

5 Fettemulsionen als Träger für das Narkosegas Xenon

Mit welchen Medikamenten ein Patient heute behandelt wird, wird vielfach nicht nur anhand der Wirksamkeit entschieden. Der enge Kostenrahmen setzt deutlich Grenzen für den Einsatz neuer innovativer Arzneimittel. Kriterien, wie das Nebenwirkungsprofil, die klinische Relevanz und ökologische Aspekte spielen häufig keine Rolle bei gleich bleibender oder sogar besserer Wirkung, wenn die Kosten für ein bestimmtes Arzneimittel niedrig sind. Aber gerade die intravenöse Einsatzmöglichkeit des idealen Narkosemittels Xenon kann einen Gewinn für alle beteiligten Seiten bedeuten: für die Kostenträger, die Umwelt, das Personal und besonders für die Patienten (vgl. Kap. 2.2.1).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, eine Emulsions-Formulierung als Träger für Xenon zu entwickeln. Anhand von Tierversuchen sollte ein Verständnis für das Arzneistoff-System erlangt werden. Die Wirkung der beladenen Emulsionen sollte hinsichtlich Verträglichkeit und maximaler Wirkung getestet und optimiert werden. Die Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Georgieff an der Universität für Anästhesiologie in Ulm.

5.1 Ausgangssituation

5.1.1 Vergleichsformulierungen

Die Formulierungen F1 bis F4 (vgl. Tab. 5-1), mit denen schon einige Vorversuche in Ulm durchgeführt worden waren, wurden von Prof. Dr. Georgieff zur Verfügung gestellt. Sie wurden auf der Basis von Abbolipid[®] 10% hergestellt. Allerdings waren die Herstellungsbedingungen nicht bekannt. Die Formulierungen dienten zunächst für die Reproduzierung bisher erhaltener Daten als Vergleich. Die Emulsionen sollten charakterisiert und auf der Basis dieser Charakterisierungsdaten neu hergestellt werden. Ziel war es, vorherige gute Daten zu reproduzieren.

Tab. 5-1: Zusammensetzung der Formulierungen F1 bis F4 auf der Basis von Abbolipid® 10%, die Tenside wurden jeweils Abbolipid® zugesetzt

Emulsion	Tween 80 [%]	Ei-Phosphatid [%]	Solutol [%]
F1	-	-	1
F2	1	-	-
F3	-	1	2
F4	-	2	-

Die Partikelgröße wurde mittels PCS und LD bestimmt. Durch die Bestimmung des Zeta-potentials wurden die Unterschiede der Oberflächenbeladung zwischen den Partikeln charakterisiert (vgl.Tab. 5-2). Die nachfolgend aufgeführte Tabelle 5-2 gibt zusätzlich Auskunft über die Löslichkeit von Xenon bei einer Begasung mit 1 und 2 bar Xenon-Partialdrucks. Die Begasung erfolgte wie in Kapitel 3.1.4.3 beschrieben.

Tab. 5-2: Ergebnisse der Partikelgrößen- und Zetapotentialbestimmung der Formulierungen F1 bis F4 und Abbolipid® 10% als Ausgangsemulsion; die Löslichkeit von Xenon in den Emulsionen wurde unter hyperbaren und normobaren Bedingungen bestimmt.

Emulsion	d50% [µm]	d99% [µm]	PCS [nm]	PI	ZP [mV]	Xe (1 bar) [µL/mL]	Xe (2 bar) [µL/mL]
F1	0,091	0,205	132	0,147	-37,6	342	710
F2	0,095	0,177	130	0,169	-35,8	300	622
F3	0,084	0,162	118	0,116	-31,4	355	727
F4	0,094	0,249	151	0,119	-40,5	339	643
Abbolipid® 10%	0,288	0,492	270	0,039	-46,1	340	680

Die Formulierungen F1 bis F4 lagen in einem Partikelgrößenbereich von 118-151 nm und zeigten ein Zetapotential zwischen -36 und -46 mV. Dies bedeutet, dass die Emulsionen ausreichend elektrostatisch stabilisiert waren, um über eine Lagerzeit von bis zu 3 Jahren als Arzneimittel aufbewahrt zu werden (Müller, 1996a). Die Ausgangsemulsion Abbolipid® 10% zeigte einen PCS-Durchmesser von 270 nm. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die Emulsionen F1 bis F4 durch einen weiteren Homogenisationsprozess zerkleinert wurden. Dadurch entstand eine größere Grenzfläche (Oberfläche) zwischen Emulsionstropfen und

Wasser. Die Löslichkeit von Xenon lag bei normobaren Bedingungen zwischen 320 und 385 $\mu\text{L}/\text{mL}$ und bei hyperbaren Bedingungen (2 bar) zwischen 643 und 727 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Bei einem Vergleich der Werte war nicht klar ersichtlich, ob die Einlagerung von Xenon möglicherweise mit Vergrößerung der Oberfläche steigt. Es sollte daher unter anderem in den weiteren Arbeiten untersucht werden, ob die Löslichkeit nur vom Öl/Wasser-Verhältnis oder auch von der Größe der Grenzfläche und gegebenenfalls Zusammensetzung der Grenzfläche abhängt (z.B. von der Art des Lecithins).

5.1.2 Druckabhängige Löslichkeit von Xenon und Ausgasungsverhalten der Referenzemulsionen

In der Literatur sind kaum Angaben über Lösungsmittel für Xenon und das Ausgasungsverhalten aus Flüssigkeiten zu finden. Für die folgenden Untersuchungen wurden die Formulierungen F1 bis F4, Wasser und Abbolipid[®] 10% auf die Löslichkeit von Xenon in Abhängigkeit vom Xenon-Partialdruck untersucht und das Ausgasungsverhalten nach Beladung mit Überdruck über zwei Stunden verfolgt. Die Beladung mit Xenon erfolgte wie in Kapitel 3.1.4.3 beschrieben.

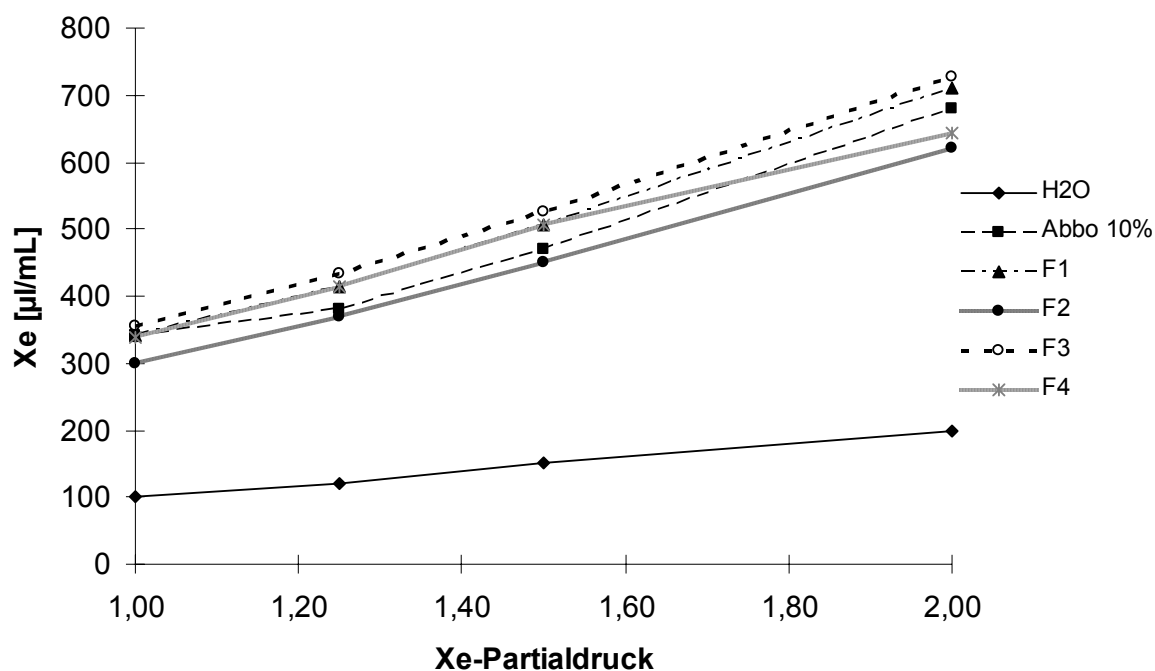


Abb. 5-1: Xenon-Löslichkeit in den Formulierungen F1 bis F4, Wasser und Abbolipid[®] nach dem Begasen bei unterschiedlichem Xenon-Partialdruck

In Abbildung 5-1 ist zu erkennen, dass der Beladungsdruck einen erheblichen Einfluss auf das Lösungsvermögen in den Flüssigkeiten bzw. Emulsionen hat. Je höher der Partialdruck des Gases war, desto mehr Xenon konnte in den Flüssigkeiten gelöst werden. Eine Verdopplung des Drucks führte mindestens zu einer Verdopplung der Löslichkeit. Die geringste Löslichkeit wurde in Wasser beobachtet (200 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 2 bar), die höchsten Löslichkeiten von Xenon waren bei F1 und F3 mit 710 $\mu\text{L}/\text{mL}$ und 727 $\mu\text{L}/\text{mL}$ zu finden. Bei einem Partialdruck von 1 bar konnten zwischen 300 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (F2) und 355 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (F3) Xenon gelöst werden. Wasser lag bei 1 bar lediglich bei 101 μL Xenon/ mL . Es konnte eine lineare Zunahme der Löslichkeit bei steigendem Druck festgestellt werden (F1: $R = 0,995$; F2: $R = 0,998$; F3: $R = 0,997$, F4: $R = 0,997$; H_2O : $R = 0,996$; Abbolipid: $R = 0,975$).

Die Messungen zeigen, dass durch Zusatzstoffe wie Öl und Emulgatoren das Lösungsvermögen beeinflusst werden kann, wie die Löslichkeitserhöhung um das 3,5fache von Wasser zu den Emulsionen zeigt.

Um ein weiteres Verständnis für das Verhalten von Xenon in Flüssigkeiten zu bekommen, wurde das Ausgasungsverhalten über einen Zeitraum von 120 min verfolgt. Nach dem Beladen der Proben bei 2 bar wurde das System entspannt, die Spritze waagrecht und liegend geöffnet gelagert und die Ausgasungskinetik nach 1, 5, 10, 30, 60, 90 und 120 min bestimmt (Abb. 5-2). Die Formulierungen F1 bis F3 fielen durch starkes Schäumen beim Beladen mit Xenon auf. Die Formulierung F4 war in dieser Hinsicht mit Abbolipid® 10% vergleichbar. Beim Ausgasen war bei keiner der Lösungen Schaumbildung zu beobachten.

In den ersten 10 min verlief die Abnahme an Xenon in den Proben schneller als im weiteren Verlauf des Versuchs. Nach 120 min war in den Emulsionen noch mehr Xenon enthalten als bei den mit 1 bar beladenen Proben. Wasser hingegen erreichte schon nach 30 min ein Plateau.

Die Zusätze von Öl und Emulgator verzögern die Freigabe des Gases. Das Ausgasen wird solange erfolgen, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat. Die Ausgasungskinetiken aller Emulsionen waren in einem vergleichbaren Ausmaß, unabhängig von den gemessenen Konzentrationen.

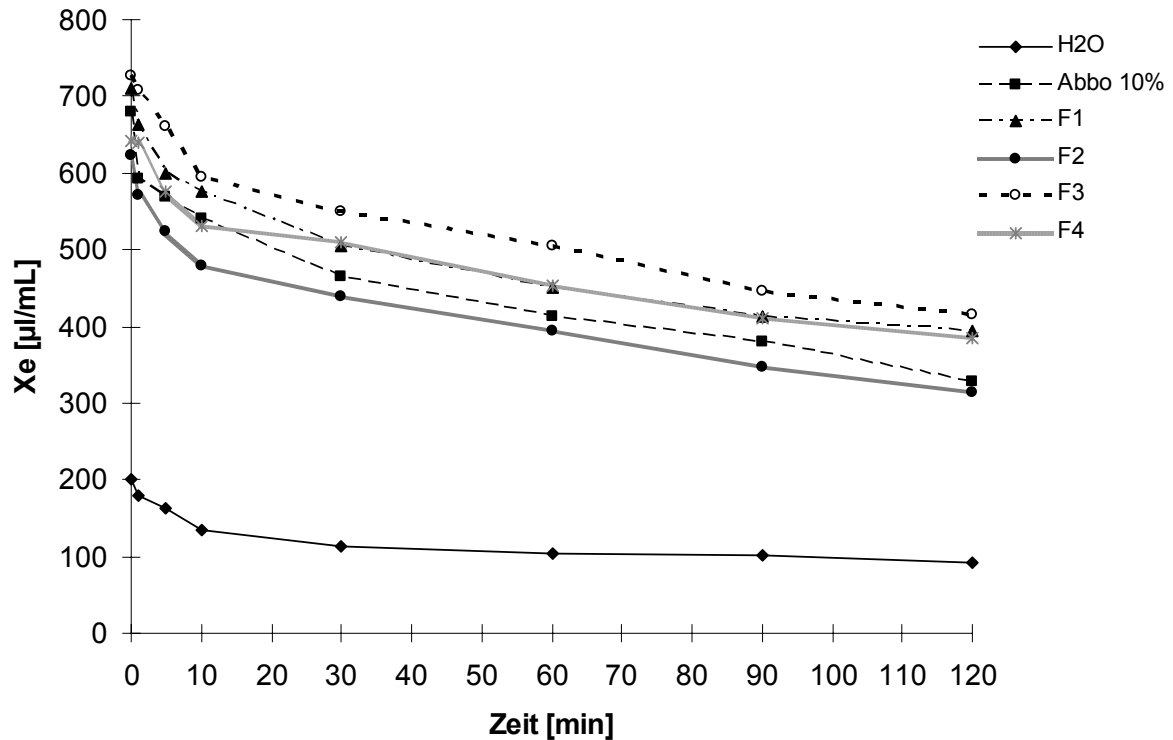


Abb. 5-2: Ausgasungsverhalten von Xenon aus mit Überdruck beladenen Flüssigkeiten

Ein schnelles Ausgasen der Emulsionen kann bei den Versuchstieren (Schweine), mit denen die In-vivo-Untersuchungen (vgl. Kap. 5.4) durchgeführt wurden, zu Gasembolien führen. Das schnelle Ausgasen kann in der Spritze anhand des Entstehens von kleinen Gasblasen beobachtet werden. Ein langsames Ausgasen führt zur Bildung einer großvolumigen Blase.

Grundsätzlich zeigt sich bei der Beladung unter höherem Druck eine größere Beladungskapazität. Aus dieser Beobachtung heraus konnten aus Gründen der Vereinfachung alle weiteren Beladungsuntersuchungen routinemäßig bei Umgebungsdruck (1 bar) ausgeführt werden, da bei den mit 2 bar beladenen Proben eine relativ höhere Beladung erwartet werden konnte. In Abbildung 5-3 ist gut zu erkennen, dass sich 10 mL Xenon ohne Druck durch Schütteln in 30 mL Emulsion (Abbolipid[®] 10%) lösen.



Abb. 5-3:

Bild A zeigt eine Spritze mit 20 mL Xenon (Gasraum über der Emulsion) und 30 mL Abbolipid® 10% vor dem Schütteln unter Normaldruck von 1 bar; Bild B zeigt das Verhältnis nach dem Schütteln: 10 mL Xenon wurden in der Emulsion gelöst.

5.2 Rezepturscreening: Entwicklung einer Formulierung für In-vivo-Studien

Das Rezepturscreening sollte zu einer Formulierung führen, die in vivo angewendet werden kann, um anhand dieser Ergebnisse eine Weiterentwicklung zu einem optimalen Xenon-Träger zu ermöglichen. Mittels der dann folgenden Untersuchungen sollte eine Emulsion entstehen, die ohne Risiko am Patienten zu einem optimalen Narkosemittel führt.

Für die Entwicklung einer injizierbaren Formulierung war es zunächst wichtig, eine hohe Beladung mit Xenon zu erreichen, um ein geringes Applikationsvolumen bei gutem klinischen Effekt zu erhalten. Eine langsame oder fehlende Ausgasungskinetik war erforderlich, um die Gefahr einer Gasembolie zu umgehen. Die Auswahl aller Bestandteile beschränkte sich auf solche, die von den verschiedenen Arzneibüchern oder Zulassungsbehörden für parenterale Zwecke freigegeben sind oder ohne großen Zulassungsaufwand diesen Status einnehmen können.

Die bisherigen Versuche zeigten, dass sowohl die Rezepturbestandteile als auch potentiell die Partikelgröße (z.B. über der Größe der Grenzfläche O/W) einen Einfluss auf die Löslichkeit und das Ausgasen der Emulsionen nehmen. Als weitere Entwicklung war eine Modifikation in Richtung einer Formulierung denkbar, die bevorzugt im Blut Apolipoprotein E anlagert und somit einen bevorzugten Transport von Xenon über die Blut-Hirn-Schranke ermöglicht. Die Einarbeitung von Tween® 80 könnte hier ein möglicher Ansatz sein (Kreuter and

Alyautdin, 2000; Kreuter et al., 1997). Durch In-vivo-Versuche sollten für einige ausgesuchte Formulierungen die Wirkung und Verträglichkeit beurteilt und optimiert werden.

Die Formulierungen F1 bis F4 dienten richtungsweisend als Referenz. Bisher wurde nur Abbolipid[®] als Basisemulsion verwendet. Die Fettemulsionen an sich bewirken zwar keine Anästhesie oder Analgesie, aber sie ermöglichen, dass Anästhetika wie Halothan oder Propofol, verabreicht in Fettemulsionen, in ihrer Toxizität reduziert werden (Musser et al., 1999) oder in ihrer Dosierung herabgesetzt werden können (Dutta and Ebling, 1997; Musser et al., 1999). Dies wird mit einer Veränderung der Arzneistoffanordnung sowie der Pharmakokinetik und Reduzierung des freien Arzneistoffs begründet. Für Intralipid[®] 20%, ClinOleic[®] 20%, Lipofundin[®] MCT 20% und Abbolipid[®] 20% wurde eine Reduktion der provozierten NMDA-Antwort mit Hilfe der Patch-clamp-Technik in Neuronal- und TsA-Zellen mit transfizierten NMDA-Untereinheiten nachgewiesen (Weigt et al., 2004). Die Patch-clamp-Technik ermöglicht das Erfassen von Membranströmen der gesamten Zelle. Hierbei wurde die ausgeprägteste Hemmung mit Abbolipid[®] beobachtet.

5.2.1 Löslichkeitsuntersuchungen von Xenon

5.2.1.1 Löslichkeit in parenteralen Fettemulsionen

Durch die Hochdruckhomogenisation der Basisemulsion Abbolipid[®] 10% sollten zum einen gleichwertige oder noch feiner verteilte Emulsionen hergestellt werden, zum anderen sollte untersucht werden, ob durch den Zusatz von verschiedenen Tensiden mit anschließender Hochdruckhomogenisation die Emulsionen Abbolipid[®] 10% und 20% verändert werden können, so dass gleichwertige oder kleinere Teilchengrößen als die der Referenzformulierungen F1-F4 (Kap. 5.1.1) entstehen. Zusätzlich wurden weitere handelsübliche Fettemulsionen mit und ohne Zusatz von lösungsvermittelnden Tensiden auf ihre Eignung als Xenonträger getestet. Alle Emulsionen wurden auf die Löslichkeitseigenschaften für Xenon untersucht. Die Tabelle 5-3 gibt die Löslichkeit von Xenon in Abhängigkeit von der Zusammensetzung und den Herstellungsbedingungen an.

Tab. 5-3: Produktdaten der Rezepturen mit den Ergebnissen der Löslichkeitsuntersuchung**Tab. 5-3a: Emulsionen mit Abbolipid® unter evt. Zusatz von Tensiden; in Klammern wird die Bezeichnung der Referenzformulierung genannt.**

Formulierung	Abbolipid	Tween 80 [%]	Eilecithin [%]	Solutol [%]	Bemerkung	Xe [$\mu\text{L}/\text{mL}$]	PCS [nm]
A1	10%	-	-	-	unhomogenisiert	320	264
A2	10%	1	-	-	unhomogenisiert	320	263
A3	10%	2	-	-	unhomogenisiert	315	262
A4	10%	-	-	-	1500 bar, 45°C, 15 Z	320	174
A5 (F2)	10%	1	-	-	1500 bar, 45°C, 15 Z	320	157
A6	10%	2	-	-	1500 bar, 45°C, 15 Z	340	139
A7	10%	-	1	-	1500 bar, 45°C, 15 Z	345	139
A8 (F4)	10%	-	2	-	1500 bar, 45°C, 15 Z	360	124
A9 (F1)	10%	-	-	1	1500 bar, 45°C, 15 Z	340	154
A10	10%	-	-	2	1500 bar, 45°C, 15 Z	350	127
A11(F3)	10%	-	1	2	1500 bar, 45°C, 15 Z	350	88
A12	20%	-	-	-	unhomogenisiert	575	293
A13	20%	-	-	-	1500 bar, 45°C, 15 Z	600	201

Tab. 5-3b: Emulsionen auf der Basis von Lipofundin®, die Basisemulsionen wurden extern von einer Firma extra für das Rezepturscreening von Amphotericin B gefertigt vgl. Kap. 4.1.

