

Entwicklung von Trockenvernebelungstechniken zur inhalativen Applikation pulmonalen Surfactants: Biophysikalische und tierexperimentelle Ergebnisse

TIM KUCHENBUCH

INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2012

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

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Entwicklung von Trockenvernebelungstechniken zur inhalativen Applikation pulmonalen Surfactants:

Biophysikalische und tierexperimentelle Ergebnisse



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Tim Kuchenbuch

aus Hamburg

Gießen, 2012

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik II
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität in Gießen

Gutachter: Herr Prof. Dr. med. A. Günther

Gutachter: Frau Prof. Dr. med. S. Rohrbach

Tag der Disputation: 27.11.2012

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1.0	Einleitung	1
1.1	Was ist Surfactant?	1
1.2	Bei welchen Erkrankungen ist das Surfactantsystem gestört?	2
1.3	Gibt es Hinweise für einen Einfluss der Surfactantveränderung auf V/Q mismatch, Gasaustausch und Compliance der Lunge von ARDS-Patienten?	3
1.4	Transbronchiale Surfactanttherapie – klinische Erfahrungen	4
1.5	Surfactant-Vernebelung als neues Therapieprinzip?	6
2.0	Fragestellung	7
3.0	Materialien und Methoden	8
3.1	Arzneimittel und Chemikalien	8
3.2	Biophysikalische Methoden zur Messung der Eigenschaften eines Aerosols	9
3.2.1	Laserdiffraktometrische Analyse des Partikelspektrums und Messung der Verneblerleistung	9
3.2.2	Nachweis der oberflächenspannungssenkenden Funktion des vernebelten Surfactants mittels „ <i>pulsating bubble surfactometer</i> “	10
3.3	Experimentelle Modelle des ARDS am Kaninchen	11
3.3.1	Schädigungsmodell durch repetitive Lavagen	11
3.3.2	Schädigungsmodell durch Bleomycin	13
3.4	Statistische Verfahren	13
4.0	Ergebnisse	14
4.1	Vorstellung unterschiedlicher Verneblertypen	14
4.2	Partikelspektren verschiedener Verneblertypen in Abhängigkeit des Flusses	22
4.3	Biophysikalische Charakterisierung des wiederaufgenommenen Aerosols	26
4.4	Ergebnisse der inhalativen Surfactantapplikation durch „ <i>dry-powder</i> “-Vernebelung	26

4.4.1	Ergebnisse mit dem „Lavage-Modell“	27
4.4.2	Ergebnisse mit dem Schädigungsmodell durch Bleomycin	28
5.0	Diskussion	31
5.1	Welche Therapiemöglichkeiten ergeben sich aus den gewonnenen Erkenntnissen für das ARDS?	31
5.2	Inwiefern eröffnen sich hiermit auch Therapiemöglichkeiten für andere Krankheitsbilder?	33
6.0	Zusammenfassung	34
7.0	Abstract	35
	Literaturverzeichnis	36
	Patentschrift Trockenvernebler vom 14.06.2006	47
	Lebenslauf	49
	Danksagung	50
	Erklärung zur Dissertation	51

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Prototyp 1 eines Trockenverneblers	15
Abbildung 2	Prototyp 2 eines Trockenverneblers	16
Abbildung 3	Prototyp 3 eines Trockenverneblers	17
Abbildung 4	Prototyp 4 eines Trockenverneblers	18
Abbildung 5	Prototyp 5 eines Trockenverneblers	19
Abbildung 6	Prototyp 6 eines Trockenverneblers	20
Abbildung 7	Prototyp 6 in der ambulant nutzbaren Ausstattung	21
Abbildung 8	Prototyp 6 während der Vernebelung	21
Abbildung 9	Messkurve der prozentualen Größenverteilung der Partikel	22
Abbildung 10	Messung der prozentualen Größenverteilung der Partikel	23
Abbildung 11	paO ₂ -Werte im Versuchsverlauf im Lavage-Modell	27
Abbildung 12	Compliance-Werte im Versuchsverlauf im Lavage-Modell	28
Abbildung 13	paO ₂ -Werte im Versuchsverlauf im Bleomycin-Modell	29
Abbildung 14	Compliance-Werte im Versuchsverlauf im Bleomycin-Modell	29
Abbildung 15	Druck-Volumenkurve vor und 60 min nach Vernebelung	30

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Natürliche und synthetische Surfactantpräparate	4
Tabelle 2	Verwendete Arzneimittel und Chemikalien	8
Tabelle 3	Prozentuale Verteilung der Partikelgrößen im vernebelten Aerosol	24
Tabelle 4	Output und Fluss	25
Tabelle 5	Oberflächenaktivität vor und nach Vernebelung	26

Abkürzungsverzeichnis

Δp	Druckunterschied
°C	Grad Celsius, 0 °C entspricht 273,15 K
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ALI	acute lung injury
AMV	Atemminutenvolumen
ARDS	<i>adult respiratory distress syndrome</i>
art.	arteriell
Bpm	<i>beats per minute / breath per minute</i>
Cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
D	Tag
et al.	et altera
FiO ₂	Sauerstoff-Fraktion der Inspirationsluft bei 100% O ₂ FiO ₂ = 1
G	Gramm
H	Stunde
H ₂ O	Wasser
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IRDS	<i>infant respiratory distress syndrome</i>
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LSA	<i>large surfactant aggregates</i>
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule, 1 mm Hg entspricht ca. 133,3 Pa

MMAD	<i>mass median aerodynamic parameter</i>
mN/m	Millinewton pro Meter
mWs	Meter Wassersäule 1 mWs = 9,80665 kPa
n	Anzahl
n.s.	nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NaCl-Lsg.	isotonische Kochsalzlösung
O ₂	Sauerstoff
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
Pa	Pascal, 1 Pa = 1 N/m ²
paCO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
paO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- konzentration
p _{insp}	Beatmungsdruck bei der Inspiration des intubierten Patienten
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
r	Radius
RDS	<i>respiratory distress syndrome</i>
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SEM	Mittelwert mit Standardfehler
SP	Surfactantprotein
V.	Vena
ZEEP	<i>zero endexpiratory pressure</i>
γ	Grenzflächenspannung

1. Einleitung

1.1 Was ist Surfactant?

Atmung ist der Gasaustausch zwischen Zellen und der Umgebung. Bei lungenatmenden Lebewesen diffundiert Sauerstoff über die Atemluft in das Blut und Kohlendioxid aus dem Blut in die Ausatemluft. Dies geschieht in den Alveolen, der kleinsten Untereinheit der Lungen. Für den Gasaustausch muss die pulmonale Endstrecke überwunden werden, welche aus Endothelzellen, Alveolarepithelzellen (Pneumozyten) und Bindegewebszellen besteht.

Der überwiegende Teil des Alveolarepithels wird durch Pneumozyten Typ I gebildet, dies sind abgeflachte und weit gestreckte Deckzellen. Zwischen diesen Zellen liegen die Typ-II-Pneumozyten, d.h. hochaufgebaute Zellen, die Surfactant produzieren und abbauen können. Surfactant (*surface active agent*, also oberflächenaktives Agens) ist ein aus Phospholipiden, vor allem Lecithin und Sphingomyelin, und Proteinen (50 % nicht spezifische Plasmaproteine und 50 % Surfactant-Apoproteine A-D) bestehendes Stoffgemisch, welches die Innenseite der Alveolen mit einem Film überzieht [1, 2, 3, 4]. Surfactant setzt die alveoläre Oberflächenspannung stark herab und ermöglicht somit den Gasaustausch unter normalen transthorakalen Druckverhältnissen. Dies geschieht durch eine Stabilisierung der Alveolen während der Expiration und der Verhinderung des Kollapses in der Endexpirationsstellung.

Des Weiteren ist das Surfactantsystem auch für den intrapulmonalen Wasserhaushalt von wichtiger Bedeutung. Zusätzlich gibt es deutliche Anzeichen dafür, dass das Surfactantsystem immunregulatorische Funktionen wahrnimmt [5, 6, 7, 8].

Das Vorhandensein eines intakten pulmonalen Surfactantsystems ist Voraussetzung für eine ungestörte Lungenfunktion, einen physiologischen Gasaustausch und einen normalen alveolären Flüssigkeitshaushalt. Die Beeinträchtigung des pulmonalen Surfactants mit fehlender oder verminderter Reduktion der Oberflächenspannung ist ein wesentlicher Faktor für die Entstehung einer respiratorischen Insuffizienz [9, 10].

Im Folgenden werden zunächst Krankheiten vorgestellt, die mit einer Störung der Surfactanthomöostase einhergehen. Anschließend wird eine neue Methode der therapeutischen Applikation von exogenem Surfactant vorgestellt, gefolgt von tierexperimentellen Untersuchungsergebnissen.

1.2 Bei welchen Erkrankungen ist das Surfactantsystem gestört?

Viele Krankheitsbilder gehen mit einem Surfactantmangel, einem erhöhten Abbau von Surfactant oder aber einer mangelhaften oder fehlenden Surfactantbildung einher. Das *infant respiratory distress syndrome* (IRDS) stellt die häufigste Todesursache des Neugeborenen dar. Etwa 1 % aller Neugeborenen erleiden ein IRDS, das auf einem weitgehenden Mangel funktionstüchtigen Surfactants aufgrund der fetalen Lungenunreife der Frühgeborenen beruht [11]. Als kausalen Therapieansatz hierfür sind in den letzten Jahren unterschiedliche Surfactantpräparate entwickelt und mit überwältigendem Erfolg eingesetzt worden. Im Bereich der Erwachsenenmedizin sind das *adult respiratory distress syndrome* (ARDS) und die Lungenfibrose Beispiele für eine gestörte Zusammensetzung des endogenen Surfactantpools [12, 13, 14, 15].

Das Phospholipidprofil sowie das Fettsäurespektrum des Phosphatidylcholins sind verändert, die hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C sind stark reduziert und die Fraktion der *large-surfactant-aggregates* (LSA), die Präkursorfraktion des Oberflächenfilms ist ebenfalls deutlich reduziert. Vor allem beim ARDS ist ein weiterer wesentlicher Mechanismus der gestörten Surfactantfunktion die Inhibition der Surfactantfunktion durch Plasmaproteine. Von besonderer Bedeutung erscheint in diesem Zusammenhang die alveoläre Fibrinbildung, da hierbei eine Inkorporation aller hydrophoben Surfactantkomponenten in das Fibringerüst stattfindet und eine Depletion der alveolären Grenzfläche von nahezu allen Surfactantkomponenten stattfindet [16, 17]. Diese Veränderungen bewirken in der Summe eine deutliche Erhöhung der minimalen Oberflächenspannung.

Weiterhin können durch eine Inhalation toxischer Gase die Alveolarzellen direkt geschädigt werden, so dass eine Produktion von endogenen Surfactant unmöglich wird [18, 19, 20].

1.3 Gibt es Hinweise für einen Einfluss der Surfactantveränderung auf V/Q-mismatch, Gasaustausch und Compliance der Lungen von ARDS-Patienten?

Störungen des respiratorischen Systems durch Surfactantmangel führen zu Alveolarkollaps und Bildung von dystelektatischen oder atelektatischen Bezirken. Die Oberflächenspannung eines lungengesunden Patienten beträgt nahezu 0 mN/m in der Endexpiration. Patienten, die intubationspflichtig im Rahmen eines ARDS oder an einer schweren Pneumonie erkrankt waren, zeigten Oberflächenspannungswerte im Bereich von 20 mN/m [21, 22]. Über den hierdurch bedingten Alveolarkollaps kommt es zum Shuntfluß und somit zur arteriellen Hypoxämie. Dieser Shuntfluß kann beim ARDS Patienten bis zu 50 % des Herzzeitvolumens (HZV) mit entsprechenden Hypoxämien betragen [23, 24, 25, 26].

Durch die Abnahme des funktionell intakten pulmonalen Surfactants kommt es zudem zu einer Verringerung der pulmonalen Compliance mit Herabsetzung der funktionalen Residualkapazität [8, 9, 10, 11]. Weiterhin erfolgt ein Anstieg des Lungengefäßwiderstandes mit daraus resultierender Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes [27, 28]. Nach Caironi kommt es beim ARDS zu einer inhomogenen Schädigung der Lungenareale [29]. Vollkommen gesunde Areale wechseln sich mit kollabierten bzw. atelektatischen Arealen ab. Ein wesentliches Ziel der lungenprotektiven Beatmung ist neben der Rekrutierung dieser kollabierten Areale die Vermeidung einer Überdehnung noch gesunder Lungenareale [29, 30].

Die verminderte Compliance der Lunge erzwingt beim spontan atmenden Patienten eine massiv gesteigerte Atemarbeit; beim beatmeten Patienten müssen die Beatmungsdrücke erhöht werden. Dies führt wiederum zu einer verringerten Perfusion und somit zu einem verstärkten Ventilations-Perfusions-Mismatch. Über die Störung des Flüssigkeitsgleichgewichts kommt es zum Plasmaleakage, was die Inaktivierung der Surfactantfunktion noch verstärkt.

1.4 Transbronchialen Surfactanttherapie – klinische Erfahrungen

Es liegt nahe, über eine Zuführung von exogenem Surfactant bei ARDS Patienten die Oberflächenspannung zu senken und den Gasaustausch zu verbessern. Durch die Verbesserung der Compliance könnte zudem die Invasivität der Beatmung deeskaliert werden. Beim IRDS ist die Surfactantapplikation, wie bereits erwähnt, klinisch etabliert und hat die Mortalität um 50 % senken können [31, 32, 33].

Grundsätzlich existieren hierfür auf dem Markt verschiedene Surfactantpräparationen, die aus Lavagen oder aus homogenisierten Lungen vom Schwein und Rind gewonnen werden. Diese Präparate kommen momentan routinemäßig beim IRDS zur Anwendung. Auch synthetische Surfactantpräparate wurden in der Vergangenheit hergestellt. Diese haben den Vorteil, dass die Zusammensetzung besser definiert ist und möglicherweise größere Mengen an Surfactant verfügbar wären. Die Möglichkeit einer Übertragung von humanpathogenen Bakterien, Viren und Prionen ist gering bis nicht vorhanden. Ein möglicher Nachteil ist, dass diese synthetischen Präparate mit Ausnahme des auf rekombinant hergestellten SP-C beruhenden Surfactants Venticute, keine hydrophoben Surfactantproteine beinhalten. Die Surfactantpräparate unterscheiden sich also nicht nur im Ursprung sondern auch in der Zusammensetzung.

Präparat	Herkunft	Zusammensetzung	
		Phospholipide	Apoproteine
Venticute	synthetisch	DPPC, PG, PA	Rec.SP-C (2 %)
Survanta	Rind	84 % *	SP-B, C (1 %)
Infasurf	Kalb	95 % *	SP-B, C (1 %)
Alveofact	Rind	88 %	SP-B, C (1 %)
Amnionflüssigkeit-surfactant	Mensch	85 %	SP-A, B, C (5 %)
Curosurf	Schwein	99 %	SP-B, C (1 %)
ALEC	synthetisch	DPPC, PG	keine
Exosurf	synthetisch	DPPC	keine

*Die Endkonzentration ist mit synthetischen DPPC, Tripalmitin und Palmitinsäure angereichert.

Tabelle 1: Natürliche und synthetische Surfactantpräparate, die in kontrollierten und randomisierten Studien untersucht wurden (modifiziert nach [34]).

In tierexperimentellen Studien des ARDS durch repetitive Lavagen in Schweinen [24] sowie bei der Ratte [35, 36] zeigte sich eine deutliche Verbesserung der Oxygenierung, der Compliance sowie des *ventilation efficiency index* (VEI).

Im Rahmen des Mekonium-Aspirations-Syndroms, einem ARDS ähnlichem Krankheitsbild, kommt es zu einer direkten Inhibition der Surfactantfunktion [37]. Auch hier konnte in einer Vielzahl von tierexperimentellen Studien der Nutzen einer exogenen Surfactantapplikation nachgewiesen werden [38, 39, 40, 41].

