

5 Materialien und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Materialien ad Kapitel 2: Transdermale Applikation von Protergurid

5.1.1.1 Wirkstoff

Der Wirkstoff Protergurid (Charge: F 210 703; Reinheit 100% gemäß Analysenzertifikat) wurde von Miroslav Flieger vom Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prag synthetisiert.

5.1.1.2 Hauthaftkleber

BioPSA[®] 7-4202

Der BioPSA[®] 7-4202-Hauthaftkleber (Charge: 17409-151) wurde von der Firma Dow Corning, Midland, USA zur Verfügung gestellt. Es handelte sich hierbei um einen aminkompatiblen Silikonkleber, welcher in Ethylacetat gelöst vorlag (Feststoffgehalt: 60%).

Eudragit[®] E 100

Eudragit[®] E 100 (Charge: 8311001152) wurde von der Röhm GmbH, Darmstadt, Deutschland bezogen. Es handelte sich hierbei um ein Butylmethacrylat-(2-Dimethylaminoethyl)-methacrylat-Methylmethacrylat-Copolymer, welches in Form eines Granulates vorlag. Zur Herstellung von Matrix-Transdermalsystemen wurde das Polymer in Aceton / Ethanol / 2-Propanol (60 / 33,4 / 6,6) gelöst.

Gelva[®] 7883 Multipolymer solution

Der Gelva[®] 7883-Hauthaftkleber (Charge: SP 6802) wurde von der Firma Solutia Inc., St. Louis, USA zur Verfügung gestellt. Es handelte sich hierbei um ein Acrylat-Vinylacetat-Polymer (~ 95 : 5), welches in Ethylacetat gelöst vorlag (Feststoffgehalt: 50%).

Oppanol[®] B 15 SFN

Der Oppanol[®] B 15 SFN-Kleber (Charge: 3081081074 000010) wurde von der Firma BASF, Ludwigshafen am Rhein, Deutschland zur Verfügung gestellt. Es handelte sich hierbei um ein weichharziges Polyisobutylenpolymer mit einer Molmasse von 40000 bis 85000. Zur Herstellung von Transdermalsystemen wurde das Polymer vorab in n-Hexan gelöst.

5.1.1.3 Hilfsstoffe und chemische Permeationsverstärker*Polyvidon 25*

Polyvidon 25 (Polyvinylpyrrolidon, PVP, Charge: K26792043 206) war von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und diente als Kristallisationsinhibitor in Acrylat-Matrixpflastern

Dibutylsebacat

Dibutylsebacat (Charge: S35872 216) war von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und diente als Weichmacher in Eudragit[®] E 100-Matrixpflastern.

Bernsteinsäure

Bernsteinsäure (Charge: K29940782 151) war von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und diente als Quervernetzer („Crosslinker“) in Eudragit[®] E 100-Matrixpflastern.

N-Methylpyrrolidon

N-Methylpyrrolidon (Charge: K32455772 340) war von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und diente als chemischer Permeationsverstärker.

Surfadone[®] LP100 (N-Octylpyrrolidon) und Surfadone[®] LP300 (N-Dodecylpyrrolidon)

Surfadone[®] LP100 (N-Octylpyrrolidon, Charge: 05300098217) und Surfadone[®] LP300 (N-Dodecylpyrrolidon, Charge: 03300104741) wurden von der Firma ISP Global Technologies, Köln, Deutschland zur Verfügung gestellt und dienten als chemische Permeationsverstärker.

Azone[®]

Azone[®] (N-Dodecylazacycloheptan-2-on oder Laurocapram, Charge: 040825) wurde von der Firma Yick-Vick Chemicals and Pharmaceuticals, Hong Kong, China bezogen und diente als chemischer Permeationsverstärker.

Dodecanol

Dodecanol (Charge: S34126 315) war von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und diente als chemischer Permeationsverstärker.

Laurinsäure

Laurinsäure (Charge: S3823833 409) war von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und diente als chemischer Permeationsverstärker.

Tween[®] 20

Tween[®] 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat, Charge: S3871584 325) war von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und diente als chemischer Permeationsverstärker und als Referenzsubstanz (10%ige wässrige Lösung) im EpiDerm[®]-Assay.

Span[®] 20

Span[®] 20 (Sorbitanmonolaurat, Charge: S32784 342) war von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und diente als chemischer Permeationsverstärker.

Diethylenglykolmonoethylether

Diethylenglykolmonoethylether (Transcutol[®], Charge: S35056 251) war von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und diente als chemischer Permeationsverstärker und Lösungsmittel in Reservoirpflastern.

2-Propanol

2-Propanol (diverse Chargen) war von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und diente als chemischer Permeationsverstärker, Lösungsmittel in Reservoirpflastern und als Prozesslösungsmittel bei der Herstellung von Matrix-Transdermalsystemen.

Polyethylenglykol 400 (PEG400)

Polyethylenglykol 400 (diverse Chargen) war von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und diente als Lösungsmittel in Reservoirpflastern und als lösungsvermittelnder Zusatz zum Akzeptormedium (20% (m/V)) in in vitro Permeationsstudien durch die exzidierte Haut der haarlosen Maus und Membrandiffusionsstudien.

Klucel[®] LF

Klucel[®] LF (Hydroxypropylcellulose, Charge: 1181) war von der Firma Hercules, Wilmington, USA und diente als Viskositätserhöher in Reservoirpflastern.

Propylenglykol

Propylenglykol (Ph. Eur. 4.00, Charge: 41325284) war von der Firma Caesar und Lorentz GmbH, Hilden, Deutschland und diente als Lösungsmittel zur Verdünnung von Azone[®], Dodecanol, N-Octylpyrrolidon und N-Dodecylpyrrolidon bei der Bestimmung des Hautirritationspotentials anhand des EpiDerm[®]-Assays.

Natriumdodecylsulfat

Natriumdodecylsulfat (Charge: 44662/1 12704069) war von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und diente als Referenzsubstanz im EpiDerm[®]-Assay.

Penaten[®] Babyshampoo

Penaten[®] Babyshampoo diente als Referenzsubstanz im EpiDerm[®]-Assay.

Triton[®] X-100

Triton[®] X-100 wurde in einer einprozentigen Lösung von MatTek (Ashland, USA; diverse Chargen) bezogen und diente als Referenzlösung im EpiDerm[®]-Assay.

5.1.1.4 Folien und Membranen

Release liner

Als Release liner (Abziehfolien) wurden ausschließlich folgende Folien verwendet: ScotchPak[®] 1022 (diverse Chargen) und Loparex[®] RT315-PCM (Charge: 04011601) wurden von den Firmen 3M Drug Delivery Systems, St. Paul, USA und Loparex Ltd., Willowbrook, USA zur Verfügung gestellt.

Backing

Als Backingmaterial (Schutzschicht) diente ausschließlich der von der Firma 3M Drug Delivery Systems, St. Paul, USA zur Verfügung gestellte CoTran[®] 9720 Polyethylenfilm (diverse Chargen).

Mikroporöse Membran

Als mikroporöse Kontrollmembran in Reservoirpflastern wurde Solupor[®] 10P05A (Charge: P040907A-01----A01) der Firma DSM Solutech, Heerlen, Niederlande verwendet. Es handelte sich hierbei um eine mikroporöse Membran aus Polyethylen mit einer Dicke von 60 µm und einer Porösität von 83%. Die mittlere Porengröße betrug 0,5 µm (Product Data Sheet Solupor[®] 10P05A, DSM Solutech, Heerlen, Niederlande).

Ethylenvinylacetatmembranen (EVA-Membranen)

Als Ethylenvinylacetatmembranen wurden die von der Firma 3M Drug Delivery Systems, St. Paul, USA zur Verfügung gestellten Membranen

CoTran[®] 9705; 76,2 µm; 9% Vinylacetat; Charge: 002 (Jul04) und

CoTran[®] 9715; 76,2 µm; 19% Vinylacetat; Charge: 002 (Aug04)

verwendet.

5.1.1.5 Lösungsmittel, Lösungsvermittler und Puffersubstanzen

Aceton

Aceton (diverse Chargen) war von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und diente als Prozesslösungsmittel bei der Herstellung von Matrixpflastern.

Dichlormethan

Dichlormethan (Charge: K32082971 325) war von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und diente als Prozesslösungsmittel bei der Herstellung von Protergurid-haltigen BioPSA[®] 7-4202- und Oppanol[®] B 15 SFN-Matrixpflastern. Dichlormethan ist toxikologisch nicht unbedenklich und wurde in der vorliegenden Arbeit aus rein experimentellen Aspekten eingesetzt.

Ethanol 96%

Ethanol 96% (diverse Chargen) war von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und diente als Prozesslösungsmittel bei der Herstellung von Eudragit[®] E 100-Matrixpflastern.

n-Hexan

n-Hexan (Charge: K31683568 305) war von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und diente als Lösungsmittel für Oppanol[®] B 15 SFN zur Herstellung von Matrixpflastern sowie zur Extraktion des Wirkstoffs zur Gehaltsbestimmung.

2-Propanol

2-Propanol (diverse Chargen) war von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und diente als chemischer Permeationsverstärker, Lösungsmittel in Reservoirpflastern und als Prozesslösungsmittel bei der Herstellung von Matrix-Transdermalsystemen.

Acetonitril

Acetonitril, gradient grade für HPLC (diverse Chargen) war von Promochem, Wesel, Deutschland und wurde zur Extraktion des Wirkstoffs aus Transdermalsystemen auf Basis von Silikon- und Acrylat-Hauthaftklebern verwendet. Ferner war es Bestandteil der Eluenten bei der analytischen Bestimmung des Arzneistoffs und der chemischen Permeationsverstärker mittels High Pressure Liquid Chromatography (HPLC).

Wasser

Es wurde ausschließlich bidestilliertes Wasser (diverse Chargen) der Firma Th. Geyer, Berlin, Deutschland verwendet. Es wurde zur Herstellung von Freisetzungsmitteln, Akzeptormitteln und als Bestandteil von HPLC-Eluenten benötigt. Ferner diente es zum Verdünnen von Testsubstanzen für den EpiDerm[®]-Assay.

Polyethylenglykol 400 (PEG400)

Polyethylenglykol 400 (diverse Chargen) war von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und diente als Lösungsmittel in Reservoirpflastern und als Zusatz zum Akzeptormedium (20% (m/V)) in Membrandiffusionsstudien und in in vitro Permeationsstudien durch die exzidierte Haut der haarlosen Maus.

2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin

(2-Hydroxypropyl)- β -Cyclodextrin war entweder von der Firma Fluka Chemie AG, Neu-Ulm, Deutschland (Charge: 375315/1 35197) oder wurde als Cawasol[®] W7 HP Pharma (Charge: 73 B008) von der Firma Wacker Chemie, Burghausen, Deutschland bezogen. Es wurde als Lösungsvermittler dem Akzeptormedium bei Membrandiffusionsstudien und bei in vitro Permeationsstudien durch die Haut der haarlosen Maus zugesetzt (2% (m/V)).

Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4

Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 (Chargen: A397373 251 und A435171 333) war von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und diente als Puffersubstanz zur pH-Adjustierung von Freisetzungsmitteln, Akzeptormitteln und der wässrigen Phase von HPLC-Eluenten.

Dinatriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$

Dinatriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ (Charge: K91571873 314) war von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und diente als Puffersubstanz zur pH-Adjustierung von Freisetzungsmitteln.

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$ (Charge: K30794680 250) war von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und diente als Puffersubstanz zur pH-Adjustierung von Akzeptormitteln und der wässrigen Phase von HPLC-Eluenten.

Phosphorsäure 85% H₃PO₄

Phosphorsäure 85% H₃PO₄ (Charge: K32534773 345) war von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und diente zur pH-Adjustierung von Freisetzungsmitteln, Akzeptormitteln und der wässrigen Phase von HPLC-Eluenten. Ferner wurde sie als Referenzsubstanz im EpiDerm[®]-Assay eingesetzt.

5.1.1.6 Exzidierte Haut der haarlosen Maus

Die exzidierte Haut der haarlosen Maus wurde von Taconic M&B, Lille Skensved, Dänemark bezogen. Es wurden ausschließlich 8 bis 9 Wochen alte, männliche Mäuse des Stammes C3.Cg/TifBomTac-hr verwendet. Die Gewinnung und weitere Vorbereitung der Haut für Permeationsstudien ist unter 5.2.1.9 beschrieben.

5.1.2 Materialien ad Kapitel 3: Aktivität von Protergurid an nicht-dopaminergen Monoaminrezeptoren

5.1.2.1 Wirkstoff

Der Wirkstoff Protergurid (Charge: F 210 703; Reinheit 100% gemäß Analysenzertifikat) wurde von Miroslav Fliieger vom Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prag synthetisiert.

5.1.2.2 Substanzen zur Herstellung von Nähr- und Pufferlösungen

Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl₂ · 2 H₂O), D-Glucose-Monohydrat, Kaliumchlorid (KCl), Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄), Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl₂ · 6 H₂O), Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO₄ · 7 H₂O), Natriumchlorid (NaCl), Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (NaH₂PO₄ · 2 H₂O) und Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃) waren von Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland. Die verwendeten Nährmedien wurden mit demineralisiertem Wasser hergestellt und während der Experimente permanent

mit O₂ / CO₂ (95% / 5%) gesättigt. Sie wiesen bei 37 °C einen pH-Wert von ca. 7,4 auf. In Tabelle 30 sind die Zusammensetzungen der einzelnen Medien zusammengefasst.

Tabelle 30: Zusammensetzungen der einzelnen Medien, welche bei Experimenten an isolierten Organen Verwendung fanden. Alle Angaben sind Konzentrationsangaben in mM.

	Modifizierte Krebs-Henseleit (Lösung A)	Modifizierte Krebs-Henseleit (Lösung B)	Modifizierte Krebs-Henseleit (Lösung C)	Tyrode
NaCl	118,07	118,07	118,07	137,00
KCl	4,70	4,70	4,70	2,70
NaHCO ₃	25,00	25,00	25,00	11,90
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	0	0	0	0,40
KH ₂ PO ₄	1,20	1,20	1,20	0
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	2,50	1,60	1,25	1,80
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0	0	0	1,00
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,20	1,20	1,20	0,90
D-Glucose · H ₂ O	10,00	10,00	10,00	5,00

5.1.2.3 Weitere Substanzen

5-Methyl-1-(3-pyridylcarbamoyl)-1,2,3,5-tetrahydropyrrolo[2,3-f]indolhydrochlorid (SB 206553), Bradykinintriacetat, Chlorethylclonidindihydrochlorid, Corticosteron, Idazoxanhydrochlorid, Indomethacin, (±)-Propranololhydrochlorid, Prazosinhydrochlorid und Yohimbinhydrochlorid waren von Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland. Dinoprosttromethamin (Prostaglandin F_{2α}) war von Upjohn, Kalamazoo, USA. 5-Hydroxytryptamincreatininsulfat und Ketanserintartrat waren von Janssen-Cilag, Beerse, Belgien. Methysergidhydrogenmaleat war von Novartis, Basel, Schweiz. 6-(Methyl-1-(1-methylethyl)-ergolin-8β-carbonsäure-2-hydroxy-1-methylpropylester-maleat (LY 53857) war von Eli Lilly, Indianapolis, USA. L-Ascorbinsäure, Atropinsulfat, Cocainhydrochlorid, Histamindihydrochlorid und Noradrenalinbitartrat waren von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland. (±)-1,3,5-Trimethyl-6-[(3-{4-[(2,3-dihydro-2-hydroxymethyl)-1,4-benzodioxin-5-yl]-1-piperazinyl}-propyl)amino]-2,4-(1H,3H)-pyrimidindion (B8805-033) war von Altana, Bad Homburg, Deutschland.

5.1.2.4 Tiere

Männliche Wistarratten (*Rattus norvegicus*, 280 bis 420 g) und männliche Dunkin-Harley-Meerschweinchen (*Cavia porcellus*, 250 bis 450 g) wurden von DIMED Schönewalde GmbH, Deutschland bezogen. Die Tiere wurden in einem klimatisierten Tierstall bei 19 bis 25°C und etwa 60% Luftfeuchte getrennt nach Spezies gehalten. Sie erhielten Trinkwasser und ein Standardfutter ad libitum. Die Tötung der Meerschweinchen erfolgte durch Genickbruch mittels Nackenschlag. Nach Entbluten wurde die Milz (Spleen) entnommen. Wistarratten wurden mit Kohlenstoffdioxid (CO₂) betäubt und anschließend dekapitiert. Nach Entbluten wurden die thorakale Aorta (Aorta thoracalis) sowie die ventrale Schwanzarterie (Arteria caudalis) entnommen. Isolierte Herzen und Lungen von Schweinen (*Sus scrofa*, 100 bis 120 kg, Alter mindestens 6 Monate) wurden von der Lehr- und Versuchsanstalt Teltow-Ruhlsdorf, Deutschland bezogen. Die Lieferung erfolgte in mit O₂ / CO₂ (95% / 5%) gesättigter und mit Eis gekühlter Krebs-Henseleit-Lösung.

5.2 Methoden

5.2.1 Methoden ad Kapitel 2: Transdermale Applikation von Protergurid

5.2.1.1 Herstellung von Matrix-Transdermalsystemen

Die Herstellung von Matrix-Transdermalsystemen erfolgte als ein kontinuierliches Laminat mit Hilfe eines speziellen Laborcoaters (Check-Tec, Braunschweig, Deutschland), welcher in Abbildung 61 dargestellt ist. Im ersten Schritt wurde Protergurid, und gegebenenfalls PVP und / oder der chemische Permeationsverstärker in einer Mischung aus Aceton und 2-Propanol im Falle von Acrylatpflastern, bzw. in Dichlormethan im Falle von Silikon- oder Polyisobutylenpflastern, gelöst. In einem separaten Gefäß wurde die Polymerlösung angesetzt. Der weichharzige Polyisobutylenklebstoff Oppanol[®] B 15 SFN wurde unter mehrstündigem Rühren in n-Hexan gelöst. Das in Form eines Granulates vorliegende Eudragit[®] E 100 wurde zu einer Mischung aus Aceton / Ethanol / 2-Propanol (60 / 33,4 / 6,6), in welcher die Bernsteinsäure eine halbe Stunde vorsuspendiert wurde, in kleinen Portionen zugegeben und unter permanentem Rühren gelöst. Anschließend wurde Dibutylsebacat

zugegeben. Die Zusammensetzung des Feststoffanteils in der fertigen Klebstofflösung war wie folgt: Eudragit[®] E 100: 65%; Dibutylsebacat 29,2%; Bernsteinsäure 5,8%. Die bereits in Ethylacetat gelösten Hauthaftkleber BioPSA[®] 7-4202 und Gelva[®] 7883 wurden in der benötigten Menge abgewogen und durch Rühren homogenisiert. In einem folgenden Schritt wurde die Arzneistofflösung unter Rühren der Polymerlösung zugeführt. Nach Einstellen mit einem Prozesslösemittel auf eine für die Herstellung geeignete Viskosität wurde der Ansatz für weitere 45 Minuten mit Hilfe eines Magnetrührkerns gerührt. Das Gefäß wurde stets mit Parafilm[®] M (Pechiney Plastic Packaging, Neenah, USA) zur Vermeidung von Lösungsmittelverdunstung verschlossen. Nach der 45minütigen Homogenisierungsperiode wurde eine Probe der fertigen Klebstofflösung („Wetmix“) entnommen, auf einen Objektträger gegeben und anschließend polarisationsmikroskopisch auf Wirkstoffkristalle untersucht. Wurden Kristalle beobachtet, so wurde der Polymerlösung eine geringe Menge eines Prozesslösemittels zugegeben und nach einer erneuten Homogenisierungsphase von mindestens 15 Minuten wurde eine neue Probe mit Hilfe des Polarisationsmikroskopes untersucht. Sobald keine Kristalle identifiziert werden konnten, wurde der „Wetmix“ für die weitere Herstellung der Transdermalsysteme eingesetzt.

Der verwendete, computergesteuerte Laborcoater führte die folgenden Schritte durch: Aufbringen des „Wetmixes“ mit definierter Schichtdicke auf den Release liner, Trocknen des Filmes durch die zwei separat steuerbaren, ausreichend belüfteten Öfen und Laminieren des getrockneten Films mit der Backingmembran. Die Transportgeschwindigkeit wurde prinzipiell auf 0,1 m/min festgesetzt. Die gewählten Trocknungstemperaturen waren abhängig von der Art und Menge der Lösungsmittel und der verwendeten Beschichtungsdicke und lagen üblicherweise zwischen 36 °C und 40 °C für den ersten Ofen, um die Bildung von Blasen in der Matrix zu vermeiden und zwischen 74 °C und 80 °C für den zweiten Ofen. Während des kontinuierlichen Laminierungsprozesses wurden aus dem fertigen Laminat mittels Henkellocheisen (Durchmesser: 3,6 cm) Proben ausgestanzt und nach Entfernen des Release liners gewogen. Das mittlere Gewicht einer 3,6 cm im Durchmesser großen Probe der verwendeten Charge der Backingmembran (Mittelwert aus n = 10) wurde von dem Probengewicht subtrahiert, um das reine Gewicht der Matrix zu erhalten. Gegebenenfalls wurde die Rakelhöhe adjustiert, um das angestrebte Matrixgewicht von etwa 50 mg pro 10 cm² Matrix zu erzielen. Gängige Rakelhöhen lagen in dem Bereich von 175 bis 300 µm. Das verwendete Herstellungsverfahren gewährleistete Matrices mit Homogenität in Masse und Wirkstoffgehalt. Von jeder Formulierung wurde eine ausreichende Menge für

nachfolgende Untersuchungen wie in vitro Freisetzung, polarisationsmikroskopische Untersuchungen nach Lagerung unter definierten Bedingungen, Gleichförmigkeit von Masse und Gehalt und insbesondere in vitro Hautpermeation des Wirkstoffs hergestellt. Alle verwendeten Formulierungen wurden unmittelbar nach der Herstellung polarisationsmikroskopisch auf Kristalle untersucht.