Formulierung	Lipofundin®	Bemerkung	Xe [$\mu\text{L}/\text{mL}$]	PCS [nm]
L1	MCT 10% (0,6% Eilecithin)	unhomogenisiert	340	256
L2	MCT 10% (0,8% Eilecithin)	unhomogenisiert	350	257
L3	MCT 10% (1,2% Eilecithin)	unhomogenisiert	360	244
L4	MCT 10% (2,4% Eilecithin)	unhomogenisiert	370	239
L5	MCT 10% (0,8% Sojalecithin)	unhomogenisiert	365	257
L6	MCT 10% (1,2 Sojalecithin)	unhomogenisiert	345	255
L7	MCT 10% (2,4% Sojalecithin)	unhomogenisiert	350	235
L8	MCT 10% (1,2% Tween 80)	unhomogenisiert	320	197
L9	MCT 10% (1% DMPC/99% Eil.=1,2%)	unhomogenisiert	340	266
L10	MCT 10% (10% DMPC/90% Eil.=1,2%)	unhomogenisiert	350	260
L11	MCT 10% (1% SPC-3/99% Eil.=1,2%)	unhomogenisiert	350	279
L12	MCT 10% (10% SPC-3/90% Eil.=1,2%)	unhomogenisiert	350	275
L13	MCT 20% (1,2% Eilecithin)	unhomogenisiert	590	273
L14	N* 20% (1,2% Eilecithin)	unhomogenisiert	515	309
L15	MCT 10% (0,8% Eilecithin)	1500 bar, 45°C, 15 Z	340	172
L16	MCT 10% (1,2% Eilecithin)	1500 bar, 45°C, 15 Z	360	153
L17	MCT 10% (2,4% Eilecithin)	1500 bar, 45°C, 15 Z	370	129

* LCT als Ölphase

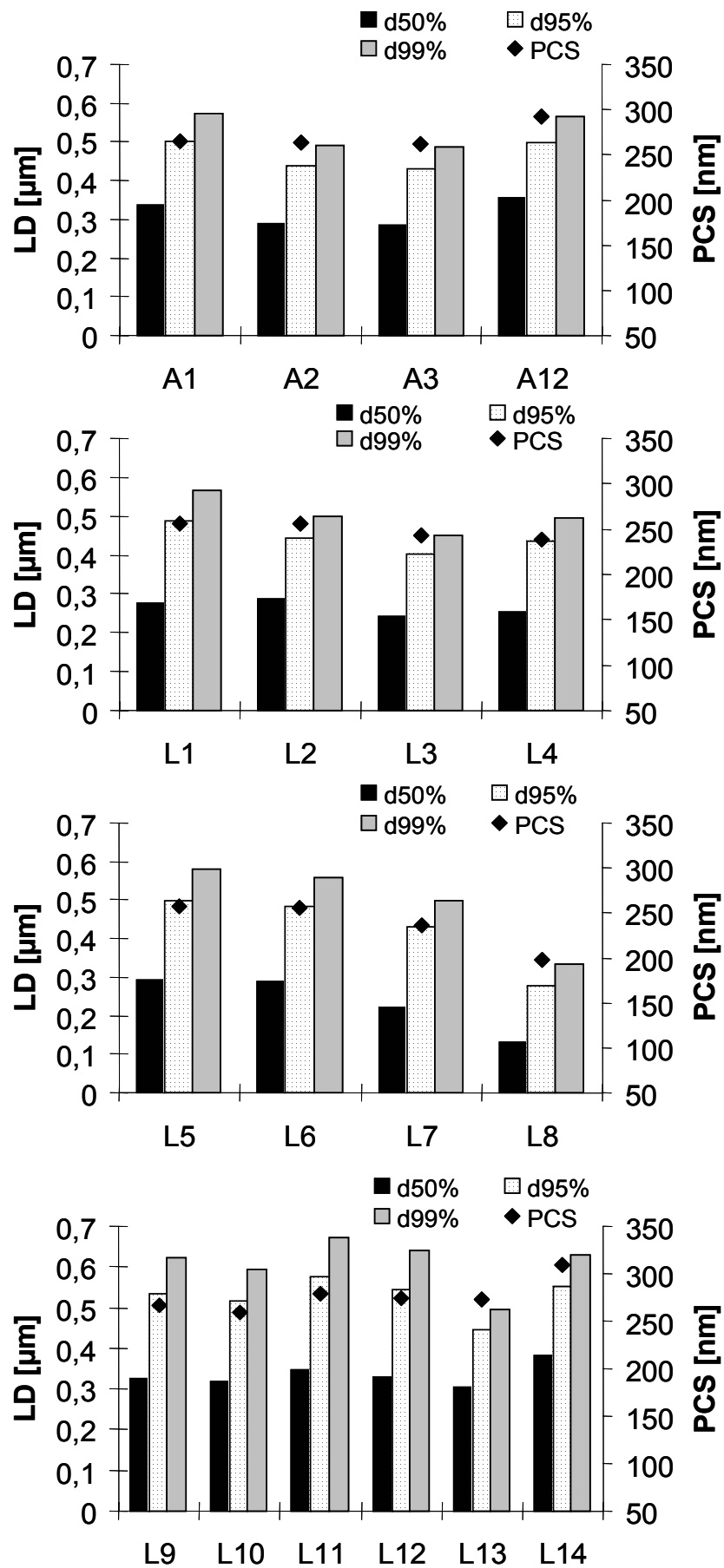


Abb. 5-4: Partikelgrößen der unhomogenisierten Emulsionen (Formulierungen s. Tab. 5-3)

Die Abbildung 5-4 zeigt die Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung der unhomogenisierten Emulsionen (Formulierungen vgl. Tab. 5-3). Diese Partikel lagen im Größenbereich handelsüblicher parenteraler Fettemulsionen. Der mittlere Teilchendurchmesser lag bei allen Proben unter 300 nm, während die Polydispersitätsindices einen Wert von 0,12 nicht überschritten (enge Verteilung). Die 20%igen Fettemulsionen waren erwartungsgemäß etwas größer, bedingt durch den höheren Fettgehalt. Auffällig war die Emulsion L8 (Emulgator: Tween[®] 80), die mit einem mittleren Partikeldurchmesser von 198 nm (PI: 0,091) und einem d99% von 333 nm deutlich kleiner war als die anderen Emulsionen. Lecithin besitzt eine langsame Grenzflächenbesetzungskinetik (Jahnke, 1998). Durch Tween[®] werden die während des Dispergierprozesses aufgebrochenen Grenzflächen schneller besetzt und somit kleinere Partikel schnell stabilisiert und somit eine feinere Emulsion erhalten. Das Einarbeiten von Tween[®] 80 mit einem Magnetrührer in unhomogenisiertes Abbolipid[®] (A2 und A3) hatte keinen Einfluss auf die Partikelgröße.

Durch die Hochdruckhomogenisation der Rezepturen mit 1500 bar bei 45 °C und 15 Zyklen konnten alle Emulsionen in ihrer Partikelgröße reduziert werden. Zur Beurteilung des Verlaufs des Homogenisationsergebnisses wurden während der Homogenisation nach den Zyklen 1, 5, 10 und 15 Proben entnommen und vermessen. In den Abbildungen 5-5 und 5-6 ist zu erkennen, dass 5 Homogenisationszyklen in der Regel ausreichend sind, um eine maximale Zerkleinerung der Partikel zu erreichen. Wurde bei den unhomogenisierten Fettemulsionen mit 10 und 20% Fettgehalt noch ein mittlere Partikeldurchmesser von 200-300 nm gemessen, so wiesen die homogenisierten Proben bereits nach 5 Zyklen nur noch mittlere Durchmesser (PCS) von 90-200 nm auf. In den folgenden Zyklen konnte der mittlere Durchmesser der Emulsionen nicht weiter reduziert werden. Der größte Teil der Zerkleinerungsarbeit findet bis zum 5. Zyklus statt. Durch weiteres Homogenisieren kann sich der Emulgator jedoch optimal auf den neuen Grenzflächen verteilen. Eine Ausnahme bildete Rezeptur A8 (entspricht F4). Die mittlere Partikelgröße konnte kontinuierlich von Zyklus 1 (185 nm) bis Zyklus 15 (124 nm) reduziert werden. Für die LD-Werte galt analog, dass die Reduktion des Anteils an größeren Partikeln vorwiegend zwischen Zyklus 1 und 5 stattfand. Zwischen Zyklus 10 und 15 konnte der d99% von A8 noch einmal deutlich von 239 nm auf 157 nm verkleinert werden. Weiteres Homogenisieren hätte gezeigt, wann ein maximaler Dispersitätsgrad erreicht worden wäre. Lediglich ein geringer Anstieg der LD 99%-Werte um 40-90 nm von Zyklus 5 bis 15 bzw. 10 bis 15 war bei den Rezepturen A13 und L15 zu beobachten. A13 verzeichnete auch eine Zunahme um 20 nm im d50%. Die Hauptpopulation blieb klein. Nur wenige Partikel aggregierten durch den überschüssigen

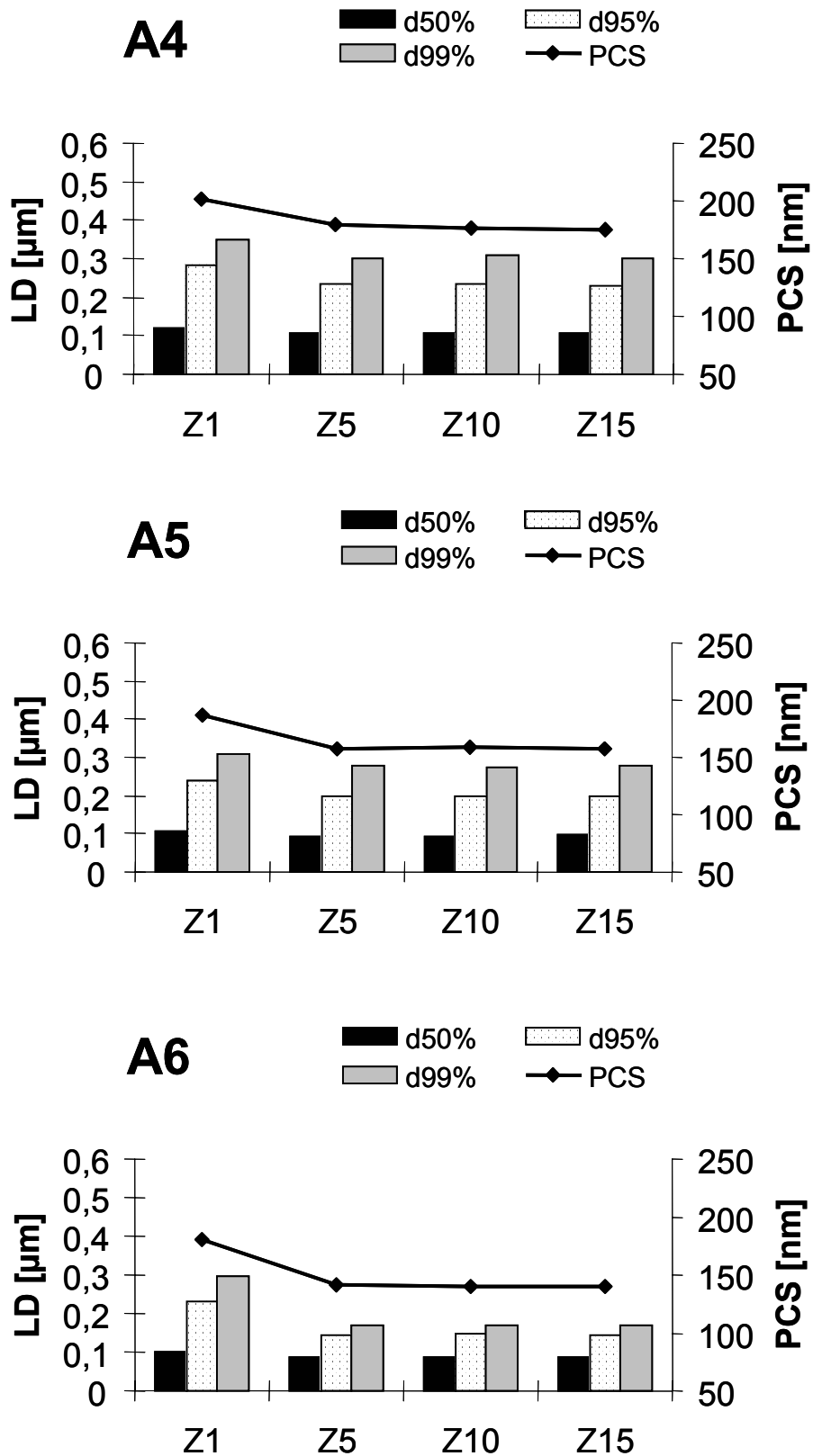


Abb. 5-5a: Partikelgrößen der homogenisierten Formulierungen A4-A6

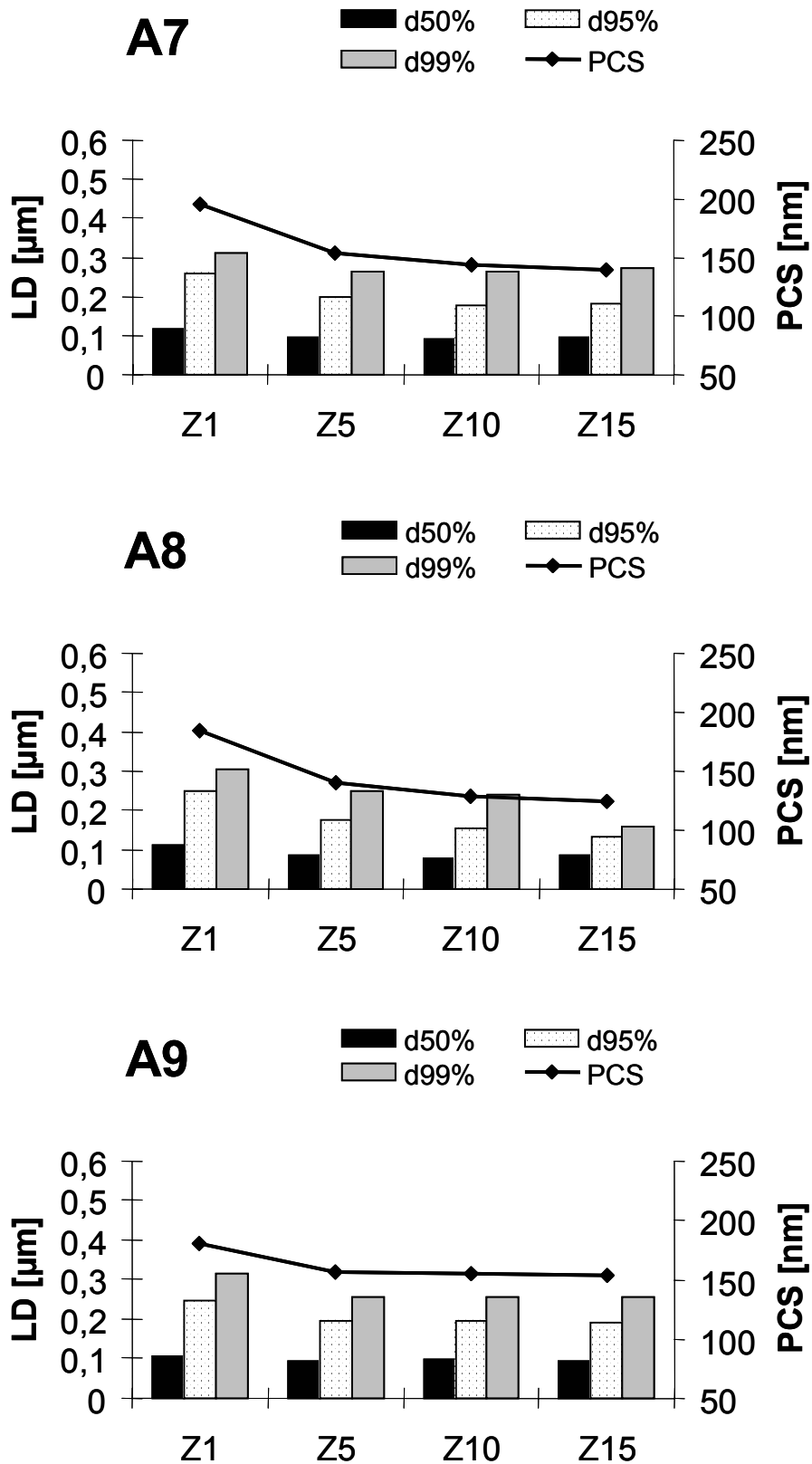


Abb. 5-5b: Partikelgrößen der homogenisierten Formulierungen A7-A9

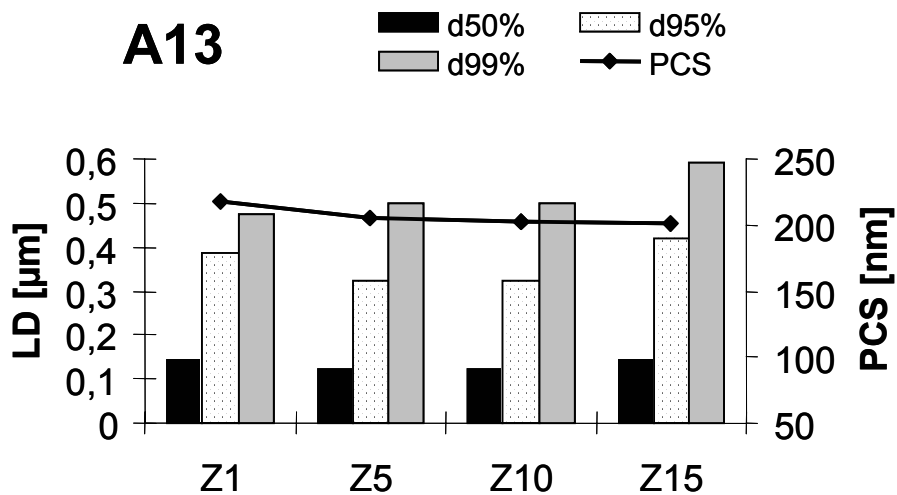
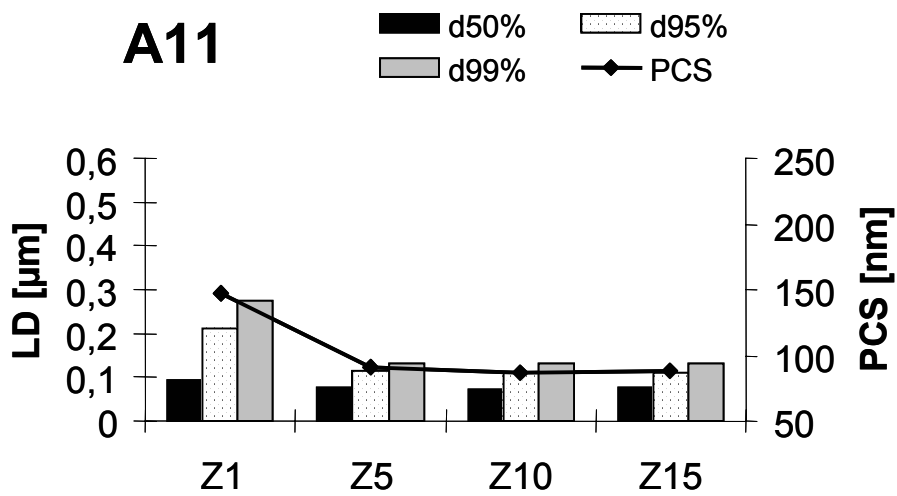
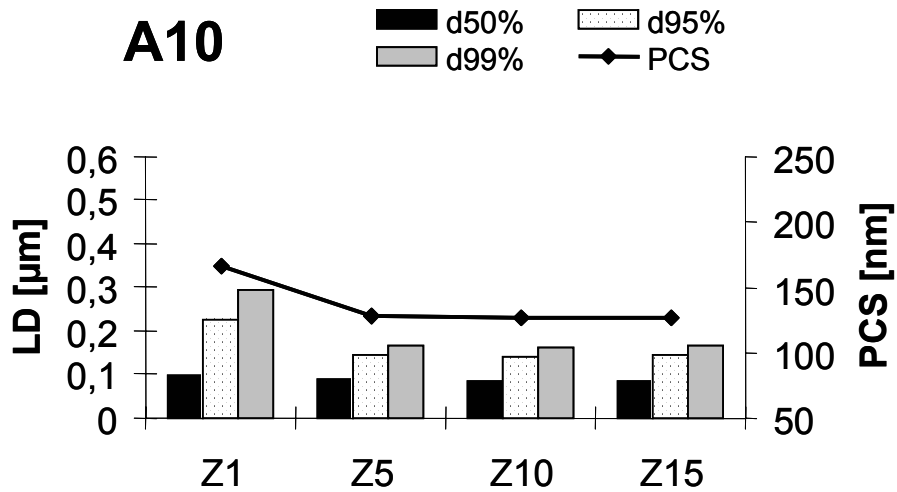


Abb. 5-5c: Partikelgrößen der homogenisierten Formulierungen A10, A11 und A13

Abb. 5-5: Partikelgrößen der homogenisierten Emulsionen auf der Basis von Abbolipid® (1500 bar, 45 °C) in Abhängigkeit von der Zyklenzahl (Formulierungen s. Tab. 5-3)

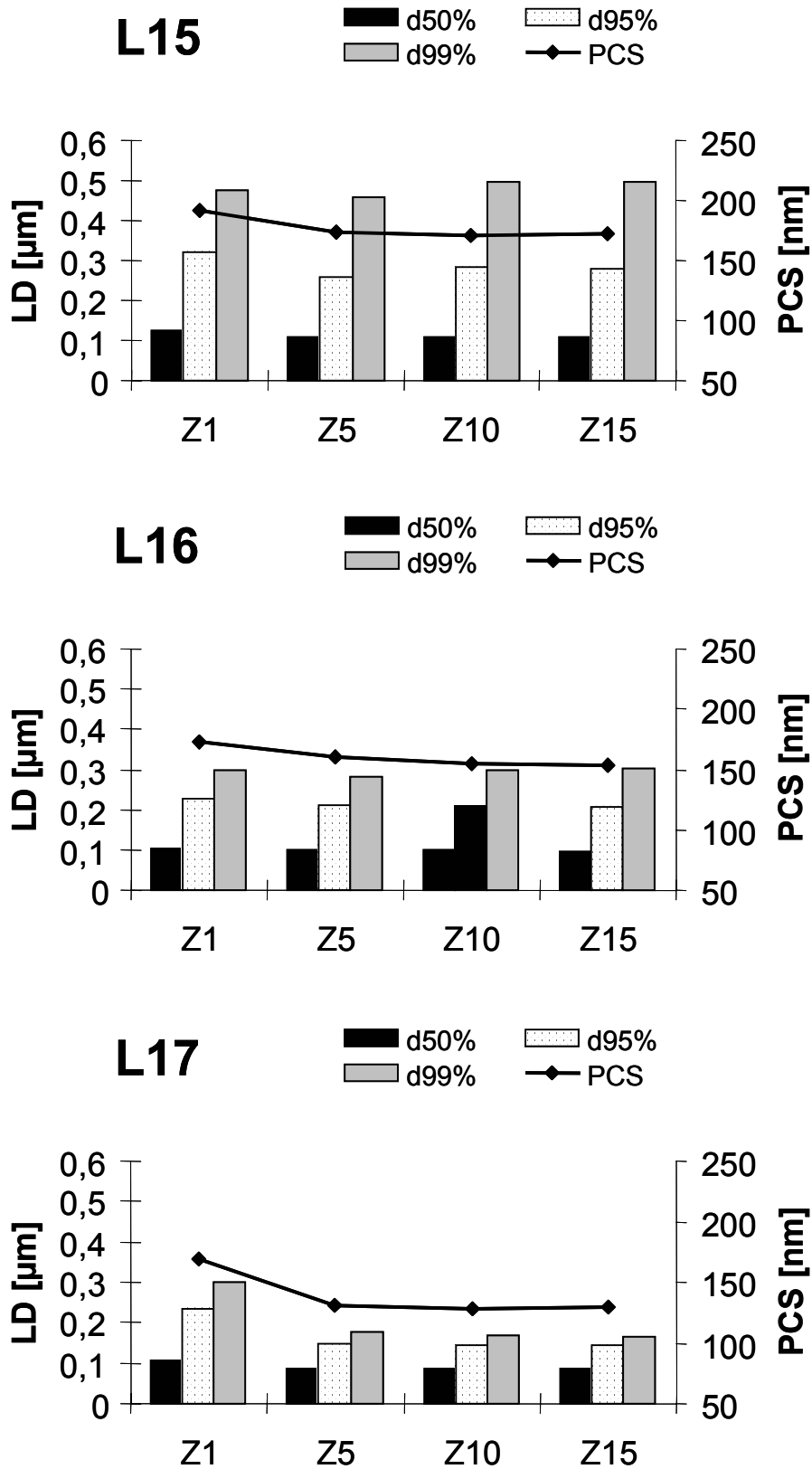


Abb. 5-6: Partikelgrößen der homogenisierten Emulsionen auf der Basis von Lipofundin® (1500 bar, 45 °C) in Abhängigkeit von der Zyklenzahl (Formulierungen s. Tab. 5-3)

Energieeintrag zu größeren Partikeln, was sich in der Detektion des höheren d99%-Wertes widerspiegelte.

Die Formulierungen F1 bis F4 konnten hinsichtlich der Partikelgröße reproduziert werden. Die Emulsionen F1 und F2 hatten um 30 nm größere PCS-Durchmesser als die Referenzen, die Emulsionen F3 und F4 hingegen um 30 nm kleinere PCS-Durchmesser. Die Unterschiede lassen sich mit dem erhaltenen LD 99% erklären. Dieser war bei F1 und F2 um 50-100 nm größer als bei dem der Referenz, bei den Emulsionen F3 und F4 hingegen um 30-100 nm kleiner.

