

**Untersuchungen zur extracochleären und
intracochleären Applikation von Dexamethason am
Innenohr**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Biegner, Thorsten Dirk

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Plontke
2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Knipper-Breer

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
1.1	Epidemiologie der Innenohrerkrankungen	10
1.2	Anatomie des Ohres	11
1.3	Physiologie des Hörens	13
1.4	Formen von Innenohrerkrankungen.....	15
1.4.1	Hörsturz	15
1.4.2	Akustisches Trauma	15
1.4.3	Altersschwerhörigkeit (Presbyakusis)	15
1.4.4	Tinnitus aurium	16
1.4.5	Morbus Menière.....	16
1.4.6	Neuritis vestibularis.....	16
1.5	Therapie von Innenohrerkrankungen.....	16
1.5.1	Topische Medikamentenapplikation.....	17
1.6	Präklinische pharmakokinetische Untersuchungen zur lokalen Medikamentenapplikation an das Innenohr	18
1.7	Prinzipien der Pharmakokinetik des Innenohres.....	21
1.8	Zielsetzung der Arbeit.....	24
2	Material und Methodik	25
2.1	Verwendete Tiere und Tierversuchsgenehmigung	25
2.1.1.1	Narkoseverfahren und Versuchsvorbereitung	25
2.1.1.2	Chirurgischer Zugang zur Cochlea	25
2.1.1.3	Präparation der Cochleaspitze	26
2.1.2	Applikation	29
2.1.2.1	Lokale Applikation an die Rundfenstermembran	29
2.1.2.2	Intracochleäre Applikation	30
2.1.3	Probenentnahme	32
2.1.3.1	Apikale Probenentnahmetechnik	32
2.1.3.2	Sequentielle apikale Probenentnahmetechnik.....	33
2.1.3.3	Vorgehensweise	36
2.1.3.3.1	Lokale Applikation an die Rundfenstermembran	36
2.1.3.3.2	Intracochleäre Injektion	36

2.1.4	Probenanalyse	37
2.1.5	Computersimulation	37
2.1.6	Anpassung der Computersimulation an die experimentellen Messdaten	39
3	Ergebnisse	41
3.1	Lokale Applikation an die Rundfenstermembran	41
3.1.1	Auswertung der experimentellen Daten	41
3.1.2	Interpretation der experimentellen Daten mit Hilfe von Computersimulationen	45
3.2	Intracochleäre Applikation	47
3.2.1	Auswertung der experimentellen Daten	47
3.2.2	Computersimulation basierend auf den experimentellen Daten	54
4	Diskussion	58
4.1	Pharmakokinetische Unterschiede der einzelnen Applikationsformen ..	58
4.1.1	Lokale Applikation an die Rundfenstermembran	58
4.1.2	Intracochleäre Injektion	64
4.1.2.1	Probenentnahme 20 Minuten nach erfolgter Applikation	64
4.1.2.2	Probenentnahme 80 Minuten nach erfolgter Applikation	68
4.1.2.3	Berechnung der Halbwertszeit	70
4.2	Vergleich der unterschiedlichen Applikationsformen	73
4.2.1	Konversion von Dex-P in Dex-Base	73
4.2.2	Vergleich der Spitzenkonzentrationen	76
4.2.3	Verteilung der applizierten Substanz in der Scala tympani	80
5	Zusammenfassung	92
6	Literaturverzeichnis	94
7	Erklärung zum Eigenanteil	98
8	Danksagung	100
9	Lebenslauf	101

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ca.	circa
Dex-Base	Dexamethasonbase
Dex-P	Dexamethason-21-dihydrogenphosphat
g	Gramm
GmbH	Gemeinschaft mit beschränkter Haftung
hplc	high-performance liquid chromatography
i.m.	intramuskulär
Inc.	Incorporated
i.p.	intraperitoneal
M.	Musculus
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µl	Mikroliter
Tab.	Tabelle
V.	Vena

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau des menschlichen Ohres	12
Abb. 2: Schema des membranösen Labyrinths	12
Abb. 3: Querschnitt einer Cochlea mit Corti-Organ	13
Abb. 4: Schallübertragung vom Mittelohr auf das Innenohr	14
Abb. 5: Schema einer „entrollten“ Cochlea	19
Abb. 6: Kontamination der Perilymphe mit zerebrospinaler Flüssigkeit	20
Abb. 7: Prinzipien der Substanzverteilung im Innenohr	23
Abb. 8: Präparation der Cochleaspitze für die sequentielle apikale Probenentnahme	28
Abb. 9: Applikationskapillare	29
Abb. 10: Lokale Applikation an die Rundfenstermembran	30
Abb. 11: Intracochleäre Applikation	31
Abb. 12: Apikale Probenentnahmetechnik	33
Abb. 13: Sequentielle apikale Probenentnahmetechnik	34
Abb. 14: Scala tympani in 1µl-Kompartimente unterteilt	35
Abb. 15: Das Finite-Element-Computermodell „Fluidsim“ (© Alec N. Salt)	38
Abb. 16: Anpassung der Computersimulation an die Messdaten	40
Abb. 17: Lokale Applikation an die Rundfenstermembran	42
Abb. 18: Konzentrationsverlauf von Dex-P und Dex-Base bei lokaler Applikation an die Rundfenstermembran	44
Abb. 19: Konzentrationsprofile von Dex-P inklusive Dex-Base	45
Abb. 20: Optimale Anpassung der Simulation an die gemessenen Werte	46
Abb. 21: Mit Hilfe der Computersimulation errechnete basoapikale Konzentrationsprofile	47
Abb. 22: Verteilung von Dex-P und Dex-Base in den Perilymphproben	51
Abb. 23: Verteilung von Dex-P und Dex-Base	53
Abb. 24: Mit Hilfe des Computermodells berechnete Konzentrationsprofile entlang der Scala tympani	56

