

Zusammenfassung - In vitro Optimierung der Mikrodialyse für pharmakokinetische Fragestellungen

Einleitung

Die Mikrodialyse wurde ursprünglich in der Neuropharmakologie, zur Messung von Neurotransmitter entwickelt (Ungerstedt, Herrera-Marschitz et al., 1982). Seit 1990 wurde die Mikrodialyse auch für pharmakokinetische Untersuchungen exogener Substanzen eingesetzt (Stähle, Segersvärd et al., 1990). Problematisch sind hierbei lipophile Substanzen, die an der Sondenmembran und am Schlauch haften. Die Mikrodialyse dieser Substanzen ist mit niedrigen Wiederfindungen (Carneheim and Stähle, 1991) und langen Equilibrationszeiten verbunden. Die genaue Equilibrationszeit wird aber selten berichtet (Tao and Hjorth, 1992), dabei ist eine kurze Equilibrationszeit wichtig, wenn schnelle Konzentrationsänderungen gemessen werden sollen. Diese Dissertation hat daher zum Ziel ein Testverfahren zu etablieren, welches die Substanzbindung am eingesetzten Material, und die Reaktionszeit des Mikrodialyse-aufbaus auf Konzentrationsänderungen quantitativ erfassen kann, damit Schlauch- und Sondenmaterialien identifiziert werden können, die für pharmakokinetische Anwendungen geeignet sind.

Materialien

Ein Material, dass für pharmakokinetische Studien eingesetzt werden soll, muss schnell auf Konzentrationsänderungen reagieren, und muss eine genügende Wiederfindung haben, damit die Substanzkonzentrationen in den gesammelten Proben ausreichen, um mit dem vorhandenen analytischen Verfahren quantifiziert werden zu können. Die Materialien sollten daher keine Bindung mit der Testsubstanz eingehen. Um dies zu belegen, werden Schläuche und Sonden getrennt getestet, denn nur wenn der Sammelschlauch (= Outlet) die Substanz nicht bindet, kann die Adhäsion am Sondenmaterial gemessen werden. Für die Dissertation waren 5 für die Mikrodialyse geeignete Schlauchmaterialien, und 11 unterschiedliche Hirnsonden im Handel erhältlich (Tabelle 1 und Tabelle 2). Fettgedruckt sind die Eigenschaften der Sonden, die in Bezug auf Bindungskapazität und Reaktionszeit verglichen werden: unterschiedliche Membranmaterialien und gleiches Membranmaterial aber mit unterschiedlicher Porengröße, Membrangröße, Membrandicke oder Outletmaterial.

Tabelle 1: Dimensionen der fünf getesteten Schlauchmaterialien

Material	OD [mm]	ID [mm]	Tot- Volumen [μ L]	Innere Oberfläche [cm ²]
FEP	0.80	0.12	12	3.9
FEP/Teflon	0.65	0.12	12	3.9
PEEK	0.65	0.12	12	3.9
Fused silica	0.36	0.10	7.9	3.1
Silikon	0.76	0.25	23	3.6

FEP Fluorinated ethylene propylene

PEEK Polyetheretherketone

OD Außendurchmesser

ID Innendurchmesser

Tabelle 2: Relevante Eigenschaften der elf geprüften Hirnmikrodialysesonden

Sonden-bezeichnung	Membran-material	Poren-größe [kDa]	S ¹⁾ [mm ²]	V ²⁾ [mm ³]	Membran-dicke [µm]	Fluid layer [µm]	Outlet-material
CMA/12 (PES)	PES	100	6.28	0.283	50	75	14 mm Steel
MAB 2.14.4	PES	35	7.54	0.248	35	150	14 mm PEEK
MAB 6.14.4	PES	15	7.54	0.248	35	150	14 mm PEEK
MAB 9.14.4	PES	6	7.54	0.248	35	150	14 mm PEEK
MAB 8.4.4	PES	6	3.02	0.079	30	28	4 mm Steel
MAB 4.15.4 PES	PES	6	3.02	0.079	30	28	15 mm PEEK
MAB 4.15.4 Cu	Cu	6	3.02	0.079	30	28	15 mm PEEK
CMA/11	Cu	6	3.02	0.055	20	25	14 mm Steel
MBR-4-10	Cell	38	2.76	0.016	5	52	12 mm PEEK
CMA/12 (PC)	PC	20	6.28	0.091	15	110	14 mm Steel
BR-4	PAN	30	4.02	0.141	40	45	15 mm PEEK

