aufgrund dieser Eigenschaften, vor allem der fehlenden Konzentrationserhöhung, erweist sich der Mikropumpenvernebler als geeignetes Gerät für die Verneblung empfindlicher Formulierungen, wie z.B. Nanosuspensionen (Watts et al., 2008). Wie oben bereits erwähnt, beeinflussen die Nanopartikel in der Reservoirflüssigkeit nicht den charakteristischen Temperatur- und Konzentrationsverlauf im Aeroneb[®]Pro-Vernebler.

Allerdings ist anzunehmen, dass die Temperaturveränderung auch im Mikropumpenvernebler, wenngleich sie geringer ausfällt als im Düsen- oder Ultraschallvernebler, die physikochemischen Eigenschaften der Flüssigkeit verändert und so für die Schwankungen der Aerosoleigenschaften über die Zeit verantwortlich ist.

Deshalb wurden die physikochemischen Parameter Dichte, dynamische Viskosität und Oberflächenspannung und ihr Verhalten über die Verneblungszeit hinweg untersucht. Im Düsenvernebler erfolgt über die Zeit ein Abfall der Temperatur und eine Zunahme der Konzentration. Daraus ergibt sich eine steigende dynamische Viskosität, Oberflächenspannung und Dichte der Flüssigkeiten. Im Ultraschallvernebler steigen die Temperatur und die Konzentration der Flüssigkeit im Vernebler. Die Werte der dynamischen Viskosität und der Oberflächenspannung fallen über die Verneblungszeit ab, die Dichte steigt leicht an. Im Mikropumpenvernebler bleibt die Konzentration konstant und die Temperatur steigt, in geringerem Maße als im Ultraschallvernebler, an. Die Dichte der Flüssigkeit im Mikropumpenvernebler bleibt über die Zeit unverändert, die Viskosität und die Oberflächenspannung fallen leicht ab.

Daraus lässt sich die Annahme ableiten, dass die Dichte der Reservoirflüssigkeiten am stärksten von der Konzentration abhängig ist, da sie, im Düsen- und Ultraschallvernebler, bei gegensätzlichen Temperaturverläufen und ähnlichen Konzentrationsverläufen steigt und sich im Aeroneb[®]Pro Vernebler, bei konstanter Temperatur, nicht ändert.

Für die dynamische Viskosität und die Oberflächenspannung kann analog dazu angenommen werden, dass sie stärker von der Temperatur als von der Konzentration der Flüssigkeiten abhängen. Obwohl die Konzentrationen im Düsenund Ultraschallvernebler ansteigen, kommt es im PariLCStar[®], bei sinkender Temperatur, zu einem Anstieg der Viskosität und Oberflächenspannung, im Optineb[®]ir, bei steigender Temperatur, zu einer Abnahme dieser Größen. Im Mikropumpenvernebler fallen die Viskosität und Oberflächenspannung bei steigender Temperatur ebenfalls.

Dieser Zusammenhang der Viskosität und Oberflächenspannung von Flüssigkeiten von der Temperatur konnte für den Aeroneb[®]Pro mit der Auswertung nach Arrhenius-Andrade und Eötvös verdeutlicht werden, da hier die Konzentration konstant bleibt und als beeinflussender Faktor ausgeschlossen werden kann. Durch Anwendung dieser Auswertungsmethoden konnte, wie oben bereits beschrieben, dargestellt werden, dass die dynamische Viskosität und die Oberflächenspannung mit steigender Temperatur linear abfallen.

5.4.Einfluss der physikochemischen Parameter auf die Aerosoleigenschaften Die Zusammenhänge zwischen den physikochemischen Parametern der vernebelten Flüssigkeiten und den Eigenschaften des Aerosols wurden schon häufiger untersucht:

Für Düsenvernebler wurde gefunden, dass die Partikelgrößen des produzierten Aerosols sinken, wenn die Viskosität der Flüssigkeit ansteigt und die Oberflächenspannung sinkt, wobei die Viskosität einen sehr viel deutlicheren Einfluss auf die Partikelgrößen hat (McCallion et al., 1995, McCallion und Patel, 1996). Steckel und Eskandar (2003) zeigten ebenfalls, dass die Partikelgröße von Aerosolen aus einem Düsenvernebler mit steigender Viskosität und sinkender Oberflächenspannung vermindert wird.

Auch bei der Ultraschallverneblung scheint die Viskosität eine sehr viel stärkere Auswirkung auf die Aerosolpartikelgrößen zu haben als die Oberflächenspannung. Die Partikelgrößen der produzierten Aerosole steigen mit zunehmender Viskosität der Flüssigkeit, wobei die Größe der Oberflächenspannung keinen eindeutigen Effekt auf die Partikelgröße hat (McCallion, 1995).

Auch für Mikropumpenvernebler wurde bereits ein Zusammenhang dieser Parameter untersucht und es konnte gezeigt werden, dass bei erhöhter Viskosität der MMAD und die GSD der produzierten Aerosole sinken und die FPF erhöht wird (Beck-Broichsitter et al., 2012a). Generell wurde festgestellt, dass bei erhöhter Viskosität die Ausstoßrate sinkt und die Verneblungszeit definierter Volumina in Mikropumpenverneblern steigt (Ghazanfari et al., 2007, Zhang et al., 2007). Allerdings konnte mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit die Veränderung der Aerosolparameter über die Zeit nicht eindeutig auf die Veränderung isolierter physikochemischer Eigenschaften der vernebelten Flüssigkeit zurückgeführt werden.

Die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern sind, vor allem im zeitlichen Verlauf, komplex und von vielen Faktoren abhängig.

Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass Dichte, dynamische Viskosität und Oberflächenspannung einen sehr wichtigen Einfluss auf die aerodynamischen Eigenschaften der Aerosole haben. Weitere Einflussfaktoren, z.B. das sinkende Flüssigkeitsvolumen im Reservoir über die Zeit oder auch der Salzgehalt der Flüssigkeiten, müssen noch untersucht werden, um exaktere Schlüsse ziehen zu können.

6. Schlussfolgerung

Mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnte zum einen gezeigt werden, dass PLGA-Nanopartikel durch den Einsatz von verschiedenen Stabilisatoren, z.B. Zuckern und hydrophilen Polymeren, über den Gefriertrocknungsprozess hinweg geschützt werden können. Ihre Form und Struktur wird nicht beschädigt, so dass sie ohne Probleme erneut in Suspension gebracht werden und diese in einem geeigneten Vernebler in ein Aerosol überführt werden kann.