Abb. 25: Konzentrationsverlauf von Dex-P und Dex-Base in den entnommenen Perilymphproben	58
Abb. 26: Rückdiffusion der applizierten Substanz aus benachbarten Kompartimenten während der Probenentnahme	60
Abb. 27: Variabilität der ermittelten Konzentrationen	61
Abb. 28: Rundfenstermembran-Permeabilität	62
Abb. 29: Clearance.....	63
Abb. 30: normalisierte Darstellung der einzelnen Versuche mit Probenentnahme 20 Minuten nach Beendigung der Injektion	65
Abb. 31: Zusammenhang von Clearance und Perilymph-Leak	67
Abb. 32: Artefaktbildung durch hohe "Perilymph-Leaks"	68
Abb. 33: Vergleich der unterschiedlichen "Perilymph-Leaks"	69
Abb. 34: Einfluss des "Perilymph-Leaks".....	70
Abb. 35: Vergleich der unterschiedlichen Applikationsformen.....	74
Abb. 36: Verteilung von Dex-Base in den entnommenen Probevolumina	75
Abb. 37: Substanzkonzentrationen der einzelnen Applikationsarten.....	76
Abb. 38: Konzentrationen der ersten vier Perilymphproben nach extracochleärer Applikation.....	81
Abb. 39: Konzentrationen der ersten vier Perilymphproben nach intracochleärer Applikation (Probenentnahme 20 Minuten nach Substanzapplikation)	87
Abb. 40: Konzentrationen der ersten vier Perilymphproben nach intracochleärer Applikation (Probenentnahme 80 Minuten nach Substanzapplikation)	88
Abb. 41: Einfluss der Geometrie der Scala tympani auf die Stoffdiffusion.....	89
Abb. 42: Perilymphkonzentrationen der ersten vier Proben	90
Abb. 43: Konzentrationsprofile entlang der Scala tympani	91

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Spitzenkonzentrationen der einzelnen Experimente	43
Tab. 2: Vergleich der Konzentrationen von Dex-P und Dex-Base.....	44

Tab. 3: Auflistung der einzelnen Parameter, die zu einer optimalen Anpassung der Simulationsdaten an die experimentellen Daten führten	46
Tab. 4: Perilymphkonzentrationen 20 Minuten nach Beendigung der Applikation	49
Tab. 5: Perilymphkonzentrationen 80 Minuten nach Beendigung der Applikation	50
Tab. 6: Mit Hilfe des Computermodells ermittelte pharmakokinetische Parameter.....	55
Tab. 7: Variation der basalen Konzentrationen	57
Tab. 8: in den Proben wiedergefundenen Gesamtmenge an Dexamethason (Dex-P + Dex-Base)	71
Tab. 9: mittlere Probenkonzentrationen der einzelnen Applikationsverfahren..	78
Tab. 10: Variationskoeffizienten	79
Tab. 11: basoapikale Quotienten für Dex-P nach Rundfensterapplikation	82
Tab. 12: basoapikale Quotienten für Dex-P und Dex-Base nach Rundfensterapplikation.....	83
Tab. 13: Vergleich der basoapikalen Quotienten.....	85

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der Innenohrerkrankungen

Nach Schätzungen der World Health Organisation (WHO) leiden weltweit 360 Millionen Menschen an Schwerhörigkeit (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/>). Allein in Deutschland leben laut Deutschem Grünen Kreuz 15 Millionen Menschen mit einer deutlichen Hörminderung (<http://dgk.de/gesundheits/hoeren/hoerschaeden.html>). Mit einem Anstieg der Zahl an Menschen, die mit einer Hörbeeinträchtigung leben, kann aufgrund der wachsenden Bevölkerung und der steigenden Lebenserwartung gerechnet werden.

Durch die zunehmende Exposition mit Freizeitlärm wie z.B. in Diskotheken oder auf Konzerten häuft sich die Zahl vor allem junger Menschen, die ein akustisches Trauma bzw. eine Hörminderung erleiden. Weitere Ursachen für eine Schädigung des Hörvermögens neben Lärmexposition können der sogenannte Hörsturz sein, dessen Ätiologie noch nicht sicher geklärt ist, sowie genetische Faktoren oder auch der Einsatz von ototoxischen Medikamenten wie z.B. bestimmte Antibiotika, Diuretika oder Zytostatika oder auch bakterielle und virale Infekte (Masern, Mumps, Röteln, Scharlach, Diphtherie), wobei Letztere vorwiegend im Kindesalter anzutreffen sind.

Der Hörminderung liegt in den meisten Fällen eine Schädigung des Innenohres und der sich darin befindenden Strukturen wie z.B. der für das Hörvermögen zuständigen Haarsinneszellen zugrunde, die bis hin zum Verlust dieser Sinneszellen führen kann. Schädigungen dieser Innenohrstrukturen können sich aber nicht nur als Schwerhörigkeit, sondern auch als Tinnitus bemerkbar machen oder sich auch aufgrund der engen anatomischen Beziehung zum Gleichgewichtsorgan als Schwindel manifestieren. Viele Patienten empfinden gerade Tinnitus und Schwindel als sehr belastend und klagen über starke Beeinträchtigungen ihres Alltagslebens.

Bei der Therapie von Innenohrerkrankungen kommen sowohl operative als auch medikamentöse Verfahren zum Einsatz. Gerade bei der Behandlung des

idiopathischen Hörsturzes wird zunehmend im Rahmen von klinischen Studien die lokale Medikamentenapplikation an das Innenohr beispielsweise nach einem Therapieversagen unter systemischer Arzneimittelgabe eingesetzt [14,15,21,35,52].

Die bisherigen Ergebnisse solcher Studien zeigen allerdings sehr unterschiedliche Behandlungserfolge, was sehr wahrscheinlich auch auf die noch nicht ausreichend geklärte Pharmakokinetik des Innenohres zurückzuführen ist.

Ziel dieser Promotionsarbeit ist es daher, die pharmakokinetischen Eigenschaften des Innenohres qualitativ sowie quantitativ bei unterschiedlicher Medikamentenapplikation (extra- versus intracochleär) anhand von tierexperimentellen Studien näher zu untersuchen.