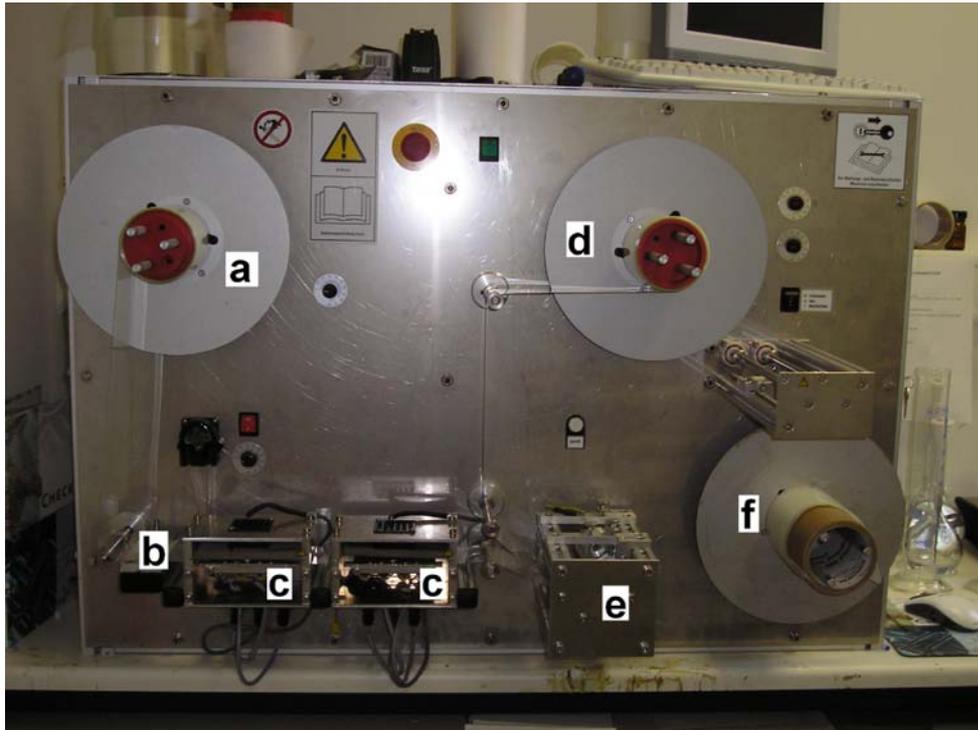


Abbildung 61: Darstellung des für die Herstellung von Matrix-Transdermalsystemen verwendeten Laborcoaters. a) Haspel für Release liner, b) Rake mit Vorrat an „Wetmix“, c) Ofen, d) Haspel für Backingmembran, e) Transport- und Laminierungseinheit, f) Haspel zur Aufspulung des fertigen Laminats.

5.2.1.2 Herstellung von Reservoir-Transdermalsystemen

Die Herstellung wurde nach dem von Jain et al. (2003) beschriebenen Verfahren hergestellt, welches jedoch leicht modifiziert wurde. Als Adhesivschicht für Reservoirpflaster diente eine Schicht des BioPSA[®] 7-4202-Silikonklebers mit einem Gewicht von 37,9 (2,6) mg/10,2 cm², welche mit Hilfe des Laborcoaters zwischen zwei Release linern hergestellt wurde. Der Silikon-Haushaftkleber wurde ausgewählt, da er bei Anwendung in Matrixpflastern gute Hautadhäsion, gute Hautverträglichkeit sowie hohe transdermale Flüsse von Protergurid

ermöglichte. Da bei Reservoirsystemen der Arzneistoff primär im Reservoir und nicht in der Adhesivschicht vorliegt, wurden die Stabilitätsdaten aus den polarisationsmikroskopischen Untersuchungen der Matrix-Transdermalsysteme bei der Auswahl des Klebers nicht berücksichtigt. In einem separaten Herstellungsschritt wurde ein Metallzylinder (Fläche 1 cm²) auf der Backingmembran positioniert und mit Hilfe einer Spritze eine Klebenut von Oppanol[®] B 15 SFN (gelöst in n-Hexan) um diesen Metallzylinder gefertigt. Das Lösungsmittel wurde in einem Trockenschrank bei 40 °C über drei Tage abgezogen und die Metallzylinder entfernt. Im nächsten Schritt wurde ein Releaseliner der Adhesivschicht entfernt und per Hand mit der gewünschten Kontrollmembran laminiert. Das Refugium aus Backingmembran und Oppanol[®]-Klebenut wurde schließlich mit der Kontrollmembran durch leichtes Andrücken verbunden. Mit einer Mikroliterspritze mit aufgesetzter Kanüle wurden 50 µL der Reservoirlösung durch die Backingmembran in das entstandene, exakt 1 cm² große Reservoir eingeführt und die Einstichstelle mit handelsüblichem, lösungsmittelbeständigem Klebeband verschlossen. Die so erhaltenen Reservoir-Transdermalsysteme wurden für mindestens 72 Stunden bei Raumtemperatur gelagert, um eine Äquilibration und Umverteilung des Arzneistoffs vom Reservoir in die Kontrollmembran und die Adhesivschicht zu gewährleisten. Der sehr lipophile Polyisobutylenkleber wurde zur Bildung des Reservoirs gewählt, da dieser mit polaren organischen Lösungsmitteln inkompatibel ist und ferner nahezu keine Lösungseigenschaften für Protergurid zeigte. Die Reservoirlösungen wurden durch Einwiegen der Feststoffe in einen Messkolben und Auffüllen bis zur Marke mit dem entsprechenden Lösungsmittel hergestellt, so dass auf eine Gehaltsbestimmung sowohl der Reservoirlösung als auch der volumetrisch beschickten Reservoirpflaster verzichtet werden konnte. Abbildung 62 gibt einen schematischen Überblick über den Ablauf des Herstellungsprozesses der Reservoirsysteme.

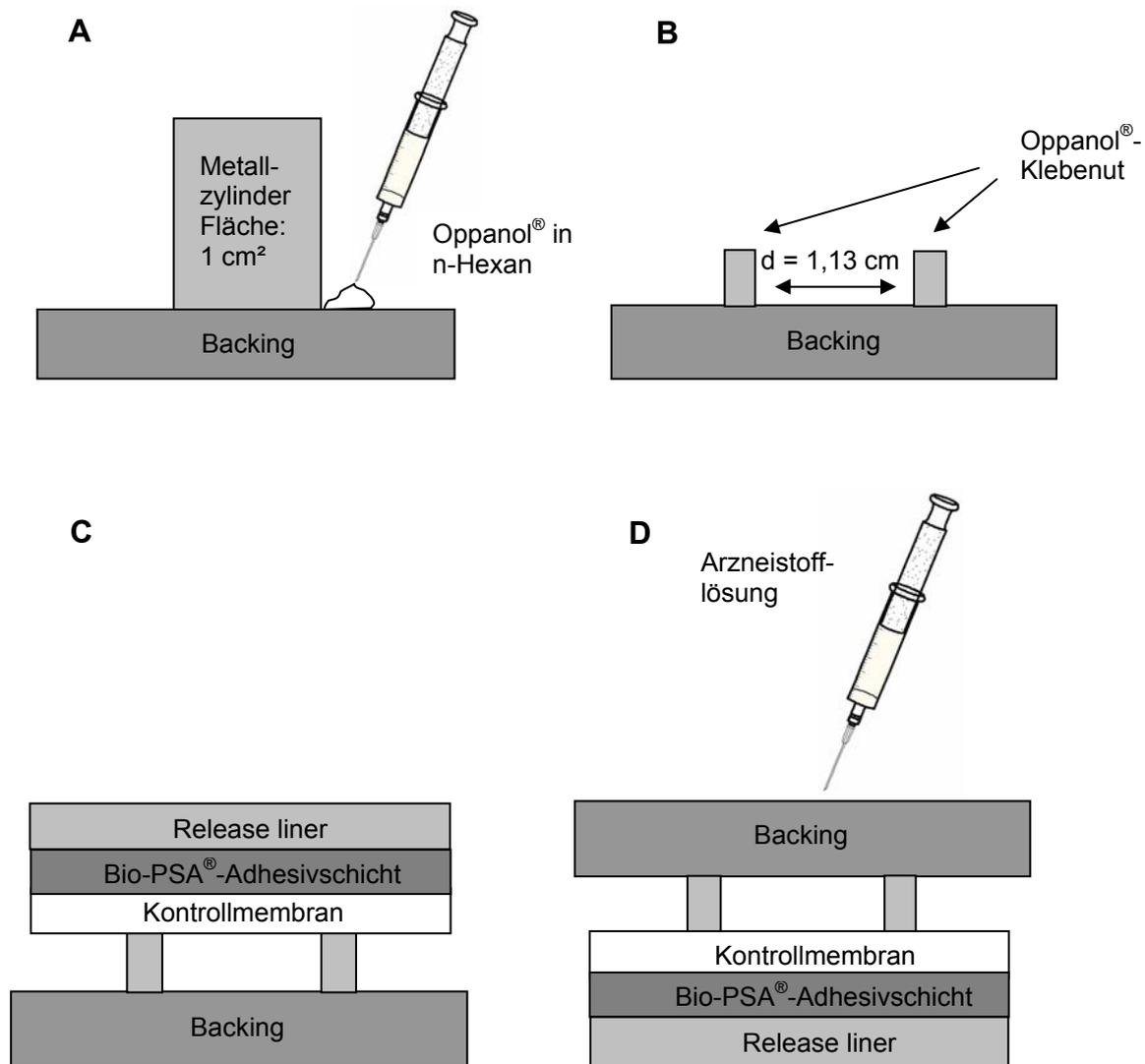


Abbildung 62: Schematische Darstellung der Herstellung der Reservoir-Transdermalsysteme (nicht-maßstabgetreue Skizze). A: Fertigung der Klebenut; B: Entfernen des Metallzylinders; C: Kaschieren der Klebenut mit einem Laminat aus Kontrollmembran, Bio-PSA[®]-Adhesivschicht und Release liner. D: Injektion der Arzneistofflösung durch die Backingmembran in das geformte Reservoir.

5.2.1.3 Gleichförmigkeit des Matrixgewichtes

Aus jeder Matrix-Formulierung wurden $n = 6$ Pflaster mit einem Henkellocheisen (Durchmesser: $3,6 \text{ cm}$) ausgestanzt. Nach Entfernen des Release liners wurde das Backing-Matrix-Laminat gewogen und das mittlere Gewicht (Mittelwert aus $n = 10$) einer gleich großen Probe der Backingmembran subtrahiert. Die so bestimmten, durchschnittlichen Matrixgewichte wurden mit der zugehörigen Standardabweichung zu jeder Formulierung angegeben.