Des Weiteren ist festgestellt worden, dass die eingesetzten Stabilisatoren die Eigenschaften des Aerosols nicht nachteilig verändern und mit allen Verneblern ein Aerosol produziert werden kann, das mit seiner Partikelgrößenverteilung eine Deposition in die Peripherie der Lunge sicherstellt. Einzig mit Formulierungen mit höheren Konzentrationen von hydrophilen Polymeren als Stabilisatoren (PEG und Poloxamer 188) misslang die Verneblung mit dem Mikropumpen- und dem Ultraschallvernebler, da die Viskosität der Flüssigkeiten zu hoch war. Im Vergleich der Vernebler untereinander schnitt der Aeroneb[®]Pro am besten ab, da in diesem Gerät, im Gegensatz zum PariLCStar[®] und dem Optineb[®]ir, die Bedingungen bezüglich der physikochemischen Parameter über die Zeit am stabilsten waren. Der Düsen- und der Ultraschallvernebler erwiesen sich als nicht geeignet, empfindliche Suspensionen aus Nanopartikeln zu vernebeln, da in ihnen über die Zeit hinweg eine erhebliche Veränderung der Temperatur, Konzentration, Dichte, Viskosität und Oberflächenspannung der Flüssigkeiten stattfindet. Diese starke Veränderung der Bedingungen im Verneblerreservoir kann die adäquate Verneblung medikamentenbeladener Nanopartikel und ihre Deposition in der Lungenperipherie beeinträchtigen. Der Aeroneb[®]Pro hingegen zeigte weniger starke Schwankungen der physikochemischen Eigenschaften der Flüssigkeiten über die 10minütige Verneblungszeit hinweg und kann als geeignetes Gerät für die Verneblung gefriergetrockneter, resuspendierter Nanopartikel zur Deposition in die Lungenalveolen betrachtet werden.

7. Ausblick

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Nanopartikel mit geeigneten Stabilisatoren haltbar und lagerbar gemacht werden können und dass sie durch geeignete Vernebler in ein Aerosol überführt werden können, das adäquate Partikelgrößen für die Deposition von Medikamenten in der Lunge besitzt, müssen nun die nächsten Schritte auf dem Weg zur praktischen Anwendung der Nanopartikel als Träger von Medikamenten gemacht werden. Nanopartikel sind für die pulmonale Applikation von Medikamenten sehr vielversprechend, allerdings gibt es noch viele Fragen zu klären und Probleme zu lösen, bis ihre klinische Anwendung möglich ist. Die optimale Beladung der Nanopartikel mit Medikamenten und deren Freisetzungscharakteristik sind ein Gebiet, dem noch mehr Aufmerksamkeit gewidmet werden muss (Beck-Broichsitter et al., 2012c). Die Pharmakokinetik der über die Controlled-Release-Systeme in die Lunge eingebrachten Medikamente ist ein weiterer Punkt, der in zukünftigen in-vivo- und ex-vivo-Studien untersucht werden sollte (Beck-Broichsitter et al., 2011). Außerdem müssen die genauen Prozesse, die sich auf der Alveolarebene zwischen den eingebrachten Materialien und dem Lungenepithel abspielen, noch genauer erforscht werden, um die Aufnahme der Medikamente in die Zielzellen zu verbessern (Azarmi et al., 2008). Hierbei spielt nicht nur die biochemische Interaktion zwischen den Nanopartikeln und den Zellen eine Rolle, sondern auch die Veränderung der biophysikalischen Eigenschaften des Surfactant der Lunge (Azarmi et al., 2008). Ganz besonders wichtig ist jedoch die Sicherheit der Nanopartikel als Medikamententräger. Das inflammatorische und immunogene Potential der Carrier-Materialen und ihrer Abbauprodukte ist schon vielfach untersucht worden, allerdings müssen auch hier noch eindeutigere Ergebnisse folgen (Gill et al., 2007). Diesbezüglich müssen vor allem Langzeitstudien beweisen, dass die Inhalation von Nanopartikeln unbedenklich ist bzw. eine diesbezüglich ideale Zusammensetzung der Materialien ermittelt werden.

Trotz all dieser Probleme und Fragen, die im Moment noch geklärt werden müssen, können in Nanopartikel als Träger zur gezielten und kontrollierten Freisetzung von Medikamenten in die Lunge weiterhin große Hoffnungen gesetzt werden.

8. Zusammenfassung

Bioabbaubare Nanopartikel als Medikamententräger zur Inhalation in die Lunge sind sehr vielversprechend. Um ihre Lagerungsfähigkeit zu gewährleisten, müssen Nanopartikel unter Zusatz von Stabilisatoren gefriergetrocknet werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Form und Struktur der Nanopartikel durch die Gefriertrocknung (Lyophilisation) unter Einsatz von diversen Stabilisatoren wie Zuckern oder hydrophilen Polymeren auf befriedigende Weise erhalten werden konnte. Außerdem wurde der Einfluss der Stabilisatoren auf die Eigenschaften der von Düsen-, Ultraschall- und Mikropumpenverneblern produzierten Aerosole und auf den Verneblerausstoß untersucht. Auch die Konzentration, Temperatur, Dichte, Viskosität und Oberflächenspannung der Flüssigkeiten während des Verneblungsverlaufs und deren Einfluss auf die Aerosolproduktion war von Interesse.

Mit allen vernebelten Stabilisator-Formulierungen konnten mit allen drei Verneblern Ausstoßleistungen und Aerosoleigenschaften erreicht werden, die eine Deposition in der Lungenperipherie gewährleisten.

Die Verneblung mittels Düsen- und Ultraschallvernebler resultierte in zum Teil starken Schwankungen der Temperatur und der Konzentration der Flüssigkeiten, die dann auch deren Viskosität und Oberflächenspannung veränderten. Im Gegensatz dazu konnten im Mikropumpenvernebler nur geringe Veränderungen der Konzentration und Temperatur beobachtet werden.

Daraus lässt sich schließen, dass vor allem Mikropumpenvernebler adäquate Geräte für die Verneblung von gefriertrockneten, rehydrierten Nanopartikeln zur Deposition in den Lungenalveolen darstellen.
9. Summary

Biodegradable nanoparticles are very promising pulmonary delivery systems for the controlled and targeted application of drugs via inhalation. In order to maintain their physicochemical properties during long-term storage polymeric nanoparticles need to be stabilized by freeze-drying (lyophilisation). It was shown that the nanoparticle characteristics could be adequately preserved by freeze-drying in the presence of various stabilizers such as sugars or hydrophilic polymers.