Die klinisch derzeit angewandte Applikationsform zur Substitution von Surfactant beim IRDS und beim Mekonium-Aspirations-Syndrom bei Kindern ist die Instillation. Bei der Instillation wird die in Flüssigkeit gelöste Emulsion direkt in die Trachea instilliert (intratracheale Instillation). Bei erwachsenen Patienten wurden in der Vergangenheit Surfactantpräparate auch bronchoskopisch eingebracht (intrabronchiale Instillation) [42]. Bei der intratrachealen Instillation hat es sich als hilfreich erwiesen, den Patienten in 30° Beintieflage zu lagern und die Surfactantemulsion in zwei Schritten jeweils in Seitenlage zu substituieren.

Die Anwendung von Surfactant beim ARDS des erwachsenen Patienten ist eine allerdings noch sehr umstrittene Therapieoption. Bis dato konnte in mehreren Studien eine signifikante Senkung der Mortalität in Folge einer Surfactanttherapie nicht nachgewiesen werden [43, 44, 45], wohl aber eine signifikante Erhöhung des arteriellen pO_2 [42, 44, 45, 46].

Als Gründe für die fehlende Beeinflussung des in der Intensivmedizin so wichtigen Parameters „Überleben nach 28 Tagen“ wurden die Dauer der Behandlung, die Dosis, das Applikationsverfahren und die Art des verwendeten Materials diskutiert [42, 47, 48]. Darüber hinaus könnte auch ein Unterschied zwischen direktem (Aspiration, Pneumonien) und indirektem (Trauma, Pankreatitis, Sepsis) ARDS bestehen. Zumindest belegen die Daten zweier Studien, dass Patienten mit direktem ARDS viel deutlicher von einer Surfactanttherapie profitieren könnten [49].

1.5 Surfactant-Vernebelung als neues Therapieprinzip?

In tierexperimentellen ARDS-Modellen wurden in der Vergangenheit mehrfach Versuche unternommen, Surfactant als Aerosol pulmonal zu deponieren. In diesen Studien konnte ebenfalls gezeigt werden, dass beim homogen verteilten ARDS grundsätzlich eine bessere Verteilung des Surfactants nach Vernebelung im Vergleich zur Instillation erzielbar war. Außerdem konnte mit zum Teil deutlich geringeren Mengen an pulmonal inhalativ deponierten Surfactantmaterial (zum Teil nur ~10 %) der gleiche Einfluss auf die Compliance und den Gasaustausch erreicht werden wie mit instilliertem Surfactant. Eine Umsetzung der Erkenntnisse auf klinischer Ebene scheiterte bis dato allerdings an den technischen Limitationen. So blieb eine prospektive, randomisierte Studie mit inhalativ verabreichten Exosurf bei ARDS-Patienten wohl vor allem deswegen ohne irgend einem erkennbaren Einfluss, weil nicht nur ein sehr inhibitionsanfälliges Surfactantpräparat, sondern auch viel zu geringe Mengen davon klinisch verabreicht wurden [43].

Unter Verwendung von Düsenverneblern (Venturi-System) können nur geringe Vernebelungsleistungen von ~100 mg/h erzielt werden, gepaart mit einem ausgesprochen hohen Fluss durch den Vernebler. Mittels der Ultraschallvernebelung können größere Mengen an Surfactant vernebelt werden. Allerdings muss das System kontinuierlich gekühlt werden, um eine Proteindegeneration zu vermeiden.

Mit der neuen Piezo-Technik kann die Vernebelungsleistung ebenfalls nicht ausreichend gesteigert werden, um adäquate Mengen an Surfactant beim erwachsenen Patienten pulmonal deponieren zu können. Schließlich muss bei der Feuchtvernebelung das Beatmungsschlauchsystem erwärmt werden, um die Abscheidung relevanter Mengen des Aerosols bereits im Schlauch zu verringern [50].

Prinzipiell erscheint also die Vernebelung als Verfahren der Wahl zur homogenen Surfactantapplikation. Zielsetzung muss jedoch sein, ein Verfahren zur Surfactantaerosolgenerierung zu entwickeln, welches einen ausreichenden Massentransfer von Surfactant in die Lungen erwachsener Patienten gewährleistet.

Für dieses Vorgehen erscheinen Pulver- oder Trockenvernebler als idealer Ansatz zur Lösung dieses Problems. Ein solches Konzept wurde daher in der folgenden Arbeit überprüft.

Wesentliche Anforderungen an ein solches Verneblersystem waren eine direkte Integration in den inspiratorischen Schenkel des Beatmungssystems, eine mögliche Nutzung auch unter Spontanatmung, ein optimales Partikelspektrum und eine einfache Handhabung. Als Ausgangsmaterial sollte ein bereits mikronisiertes Surfactantpulver verwendet werden, da dies am ehesten ein alveolargängiges Partikelspektrum nach Vernebelung verspricht.

2.0 Fragestellung

Aufgrund des oben beschriebenen Wissensstandes ergeben sich für die vorliegende Arbeit folgende Fragestellungen:

- 1 Ist die Trockenvernebelung einer mikronisierten Surfactantpräparation, basierend auf einem synthetischen Phospholipidgemisch und rekombinant hergestelltem SP-C (rSP-C Surfactant), grundsätzlich möglich?
- 2 Können hierbei klinisch relevante Mengen eines Surfactantaerosols (5-15 g/30 min) generiert werden?
- 3 Weist das derart generierte Trockenaerosol ein alveolargängiges Partikelspektrum auf (MMAD unter 5 μm)?
- 4 Bewirkt die Trockenvernebelung eine Schädigung der biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften des Surfactants?
- 5 Kann am Kaninchenmodell der akuten respiratorischen Insuffizienz infolge repetitiver Lavagen und schädigender Beatmung und am Bleomycinmodell durch eine Trockenvernebelung von Surfactant Einfluss auf den Gasaustausch und die Compliance der Lunge genommen werden?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden unterschiedliche Trockenvernebler (*dry powder nebulizer*) konstruiert, unter Berücksichtigung des Partikelspektrums und der Verneblerleistung modifiziert, und an zwei Tiermodellen der respiratorischen Insuffizienz überprüft.

3.0 Materialien und Methoden

3.1 Arzneimittel und Chemikalien

Die für die Versuche benötigten wichtigsten Substanzen sind alphabetisch angeordnet und mit Herstellernamen nachfolgend aufgeführt. Alle anderen Stoffe wurden von entsprechenden Firmen mit höchstmöglichem Reinheitsgrad bezogen.

Name	Hersteller	Wirkstoffe
Aqua ad Injectabilia	Braun Melsungen, Melsungen	H ₂ O
Arterenol [®]	Bayer AG, Leverkusen	Noradrenalin
Bleomycin [®]	Admirall S.A., Barcelona	Bleomycin
Braunoderm [®]	Braun Melsungen, Melsungen	2-Propanol, Povidon-Iod
Ketanest [®] 50 mg/ml	Parke-Davis GmbH, Berlin	Esketaminhydrochlorid
Kochsalzlösung 0,9 %	Braun Melsungen, Melsungen	NaCl-Lsg.
Liquemin [®] N25000	Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen	Heparin-NaCl 5000 I.E./ml
Natriumhydrogencarbonat 8,4 %	Braun Melsungen, Melsungen	NaHCO ₃
Rompun [®] 2 %ige Lösung	Bayer AG, Leverkusen	Xylazin
Softasept [®] N	Braun Melsungen, Melsungen	Ethanol, 2-Propanol
Xylocain [®] 2 %	ASTRA Chemicals GmbH, Wedel/Holstein	Lidocainhydrochlorid
Suprarenin [®]	Bayer AG, Leverkusen	Epinephrin
Venticute [®]	Altana Pharma, Konstanz	recombinantes humanes SP-C mit Phospholipid / Fettsäurematrix (DPPC, POPG) 98 % + 2 % (wt/wt) rSP-C

Tabelle 2: Verwendete Arzneimittel und Chemikalien.

3.2 Biophysikalische Methoden

3.2.1 Laserdiffraktometrische Analyse des Partikelspektrums und Messung der Verneblerleistung

Für den therapeutischen Effekt eines vernebelten Medikamentes ist die Größenverteilung der Aerosolpartikel sowie die biophysikalische und biochemische Stabilität von großer Bedeutung.

Die Untersuchung der Partikelgrößenverteilung des erzeugten Aerosols wurde mittels eines kommerziell erhältlichen Laserdiffraktometers (Helios, Sympatec GmbH, Clausthal-Zellerfeld) durchgeführt [50, 51, 52, 53].

Es wurden mit jedem neu entwickelten Prototypen jeweils 3 Messungen mit jeweils 20 Messzyklen und mindestens drei unterschiedlichen Arbeitsdrücken durchgeführt. Die Versuche erfolgten zur besseren Vergleichbarkeit unter standardisierten Bedingungen. Die Vernebler wurden in einer Haltevorrichtung mit einem Abstand von 1 cm vor dem Diffraktometer fixiert. Das bereits gemessene Aerosol wurde durch einen 10 cm von dem Messbereich entfernten handelsüblichen Staubsauger abgesaugt, um eine Aerosolwolke im Messbereich zu verhindern. Zur Einstellung des Betriebsdruckes wurde synthetische Luft verwendet.

Gleichzeitig wurde die Aerosolabgabe durch den Vernebler bei unterschiedlichen Betriebsdrücken ermittelt. Die Quantifizierung der vernebelten Masse an Surfactant erfolgte durch Gewichtsbestimmung der Verneblerkammer, des Filtersystems in das das erzeugte Aerosol eingeleitet wurde, sowie des Schlauchsystems vor und nach Vernebelung für jeweils eine Minute. In diesem Messzeitraum erfolgten auch die 20 einzelnen Messzyklen, bei denen die Werte automatisch gemittelt wurden.

Da es sich um ein Trockenaerosol handelt, haben Größen wie z. B. Verdunstung oder Verdampfung keinen Einfluss. Das im Filter aufgefangene Aerosol, der im Vernebler verbliebene Rest und ein zuvor aliquotierter Teil des Surfactants wurden zur Aktivitätsprüfung biophysikalisch und biochemisch untersucht.

3.2.2 Nachweis der oberflächenspannungssenkenden Funktion des vernebelten Surfactants mittels *pulsating bubble surfactometer*

Wie bereits beschrieben, liegt eine wesentliche Aufgabe des Surfactansystems darin, die alveoläre Oberflächenspannung auf ein Minimum zu reduzieren, um somit den Alveolarkollaps zu verhindern (Oberflächenspannung nahe 0 mN/m). Hierfür ist sowohl die rasche Adsorption des Surfactants an die Luft-Wasser-Grenzfläche wie auch ein hohes Maß an Filmstabilität unterschiedlicher Filmkomponenten notwendig. Im Rahmen der Entwicklung eines klinisch anwendbaren Vernebelungssystems ist neben der Alveolargängigkeit auch die verbleibende Oberflächenaktivität des vernebelten Agens von ganz entscheidender Bedeutung.

Die biophysikalischen Eigenschaften eines Surfactantpräparates können in vitro mittels des *pulsating bubble surfactometers* überprüft werden. Hierbei wird auf der Grundlage des Young/Laplace'schen Gesetzes ($\Delta p = 2\gamma/r$) mit einem Gerät die an einer Grenzfläche zwischen einer wässrigen Lösung und einer luftgefüllten Blase existente Oberflächenspannung ermittelt. Hieran erkennt man, dass, je kleiner die Blasen sind, der Druck zur Eröffnung umso höher sein muss. Bei einem intakten Surfactantsystem mit Oberflächenspannungen nahe 0 mN/m ist somit nur ein geringer Druck notwendig um einen Alveolarkollaps zu verhindern, bei einem insuffizienten Surfactantsystem sind deutlich höhere Drücke hierfür notwendig.

Über ein mit Aqua dest. gefüllten Hohlraumssystem steht das Probengefäß in Verbindung mit einem Druckaufnehmer und einem beweglichen Kolben, mit dem ein definiertes Pendelvolumen erzeugt wird (0,43 µl). Die Pulsationsfrequenz lässt sich hierbei beliebig anpassen. In den Vorversuchen wurde rekombinantes SP-C (Venticute, Altana Pharma, Konstanz) in ein Filtersystem vernebelt und eine vorher aliquotierten Probe, der Rest im Vernebler und das aufgefangene Aerosol nach Auflösen des Aerosols in steriler Kochsalzlösung und Einstellung einer Konzentration von 2 mg/ml mittels des *pulsating bubble surfactometer* untersucht. Es wurden die minimale Oberflächenspannung nach 5 Minuten Filmszillation bei minimalem Blasenradius in Abwesenheit sowie Gegenwart inhibitorisch wirksamer Plasmaproteine (Endkonzentration 8 mg/ml) gemessen. Diese Versuche wurden mit 5 zu unterschiedlichen Zeiträumen gewonnenen Proben wiederholt (n=5).

3.3 Experimentelle Modelle des ARDS am Kaninchen

3.3.1 Schädigungsmodell durch repetitive Lavagen

Dieses Modell stellt das Standardmodell zur Charakterisierung von therapeutischen Effekten exogenen Surfactants dar [35, 36, 54, 55, 56]. Es fußt auf dem Lavage-bedingten Mangel an pulmonalem Surfactant mit konsekutiver sekundärer Erhöhung der epithelialen Permeabilität [35, 36, 54, 55, 56].

Um noch näher an die klinische Realität heranzureichen, wurde in dem hier verwendeten Modell durch repetitive Lavagen noch eine zusätzliche „schädigende Beatmung“, charakterisiert durch *zero endexpiratory pressure* (ZEEP) mit hohen Beatmungsdrücken, für die Zeit von einer Stunde durchgeführt.

Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere gewogen. Das durchschnittliche Gewicht der Tiere lag bei 2,81 kg (n=34). Nach Punktion der Ohrtrandvene mittels venöser Verweilkanüle erfolgte die Sedierung durch Bolusapplikation eines Ketanest[®]/Rompun[®]-Gemisches, später als kontinuierliche Applikation über einen Perfusor.

Nach Lagerung der Tiere in Rückenlage auf dem gewärmten Präpariertisch erfolgte eine Bolusapplikation von Xylocain[®] 1 % suprasternal subcutan und die Präparation der collaren Strukturen. Nach Freilegung der Trachea erfolgte die Tracheotomie, folgend die Präparation und Kanülierung der A. carotis communis sinistra.

Im Anschluss wurde eine kontinuierliche invasive Blutdruckmessung durchgeführt. Nun erfolgte die Präparation der V. jugularis communis dextra und das Einbringen einer Schleuse für einen pulmonalarteriellen Katheter. Über diese wurden konstant 60 ml/h isotonische NaCl-Lösung infundiert. Nun erfolgte das Einbringen des PA-Katheters unter kontinuierlicher Bestimmung der Vitalparameter. Zum Abschluss der Präparation erfolgte die Anlage eines transurethralen Blasenkatheters (10F). Die Versuchsvorbereitung erfolgte unter druckkontrollierter, normokapnischer Beatmung mittels eines Babylog 8000+ (Dräger, Lübeck; FiO₂: 1). Folgende Grundeinstellung wurde gewählt: maximaler Inspirationsdruck (P_{insp}) 8 cm H₂O, Frequenz 40 bpm, Tidalvolumen 7 ml/kg KG (was ein AMV von 280 ml/kg KG entspricht) und PEEP 3 cm H₂O.

Nun wurde der PEEP in Schritten von 2 cm H₂O in einem Zeitintervall von 30 min pro Erhöhung stufenweise eskaliert. Es erfolgten regelmäßige Blutgasanalysen im Sinne eines *search of best PEEP*. Als maximaler PEEP wurden 7 cm H₂O festgelegt. Unter diesem Beatmungsregime waren alle Tiere noch hämodynamisch stabil.