1.2 Anatomie des Ohres

Das menschliche Ohr lässt sich in drei Abschnitte unterteilen: das äußere Ohr, das Mittelohr und das Innenohr (siehe Abb. 1). Das äußere Ohr setzt sich aus der Ohrmuschel und dem äußeren Gehörgang zusammen und reicht bis zum Trommelfell, das das äußere Ohr vom Mittelohr abgrenzt. Das Mittelohr beinhaltet die Paukenhöhle, das Mastoid, die Tuba auditiva sowie die Gehörknöchelchenkette bestehend aus Hammer, Amboß und Steigbügel (von außen nach innen). Das Innenohr besteht aus dem in der Felsenbeinpyramide gelegenen knöchernen Labyrinth und dem darin liegenden membranösen Labyrinth.

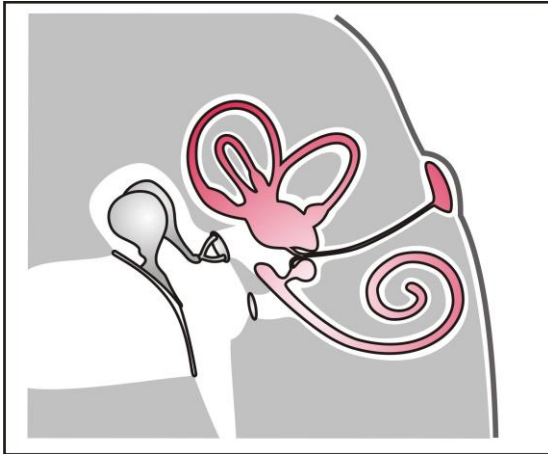


Abb. 1: Aufbau des menschlichen Ohres

In Anlehnung an Netter, F. H. Atlas der Anatomie des Menschen. 2. Auflage, Novartis 1999.

Das membranöse Labyrinth lässt sich in mehrere Abschnitte unterteilen, wie in Abb. 2 dargestellt. Im membranösen Labyrinth befindet sich K^+ -reiche Endolymphe, die durch die Stria vascularis produziert wird, und in ihrer Zusammensetzung intrazellulären Flüssigkeiten ähnelt. Der Raum zwischen knöchernem und membranösem Labyrinth ist mit Perilymphe ausgefüllt, die ähnlich extrazellulären Flüssigkeiten aufgebaut ist.

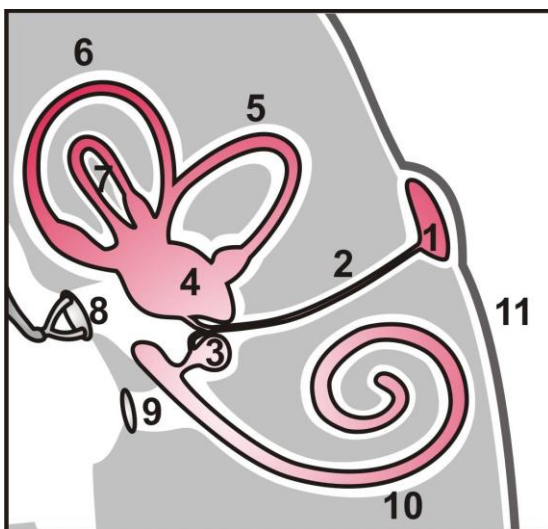


Abb. 2: Schema des membranösen Labyrinths

Rot: membranöses Labyrinth, 1: Saccus endolymphaticus, 2: Ductus endolymphaticus, 3: Sacculus, 4: Utriculus, 5: oberer Bogengang, 6: hinterer Bogengang, 7: horizontaler Bogengang, 8: Stapes, 9: Rundes Fenster, 10: Ductus cochlearis, 11: Dura mater.

In Anlehnung an Netter, F. H. Atlas der Anatomie des Menschen. 2. Auflage, Novartis 1999.

Im Ductus cochlearis des häutigen Labyrinths befindet sich das Corti-Organ mit den darin enthaltenen Haarsinneszellen, die als Rezeptorzellen Signale an den Hörnerv weiterleiten. Der Mensch verfügt über drei Reihen äußerer Haarzellen, die über ihre Fortsätze, den sogenannten Stereozilien, Kontakt mit der darüber liegenden Tektorialmembran haben, sowie über eine Reihe innerer Haarsinneszellen (siehe Abb. 3).

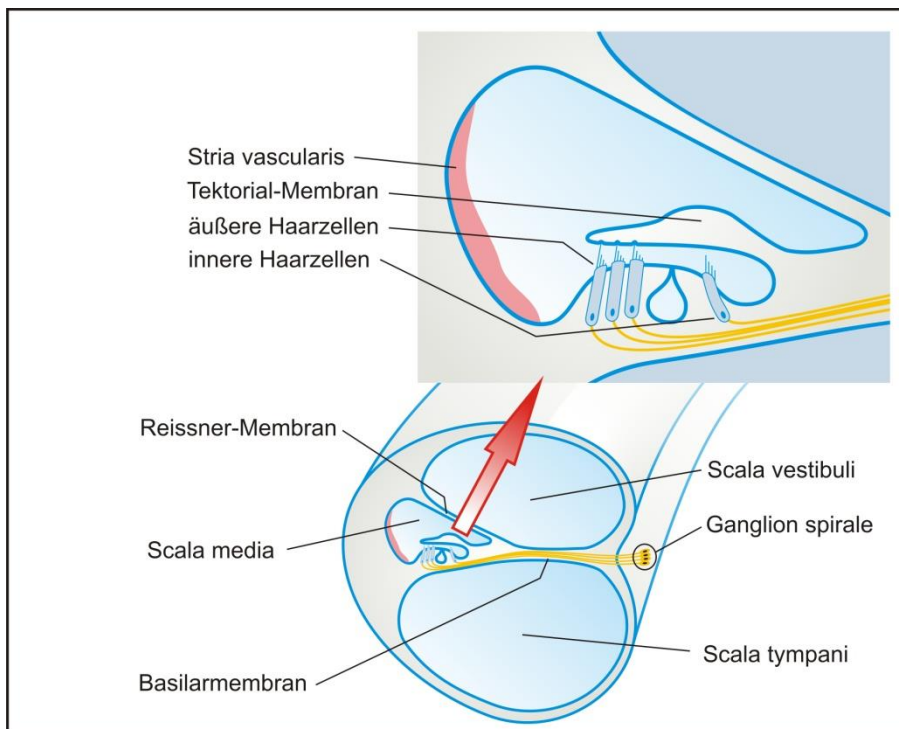


Abb. 3: Querschnitt einer Cochlea mit Corti-Organ

1.3 Physiologie des Hörens

Der Schall wird über das Trommelfell und die Gehörknöchelchenkette auf den Steigbügel übertragen, dessen Fußplatte beweglich im ovalen Fenster sitzt und so den Schallimpuls an das Innenohr weitergibt (siehe Abb. 4). Dabei wird der höhere Schallwellenwiderstand des Innenohres, bedingt durch die darin enthaltene Flüssigkeit, an den geringeren Schallwellenwiderstand der Luft angepasst, man bezeichnet dies als Impedanzanpassung.