PC = Polycarbonat

PES = Polyethylenesulfon

PAN = Polyacrylonitril

Cu = Cuprophan

Cell = Cellulose

¹⁾ S = Membranoberfläche = $\pi \times \text{Membran OD} \times \text{Membranlänge von 4 mm}$

²⁾ V = Membranzvolumen = $\pi \times (\text{OD}^2 - \text{ID}^2) / 4 \times \text{Membranlänge von 4 mm}$

³⁾ Fluid layer = (Membran ID – Innere Kanüle OD) / 2

Die zu vergleichende Eigenschaft jeder Sonde ist fett gedruckt

Die für die Mikrodialyse relevanten Eigenschaften der beiden Testsubstanzen sind in Tabelle 3 aufgelistet. ZK 975 ist eine lipophile Substanz, die in Vorversuchen als 'klebrig' erkannt worden war, ZK 894 ist eine hydrophile Substanz, die sich vorher als unproblematisch erwiesen hatte.

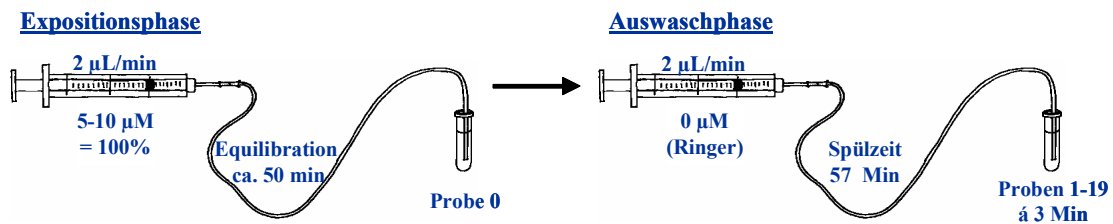
Tabelle 3: Relevante Eigenschaften der Testsubstanzen ZK 975 und ZK 894

¹⁴ C-ZK 975 (Lipophile Substanz)	¹⁴ C-ZK 894 (Hydrophile Substanz)
Spezifische Aktivität = 2.15 MBq/µmol	Spezifische Aktivität = 2.09 MBq/µmol
MW = 387.4 Da	MW = 376.4 Da
Log P _{OW} (pH 7) = 4.0	Log P _{OW} (pH 7) = 1.5
S ₂₀ (pH 7) = 43 µM	S ₂₀ (pH 7) = 43 µM
pK _a (25°C) = 2.6, 11.5 (neutral bei pH 7)	pK _a (25°C) = 2.9, 3.4 (neutral bei pH 7)
MW = Molekulargewicht	Log P _{OW} = Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
S ₂₀ = Löslichkeit in Wasser 20°C	pK _a = Säurekonstante