Das Hauptaugenmerk lag auf der vergleichenden Betrachtung der gemessenen Xenon-Löslichkeit (vgl. Tab. 5-3). Die Vermutung, dass die Xenon-Löslichkeit mit der Vergrößerung der Oberfläche steigen könnte, konnte in dieser Versuchsreihe nicht bestätigt werden. Trotz einer Vergrößerung der Oberfläche durch die Homogenisation stieg die Löslichkeit des Gases nicht oder nur unwesentlich an. Aus dem Vergleich der Löslichkeiten in den verschiedenen Emulsionen mit unterschiedlichen Ölen und Emulgatoren kann abgeleitet werden, dass sich Xenon nicht ausschließlich in die Lecithinschicht einlagern lässt, sondern auch in den Fettkern der Emulsionen aufgenommen wird. Eine Verdopplung des Fettgehalts von 10 auf 20% führte zu einer fast doppelt so hohen Löslichkeit von Xenon. Ein Gemisch aus MCT und LCT schnitt hierbei besser ab als reines LCT. Die reproduzierten Rezepturen F1 bis F4 lagen mit 320-360 µL/mL in dem angegebenen Löslichkeitsbereich für Xenon (vgl. Tab. 5-2).

Aus den unterschiedlichen Theorien über die Frage, welche Faktoren die Beladung mit Xenon beeinflussen, kann festgehalten werden, dass die ersten Überlegungen durch die Versuche widerlegt wurden: So hat die Größe von Partikel und Grenzfläche offensichtlich kaum einen bzw. keinen Einfluss auf die Löslichkeit. Allerdings wirkt sich ein hoher Fettgehalt positiv auf sie aus. Die erwartete Löslichkeit von Xenon in den mit dem LAB 40 produzierten Emulsionen F1 bis F4 konnte in der vorgegebenen Größenordnung reproduziert werden.

5.2.1.2 Löslichkeit in Ölen: Umweg über Emulsionsherstellung

Nach den Ergebnissen der vorausgegangenen Versuche war nun erforderlich, detailliertere Erkenntnisse über das Lösungsverhalten von Xenon zu erhalten. Mit der bestehenden Analytik war es nicht möglich, die Löslichkeit in öligen Substanzen direkt zu messen, da die Substanzen mit Wasser verdünnt werden mussten (vgl. Kap. 3.4.2). Daher war es erforderlich, mit verschiedenen Fetten O/W-Emulsionen herzustellen, um diese dann mit der bekannten Analytik zu untersuchen. Durch Abzug des Löslichkeitsanteils der Mischung aus den anderen

Emulsionsbestandteilen (Lecithin, Glycerol, Wasser) konnte rechnerisch auf die Xenon-Löslichkeit in den einzelnen Fetten geschlossen werden. Hauptsächlich wurden Lösungsmittel, die zur parenteralen Anwendung eingesetzt werden, gewählt (vorwiegend pflanzliche und synthetische Öle). Aber auch andere Substanzen wurden getestet, um einen breit gefächerten Überblick zu erlangen. Die in Tabelle 5-4 mit einem (x) gekennzeichneten Öle befinden sich in im Handel befindlichen Arzneistoffträgern oder sind von den nationalen Arzneibüchern oder Zulassungsbehörden für parenterale Zwecke freigegeben. Die folgende Rezeptur wurde zur Herstellung der Emulsionen zugrunde gelegt und - wie in Kapitel 3.1.4.1 beschrieben - mittels Hochdruckhomogenisation angefertigt:

Eilecithin	1,2%
Öl	10%
Glycerol	2,25%
Wasser	ad 100%

Die SLN-Formulierung 19 wurde mit Tween[®] 80 anstelle von Eilecithin bei einer Temperatur von 85 °C hergestellt. Aufgrund von Stabilitätsproblemen während der Herstellung mussten die zu untersuchenden öligen Phasen der Rezepturen 20 bis 26 zusätzlich mit MCT versetzt werden. Ein höherer als der angegebene Anteil der zu untersuchenden öligen Phase führte zu physikalischer Instabilität der Emulsionen charakterisiert durch sofortige Trennung der Phasen. Die Charakterisierung erfolgte am Tag der Herstellung und am Folgetag mittels LD und PCS (vgl. Abb. 5-7).

Im Allgemeinen konnten Nanoemulsionen mit einem PCS-Durchmesser zwischen 200 und 400 nm hergestellt werden. Mit einem LD 99% zwischen 2,3 und 3,1 µm handelt es sich hingegen bei den Emulsionen aus Distelöl, Rizinusöl, Sesamöl und Benzylbenzoat um Emulsionen mit Partikeln im unteren Mikrometerbereich. Längeres Homogenisieren hätte möglicherweise eine weitere Zerteilung der dispersen Phase gezeigt. Die mittlere Partikelgröße (d50%) befand sich zwischen 0,4 und 1,0 µm. Einen Tag nach Herstellung konnte in einigen Fällen ein geringer Anstieg der Partikeldurchmesser beobachtet werden. Dennoch war die Stabilität der Proben ausreichend, um sie der Begasung mit Xenon zu unterziehen. Ein Aufschwimmen der Ölphasen wurde nicht beobachtet.

Die Ergebnisse der Löslichkeitsbestimmung (vgl. Tab. 5-4) wurden auf den Anteil der Ölphase der Emulsionen und auf das reine Öl umgerechnet, um unterschiedlich verarbeitete Konzentrationen leichter vergleichen zu können. Zu Löslichkeitsangaben der weiteren Bestandteile können die Kapitel 5.2.1.3 und 5.2.1.5 herangezogen werden. Daraus ergibt sich

eine Löslichkeit von insgesamt 106 μL Xenon/mL in der Mischung von Wasser, 2,25% Glycerol und 1,2% Lecithin.

Tab. 5-4: Zusammenstellung der dispersen Phase der Emulsionen; gemessener Xenon-Gehalt der Emulsion und theoretische Löslichkeit bezogen auf einen Anteil von 10% und 100% Öl; Zahlen in Klammern bei Angabe der Löslichkeit in öligen Phasen (20 bis 26) zeigen den Beitrag der zugesetzten Komponente zu MCT; die Angaben über die errechneten Löslichkeiten (20 bis 26) beziehen sich auf das zusätzliche Lösungsmittel; die durch (x) gekennzeichneten Öle befinden sich in im Handel befindlichen Arzneistoffträgern oder sind von den nationalen Arzneibüchern oder Zulassungsbehörden für parenterale Zwecke freigegeben.

Formulierung	ölige Phase	Xe [$\mu\text{L}/\text{mL}$] (Emulsion)	Xe [$\mu\text{L}/\text{mL}$] (Anteil 10% Öl)	Xe [$\mu\text{L}/\text{mL}$] (theoretisch 100% Öl)
1	Baumwollsaatöl (x)	299	193	1930
2	Distelöl (x)	288	182	1820
3	Erdnussöl (x)	277	171	1710
4	Leinöl	290	184	1840
5	Maiskeimöl	286	180	1800
6	Mandelöl	292	112	1120
7	Mohnöl (x)	294	188	1880
8	Olivenöl (x)	311	205	2050
9	Rizinusöl (x)	233	127	1270
10	Sesamöl (x)	295	189	1890
11	Sojaöl (LCT) (x)	271	165	1650
12	Sonnenblumenöl	280	174	1740
13	MCT (x)	315	209	2090
14	Benzylbenzoat (x)	197	91	910
15	Diacetylmonoglycerid	278	172	1720
16	Fischöl (x)	295	189	1890
17	MOD (2-Octyldodecylmyristat)	345	239	2390
18	Paraffin (dünnflüssig)	352	246	2460
19	Feste SLN: Stearinsäure, 1,2% Tween 80	101	4	40
20	5% MCT + 5% Isopropylmyristat	357	251 (146)	2920
21	5% MCT + 5% Ethyloleat	335	229 (124)	2480
22	5% MCT + 5% Isopropylpalmitat	342	236 (131)	2620
23	5% MCT + 5% Isopropylstearat	333	227 (122)	2440
24	5% MCT + 5% Labrafil	304	198 (93)	1860
25	9% MCT + 1% Plurol	298	192 (4)	400
26	9% MCT + 1% Benzylalkohol (x)	307	201 (13)	1300

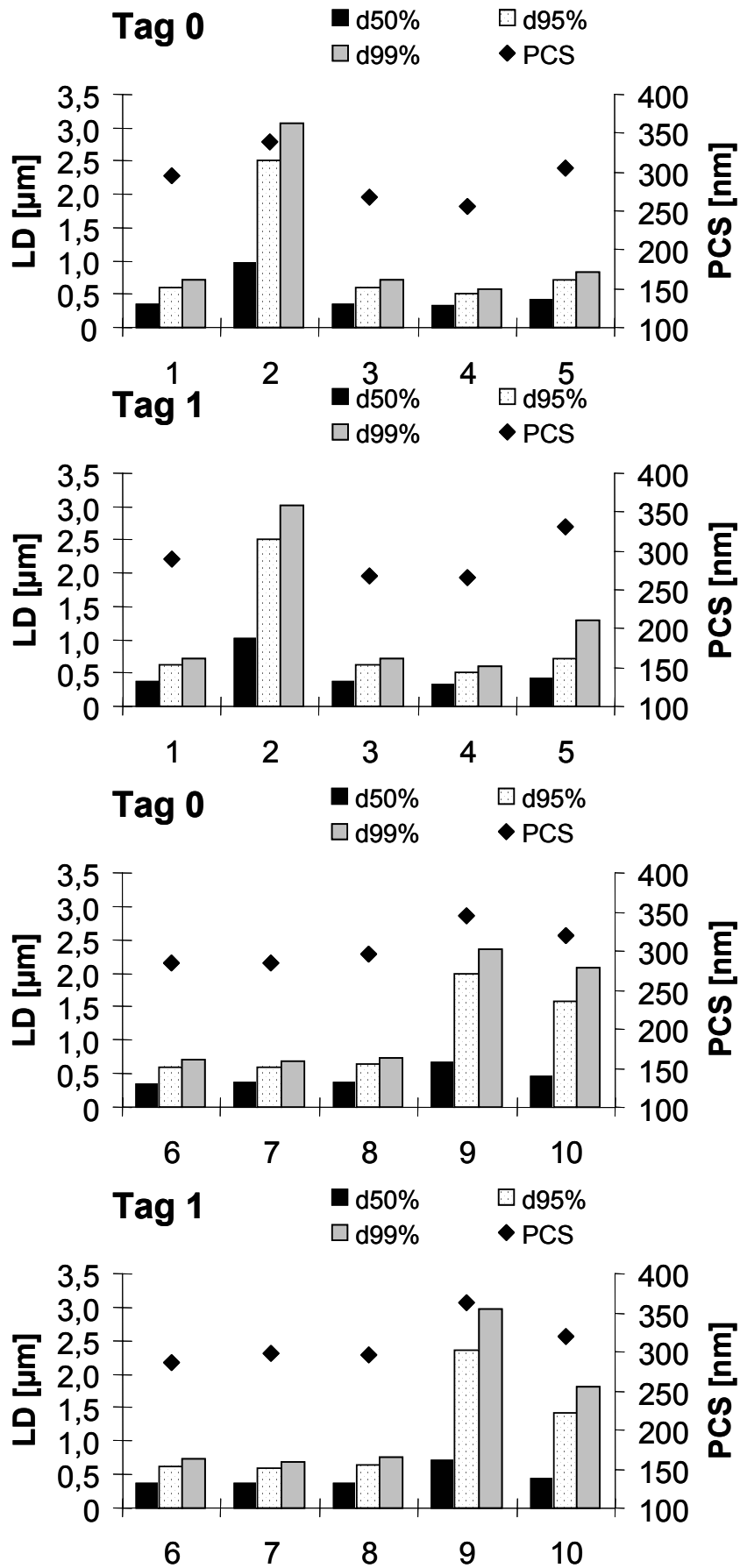


Abb. 5-7a: Partikelgröße (LD, PCS) der Formulierungen 1-10

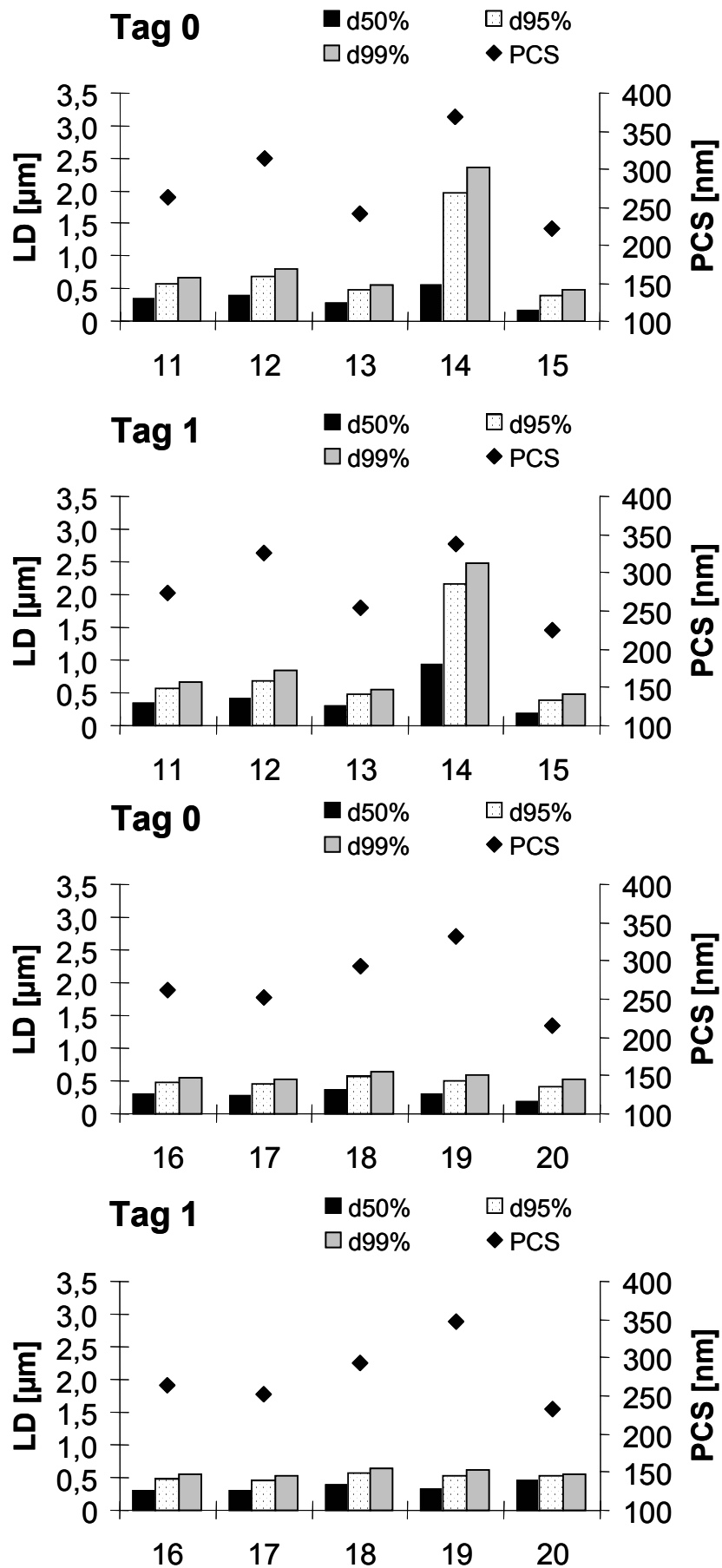


Abb. 5-7b: Partikelgröße (LD, PCS) der Formulierungen 11-20

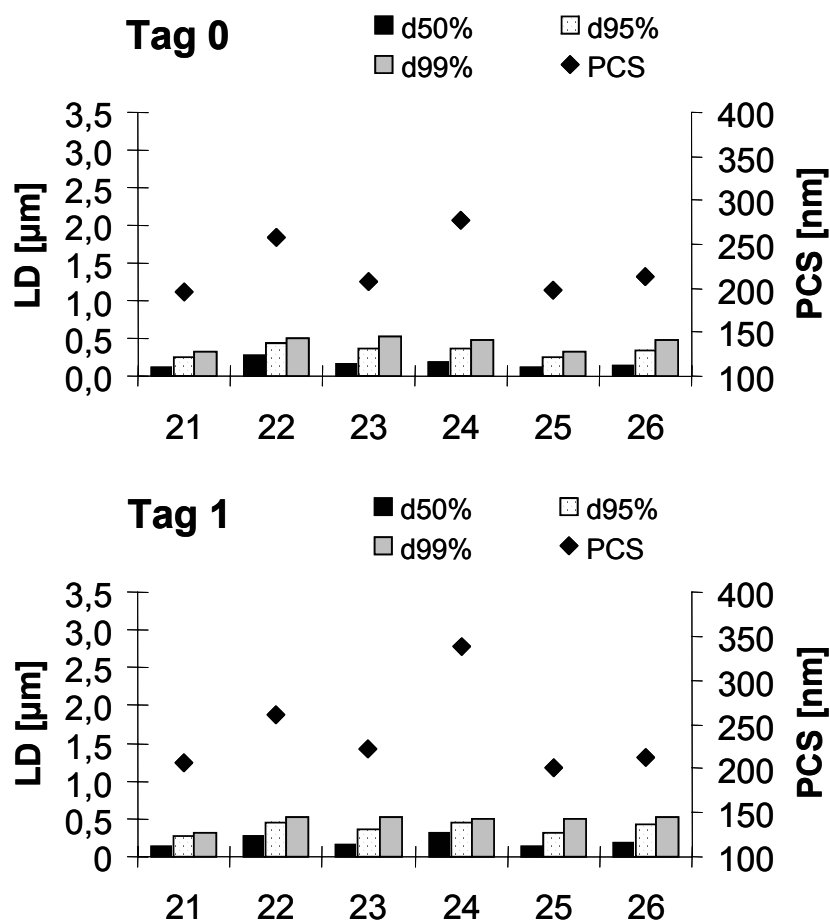


Abb. 5-7c: Partikelgröße (LD, PCS) der Formulierungen 21-26

Abb. 5-7: Partikelgröße (LD, PCS) der Emulsionen mit unterschiedlichen Öl/Fettphasen (Formulierungen vgl. Tab. 5-4)

Anscheinend setzt sich die Xenon-Löslichkeit in Emulsionen aus Wasser mit unpolaren Substanzen additiv aus den Teillöslichkeiten in den Einzelkomponenten zusammen. Bei 25 °C beträgt die Löslichkeit in Olivenöl 2,1 mL/mL (Quelle unbekannt). Sie korreliert gut mit dem Ergebnis von 311 $\mu\text{L/mL}$ für eine 10%ige Emulsion. Für 100% Olivenöl resultiert somit eine Löslichkeit von 2,1 mL/mL. Für Paraffin liegen keine Literaturdaten vor. Aber im Vergleich mit der Xenon-Löslichkeit in höheren Alkanen (C15: 2,2 mL/mL, C16: 2,0 mL/mL; Quelle unbekannt) zeigte sich auch hier eine relativ gute Übereinstimmung.

Die Löslichkeit in den pflanzlichen Ölen, die von den Zulassungsbehörden für parenterale Zwecke freigegeben sind, liegen in einem Bereich von 1700-2100 $\mu\text{L/mL}$ (10%ig in Emulsion: 170-210 $\mu\text{L/mL}$). Der Unterschied zwischen einer 10 und 20%igen Emulsion ist vernachlässigbar. Die ebenfalls zugelassenen synthetischen Ölphasen Benzylbenzoat und

Benzylalkohol sowie Rizinusöl zeigten mit Werten von 900-1300 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ein deutlich schlechteres Lösevermögen für Xenon.

5.2.1.3 Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln bestimmt und zwar sowohl in reinem Lösemittel als auch in Verdünnungen (vgl. Tab 5-5.).

Tab. 5-5: Löslichkeit von Xenon in weiteren Lösungsmitteln

Lösungsmittel	Xe [$\mu\text{L}/\text{mL}$]	Xe [$\mu\text{L}/\text{mL}$] theoretisch 100% LM)
10% Glycerol	93	30
10% Polyethylenglycol 400	107	170
10% Polyethylenglycol 600	98	80
10% Ethanol	107	170
25% Ethanol	131	220
50% Ethanol	329	560
75% Ethanol	928	1200
96% Ethanol	1943	1943
Methanol	1613	1613
2-Propanol	1815	1815
n-Propanol	2215	2215
10% Propylenglycol	96	60
Propylenglycol	647	647
Wasser	100	100

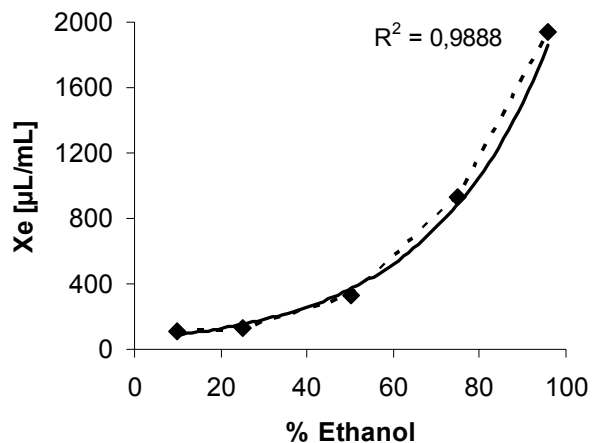


Abb. 5-8:
Löslichkeit von Xenon in Ethanol

Bei den polaren Verbindungen Ethanol und Propylenglykol war in den Verdünnungen mit Wasser wesentlich weniger Xenon gelöst, als sich bei einer additiven Löslichkeitsfunktion ergäbe. Hierbei wurde von einer Löslichkeit von 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ in Wasser ausgegangen. 96%iges Ethanol konnte wesentlich mehr Xenon aufnehmen, als das Hochrechnen auf 100% aus den einzelnen Verdünnungen besagte. Es konnte eine exponentielle Löslichkeitsfunktion festgestellt werden ($R=0,989$, vgl. Abb. 5-8). Die SLN Formulierung Nr. 19 aus der vorherigen Versuchsreihe mit der polaren Stearinsäure löste im Vergleich zu der unpolaren Stearinsäureisopropylester-Emulsion (Nr. 23) nur ein Drittel der Xenonmenge.

Die Löslichkeit von Xenon in Komponenten, die nicht miteinander mischbar sind, setzt sich additiv aus den Teillöslichkeiten zusammen. Bei Komponenten, die miteinander mischbar sind (z.B. Wasser/Ethanol), besteht ein anderes Verhältnis, am Beispiel Ethanol ein exponentielles. Es löst sich deutlich weniger Xenon, als man additiv aus den Einzelkomponenten erwarten könnte, d. h. es ist eine nicht ideale Flüssigkeit mit negativer Abweichung vom Lösungsvermögen.

5.2.1.4 Löslichkeit in ethanolhaltigen Emulsionen

Die bisherigen Untersuchungen ergaben, dass sich ein höherer Fettanteil positiv auf die Beladung mit Xenon auswirkt. 96%iges Ethanol erwies sich als ein gutes Lösungsmittel für Xenon. Durch eine Herstellung von Emulsionen mit 15 und 20% Fettanteil unter Zugabe von Ethanol wurde geprüft, ob eine Erhöhung der Beladung durch Einarbeiten von Ethanol möglich ist. Die Versuche sollten aufzeigen, ob Ethanol in Anwesenheit von Öl doch eine additive Löslichkeitserhöhung zulässt und somit ein anderes Verhalten vorliegt, als in Kapitel 5.2.1.3 beschrieben wurde. Folgende Rezeptur wurde zugrunde gelegt:

Eilecithin	1,2%
MCT	x%
Ethanol	x%
Glycerol	2,25%
Wasser	ad 100%.

Um eine Phasentrennung zu verhindern, wurde Ethanol mit Wasser vermischt und dem Öl zugegeben. Die Zugabe des Ethanols zum Öl oder langsame Zugabe nach der Homogenisation führte zu einer Trennung der Phasen, die durch eine Erhöhung der

Zyklenanzahl nicht behoben werden konnte. Unter diesen Bedingungen konnte ein maximaler Ethanolanteil von 15% eingearbeitet werden. Eine Erhöhung des Ethanolanteils auf 20% führte zu sofortiger Separation.