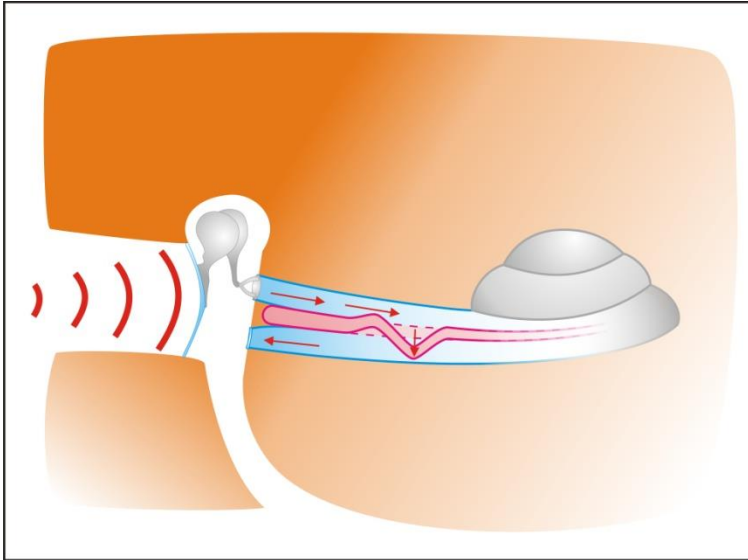


Abb. 4: Schallübertragung vom Mittelohr auf das Innenohr

Im Innenohr versetzt das Schallsignal die Basilarmembran in eine wellenförmige Auslenkung, die von der Basis zur Spitze der Cochlea wandert.

Diese Wanderwelle erreicht an einem bestimmten der Reizfrequenz entsprechenden Ort der Cochlea ihr Amplitudenmaximum, das die inneren Haarzellen stimuliert, die daraufhin das Signal an den Hörnerv weiterleiten. Die äußeren Haarzellen wirken dabei als Verstärker der Wanderwelle, indem sie bei niedrigem Schalldruck zusätzliche Schwingungen im Bereich des Amplitudenmaximums erzeugen und auf diese Weise die Amplitude der Wanderwelle bis zu tausendfach verstärken.

Die einzelnen Abschnitte der Basilarmembran sind frequenzspezifisch angeordnet, im basalen Anteil liegt das Amplitudenmaximum der hohen Frequenzen, zum Apex hin werden die der Basilarmembran zugeordneten Frequenzbereiche immer tiefer.

1.4 Formen von Innenohrerkrankungen

Innenohrerkrankungen äußern sich hauptsächlich durch drei Symptome:

- Hörminderung
- Ohrgeräusch
- Schwindel

Diese Symptome können jeweils unterschiedlich miteinander kombiniert sein. Im Nachfolgenden sollen die häufigsten Innenohrerkrankungen kurz beschrieben werden:

1.4.1 Hörsturz

Als Hörsturz wird eine plötzlich einsetzende, zumeist auf eine Seite beschränkte Innenohrschwerhörigkeit von oftmals unbekannter Ursache bezeichnet. Häufig kommt es neben der Hörminderung zu Ohrgeräuschen auf dem betroffenen Ohr. Obwohl die Ätiologie noch nicht vollständig geklärt ist, werden als mögliche Ursachen Durchblutungsstörungen, virale Infekte, immunpathologische Mechanismen, Stoffwechselstörungen (z.B. Diabetes mellitus, Hyperurikämie) oder Perilymphfisteln angenommen.

1.4.2 Akustisches Trauma

Durch Lärm, Knall, Explosion oder Ähnlichem hervorgerufene Stoffwechselstörung des Innenohres mit daraus resultierendem O₂-Mangel oder direkter mechanischer Schädigung der Haarsinneszellen, die klinisch als Innenohrschwerhörigkeit, evtl. kombiniert mit Ohrgeräuschen im typischen Frequenzbereich von 4 kHz imponiert.

1.4.3 Altersschwerhörigkeit (Presbyakusis)

Die Altersschwerhörigkeit tritt ab dem 50. Lebensjahr zunehmend auf. Sie äußert sich als seitengleich auftretende Hörminderung vor allem im Hochtonbereich mit herabgesetztem Sprachverständnis bei Hintergrundlärm. Ursächlich sind degenerative Veränderungen im Corti-Organ begünstigt durch die lebenslange Einwirkung schädigender Einflüsse, wie z.B. Lärm,

Durchblutungsstörungen oder andere potentiell innenohrschädigende Grunderkrankungen (Diabetes, Hypertonie etc.).

1.4.4 Tinnitus aurium

Als Tinnitus werden Ohrgeräusche bezeichnet, die klinisch oftmals mit einer Hörminderung vergesellschaftet sind, aber ebenso auch isoliert auftreten können. Es wird dabei zwischen einem objektiven Ohrgeräusch, bei dem eine körpereigene Schallquelle (z.B. eine Stenose der A. carotis interna mit daraus resultierendem Strömungsgeräusch) vorhanden ist, und einem subjektivem Ohrgeräusch, das die Folge einer fehlerhaften Informationsverarbeitung des Hörsystems ist, unterschieden.

1.4.5 Morbus Menière

Dieser Erkrankung des Innenohres liegt ein Hydrops des häutigen Labyrinths zugrunde, der z.B. durch fehlerhafte Endolymphproduktion, gestörte Resorption von Endolymph im Saccus endolymphaticus oder eines Verschlusses des Ductus endolymphaticus entstehen kann. Die Klinik besteht in rezidivierenden Drehschwindelattacken vergesellschaftet mit einem Tinnitus sowie einer Hörminderung des betroffenen Ohres.