Es erfolgte eine Blutgasanalyse zum Festlegen des maximalen pO_2/FiO_2 Wertes zum Zeitpunkt T0. Nun erfolgten die repetitiven Lavagen. Hierzu wurde jeweils 50 ml einer 37° C warmen NaCl-Lösung mittels einer Spitze mit dem Tracheostoma konnektiert und langsam endotracheal appliziert. Nach einer Verweildauer von 10 Sekunden wurde die Flüssigkeit vorsichtig aspiriert. Im Mittel konnten 85 % der Lavageflüssigkeit reaspiriert werden.

Nach jeweils 20 Minuten erfolgten erneute Blutgasanalysen. Bei einem paO_2 von über 200 mmHg wurde die Lavageprozedur wiederholt. Bei Erreichen des gewünschten paO_2 -Wertes unter 200 mmHg wurde das Tier im Rahmen einer *steady-state-phase* für 30 Minuten unter denselben Bedingungen weiter ventiliert und Persistenz eines $paO_2 < 200$ mmHg wurde die schädigende Beatmung begonnen.

Hierzu wurde der PEEP innerhalb von 5 min auf 0 cm H₂O reduziert und der Spitzendruck auf 30 cm H₂O augmentiert. Hierunter waren durchschnittlich Tidalvolumen von 9 ml/kg KG bei durch die Lavage deutlich reduzierter Compliance der Lunge zu erreichen. Die Atemfrequenz wurde entsprechend der arteriellen Blutgasanalysen angepasst, so dass sich unter Beatmung Normokapnie einstellte.

Diese Beatmung wurde für eine weitere Stunde beibehalten. Danach wurde der PEEP wieder auf den Ausgangswert (PEEP von 5-7 cm H₂O) schrittweise augmentiert und der Inspirationsdruck so eingestellt, dass wieder ein Atemzugvolumen von 6-8 ml/kg Körpergewicht vorlag. Die Beatmungsfrequenz wurde nach Blutgasanalyse adaptiert. Dieser Wert ergab den paO_2 -Wert zum Zeitpunkt T0.

Nach 15 Minuten wurde eine einminütige Surfactantvernebelung über den in den Inspirationsschenkel integrierten *dry-powder*-Vernebler durchgeführt. Die hierbei vernebelte Surfactantmenge lag bei ca. 400 mg; wie viel hiervon die Lunge erreichte und pulmonal deponiert wurde, ist ungeklärt. Als Kontrolle diente hierzu eine unbehandelte Kontrollgruppe (n=10).

Es folgten arterielle Blutgasanalysen nach 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 und 300 Minuten. Zeitgleich wurden die Werte der Gerätecompliance registriert und ausgewertet. Nach Versuchsende wurden die Tiere mittels Überdosis Ketanest[®] und Rompun[®] getötet. Die Anzahl der Therapieversuche belief sich auf 10 (n=10).

3.3.2 Schädigungsmodell durch Bleomycin

Das Modell der Lungenschädigung durch einmalige inhalative Applikation des Zytostatikums Bleomycin am Kaninchen ist ein etabliertes Verfahren [12, 57, 58].

Zu diesem Zweck wurden antibiotisch vorbehandelte Tiere nach Einleitung einer Narkose eines Ketanest[®]/Rompun[®]-Gemisches und orotrachealer Intubation volumengesteuert maschinell beatmet. Unter Verwendung eines Ultraschall-Verneblers (MMAD ~2,5 µm) wurden exakt 1,8 U/kg KG Bleomycin inhalativ verabreicht.

Es entwickelt sich zunächst ein ARDS-ähnliches Geschehen, mit einer massiven Einschränkung des Gasaustausches (p_{aO_2}/F_{iO_2} von > 500 mmHg in den Kontrollen reduziert auf ~110 mmHg am Tag 4).

Am vierten Tag nach Bleomycinapplikation wurden die Tiere nach dem vorstehend beschriebenen Regime präpariert und ventiliert (PEEP von 5-7 cm Ws, Tidalvolumen von 6-8 ml/kg KG). Eine zusätzliche Schädigung der Lunge durch eine *injurious ventilation* fand bei diesem Modell nicht statt. Nach 30 Minuten erreichten die Tiere eine *steady-state-phase*, so dass nun über 1 min inhalativ Surfactant verabreicht wurde. Direkt nach Vernebelung wurde für 5 min Kochsalzlösung über einen Düsenvernebler appliziert um eine sichere Auflösung des Surfactantaerosols zu gewährleisten.

Im Folgenden wurden arterielle Blutgasanalysen nach 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 und 300 Minuten durchgeführt sowie die Gerätecompliance registriert. Nach Versuchsende wurde das Tier euthanasiert, die Lungen zur Surfactantdiagnostik lavagiert und für weitere Versuche entnommen und eingefroren. Auch diese Versuche wurden 10-mal wiederholt (n=10).

3.4. Statistische Verfahren

Es wurde ein allgemeines lineares Modell zur Auswertung der Daten aus den Versuchen des Kaninchen-Lavage-Modells und des Kaninchen-Bleomycin-Modells angewendet. Zielgrößen waren p_{O_2}/F_{iO_2} und die Compliance; Einflussgrößen die Zeit nach Surfactant-Vernebelung und Gruppe (Kontrolle/Behandlung). Die Auswertung erfolgte in Hinsicht auf die Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Kontrolltiere zu den behandelten Tieren. Diese Unterschiede werden im Modell durch den Interaktionseffekt von Zeit x Gruppe abgebildet. Wenn erforderlich, wurden die Werte der Zielgröße logarithmiert, um normalverteilte Residuen zu erhalten und so die Anwendbarkeit eines allgemeinen linearen Modells rechtfertigen zu können. Die Verteilung der Residuen wurde anhand von Normal-Quantilen-Quantilen-Plots auf Konformität mit Normalverteilung und Homoskedastizität geprüft.

4.0 Ergebnisse

4.1 Vorstellung unterschiedlicher Verneblertypen

Im Zuge der Entwicklung des Verneblungssystems wurde eine Reihe von Prototypen (Abb.1-6) entworfen. Die Ausführung der ersten beiden Prototypen wurde verlassen, da hierfür ein großer Fluss durch den Vernebler nötig war und eine direkte Integration in ein Beatmungssystem nicht erfolgen konnte. In den Modellen mit integrierten Prallplatten und Kegeln zeigte sich, dass aufgrund der geringen Dichte der Partikel die im Rahmen der Flüssigkeitsvernebelung eingesetzten Verfahren zur Reduzierung der Partikelgröße bei der Surfactanttrockenvernebelung keine Wirkung zeigen. Im Luftstrom zeigten die größeren Partikel dieselben aerodynamischen Eigenschaften wie die kleineren, so dass durch diese Technik keine Verringerung des Partikelspektrums möglich war. Somit wurde auch diese Technik wieder verlassen. Erst durch den Einsatz der Düsen mit direkt gegeneinander gerichteten Luft-einlässen wurde über das Zusammenprallen der Partikel in der Düse das geringe Partikelspektrum erreicht (Abb.6).

Am Ende des Prozesses lag ein hinsichtlich der Verneblungstechnik, des Surfactant-Fassungsvermögens, des Partikelspektrums und des Handlings optimiertes Gerät vor. Somit wurde auch die Anwendung am nicht intubierten Patienten möglich (Abb. 7-8).

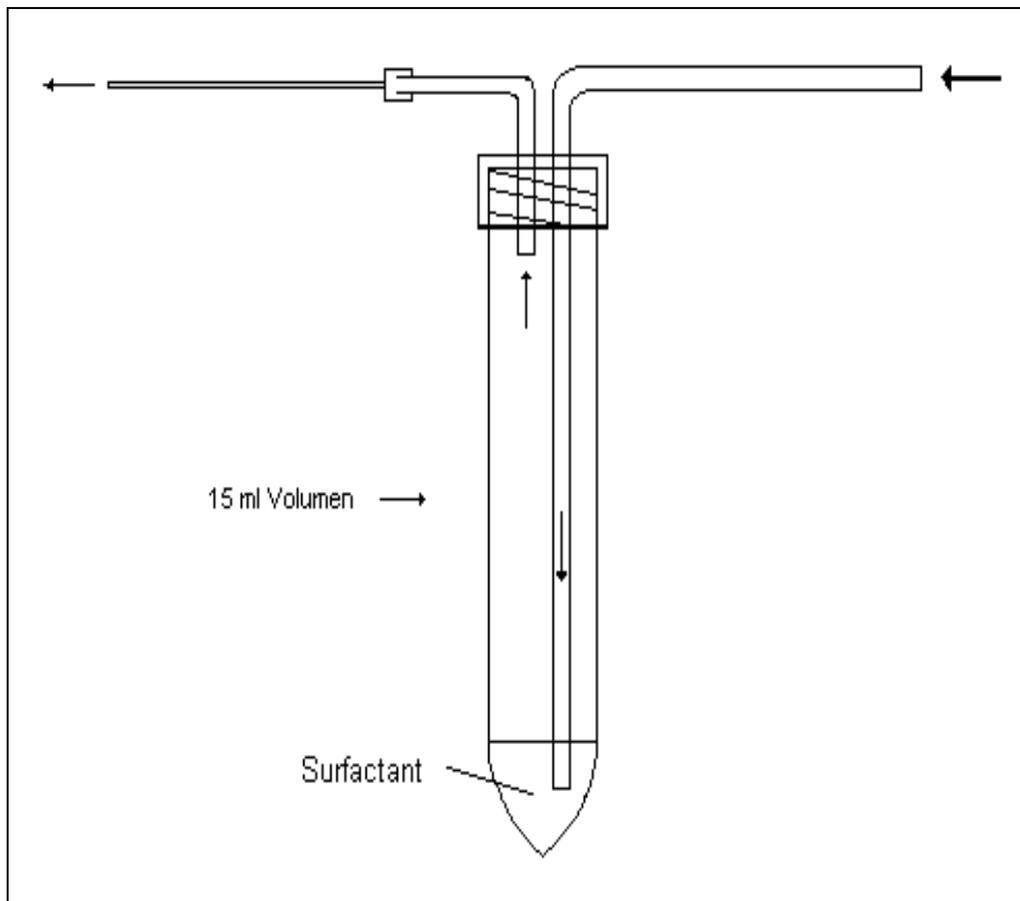


Abbildung 1: Prototyp 1 eines Trockenverneblers noch ohne spezielle Düsenanordnung. Die Zerstäubung erfolgt über einen hohen Fluss durch den Vernebler (6-8 l/min). Als Gasauslass dient ein ca. 0,8 mm messender Katheter, der im Versuch durch ein Verbindungsstück in den Tubus eingebracht wurde. Befüllung mit max. 0,8 g Surfactant.

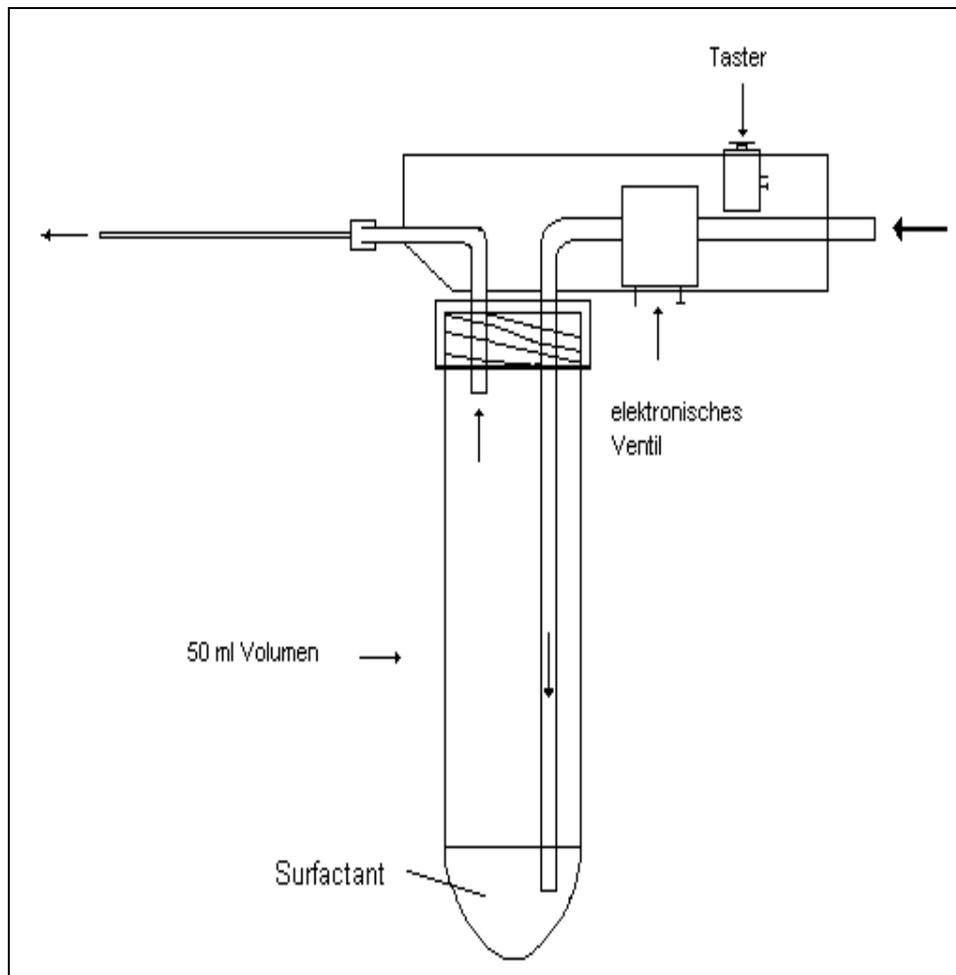


Abbildung 2: Prototyp 2 als Weiterentwicklung des Prototyps 1 mit ähnlicher Anordnung jedoch größerem Füllvolumen. Auch hierbei erfolgte die Applikation über den Katheter in den Tubus. Füllmenge bis 2 g Surfactant.