Tab. 5-6: Xenon-Löslichkeit in Emulsionen mit variablem Fett- und Ethanolgehalt [m/m%]

Formu- lierung	MCT [%]	EtOH [%]	Xe [$\mu\text{L}/\text{mL}$]
E1	15	10	430
E2	20	10	549
E3	15,	15	453
E4	20	15	571
	-	96	1800

Eine Erhöhung des Ethanolanteils von 10 auf 15% führte zu einem erheblichen Anstieg der Partikelgröße (Abb. 5-9). So stieg der PCS-Durchmesser der Emulsion mit 15% Fettgehalt von 252 nm auf 545 nm bei Zugabe von 15% Ethanol. Die 20%ige Fettemulsion zeigte einen PCS-Durchmesser von 375 nm mit 10% Ethanol und 940 nm mit 15% Ethanol. Außerdem stieg der PI von 0,1 auf 0,8 an, was auf eine Veränderung der Emulsionen, d.h. von einer engen Größenverteilung zu einer sehr breiten Verteilung, schliessen lässt und die Instabilitätszunahme durch Ethanol verdeutlicht. Zusätzlich wird auch bei den LD-Werten die Zunahme der Mikropartikel bei den 15%igen Ethanol-Emulsionen deutlich (E3: $d_{50\%}$: 0,807 μm , $d_{99\%}$: 3,046 μm ; E4: $d_{50\%}$: 1,045 μm $d_{99\%}$: 2,527 μm).

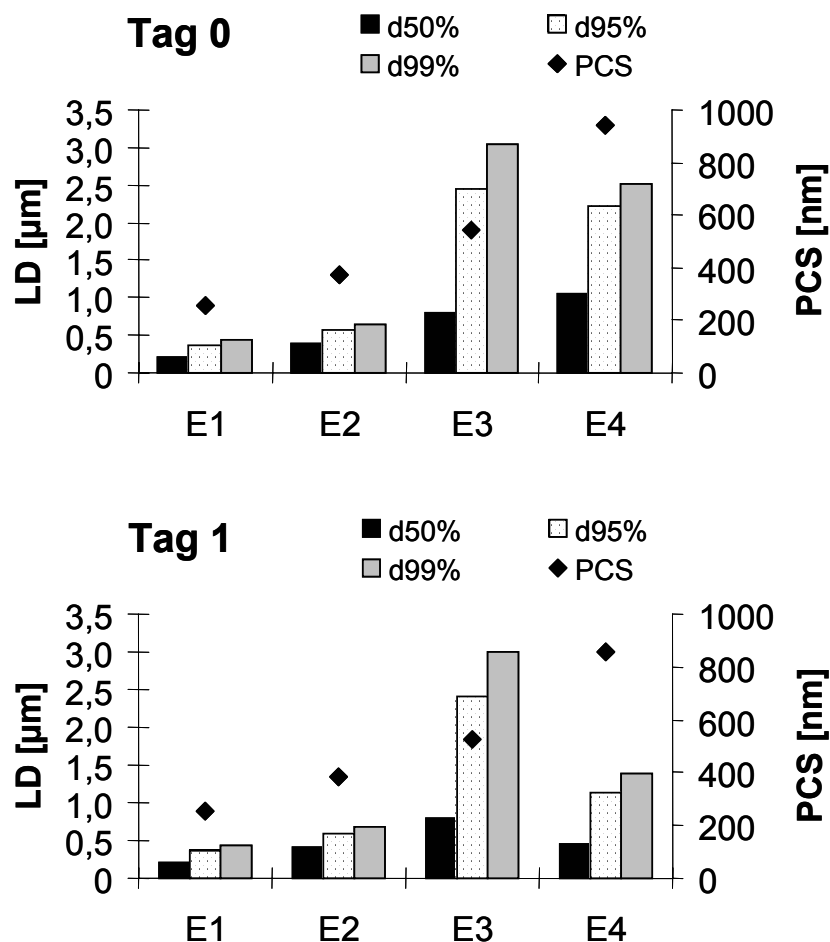


Abb. 5-9: Partikelgrößen (LD, PCS) der ethanolhaltigen Emulsionen (Formulierungen s. Tab. 5-6)

Einen Tag nach der Herstellung wies die Emulsion E4 kleinere LD-Werte als am Tag zuvor. Dieses Ergebnis kann durch das Entstehen einiger weniger großer Tropfen erklärt werden, die im LD bei der Auswertung der Volumenverteilung nicht zu erfassen waren.

Die Untersuchungen bestätigten, dass sich die Gesamtlöslichkeit von Xenon in Emulsion additiv aus den Löslichkeiten in den einzelnen nicht miteinander mischbaren Phasen zusammensetzt und nicht aus den Löslichkeiten in sämtlichen Einzelkomponenten (Tab. 5-6). Beim Mischen von Xenon-gesättigtem Ethanol (1800 µL/mL) und Xenon-gesättigter Emulsion ohne Ethanol (484 µL/mL) im entsprechenden Verhältnis (15 T + 85 T) sollte die Xenon-Löslichkeit bei Addition der Einzelkomponenten auf ca. 680 µL/mL steigen (270 + 410). Wird die Gesamtlöslichkeit aus der Löslichkeit in den Phasen berechnet, so resultiert ein Wert von 445 µL/mL (Löslichkeit in 15% EtOH ca. 115 µL/mL, Löslichkeit in MCT ca. 2090 µL/mL, Löslichkeit in 1,2% Eilecithin: 17 µL/mL; vgl. Kap. 5.2.1.2 und 5.2.1.5). Der

Messwert von 410 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Mischung: 15 T + 85 T) bzw. von 453 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (E3) korreliert gut mit der zweiten Berechnung.

Durch eine Ethanolzugabe kann keine deutliche Verbesserung der Löslichkeit erzielt werden. Aufgrund der physikalischen Stabilitätsproblematik gestaltet sich eine parenterale Applikation schwierig.

5.2.1.5 Löslichkeit in Emulgatoren

Bisher wurde die Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln untersucht. Da eine parenterale Applikation erwünscht war, kamen alle Substanzen infrage, die zur Herstellung einer injizierbaren Emulsion verwendet werden können. Gut toleriert wird die Gruppe der Lecithine, vor allem Eilecithine, typische Stabilisatoren für viele parenterale Nähremulsionen. Außer Ei- und Sojalecithin (Lipoid[®] S 75) wurde zusätzlich Lipoid[®] S 100-3 untersucht. Dies ist dem hydrierten Lecithin DMPC (vgl. Kap. 4.1.7.2) recht ähnlich und stellt eine preisgünstige Alternative dar. Tween[®] 80 und die beiden Poloxamere können alternativ Verwendung finden. Emulgatoren sind normalerweise zwar vorwiegend in einem geringen Anteil von 1-3% in den Systemen vorhanden, aber auch hier stellt sich die Frage des Anteils an der Löslichkeit. Da auch höhere Konzentrationen von membranähnlichen Substanzen gut vertragen werden, ist eine Anreicherung der Membranlipide in Emulsionen zur Verbesserung der Eigenschaften als Xenon-Träger denkbar. Die Emulgatoren wurden entweder 5%ig in Wasser gelöst oder mittels Hochdruckhomogenisation zu Liposomen verarbeitet (vgl. Tab. 5-7).

Tab. 5-7: Löslichkeit in Emulgatoren, 5%ig in bid. Wasser; Xenon-Sättigung der Mischung und ungefährender Löslichkeitsbeitrag von 1,2% Emulgatoranteil

Formulierung	Emulgator (5% in aqua bidest.)	Bemerkung	Xe [$\mu\text{L}/\text{mL}$] (5%ige Lsg.)	Xe [$\mu\text{L}/\text{mL}$] (Anteil von 1,2% Emulgator)
LS 100-3	Lipoid [®] S 100-3	1500 bar, RT, 5 Z	124	7
LS 75	Lipoid [®] S 75	1500 bar, RT, 5 Z	155	14
Ei	Eilecithin	1500 bar, RT, 5 Z	167	17
Tw 80	Tween [®] 80	gelöst	127	8
P 188	Poloxamer 188	gelöst	112	4
P 407	Poloxamer 407	gelöst	116	5

Die Stabilität der Liposomen wurde am Tag der Herstellung und am Folgetag mittels PCS untersucht (Abb. 5-10). Mittels Hochdruckhomogenisation bei 1500 bar und 5 Zyklen lassen sich die kleinsten Liposomen mit Eilecithin herstellen. Der mittlere Durchmesser (PCS) nahm von Lipoid® S 100-3 mit 140 nm über Lipoid® S 75 (76 nm) bis hin zu Eilecithin mit 43 nm ab. Ei- und Sojalecithinliposomen zeigten an Tag 1 keine Veränderung. Liposomen aus S 100-3 wuchsen im Mittel um 10 nm.

Entscheidend war die Löslichkeit von Xenon in den 5%igen Tensidlösungen. Der zusätzliche Lösungseffekt durch die Emulgatoren ist minimal. Die Löslichkeit von Xenon in 5%igen Eilecithin- und Lipoid S 75-Liposomen liegt zwar um ca. 60 $\mu\text{L}/\text{mL}$ höher als bei Wasser, allerdings liegt normalerweise die eingesetzte Emulgatorkonzentration in Fettemulsionen bei 1,2%. Daher ist zu erwarten, dass der zusätzliche Lösungseffekt lediglich bei ca. 17 $\mu\text{L}/\text{mL}$ liegt. Alle anderen Emulgatoren zeigten weniger Lösungsvermögen.

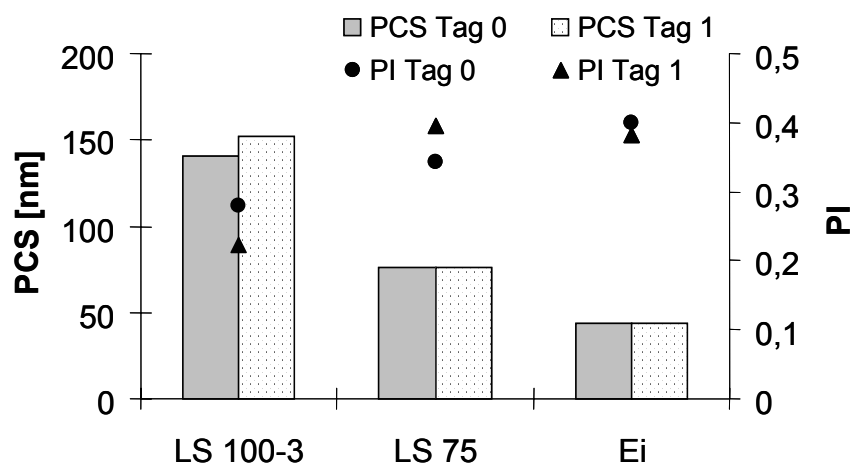


Abb. 5-10: Charakterisierung der 5%igen Lecithinliposomen mittels PCS und LD (Formulierungen s. Tab. 5-7)

Eine weitere Möglichkeit, die Löslichkeit für Xenon in der angestrebten Emulsion zu erhöhen, kann darin bestehen, deutlich mehr Lecithin als die üblichen 0,6-2,4% zu den Emulsionen hinzuzufügen (vgl. Kap. 5.2.1.6). Somit liegt der Überschuss an Lecithin, der nicht zur Emulsionsstabilisierung benötigt wird, als Liposomen in der wässrigen Phase vor und könnte Xenon nach und nach aus den Liposomen freisetzen.

5.2.1.6 Löslichkeit in Emulsionen mit variablem Fett und Lecithingehalt

Es bot sich an, das gut akzeptierte Eilecithin für die Versuche mit erhöhtem Fett- und Lecithingehalt einzusetzen.

Tab. 5-8: Zusammensetzung und Löslichkeitsergebnisse der Emulsionen mit variablem Fett- und Lecithingehalt (Fett: MCT/LCT 1:1)

Formu- lierung	Eilecithin [%]	Fett [%]	+ Eilecithin [%]	Xe [$\mu\text{L}/\text{mL}$]	Xe [$\mu\text{L}/\text{mL}$] (Anteil Fett)	Xe [$\mu\text{L}/\text{mL}$] (Anteil Ei-L.)
Var1	1,2	10	5	405	229	70
Var2	1,2	10	10	476	230	140
Var3	1,2	15	5	520	344	70
Var4	1,2	15	10	594	348	140

Die Emulsionen enthielten zusätzlich zum normalen Lecithingehalt von 1,2% die angegebene Menge Lecithin (Tab. 5-8). Es wurden hochkonzentrierte Liposomen (11,2 und 21,1%ig) mittels Hochdruckhomogenisation (1500 bar, 5 Zyklen) in einer 2,25% Glycerol-Wasser-Mischung hergestellt. Die Liposomen wurden mit Lipofundin[®] MCT 20% verdünnt und bei 45 °C, 1500 bar, 15 Zyklen homogenisiert. Zur Herstellung der Emulsion mit 15% Fett und 10% Eilecithin wurde Lecithin bei 45 °C in der Emulsion dispergiert. Die Dispersion wurde anschließend 30 sec mit einem Ultra-Turrax bei 9000 U/min behandelt und der Homogenisation unterzogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-11 graphisch aufgezeigt. Zum Vergleich wurde eine unter denselben Bedingungen homogenisierte Lipofundin[®] MCT 20% Emulsion hinzugefügt.

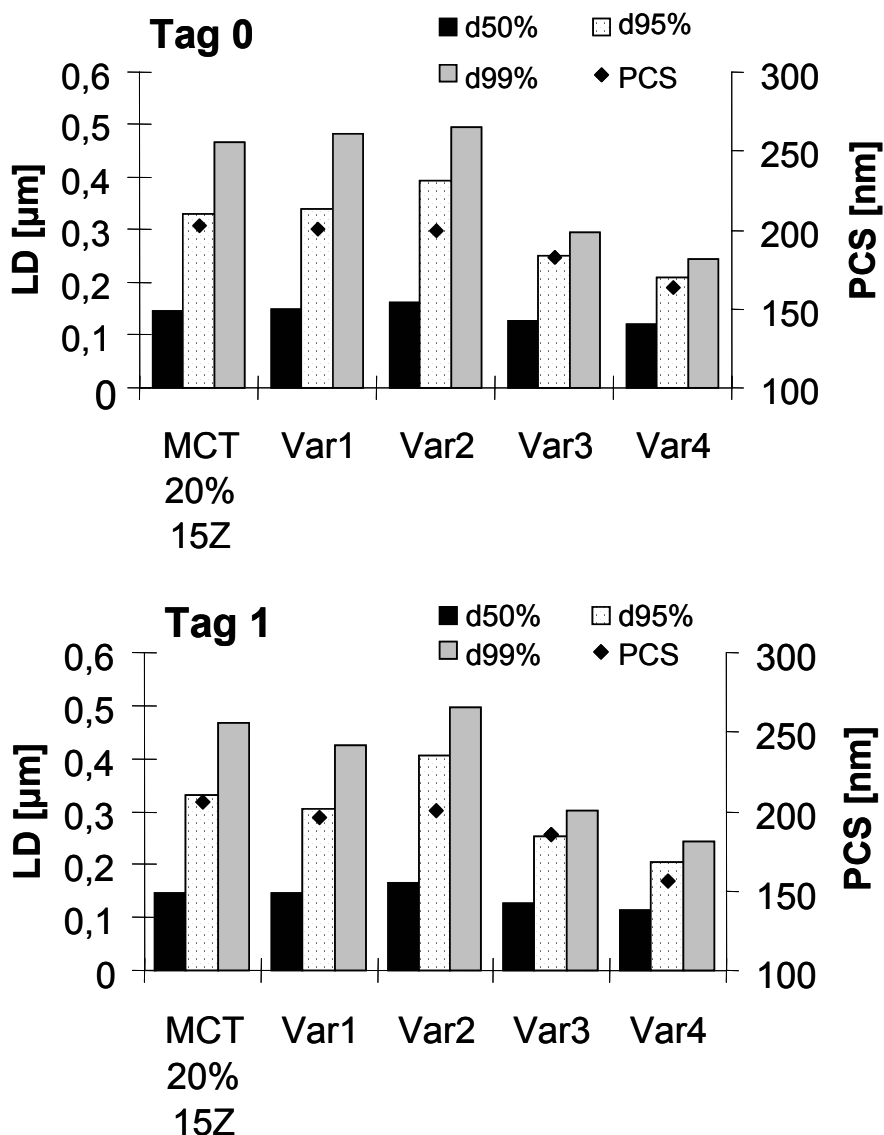


Abb. 5-11: Partikelgrößen (LD, PCS) der Emulsionen und der homogenisierten Lipofundin® MCT 20% Emulsion (MCT 20%, 15 Zyklen, Formulierung s. Tab. 5-8)

Die Homogenisation ergab für Var1 und Var2 einen mittleren PCS-Durchmesser von 200 nm und waren damit genauso groß wie homogenisiertes Lipofundin® MCT 20%. Wurde der Fettgehalt von 10 auf 15% erhöht, so konnte die Emulsion weiter in der Partikelgröße reduziert werden (Var3: 182 nm). Bei einer Erhöhung des Lecithingehalts von 5 auf 10%, nahm der PCS-Durchmesser erneut ab (Var4: 163 nm). Der PI lag bei allen Proben unter 0,13. Dass bei einem höheren Fettgehalt trotz erhöhter Viskosität diesmal eine Reduzierung der Partikelgröße vorlag, beruhte auf der Erhöhung der Emulgatorkonzentration. Während des Dispergiervorgangs wurden die neuen Grenzflächen gut stabilisiert. Mittels LD-Untersuchung

wurden in keiner Emulsion Mikropartikel detektiert. Die Erhöhung des Eilecithingehalts hatte keinen Einfluss auf die Kurzzeitstabilität. Dies bestätigten spätere Beobachtungen.

Durch Bestimmung der Xenon-Sättigung (Tab. 5-8) konnte gesichert werden, dass - wie bisher beobachtet - sowohl mit steigendem Fettgehalt als auch mit steigendem Lecithingehalt die Löslichkeit deutlich zunimmt, bei gleichzeitiger physikalischer Stabilität der Emulsionen. Eine Löslichkeit von 600 μL Xenon/mL wurde bei der Emulsion mit 15% Fett und insgesamt 11,2% Lecithin beobachtet. Eine Erhöhung der Konzentration um 5% Lecithin lieferte eine zusätzliche Löslichkeit von ca. 70 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Var1, Var4).

5.2.2 Auswirkung der Zyklenzahl auf Emulsionen mit Tween[®] 80 und Eilecithin

Die Emulsionen mit erhöhtem Fettanteil und Zusatz von Eilecithin ergaben einen viel versprechenden Lösungsansatz für eine Emulsionsformulierung für Xenon, so dass diese Formulierungen für In-vivo-Testungen vorgesehen werden konnten. Da dem Eilecithin eine rezeptorantagonistische Wirkung zugeschrieben wird (Weigt et al., 2004), kann der Emulgator die NMDA-antagonistische Wirkung des Xenons unterstützen. Als weitere mögliche Formulierung wurde eine Rezeptur mit 10% Fett und Tween[®] 80 angesehen. Hierbei sollte geprüft werden, ob der Zusatz von Tween[®] eine bessere Gehirngängigkeit bewirken kann und Xenon direkt zum Wirkort transportiert (nähere Ausführungen s. Kap. 5.3).

Die vorliegende Studie sollte klären, ob sich die Partikel mit Erhöhung der Zyklenzahl weiter zerkleinern lassen, um damit eine Wirkungssteigerung zu erreichen. Sämtliche Emulsionen wurden unter Verwendung von Abbolipid[®] als Basisemulsion hergestellt, da durch MCT-Öle bei Schweinen (Versuchstiere für In-vivo-Tests) pulmonaler Hochdruck hervorgerufen werden kann. Abbolipid[®] mit einer Fettkonzentration unter 20% wird von den Tieren hingegen gut vertragen. Abbolipid[®] 10% mit 2% Eilecithin und Tween[®] wurde zwar über 15 Zyklen bereits untersucht (A8 (F4) und A6, s. Kap. 5.2.1.1), möglicherweise könnte jedoch noch ein Homogenisieren mit mehr als 15 Zyklen zu einer Verkleinerung der Partikel führen; gerade Probe A8 ließe diese Vermutung zu. Zur Herstellung der Emulsionen wurde Abbolipid[®] 10% mit 2 und 4% Eilecithin bzw. Tween 80[®] versetzt und bei 45 °C und 1500 bar 30 Zyklen homogenisiert. Alle 5 Zyklen wurden Proben entnommen und der Verlauf der Homogenisation anhand von LD- und PCS-Messungen verfolgt (Abb. 5-12).

Innerhalb der ersten 5 bis 10 Zyklen findet die gesamte Zerkleinerungsarbeit statt. Wurde bei Abbolipid[®] 10% noch eine mittlere Partikelgröße von 270 nm gemessen, konnte die Größe auf 93-135 nm reduziert werden. Der weitere Energieeintrag führte zu keiner weiteren Zerkleinerung. Eine Zunahme der Emulgatorkonzentration begünstigt die Zerkleinerung der Partikel, wie schon in Kap. 4.1.3 und 5.2.1.6 festgestellt wurde (vgl. auch Abb. 5-13). Tween[®] 80 führte auch hier zu geringfügig kleineren Partikeln. Die Partikelgrößen waren durchschnittlich 10 nm kleiner. Die Emulsion mit 2% Eilecithin lag nach 15 Zyklen im selben Größenbereich wie bei den vorherigen Versuchen. Auch hier brachten zusätzliche Zyklen keine erhöhte Dispersität. Die Polydispersitätsindizes lagen in einem Bereich zwischen 0,16 und 0,27.