Furthermore, the stabilizers' influence on the properties of aerosols produced by airjet, ultrasonic and vibrating mesh nebulizers and on the output of the nebulizer was investigated. The fluids' temperature, concentration, density, viscosity and surface tension during nebulization and their influence on aerosol production was also analyzed.

With all stabilizer formulations in all three nebulizers aerosol output and aerosol characteristics suitable for peripheral deposition in the lung could be accomplished. Air-jet and ultrasonic nebulization showed notable changes of the temperature and concentration of the reservoir fluid which also resulted in shifting of viscosity, density and surface tension. In contrast, vibrating-mesh nebulization caused only minor changes in temperature and no alteration of the fluids' concentration. This leads to the conclusion that vibrating-mesh nebulization in particular is a very promising technique for the pulmonary application of freeze-dried, rehydrated biodegradable nanoparticles.

10. Abkürzungsverzeichnis

Α	Andrade-Konstante
Abb.	Abbildung
ANOVA	Ananlysis of variance
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CF	5,(6)-Carboxyfluorescein
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratzentimeter
$\gamma_{ m mol}$	molare Oberflächenspannung
d _{ae}	aerodynamischer Durchmesser
d_p	Durchmesser eines sphärischen Partikels
d_n	Durchmesser der Partikel auf der Perzentile n der
	Gesamtverteilung
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DPI	Dry Powder Inhaler
Δ	Differenz
E _A	Aktivierungsenergie
η	dynamische Viskosität
F	Kraft
F _{max}	Kraftmaximum
FPF	Fine Particle Fraction
GSD	geometrische Standardabweichung
HCl	Hydroxychlorid (Salzsäure)
k	Eötvös-Konstante
K	Kapillarkonstante
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
kHz	Kilohertz
kJ	Kilojoule
1	Länge

L	benetzte Länge des DuNoüy-Rings
ln	natürlicher Logarithmus
λ	Wellenlänge
λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{ex}	Anregungswellenlänge
m	Masse
Μ	Molar (mol/l)
m^2	Quadratmeter
mbar	Millibar
mg	Milligramm
min.	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMAD	Mass Median Aerodynamic Diameter
mPa	Millipascal
ms	Millisekunde
m/v	Masse pro Volumen
$M_{ m w}$	Molekulargewicht
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
n	Anzahl
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
n.e.	nicht ermittelt
nm	Nanometer
N/m	Newton pro Meter
NP	Nanopartikel
n.v.	nicht vernebelbar
ν	kinematische Viskosität
р	Druck
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PDI	Polydispersitätsindex
PEG	Polyethylenglykol

PEO	Polyethylenoxid
PGA	Polyglykolsäure
pН	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenaktivität
PLA	Polymilchsäure
PLGA	Polymilchsäure-Polyglykolsäure
PVA	Polyvinylsäure
PVP	Polyvinylpyrrolidon
R	Allgemeine Gaskonstante
r	Radius
REM	Rasterelektronenmikroskop
RKM	Rasterkraftmikroskop
rpm	revolutions per minute
ρ	Dichte
S	Sekunde
S.	Seite
S.D.	Standardabweichung (Standard Deviation)
σ	Oberflächenspannung
Т	Temperatur
t	Zeit
Tab.	Tabelle
T _c	kritische Temperatur
θ	Kontaktwinkel
VMD	Mittlerer Volumendurchmesser (Volume Mean Diameter)
X50	Median der Volumenverteilung
z.B.	zum Beispiel
0	Grad
∞	unendlich

11. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

a) Tabellenverzeichnis

Tab.1: Die Austoßraten in g/min für die einzelnen Stabilisatorlösungen in den drei Verneblern. Die Werte sind als Mittelwert \pm S.D. bei n = 4 angegeben.

• **Tab.2:** Andrade-Konstanten für die unterschiedlichen Formulierungen, angegeben als Mittelwert ± S.D.

• **Tab.3:** Eötvös-Konstanten für die einzelnen Formulierungen, angegeben als Mittelwert ± S.D.

b) Abbildungsverzeichnis

• Abb.1: Pari-LC-Star[®]-Düsenvernbler (Quelle: www.pari.de)

• Abb.2: Optineb[®]-ir-Ultraschallvernebler (Quelle: www.nebu-tec.de)

• Abb.3: Aeroneb[®]-Pro-Mikropumpenvernebler (Quelle: www.aerogen.com)

 Abb.4: Abbildung A zeigt ein Bild frisch hergestellter PLGA-Nanopartikel aufgenommen mit einem Rasterelektronenmikroskop. Der Maßstabsbalken in der Ecke entspricht 1µm. Abbildung B zeigt ein Bild von PLGA-Nanopartikeln, das mittels Rasterkraftmikroskopie erstellt wurde.

Abb.5: Die Bilder stellen die Stabilität der PLGA-Nanopartikel über die Gefriertrocknung hinweg dar. Sie wird mit den Quotienten *Partikelgrößef/Partikelgrößei* (Verhältnis der endgültigen Größe zur ursprünglichen Größe, Bild A) und *PDIf/PDIi* (Verhältnis des PDI nach Gefriertrocknung zum PDI vor der Gefriertrocknung, Bild B) ausgedrückt. Es sind die Ergebnisse der Gefriertrocknung mit und ohne Zugabe verschiedener Lyoprotektoren dargestellt. Es kann außerdem der Einfluss der unterschiedlichen Temperaturen, auf die die NP vor der Lyophilisation eingefroren wurden, entnommen werden ((-40 °C (weiße Balken), -80 °C (graue Balken), und -196 °C (schwarze Balken)).

Abb.6: Bilder des Rastelektronenmikroskops (groß) und des Rasterkraftmikroskops (klein in der Ecke, in stärkerer Vergrößerung) zeigen die Nanopartikelmorphologie nach Zugabe von 10% (m/v) Saccharose-Lösung (A) und Zugabe von 1% (m/v)
Polyvinylalkohol (B) als Stabilisatoren bei der Gefriertrocknung. Der Maßstabsbalken unten rechts entspricht jeweils 1µm.

Abb.7: Der MMAD der aus unterschiedlichen Formulierungen erzeugten Aerosole im zeitlichen Verlauf im Pari LC Star® (A), im Optineb®-ir (B) und im Aeroneb® Pro
(C). Alle Werte sind als Mittelwert ± S.D. bei n = 4 angegeben.