1.4.6 Neuronitis vestibularis

Als mögliche Ursachen werden Virusinfekte oder eine Virusreaktivierung sowie Mikrozirkulationsstörungen diskutiert. Die Erkrankung äußert sich in plötzlich einsetzendem Drehschwindel, einem heftigem Spontannystagmus sowie einer Fallneigung zu der betroffenen Seite. In der apparativen Diagnostik zeigt sich eine einseitige vestibuläre Untererregbarkeit bzw. Unerregbarkeit. Hörstörungen treten bei dieser Erkrankung jedoch nicht auf.

1.5 Therapie von Innenohrerkrankungen

Für einige Erkrankungen des Innenohres stehen sowohl medikamentöse als auch operative Therapieverfahren zur Verfügung. An dieser Stelle soll jedoch nur auf die medikamentöse Therapie eingegangen werden.

Grundsätzlich lässt sich die medikamentöse Therapie von Innenohrerkrankungen unterteilen in eine systemische Therapie, die eine orale Verabreichung des Medikaments oder eine i.v.-Gabe beinhaltet, und in eine lokale Medikamentenapplikation, die z.B. als transtympanale Applikation erfolgen kann.

Als Medikamente kommen vor allem Glukokortikoide, Rheologika, ionotrope Medikamente, Thrombozytenaggregationshemmer, antivirale Medikamente sowie diverse andere Substanzklassen zum Einsatz.

1.5.1 Topische Medikamentenapplikation

Die klinische Relevanz der lokalen Medikamentenapplikation an das Innenohr scheint zunehmend größer zu werden, was sich auch in der steigenden Zahl an klinischen Studien und Fallberichten widerspiegelt [4,5,6,7,12,14,15,21,27,35,52].

Mit Hilfe der topischen Applikation können unter Verwendung geringer Mengen des Medikaments hohe Wirkspiegel am Zielorgan erreicht werden [3,9,32]. Die Rate an Nebenwirkungen ist im Vergleich zur systemischen Medikamentengabe deutlich minimiert [4,15,23,27].

Es stehen verschiedene Optionen für die lokale Medikamentenapplikation zur Verfügung. So lässt sich z.B. ein Medikament extracochleär über eine transtympanale Injektion vor die Rundfenstermembran applizieren, dass dann anschließend durch die Membran in die Perilymphe der Scala tympani diffundieren und sich in den restlichen Innenohrflüssigkeiten ausbreiten soll. Um die Verweildauer des Medikaments im Mittelohr zu verlängern, kann dem Arzneistoff ein Volumenstabilisator (z.B. Hyaluronsäure) zugefügt werden, der eine kontinuierliche Abgabe des Wirkstoffs über einen längeren Zeitraum hinweg ermöglicht. Je nach Therapieprotokoll können die Injektionen als „single shot“ oder auch wiederholt durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in der teilweisen oder vollständigen Implantation von Micropumpen, die es ermöglichen, ein Medikament über mehrere Tage an die Rundfenstermembran zu applizieren.

In Form eines Cochlea-Implantates wäre es technisch sogar denkbar, den Arzneistoff direkt intracochleär zu verabreichen.

Momentan kommt die lokale Medikamentenapplikation im Rahmen von klinischen Studien hauptsächlich nach Therapieversagen unter systemischer Therapie als „Rettungsversuch“ zum Einsatz [15,21,23,33,52]. Die bisherigen Ergebnisse zeigen eine große Varianz bezüglich des Outcome der Patienten, was einerseits sicherlich auch auf die sehr unterschiedlichen Therapieprotokolle zurückzuführen ist, andererseits aber auch in der noch nicht ausreichend geklärten Pharmakokinetik des Innenohres begründet ist. So sind beispielsweise für die klinische Anwendung die Prinzipien der Substanzverteilung in den Innenohrflüssigkeiten als auch die zu erwartenden Medikamentenspiegel im Innenohr Faktoren von entscheidender Bedeutung. Zur näheren Untersuchung der Innenohrpharmakologie bieten sich präklinische tierexperimentelle Studien an, die die Gewinnung und die anschließende qualitative sowie quantitative Analyse der Innenohrflüssigkeiten beinhalten. Mit Hilfe dieser Studien ist es möglich unterschiedliche Applikationsmethoden vergleichend zu untersuchen und zu ermitteln, welche Methode im klinischen Einsatz den größten Therapieerfolg verspricht.

1.6 Präklinische pharmakokinetische Untersuchungen zur lokalen Medikamentenapplikation an das Innenohr

Die Grundlage für eine klinische Etablierung lokaler Applikationstechniken bilden präklinische tierexperimentelle Studien, mit deren Hilfe es möglich ist die Pharmakokinetik des Innenohres näher zu untersuchen.

Derzeit existiert allerdings nur eine geringe Anzahl an Studien, die auch eine quantitative Untersuchung der Innenohrflüssigkeiten beinhalten [2,3,9,24,25,28,32]. Zwei dieser Studien mit ähnlichem Applikationsprotokoll lieferten zudem sehr unterschiedliche Perilymphkonzentrationen [3,32].

Die uneinheitliche Datenlage schränkt jedoch die Nutzbarkeit hinsichtlich einer klinischen Anwendung stark ein, weshalb an dieser Stelle einige grundlegende Probleme präklinischer tierexperimenteller innenohrpharmakokinetischer Untersuchungen angesprochen werden sollen:

Eine besondere Herausforderung an die Probenentnahme und die darauf folgende Analytik stellen die äußerst kleinen Volumina der Innenohrflüssigkeiten dar: Das Volumen an Perilymphe einer Meerschweinchen-Cochlea beträgt gerade etwa 10 μl , in der Scala tympani befinden sich nur ungefähr 4,7 μl Perilymphe [53].

Um eine ausreichend große Menge zur Analytik der Perilymphproben zu erhalten, wurden von einigen Arbeitsgruppen bisher Probevolumen entnommen, die dem gesamten Perilymphvolumen entsprechen oder dieses sogar übertreffen [3,9,25,32]. Mit zunehmend größerem entnommenen Perilymphvolumen steigt jedoch auch die Rate an Kontamination der Perilymphe durch zerebrospinale Flüssigkeit, die über das nahe der Cochleabasis gelegene Aquädukt in die Scala tympani gelangt (siehe Abb. 5) und damit zu einem Verdünnungseffekt der Perilymphproben führt [20].