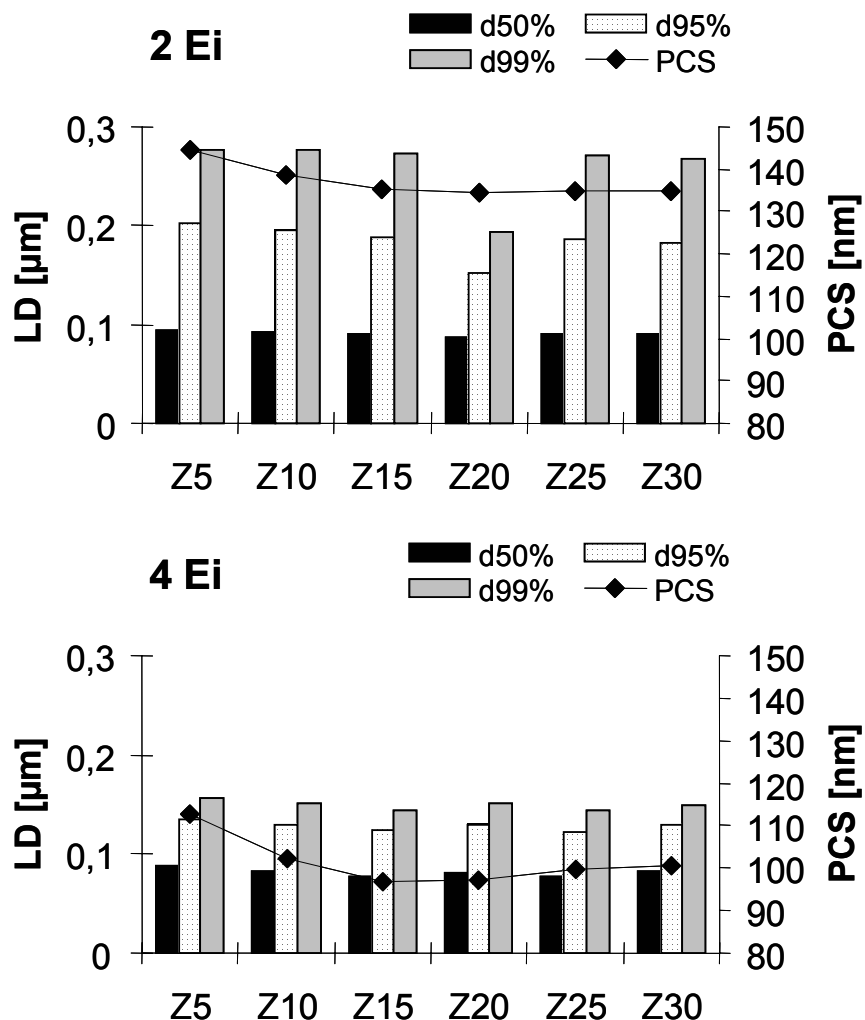


Abb 5-12 a: Homogenisationsverlauf der Abbolipid[®] 10%-Emulsionen mit Eilecithin

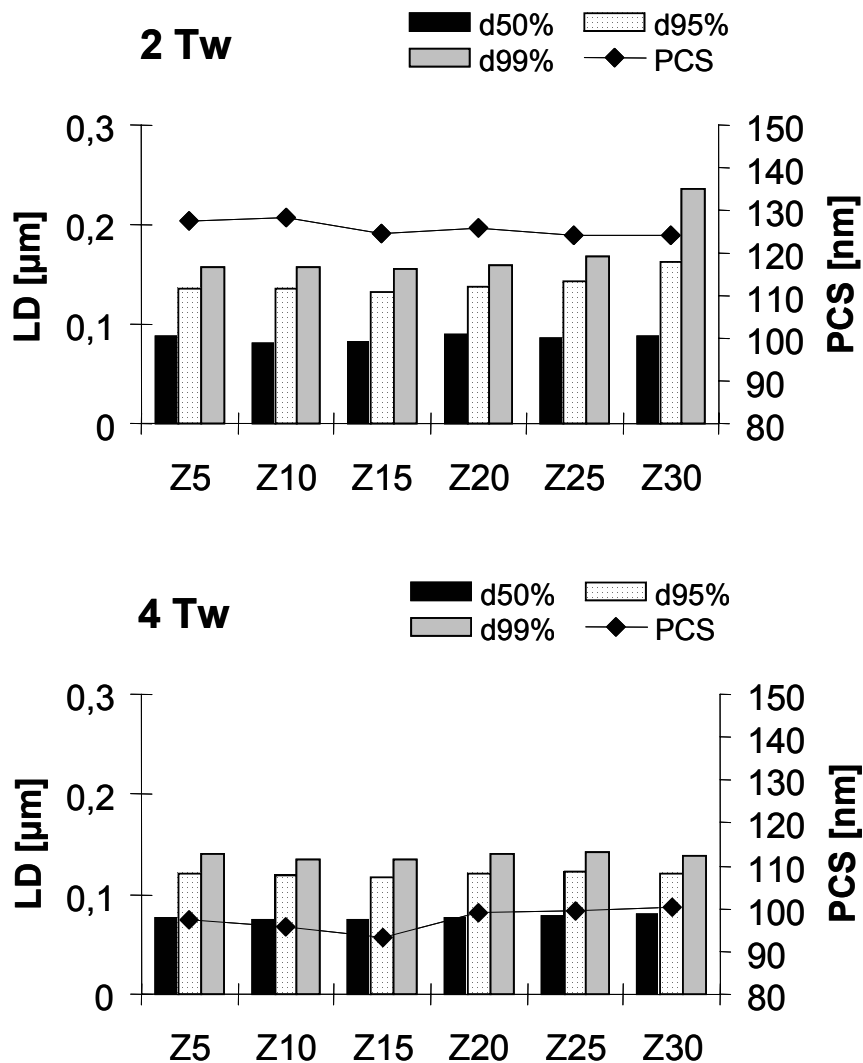


Abb 5-12 b: Homogenisationsverlauf der Abbolipid[®] 10%-Emulsionen mit Tween[®] 80

Abb. 5-12: Homogenisationsverlauf über 30 Zyklen der Abbolipid[®] 10%-Emulsionen mit 2 und 4% Eilecithin (2Ei und 4Ei) und Tween[®] 80 (2Tw und 4Tw) bei 1500 bar und 45 °C

Dieser Versuch bestätigte, wie bereits in dieser Arbeit beschrieben, dass nach 15 Zyklen maximale Dispersität erreicht wird. Die LD-Messungen unterstützten die Beobachtung. Die Verteilungskurven in Abbildung 5-12 verdeutlichen das Homogenisationsgeschehen bei zunehmender Emulgatorkonzentration.

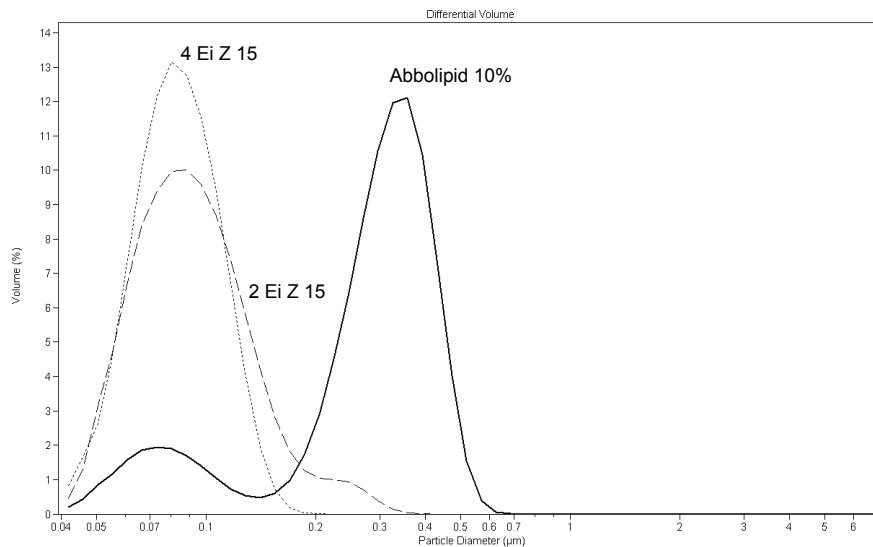


Abb. 5-13: Volumenverteilung der Basisemulsion Abbolipid® 10% und der Emulsionen mit 2 und 4% Eilecithin nach 15 Zyklen bei 1500 bar

Abbolipid® 10% zeigt eine bimodale Verteilung mit einem scharfen Peak zwischen 200 und 700 nm und einem kleineren Peak im unteren Nanometerbereich (40-150 nm). Die mittlere Partikelgröße ($d_{50\%}$) betrug 305 nm. Nach 15 Zyklen unter Zusatz von Eilecithin erfuh die Partikelgrößenverteilung eine Linksverschiebung. Die Peaks stimmen in ihrer Lage mit dem Peak der kleineren Abbolipid®-Population überein. 2% Eilecithin zeigte noch eine kleine Schulter zwischen 200 und 350 nm, welche einige restliche größere Partikel präsentiert. Bei 4% Eilecithin verschwand diese Schulter mit einem Anstieg der Verteilungskurve im Bereich der kleineren Population. Alle größeren bei 2% Lecithin noch vorhandenen Partikel konnten weiter zerkleinert werden.

Eine Homogenisation von 10 bis 15 Zyklen ist für die gegebenen Rezepturen optimal. Jeder weitere Energieeintrag bringt nicht nur keinen Erfolg, sondern kann sich sogar unter Umständen hinsichtlich der Partikelgröße nachteilig auswirken.

5.2.3 Zusammenfassende Diskussion

Das Rezepturscreening sollte zu einer oder mehreren Formulierung führen, die in vivo auf ihre Wirkung getestet werden konnten. Daher war es erforderlich, Emulsionen zu entwickeln, die Partikelgrößen im Bereich der zur parenteralen Ernährung eingesetzten O/W-Emulsionen aufweisen. Diese Anforderung wurde bei den meisten Formulierungen erfüllt.

Als eher ungeeignet erweisen sich durch eine De-Novo-Produktion gefertigte Emulsionen mit 10% Distelöl, Rizinusöl, Sesamöl und Benzylbenzoat unter den Herstellungsbedingungen von 500 bar, 45 °C und 3 Homogenisationszyklen. Die ungeeignete Größenverteilung war unter der gegebenen Fragestellung jedoch ohne Bedeutung, da die genannten Öle ein gleichwertiges oder ungünstigeres Lösungsvermögen für Xenon als die üblicherweise in parenteralen Produkten verarbeiteten Öle aufweisen. Daher kam den Emulsionen keine weitere Bedeutung zu.

Der Zusatz von Ethanol zu stabilen Emulsionen führt zu physikalischer Instabilität, die bei einer Ethanolkonzentration über 10% besonders auffällt.

Was den Einfluss der Zyklenzahl anbelangt, ist das Ergebnis eindeutig: Ausgehend von einer handelsüblichen parenteralen Fettemulsion erfolgt die gesamte Zerkleinerungsarbeit unter den Homogenisationsbedingungen von 1500 bar bei 45 °C innerhalb der ersten 5 bis 10 Zyklen. Spätestens nach 15 Zyklen liegt ein optimales Ergebnis vor. Zusätzlich bewirkt sowohl eine Erhöhung der Emulgatorkonzentration als auch die Art des gewählten Tensids eine Verkleinerung der Partikel. Tween[®] führt zu kleineren Partikeln als Lecithin.

Entscheidende Bedeutung haben die Löslichkeitsuntersuchungen, da eine möglichst hohe Beladung der Emulsionen mit Xenon angestrebt wurde. In den Untersuchungen wurden übliche Grundstoffe der Emulsionen untersucht, sowohl Bestandteile der wässrigen als auch der öligen Phase.

Die Untersuchungen zeigten zunächst, dass Xenon nicht nur in der Lecithinschicht löslich ist, sondern primär in den Ölkern mit aufgenommen wird. Weiterhin ist der Einfluss der Partikelgröße zum Löslichkeitsbeitrag eher gering. Eine Vergrößerung der Partikeloberfläche durch Homogenisation ergibt nicht zwingend eine gesteigerte Löslichkeit. Daher wurde nach einem geeigneten Lösungsmittel für Xenon gesucht. Dabei wurde festgestellt, dass sich Xenon auf unterschiedliche Weise in den ausgewählten Flüssigkeiten löst:

1. Bei nicht miteinander mischbaren Komponenten ergibt sich eine additive Löslichkeit von Xenon aus den Teillöslichkeiten der Einzelkomponenten.
2. Bei Einzelkomponenten, die miteinander mischbar sind, gilt diese Beobachtung nicht. Im Falle von Ethanol-Wasser-Mischungen konnte eine exponentielle Beziehung festgestellt werden. Es löst sich immer weniger Xenon, als sich aus einer additiven Berechnung für ein ideales Lösungsmittelgemisch ergäbe.

Die Formulierungen F1 bis F4 konnten mit dem LAB 40 sowohl hinsichtlich der Partikelgrößenverteilung als auch bezüglich einer Löslichkeit von 320-360 $\mu\text{L}/\text{mL}$ reproduziert werden.

Mit einer Emulsion aus 15% Fett und 11,2% Eilecithin wurde das Lösungsvermögen von Xenon auf 600 $\mu\text{L}/\text{mL}$ gesteigert. Diese Beladung ist annähernd vergleichbar mit einer Beladung der Referenzemulsionen F4 bei etwa 1,8 bar Xenon-Partialdrucks. Das überschüssige Lecithin, das nicht für die Emulsionsstabilisierung benötigt wird (mind. 10%), liegt als Liposomen vor und dient als Reservoir für das Edelgas.

Parallel wurden noch Emulsionen stabilisiert mit Tween[®] 80 hergestellt. Hierbei sollte in folgenden Untersuchungen geprüft werden, ob der Zusatz von Tween[®] ein Targeting über Apolipoprotein E ermöglicht und damit eine bessere Gehirngängigkeit erreicht werden kann.

5.3 Vergleich der Proteinadsorptionsmuster auf Fettemulsionen mit und ohne weiteren Zusatz von Emulgatoren (2-D PAGE)

In dieser Studie sollte die Plasmaproteinadsorption auf den Fettemulsionen Abbolipid® 10% und Abbolipid® mit Zusätzen von je 2 und 4% Tween® 80 (2Tw, 4Tw) und 2 und 4% Eilecithin (2Ei, 4Ei) untersucht werden. Mit Hilfe der Untersuchung sollte abgeschätzt werden, welche Emulsionen vermutlich das günstigste In-vivo-Verhalten zeigen würden. Abbolipid® 10% galt als Referenz, da hier schon Erfahrungen als Xenon-Träger am Schwein vorlagen. Jeweils die im letzten Homogenisationszyklus erhaltene Emulsion aus Kapitel 5.2.2. (Zyklus 30) bzw. die Ausgangsemulsion Abbolipid® wurde wie in Kapitel 3.5 beschrieben aufbereitet und getestet.

Unter qualitativer Betrachtung der gefärbten Gele konnte kein qualitativer Unterschied in den adsorbierten Proteinspezies erkannt werden. Die Proteinspots waren in Form und Lage identisch. Abbildung 5-14 zeigt beispielhaft die Gele von Abbolipid® 10% (links) und der Formulierung 4Tw (rechts).

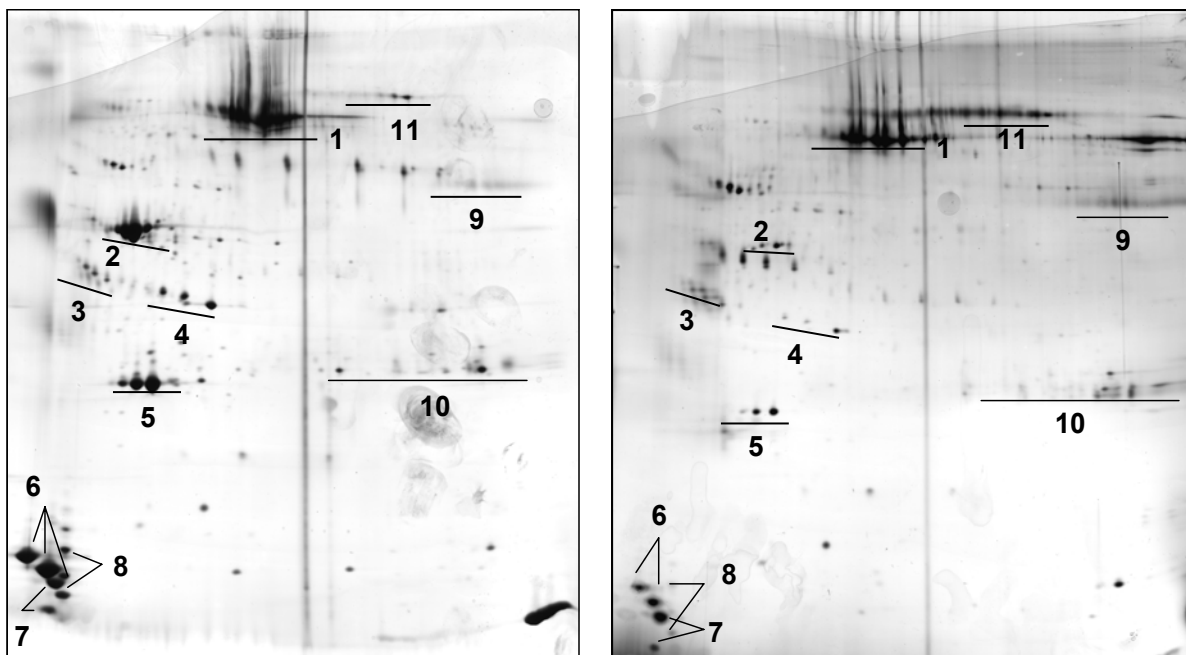


Abb. 5-14: 2-DE Gele mit den Proteinadsorptionsmustern der Emulsionen nach Silberfärbung: Abbolipid® 10% (links) und 4Tw (Abbolipid 10% + 4% Tween® 80, homogenisiert, rechts);

(1) Albumin, (2) ApoA-IV, (3) ApoJ, (4) ApoE, (5) ApoA-I, (6) ApoC-III, (7) ApoC-II, (8) ApoA-II, (9) IgG, (10) Ig leichte Kette, (11) IgM;

Abszisse: nicht linearer Gradient pI 4-9 (von links nach rechts),

Ordinate: nicht linearer Gradient, MG: 6 kDa-250 kDa (von unten nach oben).

Fettemulsionen zur parenteralen Ernährung ähneln physiologischen Fettpartikeln, wie den Chylomikronen. Die Elimination solcher Fettpartikel aus dem Blutkreislauf ist bereits gut untersucht (Davis et al., 1990; Jeppsson and Rössner, 1975; Johnson et al., 1990a; Johnson et al., 1990b). Eine Veränderung der Oberflächenstruktur beeinflusst die Eliminationsgeschwindigkeit von Fettemulsionen. Eilecithin kann die Elimination aus dem Blut fördern (Jeppsson and Rössner, 1975).

Eine semiquantitative Analyse sollte nun genauere Unterschiede im Mengenverhältnis der adsorbierten Proteine ergeben. Somit könnten sich ein unterschiedliches metabolisches Geschehen und eine unterschiedliche Organverteilung der Emulsionen ableiten lassen, besonders in Beziehung auf ein mögliches Gehirntargeting.

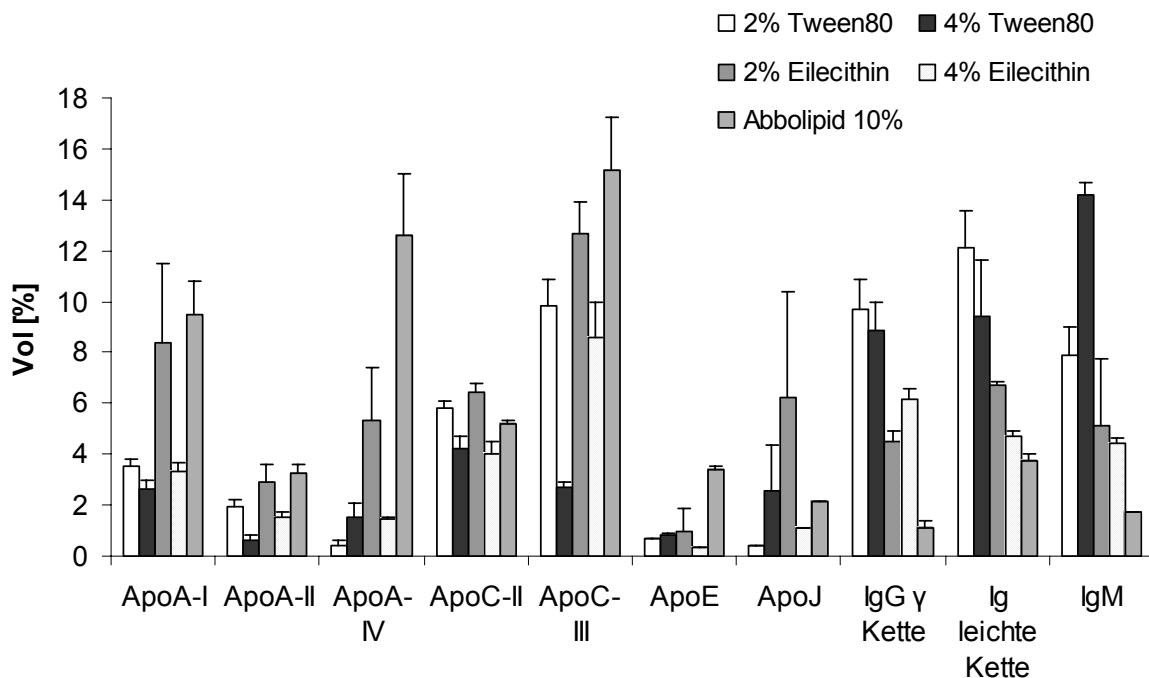


Abb. 5-15: Proteinadsorption auf den 5 untersuchten Emulsionen: Abbolipid[®] 10% und Abbolipid[®] 10% unter Zusatz von 2 und 4% Eilecithin und Tween[®] 80 (1500 bar, 30 Zyklen); die x-Achse präsentiert die verschiedenen Proteine.

Die Proteine, die in der Abbildung 5-15 aufgeführt sind, repräsentieren mehr als 50% des gesamten detektierten Anteils. Albumin, das Hauptprotein im Humanplasma (> 40%), wurde in der Abbildung nicht aufgeführt, um den Unterschied der anderen Proteine besser herauszuheben. Bei den untersuchten Emulsionen lag der Albumin-Anteil zwischen 33% (Abbolipid[®] 10%) und 43% (4Ei). Die Formulierung 2Ei lag mit 19% deutlich unter den

anderen Albuminkonzentrationen. Im Vergleich zu anderen parenteralen Emulsionen liegt der Albuminanteil recht hoch.

Als Opsonisierung bezeichnet man den Mechanismus, durch den die Oberfläche von in den Körper eingedrungenen Fremdzellen (z.B. Bakterienzellen oder Emulsionströpfchen) mit Immunglobulinen (Opsonine, Substanzen des Serums, die an Partikel binden und dadurch deren Phagozytose vermitteln) und Faktoren des Komplement-Systems bedeckt wird (Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie, 1995). Nach der Opsonisierung können Fremdzellen dann von endocytierenden Zellen des Immunsystems aufgenommen und eliminiert werden. Durch Albumin (Dysopsonin) wird die Oberfläche der Partikel hydrophiler. Dadurch kommt es zu einer längeren Zirkulation, da keine Erkennung durch das MPS erfolgt. Der klinische Erfolg der Emulsionen müsste daher um so größer sein, je größer der Anteil an Dysopsoninen und je geringer die Menge an Opsoninen ist, da bei einer längeren Verweilzeit der Partikel im Blut mehr Partikel den Weg ins Gehirn finden können.

Hervorzuheben sind die Proteinspezies der Apolipoproteine (Apos, Dysopsonine), deren Anteil zwischen 15 und 51% betrug. Durch Apolipoproteine können Emulsionen verstärkt dem Weg des Fettmetabolismus zugeführt werden. Mengenmäßig unterschieden sich die unterschiedlichen Apos der einzelnen Rezepturen sehr. Besonders ApoA-I, ApoC-II und ApoC-III sind bei allen Formulierungen mengenmäßig gut vertreten. Diese Proteine sind vermehrt an der Interaktion mit HDL beteiligt (Carpentier et al., 1987). Abbolipid® 10% und 2Ei fallen durch einen hohen Anteil an ApoA-I, ApoA-IV und ApoC-III auf. ApoA-IV beeinflusst u.a. die Lipoproteinlipaseaktivität, ApoC-III vermag sie zu inhibieren.

Auffällig bei den Tween® 80 enthaltenen Emulsionen war, dass insgesamt sehr wenig Apolipoproteine adsorbierten, hingegen die Immunglobuline (Igs) einen hohen Anteil einnahmen.

ApoE soll aufgrund der nachgewiesenen ApoE-Rezeptoren an der Blut-Hirn-Schranke (BBB) eine wichtige Rolle im Gehirntargeting spielen (Kim et al., 1996). Nach Kreuter et al. besteht ein nachgewiesener Zusammenhang zwischen Tween® 80 und Apolipoprotein E beim Überschreiten der Blut-Hirn-Schranke (Kreuter, 2001; Kreuter et al., 1997; Kreuter et al., 2002). Die Anreicherung von ApoE auf Polybutylcyanoacrylat (PBCA) Nanopartikel als wirksames Transportsystem für Dalargin durch die BBB (Lück, 1997) bestätigte diese Theorie. ApoE wird hier Aktivität zugesprochen (Kreuter et al., 1995; Müller et al., 1997).

Zusätzlich wird ebenfalls ein Zusammenspiel zwischen ApoA-I, ApoA-IV und ApoE diskutiert, da diese Proteine eine verringerte Aufnahme der Partikel durch Leberzellen

bewirken können (Bisgaier et al., 1989). Diese Proteine adsorbierten zusätzlich in hohem Maß auf den Tween[®]-modifizierten PBCA-Partikeln von Lück. Infolge der genannten Gründe lag das Augenmerk besonders auf dem Tensid Tween[®] 80.