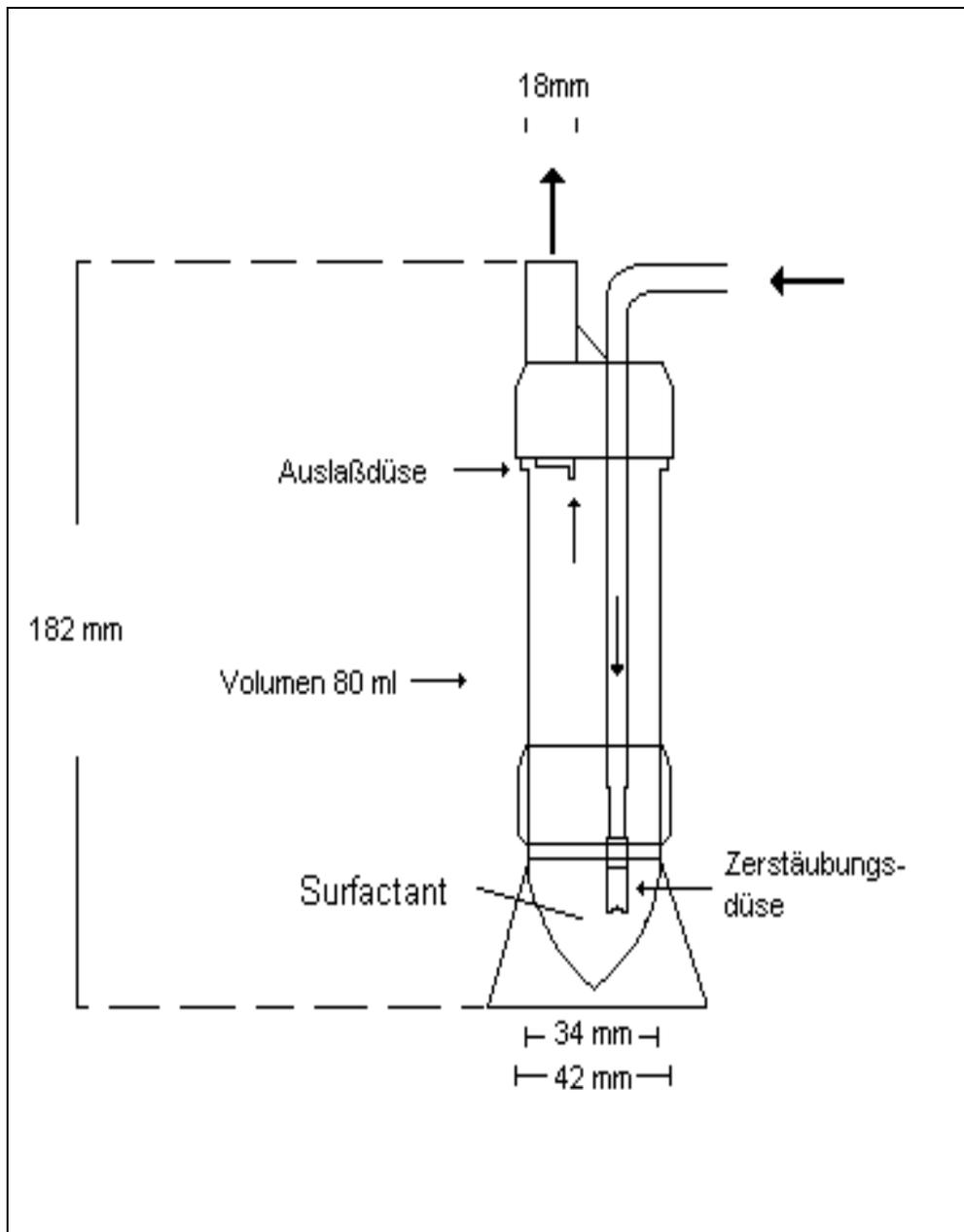


Abbildung 3: Prototyp 3 mit der Möglichkeit der Anwendung am spontan atmenden Patienten. Erstmalig Anordnung einer Gaseinlass- und Gasauslassdüse zur Modifikation des Partikelspektrums. Weiterhin Einblasen des Gases von oben in das Pulver.

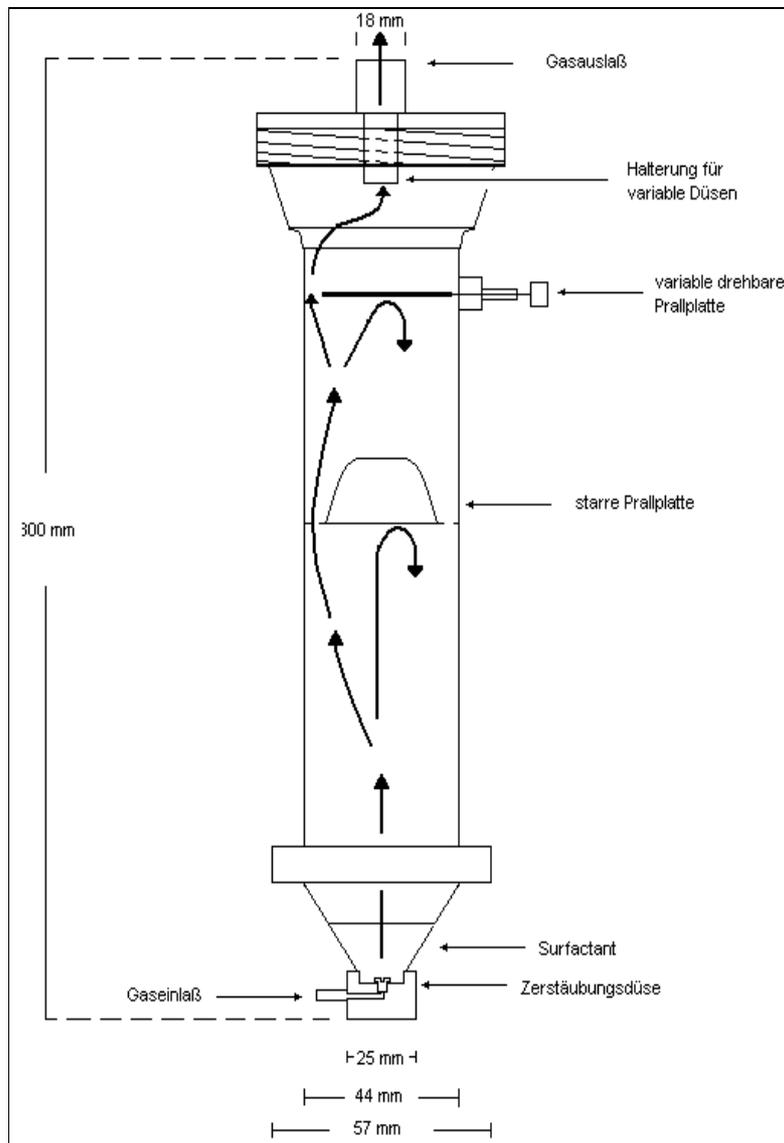


Abbildung 4: Versuchsanordnung des Prototyps 4 mit Einbau von variablen Düsen und Prallplatten. Einblasen des Gasstroms in das Pulver von unten. Aufgrund der sehr geringen Dichte des mikronisierten und lyophilisierten Surfactants zeigten die Prallplatten keinen Nutzen. Diese Anordnung der Gaseinlassdüse hatte eine geringere Verneblungsleistung zur Folge.

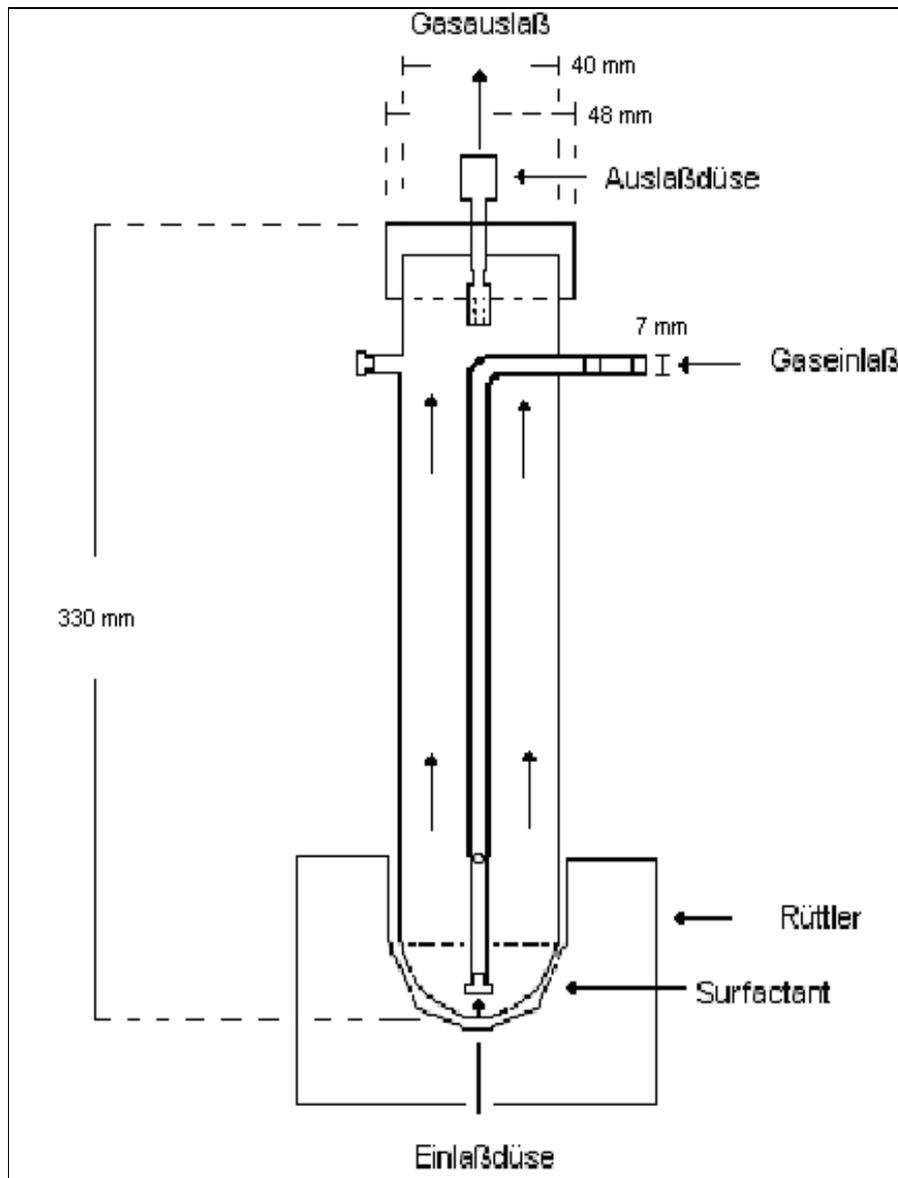


Abbildung 5: Prototyp 5 mit bereits akzeptablem Partikelspektrum, modifiziert mit einem Rüttler zur kontinuierlichen Surfactantvernebelung. Füllmenge 3-5 g Surfactant. Anwendung am spontan atmen- den Patienten möglich, System in ein Beatmungssystem voll integrierbar und Betreibung über den Verneblerausgang des Beatmungssystems möglich.

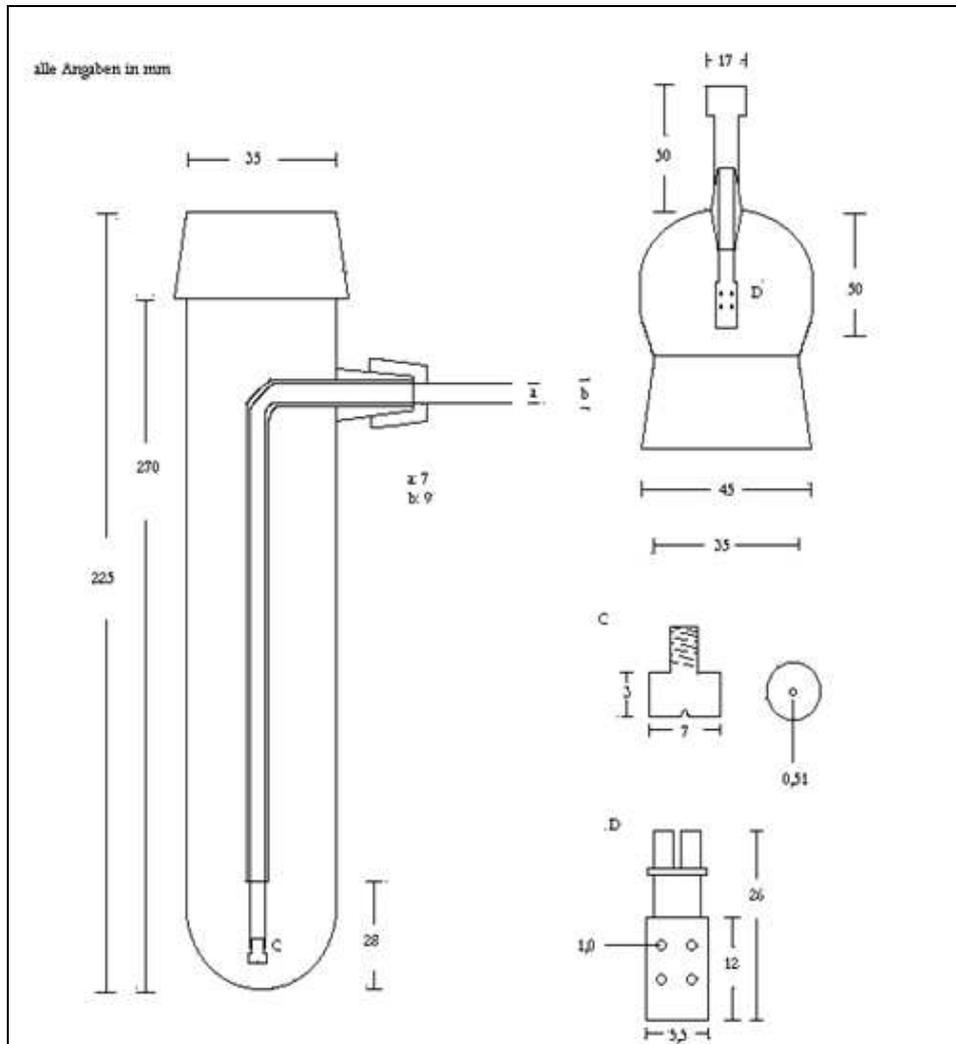


Abbildung 6: Verneblungssystem (Prototyp 6) mit Anordnung einer einlochigen Gaseinlassdüse und einer achtlochigen Gasauslassdüse. Füllmenge 3-5 g Surfactant, Verneblungsleistung abhängig vom Fluss bei 0,4 g (0,8 bar) bis 0,9 g (1,5 bar). Modifizierbar mit Rüttler und Anordnung für Spontanatmung. Die Version für den spontan atmenden Patienten kann mit handelsüblichem Kompressor (i.E. Pariboy) betrieben werden.



Abbildung 7: Fertiger Prototyp 6 in der ambulant nutzbaren Ausstattung.



Abbildung Nr. 8: Prototyp 6 während der Vernebelung von Venticute.

4.2 Partikelspektren verschiedener Verneblertypen in Abhängigkeit des Flusses

Die unterschiedlichen Verneblerprototypen wurden nach der unter 3.2 beschriebenen Methode auf die Größenverteilung der Partikeldurchmesser untersucht. In Abbildung 9 ist die Partikel-größenverteilung exemplarisch graphisch dargestellt; die Tabellen 3 und 4 zeigen jeweils die prozentuale Verteilung unter der jeweiligen Teilchengröße. Die Graphen zeigen die jeweils 3 Messungen à 20 Messzyklen.