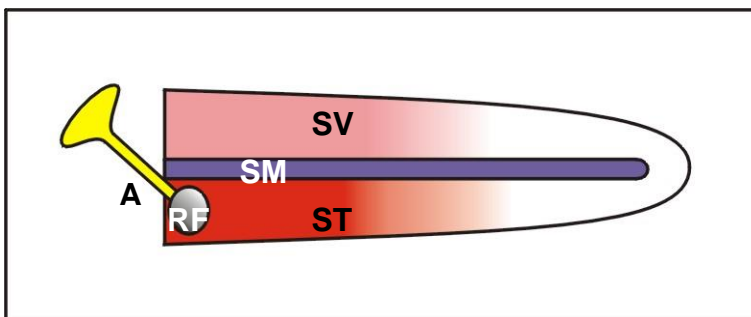


Abb. 5: Schema einer „entrollten“ Cochlea

SV: Scala vestibuli, SM: Scala media, ST: Scala tympani, RF: Rundfenstermembran, A: Aquädukt. Nach: Plontke S (2006) mit freundlicher Genehmigung.

Es wird geschätzt, dass ein Probevolumen von 1 μl , das durch die Rundfenstermembran entnommen wird, ungefähr 80% Perilymphe enthält, wohingegen jedoch Probenvolumina von 10 μl weniger als 20% Perilymphe enthalten [48].

Ebenfalls entscheidend für das Ausmaß einer Kontamination der Proben mit zerebrospinaler Flüssigkeit ist der Ort, an dem die Proben entnommen werden. Bei einer Probenentnahme nahe des Aquädukts ist eine hohe Rate an Kontamination mit zerebrospinaler Flüssigkeit zu erwarten (siehe Abb. 6). Dieser Effekt ist umso geringer ausgeprägt je weiter entfernt sich der

Probenentnahmeort von der Einmündung des Aquädukts nahe der Basis der Cochlea befindet.

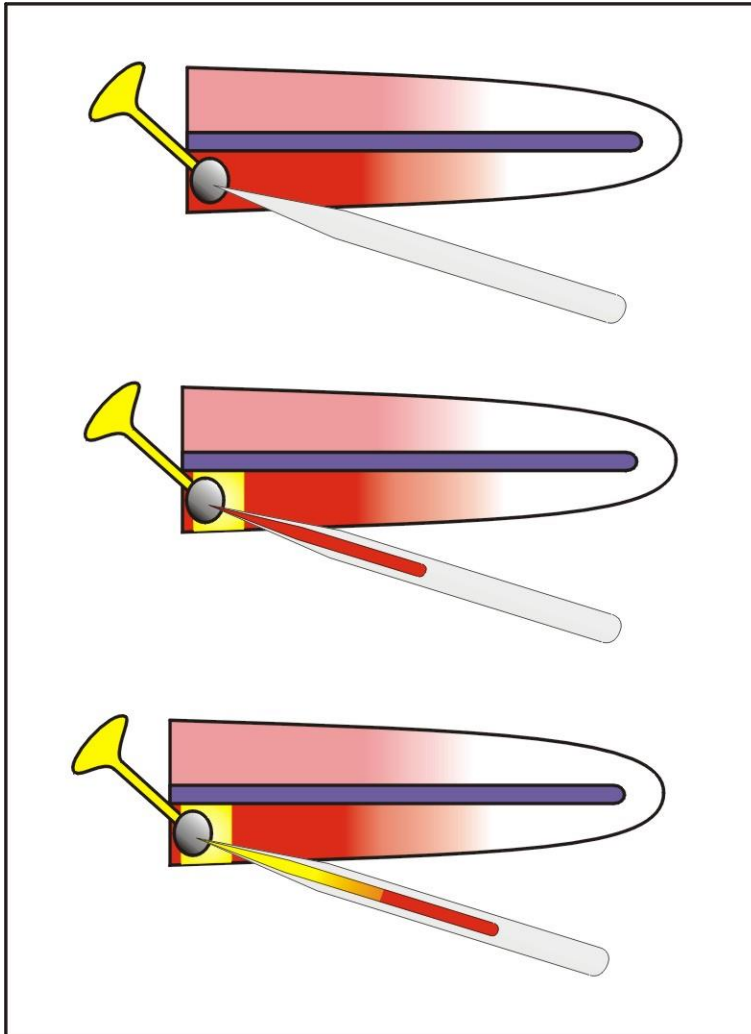


Abb. 6: Kontamination der Perilymphe mit zerebrospinaler Flüssigkeit

Bei einer Probenentnahme durch die Rundfenstermembran kommt es infolge einströmender zerebrospinaler Flüssigkeit (gelb) durch das Aquädukt zu einer Kontamination der Perilymphe (rot) in der Probenkapillare. *Nach: Plontke S (2006) mit freundlicher Genehmigung.*

Zur Minimierung einer Kontamination von Perilymphflüssigkeit durch zerebrospinale Flüssigkeit sollte sich daher der Probenentnahmeort möglichst weit entfernt von der Einmündung des Aquäduktes befinden. Hier bietet sich z.B. eine Probenentnahme im Bereich des Apex der Cochlea an [46].

Eine weitere Ursache, die zu falschen Konzentrationswerten in den Perilymphproben führen kann, stellen die der Scala tympani unmittelbar benachbarten Kompartimente dar. Während der Applikationsphase kommt es zu einer Diffusion der applizierten Substanz aus der Scala tympani entlang eines Gradienten in benachbarte Kompartimente ("Partitioning"). Bei der anschließenden Entnahme der Perilymphproben kommt es zu einer Umkehrung dieser Konzentrationsgradienten mit einer Substanzrückdiffusion in die Scala tympani ("Repartitioning"), was wiederum zu einer Verfälschung der Substanzkonzentrationen in der Scala tympani führt.

Dieser Verteilungsprozess soll an entsprechender Stelle bei der Beschreibung der sequentiellen apikalen Probenentnahmetechnik näher erläutert werden.