5.2.1.4 Gleichförmigkeit des Gehaltes bei Matrix-Transdermalsystemen

Die Gehaltsbestimmung von Protergurid und gegebenenfalls von chemischen Permeationsverstärkern in Matrix-Transdermalsystemen (10,2 cm²) erfolgte mittels HPLC-analytischer Verfahren. Pflaster auf Basis von BioPSA[®], Eudragit[®] und Gelva[®] wurden nach Entfernen des Release liners gewogen, in ein Becherglas (100 mL) überführt, mit etwa 40 mL Acetonitril überschichtet und anschließend 40 Minuten im Ultraschallbad (Sonorex Super RK 106, Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland) extrahiert. Die Bechergläser wurden mit Parafilm[®] nach oben hin verschlossen. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Lösungen in einen 50 mL-Messkolben überführt und bis zur Marke mit Acetonitril aufgefüllt. Diese Lösungen wurden ohne vorhergehende Weiterbehandlung mittels HPLC auf den Gehalt der entsprechenden Verbindung analysiert. Galt es den Gehalt des chemischen Permeationverstärkers N-Methylpyrrolidon zu bestimmen, so wurde als Extraktionsmittel 97,5% Phosphatpuffer pH 3, 20 mM / 2,5% Acetonitril (V/V), gradient grade verwendet. Voruntersuchungen zeigten, dass die Extraktion quantitativ verlief. Pflaster auf Basis des Oppanol[®]-Hauthaftklebers wurden hingegen mit etwa 40 mL n-Hexan extrahiert. Die zu 50 mL mit n-Hexan aliquotierten Extrakte wurden anschließend dreimal mit 15 mL Acetonitril ausgeschüttelt. Die Acetonitrilfraktionen wurden in einem 50 mL-Messkolben gesammelt und zur Marke mit Acetonitril aufgefüllt und anschließend via HPLC auf den Gehalt von Protergurid untersucht. In allen Bestimmungen wurde eine gute Korrelation mit dem aus den Einwaagen berechneten Gehalt gefunden.

Auf eine Gehaltsbestimmung der Permeationsverstärker Dodecanol, Laurinsäure, Span[®] 20 und Tween[®] 20 in Matrix-Transdermalsystemen, welche spektralphotometrisch mittels HPLC nicht detektiert werden konnten, konnte verzichtet werden. Eine nennenswerte Reduzierung des Gehaltes an Dodecanol und Laurinsäure während des Trocknungsprozesses bei der Herstellung der Pflaster konnte aufgrund der Siedepunkte von > 250 °C praktisch ausgeschlossen werden. Wurden Span[®] 20 oder Tween[®] 20 eingesetzt, so wurde der Berechnung des Ansatzes ein Überschuss von 20% des Permeationsverstärkers zugrunde gelegt, um den angestrebten Gehalt von 5% nach Trockung im Transdermalsystem sicherzustellen.

5.2.1.5 Polarisationsmikroskopische Untersuchungen

Für die Identifizierung von Kristallen in Matrix-Transdermalsystemen wurde die Polarisationsmikroskopie als Methode der Wahl beschrieben (Lipp und Müller-Fahrnow, 1999). Matrix-Transdermalsysteme (10,2 cm²) wurden vom Release liner befreit und auf ein Deckglas (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) geklebt. Die Untersuchung erfolgte routinemäßig mit einem Motic PM-2805 Polarisationsmikroskop (Motic Microscopes, Wetzlar, Deutschland) direkt durch das Deckglas, um das Fokussieren der Pflastermatrix zu erleichtern. Jeweils drei Transdermalsysteme pro Formulierung wurden komplett nach Kristallen unmittelbar nach der Herstellung und gegebenenfalls nach Lagerung abgesucht. Sollte der „Wetmix“ untersucht werden, wurde eine Probe zwischen Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) und Deckglas gegeben. Proben von ausgewählten Formulierungen wurden eingesiegelt in Beuteln aus Aluminiumverbundfolie entweder bei Raumtemperatur (Temperatur 18 bis 25°C gemäß Temperaturüberwachung) oder bei 40 °C in einem Trockenschrank (Memmert UM 300, Memmert, Schwabach, Deutschland) über ein definiertes Zeitintervall gelagert und anschließend erneut polarisationsmikroskopisch nach Kristallen untersucht. Die Fotodokumentation erfolgte mit einem computergestützten Leitz Laborlux S Mikroskop (Leitz, Bensheim, Deutschland), welches mit einer Digitalkamera (JVC Colorvideokamera TK-C1381, JVC, Friedberg, Deutschland) und Leica Qwin Standard Software V2.3 (Leica Microsystems Imaging solutions, Bensheim, Deutschland) ausgestattet war und wurde bei der Schering AG, Berlin, Deutschland in der Abteilung Drug Delivery Systems durchgeführt.

5.2.1.6 Beurteilung der Klebeeigenschaften und der Hautverträglichkeit in vivo

Zur Abschätzung der Hautadhäsion und der Hautverträglichkeit wurden Placebopflaster auf Basis der untersuchten Hauthaftkleber mit einem mittleren Matrixgewicht von etwa 50 mg/10 cm² hergestellt und für 24 Stunden auf den inneren Unterarm von vier Probanden appliziert. Die Bewertung erfolgte jeweils auf einer Skala von 1 (mangelhafte Hautadhäsion bzw. mangelhafte Hautverträglichkeit) bis 5 (sehr gute Hautadhäsion bzw. sehr gute Hautverträglichkeit).

5.2.1.7 pH-Messungen

Die Bestimmung und Überprüfung des pH-Wertes von Akzeptor- und Freisetzungsmitteln sowie von wässrigen Phasen der Eluenten für HPLC-analytische Arbeiten wurden mit einem Knick Labor-pH-Meter 766 mit einer Knick-pH-Einstabmesskette Typ SE 100 (Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co, Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die pH-Messungen von Pflastermatrizes erfolgte mit einem WTW inoLab pH720 pH-Meter mit einer Sentix Sur-Elektrode (WTW GmbH, Weilheim, Deutschland).

5.2.1.8 In vitro Dissolutionstest (disk assembly method)

Zur Untersuchung des in vitro Freisetungsverhaltens von Protergurid aus Matrix-Transdermalsystemen (n = 6) wurde die „disk assembly“-Methode (Ph. Eur. 5, 5. Auflage, Volume 1, S. 231) herangezogen. Runde Transdermalssysteme von 10,2 cm² Größe wurden mit der Backingmembran mit BioPSA[®] 7-4202-Silikonkleber auf Edelstahlscheiben (Durchmesser 4,1 cm; Dicke: 0,4 cm; Spezialanfertigung der Firma Check-Tec, Braunschweig, Deutschland) geklebt. Nach Entfernen des Release liners wurden die Edelstahlscheiben in die Freisetzungsvessels eingeführt, so dass die nach oben gerichtete Matrixoberfläche einen Abstand von 2,5 cm zu dem Rührer aufwies. Der Freisetzungstest wurde in 900 mL eines 0,1 M Phosphatpuffers pH 5,5 (Ph. Eur. 5, 5. Auflage, Volume 1, S. 431) bei 32 °C in einem Erweka DT6 Dissolutionstester (Erweka, Heusenstamm, Deutschland) durchgeführt (n = 6). Diese Bedingungen reflektieren bezüglich pH-Wert und Temperatur am besten den physiologischen Zustand der Haut (Siewert et al., 2003). Die Rührgeschwindigkeit betrug 100 Umdrehungen pro Minute. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben von 1 mL zur Gehaltsbestimmung mittels HPLC entnommen. Das entnommene Probenvolumen wurde durch frisches Freisetzungsmitteln ersetzt und die damit einhergehende Verdünnung bei der Berechnung der freigesetzten Wirkstoffmengen berücksichtigt.

5.2.1.9 In vitro Permeationsstudien mit exzidierter Haut der haarlosen Maus und Diffusionsstudien durch synthetische Membranen

Die Handhabung und Vorbereitung der exzidierten Haut der haarlosen Maus geschah wie folgt. Nach Tötung der Maus wurde die Haut vorsichtig exzidiert und 40 Minuten bei Raumtemperatur in einem Druckverschlussbeutel aus Polyethylen, welcher mit 10 mL einer 10%igen Lösung von Glycerol als kryoprotektives Agens in isotonischer Kochsalzlösung beschickt war, inkubiert. Anschließend wurden die Druckverschlussbeutel tiefgefroren und auf Trockeneis binnen 24 Stunden von Taconic M&B (Lille Skensved, Dänemark) geliefert. Die Aufbewahrung erfolgte bei $< -4\text{ °C}$ in einem handelsüblichen Gefrierschrank. Vor der Verwendung wurde die Haut in dem Druckverschlussbeutel in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, anschließend entnommen und in ein 500 mL-Becherglas überführt. Im weiteren Vorbereitungsprozess wurde die Haut dreimal für zwei bis drei Minuten mit jeweils 100 mL bidestilliertem Wasser mit einer Temperatur von 37 °C sanft geschwenkt und danach in eine Petrischale überführt und erneut mit ausreichend bidestilliertem Wasser (37 °C) abgespült, um das Glycerol vollständig zu entfernen. Dieses Verfahren wurde von Babu et al. (2002) als geeignet zur Lagerung von exzidierten Rattenhaut beschrieben, wobei der Restgehalt an Glycerol weniger als 0,005% betrug. Das anhaftende subcutane Fettgewebe wurde vorsichtig mit einer Gewebepinzette entfernt und die Haut mittels Skalpell in ausreichend dimensionierte Hautfelder geteilt. Um eine Äquilibration des Gewebes an die Umgebung zu ermöglichen, wurde die Haut eine Stunde ruhen gelassen.

Zur Untersuchung der Hautpermeation von Protergurid in vitro aus Transdermalsystemen wurden diese auf die einzelnen Hautfelder (auf das Stratum corneum) mit leichtem Druck aufgebracht und in statische Franz-Diffusionszellen (Permeagor, Bethlehem, USA) eingebracht. Die aus Klarglas bestehenden und mit einem Wassermantel versehenen Diffusionszellen wiesen eine Permeationsfläche von 1 cm^2 und ein Akzeptorvolumen von 8 mL auf und wurden mit einem zirkulierenden Wasserbad (Julabo Einhängethermostat Modell EC, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland) auf 38 °C (entsprechend 32 °C an der Diffusionsfläche) temperiert. Mit einem Magnetrührkern wurde das Akzeptormedium konstant bei 500 Umdrehungen pro Minute gerührt (Variomag Telesystem 06.20, H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim, Deutschland). Sollten Flüssigformulierungen auf Hautpermeation oder Membrandiffusion getestet werden, wurde zuerst die Modellmembran (Haut oder Kontrollmembran) zwischen Donor- und Akzeptorkompartiment

eingelegt und anschließend das entsprechende Volumen der Flüssigformulierung (50 μL im Falle von *in vitro* Hautpermeation; 1,5 mL im Falle von Membrandiffusion) mit einer Eppendorfpipette in das Donorkompartiment zugegeben. In diesem Fall wurde das Donorkompartiment mit Parafilm[®] M nach außen hin verschlossen, um die Verdunstung des Lösungsmittels zu minimieren. Permeationsexperimente wurden mit einer Matrix-Kontrollformulierung zu $t = 0$ d, $t = 21$ d und $t = 49$ d durchgeführt und ergaben keine signifikanten Änderungen des steady state Flusses von Protergurid.