Method

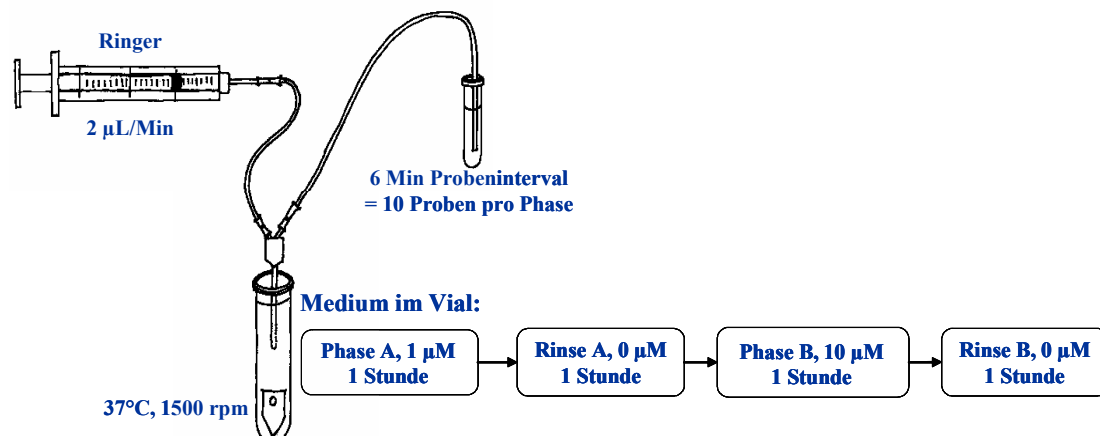
Für den Schlauchtest wurde jeder Schlauch (N = 4 pro Material) über Nacht mit Ringerlösung vorgespült, was zu reproduzierbareren Ergebnissen führte als mit Schläuchen, die direkt von der Packung für den Test eingesetzt wurden. Der Test bestand aus einer Expositionsphase von zirka einer Stunde, wobei der Schlauch mit einer Lösung von 5-10 μM Substanz in Ringer bei 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ durchgespült wurde (Figur 1). Am Ende dieser Phase wurde eine Probe entnommen (Probe 0). Anschließend folgte eine 57-Minütige Auswaschphase, wobei die Schläuche mit Ringerlösung gespült wurden, und alle 3 Minuten Proben gesammelt wurden.

Figur 1: Aufbau und zeitlicher Ablauf des Schlauchtests



Für den Sondentest wurden die Materialien (N = 4 pro Sondentyp) ebenfalls über Nacht mit Ringerlösung vorgespült. Der Test am Folgetag bestand aus zwei Konzentrationsphasen (Phase A und Phase B), und zwei Auswaschphasen ('Rinse A' und 'Rinse B'), jeweils 1 Stunde lang, mit Probenahme alle 6 Minuten (Figur 2). Die Flußrate war immer 2 $\mu\text{L}/\text{min}$, die Temperatur war auf 37°C eingestellt, und die Media wurden bei maximaler Einstellung (1500 rpm) gerührt.

Figur 2: Aufbau und zeitlicher Ablauf des Sondentests



Auswertung

Die Schlauchbefunde wurden grafisch dargestellt als Probenkonzentration in '% der Ausgangskonzentration' gegen 'Anzahl Totvolumenwechsel', wobei jeder Schlauch eine ähnliche innere für die Substanzbindung verfügbare Oberfläche hat (Tabelle 1). Um die Bindungskapazität der Schläuche zu quantifizieren, wurde die 'amount eluted' (Ae), die Menge an eluierter Substanz, berechnet:

$$Ae_{1-5} = \frac{Ae_{0-5} - A_{\text{Totvolumen}}}{\text{Innenoberfläche}} \quad [\text{pmol}/\text{cm}^2],$$

wobei Ae_{1-5} die gesamte gesammelte Menge an Substanz in den ersten fünf Totvolumenwechsel (Ae_{0-5}) ist, mit Abzug der noch vorhandenen Substanzmenge im Schlauch am Anfang der Auswaschphase ($A_{\text{Totvolumen}}$).