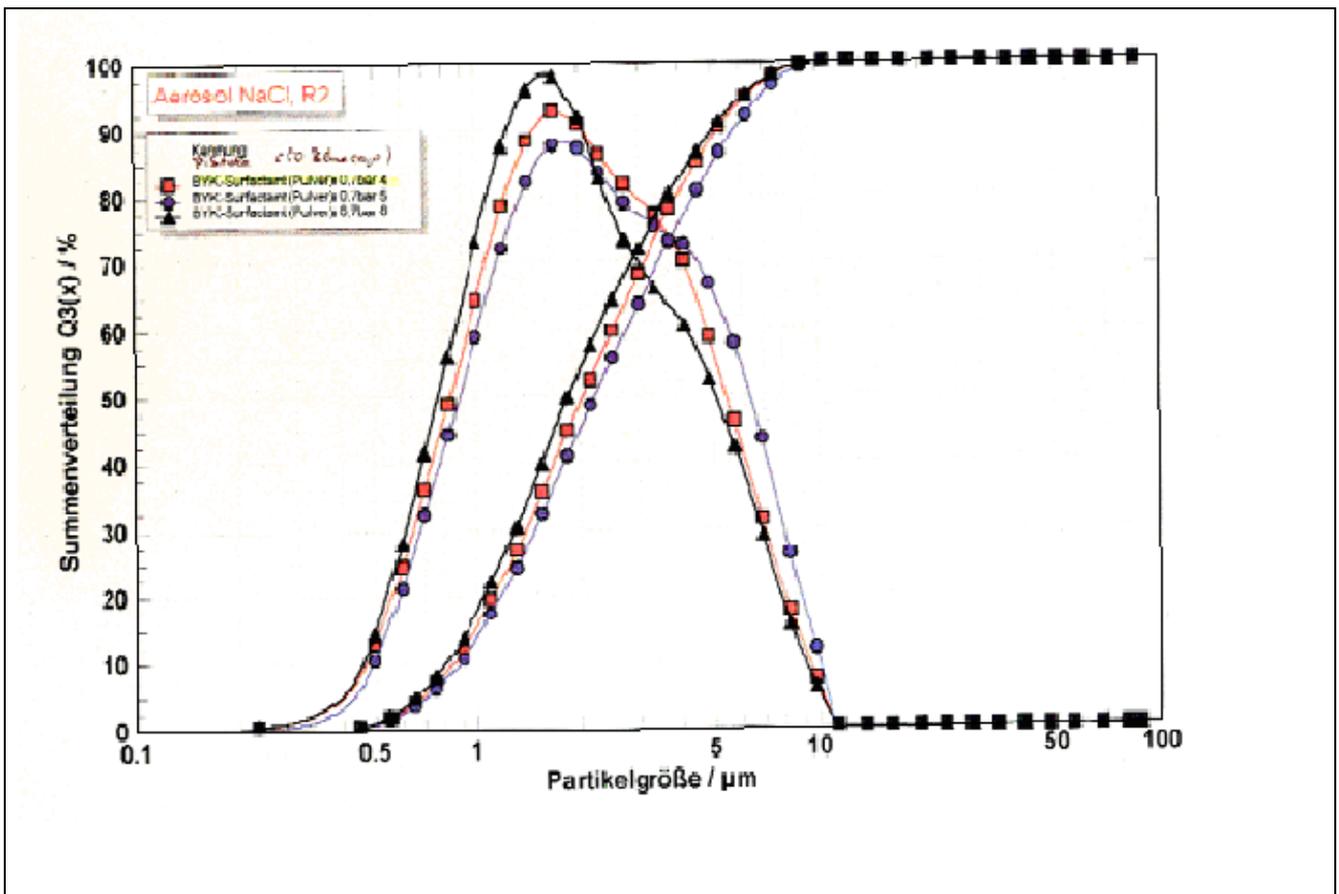


Abbildung 9: Messkurve der prozentualen Größenverteilung der Partikel Prototyp 2, Betriebsdruck 0,7 bar. [Originalausdruck]

Sympatec HELOS (H1102) & SSA: Surfactant
 R2: 0.25/0.45...87.5µm Wellenlänge = 632.8 nm
 BYK-Surfactant (Pulver) 0,7bar
 03.11.00 / 13:17:40,1500 HRLD (V 3.2 Rel.9)
 Messzeit = 1,00 sec Zykluszeit = 5 msec

Messung 1

x10 =	0,88 µm	x50 =	2,24 µm	x90 =	5,92 µm
x16 =	1,06 µm	x84 =	4,97 µm	x99 =	9,04 µm

Messung 2

x10 =	0,88 µm	x50 =	2,24 µm	x90 =	5,92 µm
x16 =	1,06 µm	x84 =	4,97 µm	x99 =	9,04 µm

Abbildung 10: Exemplarisch gezeigte prozentuale Größenverteilung der Aerosolpartikel des Prototyps 2 bei einem Betriebsdruck von 0,7 bar. Hier ist erkennbar, dass 84 % der Partikel kleiner als 5 µm sind und damit ein sicher alveolengängiges Partikelspektrum besitzen. [Originalausdruck]

0,8 bar	x10	x16	x50	x84	x90	x99
Prototyp 1	0,58 +/- 0,01	0,81 +/- 0,0	2,14 +/- 0,14	3,97 +/- 0,03	4,76 +/- 0,13	11,47 +/- 0,71
Prototyp 2	0,91 +/- 0,03	1,14 +/- 0,03	2,50 +/- 0,06	4,81 +/- 0,11	5,64 +/- 0,16	9,15 +/- 0,60
Prototyp 3	2,83 +/- 0,08	3,92 +/- 0,05	7,56 +/- 0,01	12,63 +/- 0,30	14,46 +/- 0,34	20,82 +/- 0,57
Prototyp 4	1,91 +/- 0,01	2,26 +/- 0,03	5,22 +/- 0,10	8,78 +/- 0,18	10,26 +/- 0,19	20,18 +/- 0,33
Prototyp 5	0,92 +/- 0,01	1,10 +/- 0,01	2,31 +/- 0,09	5,32 +/- 0,23	6,63 +/- 0,33	16,87 +/- 1,25
Prototyp 6	0,61 +/- 0,10	0,74 +/- 0,12	1,63 +/- 0,21	3,94 +/- 0,06	5,26 +/- 0,40	35,48 +/- 24,5

1,5 bar	x10	x16	x50	x84	x90	x99
Prototyp 1	0,53 +/- 0,04	0,72 +/- 0,03	1,73 +/- 0,03	3,3 +/- 0,07	4,07 +/- 0,14	10,31 +/- 1,10
Prototyp 2	0,82 +/- 0,04	1,09 +/- 0,07	1,96 +/- 0,20	5,56 +/- 0,12	7,87 +/- 0,23	16,20 +/- 2,32
Prototyp 3	2,11 +/- 0,10	4,11 +/- 0,16	8,81 +/- 0,09	11,30 +/- 0,22	15,66 +/- 0,32	23,81 +/- 0,65
Prototyp 4	1,71 +/- 0,01	1,97 +/- 0,06	4,09 +/- 0,09	9,43 +/- 0,21	14,82 +/- 0,31	26,63 +/- 0,45
Prototyp 5	0,70 +/- 0,03	0,95 +/- 0,04	2,61 +/- 0,12	6,95 +/- 0,53	9,2 +/- 0,66	22,16 +/- 1,87
Prototyp 6	Messung aufgrund des hohen Outputs nicht durchführbar					

Tabelle 3: Prozentuale Verteilung der Partikelgrößen im vernebelten Aerosol (in μm) in Abhängigkeit des Vernebelungsdruckes. Hier ist erkennbar, dass bei Prototyp 6 und 0,8 bar Vernebelungsdruck 90 % der Partikel kleiner als $5,26 \pm 0,40 \mu\text{m}$ sind und damit ein alveolengängiges Partikelspektrum besitzen.

Output und Fluss	Output 0,8 bar in mg/min	Gasfluß in l/min bei 0,8 bar	Output 1,5 bar in mg/min	Gasfluß in l/min bei 1,5 bar
Prototyp 1	22,5	4,71	32,7	7,1
Prototyp 2	43,2	4,77	60,6	7,9
Prototyp 3	191,0	2,1	343,6	4,3
Prototyp 4	84,4	3,92	343,6	7,7
Prototyp 5	292,0	1,75	496,0	3,25
Prototyp 6	415,0	1,7	715,0	3,15

Tabelle 4: Output in mg/min und Fluss durch den Vernebler in l/min der unterschiedlichen Prototypen.

4.3 Biophysikalische Charakterisierung des wieder aufgenommenen Aerosols

Im Rahmen der Funktionsdiagnostik wurde rSP-C vernebelt und das Aerosol in einem Filter wieder aufgenommen. Die Untersuchungen der biophysikalischen Eigenschaften mittels *pulsating bubble surfactometer* zeigten, dass der Prozess der Vernebelung keinen Einfluss auf die hervorragende Oberflächenaktivität des rSP-C hat. Hierbei hatte die Anwesenheit inhibitorische wirkender Plasmaproteine ebenfalls keinen Einfluss.

Die biochemische Zusammenstellung blieb ebenfalls durch die Vernebelung unbeeinflusst.

	<i>Minimale Oberflächenspannung in γ_{min} (mN/m +/- SD)</i>	
	<i>Vor Vernebelung</i>	<i>Nach Vernebelung</i>
In Abwesenheit von Plasmaproteinen	0.00 +/- 0.0	0.00 +/- 0.0
In Anwesenheit von Plasmaproteinen (8 mg/ml)	8.26 +/- 1.2	8.45 +/- 0.9

Tabelle 5: Oberflächenaktivität vor und nach der Trockenvernebelung des rekombinanten SP-C (n=5).

4.4 Ergebnisse der inhalativen Surfactantapplikation durch „dry-powder“-Vernebelung

Zwei unterschiedliche Modelle der akuten Lungenerkrankung bei beatmeten Tieren wurden benutzt, um die Effektivität einer Aerosolapplikation von rekombinanten SP-C durch ein Trockenvernebelungssystem zu beurteilen.

4.4.1 Ergebnisse mit dem „Lavage-Modell“

In dem Modell der repetitiven Lungenlavagen mit darauf folgender schädigender Beatmung konnte durch die einmalige inhalative Applikation von 200 mg/Kg KG von rSP-C in einem Zeitraum von nahezu einer Minute eine nahezu vollständige Wiederherstellung des Gasaustausches nach 20 Minuten bewirken (von etwa 100 mmHG auf 450 mmHG, Abb. 11). Auch die im Rahmen der Lavagen ebenfalls dramatisch abgefallenen Werte der Respiatorcompliance verbesserten sich nach Surfactantgabe innerhalb des gleich Zeitraumes wieder auf Normalwerte (Abb. 12).

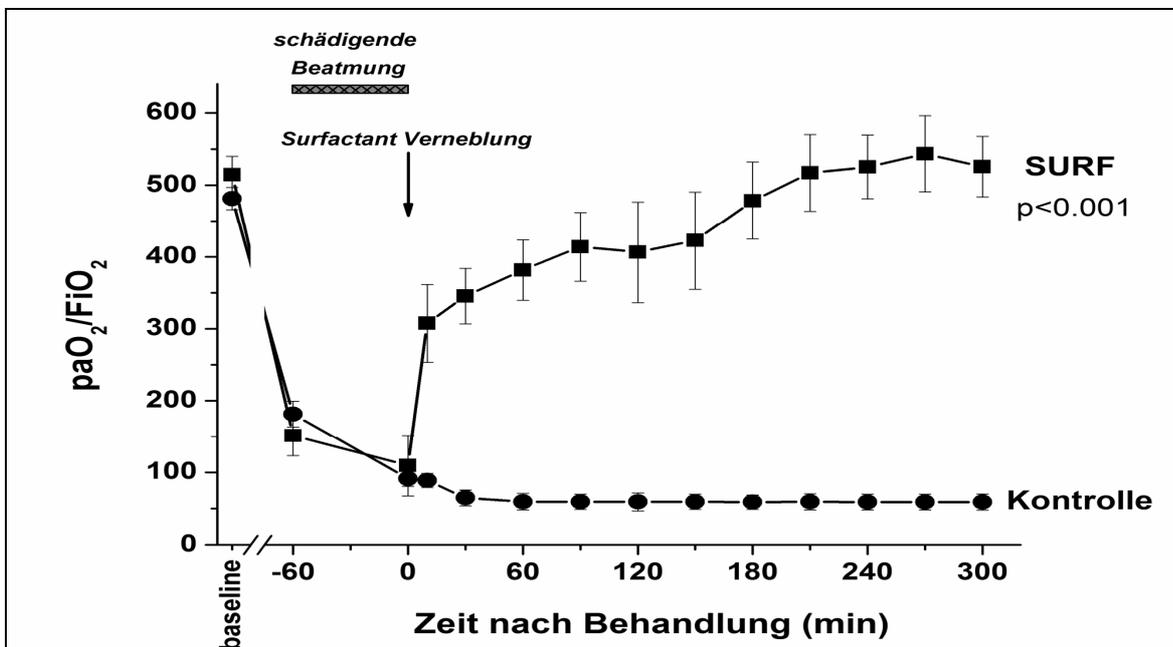


Abbildung 11: Darstellung der paO_2 -Werte im Versuchsverlauf. Zeitpunkt -60 entspricht dem Beginn der injurious ventilation, Zeitpunkt 0 entspricht dem Beginn der Verneblung. Die Therapiegruppe (rSP-C) wird durch Quadrate, die Kontrollgruppe (ohne Therapie) durch Kreise dargestellt. Jede Gruppe enthielt 10 Tiere ($n=10$). Es sind die Mittelwerte \pm SD dargestellt. Die Gruppe \times Zeit - Interaktion war für die überprüfte Zielgröße (Compliance) hoch signifikant ($p < 0,001$).

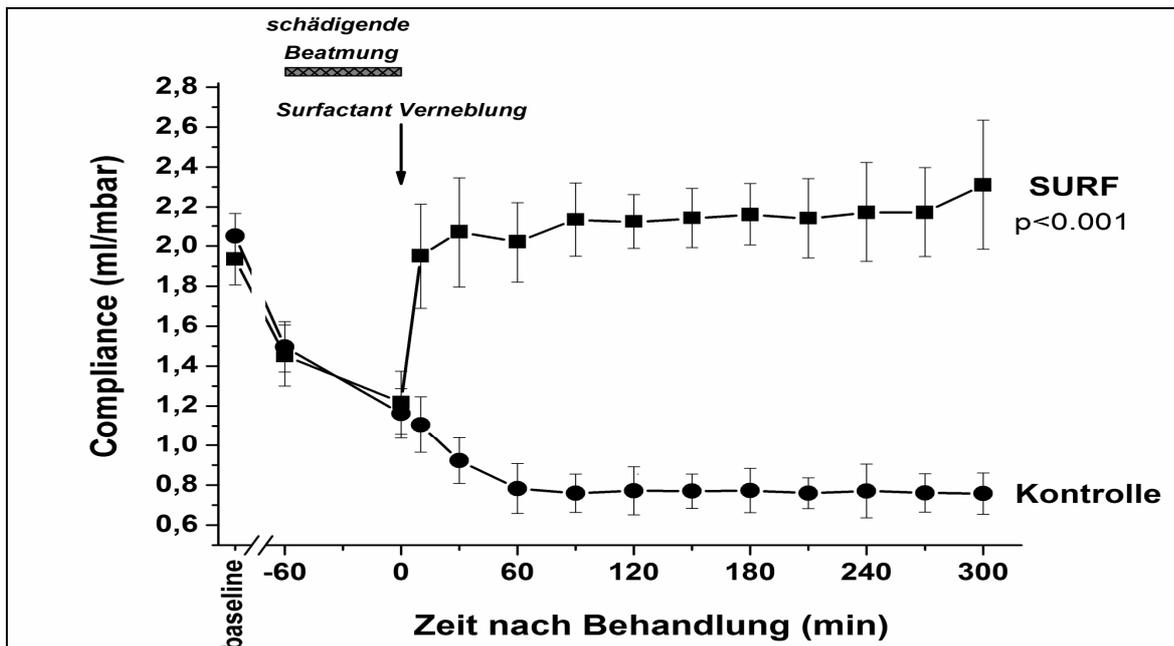


Abbildung 12: Darstellung der Respiratorcompliance-Werte im Versuchsverlauf. Zeitpunkt -60 entspricht dem Beginn der injurious ventilation, Zeitpunkt 0 entspricht dem Beginn der Verneblung (n=10). Es sind die Mittelwerte +/- SD dargestellt. Die Gruppe x Zeit - Interaktion war für die überprüfte Zielgröße (pO_2/FiO_2) hoch signifikant ($p < 0,001$).

4.4.2 Ergebnisse mit dem Schädigungsmodell durch Bleomycin

In dem zweiten Tiermodell der akuten Lungenerkrankung wird diese durch eine einmalige inhalative Gabe von 1,8 U/kg KG Bleomycin ausgelöst. Nach vier Tagen entwickelte sich eine ARDS-ähnliche Lungenerkrankung mit Werten für paO_2 von ~100 mmHG und einer stark reduzierten Gerätecompliance. Die Verabreichung derselben Menge rSP-C-Surfactant wie im Lavage-Modell unter Verwendung des Trockenverneblers führte ebenfalls zu einer weitgehenden Wiederherstellung des Gasaustausches und der Compliance mit Werten für paO_2 von bis zu 375 mmHg (Abb. 13). Die Respiratorcompliance stieg von ~1,0 ml/mbar auf ~1,5 ml/mbar an (Kontrolle bei gesunden Tieren ~2,2 ml/mbar, Abb 14 und 15).