Als Akzeptormedium diente ausschließlich eine auf pH 7,4 phosphatgepufferte Lösung mit einem Zusatz von 20% (m/V) Polyethylenglykol 400 und 2% (m/V) 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin. Die Löslichkeit von Protergurid betrug > 32 mg/100 mL und gewährleistete somit selbst bei hoher Wirkstoffpermeation über 48 Stunden „perfect sink“-Bedingungen. Polyethylenglykol 400 wird in Akzeptormedien bei Hautpermeationsstudien in Konzentrationen bis zu über 40% und 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin bis zu 5% eingesetzt. 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin selbst besitzt keine permeationsverstärkenden Eigenschaften und ist nicht in der Lage, in das Hautgewebe zu penetrieren (Shaker et al., 2003). Um die Konzentrationen der lösungsvermittelnden Zusätze im Akzeptormedium möglichst gering zu halten, wurden im Vorfeld verschiedene potentielle Akzeptormedien auf ihr Lösungsvermögen von Protergurid untersucht. Die beschriebene Zusammensetzung erschien am geeignetsten und wurde sowohl für Permeationsstudien durch die exzidierte Haut der haarlosen Maus als auch für Diffusionsexperimente durch Kontrollmembranen eingesetzt. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben von 500 μL mittels Mikroliterspritzen entnommen und unverzüglich durch frisches, auf 37 °C vorgewärmtes Akzeptormedium ersetzt. Diese Verdünnung wurde bei der Berechnung der Permeationsprofile und -parameter berücksichtigt. Die Bestimmung des Gehaltes an Protergurid und chemischen Permeationsverstärkern erfolgte ohne weitere Probenvorbereitung mittels HPLC.

Das verwendete Permeationsmodell erwies sich im Verlauf der Studien als sehr gut geeignet, sowohl um Unterschiede im Freisetzungsverhalten von Formulierungen zu erkennen als auch um reproduzierbare Flüsse bei Versuchswiederholungen mit der gleichen Formulierung zu erzielen. Demnach war es möglich, anhand der an diesem Modell ermittelten Daten das gewünschte Ranking der Formulierungen nach freigesetztem Arzneistoff zu erstellen (siehe auch Kapitel 1.2.3). Sollte Haut ohne Stratum corneum verwendet werden, so wurde dieses

durch etwa 15maliges Aufdrücken und abruptes Wiederabziehen handelsüblicher Klebestreifen (TesaFilm[®], tesa AG, Hamburg, Deutschland) entfernt.

5.2.1.10 Bestimmung des Hautirritationspotentials mittels EpiDerm[®]-Modell

Die Bestimmung und Einschätzung des Hautirritationspotentials ausgewählter Substanzen und deren Verdünnungen erfolgten mit Hilfe des EpiDerm[®]-Modells (Epi-200, MatTek Corporation, Ashland, USA). Bei dem EpiDerm[®]-Modell handelt es sich um ein dreidimensionales, rekonstruiertes Hautmodell auf Basis humaner Keratinozyten (EpiDerm[®]-Produktinformation, 2003). Diese sind zu einer hochdifferenzierten Epidermismembran kultiviert und weisen alle wichtigen Hautschichten nativer Epidermis auf (Ponec et al., 2003). Die Detektion des Irritationsausmaßes erfolgte mittels MTT-Assay. Der erfasste Parameter war der Zeitpunkt nach Exposition des Gewebes zu der Testsubstanz, an welchem die Vitalität des Gewebes auf 50% bezogen auf den Ausgangswert reduziert war (ET-50-Wert). Das Prinzip basiert auf einer Reduktion von MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durch die Mitochondrien lebender Zellen zu einem blau gefärbten Formazan (Abbildung 63), welches spektralphotometrisch quantifiziert wurde.

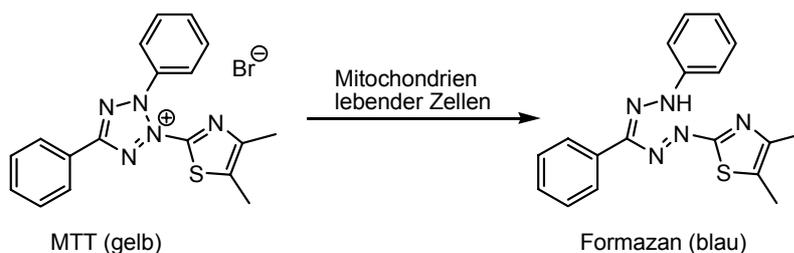


Abbildung 63: Schematischer Ablauf der Farbreaktion des MTT-Assays.

Die Durchführung des Assays erfolgte nach dem Versuchsprotokoll der Firma MatTek (MTT ET-50 Protocol, Stand 19.02.2004, MatTek Corporation, Ashland, USA) und ist im folgenden in den wichtigsten Schritten wiedergegeben. Zu Beginn wurden die Gewebeinserts in 6er-Titerplatten mit 0,9 mL Assaymedium im Brutschrank (Mini Galaxy E CO₂ Incubator Modell No. 050-600, RS Biotech Laboratory Equipment Ltd., Irvine, Schottland) bei 37 °C, 5% CO₂

und 95% relativer Feuchte für eine Stunde inkubiert. Nachfolgend wurde das Assaymedium ersetzt und jede Testsubstanz (100 µL) auf sechs Hautproben appliziert. Die Inkubation erfolgte für 2, 5 und 18 Stunden (je n=2) im Brutschrank. Nach Ablauf der Inkubationsperiode wurden die entsprechenden Testfelder entnommen, mit ausreichend isotonischem Phosphatpuffer (MatTek Corporation, Ashland, USA) gespült, um die Testsubstanzen zu entfernen, und in ein neues, mit je 300 µL MTT-Lösung (MatTek Corporation, Ashland, USA) pro Feld beschickte 24er-Titerplatte überführt. Nach Ablauf einer dreistündigen Inkubation im Brutschrank wurden die einzelnen Gewebeinserts auf Filterpapier abgetupft und in eine neue 24er-Titerplatte überführt. Die einzelnen Testfelder wurden mit 2,0 mL Extraktionslösung versehen und bei Raumtemperatur im Dunkeln für mindestens drei Stunden extrahiert. Nach Abarbeitung aller Proben wurden die Gewebeinserts verworfen und die erhaltenen Lösungen bei 570 nm und 650 nm spektralphotometrisch gegen das reine Extraktionsmedium vermessen (Photometer 5010, Robert Riele GmbH und Co KG, Berlin, Deutschland). An jeder Charge EpiDerm[®] wurden stets mindestens zwei Inserts nicht mit Testsubstanzen beschickt und analog den 5-Stunden-Expositionsproben behandelt. Diese fungierten als Referenz zur Ermittlung der 100%-Vitalität des Gewebes. Zusätzlich wurden 100 µL einer 1%igen Triton[®] X-100 Lösung für drei und sieben Stunden Exposition (je n = 2 Hautfelder) getestet und der berechnete ET-50-Wert mit dem von MatTek an der gleichen Charge EpiDerm[®] bestimmten Wert verglichen. Der ET-50-Wert der 1%igen Triton[®] X-100 Lösung lag in allen Fällen im geforderten Intervall von 3,7 bis 7 Stunden. Die Berechnung der Gewebevitalität zu den einzelnen Zeitpunkten der einzelnen Testsubstanzen erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\%Vitalität = 100 \cdot \frac{A_{(T)}}{A_{(B)}} \quad (8)$$

mit:

$A_{(T)}$ Absorption der Testprobe bei 570 nm minus Absorption der Testprobe bei 650 nm

$A_{(B)}$ Absorption der nicht dosierten Blindprobe bei 570 nm minus Absorption der nicht dosierten Blindprobe bei 650 nm.

Der ET-50-Wert wurde im nachfolgenden durch eine Regressionsanalyse aus einer Darstellung der Vitalität des Gewebes in % gegen den Logarithmus der Expositionszeit des Gewebes zu der jeweiligen Testsubstanz in Stunden bestimmt (Abbildung 64). Jeder chemische Permeationsverstärker wurde pur und als 10%ige Lösung an zwei Chargen EpiDerm[®] unter aseptischen Bedingungen getestet. Die an den einzelnen Chargen ermittelten ET-50-Werte wiesen gute bis sehr gute Übereinstimmungen auf (Abweichung in der Regel kleiner 10%), wobei eine maximale Abweichung von 25% toleriert wurde. Anhand der ermittelten ET-50-Werte wurden die Hautirritationspotentiale mittels eines Bewertungsregimes klassifiziert (siehe Tabelle 12 in Kapitel 2.5.3).

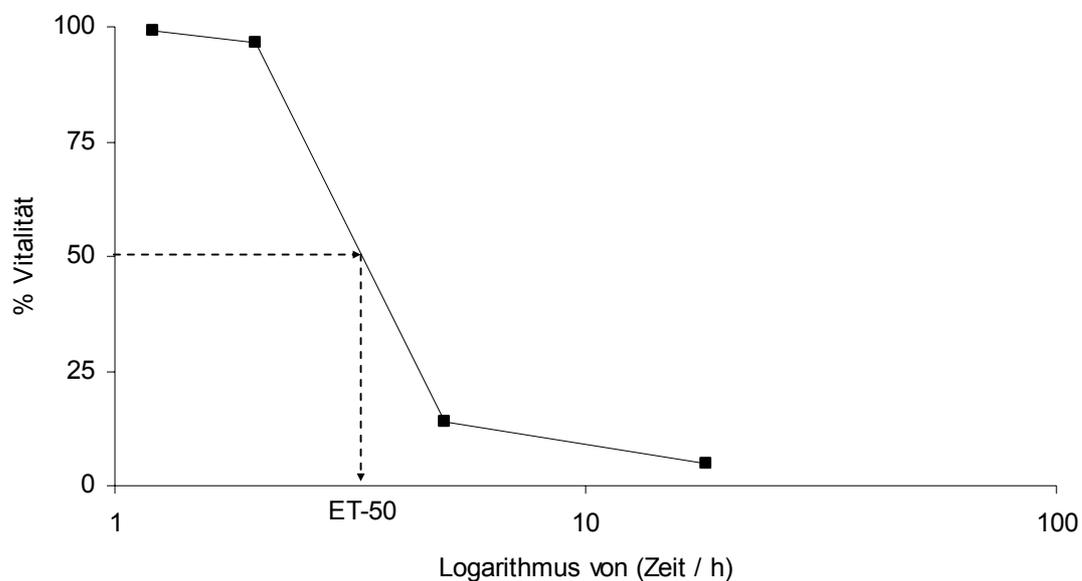


Abbildung 64: Darstellung einer typischen Abhängigkeit der Gewebevitalität von dem Logarithmus der Expositionsdauer in Stunden zu der Testsubstanz.

5.2.1.11 Bestimmung von Löslichkeit und pK_s -Wert

Die (annähernde) Bestimmung der Löslichkeit von Protergurid in unterschiedlichen Lösungsmitteln erfolgte durch Zugabe eines Überschusses des Arzneistoffs zu dem Lösungsmedium. Mittels Rührfisch und Magnetrührer wurde für mindestens 24 Stunden unter Lichtausschluss gerührt und anschließend für weitere 24 Stunden die Suspension ruhen

gelassen, um Übersättigungserscheinungen auszuschließen. Das Gefäß wurde stets mit Parafilm[®] M zur Minimierung von Lösungsmittelverdunstung verschlossen. Die überstehende Lösung wurde, gegebenenfalls nach entsprechender Verdünnung, mittels HPLC auf den Gehalt an Protergurid analysiert.

Die Bestimmung des pK_s -Wertes erfolgte nach der Methode von Zimmermann (1983) über die Löslichkeiten des Arzneistoffs im wässrigen Medium bei verschiedenen pH-Werten. Bei Darstellung der Sättigungslöslichkeit gegen die Konzentration an Oxoniumionen (Abbildung 65) folgt bei basischen Substanzen eine Gerade, deren Funktion die Berechnung des pK_s -Wertes einer Base ermöglicht nach:

$$pK_s = \lg(m) - \lg(n) \quad (9)$$

mit:

m Steigung und

n Schnittpunkt mit der y-Achse.