Eine Möglichkeiten zur besseren Interpretation der gewonnen Perilymphproben stellen Computermodelle wie z.B. das Finite-Element-Computermodell der Washington University School of Medicine dar (<http://oto.wustl.edu/cochlea/>), das pharmakokinetische Prinzipien der Innenohrflüssigkeiten, verschiedene lokale Applikationstechniken sowie Probeentnahmetechniken berücksichtigt. Mit Hilfe der damit durchgeführten, auf den experimentellen Daten beruhenden Computersimulationen lassen sich bessere Aussagen über die erreichten Medikamentenkonzentrationen innerhalb der Innenohrflüssigkeiten kurz vor dem eigentlichen Probenentnahmeverfahren machen als dies die alleinige Analyse der Probenkonzentrationen ermöglicht. Die Rate an Fehlern, die durch das Probenentnahmeverfahren selbst z.B. infolge Kontamination verursacht wird, kann dadurch minimiert werden.

1.7 Prinzipien der Pharmakokinetik des Innenohres

Die Substanzverteilung in den Innenohrflüssigkeiten unterscheidet sich von der des Blutkreislaufs. Anders als im Blutkreislauf findet hier keine rasche aktive Verteilung durch schnelle Zirkulation statt. Es existieren zwar in der nicht eröffneten Cochlea Endo- und Perilymphflüsse, diese sind jedoch sehr gering und sind deshalb nicht die Hauptfaktoren, die für die Verteilung von Substanzen in den cochleären Flüssigkeiten ausschlaggebend sind [31,49,51]. Die Diffusion

scheint somit der wichtigste Faktor für die Substanzverteilung in den Innenohrflüssigkeiten zu sein [45,49].

Entsprechend der Substanzverteilung im Innenohr wird für die Rundfenstermembran ebenfalls Diffusion als der wichtigste Parameter angenommen für den Übertritt von an die Rundfenstermembran applizierten Substanzen in die Perilymphe der Scala tympani. Für sehr große Moleküle werden aktive Transportprozesse vermutet, jedoch konnten diese Annahmen experimentell noch nicht ausreichend bestätigt werden [16]. Die Rundfenstermembran, die sich aus drei Schichten zusammensetzt (innerer und äußerer Epithelzellschicht mit dazwischen liegender Bindegewebsschicht) [17], verhält sich wie eine semipermeable Membran, was durch diverse tierexperimentelle Untersuchungen gezeigt werden konnte. Die Permeabilität der Rundfenstermembran spielt eine wichtige Rolle für die in das Innenohr gelangende Menge eines Medikaments. Für die Verteilung in den einzelnen Scalae der Cochlea sind jedoch andere Prozesse verantwortlich.

Salt teilt diese Prozesse in zwei Gruppen ein: *longitudinale und radiale Prozesse* [31,45,50]:

Zu den *longitudinalen Prozessen* zählen der Übertritt von Medikamenten vom Mittelohr durch die Rundfenstermembran in die Scala tympani, die Diffusion entlang der Scalae, die Kommunikation von Scala tympani und Scala vestibuli über das Helicotrema sowie der Übergang von Medikamenten aus dem basalen Anteil der Scala vestibuli in das Vestibulum.

Die *radialen Prozesse* beinhalten als wichtigsten Faktor die Clearance, die vor allem den Übergang von in den Innenohrflüssigkeiten befindlichen Medikamenten in den Blutkreislauf im Bereich der lateralen Wand der Cochlea sowie im Bereich des Modiolus beschreibt (siehe Abb. 7).

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass in dem Finite-Element-Computermodell der Washington University School of Medicine die Clearance alle Eliminationsprozesse beinhaltet, d.h. ihr werden ebenso die Aufnahme von Medikamenten in die Flüssigkeitsräume des Modiolus sowie die Aufnahme in Interzellularräume als auch die Inaktivierung von Substanzen infolge Metabolismus oder Bindung an Gewebe zugezählt.

Ebenfalls den radialen Prozessen zugeordnet ist die Kommunikation zwischen den einzelnen Kompartimenten, so z.B. die Kommunikation der Scala tympani mit der Scala vestibuli über die laterale Wand hinweg.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass entsprechend dem gegenwärtigen Erkenntnisstand die Substanzverteilung eines in den Innenohrflüssigkeiten befindlichen Medikamentes hauptsächlich von der Diffusion und Clearance des jeweiligen Medikamentes bestimmt wird.