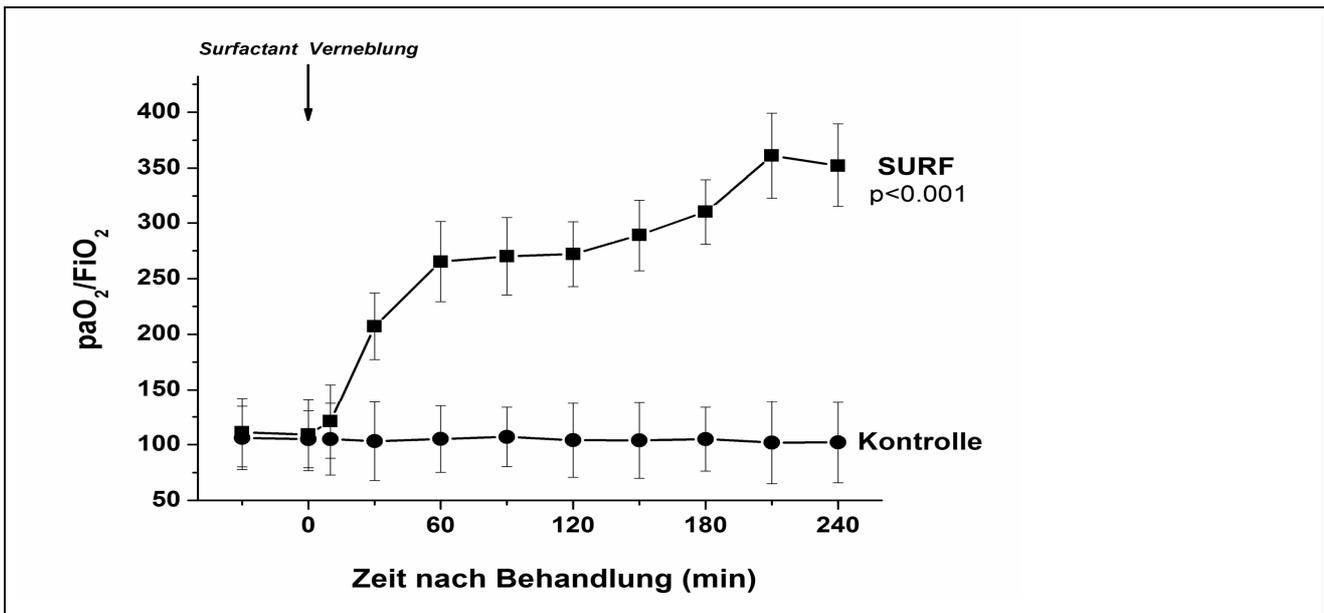


Abbildung 13: Darstellung der paO_2 -Werte im Versuchsverlauf. Zeitpunkt 0 entspricht dem Beginn der Verneblung. Die Therapiegruppe (rSP-C) wird durch Quadrate, die Kontrollgruppe (ohne Therapie) durch Kreise dargestellt. Jede Gruppe enthielt 5 Tiere ($n=5$). Es sind die Mittelwerte \pm SD dargestellt. Die Gruppe \times Zeit - Interaktion war für die überprüfte Zielgröße (pO_2/FiO_2) hoch signifikant ($p < 0,001$).

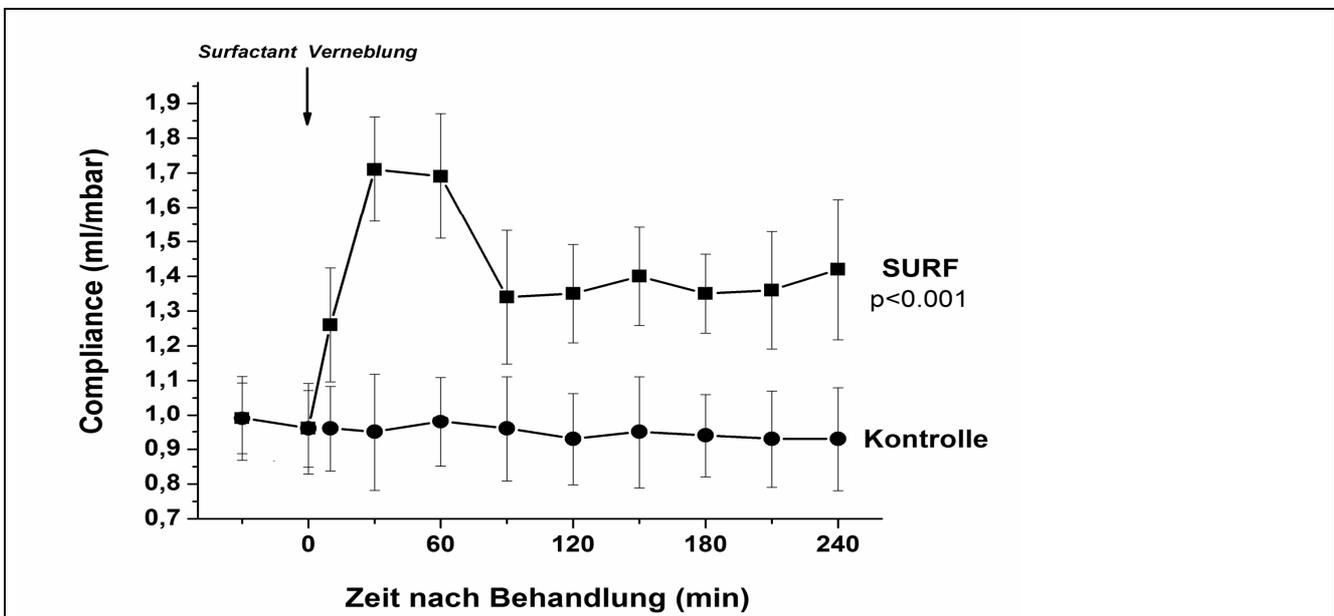
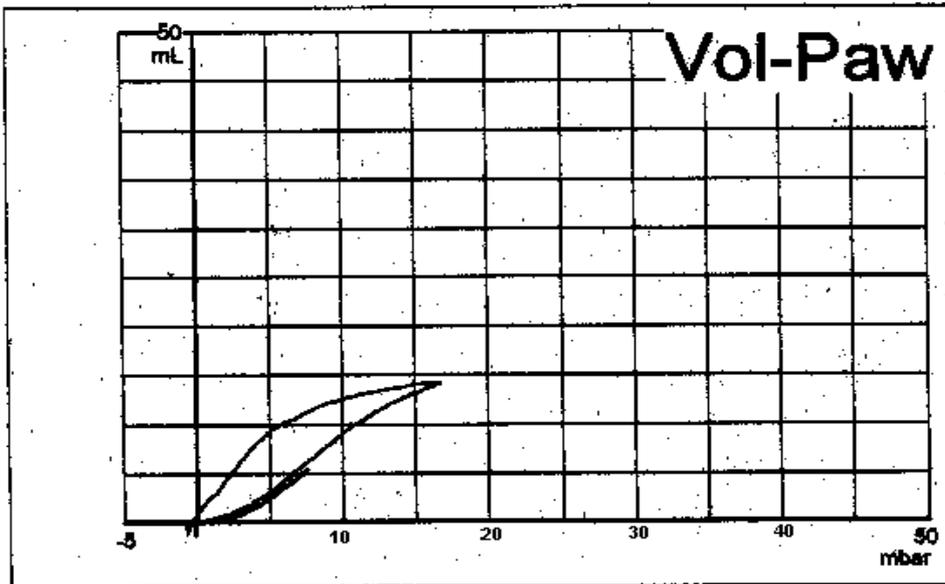


Abbildung 14: Darstellung der Respiratorcompliance-Werte im Versuchsverlauf. Zeitpunkt 0 entspricht dem Beginn der Verneblung (je Gruppe $n=5$). Es sind die Mittelwerte \pm SD dargestellt. Die Gruppe \times Zeit - Interaktion war für die überprüfte Zielgröße (Compliance) hoch signifikant ($p < 0,001$).

Zeitpunkt t_0 vor Vernebelung



Zeitpunkt t_{60} nach Vernebelung

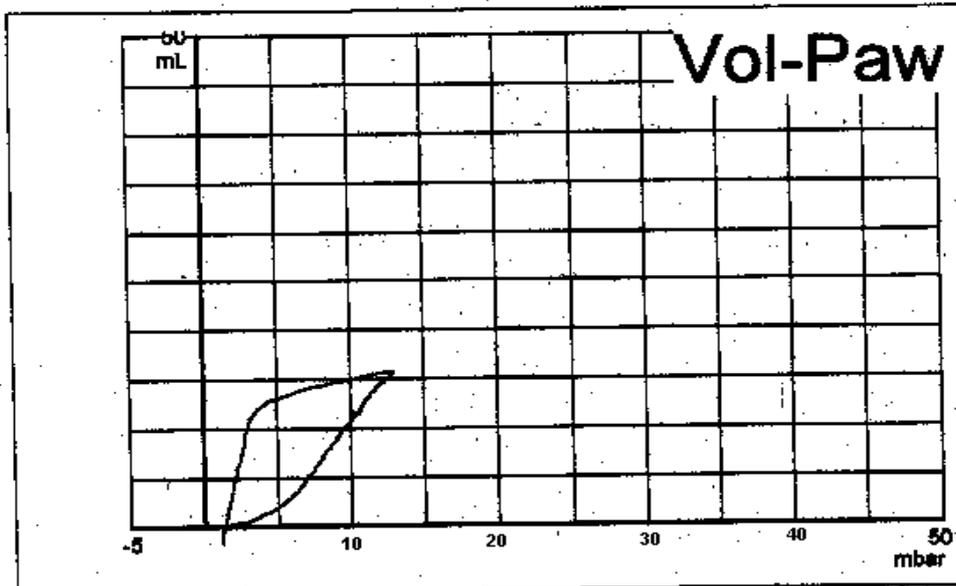


Abbildung 15: Exemplarische Druck / Volumenkurve direkt vor und 60 min nach Surfactantvernebelung als Trockenpulveraerosol am Bleomycin-Modell. [Originalausdruck Dräger Babyview]

5.0 Diskussion

5.1 Welche Therapiemöglichkeiten ergeben sich aus den gewonnenen Erkenntnissen für das ARDS?

In der vorliegenden Studie untersuchten wir die Wirksamkeit eines neu entwickelten Vernebelungsgerätes zur Aerosolgenerierung aus mikronisiertem, rekombinanten Surfactant auf SP-C-Basis. Dieses Gerät stellte sich bei zwei unterschiedlichen Modellen der Lungenschädigung als funktionsfähig heraus. Zusätzlich ermöglicht es die Applikation vergleichbarer Dosen wie bei der Instillation, ohne dass die biochemischen oder biophysikalischen Eigenschaften beeinflusst werden. Hieraus ergibt sich die Folgerung, dass die Trockenvernebelung eine denkbare Therapieoption bei der Behandlung des ARDS darstellt.

Bei dem Erkrankungsbild des ARDS führen verschiedene Mechanismen zu in der bei diesen Patienten zu beobachtenden Störungen des Gasaustausches. Sie beinhalten Veränderungen des Phospholipidhaushaltes, der Fettsäuren- und Apoproteinprofile sowie einen herabgesetzter Anteil an wirksamen *large surfactant aggregates*. Weiterhin wird die Funktion des endogenen Surfactants durch einströmende inhibitorisch wirkende Plasmaproteine und durch inflammatorische Mediatoren weiter eingeschränkt [15, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65]. Unter diesem Wissen hat sich die transbronchiale Applikation exogenen Surfactant als eine sichere und gut durchführbare Methode ergeben, um die arterielle Oxygenierung bei Patienten, die am ARDS leiden, signifikant zu erhöhen [42, 45, 66, 67, 68, 69] und um die biochemischen sowie biophysikalischen Eigenschaften des endogenen Surfactantpools weitgehend wieder herzustellen [13, 69].

Obwohl die Aerosolapplikation viele Vorteile gegenüber der Instillation besitzt, wie eine geringere Flüssigkeitsbeladung in der vorgeschädigten Lunge, was wiederum zu einem zeitlich begrenzten Anstieg der Beatmungsdrücke sowie zu einem kurzzeitigen Abfall der arteriellen Oxygenierung führen kann, sowie eine homogenere Verteilung des applizierten Materials in der Lunge, wurde in den meisten klinischen Studien Surfactant als Bolus über den Tubus appliziert [45, 66, 69] oder beim beatmeten Patienten bronchoskopisch instilliert [42, 68]. Tierexperimentelle Studien [50, 70, 71, 72, 73] legen nahe, dass eine Surfactantvernebelung beim beatmeten Patienten sinnvoll und hilfreich wäre, jedoch sind die aktuell verfügbaren Vernebelungstechniken nicht in der Lage, große Mengen an Surfactant pulmonal zu deponieren. In der großen Exosurf-Studie [43], in die 725 Patienten mit einem Sepsis-induziertem ARDS eingeschlossen wurden, wurden lediglich 5 mg/kg KG in die unteren Atemwege

eingetragen. Dieses liegt deutlich unter der Dosierung, die nötig wäre, um die inhibitorische Kapazität der im Rahmen des ARDS entzündeten Lunge zu überschreiten [59] und sogar noch deutlich unter der Menge an appliziertem Surfactant, die beim Kind im Rahmen des *infant respiratory distress syndrom* gegeben wird.

Ein Hauptproblem bei der Vernebelung einer flüssigen Surfactantzubereitung liegt in der hohen Viskosität der Suspension und der Tendenz, stabile Blasen während der Vernebelung zu bilden, die ein Abreißen der Tröpfchen verhindern. Daraus resultiert eine ineffiziente Materialdeposition im pulmonalen Kompartiment sowie ein hoher Verlust an Surfactant im Beatmungssystem [74].

Dry powder inhalation devices (DPI) haben in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Die zu vernebelnden Dosen sind üblicherweise jedoch äußerst gering (wenige Mikrogramm). Trockenvernebler waren bislang somit auf Medikamente beschränkt, von denen nur eine geringe Menge zur Erzeugung des therapeutischen Effekts notwendig sind (z.B. Antibiotika, Steroide und Betamimetica zur topischen Asthma-Therapie). Nur wenige Studien berichten über die hochdosierte Vernebelung von Medikamenten wie z.B. die inhalative Antibiotikagabe. Die hier generierte Menge betrug 15-160 mg [75, 76, 77].

Jüngst wurde Pumacant, ein vollsynthetisches proteinfreies Surfactantpräparat zur Trockenareosolanwendung entwickelt. Dieses Medikament soll zur inhalativen Therapie des allergischen Asthma bronchiale eingesetzt werden [78]. Eine Loading-Dosis von 100 mg wurde in vier Fraktionen mittels eines selbst gebauten Vernebelungsgeräts appliziert. Der Anteil pulmonal deponierbarer Aerosolteilchen betrug aufgrund des Partikelspektrums gerade einmal 25 %. Die Verwendung eines neu entwickelten Applikators ermöglichte schließlich die einmalige Inhalation der Loading-Dosis von 250 mg bei einem Feinpartikelanteil von über 30 % [79]. Im Gegensatz dazu generiert der von uns entwickelte Surfactantvernebler einen Surfactantausstoß von etwa einem Gramm pro Minute und kann vollständig in ein Beatmungssystem integriert werden. Über dieses System könnte eine Dosis von 300 mg/kg KG Surfactant in weniger als 30 Minuten den Patienten zugeführt werden; genug um die Surfactant-Therapie bei beatmungsunterstützten Patienten durchzuführen. Wie die Ergebnisse der unterschiedlichen Prototypen zeigen, ermöglicht die Verwendung unterschiedlich angeordneter Düsen die Abscheidung von unbrauchbaren und nicht Alveolen-gängigen großen Partikeln. Daraus resultierend verlassen nur kleine Partikel (MMAD = $\sim 1,8 \mu\text{m}$) den Vernebler, die großen Partikel werden hingegen erneut der Zerstäubung zugeführt. Die Prozedur der Zerstäubung hat weder Einfluss auf die biochemische Zusammensetzung noch auf die biophysikalische Aktivität des vernebelten Surfactants. Dieses wurde jedoch unter bestimmten Bedingungen für die Vernebelung einer Suspension mittels Venturi-Vernebler [74], als auch für Ultraschallvernebelung [50] nachgewiesen.