Da die üblicherweise bei Sonden angegebene Wiederfindung (REC) stark von der Membranoberfläche (S) und der Flußrate (Q) abhängt, wurden zum direkten Vergleich die Sondenbefunde grafisch dargestellt als Massenübertragungskoeffizient K (Sun and Stenken, 2003) gegen Probenzahl, wobei K berechnet wird als:

$$K = \frac{-Q \times \ln(1 - \text{REC})}{S} \quad [\mu\text{L}/\text{Min}/\text{mm}^2]$$

Um die Reaktion der Sonde auf ansteigende Konzentrationen numerisch zu beschreiben, wurde für Phasen A und B die Fläche unter der Kurve (AUD) bestimmt, die dann bezogen wurde auf die AUD einer 'idealen' Sonde (iAUD), die sofort auf die Konzentrationsänderung reagiert, und denselben K wie die getestete Sonde hat:

$$\text{gesamt \%iAUD} = \frac{\text{AUD}_{\text{Phase A}} + \text{AUD}_{\text{Phase B}}}{\text{iAUD}_{\text{Phase A}} + \text{iAUD}_{\text{Phase B}}} \times 100$$

Für die Auswaschphase wurde, wie bei den Schläuchen, die Menge der Substanz berechnet die vom Sondenmaterial eluiert wurde (Ae). Da am Anfang der Auswaschphase aber noch Substanzrückstände in der wässrigen Phase in den Poren der Membran in unbekanntem Mengen vorhanden sind, wurden die Daten beider Auswaschphase kombiniert um dieses zu berücksichtigen:

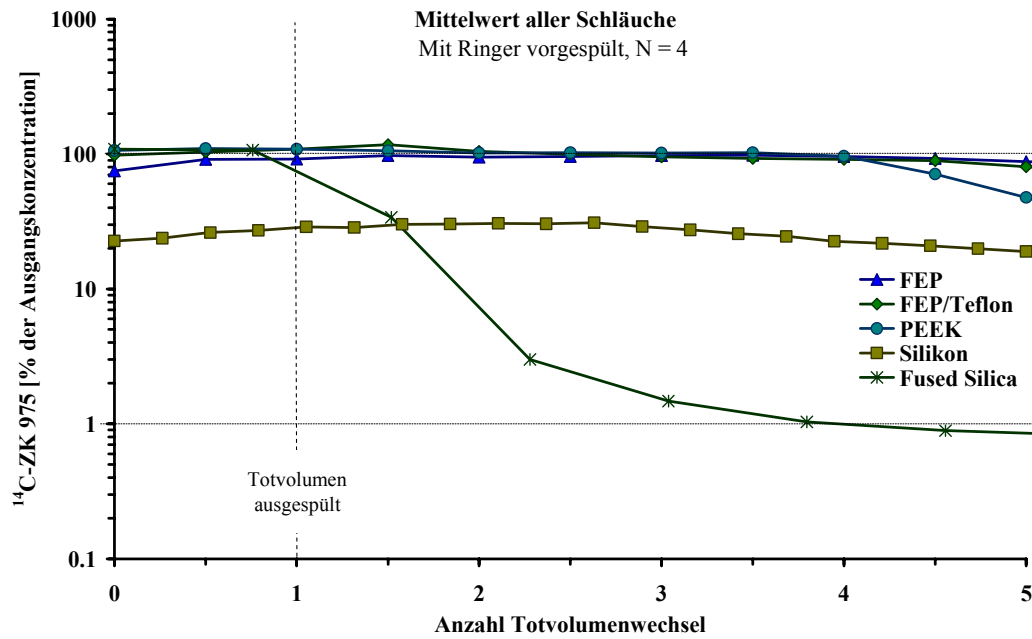
$$A_{\text{membranegebunden}} = Ae_{\text{Rinse A}} - \frac{Ae_{\text{Rinse B}} - Ae_{\text{Rinse A}}}{\frac{C_B}{C_A} - 1} = Ae \quad [\text{pmol}/\text{mm}^3]$$

(A = Substanzmenge, und $C_{A/B}$ ist die Mediumkonzentration der jeweiligen Phase)