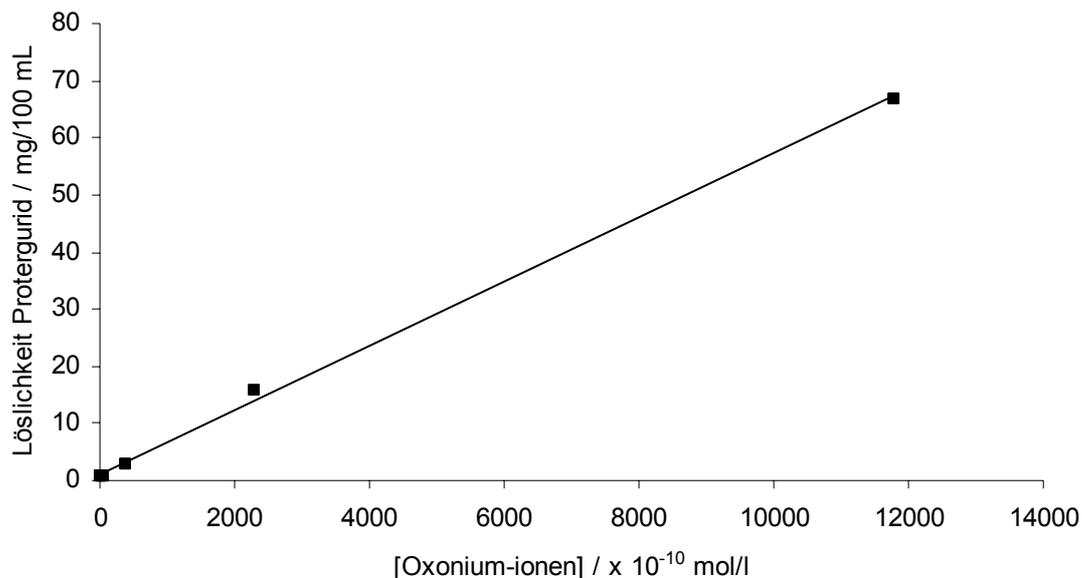


Abbildung 65: Darstellung der Löslichkeit von Protergurid in phosphatgepufferter, wässriger Lösung in Abhängigkeit von der Konzentration an Oxoniumionen (10^{-pH}). Dargestellt ist die Regressionsgerade ($R = 0,9993$) durch sechs Datenpunkte (pH: 5,93; 6,64; 7,40; 8,26; 8,66; 9,16).

5.2.1.12 Bestimmung des Schmelzpunktes

Die Bestimmung des Kapillarschmelzpunktes von Protergurid erfolgte mit Hilfe eines Apotec Schmelzpunktbestimmers RS (WEPA, Hillscheid, Deutschland) und betrug 114,4 (0,1) °C (n = 3).

5.2.1.13 HPLC-Systeme und -Methoden

Die HPLC-analytischen Arbeiten wurden auf einer der folgenden Anlagen durchgeführt:

Kontron-Anlage (Biotek Kontron Instruments, Neufahrn, Deutschland) bestehend aus:

- 2 Kontron 420 HPLC-Pumpen
- 1 Kontron M800 Mischkammer
- 1 Kontron 460 Autosampler
- 1 Kontron 420 UV-Detektor
- Kontron MT2 Datasystem

oder

Waters-Anlage (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland) bestehen aus:

- 2 Waters 515 HPLC-Pumpen
- 1 Pump Control Modul
- 1 Waters 717plus Autosampler
- 1 Waters 2996 PDA-Detektor
- Empower[®] Chromatographie-Software (2002).

Im folgenden sind die verwendeten HPLC-Methoden zur quantitativen Bestimmung von Protergurid und den chemischen Permeationsverstärkern beschrieben. Die Quantifizierung erfolgte stets mit Hilfe von mindestens zwei separat hergestellter Standardlösungen bekannten Gehaltes des Analyten, wobei die Peakflächen als Quantifizierungskriterium herangezogen wurden. Nach Injektion von 12 Proben erfolgte stets eine Doppelinjektion eines Standards. Die für jeden Probenstapel berechneten Kalibriergeraden, wobei der Ursprung als

Kalibrierpunkt mit einbezogen wurde, wiesen in der Regel eine Korrelation von $R > 0,999$ auf. Lag die Korrelation unter $R < 0,995$, so wurden die Proben erneut vermessen. Die Kalibrierfunktion des HPLC-analytischen Verfahrens zur quantitativen Bestimmung von Protergurid ist in Abbildung 66 dargestellt.

Protergurid

Vorsäule	Waters Symmetry Shield [®] RP18, 3,5 μm , 3,9 · 20 mm
Säule	Waters Symmetry Shield [®] RP18, 3,5 μm , 4,6 · 100 mm
Eluent	55% 20 mM Phosphatpuffer pH 7,1 45% Acetonitril, gradient grade
Flussrate	0,9 mL/min
Detektion	222 nm
Retentionszeit	~ 10 min

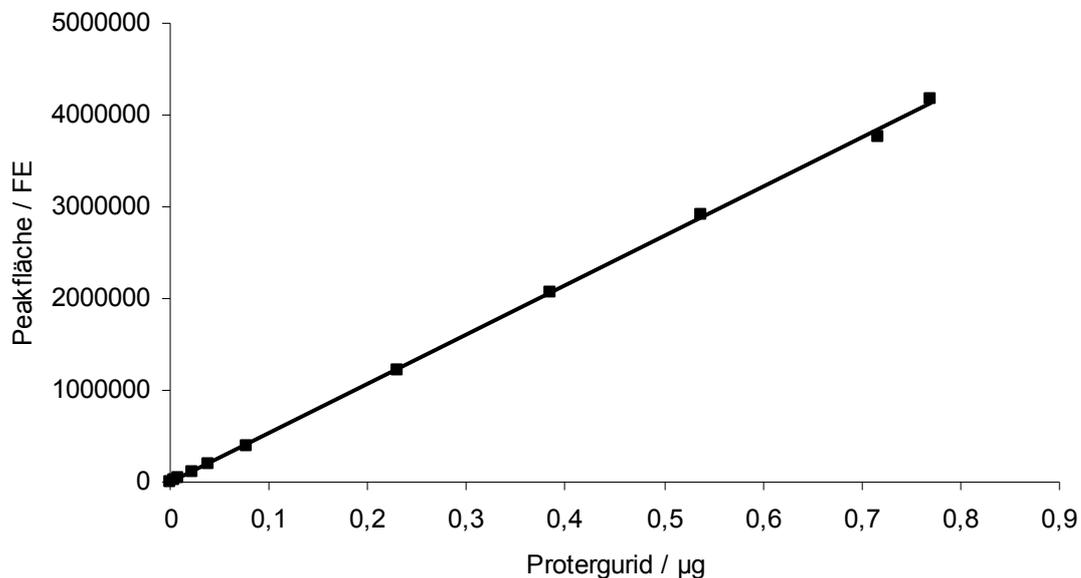


Abbildung 66: Kalibriergerade des HPLC-analytischen Verfahrens zur quantitativen Bestimmung von Protergurid ($R = 0,9998$).

N-Methylpyrrolidon

Vorsäule	Waters Symmetry Shield [®] RP18, 3,5 µm, 3,9 · 20 mm
Säule	Waters Atlantis [®] RP18, 3 µm, 4,6 · 100 mm
Eluent	97,5% 20 mM Phosphatpuffer pH 3 2,5% Acetonitril, gradient grade
Flussrate	0,9 mL/min
Detektion	205 nm
Retentionszeit	~ 8 min

N-Octylpyrrolidon

Vorsäule	Waters Symmetry Shield RP18, 3,5 µm, 3,9 · 20 mm
Säule	Waters Atlantis RP18, 3 µm, 4,6 · 100 mm
Eluent	40% 20 mM Phosphatpuffer pH 3 60% Acetonitril, gradient grade
Flussrate	0,9 mL/min
Detektion	205 nm
Retentionszeit	~ 7 min

N-Dodecylpyrrolidon

Vorsäule	Waters Symmetry Shield [®] RP18, 3,5 µm, 3,9 · 20 mm
Säule	Waters Atlantis [®] RP18, 3 µm, 4,6 · 100 mm
Eluent	20% 20 mM Phosphatpuffer pH 3 80% Acetonitril, gradient grade
Flussrate	0,9 mL/min
Detektion	205 nm
Retentionszeit	~ 9 min

Azone[®]

Vorsäule	Waters Symmetry Shield [®] RP18, 3,5 µm, 3,9 · 20 mm
Säule	Waters Atlantis [®] RP18, 3 µm, 4,6 · 100 mm
Eluent	20% 20 mM Phosphatpuffer pH 3 80% Acetonitril, gradient grade
Flussrate	1,2 mL/min
Detektion	205 nm
Retentionszeit	~ 10 min

5.2.1.14 Statistische Auswertung und Datenpräsentation

Die Datenangabe erfolgte in Kapitel 2 prinzipiell als arithmetischer Mittelwert (Standardabweichung). Permeationsversuche durch die Haut der haarlosen Maus wurden mit mindestens $n = 3$ Versuchen durchgeführt und bis auf wenige Ausnahmen auf mindestens zwei Mäuse verteilt. Diffusionsexperimente, Freisetzungstests nach der „disk assembly“-Methode sowie Untersuchungen auf Gleichförmigkeit von Matrixmasse und Gehalt bei Matrix-Transdermalsystemen wurden mit $n = 6$ durchgeführt. Die Darstellung der Permeations- und Diffusionsprofile erfolgte mit Hilfe von MS Excel[®] 2002 (Microsoft, München, Deutschland), ebenso die Darstellung von Ergebnissen in Balkendiagrammen. Freisetzungsprofile zeigen in allen Fällen die kumulativ freigegebene (permeierte) Menge der betreffenden Substanz in Abhängigkeit von der Zeit. Wie in Kapitel 1.2.5 erläutert, wurden der steady state Fluss (Permeation unter Gleichgewichtsbedingungen) und die lag time (Latenzzeit) durch lineare Regression des linearen Abschnittes der Permeationskurve berechnet. Die Steigung der Regressionsgerade entsprach dem steady state Fluss, der Schnittpunkt mit der Abszisse der lag time. Der 48-Stundendurchschnittsfluss wurde aus dem Quotienten aus in 48 Stunden permeierter Menge der betreffenden Substanz und dem Zeitintervall von 48 Stunden kalkuliert.

Zu vergleichende Parameter wurden auf Normalverteilung (Test nach David, $P = 90\%$) und Varianzenhomogenität (F-Test, $P = 95\%$) getestet. Normalverteilung war in allen Fällen, in denen eine weitere statistische Analyse erfolgte, gegeben. Ausreißer wurden mit Hilfe des

Testes nach Dixon ($P = 95\%$) identifiziert und ausgeschlossen. Um schließlich signifikante Unterschiede in einem Parameter zweier Formulierungen bei nachgewiesener Varianzenhomogenität festzustellen, wurde der zweiseitige Student's t-Test ($P = 95\%$) herangezogen. Lag keine Varianzenhomogenität vor (Fischer-Behrens-Problem), so wurde der von Welch modifizierte t-Test ($P = 95\%$) durchgeführt.