Die Effizienz der Trockenvernebelung von Surfactant in vivo wurde in zwei unterschiedlichen Modellen der akuten Lungenerkrankung (Lavage-Modell, Bleomycin induzierte Lungenerkrankung) bewiesen. Die Vernebelung für weniger als eine Minute war in der Lage, die Oxygenierung und die Lungencompliance in beiden Modellen der akuten Lungenerkrankung deutlich zu verbessern.

In einer vorhergehenden Studie aus unserer Gruppe bestand die Notwendigkeit einer Vernebelung für mindestens 50 Minuten, um einen klinisch messbaren Benefit im Bereich des Gasaustausches zu erreichen [50]. Auch im Vergleich zu der hier gewählten Möglichkeit der Surfactantvernebelung mittels Ultraschallverneblern weist die Trockenvernebelung also deutliche Vorteile auf. Abgesehen von der Beeinflussung der biophysikalischen Aktivität liegt die Gesamtmenge des pulmonal deponierten Materials bei der Trockenvernebelung um den Faktor 10 höher als bei der Ultraschallvernebelung.

5.2 Inwiefern eröffnen sich hiermit auch Therapiemöglichkeiten für andere Krankheitsbilder?

Eine inhalative Surfactantgabe würde sich nach den oben beschriebenen Ergebnissen für jede Lungenerkrankung anbieten, die mit einer verminderten Oxygenierung, einer verminderten Compliance auf der Basis einer erhöhten Kollapsneigung der Alveolen durch gestörte Surfactantfunktion einhergeht.

Insbesondere durch die beschriebene Möglichkeit der Anwendung am spontan atmenden Patienten ergibt sich eine deutliche Erweiterung möglicher Therapieansätze, bis in den ambulanten Bereich. Die restriktiven Lungenerkrankungen wären ein Beispiel für eine solche denkbare Anwendung.

Im Rahmen des Formenkreises der diffus parenchymatösen Lungenerkrankungen, wie idiopathische Lungenfibrose, die Vogelzüchterlunge oder exogen allergische Alveolitis, könnte die Therapie mit Surfactant eine deutliche Verbesserung der Compliance bewirken und den Alveolarkollaps verringern. Dies würde über eine Wiederherstellung des Surfactantfilmes in den Alveolen erfolgen. Der Untergang der Typ-II-Zellen sowie der Abbau der *large surfactant aggregates* in *small surfactant aggregates* könnte hierdurch positiv beeinflusst werden.

Im Falle der obstruktiven Lungenerkrankungen wie der COPD sowie des Lungenemphysems könnte über die Therapie mit exogenem Surfactant vor allem eine Stabilisierung der kleinen Atemwege erreicht werden. Eine ambulante Dauertherapie ist auch hier gut vorstellbar. Eine weitere denkbare Anwendung wäre auch die zystische Fibrose.

6.0 Zusammenfassung

Einleitung: Vernebelung pulmonalen Surfactans zur Behandlung des ARDS stellt einen wünschenswerten Therapieansatz da. Bis dato war jedoch aufgrund technischer Limitationen der aktuell erhältlichen Vernebler ein klinischer Einsatz nicht möglich. In dieser Arbeit stellen wir einen neuen Dry-powder-Vernebler zur Applikation von rekombinanten SP-C-basierten Surfactant vor.

Material und Methoden: Unter Verwendung des neuen „dry-powder-nebulizers“ konnte die Effektivität der Trockenvernebelung eines rSP-C-basierten Sufactants in zwei Tierversuchsmodellen der akuten Lungenerkrankung (paO_2/FiO_2 Werte von ~ 100 mmHg) am Kaninchen gezeigt werden. Dies erfolgte am Schädigungsmodell durch repetitive Lavagen kombiniert mit einer zusätzlichen schädigenden Beatmung sowie am Schädigungsmodell durch einmalige inhalative Applikation von Bleomycin.

Ergebnisse: Die Untersuchung der Verneblereigenschaften zeigte, dass dieses Gerät die spezifischen Eigenschaften vereint, welche für die Surfactanttherapie beim ARDS notwendig sind: Das generierte Aerosol hat einen mittleren Partikeldurchmesser (MMAD X50) von $1,6 \mu m$, wobei 85 % der Partikel kleiner als $5 \mu m$ waren. Die pro Minute vernebelte Surfactantmenge lag unter diesen Voraussetzungen bei ungefähr 400 mg bei 0,8 bar Betriebsdruck, dies ermöglicht die Applikation großer Mengen Surfactant. Biochemische sowie biophysikalische Untersuchungen bestätigten, dass die biochemische Zusammensetzung sowie die oberflächenspannungssenkenden Eigenschaften des rSP-C durch die Vernebelung nicht beeinflusst wurden. In beiden Kaninchenmodellen zeigte die Applikation von 130 mg/kg KG rSP-C-surfactant eine weitgehende Wiederherstellung von Gasaustausch und Compliance mit paO_2/FiO_2 –Werten nahe denen der Kontrolltiere (400-450 mmHg).

Schlussfolgerung: Diese Ergebnisse legen nahe, dass der hier beschriebene Trockenvernebler eine attraktive Alternative für die Surfactanttherapie bei ARDS darstellt, da, verglichen mit der Instillation, vergleichbare Dosen dem Patienten appliziert werden können und das Gerät in den Inspirationsschenkel des Beatmungssystems integriert werden kann. Das vernebelte Surfactantmaterial war biophysikalisch vollständig aktiv und die Effektivität wurde in zwei unterschiedlichen ARDS-Modellen unter Beweis gestellt. Beim spontan atmenden Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen wie der COPD könnte die Trockenvernebelung von Surfactant könnte erfolgreich in der Wiederherstellung des Gasaustausches sein und somit eine additive Therapie in der Behandlung dieser Erkrankungen darstellen.

7.0 Abstract

Objective: Nebulization of pulmonary surfactant for treatment of ARDS represents a desirable therapeutic approach, but was hitherto impossible under clinical conditions due to the technical limitations of currently available devices. We now describe a new dry powder nebulizer for administration of a recombinant surfactant protein C (rSP-C) – based surfactant.

Interventions: Employing new dry powder nebulizer, the efficacy of an aerosol application of rSP-C surfactant was assessed in two animal models of acute lung injury, including rabbits with acute lung injury ($\text{paO}_2/\text{FiO}_2$ values of $\sim 100\text{mmHg}$) due to either repetitive lavage with prolonged and injurious ventilation, or due to inhalative application of Bleomycin at day 4.

Measurements and Main Results: Analysis of nebulizer characteristics revealed that the device meets the specific requirements of surfactant treatment in ARDS: the generated aerosol had a mass median aerodynamic diameter of $1.6\mu\text{m}$, with 85% of all particles being smaller than $5\mu\text{m}$ and the average mass of surfactant being nebulized under these conditions was approximately $400\text{mg}/\text{min}$, thus allowing delivery of large amounts of surfactant. Biochemical and biophysical studies showed that composition and surface tension reducing properties of the rSP-C surfactant remained unaltered after nebulization. In both rabbit models administration of $130\text{mg}/\text{kg}$ bw rSP-C surfactant resulted in a far-reaching restoration of gas exchange and compliance, with $\text{paO}_2/\text{FiO}_2$ values approaching Control values ($400\text{--}450\text{mmHg}$).

Conclusions: We conclude that the herein described dry powder nebulizer might proffer for surfactant therapy of ARDS, since similar dosages as compared to intratracheal instillation can be applied in humans, the device may be connected to the inspiratory limb of the ventilator circuit, the nebulized surfactant material is biophysically fully active and efficacy was proven in two different models of ARDS. In spontaneous breathing patients with chronic pulmonary diseases as the COPD the dry powder therapy could be helpful in restoring gas exchange and might be a useful additional therapy for the treatment of these diseases.

Literaturverzeichnis

1. King RJ. Composition and metabolism of the apolipoproteins of pulmonary surfactant. *Annu Rev Physiol.* 1985; 47: 775-788. Review.
2. Hamm H, Fabel H, Bartsch W. The surfactant system of the adult lung: physiology and clinical perspectives. *Clin Investig.* 1992 Aug; 70 (8): 637-657. Review.
3. Haagsman HP, van Golde LM. Synthesis and assembly of lung surfactant. *Annu Rev Physiol.* 1991; 53: 441-464.
4. Haagsman HP, Elfring RH, van Buel BL, Voorhout WF. The lung lectin surfactant protein A aggregates phospholipid vesicles via a novel mechanism. *Biochem J.* 1991 Apr 1; 275 (Pt 1): 273-276.
5. Coonrod JD, Jarrells MC. Impaired antipneumococcal activity of bronchoalveolar lining material of neonatal rats. *Infect Immun.* 1989 Feb; 57 (2): 359-366.
6. Coonrod JD. Human alveolar lining material and antibacterial defenses. *Am Rev Respir Dis.* 1986 Dec; 134 (6): 1337.
7. Hayakawa H, Giridhar G, Myrvik QN, Kucera L. Pulmonary surfactant phospholipids modulate priming of rabbit alveolar macrophages for oxidative responses. *J Leukoc Biol.* 1992 Apr; 51 (4): 379-385.
8. Hayakawa H, Myrvik QN, St Clair RW. Pulmonary surfactant inhibits priming of rabbit alveolar macrophage. Evidence that surfactant suppresses the oxidative burst of alveolar macrophage in infant rabbits. *Am Rev Respir Dis.* 1989 Nov; 140 (5): 1390-1397.
9. Seeger W, Pison U, Buchhorn R, Obertacke U, Joka T. Surfactant abnormalities and adult respiratory failure. *Lung.* 1990; 168 Suppl: 891-902.

10. Seeger W, Gunther A, Walmrath HD, Grimminger F, Lasch HG. Alveolar surfactant and adult respiratory distress syndrome. Pathogenetic role and therapeutic prospects. *Clin Investig*. 1993 Mar; 71 (3): 177-190.
11. Chess PR, D'Angio CT, Pryhuber GS, Maniscalco WM. Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol*. 2006 Aug; 30 (4): 171-178.
12. Schmidt R, Ruppert C, Markart P, Lubke N, Ermert L, Weissmann N, Breithecker A, Ermert M, Seeger W, Gunther A. Changes in pulmonary surfactant function and composition in bleomycin-induced pneumonitis and fibrosis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004 Mar 1; 195 (2): 218-231.
13. Gunther A, Schmidt R, Harodt J, Schmehl T, Walmrath D, Ruppert C, Grimminger F, Seeger W. Bronchoscopic administration of bovine natural surfactant in ARDS and septic shock: impact on biophysical and biochemical surfactant properties. *Eur Respir J*. 2002 May; 19 (5): 797-804.
14. Gunther A, Schmidt R, Nix F, Yabut-Perez M, Guth C, Rosseau S, Siebert C, Grimminger F, Morr H, Velcovsky HG, Seeger W. Surfactant abnormalities in idiopathic pulmonary fibrosis, hypersensitivity pneumonitis and sarcoidosis. *Eur. Respir. J*. 1999, 14, 565–573.
15. Gunther A, Schmidt R, Feustel A, Meier U, Pucker C, Ermert M, Seeger W. Surfactant subtype conversion is related to loss of surfactant apoprotein B and surface activity in the large surfactant aggregates—Experimental and clinical studies. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 1999, 159, 244–251.
16. Gunther A, Kalinowski M, Elssner A, Seeger W. Clot-embedded natural surfactant: kinetics of fibrinolysis and surface activity. *Am J Physiol*. 1994 Nov; 267 (5 Pt 1): L618-624.
17. Seeger W, Grube C, Gunther A. Proteolytic cleavage of fibrinogen: amplification of its surfactant inhibitory capacity. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1993 Sep; 9 (3): 239-247.

18. Podgorski A, Sosnowski TR, Gradon L. Deactivation of the pulmonary surfactant dynamics by toxic aerosols and gases. *J Aerosol Med.* 2001 Winter; 14 (4): 455-466.
19. Matalon S, DeMarco V, Haddad IY, Myles C, Skimming JW, Schurch S, Cheng S, Cassin S. Inhaled nitric oxide injures the pulmonary surfactant system of lambs in vivo. *Am J Physiol.* 1996 Feb; 270 (2 Pt 1): L273-280.
20. Nieman GF, Clark WR Jr. Effects of wood and cotton smoke on the surface properties of pulmonary surfactant. *Respir Physiol.* 1994 Jun; 97 (1): 1-12.
21. Schermuly RT, Gunther A, Ermert M, Ermert L, Ghofrani HA, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Walmrath D. Conebulization of surfactant and urokinase restores gas exchange in perfused lungs with alveolar fibrin formation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001 Apr; 280 (4): L792-800.
22. Kallet RH, Katz JA. Respiratory system mechanics in acute respiratory distress syndrome. *Respir Care Clin N Am.* 2003 Sep; 9 (3): 297-319.
23. Wagner PD. Diffusion and chemical reaction in pulmonary gas exchange. *Physiol Rev.* 1977 Apr; 57 (2): 257-312.
24. Balaraman V, Meister JC, Ku T, Sood S, Uyehara C, Easa D. Lavage administration of dilute surfactants after acute lung injury in neonatal piglets. *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 158: 12-17.
25. Wagner PD. Ventilation-perfusion relationships. *Annu Rev Physiol.* 1980; 42: 235-247.
26. Gea J, Roca J, Torres A, Agusti AG, Wagner PD, Rodriguez-Roisin R. Mechanisms of abnormal gas exchange in patients with pneumonia. *Anesthesiology.* 1991 Nov; 75 (5): 782-789.
27. Moller JC, Schaible TF, Reiss I, Artlich A, Gortner L. Treatment of severe non-neonatal ARDS in children with surfactant and nitric oxide in a "pre-ECMO"-situation. *Int J Artif Or-*

gans. 1995 Oct; 18 (10): 598-602.

28. Blanch L, Joseph D, Fernandez R, Mas A, Martinez M, Valles J, Diaz E, Baigorri F, Artigas A. Hemodynamic and gas exchange responses to inhalation of nitric oxide in patients with the acute respiratory distress syndrome and in hypoxemic patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Intensive Care Med.* 1997 Jan; 23 (1): 51-57.
29. Caironi P, Carlesso E, Gattinoni L. Radiological imaging in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med.* 2006 Aug; 27 (4): 404-415.
30. Crotti S, Mascheroni D, Caironi P, Pelosi P, Ronzoni G, Mondino M, Marini JJ, Gattinoni L. Recruitment and derecruitment during acute respiratory failure: a clinical study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Jul 1; 164 (1): 131-140.
31. Soll RF, Hoekstra RE, Fangman JJ, Corbet AJ, Adams JM, James LS, Schulze K, Oh W, Roberts JD Jr, Dorst JP. Multicenter trial of single-dose modified bovine surfactant extract (Survanta) for prevention of respiratory distress syndrome. *Ross Collaborative Surfactant Prevention Study Group. Pediatrics.* 1990 Jun; 85 (6): 1092-1102.
32. Gortner L, Bartmann P, Pohlandt F, Bernsau U, Porz F, Hellwege HH, Seitz RC, Hieronimi G, Bremer C, Jorch G. Early treatment of respiratory distress syndrome with bovine surfactant in very preterm infants: a multicenter controlled clinical trial. *Pediatr Pulmonol.* 1992 Sep; 14 (1): 4-9.
33. Willson D. Calfactant. *Expert Opin Pharmacother.* 2001 Sep; 2 (9): 1479-1493. Review.
34. Buchardi, Larson, Schuster, Suter (Hrsg.) *Intensivmedizin*, 8. Ausgabe, Springer Verlag.
35. Germann PG, Häfner D. A rat model of acute respiratory distress syndrome (ARDS): Part 2, influence of lavage volume, lavage repetition and therapeutic treatment with r-SP-C surfactant. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1999; 41: 97-106.