Abb.8: Zeitlicher Verlauf der geometrischen Standardabweichung (GSD) der vernebelten Formulierungen im Pari LC Star[®] (A), Optineb[®]ir (B) und AeronebPro[®] (C). Alle Werte sind als Mittelwert ± S.D. mit *n* = 4 angegeben.

Abb.9: Die Fine Particle Fraction (FPF, definiert als der Anteil der Aerosolteilchen, der kleiner als 5,25μm ist) der Aerosole aus den verschiedenen Formulierungen, produziert durch den Pari LC Star[®] (A), den Optineb[®]-ir (B) und den Aeroneb[®] Pro (C). Die Werte sind dargestellt als Mittelwert±S.D. bei n = 4.

• **Abb.10:** Die Temperaturkurven der unterschiedlichen Formulierungen im Pari LC Star[®] (A), im Optineb[®]-ir (B) und im Aeroneb[®] Pro (C). Alle Werte sind als Mittelwert±S.D. bei *n* = 4 dargestellt.

Die Zugabe von Nanopartikeln zu einer ausgewählten Formulierung (PVA1% (m/v)) veränderte den Temperaturverlauf im Mirkropumpenvernebler nicht.

• Abb.11: Die Verläufe der CF-Konzentration in % in den diversen Stabilisatorlösungen über die Zeit im Pari LC Star[®] (A), im Optineb[®]-ir (B) und im Aeroneb[®] Pro (C). Alle Werte sind als Mittelwert \pm S.D. bei n = 4 dargestellt.

• Abb.12: Entwicklung der dynamischen Viskosität der verschiedenen Flüssigkeiten über die Zeit im Pari LC Star[®] (A), im Optineb[®]-ir (B) und im Aeroneb[®] Pro (C). Alle Werte sind als Mittelwert \pm S.D. bei *n* = 4 dargestellt.

• Abb.13: Entwicklung der Oberflächenspannung der verschiedenen Flüssigkeiten über die Zeit im Pari LC Star[®] (A), im Optineb[®]-ir (B) und im Aeroneb[®] Pro (C). Alle Werte sind als Mittelwert \pm S.D. bei *n* = 4 dargestellt.

• Abb.14: Die Graphen illustrieren die Abhängigkeit der Oberflächenspannung (A) und der dynamischen Viskosität (B) von der Temperatur. Im Reservoir des Aeroneb[®]Pro-Verneblers steigt die Temperatur im Verneblungsverlauf an, was eine Abnahme der Oberflächenspannung und der dyn. Viskosität zur Folge hat. Die Geraden stellen die lineare Anpassung der erhobenen Daten mir $R^2 > 0,98$ dar. Alle Werte sind als Mittelwert ±S.D. bei n = 4 angegeben

12. Quellen

- Abdelwahed W., Degobert G., Fessi H.: A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): Formulation and process optimization Pharm. Res. 2006, 309:178-188 a
- Abdelwahed W., Degobert G., Fessi H.: Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage Eur. J. Pharm. Biopharm. 2006, 63:87-94 b
- Abdelwahed W., Degobert G., Stainmesse S., Fessi H.: Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations Adv. Drug Deliv. Rev. 2006, 58:1688-1713 c
- Ahmad Z., Pandey R., Sharma S., Khuller G.K.: Pharmacokinetic and pharmacodynamic behaviour of antitubercular drugs encapsulated in alginate nanoparticles at two doses
 Int. J. Antimicrob. Agents 2006, 27:409-416
- Akagi S.: Über die Bestimmung der relative Viskosität mit dem Ubbelohde-Viskosimeter
 The Journal of Biochemistry 1930, XI(8): 415-421
- Andrade R.: The viscosity of liquids Nature 1930, 125:309-310
- Azarmi S., Roa W.H., Löbenberg R.: Targeted delivery of nanoparticles for the treatment of lung diseases Adv. Drug Deliv. Rev. 2008, 60:863-875
- Baginski L., Tachon G., Falson F., Patton J.S., Bakowsky U., Ehrhardt C. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of proteolytic enzymes in cultures of human respiratory epithelial cells.
 J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv. 2011, 24(2):89-101
- Baginski L., Tewes F., Buckley S.T., Healy A.M., Bakowsky U., Ehrhardt C.: Investigations into the fate of inhaled salmon calcitonin at the respiratory epithelial barrier Pharm. Res. 2012, 29(1):332-41
- Beck-Broichsitter M., Gauss J., Packhäuser C.B., Lahnstein K., Schmehl T., Seeger W., Kissel T., Gessler T.: Pulmonary drug delivery with aerosolizable nanoparticles in an ex-vivo lung model Int. J. Pharm. 2009, 367:169-178
- Beck-Broichsitter M., Rytting E., Lebhardt T., Wang X., Kissel T.: Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: A shift in the "ouzo region" upon dug loading Eur. J. Pharm. Sci. 2010, 41:244-253

- Beck-Broichsitter M., Schmehl T., Seeger W., Gessler T.: Evaluating the Controlled Release Properties of Inhaled Nanoparticles Using Isolated, Perfused, and Ventilated Lung Models
 J. Nanomaterials 2011, Article ID 163791, 16 pages doi:10.1155/2011/163791
- Beck-Broichsitter M., Kleimann P., Gessler T., Seeger W., Kissel T., Schmehl T.: Nebulization performance of biodegradable sildenafil-loaded nanoparticles using the Aeroneb® Pro: Formulation aspects and nanoparticle stability to nebulization Int. J. Pharm 2012, 422:398-408. a
- Beck-Broichsitter M., Merkel O.M., Kissel T.: Controlled pulmonary drug and gene delivery using polymeric nano-carriers J. Contr. Release 2012, 161(2):214-224 b
- Beck-Broichsitter M., Schmehl T., Gessler T., Seeger W., Kissel T.: Development of a biodegradable nanoparticle platform for sildenafil: Formulation optimization by factorial design analysis combined with application of charge-modified branched polyesters J. Contr. Release 2012, 157(3):469-477 c
- Beck-Broichsitter M., Knuedeler M.-C., Schmehl T., Seeger W.: Following the concentration of polymeric nanoparticles during nebulization Pharm. Res. 2013, 30(1):16-24
- Blanchard C.R.: In The Classroom: Atomic Force Microscopy The Chemical Educator 1996, 1(5):1-8
- Bozdag S., Dillen K., Vandervoort J., Ludwig A.: The effect of freeze-drying with different cryoprotectants and gamma-irradiation sterilization on the charactersitics of ciprofloxacin Hcl-loaded poly(D,L-lactide-glycolide) nanoparticles
 J. Pharm. Pharmacol. 2005, 57:699-707
- Bridges P.A., Taylor, K.M.G.: An investigation of some of the factors influencing the jet nebulisation of liposomes Int. J. Pharm. 2000, 204:69-79
- Cai C., Bakowsky U., Rytting E., Schaper A.K., Kissel T.: Charged nanoparticles as protein delivery systems: A feasibility study using lysozyme as model protein
 Eur. J. Pharm. Biopharm. 2008, 69:31-42
- Cefalu W.T., Skyler J.S., Kourides I.A., Landschulz W.H., Balagtas C.C., Cheng S.-L., Gelfand R.A.: Inhaled Human insulin treatment in Patients with Type 2 Diabetes mellitus Ann. Int. Med. 2001, 134 (3):203-207