Ergebnisse

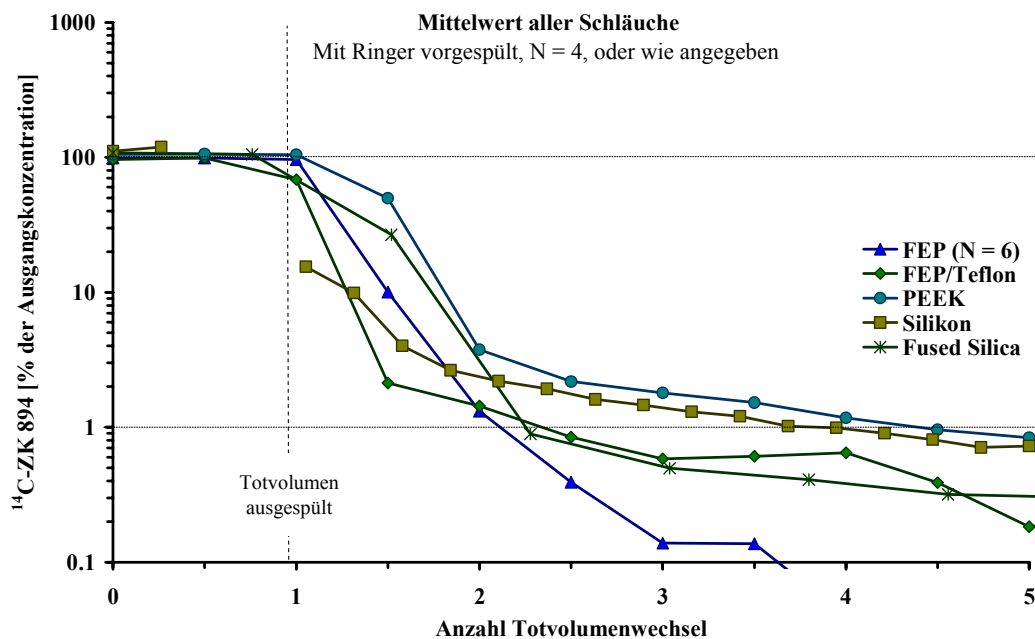
Von den Schlauchmaterialien ist nur fused silica geeignet zur Mikro dialyse der lipophilen Substanz ZK 975, da es schnell ausgespült werden kann (Figur 3), und keine Bindung aufweist ($Ae = 0 \pm 0 \text{ pmol}/\text{cm}^2 - \text{Mittelwert} \pm \text{SD}$). Alle anderen Materialien bluten lange nach (FEP, FEP/Teflon und PEEK, $Ae > 45 \text{ pmol}/\text{cm}^2$), oder werden gar nicht erst in der einstündigen Expositionsphase abgesättigt (Silikon).

Figur 3: Konzentration-Zeitverläufe der Elution von Schlauchmaterialien nach 1-Stündiger Exposition mit ^{14}C -ZK 975



Für die Mikrodialyse von der hydrophilen Substanz ZK 894 sind sowohl fused silica ($A_e = 0 \pm 0 \text{ pmol/cm}^2$), als auch FEP ($A_e = 2.2 \pm 0.6 \text{ pmol/cm}^2$) und FEP/Teflon ($A_e = 0 \pm 0 \text{ pmol/cm}^2$) als Schlauchmaterial geeignet (Figur 4). Eine leicht verlängerte Auswaschzeit wurde beobachtet für PEEK ($A_e = 5.1 \pm 4.4 \text{ pmol/cm}^2$) und für Silikon ($A_e = 4.9 \pm 0.8 \text{ pmol/cm}^2$), und diese beide Materialien eignen sich daher nur für Messungen konstanter Konzentrationen (z.B. bei Infusionsstudien).