5.2.2 Methoden ad Kapitel 3: Aktivität von Protergurid an nicht-dopaminergen Monoaminrezeptoren

5.2.2.1 Allgemeine Versuchsdurchführung

Die Organe wurden unmittelbar nach Exzision in das entsprechende, mit O_2 / CO_2 (95% / 5%) gesättigte Medium transferiert, vorsichtig von anhaftendem Gewebe befreit und gegebenenfalls in kleinere Ringe (Gefäße) bzw. Segmente geteilt. Je nach Organ wurden Häkchen (L-förmig, $d = 0,15$ mm von TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland oder dreieckförmig, $d = 0,3$ mm, Eigenanfertigung), Klammern (Hugo-Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) oder Fäden (Mersilene[®] EH 451, Ethicon, Norderstett, Deutschland) verwendet, um das Gewebe im Organbad ($V = 20$ mL, TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland), welches mit dem entsprechenden Medium beschickt, auf 37 °C temperiert war und stetig mit O_2 / CO_2 (95% / 5%) begast wurde, zu fixieren. Änderungen in der Kontraktionskraft wurden isometrisch und Längenänderungen (nur Meerschweinchenileum) isotonisch erfasst (Transducer TF6V5 bzw. TF6V5iso und Transducer Coupler TSE 4711, TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland) und mittels 4-Kanal-x/t-Schreibern (Siemens C 1016 compensograph, Siemens, München, Deutschland) detektiert. Vor Versuchsbeginn wurde nach Ablauf einer Äquilibrationsperiode das Medium gewechselt und die Organe vorstimuliert. Die Aufzeichnung der E/[A]-Kurve eines Agonisten erfolgte nach der kumulativen Technik. Unmittelbar nach Erreichen eines Plateaueffektes wurde die Konzentration des Agonisten um eine halbe log-Einheit erhöht. Dieser Schritt wurde bis zum Erreichen des Maximaleffektes wiederholt. Nach Fertigstellung der kumulativen E/[A]-Kurve wurden der Agonist und gegebenenfalls dem Medium zugesetzte Agenzien ausgespült, so dass der Basalzustand des Organes wieder hergestellt wurde. Sollte die E/[A]-Kurve des Agonisten in Gegenwart eines Antagonisten aufgezeichnet werden, so wurde der

Testantagonist vor Zugabe der ersten Agonistenkonzentration dem Organ zugeführt und ausreichend lange inkubiert (0,5 bis 2 Stunden). Lediglich Experimente an der Schweinepulmonalarterie (5-HT_{2B}-Rezeptor) und der Schweinekoronararterie (5-HT_{2A}-Rezeptor), bei welchen Protergurid als Agonist untersucht wurde, wurden nach der nicht-kumulativen-Technik („single point“-Technik) durchgeführt. Dies beruht darauf, dass bestimmte Gewebe nur auf die erste Konzentration eines Ergolinderivates reagieren (Müller-Schweinitzer, 1990), so dass in diesen Fällen die kumulative Technik nicht angewendet werden konnte.

5.2.2.2 α_{1A} -Adrenozeptor (Rattenschwanzarterie)

In die vom anhaftenden Gewebe befreite Rattenschwanzarterie wurde ein Edelstahldraht (d = 0,3 mm) eingeführt, um das Endothel zu entfernen. Anschließend wurde die Arterie in 3 bis 5 mm lange Ringe geschnitten. Diese wurden auf L-förmige Häkchen gestülpt und in mit modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung (Lösung A) befüllte Organbäder überführt. Nach Zugabe von 3 μ M B8805-033 wurde 50 Minuten zur Maskierung der α_{1A} -Adrenozeptoren inkubiert. Während der letzten 30 Minuten der Inkubationszeit wurden 100 μ M Chlorethylclonidin zur selektiven Alkylierung und damit Inaktivierung von α_{1B} -Adrenozeptoren zugegeben. Es folgte eine 15 minütige Spülung der Arterienringe, bevor diese in separate Organbäder umgehungen und mit einer Vorlast von 7,5 mN gespannt wurden. Der verwendeten Elektrolytlösung wurden zugesetzt:

Ascorbinsäure (200 μ M) zur Minimierung des oxidativen Abbaus von Noradrenalin,
Cocain (30 μ M) zur Hemmung der neuronalen Wiederaufnahme von Noradrenalin,
Corticosteron (30 μ M) zur Hemmung der extraneuronalen Aufnahme von Noradrenalin,
Idazoxan (0,1 μ M) zur Blockade von α_2 -Adrenozeptoren,
Propranolol (1 μ M) zur Blockade von β -Adrenozeptoren,
Methysergid (1 μ M) zur Blockade von 5-HT_{2A}-Rezeptoren.

Nach einer 45minütigen Stabilisierungsphase mit anschließendem Mediumwechsel und Nachjustierung der Vorlast wurden die Arteriensegmente mit Noradrenalin vorstimuliert (drei Stimulationen submaximal mit 1 μ M und eine Stimulation maximal mit 100 μ M Noradrenalin

innerhalb von 100 Minuten inklusive Mediumwechsel nach jeder Stimulation). Mangelhaft kontrahierende Organe wurden gegebenenfalls von der weiteren Versuchsdurchführung ausgeschlossen. Im Anschluss erfolgte die Aufnahme von zwei kumulativen E/[A]-Kurven von Noradrenalin (10^{-8} bis 10^{-4} M) im Abstand von > 60 Minuten, wobei die zweite gegebenenfalls in Anwesenheit von Protergurid (Inkubation: 60 Minuten) generiert wurde. Zwischen die Aufzeichnung der kumulativen E/[A]-Kurve von Noradrenalin war eine Auswaschphase geschaltet.

5.2.2.4 α_{1B} -Adrenozeptor (Meerschweinchenmilz)

Zur Evaluierung der Aktivität von Protergurid an α_{1B} -Adrenozeptoren wurde das bereits von Eltze (1994) beschriebene Modell der Meerschweinchenmilz herangezogen. Die in sechs Teile geschnittene Milz wurde mittels Klammern in den Organbädern mit modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung (Lösung A) fixiert und mit 10 mN vorgespannt. Zur Vermeidung der neuronalen und extraneuronalen Aufnahme von Noradrenalin, zur Minimierung des oxidativen Noradrenalinabbaus und zur Blockade von β -Adrenozeptoren wurden dem Medium Cocain (30 μ M), Corticosteron (30 μ M), Ascorbinsäure (200 μ M) und Propranolol (1 μ M) zugesetzt. Nach einer initialen Äquilibrierungsphase von 45 Minuten (Mediumwechsel nach 30 Minuten), wurde die Vorspannung nachjustiert. Im Abstand von 40 Minuten wurden die Organsegmente kumulativ mit Noradrenalin (0,1, 1,0 und 10,0 μ M Noradrenalin) dreimal vorstimuliert, bis die erzielten Kontraktionen reproduzierbar verliefen. Nach jedem Kontraktionszyklus wurde das Noradrenalin gründlich ausgewaschen. Nach einer weiteren Spülung und einer Ruhephase von 15 Minuten gefolgt von einem erneuten Mediumwechsel wurden zwei kumulative E/[A]-Kurven von Noradrenalin ($10^{-8.5}$ bis 10^{-4} M) mit zwischengeschalteter Auswaschperiode aufgenommen. Die Aufzeichnung der zweiten kumulativen E/[A]-Kurve von Noradrenalin erfolgte gegebenenfalls in der Anwesenheit von Protergurid (Inkubation: 60 Minuten).

5.2.2.5 α_{1D} -Adrenozeptor (Rattenaorta)

Zur Charakterisierung α_{1D} -Adrenozeptor-vermittelter agonistischer und antagonistischer Effekte wurde das von Schöning et al. (2001) beschriebene Modell der isolierten Rattenaorta herangezogen. Der von umliegendem Gewebe gesäuberte, thorakale Teil der Aorta wurde durch vorsichtiges Rollen mit einer in das Lumen eingeführten Pinzette vom Endothel befreit. Aortenringe (Länge 2 bis 3 mm) wurden auf triangelförmige Häkchen geschoben und in das Organbad überführt. Als Medium diente eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (Lösung C). Zur Hemmung der neuronalen und zellulären Aufnahme von Noradrenalin, zur Minimierung des oxidativen Abbaus von Noradrenalin und zur Blockade von α_2 - und β -Adrenozeptoren wurden dem Medium Cocain (30 μM), Corticosteron (30 μM), Ascorbinsäure (200 μM), Yohimbin (0,1 μM) und Propranolol (1 μM) zugesetzt. Die angelegte Ruhespannung betrug 10 mN, welche nach einer initialen Ruhephase von 45 Minuten mit Mediumwechsel nach 30 Minuten nachjustiert wurde. Drei Vorkontraktionen mit 0,3 μM Noradrenalin wurden innerhalb von 180 Minuten durchgeführt. Nach einer Ruhephase (15 Minuten) mit vorangegangenem und abschließendem Spülzyklus erfolgte eine erneute Ruheperiode von 30 Minuten. Zwei kumulative E/[A]-Kurven von Noradrenalin ($10^{-9.5}$ bis $10^{-6.5}$ M) mit zwischengeschaltetem Wechsel des Mediums wurden im Abstand von 60 Minuten aufgezeichnet. Die zweite kumulative E/[A]-Kurve von Noradrenalin wurde gegebenenfalls in Anwesenheit von Protergurid (Inkubation: 60 Minuten) generiert.

5.2.2.6 Histamin H_1 -Rezeptor (Meerschweinchenileum)

Die Charakterisierung der pharmakologischen Eigenschaften von Protergurid am Histamin H_1 -Rezeptor erfolgte an einem Modell des isolierten Meerschweinchenileums nach der von Menghin et al. (2003) beschriebenen Methode. Ileumsegmente mit einer Länge von 1,5 cm wurden präpariert und vertikal in den Organbädern mittels Fäden positioniert. Als Medium diente Tyrode Lösung mit einem Zusatz von Atropin (10^{-7} M) und LY 53857 (10^{-7} M) zur Blockade von muskarinergen M_3 -Rezeptoren und serotoninergen 5-HT $_{2A}$ -Rezeptoren. Die Längenänderung des Gewebes nach Stimulation der exprimierten H_1 -Rezeptoren wurde isotonisch (Vorlast 5 mN) aufgezeichnet. Nach einer initialen Äquilibrationsphase von 80 Minuten wurden die Ileumsegmente dreimal mit Histamin kumulativ (0,1 μM und 10 μM)

vorstimuliert. Im Anschluss erfolgte die Aufnahme zweier kumulativer E/[A]-Kurven von Histamin (10^{-8} bis 10^{-5} M), erst in Abwesenheit und anschließend in Anwesenheit von Protergurid. Die Inkubationszeit des Arzneistoffs betrug 15 Minuten.