- Choi M.J., Briancon S., Andrieu J., Min S.G., Fessi H. : Effect of Freeze-Drying process conditions on the stability of nanoparticles Dry. Technol. 2004, 22:335-346
- Clark A., Borgström L.: In vitro testing of Pharmaceutical Aerosols and Predicting aerosol deposition from in vitro measurements
 Drug Delivery to the Lung, Marcel Dekker Inc., New York, 2002
- Crowder T.M., Hickey A.J., Louey M.D., Orr N.: A Guide to pharmaceutical particulate science Interpharm/CRC, Boca Raton, 2003
- Dailey L.A., Schmehl T., Gessler T., Wittmar M., Grimminger F., Seeger W., Kissel T.: Nebulization of biodegradable nanoparticles: Impact of nebulizer technology and nanoparticle characteristics on aerosol features J. Contr. Release 2003, 86:131-144.
- Dailey L.A., Kleemann E., Merdan T., Petersen H., Schmehl T., Gessler T., Hänze J., Seeger W., Kissel T.: Modified polyethylenimines as non viral gene delivery systems for aerosol therapy: effects of nebulization on cellular uptake and transfection efficiency J. Contr. Release 2004, 425-436
- Dailey L.A., Jekel N., Fink L., Gessler T., Schmehl T., Wittmar M., Kissel T., Seeger W.: Investigation of the proinflammatory potential of biodegradable nanoparticle drug delivery systems in the lung Tox. Appl. Pharm. 2006, 215:100-108
- Donaldson K., Tran L., Jimenez L.A., Duffin R., Newby D.E., Mills N., MacNee W., Stone V.: Combustion derived nanoparticles: A review of their toxicology following inhalation exposure Particle and Fiber Toxicology 2005, 2:10
- Elhissi A.M.A., Taylor K.M.G.: Delivery of liposomes generated from proliposomes using air-jet, ultrasonic, and vibrating-mesh nebulisers.
 J. Drug Deliv. Sci. Technol. 2005, 15:261–265.
- Elhissi A.M.A., Karnam K.K., Danesh-Azari M.-R., Gill H.S., Taylor K.M.G.: Formulations generated from ethanol-based proliposomes for delivery via medical nebulizers
 J. Pharm. Pharmacol. 2006, 58:887-894
- Elhissi A.M.A., Faizi M., Naji W.F., Gill H.S., Taylor K.M.G.: 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. 2007, 334:62-70
- Eötvös R.: Über den Zusammenhang der Oberflächenspannung von Flüssigkeiten mit ihrem Molecularvolumen Ann. Phys. 1886, 263:448-459

- Fink J.B., Power J.: Comparison of a novel aerosol generator with a standard ultrasonic nebulizer designed for use during mechanical ventilation Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2001, 163:A127.
- Finlay W.H., Lange C.F., King M., Speert D.P.: Lung delivery of aerosolized Dextran Am. J. Resp. Crit. Care Med. 2000, 161:91-97
- Galindo-Rodriguez S., Allémann E., Fessi H., Doelker E.: Parameters associated with Nanoparticle Formation in the Salting-out, Emulsification-diffusion and Nanoprecipitation methods Pharm. Res. 2004, 21(8):1428-1439
- Geiser M., Schurch S., Gehr P.: Influence of surface chemistry and topography of particles on their immersion into the lung's surface lining layer J. Appl. Physiol. 2003, 94:1793-1801
- Gerrity T.R., Lee P.S., Hass F.J., Marinelli A., Werner P., Lourenco R.V.: Calculated deposition of inhaled particles in the airway generations of normal subjects
 J. Appl. Physiol. 1979, 47:867-873
- Gessler, T.: Entwicklung und Charakterisierung eines geschlossenen und effizienten Ultraschall-Aerosolgenerators Dissertation im Fachbereich Physik, Universität Gießen, 1999
- Ghazanfari T., Elhissi A.M.A., Ding Z., Taylor K.M.G.: The influence of fluid physicochemical properties on vibrating-mesh nebulization Int. J. Pharm 2007, 339:103-111
- Giessibl F.J.: Advances in Atomic Force Microscopy Rev. of Mod. Physics 2003, 75:949-978
- Gill S., Loebenberg R., Ku T., Azarmi S., Roa W., Prenner E.J.: Nanoparticles: Characteristics, mechanisms of action and toxicity in pulmonary drug delivery – A review
 J. Biomed. Nanotechnol. 2007, 3:107-119
- Goldstein J., Newbury D., Joy D., Lyman C., Echlin P., Lifshin E., Sawyer L., Michael J.: Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis Springer, 2003
- Gonda I., Byron P.R.: Perspectives on the biopharmacy of inhalation aerosols Drug Develop. Ind. Pharm 1978, 4(3):243-259
- Gonda I.: Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract Critical Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 1990, 6:273-313