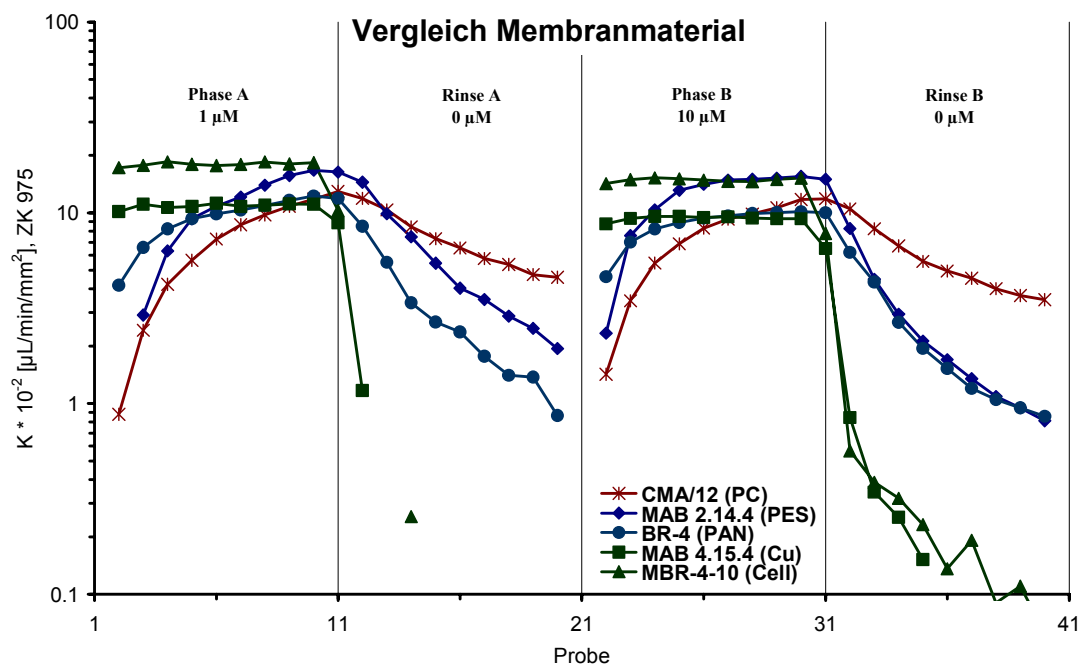
Figur 4: Konzentration-Zeitverläufe der Elution von Schlauchmaterialien nach 1-Stündiger Exposition mit ^{14}C -ZK 894



Von den Mikrodialysesonden eignen sich alle Cellulose-ähnlichen Membrane (Cuprophan und Cellulosic) für pharmakokinetische Mikrodialysestudien mit sowohl ZK 975 als auch ZK 894 (Figur 5 und Figur 6). Die %iAUD lag immer über 95%, und die Ae immer unter 5 pmol/mm^3 . Auch die PES-Membrane sind für die quantitative Mikrodialyse von ZK 894 geeignet, für ZK 975 aber eher nicht. Nur bei sehr kleinen Membranoberflächen kann die Bindungskapazität der PES-Membran für ZK 975 auf ein Maß reduziert werden, dass eventuell noch Messungen konstanter Konzentrationen erlaubt (mit $85\% < \%iAUD < 95\%$, und einer Ae von zirka 15 pmol/mm^3). Die PC-Membran ist für ZK 975 gar nicht, und für ZK 894 nur begrenzt geeignet, und die PAN-Membran ist für keine der beiden Substanzen für pharmakokinetische Fragestellungen geeignet ($\%iAUD < 85\%$, $Ae > 5 \text{ pmol/mm}^3$).