Das Protein ApoE scheint bei allen getesteten Emulsionen eine untergeordnete Rolle zu spielen. Überraschenderweise adsorbierte an Abbolipid[®] 10% die größte Menge (3,4%). Mit einer Verdopplung des Tween[®]-Anteils konnte die adsorbierte ApoE-Menge (0,8%) nicht erhöht werden. Dies ist ein überraschendes Ergebnis, da Templin (2003) mit einer Konzentrationserhöhung von 1 auf 5% Tween[®] 80 der Diminazendipalmitat-Nanosuspension den Anteil an ApoE um 34% steigern konnte. Zwar mag hierbei auch eine Oberflächenvergrößerung bei Erhöhung des Tween[®]-Anteils eine Rolle gespielt haben, bei den hier getesteten Partikeln konnte dieser Einfluss aber nicht beobachtet werden. Die mit 2% Tween[®] hergestellten Partikel wiesen eine Oberfläche von etwa 5,26 m²/100 µL Emulsion auf, die bei der Verdopplung der Tween[®]-Konzentration mit einer Verkleinerung der Partikel auf 7,01 m²/100 µL stieg. Auch waren ApoA-I und ApoA-IV eher vermehrt auf den Emulsionen ohne Tween[®] zu finden (Abbolipid[®] 10% und 2 Ei).

Die Tabelle 5-9 zeigt zusammengefasst das Verhältnis der Opsonine und Dysopsonine. Da Abbolipid[®] 10% die größte Menge an Dysopsoninen und die kleinste Menge an Opsoninen aufwies, kann mit dieser Emulsion ein guter klinischer Effekt erwartet werden.

Tab. 5-9: Adsorption von Dysopsoninen und Opsoninen an Emulsionen mit unterschiedlichen Emulgatoren

Formulierung	Dysopsonine			Opsonine
	Albumin [Vol%]	Apos [Vol%]	Summe	Igs [Vol%]
2% Tw	30,5	22,6	53,1	29,7
4% Tw	35,7	15,1	50,8	32,5
2% Ei	19,1	42,9	62,0	16,3
4% Ei	42,8	20,3	63,1	15,3
Abbolipid [®] 10%	32,9	51,3	84,2	6,6

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lagen zum Beginn der In-vivo-Versuche noch nicht vor. Aus den oben dargelegten Gründen wurde zusätzlich zum Abbolipid[®] 10% und der Emulsion mit 2% Eilecithin (F4) die Emulsion mit 4% Tween[®] für eine In-vivo-Testung ausgewählt, um ein mögliches Gehirntargeting mit Tween[®] zu erreichen.

5.4 In-vivo-Studien mit Xenon-gesättigten Fettemulsionen - Optimierung der Zusammensetzung und der Partikelgröße

Bisher konnten Formulierungen auf Grund ihrer Xenonlöslichkeit untersucht und optimiert werden. Das In-vivo-Verhalten der Emulsionen kann jedoch mittels Tests oder Modellen bisher noch nicht abgeschätzt werden. Für eine Weiterentwicklung ist diese Kenntnis allerdings unerlässlich. Verschiedene Xenon-gesättigte Emulsionen wurden daher am Tier untersucht (vgl. Kap. 3.6), um damit weitere Kenntnisse über das In-vivo-Verhalten der Xenon-gesättigten Emulsionen zu erhalten.

5.4.1 Inhalative Applikation von Xenon im Vergleich zur parenteralen Verabreichung von xenonhaltigen Fettemulsionen

5.4.1.1 Xenon inhalativ

Bisher gibt es kaum Erfahrungen über eine i.v. Applikation von Xenon. In diesem Kapitel wird versucht, einen Vergleich zwischen inhalativer und parenteraler Gabe von Xenon zu ziehen. Die Daten der Xenon-Inhalation wurden ebenfalls in Ulm erhoben (Froeba, 1994; Georgieff et al., 2003).

Der arterielle Messwert der Xenonkonzentration steht für das Ausmaß der Xenonsättigung vor der Lungenpassage. Nach und nach erfolgt eine Anreicherung in der Peripherie. Zunächst werden die gut durchbluteten Gewebe erreicht (ZNS, Herz, Niere, Leber), später die weniger gut durchbluteten. Die gemischt venösen Blutspiegel steigen somit langsam an. Sie sind ein Maß für die noch vorhandene Menge Xenon im Blut nach Auffüllung sämtlicher peripherer Bereiche. Die Werte, die im Sinus sagittalis gemessen werden, geben Aufschluss über die Aufnahme und Sättigung von Xenon ins Gehirn.

Die Abbildung 5-15 zeigt ein typisches Bild der Blutspiegel bei einer Verabreichung eines Gemisches aus 70% Xenon und 30% Sauerstoff.

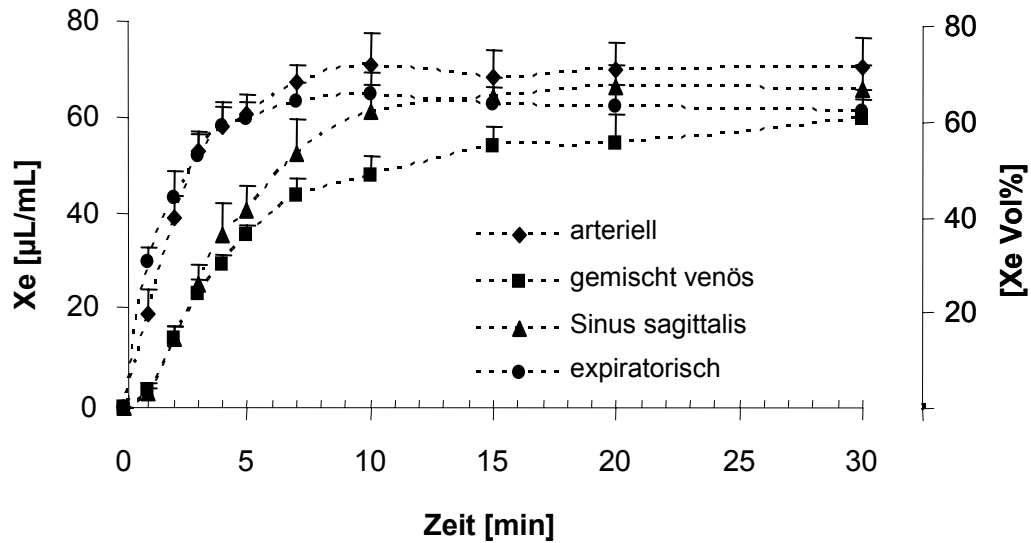


Abb. 5-16: Xenon-Spiegel während einer Anästhesie mit 70% Xenon in 30% Sauerstoff (n=5); Xenon-Blutspiegel [μL/mL], expiratorische Konzentration [Vol %]

Bei der Xenon-Inhalation konnte ein schneller Anstieg im arteriellen Blut beobachtet werden. Die endexpiratorische Xenonkonzentration erreichte ein Plateau bei 64 ± 7 Vol% nach 7 min. Die arterielle, gemischt und sagittal venöse Xenon-Blutkonzentration erreichte ein Plateau nach 7 (68 ± 4 μL/mL Blut), 20 (52 ± 2 μL/mL Blut) und 15 min (65 ± 2 μL/mL Blut) (Abb. 5-16). Die Darstellung der Differenz aus arteriell und gemischt venösen Blutspiegeln und arteriell und Sinus sagittalis-Spiegeln (A minus V) verdeutlicht die Gleichgewichtseinstellung im Körper (vgl. Abb. 5-17). Die höchste Gehaltsdifferenz wurde für arteriellen-zerebralen und arteriellen-gemischt venösen A-V-Gehalt nach 3 min gemessen. Das Plateau stellte sich nach 15 min für die arterielle-zerebrale A-V-Differenz ein, während sich kein Plateau für die A-V-Differenz des arteriellen-gemischt venösen Gehalts einstellte.

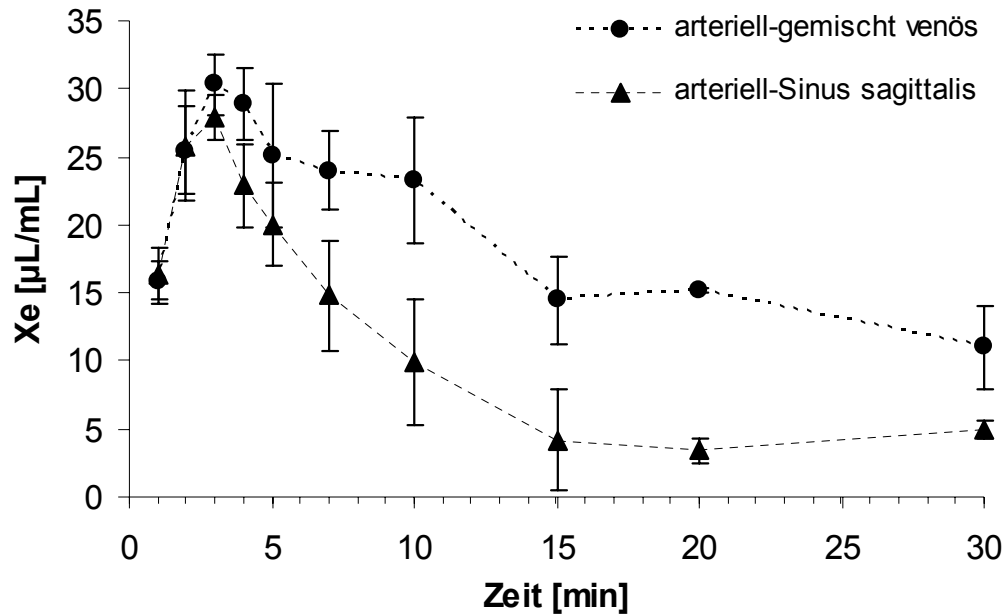


Abb. 5-17: Xenon-Konzentration, dargestellt als Differenzen von arteriell-gemischt venös und arteriell-Sinus sagittalis

Aus den Daten wird ersichtlich, dass bei einer Xenon-Inhalation eine schnelle Sättigung im Gehirn, dem Hauptzielorgan, verglichen mit dem Gesamtkörper, erreicht wird (schnelles Anfluten). Das Gehirn ist gut durchblutet und stellt ein großes Fettreservoir dar. Somit bietet es eine gute Aufnahmekapazität für Xenon. Schon Nakata et al. beschrieben einen schnellen Beginn der Narkose bei gleichzeitigem Eintritt der Bewusstlosigkeit innerhalb von 71 sec (Nakata et al., 1997). Zu diesem Zeitpunkt betrug die endexpiratorische Xenon-Konzentration etwa 50%. Euphoriesymptome wurden bei einer Konzentration von 30% beschrieben (Yonas et al., 1981).

Die schnelle Aufnahme von Xenon über die Lunge bei rascher Gleichgewichtseinstellung zwischen Abatmung und Aufnahme des Xenons beweist, dass Xenon eine rasche An- und Abflutgeschwindigkeit besitzt. Bei einem Blutlöslichkeitskoeffizient von 0,11 lässt sich die Xenon-Konzentration während einer Anästhesie gut steuern. Dies ist ein wichtiges Kriterium für ein ausgezeichnetes Inhalationsnarkosemittel.

Die Plasmakonzentration in den unterschiedlichen Geweben war während der Xenon-Einwaschphase nach 2 min eher gering ($40,0 \pm 3,7$ µL/mL arteriell, $14,4 \pm 1,2$ µL/mL gemischt venös, $14,2 \pm 1,3$ µL/mL cerebro venös) (Froeba, 1994). Durch die Wechselwirkung mit dem NMDA-Rezeptor ist nur eine geringe Xenon-Konzentration notwendig, um eine Sedierung zu erreichen. Innerhalb der ersten 15 min wird das Gehirn mit Xenon gesättigt (Plateau im A-V-Gehalt). Das weitere aufgenommene Xenon wird nach dieser Zeit im

gesamten Körper gespeichert, z.B. im Fettgewebe. Diese Gleichgewichtseinstellung dauert aufgrund des größeren Verteilungsvolumens länger.

Der Verbrauch während einer Inhalationsnarkose liegt bei 9-15 L Xenon in den ersten zwei Stunden (Luttrupp et al., 1994; Lynch et al., 2000b; Nalos et al., 2001). Die durchführbare Anzahl solcher Narkosen wird auf nur 400.000 pro Jahr weltweit geschätzt (Lynch et al., 2000b). Kann der Xenon-Verbrauch nicht deutlich eingeschränkt werden, muss eine Anwendbarkeit des Xenons als Narkosemittel überdacht werden.

5.4.1.2 Xenon i.v. in Abbolipid[®] 10%

Bei einer parenteralen Gabe von Xenon-gesättigtem Abbolipid[®] 10% ist auffällig, dass die erreichten Höchstkonzentrationen der Blutspiegel deutlich unter denen der Inhalationsnarkose liegen. Mit 2 bar beladenes Abbolipid[®] 10% zeigte arteriell und gemischt venös nach 1 min eine Spitzenkonzentration von $3,8 \pm 0,3 \mu\text{L}/\text{mL}$ und $2,1 \pm 0,1 \mu\text{L}/\text{mL}$ Blut. Die Narkosetiefe, die durch ein bestimmtes Narkosemittel hervorgerufen wird, wird von dessen Konzentration im Zentralnervensystem bestimmt. Im Sinus sagittalis wurde nach 2 min eine Konzentration von $1,7 \pm 0,2 \mu\text{L}/\text{mL}$ Blut gemessen (Abb. 5-18). Nach zweiminütiger Apnoe erfolgte ein schneller Abfall aller Blutspiegel durch Abatmung des Xenons über die Lunge. Nach 7 und 15 min wurde arteriell und cerebrovenös ein Plateau bei 100 nL/mL Blut erreicht. Gemischt venös lag es nach 15 min bei 300 nL/mL. Die Beladung der Emulsionen bei Umgebungsdruck (1 bar) ergab noch geringere Wirkspiegel. Dies kann durch die geringere Beladung der Emulsion mit Xenon erklärt werden (vgl. Kap. 5.1.2). Die Plasmaspiegel waren hier nicht ausreichend (Abb. 5-19).

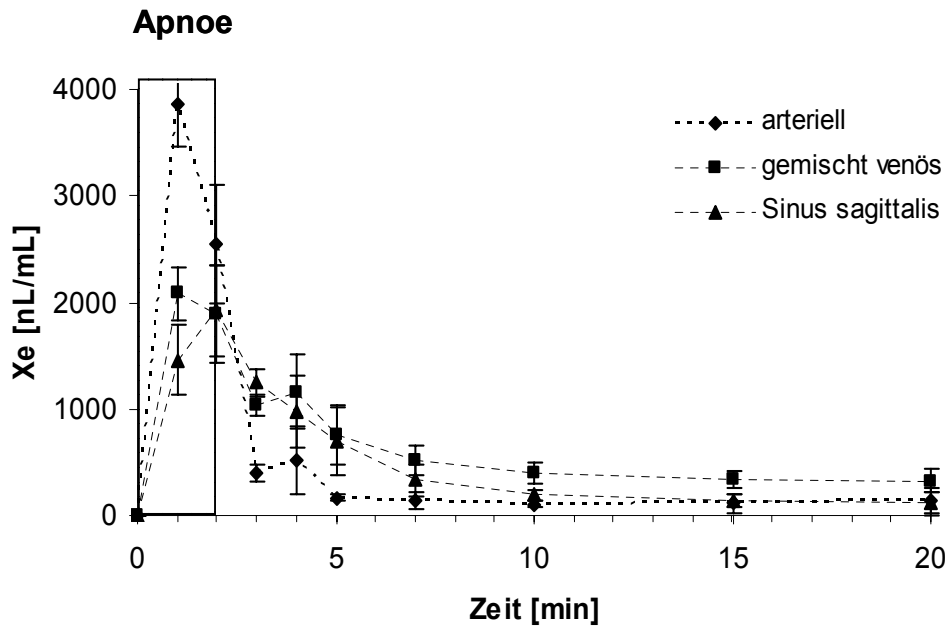


Abb. 5-18: Xenon-Blutspiegel während der intravenösen Applikation von Abbolipid® 10% (Beladung bei 2 bar, n = 6), Kasten = Zeitraum der Apnoe

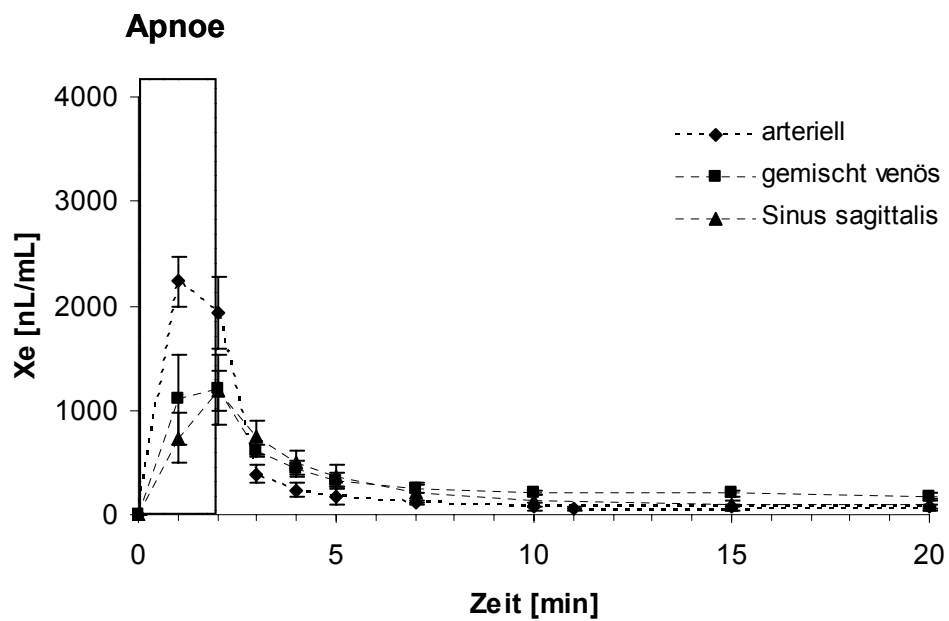


Abb. 5-19: Xenon-Blutspiegel während der intravenösen Applikation von Abbolipid® 10% (Beladung bei 1 bar, n = 3), Kasten = Zeitraum der Apnoe

5.4.1.3 Beurteilung der beiden Verfahren mittels weiterer Parameter

Die Aufrechterhaltung der Narkose vor Xenon-Gabe erfolgte mit Sevofluran. Die Senkung der Sevofluran-Konzentration während der Xenonanästhesie gilt als Maß für die Eigenwirkung des Xenons bei gleich bleibender Tiefe der Narkose. Bei fehlender Reaktion auf den Zangentest wurde Sevofluran weiter reduziert. Während der Xenon-Inhalation konnte das zusätzliche Sevofluran von 1,7 Vol% auf 0,8 Vol% reduziert werden (vgl. Abb.5-20 links). Hier wurde nochmals deutlich, dass Xenon nicht als Monoanästhetikum, sondern nur in Kombination wirkt. Bei parenteraler Gabe von Xenon wurde nach 30 min eine maximale Sevofluran-Reduktion, ebenfalls um 1 Vol%, erreicht (vgl. Abb.5-20 rechts). Erneut wurde ein Schmerz ohne Reaktion ausgelöst. Sevofluran wurde weiter reduziert und ein Schmerzstimulus erzeugt, mit dem Resultat, dass das Tier sich bewegte, jedoch kein Anstieg der Herzfrequenz und des Blutdrucks zu verzeichnen war. Gleichzeitig blieben die Katecholamine im praktisch stressfreien Messbereich, selbst nach Reaktion auf den Zangenstimulus (vgl. Abb. 5-21). Herzfrequenz und Blutdruck blieben während aller Versuche unverändert.

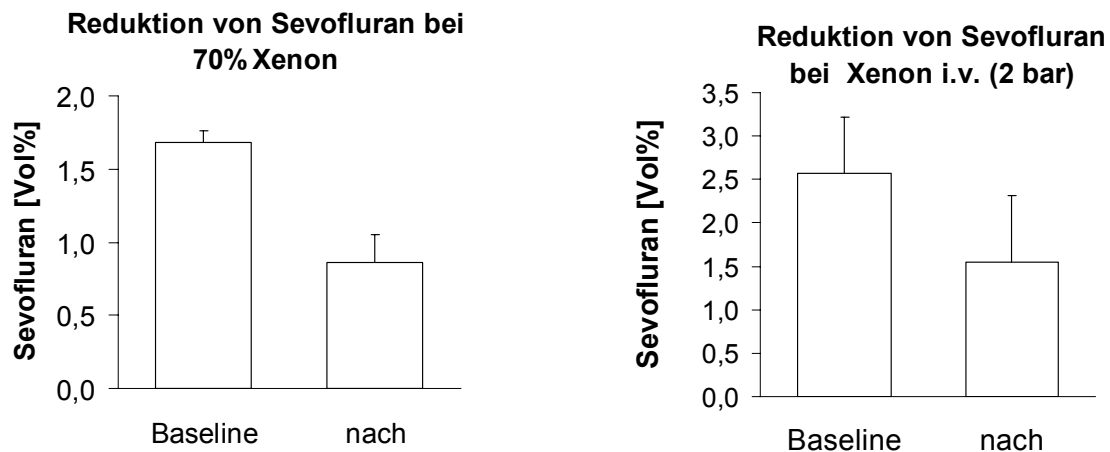


Abb. 5-20: Sevofluran-Konzentration bei Beginn der Versuche (Baseline) und nach maximal durchzuführender Reduktion (nach) während der Xenon-Anästhesie; links: Xenon inhalativ, rechts: Xenon i.v. in Abbolipid® 10% (2 bar)

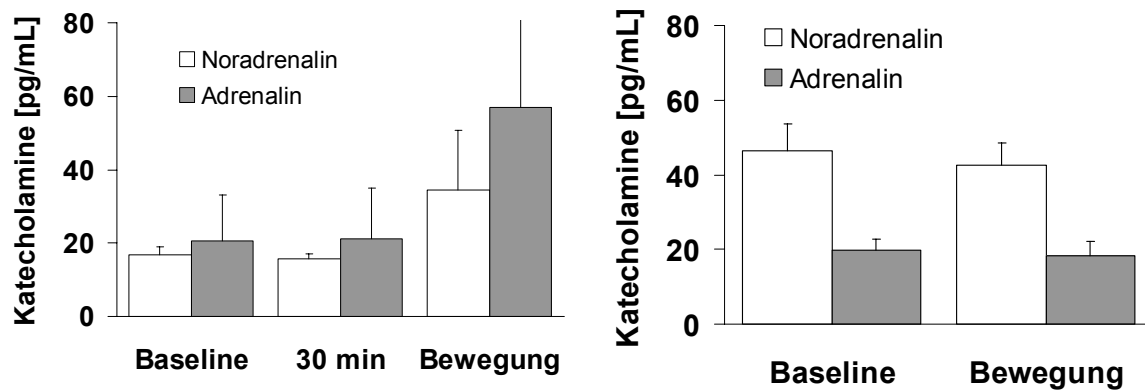


Abb. 5-21: Katecholamin-Konzentrationen vor Versuchsbeginn (Baseline) und bei Reaktion auf den Zangenstimulus (Bewegung); links: Xenon inhalativ, rechts: Xe i.v. in Abbolipid® 10% (2 bar)

Die Resultate zeigen, dass intravenöses Xenon mit einem signifikanten anästhetischen und analgetischen Effekt in Verbindung gebracht werden kann. Während der gesamten Experimente blieben die hämodynamischen Parameter und Katecholaminspiegel unverändert im stressfreien Bereich. Das zeigt, dass Xenon ein Beispiel für eine perzeptive Schmerzhemmung ist. Im Gegensatz zu einer Opiat-Schmerzhemmung bleibt der Patient sensibel für Veränderungen (Sandkühler, 2000; Sandkühler et al., 2000). Ein mit Opiaten behandelter Patient kann z.B. keine Berührungen wahrnehmen. Komplikationen, wie ein platzendes Gefäß, werden von ihm nicht wahrgenommen. Die NMDA-Rezeptor-Antagonisten ihrerseits vermitteln Schmerzfremheit, wohingegen der Patient aber auf sich ankündigende Komplikationen und Ungereimtheiten reagieren kann. Dies ist ein weiterer Grund für die klinische Bedeutung der Xenon-Anästhesie.