- Govender T., Stolnik S., Garnett M.C., Illum L., Davis S.S.: PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug J. Contr. Release 1999, 57:171-185
- Groneberg D.A., Witt C., Wagner U., Chung K.F., Fischer A.: Fundamentals of pulmonary drug delivery Respir. Med. 2003, 97:382-387
- Haas, U.: Physik f
 ür Pharmazeuten und Mediziner. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2002
- Harush-Frenkel O., Bivas-Benita M., Nassar T., Springer C., Sherman Y., Avital A., Altschuler Y., Borlak J., Benita S.: A safety and tolerability study of differently-charged nanoparticles for local pulmonary drug delivery Tox. Appl. Pharm. 2010, 246 (1-2):83-90
- Heyder J., Rudolf G.: Mathematical models of particles deposition in the human respiratory tract
 J. Aerosol Sci. 1984, 15:697-707
- Heyder J., Gebhardt J., Rudolf G., Schiller C.F., Stahlhofen W.: Deposition of Particles in the Human respiratory tract in the size of 0,005-15µm J. Aerosol Sci. 1986, 5:811-825
- Hinrichs W.L.J., Mancenido F.A., Sanders N.N., Braeckmans K., De Smendt S.C., Demeester J., Frijlink H.W.: The choice of a suitable oligosaccharide to prevent aggregation of PEGylated nanoparticles during freeze thawing and freeze drying Int. J. Pharm. 2006, 311:237-244
- Hirsjärvi S., Peltonen L., Kainu L., Hirvonen J.: Freeze-Drying of low molecular weight poly(L-lactic acid) nanoparticles: Effect of cryo- and lyoprotectants J. Nanosc. Nanotechnol. 2006, 6:3110-3117
- Holthoff H., Engelhaaf S.U., Borkovec M., Schurtenberger P., Sticher H.: Coagulation rate measurements of Colloidal Particles by Simultaneous Static and Dynamic Light Scattering Langmuir 1996, 12 (23): 5541-5549
- Holzer M., Vogel V., Mäntele W., Schwartz D., Haase W., Langer K.: Physicochemical characterisation of PLGA nanoparticles after freeze-drying and storage Eur. J. Pharm. Biopharm. 2009, 72:428-437
- Hradetzky, G., Sommer, K.D.: Flüssigkeitsdichtemessung Nachr. aus Chemie, Technik und Laboratorium 1994, 42: M1-M15 Überarbeitete Fassung Januar 2002

- Jung T., Breitenbach A., Kissel T.: Sulfobutylated poly(vinyl alcohol)-graftpoly(lactide-co-glycolide)s facilitate the preparation of small negatively charged biodegradable nanospheres
 J. Contr. Release 2000, 67:157-169
- Junqueira L.C.U., Carneiro J.: Histologie Springer Medizin Verlag Heidelberg 2005
- Kato T., Yashiro T., Murata Y., Herbert D.C., Oshikawa K., Bando M., Ohno S., Sugiyama Y.: Evidende that exogenous substances can be phagocytized by alveolar epithelial cells and transported into blood capillaries Cell Tissue Res. 2003, 311:47-51
- Kawashima Y., Yamamoto H., Takeuchi H.: Pulmonary delivery of insulin with nebulized DL-lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres to prolong hypoglycemic effect
 J. Contr. Release 1999, 62:279-287
- Keck C., Müller R.: Size analysis of submicron particles by laser diffractometry - 90% of the published measurements are false Int. J. Pharm. 2008, 355:150-163
- Kleemann E., Dailey L.A., Abdelhady H.G., Gessler T., Schmehl T., Roberts C.J., Davies M.C., Seeger W., Kissel T.: Modified polyethylenimines as non-viral gene delivery systems for aerosol gene therapy: investigations of the complex structure and stability during air-jet and ultrasonic nebulization J. Contr. Release 2004, 100(3):437-450
- Kleemann E., Schmehl T., Gessler T., Bakowsky U., Kissel T., Seeger W.: Iloprost-Containing Liposomes for Aerosol Application in Pulmonary Arterial Hypertension: Formulation Aspects and Stability Pharm. Res. 2007, 24(2):277-287
- Klonoff D.C.: Inhaled Insulin Diabetes Technol. Ther. 1999, 1:307-313
- Lahnstein K., Schmehl T., Rüsch U., Rieger M., Seeger W., Gessler T.: Pulmonary absorption of aerosolized flourescent markers in the isolated rabbit lung Int. J. Pharm. 2008, 351:158-164
- Lebhardt T., Roesler S., Uusitalo H.P., Kissel T.: Surfactant-free redispersible nanoparticles in fast-dissolving composite microcarriers for dry-powder inhalation Eur. J. Pharm. Biopharm. 2011, 78:90-96
- Lewis R.A.: Nebulisers for lung aerosol therapy Lancet 1983, 849

- Lippmann M., Yeates D.B., Albert R.E.: Deposition, retention, and clearance of inhaled particles
 Br. J. Ind. Med. 1980, 37:337-362
- MacLoughlin R.J., Higgins B.D., Laffey J.G., O'Brien T.: Optimized aerosol delivery to a mechanically ventilated rodent J. Aerosol Med. 2009, 22:323-332.
- Mansour H.M., Rhee Y.-S., Wu X.: Nanomedicine in pulmonary delivery Int. J. Nanomed. 2009, 4:299-319
- McCallion O.N.M., Taylor K.M.G., Thomas M., Taylor A.J.: Ultrasonic nebulisation of Fluids of different Viscosities and Surface Tensions J. Aerosol Med. 1995, 8 (3):281-284
- McCallion O.N.M., Patel M.J.: Viscosity effects on nebulisation of aqueous solutions
 Int. J. Pharm. 1996, 130(2):245-249
- McCallion O.N.M., Taylor K.M.G., Bridges P.A., Thomas M., Taylor A.J.: Jet nebulisers for pulmonary drug delivery Int. J. Pharm 1996, 130:1-11 a
- McCallion O.N.M., Taylor K.M.G., Thomas M., Taylor A.J.: Nebulisation of monodisperse latex sphere suspensions in air-jet and ultrasonic nebulisers Int. J. Pharm. 1996, 133: 203-214 b
- Menges G., Haberstroh E., Michaeli W., Schmachtenberg E.: Werkstoffkunde Kunststoffe, 5. völlig überarbeitete Auflage Carl Hanser Verlag München Wien, 2002
- Meyer E.: Atomic Force Microscopy Progress in Surface Science 1992, 41:3-49
- Mitchell J.P., Nagel M.W., Nichols S., Nerbrink O.: Laser Diffractometry as a Technique for the Rapid Assessment of Aerosol Particle Size from Inhalers J. Aerosol Med. 2006, Vol. 19, No. 4:409-433
- Mitra S., Gaur U., Ghosh P.C., Maitra A.N.: Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conugate using chitosan nanoparticles as carrier
 J. Contr. Release 2001, 74:317-323
- Montgomery A.B., Luce J.M., Turner J., Lin E.T., Debs R.J., Corkery K.J., Brunette E.N., Hopewell P.C.: Aerosolized pentamidine as sole therapy for Pneumocystis carinii pneumonia in patients with acquired immunodeficiency syndrome Lancet 1987, 330:480-483