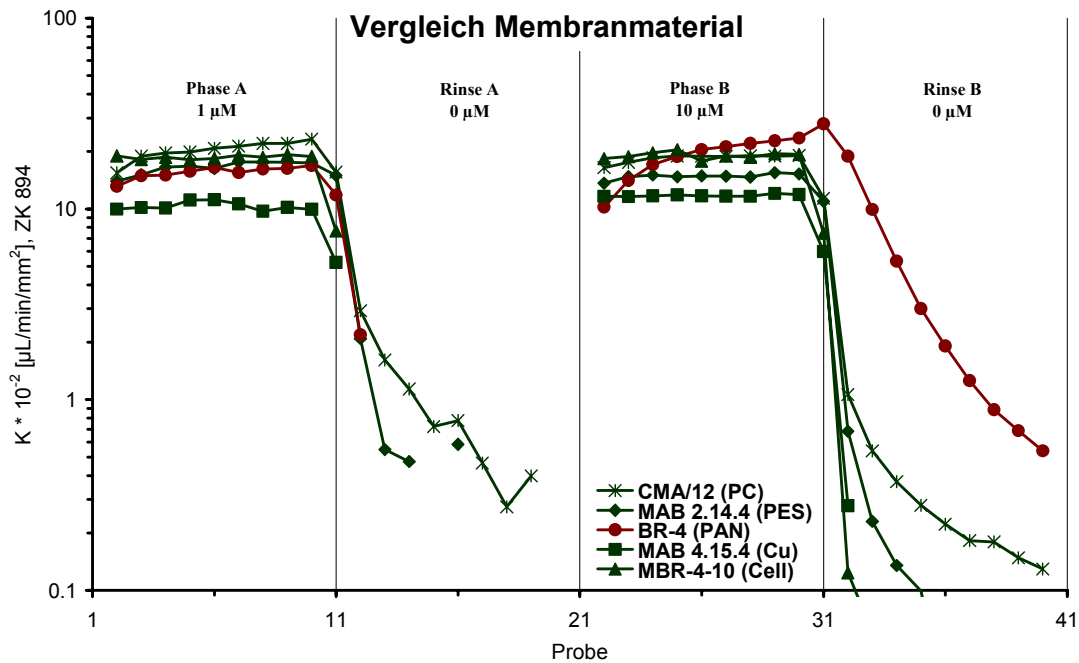
Ein Einfluss der Porengröße auf die Wiederfindung oder auf die Reaktionszeit konnte nicht gefunden werden. Eine scheinbar höhere Massenübertragung (K) bei einer kleineren Membran ist eher zurückzuführen auf unterschiedliche 'fluid layers' (Tabelle 2). Die Membrandicke jedoch hat einen deutlichen Einfluss auf K, wobei eine dünnere Membran erwartungsgemäß eine größere Massenübertragung hat. Das Outletmaterial hat keinen Einfluss auf K oder auf die Reaktionszeit.

Figur 5: Kurvenverläufe von K gegen Zeit der unterschiedlichen Membranmaterialien bei der in vitro Mikrodialyse von ^{14}C -ZK 975



In der Grafik fehlende Daten haben eine Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze (LLOQ), und können auf einer halblogarithmischen Achse nicht dargestellt werden (REC < LLOQ sind auf 0% gesetzt).

Figur 6: Kurvenverläufe von K gegen Zeit der unterschiedlichen Membranmaterialien bei der in vitro Mikrodialyse von ^{14}C -ZK 894



In der Grafik fehlende Daten haben eine Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze (LLOQ), und können auf einer halblogarithmischen Achse nicht dargestellt werden (REC < LLOQ sind auf 0% gesetzt).

Schlussfolgerung

- Die vorgestellten Prüfungsabläufe für Schlauch- und Sondentests eignen sich zur Identifizierung geeigneter Materialien für pharmakokinetische Fragestellungen;
- Die Parameter A_e (Schläuche und Sonden), und der Parameter %iAUD (Sonden) beschreiben die Reaktion der Materialien auf Konzentrationsänderungen gut;
- Für die lipophile Substanz ZK 975 eignen sich fused silica Schläuche und Cellulosic- oder Cuprophane-Membrane zur quantitativen Mikrodialyse;
- Für die hydrophile Substanz ZK 894 eignen sich zusätzlich FEP und FEP/Teflon Schläuche, und PES-Membrane für pharmakokinetische Fragestellungen.