5.2.2.7 5-HT_{2A}-Rezeptor (Rattenschwanzarterie)

Die Charakterisierung 5-HT_{2A}-Rezeptor-vermittelter agonistischer und antagonistischer Effekte von Protergurid erfolgte wie bereits von Pertz und Elz (1995) beschrieben. Die vom umliegenden Gewebe und vom Endothel durch Einführen eines Edelstahlrahtes ($d = 0,3$ mm) befreite Rattenschwanzarterie wurde in Ringe von 3 bis 5 mm Länge geschnitten, auf L-förmige Häkchen gesetzt und in die Organbäder transferiert. Als Elektrolytlösung diente eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (Lösung A), welcher Cocain ($6 \mu\text{M}$) und Prazosin ($0,1 \mu\text{M}$) zur Hemmung der Aufnahme von Serotonin und zur Blockade von kontraktilen α_1 -Adrenozeptoren zugesetzt wurden. Die Ruhespannung betrug 5 mN, welche nach einer Ruhephase von 60 Minuten mit Wechsel des Mediums nach 30 Minuten nachjustiert wurde. Die Gefäße wurden im folgenden mit Serotonin kumulativ vorstimuliert ($1,0$ und $10,0 \mu\text{M}$ Serotonin). Mangelhaft kontrahierende Gewebe wurden von der weiteren Versuchsdurchführung ausgeschlossen. Es folgten ein Mediumwechsel, eine Ruhephase von 15 Minuten, ein erneuter Mediumwechsel und eine erneute Ruhephase von 30 Minuten. Zwei kumulative E/[A]-Kurven von Serotonin ($10^{-8,5}$ bis 10^{-5} M) mit zwischengeschaltetem Mediumwechsel wurden anschließend aufgezeichnet. Die zweite kumulative E/[A]-Kurve von Serotonin wurde gegebenenfalls in Anwesenheit von Protergurid (Inkubation: 60 Minuten) generiert. Sollte Protergurid auf seine agonistischen Effekte untersucht werden, so wurde die zweite kumulative E/[A]-Kurve nicht mit Serotonin, sondern mit dem Ergolinderivat, gegebenenfalls in Anwesenheit von Ketanserin ($10^{-8,5}$ M), aufgezeichnet.

5.2.2.8 5-HT_{2A}-Rezeptor (Schweinekoronararterie)

Kontrollexperimente zur Verifizierung des an der Rattenschwanzarterie bestimmten pK_p -Wertes von Protergurid an serotoninergen 5-HT_{2A}-Rezeptoren wurden anhand des von

Strassner (2003) beschriebenen Modells der Schweinekoronararterie durchgeführt. Der isolierte, von anhaftendem Gewebe befreite absteigende Teil der linken Koronararterie (Ramus interventricularis anterior) wurde in 2 bis 3 mm lange Ringe geschnitten. Das Endothel wurde durch eine in das Lumen eingeführte Pinzette und vorsichtiges Rollen entfernt und die Arterienringe mittels triangelförmiger Häkchen im Organbad fixiert. Der als Medium fungierenden, modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung (Lösung B) wurden Cocain (30 μM) zur Hemmung der neuronalen Aufnahme von Serotonin und Prazosin (0,1 μM) zur Blockade von α_1 -Adrenozeptoren zugesetzt. Die Ruhespannung betrug 20 mN und wurde nach einer initialen Ruhephase von 60 Minuten mit Mediumwechsel nach 30 Minuten nachjustiert. Zwei Vorkontraktionen mit je 50 mM Kaliumchlorid wurden im Abstand von 60 Minuten durchgeführt. Die quantitative Eliminierung des Endothels bei der Organpräparation wurde durch das Ausbleiben einer Relaxation nach Zugabe von Bradykinin (0,1 μM) im Maximum des durch Kaliumchlorid induzierten, kontraktile Effektes gesichert. Nach einem Zyklus aus Waschen, 15 Minuten Ruhe, Waschen und 60 Minuten Ruhe wurden kumulative E/[A]-Kurven von Serotonin (10^{-8} bis $10^{-5,5}$ M) in Abwesenheit und Anwesenheit von Protergurid (Inkubation: 60 Minuten während der Ruheperiode) aufgezeichnet.

5.2.2.9 5-HT_{2B}-Rezeptor (Schweinepulmonalararterie)

Zur Charakterisierung der agonistischen und antagonistischen Effekte von Protergurid an serotoninerger 5-HT_{2B}-Rezeptoren wurde das von Glusa und Pertz (2000) beschriebene Modell der Schweinepulmonalararterie herangezogen. Die aus Schlachtschweinen gewonnenen Pulmonalarterien zweiter bis vierter Ordnung (d = 2 bis 3 mm) wurden von anhaftendem Gewebe befreit, in Segmente von 2 bis 3 mm Länge geschnitten und mittels triangelförmiger Edelstahlhäkchen in den Organbädern fixiert. Als Medium diente eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (Lösung A), welcher Ketanserin (0,1 μM) zugesetzt wurde, um serotoninerge 5-HT_{2A}-Rezeptoren zu blockieren. Die angelegte Ruhespannung betrug 20 mN und wurde nach einer initialen Ruhephase von 60 Minuten mit Mediumwechsel nach 30 Minuten nachjustiert. Eine erste Stimulation mit Kaliumchlorid (30 mM) wurde durchgeführt, gefolgt von zwei weiteren Stimulationen mit Prostaglandin F_{2 α} (3 μM). Ein zeitlicher Abstand von 45 Minuten und Mediumwechsel wurden berücksichtigt. Bradykinin bewirkte eine Relaxation von mindestens 80% der mit Prostaglandin F_{2 α} (3 μM)

vokontrahierten Arterienringe, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass das Endothel bei der Organpräparation weitgehend unbeschädigt blieb. Nach einer 60minütigen Ruheperiode, in welcher gegebenenfalls Protergurid inkubiert wurde, gefolgt von einer erneuten Stimulation mit Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($3 \mu\text{M}$), wurde eine kumulative $E/[A]$ -Kurve von Serotonin (10^{-10} bis 10^{-7} M) aufgezeichnet. Bei Experimenten zur Untersuchung der agonistischen Effekte von Protergurid wurde anstatt der kumulativen $E/[A]$ -Kurve von Serotonin pro Organbad jeweils nur eine Konzentration des Ergolinderivates ($10^{-8.5}$ bis $10^{-5.5}$ M), gegebenenfalls in Anwesenheit des 5-HT_{2B/2C}-Rezeptorantagonisten SB 206553 (10^{-6} M; Inkubation 30 Minuten), zugegeben („single point“-Technik). Die relaxierenden Effekte wurden in %, bezogen auf die durch Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($3 \mu\text{M}$) induzierte Kontraktion, angegeben.

5.2.2.10 Pharmakologische Parameter

Nachfolgend sind die für Protergurid und die physiologischen Kontrollagonisten experimentell bestimmten, pharmakologischen Parameter kurz mit ihrer Bedeutung aufgeführt. Die Verwendung von Symbolen sowie deren Bedeutung erfolgte in Übereinstimmung mit den Empfehlungen der IUPHAR (International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification, Jenkinson et al., 1995).

EC_{50} , pEC_{50}	Molare Stoffmengenkonzentration (bzw. der negative dekadische Logarithmus der molaren Stoffmengenkonzentration) eines Agonisten, welche einen halbmaximalen Effekt bewirkt.
E_{\max}	Der durch einen Agonisten erzielbare maximale Effekt in % bezogen auf eine Referenzverbindung
K_p , pK_p	Molare Gleichgewichtskonstante (bzw. der negative dekadische Logarithmus der Gleichgewichtskonstanten) eines Komplexes aus Rezeptor und partiellem Agonisten.
pA_2	Negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration eines Antagonisten, welche die $E/[A]$ -Kurve eines Agonisten um den Faktor 2 nach rechts verschiebt.

Die Bestimmung von EC_{50} -, pEC_{50} - und E_{max} -Werten erfolgte mit Hilfe der GraphPad Prism[®] Software, Version 4.0 (GraphPad Software, San Diego, USA).

Der Bestimmung von pA_2 -Werten wurde folgende Gleichung (Furchgott, 1972) zugrunde gelegt:

$$pA_2 = -\log[B] + \log(r - 1) \quad (10)$$

mit:

$[B]$ Molare Konzentration des Antagonisten

r Quotient aus den EC_{50} -Werten des Agonisten in Anwesenheit und Abwesenheit des Antagonisten.

Die Bestimmung von pK_p -Werten erfolgte nach der Methode von Marano und Kaumann (1976). Diese basiert auf den Vergleich der äquieffektiven Konzentrationen des vollen Agonisten in Anwesenheit und in Abwesenheit des partiellen Agonisten, welcher in diesen Fällen als Antagonist wirkt. Ausgehend von der Geradengleichung:

$$[A] = m \cdot [A]^* + n \quad (11)$$

mit:

$[A]$ Molare Konzentration des vollen Agonisten in Abwesenheit des partiellen Agonisten

$[A]^*$ Molare Konzentration des vollen Agonisten in Anwesenheit des partiellen Agonisten zur Erzielung gleicher Effekte

m Steigung der Geraden in der gewichteten Darstellung von $[A]$ gegen $[A]^*$, wobei folgende Gewichtung zugrunde gelegt wird: $w_i = ([A]^* + [A]_{50})^{-4}$

n Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse,

gilt:

$$K_p = \frac{[P] \cdot m}{1 - m} \cdot \left(1 - \frac{\varepsilon_P}{\varepsilon_A}\right) \quad (12)$$

mit:

$[P]$ Molare Konzentration des partiellen Agonisten

ε_P Intrinsische Aktivität des partiellen Agonisten

ε_A Intrinsische Aktivität des vollen Agonisten.

Ist $\varepsilon_A \gg \varepsilon_P$, so vereinfacht sich Gleichung (12) zu:

$$K_p = \frac{[P] \cdot m}{1 - m} \quad (13)$$

5.2.2.11 Statistische Auswertung und Datenpräsentation

Die Datenangabe der pharmakologischen Untersuchungsergebnisse in Kapitel 3 erfolgte stets als arithmetischer Mittelwert (Standardfehler des Mittelwertes, SEM). Die E/[A]-Kurven wurden nach einer iterativen, auf der Minimierung der Summe der Abstandsquadrate beruhenden Methode berechnet und an die Hill-Gleichung

$$E = \frac{E_{max}}{1 + 10^{(-pEC_{50} - \log[A]) \cdot n_H}} \quad (14)$$

mit:

n_H Hill-Koeffizient

angepasst. Zu diesem Zweck kam die GraphPad Prism[®]-Software, Version 4.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) zum Einsatz.

Zu vergleichende Parameter wurden auf Normalverteilung (Test nach David, P = 90%) und Varianzenhomogenität (F-Test, P = 95%) getestet. Normalverteilung war in allen Fällen, in denen eine weitere statistische Analyse erfolgte, gegeben. Ausreißer wurden mit Hilfe des Testes nach Dixon (P = 95%) identifiziert und ausgeschlossen. Um schließlich signifikante Unterschiede in einem Parameter zweier Formulierungen bei nachgewiesener Varianzenhomogenität festzustellen, wurde der zweiseitige Student's t-Test (P = 95%) herangezogen. Lag keine Varianzenhomogenität vor (Fischer-Behrens-Problem), so wurde

der von Welch modifizierte t-Test durchgeführt. Sollten mehr als zwei Datenreihen in einem Parameter verglichen werden, erfolgte eine einfaktorielle Varianzanalyse (One-way-ANOVA).