- Mora-Huertas C.E., Fessi H., Elaissari A.: Polymer-based Nanocapsules for drug delivery Int. J. Pharm. 2010, 385:113-142
- Niwa T., Takeuchi H., Hino T., Kunou N., Kawashima Y.: Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with DLlactide/glycolide copolymer by a novel sponateous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behaviour J. Contr. Release 1993, 25:89-98
- Oberdörster G.: Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles Int. Arch. Occup. Environ. Health 2001, 74:1-8
- O'Callaghan C., Barry P.: The science of nebulised drug delivery Thorax 1997, 52(Suppl.2):31-44
- Olschewski H., Walmrath D., Schermuly R., Ghofrani A., Grimminger F., Seeger W.: Aerosolized prostacyclin and iloprost in severe pulmonary hypertension Ann. Intern. Med. 1996, 124:820-824
- Packhäuser C.B., Lahnstein K., Sitterberg J., Schmehl T., Gessler T., Bakowsky U., Seeger W., Kissel T.: Stabilization of aerosolizable nano-carriers by freezedrying Pharm. Res. 2009: 26:129-138
- Patton J.S.: Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs Adv. Drug Deliv. Rev. 1996, 19:3-36
- Patton J.S., Byron P.R.: Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs Nat. Rev. Drug Discov. 2007, 6:67-74
- Patton J.S., Trinchero P., Platz R.M.: Bioavailability of pulmonary delivered peptides and proteins: α-interferon, calcitonins and parathyroid hormones J. Contr. Release 1994, 28:79-85
- Patton J.S., Platz R.M.: Pulmonary delivery of peptides and proteins for systemic action Adv. Drug Deliv. Rev. 1998, 8:179-196
- Pecora, R.: Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy Plenum Press, New York, London, 1985
- Perez C., Sanchez A., Putnam D., Ting D., Langer R., Alonso M.J. :Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA
 J. Contr. Release 2001, 75:211-224

- Phipps P.R., Pharm B., Gonda I.: Droplets produced by medical nebulizers: Soem factos affecting their size and solute concentration Chest 1990, 97:1327-1332
- Pilcer G., Amighi K.: Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery Int. J. Pharm. 2010: 392: 1-19
- Pison U., Welte T., Giersig M., Groneberg D.A.: Review: Nanomedicine for respiratory diseases
 Eur. J. Pharm. 2006, 533:341-350
- Quattrin T., Bélanger A., Bohannon N.J.V., Schwartz S.L.: Efficacy and safety of inhaled insulin (Exubera) compared with subcutaneous insulin therapy in patients with type 1 diabetes Diabetes Care 2004, 27:2622-2627
- Quintanar-Guerrero D., Ganem-Quintanar A., Allémann E., Fessi H., Doelker E.: Influence of the stabilizer coating layer on the purification and freeze-drying of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles prepared by an emulsion-diffusion technique
 J. Microencapsulation 1998, 15(1):107-119
- Reimer L.: Transmission Electron Microscopy Physics of Image Formation Springer Science+Business Media LLC, 2008
- Röthele S., Naumann H., Heuer M.: Die Anwendung der Fraunhofer-Beugung unter 1µm zur Partikelgrößenanalyse von 0,1µm bis 2000µm. Europäisches Symposium Partikelmesstechnik, Nürnberg 1989, 337-393
- Rytting E., Nguyen J., Wang X., Kissel T.: Biodegradable polymeric nanocarriers for pulmonary drug delivery Exp. Opin. Drug Deliv. 2008, 5:629-639
- Rytting E., Bur M., Cartier R., Bouyssou T., Wang X., Krüger M., Lehr C.-M., Kissel T.: In vitro and in vivo performance of biocompatible negatively-charged salbutamol-loaded nanoparticles J. Contr. Release 2010, 141:101-107
- Saez A., Guzman M., Molpeceres J., Aberturas M.R.:Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particles size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs Eur. J. Pharm. Biopharm. 2000, 50:379-387
- Sartor, M.: Dynamic light scattering. American J. Physics 1975, 38(5):575–585.
- Scheuch G.: Die Partikelgröße, der wichtigste Parameter für die Inhalierbarkeit und Deposition von Aerosolteilchen, S. 11-26 in: Aerosole in der Inhalationstherapie. Grundlagen und Anwendungen

Dustri-Verlag Dr. Karl Feistl, München-Deisenhofen, 1997

- Scheuch G., Kohlhhaeufl M.J., Brand P., Siekmeier R.: Clinical perspectives on pulmonary systemic and macromolecular delivery Adv. Drug Deliv. Rev 2006, 58:996-1008
- Schiebler T.H.: Anatomie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie Springer Medizin Verlag Heidelberg 2005
- Schneider, F.: Viskosität, in: Physikalische Chemie II, Kapitel 5, 2008, unter: http://www2.uni-siegen.de/~pciii/PC22.pdf (29.09.2013)
- Sham J.O-H., Zhang Y., Finlay W.H., Roa W.H., Löbenberg R.: Formulation and characterization of spray-dried powders containing nanoparticles for aerosol delivery to the lung Int. J. Pharm. 2004, 269:457-467
- Sheikh Hassan A., Sapin A., Lamprecht A., Emond E., El Ghazouani F., Maincent P.: Composite microparticles with in vivo reduction of the burst release effect Eur. J. Pharm. Biopharm. 2009, 73:337-344
- Soppimath K.S., Aminabhavi T.M., Kulkarni A.R., Rudzinski W.E.: Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices J. Contr. Release 2001, 70:1-20
- Stahlhofen W., Gebhart J., Heyder J., Scheuch G.: New regional deposition data of the human respiratory tract
 J. Aerosol Sci. 1983, 14:186-188
- Stelliou I., Venthoye G., Taylor K.M.G.: Manipulating the temperature of pentamidine isethionate solutions in jet nebulisers Int. J. Pharm 1993, 99:R1-R3
- Sung J.C., Pulliam B.L., Edwards D.A.: Nanoparticles for drug delivery to the lung Trends Biotechnol. 2007, 25(12):563-570
- Taylor K.M.G., Venthoye G., Chawla A.: Pentamidine isethionate delivery from jet nebulisers
 Int. J. Pharm, 1992, 85:203-208
- Taylor K.M.G., McCallion O.N.M.: Ultrasonic nebulisers for pulmonary drug delivery Int. J. Pharm 1997, 153:93-104
- URL: http://www.antonpaar.com/Dichtemessgerät/59_Germany_de?productgroup_id=2&Dichtemessge D%C3%A4t#U-tube (27.7.2013)