36. Häfner D, Germann PG, Hauschke D. Effects of rSP-C surfactant on oxygenation and histology in a rat lung lavage model of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158 (1): 270-278.
37. Janssen D, Carnielli V, Cogo P, Bohlin K, Hamvas A, Luijendijk I, Bunt J, Tibboel D, Zimmermann L. Surfactant phosphatidylcholine metabolism in neonates with meconium aspiration syndrome. *The Journal of Pediatrics*, Volume 149, Issue 5, 634-639.
38. Hilgendorff A, Doerner M, Rawer D, Leick J, Trotter A, Ebsen M, Ruppert C, Gunther A, Gortner L, Reiss I. Effects of a recombinant surfactant protein-C-based surfactant on lung function and the pulmonary surfactant system in a model of meconium aspiration syndrome. *Crit Care Med*. 2006 Jan; 34 (1): 203-210.
39. Hilgendorff A, Rawer D, Doerner M, Tutdibi E, Ebsen M, Schmidt R, Guenther A, Gortner L, Reiss I: Synthetic and natural surfactant differentially modulate inflammation after meconium aspiration. *Intensive Care Med* 2003; 29: 2247-2254.
40. Ohama Y, Ogawa Y. Treatment of meconium aspiration syndrome with surfactant lavage in an experimental rabbit model. *Pediatr Pulmonol*. 1999 Jul; 28 (1): 18-23.
40. Schmidt R, Ruppert C, Markart P, Lubke N, Ermert L, Weissmann N, Breithecker A, Ermert M, Seeger W, Gunther A. Changes in pulmonary surfactant function and composition in bleomycin-induced pneumonitis and fibrosis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004 Mar 1; 195 (2): 218-231.
41. Dargaville PA, Mills JF, Headley BM, Chan Y, Coleman L, Loughnan PM, Morley CJ. Therapeutic lung lavage in the piglet model of meconium aspiration syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Aug 15; 168 (4): 456-463. Epub 2003 Apr 24.
42. Walmrath D, Gunther A, Ghofrani H, Schermully R, Schneider T, Grimminger F, Seeger W. Bronchoscopic surfactant administration in patients with severe adult respiratory distress syndrome and sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 57-62.

43. Anzueto A, Baughman RP, Guntupalli KK, Weg JG, Wiedemann HP, Raventos AA, Lemaire F, Long W, Zaccardelli DS, Pattishall EN. Aerosolized surfactant in adults with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1996, 334: 1417–1421.
44. Davidson WJ, Dorscheid D, Spragg R, Schulzer M, Mak E, Ayas NT. Exogenous pulmonary surfactant for the treatment of adult patients with acute respiratory distress syndrome: results of a meta-analysis. *Crit Care*. 2006; 10 (2): R41. Review.
45. Spragg RG, Lewis JF, Walmrath HD, Johannigman J, Bellingan G, Laterre PF, Witte MC, Richards GA, Rippin G, Rathgeb F, Hafner D, Taut FJ, Seeger W. Effect of recombinant surfactant protein C-based surfactant on the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2004 Aug 26; 351 (9): 884-892.
46. Lewis JF, Veldhuizen RA. The future of surfactant therapy during ALI/ARDS. *Semin Respir Crit Care Med*. 2006 Aug; 27(4): 377-388. Review.
47. Anzueto A. Exogenous surfactant in acute respiratory distress syndrome: more is better. *Eur Respir J*. 2002 May; 19 (5): 787-789.
48. Lewis JF, Brackenbury A. Role of exogenous surfactant in acute lung injury. *Crit Care Med*. 2003 Apr; 31 (4 Suppl): 324-328. Review.
49. Willson DF, Thomas NJ, Surfactant composition and biophysical properties are important in clinical studies. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2010; 181: 762.
50. Schermuly R, Schmehl T, Gunther A, Grimminger F, Seeger W, Walmrath D. Ultrasonic nebulization for efficient delivery of surfactant in a model of acute lung injury. Impact on gas exchange. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Aug; 156 (2 Pt 1): 445-453.
51. Gessler T, Schmehl T, Hoepfer MM, Rose F, Ghofrani HA, Olschewski H, Grimminger F, Seeger W. Ultrasonic versus jet nebulization of iloprost in severe pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2001 Jan; 17 (1): 14-19.

52. Dailey LA, 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 Control Release*. 2003 Jan 9; 86 (1): 131-144.
53. Gessler T, Schmehl T, Olschewski H, Grimminger F, Seeger W. Aerosolized vasodilators in pulmonary hypertension. *J Aerosol Med*. 2002 Summer; 15 (2): 117-122.
54. Lachmann B, Robertson B, Vogel J. In vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1980 Jun; 24 (3): 231-236.
55. Lachmann B, Jonson B, Lindroth M, Robertson B. Modes of artificial ventilation in severe respiratory distress syndrome. Lung function and morphology in rabbits after wash-out of alveolar surfactant. *Crit Care Med*. 1982 Nov; 10 (11): 724-732.
56. Easa D, Mundie TG, Finn KC, Hashiro G, Balaraman V. Continuous negative extrathoracic pressure versus positive end-expiratory pressure in piglets after saline lung lavage. *Pediatr Pulmonol*. 1994 Mar; 17 (3): 161-168.
57. Gunther A, Lubke N, Ermert M, Schermuly RT, Weissmann N, Breithecker A, Markart P, Ruppert C, Quanz K, Ermert L, Grimminger F, Seeger W. Prevention of bleomycin-induced lung fibrosis by aerosolization of heparin or urokinase in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Dec 1; 168 (11): 1358-1365.
57. Buchardi, Larson, Schuster, Suter (Hrsg.) *Intensivmedizin*, 8. Ausgabe, Springer Verlag S. 1311
58. Asai T, Ohno Y, Minatoguchi S, Funaguchi N, Yuhgetsu H, Sawada M, Takemura G, Komada A, Fujiwara T, Fujiwara H. The specific free radical scavenger edaravone suppresses bleomycin-induced acute pulmonary injury in rabbits. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007 Jan-Feb; 34 (1-2): 22-26.

59. Gunther A, Siebert C, Schmidt R, Ziegler S, Grimminger F, Yabut M, Temmesfeld B, Walmrath D, Morr H, Seeger W. Surfactant alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and cardiogenic lung edema. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 176-184.
60. Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley MA, Whitsett JA, Reed CR, Fowler AA3rd, Hudson LD, Maunder RJ, Crim C, Hyers TM. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 1991; 88: 1976-1981.
61. Pison U, Seeger W, Buchhorn R, Joka T, Brand M, Obertacke U, Neuhof H, Schmit Neuerburg KP. Surfactant abnormalities in patients with respiratory failure after multiple trauma. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 1033-1039.
62. Hallman M, Spragg R, Harrell JH, Moser KM, Gluck L. Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure. Study of bronchoalveolar lavage phospholipids, surface activity, phospholipase activity, and plasma myoinositol. *J Clin Invest* 1982; 70: 673-683.
63. Schmidt R, Meier U, Yabut-Perez M, Walmrath D, Grimminger F, Seeger W, Günther A. Alteration of fatty acid profiles in different pulmonary surfactant phospholipids in acute respiratory distress syndrome and severe pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 95-100.
64. Gunther A, Ruppert C, Schmidt R, Markart P, Grimminger F, Walmrath D, Seeger W. Surfactant alteration and replacement in acute respiratory distress syndrome. *Respir Res* 2001; 2: 353-364.
65. Greene KE, Wright JR, Steinberg KP, Ruzinski JT, Caldwell E, Wong WB, Hull W, Whitsett JA, Akino T, Kuroki Y, Nagae H, Hudson LD, Martin TR. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1843-1850.

66. Gregory TJ, Steinberg KP, Spragg R, Gadek JE; Hyers TM, Longmore WJ, Moxley MA, Cai GZ, Hite RD, Smith RM, Hudson LD, Crim C, Newton P, Mitchell BR, Gold AJ. Bovine surfactant therapy for patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1309-1315.
67. Willson DF, Zaritsky A, Bauman LA, Dockery K, James RL, Conrad D, Craft H, Novotny WE, Egan EA, Dalton H. Instillation of calf lung surfactant extract (calfactant) is beneficial in pediatric acute hypoxemic respiratory failure. Members of the Mid-Atlantic Pediatric Critical Care Network. *Crit Care Med* 1999; 27: 188-195.
68. Walmrath D, Grimminger F, Pappert D, Knothe C, Obertacke U, Benzing A, Gunther A, Schmehl T, Leuchte H, Seeger W. Bronchoscopic administration of bovine natural surfactant in ARDS and septic shock: impact on gas exchange and haemodynamics. *Eur Respir J* 2002; 19: 805-810.
69. Spragg RG, Lewis JF, Wurst W, Hafner D, Baughman RP, Wewers MD, Marsh JJ. Treatment of acute respiratory distress syndrome with recombinant surfactant protein C surfactant. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 1562-1566.
70. Lewis JF, Ikegami M, Jobe AH, Tabor B. Aerosolized surfactant treatment of preterm lambs. *J Appl Physiol* 1991; 70: 869-876.
71. Lewis JF, Tabor B, Ikegami M, Jobe AH; Joseph M, Absolom D. Lung function and surfactant distribution in saline-lavaged sheep given instilled vs. nebulized surfactant. *J Appl Physiol* 1993; 74: 1256-1264.
72. Schermuly RT, Gunther A, Weissmann N; Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F, Walmrath D. Differential impact of ultrasonically nebulized versus tracheal-instilled surfactant on ventilation-perfusion (VA/Q) mismatch in a model of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 152-159.

73. Lutz C, Carney D, Finck C, Picone A, Gatto LA, Paskanik A, Langenback E, Nieman G. Aerosolized surfactant improves pulmonary function in endotoxin-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 840-845.
74. Dijk PH, Heikamp A, Piers DA, Weller E, Bambang Oetomo S. Surfactant nebulisation: safety, efficiency and influence on surface lowering properties and biochemical composition. *Intensive Care Med* 1997; 23: 456-462.
75. Le Brun PPH, de Boer AH, Mannes GPM, de Fraiture DMI, Brimicombe RW, Touw DJ, Vinks AA, Frijlink HW, Heijermann HGM. Dry powder inhalation of antibiotics in cystic fibrosis therapy: part 2. Inhalation of a novel colistin dry powder formulation: a feasibility study in healthy volunteers and patients. *Eur J Pharm Biophar* 2002; 54: 25-32.
76. Newhouse MT, Hirst PH, Duddu SP, Walter YH, Tarara TE, Clark AR, Weers JG. Inhalation of a dry powder tobramycin PulmoSphere formulation in healthy volunteers. *Chest* 2003; 24: 360-366.
77. Crowther Labiris NR, Holbrook AM, Chrystyn H, Macleod SM, Newhouse MT. Dry powder versus intravenous and nebulized gentamicin in cystic fibrosis and bronchiectasis. A pilot study. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1711-1716.
78. Babu KS, Woodcock DA, Smith SE, Staniforth JN, Holgate ST, Conway JH. Inhaled synthetic surfactant abolishes the early allergen-induced response in asthma. *Eur Respir J* 2003; 216: 1046-1049.
79. Young PM, Thompson J, Woodcock D, Aydin M, Price R. The development of a novel high-dose pressurized aerosol dry-powder device (PADD) for the delivery of pumactant for inhalation therapy. *J Aerosol Med* 2004; 17: 123-128.

Originalarbeit zu dieser Dissertation:

Ruppert C*, Kuchenbuch T*, Boensch M, Schmidt S, Mathes U, Hillebrand V, Henneke I, Markart P, Reiss I, Schermuly RT, Seeger W, Günther A. Dry powder aerosolization of a recombinant surfactant protein-C-based surfactant for inhalative treatment of the acutely inflamed lung. Crit Care Med. 2010 Jul; 38 (7): 1584-1591.

Patentschriften Trockenvernebler



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 10 2005 016 229 B3 2006.06.14

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: 10 2005 016 229.0
(22) Anmeldetag: 08.04.2005
(43) Offenlegungstag: –
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 14.06.2006

(51) Int. Cl.®: **A61M 11/00** (2006.01)
A61M 15/00 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C07K 14/785 (2006.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 2 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
ALTANA Pharma AG, 78467 Konstanz, DE

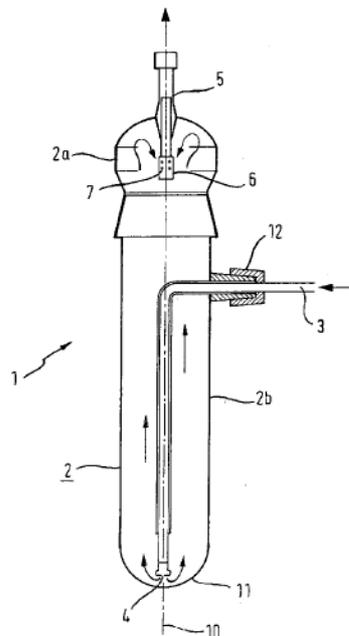
(74) Vertreter:
HOFFMANN & EITL, 81925 München

(72) Erfinder:
Kuchenbuch, Tim, 35647 Waldsolms, DE; Gessler, Tobias, Dr., 35435 Wettenberg, DE; Günther, Andreas, Dr., 35415 Pohlheim, DE; Schmehl, Thomas, Dr., 35390 Gießen, DE; Seeger, Werner, Prof. Dr., 35444 Biebertal, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:
US 51 86 166
US 26 93 805
US 15 99 959

(54) Bezeichnung: **Trockenvernebler**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft einen Trockenvernebler (1), welcher ein Gehäuse (2) mit einem Bereich für die Aufnahme von vernebelbarem Material (8), eine mit dem Gehäuse verbundene Gaszuleitung (3), deren eines Ende in das Gehäuse hineinreicht und eine Gaseinlassöffnung (4) zum Einleiten von Trägergas in das vernebelbare Material aufweist, und eine mit dem Gehäuse verbundene Gasableitung (5) mit einem Gasauslass (6) zum Ableiten des Trägergases mit darin enthaltenem vernebeltem Material umfasst, wobei der Gasauslass (6) als Filter ausgebildet ist. Der Trockenvernebler erlaubt beispielsweise die Vernebelung von pulverförmigen Arzneimittelzubereitungen, die LUSUPULTIDE umfassen, wobei ein großer Anteil des eingesetzten Arzneimittels den Wirkort in den Lungenalveolen erreicht. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Respiratoren, in welche solche Trockenvernebler eingebaut sind.



**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Andreas Günther danke ich sehr für die kontinuierliche Betreuung, die nette Atmosphäre und die Geduld, zu jeder Zeit neue Ideen mit mir zu besprechen und zu verwirklichen. Weiterhin danke ich für die Unterstützung und die Ideen bei der Realisierung des Patents.

Herrn Prof. Dr. med. Werner Seeger danke ich für die wissenschaftliche Ausbildung, für die anregenden und weiterführenden Gespräche, sowie seine Unterstützung bei der Erlangung des Patents.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. rer. nat. Tobias Gessler und Herrn Dr. rer. nat. Thomas Schmehl für die Messungen des Partikelspektrums der unterschiedlichen Aerosole sowie für die ideenreichen Gespräche.

Herrn Prof. Dr. med. Dieter Walmrath danke ich für die Unterstützung im Bereich der Intensivmedizin.

Ich danke allen Mitarbeitern des „Surfactant-Labors“, besonders Herrn Dr. rer. nat. Clemens Ruppert, für die Funktionsanalytik des Surfactants.

Besonders danken möchte ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Respiratorische Insuffizienz“ für die freundliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft. Besonders erwähnen möchte ich hier Frau Karin Quanz für ihre kompetente Unterstützung im Rahmen der Tierversuche.

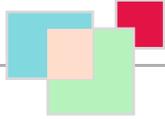
Ganz besonderer Dank gilt meiner Ehefrau Kathleen, die mich während der zeitintensiven Versuchsreihen mit großem Verständnis begleitete.

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 im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer 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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-5966-8



9 783835 959668