5.4.1.4 Zusammenfassung

In einem Vergleich der beiden Applikationsrouten konnte gezeigt werden, dass während der ersten 30 min eine vergleichende Größenordnung der Narkose mit 70% Xenon inhalativ und intravenös (2 bar) erreicht werden kann, obwohl die maximal erreichten Plateau-Werte einer i.v. Gabe nur ca. 1/300-1/600el derjenigen im Vergleich zu 70% inhalativ entsprechen. Somit kann durch intravenöses Xenon in einer Fettemulsion eine große Wirkungsverstärkung erzielt werden. Eine Kreislaufdepression blieb aus. Auch während des Stimulus erfolgte kein Anstieg der Katecholaminspiegel. Intravenöses Xenon kann mit einem signifikanten anästhetischen und analgetischen Effekt in Zusammenhang gebracht werden.

Innerhalb von 2-3 min ist der max. klinische Effekt erreicht. Auch intravenöses Xenon erreicht keine weitere Vertiefung der Narkose.

Unter den gegebenen Bedingungen (70% Xenon in Sauerstoff bzw. in Abbolipid® 10%) kann Xenon nicht als Monoanästhetikum eingesetzt werden.

Aufgrund des Verlustes von lipidgebundenem Xenon über die Lunge, kann der Effekt nur über 30 min aufrechterhalten werden. Dieser Verlust kann möglicherweise über technologische Veränderungen (höhere Beladung, festere Bindung, geringeres Abatmen) minimiert werden.

5.4.2 Rezepturoptimierung

5.4.2.1 Applikation der Formulierung F4 (Abbolipid® 10%, + 2% Eilecithin, 130 nm)

Durch das Rezepturscreening konnte gezeigt werden, dass durch Veränderung der Rezepturbestandteile die Beladungskapazität der Emulsionen mit Xenon optimiert werden konnte. Eine höhere Beladung mit Xenon sollte die Narkosestärke und -dauer verbessern. Die In-vivo-Untersuchungen sollten weitere Ansätze zur Optimierung der Rezepturen zeigen. Zudem wurde deutlich, dass die Lungenpassage des Gases problematisch ist. Xenon wurde an die Atemluft abgegeben und stand somit nicht mehr zur Wirkverstärkung zur Verfügung. Daraus ergab sich die Aufgabe, die Freigabekinetik in vivo zu optimieren. Xenon erfordert eine stärkere Kopplung an den Lipidträger, um eine vollständige Lungenpassage zu erzielen. Anschließend muss aber für eine maximale Wirkung die maximale Freisetzung ans Gehirn gewährleistet sein.

Wie bereits beschrieben, bindet 20% Fett im Gegensatz zu 10% Fett fast doppelt so viel Xenon. Im Arbeitskreis um Prof. Dr. Georgieff (Ulm) wurde beobachtet, dass auch doppelt so viel Xenon die Lunge passierte, aber die klinische Wirkung in Bezug auf Anästhesie und Analgesie nicht so ausgeprägt war. Das kann darauf beruhen, dass Xenon nicht komplett aus dem Emulsionssystem freigegeben wurde.

Die Formulierung F4 (Abbolipid® 10% + 2% Eilecithin, homogenisiert, vgl. Kap. 5.2.1.1) zeigte von den Formulierungen F1 bis F4 eine gute Beladungskapazität und ein geringes Ausgasungsverhalten. Zudem vermutet man in Eilecithin eine antagonistische Eigenwirkung, also ebenfalls eine NMDA-Rezeptor hemmende Wirkung.

Da mit dem LAB 40 nur Chargengrößen von 40 mL hergestellt werden können und während des Homogenisierens Verluste zu erwarten sind, wurden alle Chargen für die weiteren

Untersuchungen gepoolt und durch einen 0,2 µm Filter gegeben. Vor und nach Filtration war die Partikelgrößenverteilung identisch, im Beispiel mit einem d50% von 88 nm, d95% von 166 nm und einem d99% von 244 nm. Der mittlere PCS-Durchmesser ergab einen Wert von 126 nm und einen PI von 0,154. Da durch die Begasung der Emulsionen bei einem höheren Druck eine höhere Sättigung erreicht wird, wurden alle Emulsionen für die Anwendung am Schwein bei einem Druck von 2 bar ausgeführt. Die Analytik der bei 2 bar beladenen Emulsion ergab eine Xenon-Konzentration von 750 µL/mL und lag somit etwas höher als die Referenz F4. Der Verlauf der Wirkspiegel in vivo ist in Abbildung 5-22 dargestellt.

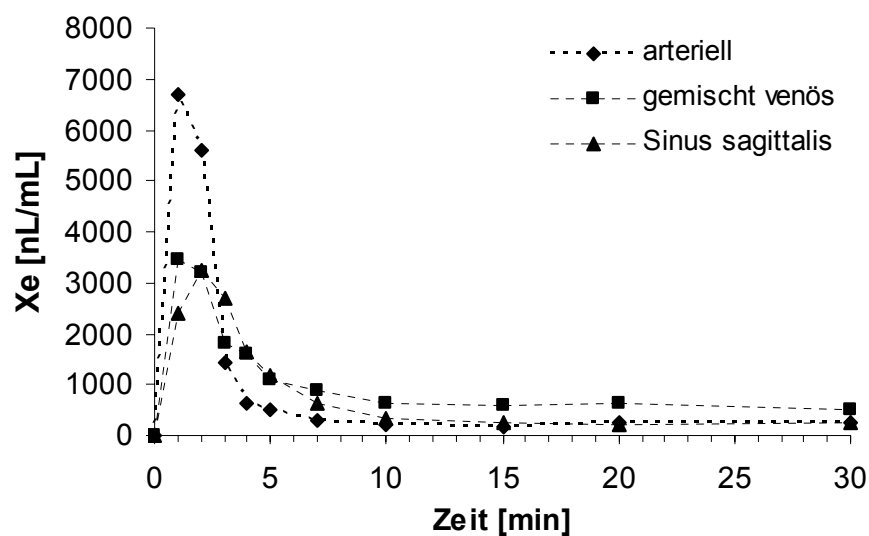


Abb. 5-22: Blutspiegel während der Applikation der Formulierung F4 (Abbolipid® 10% + 2% Eilecithin, homogenisiert bei 1500 bar, 15 Zyklen, RT); der PCS-Durchmesser betrug 126 nm.

Nach einer Minute wurde arteriell eine Spitzenkonzentration von 6680 nL/mL Blut und im Sinus sagittalis nach zwei Minuten von 3227 nL/mL erreicht. Nach zweiminütiger Apnoe erfolgte ein rascher Abfall aller Blutspiegelkurven. Nach 10 bzw. 15 min war ein Plateau von ca. 250 nL/mL arteriell und im Sinus sagittalis erreicht und von ca. 600 nL/mL gemischt venös.

Während des Versuchs wurde eine gute klinische Wirkung beobachtet. Sevofluran konnte von 2,9 Vol% auf 0,7 Vol% reduziert werden, und damit um 0,2 Vol% mehr, als bei den Versuchen mit Abbolipid® 10%. Die Katecholamine blieben ebenfalls während des Versuchs und den Stimuli mit der Zange im stressfreien Bereich. Adrenalin sank von 19 auf 15 pg/mL und Noradrenalin von 38 auf 36 pg/mL. Nach 30 min musste Sevofluran auf 2,5% erhöht

werden, während die Adrenalin- und Noradrenalin-Werte unbeeinflusst blieben (21 und 47 pg/mL).

Im Gegensatz zu reinem Abbolipid[®] 10% (PCS: 270 nm) konnte mit der Formulierung F4 (PCS: 126 nm) die Blutbildspiegel fast um das Doppelte erhöht werden, mit einhergehendem guten klinischen Effekt. Das Tier blieb absolut stressfrei während einer Sevofluran-Reduktion um 1,2 Einheiten, im Gegensatz zu einer Einheit bei Abbolipid[®] 10%. Durch den Zusatz von 2% Eilecithin und die Reduzierung der Partikelgröße konnte eine deutliche Wirkungsverstärkung zu Abbolipid[®] erreicht werden.

5.4.2.2 Applikation der Formulierung 4Tw (Abbolipid[®] 10% + 4% Tween[®] 80, 90 nm)

Um ein verstärktes Targeting zum Gehirn zu erreichen (nähere Diskussion s. Kap. 5.3), wurde die Abbolipid[®] 10 %-Emulsion mit einem Zusatz von 4% Tween[®] 80 untersucht. Die Herstellung erfolgte wie bisher durch Hochdruckhomogenisation bei 1500 bar, 45 °C, 15 Zyklen mit dem LAB 40. Die Chargen wurden nach Partikelgrößenüberprüfung ebenfalls gepoolt und filtriert. Schon bei der Herstellung fiel die Rezeptur durch stärkere Schaumbildung auf, die jedoch durch Stehenlassen verschwand. Die vereinte Charge wies folgende Partikelgrößen auf: d50%: 79 nm, d95%: 121 nm, d99%: 141 nm, PCS: 88 nm, PI: 0,165. Die Beladung der Emulsion mit Xenon lag in der bekannten Größenordnung (750 µL/mL, 2 bar Xenon-Partialdruck). Kurz nach Beladung der Emulsion fiel diese durch stärkeres Ausgasen des Xenons auf. Während der Applikation am Tier bildeten sich vermehrt kleine Gasblasen in der Spritze und in den Schläuchen, wodurch das weitere Ausgasen erkennbar blieb.

Wie in Abbildung 5-23 erkennbar, wurde nach einer Minute eine arterielle Spitzenkonzentration von über 6600 nL/mL Blut erreicht. Im Sinus sagittalis konnte nach 2 min ein Maximalwert von 2340 nL/mL festgestellt werden. Somit wurden arteriell dieselben Konzentrationsbereiche wie mit der Formulierung F4 erreicht (s. Kap. 5.4.2.1). Im Gehirn hingegen war die Konzentration geringer. Der Verlauf des gemischt venösen Blutspiegels zeigte ebenfalls niedrigere Werte. Sobald die Atmung wieder einsetzte, wurde bei dieser Formulierung, wie auch bei allen bisherigen getesteten Emulsionen, ein starker Abfall der Blutspiegel verzeichnet. Nach 10 min schwankten die Werte im niedrigen Bereich von 150-260 nL/mL.

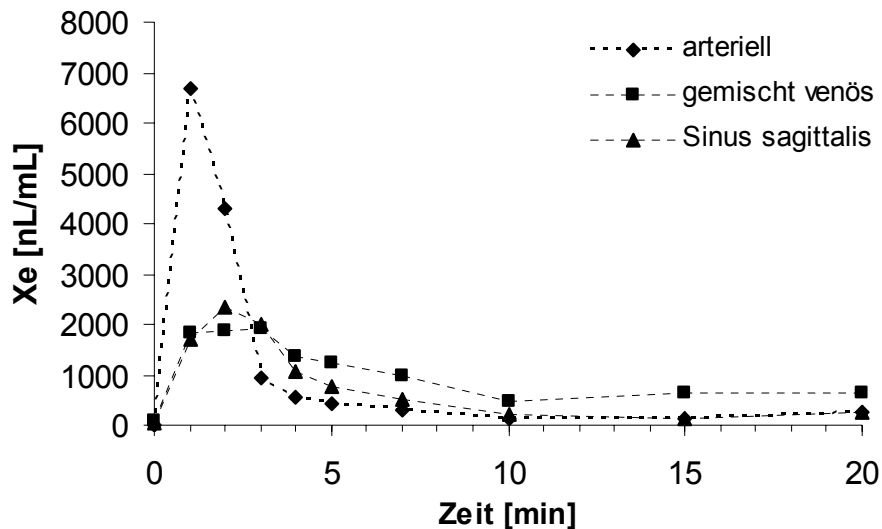


Abb. 5-23: Blutspiegel während der Applikation der gepoolten Formulierung 4Tw (Abbolipid[®] 10% + 4% Tween[®] 80), homogenisiert bei 1500 bar, 15 Zyklen, 45 °C; der PCS-Durchmesser betrug 88 nm.

Bemerkenswert war die klinische Wirkung der Emulsion. Sevofluran konnte von 3,3 Vol% auf 0,6 Vol% gesenkt werden. Die Konzentration der Katecholamine blieb während der tiefen Narkose in einem niedrigen Konzentrationsbereich (Adrenalin < 16 pg/mL, Noradrenalin < 30 pg/mL Blut). Bei Reduktion des Sevoflurans unter 0,6 Vol% zeigte das Schwein eine Reaktion auf den Zangentest. Trotzdem bedeutet dies keinen Stress für das Tier. Die hämodynamischen Parameter blieben unverändert. Stressfreiheit bestand bis einschließlich der Erhöhung der Sevofluran-Konzentration auf den Anfangswert.

Das anfängliche beobachtete Ausgasen der Emulsion kann auf einen hohen Tween[®]-Gehalt oder auf die starke Verkleinerung der Partikel zurückzuführen sein. Durch die Vergrößerung der Oberfläche erfolgt daher ein schneller Austausch des Xenons mit der Umgebung. Als optimal anzusehen wäre eine Emulsion, die Xenon außerhalb des Körpers vollständig zu binden vermag und kein Ausgasen im Herstellungsprozess, während der Lagerung und Anwendung zeigt. Zunächst kann man sich allerdings mit einer Emulsion begnügen, die ein großblasiges Ausgasen, somit also ein langsames Ausgasungsverhalten, zeigt. Diese Emulsionen führten bisher zu keinen Komplikationen während der Anwendung. Eine Gasembolie muss aber auf jeden Fall verhindert werden.

Der Versuch zeigte, dass über eine galenische Veränderung eine gute Beladung mit Xenon möglich ist und höhere Plasmaspiegel als mit Abbolipid[®] 10% erreicht werden können. Trotz einer geringeren Peakkonzentration im Sinus sagittalis im Vergleich zu F4 zeichnete sich 4Tw

durch eine Wirkungsverstärkung aus. Die Reduktion um 2,7 Vol% Sevofluran bei gleich bleibender Tiefe der Narkose war bisher das beste Ergebnis. Eine Veränderung zu F4 und damit mögliche Ursache der Wirkungsverstärkung besteht zum einen in Partikelgrößenreduktion und zum anderen in dem Zusatz von 4% Tween. Möglicherweise vermag Tween ein gewisses Hirntargeting zu forcieren, auch wenn die Blutspiegel dies nicht belegen. Hingegen ist aber der klinische Effekt sichtbar.

Aus den Beobachtungen ergab sich die Frage, was mit Xenon im Körper geschieht. Arteriell ist eine deutliche Erhöhung der Plasmaspiegel möglich, im Vergleich zu einer unveränderten Fettemulsion. Trotzdem steigt die Konzentration im Gehirn nicht deutlich an. Möglicherweise bleibt doch restliches Xenon in der Emulsion und wird nicht weiter ans ZNS abgegeben. Vorangestellt sei aber die hervorragende klinische Wirkung, die sich durch eine galenische Bearbeitung beeinflussen lässt.

5.4.2.3 Einfluss der Partikelgrößen am Beispiel von Var1 und Var3 (10 und 15%ige Fettemulsion unter Zusatz von 5% Eilecithin)

Während der Löslichkeitsversuche konnte durch Erhöhung des Fettgehalts und der Eilecithinkonzentration die Beladung bis auf 600 $\mu\text{L}/\text{mL}$ erhöht werden. Ob dadurch auch die therapeutische Wirkung erhöht werden kann, war noch zu beweisen. Aufgrund der erwähnten Unverträglichkeiten mit LCT und einem Fettgehalt von 20% wurden die Formulierungen Var1 (10% Fett) und Var3 (15% Fett) auf der Basis von Abbolipid[®], wie in Kapitel 5.2.1.6 beschrieben, hergestellt. Somit bestanden die Rezepturen aus 10 und 15% Fett und zusätzlich zum üblichen Lecithingehalt von 1,2% aus 5% Eilecithin (d. h. insgesamt 6,2% Lecithin). Im Verlauf der Versuchsreihen zeichnete sich eine Wirkung in Abhängigkeit der Partikelgrößen ab.

5.4.2.3.1 90-110 nm

Im Gegensatz zu den folgenden Untersuchungen wurde Lecithin in Abbolipid[®] 20% dispergiert, mit einem Wasser-Glycerolgemisch auf die gewünschte Konzentration verdünnt und bei 1500 bar mit 15 Zyklen homogenisiert. Die Charakterisierung der gepoolten Proben hinsichtlich der Partikelgröße ergab einen mittleren PCS-Durchmesser von 88 nm (PI 0,205) für Var1 und 107 nm (PI 0,224), für Var3. Bei der 10%igen Fettemulsion (Var1) waren 50%

der Partikel unter 79 nm und 99% der Partikel unter 142 nm, respektive 81 nm und 149 nm für die 15%ige Fettemulsion (Var 3). Insgesamt waren die Werte deutlich kleiner, um 80-120 nm, als die Emulsionen, die durch Verdünnung aus Lipofundin[®] MCT 20% hergestellt wurden (vgl. Kap. 5.2.1.6). Dies beruht auf dem leicht veränderten Produktionsprozess (diesmal keine Verdünnung mit hochkonzentrierten Liposomendispersionen), da in dieser Arbeit bisher keine Unterschiede in der Partikelgrößenverteilung von Abbolipid[®] und Lipofundin[®] MCT festgestellt wurden.

Die Emulsionen wurden bei einem Xenon-Partialdruck von 2 bar gesättigt und erreichten eine Beladung von 710 $\mu\text{L}/\text{mL}$ und 900 $\mu\text{L}/\text{mL}$, mit steigendem Fettgehalt. Kurze Zeit nach der Beladung bildeten sich große Gasblasen in der Spritze. Infolgedessen war ein Gehaltsverlust der Emulsionen zu verzeichnen. Die In-vivo-Ergebnisse sind in Abbildung 5-24 und 5-25 dargestellt.

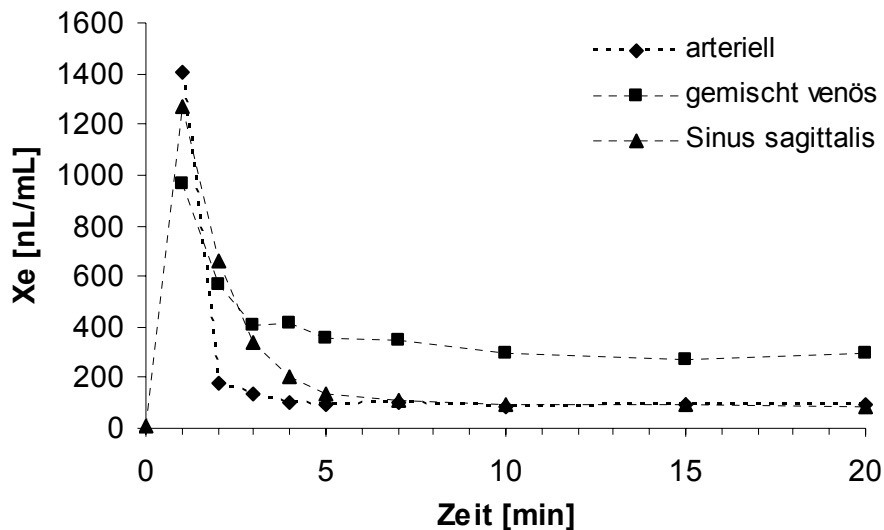


Abb. 5-24: Blutspiegel während der Applikation der Formulierung Var1, bestehend aus 10% Fett und insgesamt 6,2% Eilecithin; der PCS-Durchmesser betrug 88 nm.

Mit Var1 konnten keine Wirkspiegel aufgebaut werden. Die arterielle Spitzenkonzentration war auf 1/5 der vorigen Werte gefallen. Nach 2 min wurden im Gehirn gerade einmal knapp 1300 nL/mL Blut gemessen. Die Blutspiegel lagen im selben Konzentrationsbereich oder sogar niedriger als mit 1 bar beladenem Abbolipid[®]. Es konnte nur ein geringer Effekt verzeichnet werden. Schon bei Injektion reagierte das Tier auf den Stimulus mit Bewegung.

Nach Reduktion des Sevofluran um 0,8 Vol% erfolgte ein starkes Zappeln als Reflex. Der Adrenalin-Wert stieg um 16 Einheiten, Noradrenalin blieb konstant.

Ähnlich ernüchternd verlief die Applikation der 15%igen Fettemulsion. Nach einer Minute wurden arteriell, gemischt venös und im Sinus sagittalis Spitzenkonzentrationen von 2350, 1752 und 1961 nL/mL gemessen. Innerhalb der nächsten 5 min nach Beatmung fielen die Werte arteriell und im Sinus sagittalis auf knapp 100 nL/mL ab. Sobald wieder eine geregelte Atmung stattfand, erfolgte keine Rückdiffusion, sondern Abatmung über die Lunge.

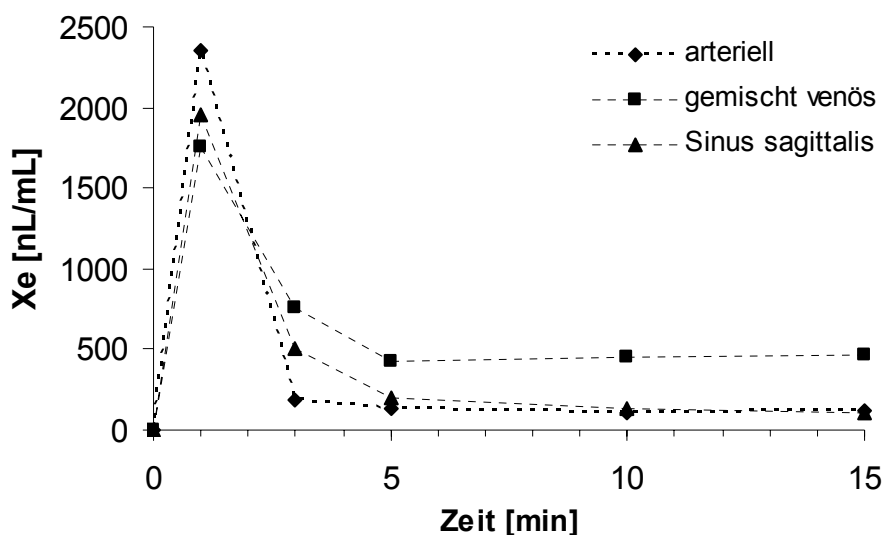


Abb. 5-25: Blutspiegel während der Applikation der Formulierung Var3, bestehend aus 15% Fett und insgesamt 6,2% Eilecithin; der PCS-Durchmesser betrug 107 nm.

Der Versuch musste frühzeitig wegen der fehlenden klinischen Wirkung (Reduktion des Sevoflurans um nur 0,2 Vol%) und des Auftretens von pulmonalem Hochdruck abgebrochen werden. Nach 5 min erfolgte eine Bestimmung der Katecholamine, die konstant in einem Bereich um 60 pg/mL geblieben waren. Als mögliche Ursache der Komplikationen kommen zwei Faktoren in Betracht: das ausgasende Xenon und der hohe Fettgehalt.

Die Rezepturen Var1 und Var3 zeigten zwar eine sehr gute Beladungskapazität für Xenon, im Tier jedoch zeigten die Emulsionen keine gute klinische Wirkung. Dies beruht auf der schnellen Abgabe von Xenon aus den Emulsionen und die Abgabe über die Lunge. Es konnten keine Wirkspiegel im ZNS aufgebaut werden.