- URL:http://www.kruss.de/de/theorie/messungen/oberflaechenspannung/ringmetr ing.html (27.7.2013)
- URL: http://www.nebu-tec.de/nt/pdf/NT_ON-100-4_IFU_Venta-Neb-D_A.pdf (23.4.2013)
- URL:http://www.pari.de/produkte/pari_vernebler_year_packs/produkt/detail/infi /techdata/pari_lc_sprint_star_vernebler.html (28.7.2013)
- Van de Hulst, H.C.: Light scattering by small particles. Dover Publications, Mineola, 1981
- Voswinckel R., Enke B., Reichenberger F., Kohstall M., Kreckel A., Krick S., Gall H., Gessler T., Schmehl T., Ghofrani H.A., Schermuly R.T., Grimminger F., Rubin L.J., Seeger W., Olschewski H.: Favorable Effects of Inhaled Treprostinil in Severe Pulmonary Hypertension J. Am. Coll. Card. 2006, 48(8):1672-1681
- Watts A.B., McConville J.T., Williams R.O.: III, Current therapies and technological advances in aqueous aerosol drug delivery Drug Dev. Ind. Pharm. 2008, 34:913-922.
- Welsch U.: Lehrbuch Histologie Elsevier GmbH München, 2003
- Wood J.A., Wilson R.S.E., Bray C.: Changes in Salbutamol concentration in the reservoir solution of a jet nebuliser Br. J. Dis. Chest, 1986, 80:164-169
- Yang W., Peters J.I., Williams III R.O.: Inhaled nanoparticles A current review Int. J. Pharm 2008, 356:239-247
- Yeo L.Y., Friend J.R., McIntosh M.P., Meeusen E.N.T., Morton D.A.V.: Ultrasonic nebulization platforms for pulmonary drug delivery Expert Opin. Drug Delivery 2010, 7:663-679.
- Zhang G., David A., Wiedmann T.S.: Performance of the vibrating membrane aerosol generation device: Aeroneb Micropump NebulizerTM
 J. Aerosol Med. 2007, 20(4):408-416
- Zweers M.L.T., Engbers G.H.M., Grijpma D.W., Feijen J.: In vitro degradation of nanoparticles prepared from polymers based on DL-lactide, glycolide and poly(ethylene oxide)
 J. Contr. Release 2004, 347-356

13. Anhang

Absorption und Brechungsindices für verschiedene Konzentrationen der vernebelten Fomulierungen

Die Absorption der unterschiedlichen Formulierungen mit Stabilisatoranteilen zwischen 5 und 20% (Zuckerlösungen), 0,5 und 2% (Polymerlösungen aus PVA und PVP) und 2 und 10% (Polymerlösungen aus PEG und Poloxamer 188) wurde auf einem Uv/Vis-Spektrophotometer (Ultrospec® 3000, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) bestimmt. Die Versuche wurden bei einer Wellenlänge von 633nm, mit einer Quarzküvette (1 cm Schichtdicke) und bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt. Für alle Zucker- und Polymerformulierungen in allen verwendeten Konzentrationen lag die Absorption <0,009 und war damit für die Berechnung des MMAD nach Mie zu vernachlässigen.

Der Brechungsindex der Formulierungen mit Stabilisatoranteilen zwischen 5 und 20% (Zuckerlösungen), 0,5 und 2% (Polymerlösungen aus PVA und PVP) und 2 und 10% (Polymerlösungen aus PEG und Poloxamer 188) wurde mit einem Refraktometer (Apotec VAR, Wepa, Hillscheid, Deutschland) bei einer Temperatur von 25 °C bestimmt.





14. Publikationsverzeichnis

 Beck-Broichsitter M., Kleimann P., Gessler T., Seeger W., Kissel T., Schmehl T.: Nebulization performance of biodegradable sildenafil-loaded nanoparticles using the Aeroneb® Pro: Formulation aspects and nanoparticle stability to nebulization

Int. J. Pharm 2012, 422:398-408

 Beck-Broichsitter, M., Kleimann, P., Schmehl, T., Betz, T., Bakowsky, U., Kissel, T., Seeger, W.: Impact of lyoprotectants for the stabilization of biodegradable nanoparticles on the performance of air-jet, ultrasonic, and vibrating-mesh nebulizers.

Eur. J. Pharm. Biopharm.2012, 82(2):272-280

Erklärung zur Dissertation

"Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch gleicher oder ähnlicher Form einer im Ausland in anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden."

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf dem Weg zur Vollendung meiner Doktorarbeit unterstützt und begleitet haben. Zunächst möchte ich Prof. Dr. Werner Seeger für die Möglichkeit danken, in einer seiner Arbeitsgruppen, der AG Schmehl/Gessler, arbeiten zu dürfen. Außerdem möchte ich mich bei den beiden Leitern der Arbeitsgruppe, Dr. Thomas Schmehl und Dr. Tobias Gessler, ganz herzlich für die geduldige und konstruktive Hilfe und Unterstützung während der letzten Jahre bedanken. Ihr habt mir immer zur Seite gestanden und mir geholfen, für jedes Problem, sei es technischer, organisatorischer oder mathematischer Art, eine Lösung zu finden. Ganz besonders möchte ich mich auch bei Dr. Moritz Beck-Broichsitter bedanken, der mich intensiv betreut und angeleitet hat. Ohne seine Hilfe wäre sicher alles viel schwerer und langsamer voran gegangen. Danke für das Engangement und die Unterstützung im Labor, bei der Recherche und bei der Korrektur meiner Arbeit.

Des Weiteren möchte ich all meinen Laborkolleginnen, Helene, Julia, Laura und Nicola danken, die mich nicht nur seelisch und moralisch unterstützt haben, sondern mit ihrer Laborerfahrung auch eine große Hilfe bei all den größeren und kleineren technischen Problemen waren und mir so manchen grauen Labortag erheitert haben.

Ganz wichtig ist es mir, meinen Freunden und Kommilitonen, die mich durch das Studium und während der Doktorarbeit begleitet haben, zu danken. Ich möchte besonders meine Mitbewohnerinnen, Sarah, Leen und Ninia nennen, die immer für mich da waren und mit so manchem Muffin/Kaffee/Schokoriegel das Gelingen dieser Arbeit entscheidend beeinflusst haben. Außerdem möchte ich mich bei Mimi, Suse, Anika, Christian, Mazze, Catharina und all meinen Freunden und Kommilitonen für die schöne Zeit bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei den Wichtigsten - meiner Familie - meiner Mutter Gisela, meinem Vater Wolfgang und meiner Schwester Vera bedanken. Danke, dass ihr immer für mich da seid!