5.4.2.3.2 Resümee und weitere Vorgehensweise

Die letzten Versuche zeigten, dass in dem Xenon-Emulsions-System offensichtlich nicht der Grundsatz gilt, je kleiner die Teilchengröße, desto besser der Effekt. Die vorgegebene Formulierung 4 hatte eine Teilchengröße von 140 nm. Basierend auf der Überlegung, dass mit kleineren Partikeln (z.B. 4Tw) eine bessere Wirkung zu erzielen sei, wurde angenommen, mit einer erreichten Partikelgröße um 90 nm dafür gute Voraussetzungen zu bieten. Diese Annahme konnte nicht bestätigt werden. Zwar stellt das Ausgasungsverhalten auch eine Stoffabhängigkeit dar, generell aber neigen die Emulsionen mit kleiner werdenden Partikelgrößen zum stärkeren Ausgasen. Offensichtlich ist aufgrund der vergrößerten Grenzfläche eine zu schnelle Freigabe des Xenons eingetreten. Zusammenfassend kann man die Ergebnisse wie folgt interpretieren:

1. Eine nicht mikronisierte Emulsion wie Abbolipid[®] 10% (270 nm) setzt zu langsam Xenon frei, um einen ausreichenden Effekt zu erzielen.
2. Die Freisetzung kann beschleunigt werden. Die Wirkung steigt, wenn die Teilchengröße auf ca. 130-140 nm verkleinert wird (F4).
3. Wird die Teilchengröße weiter verkleinert auf ca. 90-110 nm, so führt dies zu einer zu schnellen Freisetzung (4Tw, Var1 und Var3).
4. Es kann angenommen werden, dass die Freisetzung aus Liposomen aufgrund ihrer geringen Größe sehr schnell ist, d.h. das im Lecithin gelöste Xenon wird sich ebenfalls sehr schnell freisetzen.

Aufgrund dieser Überlegung ergab sich die Möglichkeit, ein optimales System durch Kombination unterschiedlicher Partikelgrößen zu erzielen: die Kombination einer nicht homogenisierten Emulsion (Partikelgröße um 270 nm, d.h. langsam freisetzend) mit 5% Lecithinliposomen (schnell freisetzend). Insgesamt enthält diese Mischung dann eine höhere Xenon-Konzentration. Die Zumischung eines schnell freisetzenden Teils (Liposomen), um einen schnellen Wirkungseintritt zu erreichen, zu dem langsamer freisetzenden Teil (größere Emulsionstropfen), um die Wirkung aufrecht zu erhalten, könnte ein optimales Profil erzeugen. Diese These wird im Folgenden untersucht.

5.4.2.3.3 130 nm

Aus den im vorigen Kapitel genannten Gründen wurde bei gleich bleibender Fett- und Lecithinkonzentration der Effekt der Teilchengröße untersucht. Die Emulsionen wurden

durch Zumischen der 5%igen Liposomen zu Abbolipid 20% und anschließender Homogenisation hergestellt, so dass sich folgende Zusammensetzung ergab: Abbolipid® 10%, 1,2% Lecithin und 5% Liposomen. Die Liposomen hatte einen PCS-Durchmesser von 50-60 nm. Durch Homogenisieren des Gemisches (3-6 Zyklen) wurden Emulsionen mit einer Partikelgröße um 130 nm hergestellt. Durch das weitere Homogenisieren kann sich die Größe der Liposomen weiter reduziert haben. Die erhaltene gepoolte 10%ige Emulsion zeichnete sich durch einen mittleren Durchmesser von 127 nm (PI: 0,195, d50%: 88 nm, d99%: 233 nm) aus, die 15%ige Emulsion durch einen mittleren Durchmesser von 129 nm (PI: 0,170, d50%: 88 nm, d99%: 246 nm). Die Emulsionen zeigten eine Beladung von 473 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (10%) und 800 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (15%). Die Abbildungen 5-26 und 5-27 zeigen die Blutspiegel.

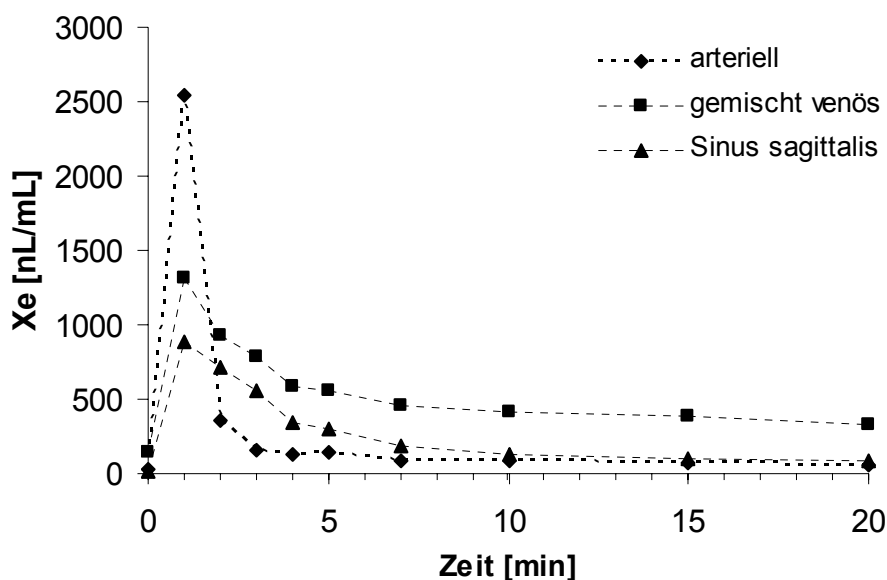


Abb. 5-26: Blutspiegel während der Applikation der Formulierung Var1, einer 10%igen Fettemulsion mit insgesamt 6,2% Eilecithin (PCS-Durchmesser: 127 nm)

Der Konzentrationsverlauf der Spiegel bei der Emulsion mit 10% Fett, 1,2% Lecithin und 5% Liposomen (Var1, PCS: 127 nm) war zwar höher als bei der Emulsion mit einem PCS-Durchmesser von 90 nm, aber niedriger als bei normalem Abbolipid® 10%. Arteriell, gemischt venös und im Sinus sagittalis wurden nach 1 min Spitzenkonzentrationen von 2541, 1318 und 891 nL/mL erreicht (Abb. 5-26). Aber das zusätzliche Eilecithin und die größeren Partikel verbesserten den klinischen Effekt. Sevofluran konnte um 2,1 Einheiten von 3,8 Vol% auf 1,7 Vol% reduziert werden. Sobald auf den Stimulus mit Bewegung reagiert

wurde, wurden die Katecholaminkonzentration bestimmt. Es herrschte völlige Stressfreiheit. Der Blutdruck und die Herzfrequenz blieben unverändert.

Die Vergrößerung der Fettpartikel von 100 auf 130 nm bewirkte auch mit der 15%igen Fettemulsion eine deutliche Erhöhung der Xenonspiegel. Arteriell konnte die Konzentration auf 4807 nL/mL verdoppelt werden. Gemischt venös wurden 2388 nL/mL gemessen (Abb. 5-27). Im Gehirn baute sich wie bei der Emulsion mit einem PCS-Durchmesser um 90 nm (4Tw) eine Konzentration von ca. 1900 nL/mL auf. Sevofluran konnte um 1,1 Einheiten reduziert werden. Alle hämodynamischen Parameter blieben während des gesamten Experiments unverändert.

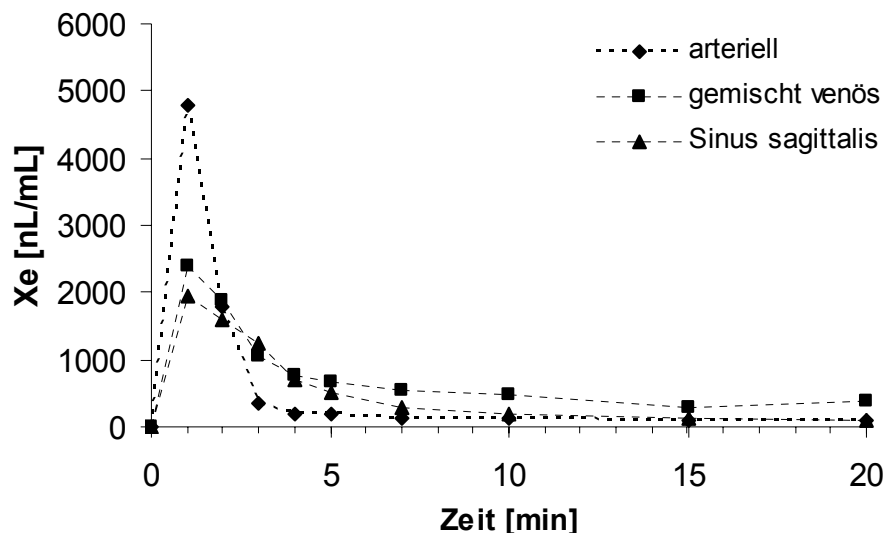


Abb. 5-27: Xenon-Konzentration im Blut während Applikation der Formulierung Var3, einer 15%igen Fettemulsion mit insgesamt 6,2% Eilecithin (PCS: 129 nm)

Die 10%ige Fettemulsion zeigte in vivo eine bessere klinische Wirkung, die 15%ige Fettemulsion hingegen höhere Blutspiegel. Durch die Erhöhung der Fettkonzentration kann zwar die Beladungskapazität erhöht werden, aber nicht die klinische Wirkung (Anästhesie und Analgesie). Xenon wird aus den Emulsionen nicht komplett an das ZNS abgegeben. Durch die Vergrößerung der Partikel um 20-40 nm wurde die Narkosetiefe um das 2½-5½fache gesteigert.

5.4.2.3.4 *Var1: 270 nm*

Basierend auf den Ergebnissen der vorigen Studien wurde eine 10%ige Fettemulsion mit insgesamt 6,2% Eilecithin und einer Partikelgröße von 270 nm (PI 0,075) hergestellt. Hierzu wurde Abbolipid[®] 20% mit Eiliposomen verdünnt und bei 600 bar und 45 °C über einen Zyklus homogenisiert. Die 11,2%ige Liposomendispersion wurde zuvor durch Homogenisieren bei 1500 bar und 5 Zyklen hergestellt und enthielt 2,25% Glycerol (wasserfrei) als Isotonisierungsmittel. Der PCS-Durchmesser betrug 38 nm mit einem PI von 0,290, der auf eine breitere Verteilung hinweist.

Das Versetzen einer nicht homogenisierten Emulsion mit Liposomen sollte folgende Ziele erreichen:

1. die Erhöhung der Beladungskapazität und
2. die Herstellung einer Mischung aus
 - a. einem schnell freisetzenden Teil (Liposomen), um einen schnellen Wirkungseintritt zu erreichen, und
 - b. einem langsamer freisetzenden Teil (größere Emulsionstropfen), um die Wirkung aufrecht zu erhalten.

Die Emulsion zeigte eine Beladungskapazität von 750 µL/mL. Während der Bolusinjektion verstarb das Tier. Durch eine Obduktion bestätigte sich der Verdacht einer Gasembolie. Die Spiegel nach 1 und 2 min ergaben folgende Werte: arteriell: 3515 nL/mL (1 min) und 2214 nL/mL (2 min), gemischt venös: 2289 nL/mL (1 min) und 3333 nL/mL (2 min) und im Sinus sagittalis: 2094 nL/mL (1 min) und 4124 nL/mL (2 min). Die Werte nach 2 min sind durch den Abfall des systemischen Drucks mit einer Unsicherheit behaftet.

Das Gas wurde aus der Emulsion zu schnell abgegeben. Die Emulsion wurde nach Zumischen der Liposomen nur mit einem Zyklus homogenisiert. Dies könnte dazu geführt haben, dass zu viele freie Liposomen vorlagen. Zuvor wurde nach Zumischen der Liposomen über mehrere Zyklen homogenisiert. Je mehr homogenisiert wird, desto mehr Öl-Liposomen-Konjugate werden gebildet. Somit scheint dann ein ausgewogenes verträgliches Gleichgewicht zwischen freien Liposomen und Liposomen-Öl-Verbindungen zu bestehen. Die LD-Verteilungskurven in Abbildung 5-28 zeigen die Volumenverteilung von Abbolipid[®] 20%, der 11,2%igen Liposomendispersion und die Emulsion (Var1) mit einem PCS-Durchmesser von 270 nm. Im Gegensatz zu Abbolipid[®] 20% ist der Peak, der mit der Lage der Liposomendispersion

übereinstimmt (0,04-0,14 μm), vergrößert und wird durch die zugemischten Liposomen verursacht.

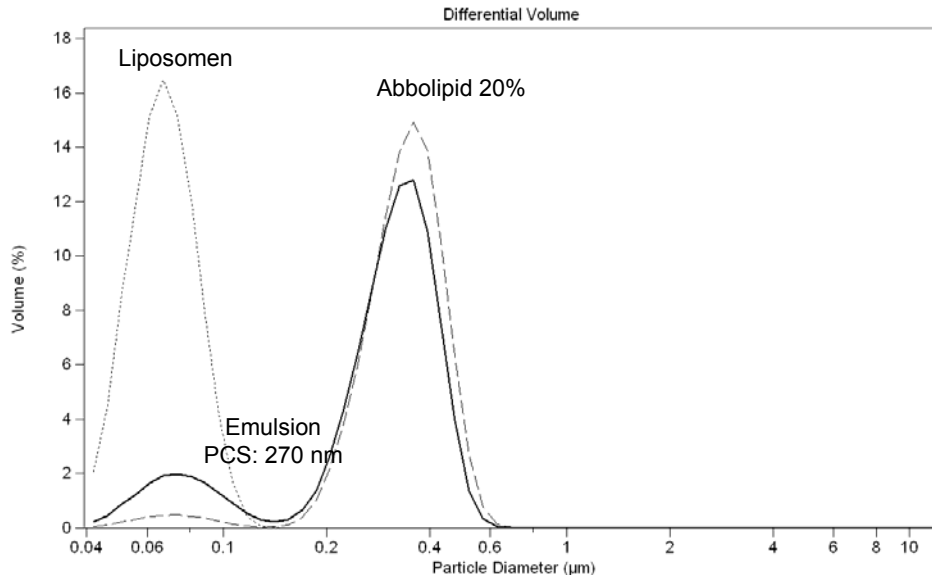


Abb. 5-28: LD-Partikelgrößenverteilung von Abbolipid 20% (gestrichelt), 11,2% Liposomendispersion (gepunktet) und Var1 (durchgezogene Linie), bestehend aus 10% Fett und insgesamt 6,2% Eilecithin (PCS: 270 nm)

5.4.3 Zusammenfassende Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass der anästhesierende Effekt von den Herstellungsbedingungen der Emulsionen abhängig ist. Zu viele Homogenisationszyklen setzen die Partikelgröße der Hauptpopulation zu stark herab. Die Folge ist eine zu schnelle Freigabe des Gases. Allerdings herrscht dann ein günstigeres Öl-Liposomen-Verhältnis, das in-vivo eine gute Verträglichkeit zeigt. Bei zu geringer Homogenisationszyklenzahl kommt es zum Vorliegen freier Liposomen, die zu einer sehr schnellen Xenon-Freisetzung mit tödlicher Folge führen können. Die Öl-Liposomen-Konjugate führen zu einer moderaten Freigabe des Xenons mit einem schnellen Aufbau der Wirkspiegel, ohne eine Gasembolie zu erzeugen. Tabelle 5-10 fasst die wichtigsten Charakteristika der Versuche zusammen.

Tab. 5-10: Zusammensetzung, mittlere PCS-Partikelgröße, Blutkonzentrationen und Sevofluranreduktion (Δ Vol%) der untersuchten Emulsionen

Emulsion		PCS [nm]	Liposomen [nm]	arteriell [μ L/mL]	Sin sag [μ L/mL]	Sin sag max [min]	Δ Vol %
inhalativ		-	-	68	65	-	0,9
Abbolipid [®] 10%	10% Fett	270	-	3,8	1,7	2	1,1
F4	10% Fett 2% Lecithin	126	?	6,6	3,2	2	1,2
4Tw	10% Fett 4% Tween [®]	88	-	6,7	1,9	2	2,7
Var1	10% Fett 5% Lecithin	88	?	1,4	1,3	1	0,8
Var3	15% Fett 5% Lecithin	107	?	2,4	1,9	1	0,2
Var1	10% Fett 5% Lecithin	127	55	2,5	0,9	1	2,1
Var3	15% Fett 5% Lecithin	129	57	4,8	1,9	1	1,1
Var1	10% Fett 5% Lecithin	270	40	3,6	4,1	2	†

† Tod des Versuchstiers

Die Narkosetiefe wird durch die Konzentration im Zentralnervensystem bestimmt (Mutschler et al., 2001). Der klinische Effekt des intravenösen Xenons wird aber auch von anderen Faktoren bestimmt. Die Hälfte der getesteten Formulierungen erreichte im ZNS eine Konzentration von 1,7-1,9 μ L/mL. Trotzdem war ihre Wirkung, die in der Reduktion des Sevoflurans (Δ Vol%) zum Ausdruck kommt, von extremer Bandbreite, d.h. von keiner Wirkung (Δ 0,2) bis hin zu sehr guter (Δ 2,7). Selbst bei F4 wurde eine Konzentration von 3,2 μ L/mL im Gehirn gemessen, sie löste aber keine entsprechende Wirkung aus. Durch den Zusatz von 5% Eilecithin konnte die maximale Konzentration im Sinus sagittalis um eine Minute früher gemessen werden, was auf eine schnellere Abgabe ins ZNS hinweist. Eine deutliche Erhöhung der Plateauspiegel, die für eine lange Aufrechterhaltung der Narkose nötig ist, wurde nicht erreicht.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass nicht nur die Fettemulsion, sondern auch andere Faktoren, wie z.B. die Partikelgröße und die Art und Konzentration der Zusatzstoffe wie Eilecithin oder Tween[®], die Wirkung des Arzneistoffs Xenon positiv modulieren. Der klinische Effekt korreliert nicht zwangsläufig mit der Beladungskapazität. Es wird deutlich, dass In-vivo-Versuche für eine Wirkungsquantifizierung unerlässlich sind. Weitere mögliche

Einflussgrößen, wie z.B. veränderte Homogenisationsparameter (Druck und Temperatur), wurden nicht getestet.

Die besten klinischen Ergebnisse wurden mit der der Emulsion Abbolipid[®] 10% unter Zusatz von 4% Tween[®] erzielt (Formulierung 4Tw, PCS: 88 nm), obwohl sie ein ungünstiges Ausgasungsverhalten aufwies, gefolgt von der Abbolipid[®]-Emulsion mit einem Fettgehalt von 10% und zusätzlich 5% Eiliposomen als schnell freisetzender Komponente (Formulierung Var1, PCS: 127 nm).

5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Arbeit bestätigt, dass Xenon ein hohes anästhetisches und analgetisches Potential besitzt, sowohl inhalativ in einem Gemisch mit Sauerstoff als auch intravenös an eine Fettemulsion gekoppelt. Die Wirkung tritt schnell ein. Während der gesamten Untersuchungen bestand durch die fehlende Ausschüttung von Stresshormonen eine hohe Kreislaufstabilität, selbst dann noch, wenn die Narkosetiefe nachließ.

Auf Zellebene wurde ein inhibitorischer Effekt für Xenon in Lipofundin[®] MCT 20% nachgewiesen (Weigt et al., 2003; Weigt et al., 2001). Die Arbeit bestätigt ebenfalls, dass der Reaktionsmechanismus unverändert bleibt und Schmerzfreiheit und Bewusstlosigkeit intravenös schnell erreicht werden.

Durch das Rezepturscreening wurden Erkenntnisse zum Lösungsverhalten gewonnen, das davon abhängig ist, ob polare oder unpolare Komponenten vorliegen.

Die Löslichkeit von Xenon in einer Emulsion konnte von 300 µL/mL (Abbolipid[®] 10% + 2% Eilecithin, PCS:150 nm) auf 600 µL/mL (15% Lipofundin[®] MCT und 6,2% Eilecithin, PCS: 180 nm, Beladung bei Umgebungsdruck) erhöht werden. Die Beladungen der Emulsionen bei 2 bar für die Wirkungsüberprüfung zeigten eine Löslichkeit bis zu 900 µL/mL (15% Fett und 6,2% Eilecithin, PCS: 107 nm).

Die sich anschließenden In-vivo-Untersuchungen ließen eine vergleichbare Wirkung in Bezug auf Analgesie und Anästhesie einer Xenon-Inhalation und intravenös verabreichtem Xenon in Abbolipid[®] 10% (2 bar) erkennen, obwohl intravenös deutlich geringere Blutspiegel und Plateaukonzentrationen als inhalativ gemessen wurden. Eine Wirkungssteigerung konnte durch eine Erhöhung des Beladungsdrucks von 1 auf 2 bar festgestellt werden. Die Wirkung wurde maximal erhöht, als Xenon in einer 10%igen Fettemulsion mit 4% Tween[®] gelöst wurde. Der sich einstellende Effekt war im Vergleich zur Inhalationsnarkose fast verdreifacht.

Durch Veränderung der Partikelgröße bei gleich bleibender Rezeptur wurde ein Zusammenhang zwischen der Partikelgröße, der Freisetzungsgeschwindigkeit aus der Trägeremulsion und der Narkosewirkung konstatiert.

Die Erhöhung der Fettkonzentration von 10 auf 15% steigert zwar die Beladungskapazität der Emulsion und erhöht die Blutspiegel, die erwartete Verbesserung der klinischen Wirkung blieb aber aus. Sie verschlechterte sich sogar. Xenon wird aus den Emulsionen nicht vollständig an das ZNS abgegeben. Die 10%igen Fettemulsionen heben sich durch eine bessere klinische Wirkung ab.

Die Fettemulsionen an sich bewirken zwar keine Anästhesie oder Analgesie, sie ermöglichen aber, dass Anästhetika in ihrer Dosierung herabgesetzt werden können (Dutta and Ebling, 1997; Musser et al., 1999). Eine Reduktion der provozierten NMDA-Antwort konnte für Intralipid® 20%, ClinOleic® 20%, Lipofundin® MCT 20% und Abbolipid® 20% nachgewiesen werden (Weigt et al., 2004). Bisher nicht genauer definierte Bestandteile in den als Xenon-Träger getesteten Fettemulsionen tragen zu der anästhetischen, analgetischen und neuroprotektiven Wirkung des Xenons bei. Basierend auf den klinischen Ergebnissen kann Eilecithin und Tween® 80 eine Eigenwirkung zugesprochen werden, wenn weitere Faktoren, wie der Fettgehalt und die Partikelgröße, aufeinander optimal abgestimmt sind.

Für eine Narkose werden für ein 40 kg Schwein 50 mL Emulsion als Bolus benötigt und 50 mL für die weiteren 30 min. Bei einer durchschnittlichen Löslichkeit von 600 µL/mL wird nur noch 1/100 bis 1/300 der bei einer Inhalation benötigten Xenonmenge für einen durchschnittlichen Erwachsenen verbraucht, bei gleich bleibender oder verstärkter Narkosewirkung.

Es ist kritisch anzumerken, dass die Lungenpassage von Xenon problematisch bleibt. In der Tatsache, dass Xenon nur über die Lunge eliminiert wird, liegt zwar einerseits die gute Steuerbarkeit der Narkose begründet, aber andererseits auch der erhebliche Nachteil des Gases: Es erfolgen nur eine begrenzte Aufnahme und Abgabe ans Gehirn. Grundsätzlich ist ein hoher Verlust über die Lunge bei sofortigem Blutspiegelabfall der Xenon-Konzentration zu beobachten, sobald die zweiminütige Apnoe beendet wird. Unter der Beatmung wird immer eine Elimination zu beobachten sein. Diese lässt eine tiefe Narkose auf Dauer nicht zu. Nach bisher vorliegenden Erkenntnissen kann zwar der Effekt der Inhalationsnarkose durch Fettemulsionen als Trägermedium verstärkt werden, aber als alleiniges Narkosemittel kann Xenon nicht zum Einsatz kommen. Xenon wird vorerst kein Monoanästhetikum.