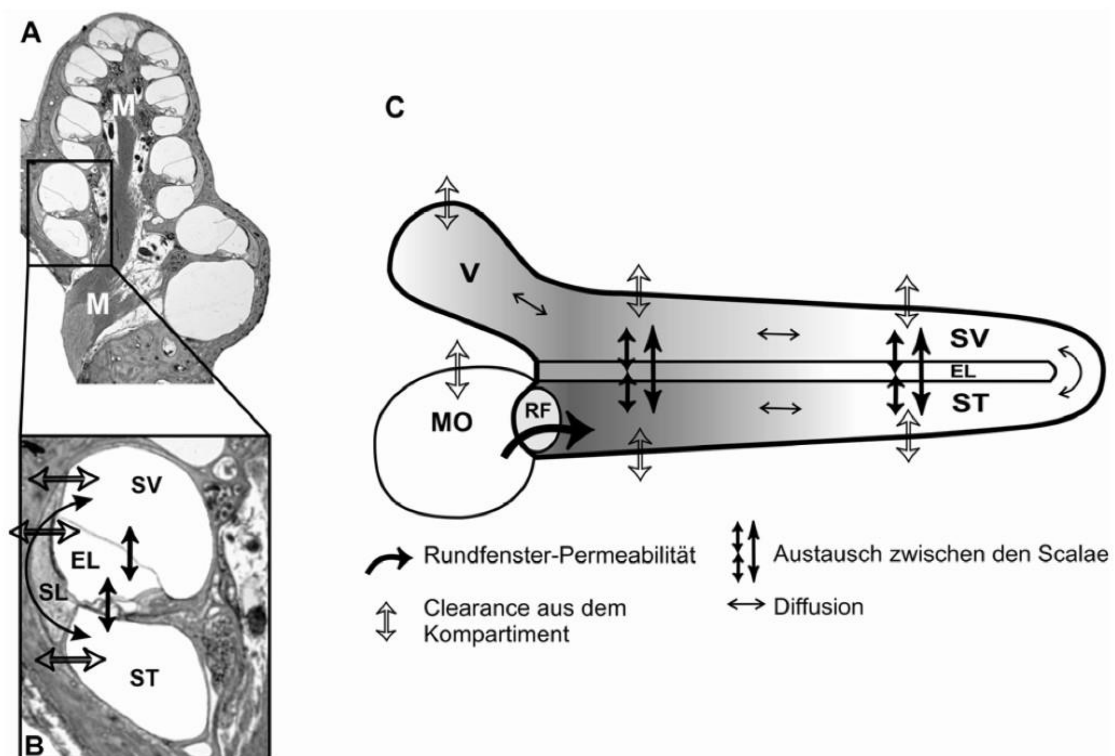


Abb. 7: Prinzipien der Substanzverteilung im Innenohr

Querschnitt durch die Meerschweinchencochlea (A) und Ausschnitt einer Windung (B). M: Modiolus, ST: Scala tympani, SV: Scala vestibuli, EL: Endolymphraum. Die "radialen" Substanzverteilungsprozesse umfassen den Austausch zwischen den verschiedenen Kompartimenten (Scalae) und die Clearance aus den Scalae/Vestibulum in den Blutkreislauf des Körpers oder in den Modiolus.

C: Schema von Cochlea und Vestibulum „aufgerollt“: Zu den „longitudinalen“ Prozessen gehören die geometrischen Dimensionen der Scalae, Diffusion entlang der Scalae, über das Helikotrema und in das Vestibulum (V) und bei lokaler Applikation in das Mittelohr (MO) der Eintritt der Substanz über die Rundfenstermembran (RF). © Plontke S (2006) mit freundlicher Genehmigung

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit ist die Bestimmung und der Vergleich von Konzentrationsgradienten entlang der Perilymphe in der Scala tympani nach Applikation von Dexamethason-21-dihydrogenphosphat durch zwei unterschiedliche Applikationsverfahren (lokale extracochleäre Applikation an die Rundfenstermembran bzw. intracochleäre Applikation).

Zur Minimierung von Artefakten, die insbesondere auch durch die Perilymphprobengewinnung im Tierexperiment zu erwarten sind, wird für die Interpretation der tierexperimentellen Daten ein Computersimulationsprogramm verwendet, das die Besonderheiten der Pharmakokinetik des Innenohrs berücksichtigt.

2 Material und Methodik

2.1 Verwendete Tiere und Tierversuchsgenehmigung

Sämtliche Versuche wurden an gesunden, adulten Meerschweinchen (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt, deren Gewicht bei Versuchsdurchführung zwischen 300 g und 600 g betrug. Für alle Versuchstiere lag eine Genehmigung durch das Regierungspräsidium Tübingen vor.

2.1.1.1 Narkoseverfahren und Versuchsvorbereitung

Neun Meerschweinchen wurden initial über eine intraperitoneale Bolusgabe mit 8 mg/kg KG Xylazin (Rompun[®], Bayer, Leverkusen, Deutschland) sowie 140 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid (Ketavet[®], Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Deutschland) narkotisiert. Zur Unterdrückung der Schleimsekretion des Bronchialsystems wurde dem Narkosegemisch 0,3 mg/kg KG Atropinsulfat (BBraun, Melsungen, Deutschland) zugefügt.

Nach Erreichen der gewünschten Narkosetiefe wurde das Tier im operativen Zugangsgebiet rasiert und anschließend auf eine mit einer Wärmematte (CMA/150 Temperature Controller, CMA Microdialysis, Kista, Schweden) ausgestatteten Hebebühne platziert. Über einen Temperaturmessfühler wurde die Temperatur konstant auf 37,5°C gehalten. Anschließend erfolgte die Fixierung des Kopfes in einer dafür typischen Kopfhaltung sowie die Lokalanästhesie im Bereich des Hautschnittes mit 1ml Prilocain 1% (Xylonest[®], AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland).

2.1.1.2 Chirurgischer Zugang zur Cochlea

Zunächst wurde die Haut über der gesamten rechten Unterkieferpartie bis zur Medianlinie unter Zuhilfenahme einer Schere entfernt. Die weiteren Schritte fanden dann unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskops in mikrochirurgischer Technik statt. Das darunter liegende Speicheldrüsengewebe wurde abgetragen. Anschließend wurden die Halsfaszien mit einer spitz-spitzen

Schere eröffnet, so dass die Trachea sichtbar wurde. Diese wurde daraufhin vollständig freipräpariert und unterminiert. Im Anschluss erfolgte die Eröffnung der Trachea an der ventralen Seite mit Einführung eines Silikonschlauchs zur Sicherung der Atemwege. Die spontane Atmung des Tieres konnte nun auch am sichtbaren Kondenswasser im Trachealschlauch verfolgt werden. Falls erforderlich, konnte dem Versuchstier nun auch über den Silikonschlauch Sauerstoff zugeführt werden.

Nach Unterbindung der V. jugularis erfolgte die Präparation am medialen Rand des M. masseter entlang in die Tiefe. Der dort lokalisierte M. stylohyoideus wurde an seinem Ursprung am Proc. styloideus durchtrennt und vollständig herausgelöst. Nach Auffinden der Bulla wurde diese – soweit möglich – freigelegt. Daraufhin erfolgte mit einem Skalpell die Inzision des Periosts und dessen Ablösung vom Knochen unter Zuhilfenahme eines Tellermessers.

Um einen ausreichend großen Zugangsweg zur Bulla zu schaffen, wurde der M. masseter gespalten und der darunter befindliche rechte Unterkieferast freipräpariert. Mit einer Schere wurde anschließend der rechte Unterkieferast frakturiert, so dass sich das Gewebe unter Zuhilfenahme eines Wundspreizers nach lateral abdrängen ließ. Die Bulla wurde daraufhin nach kaudal hin weiter freipräpariert, hierzu wurde auch das Köpfchen des Proc. styloideus abgetragen.

Die Ränder der nun ausreichend freigelegten Bulla wurden mit kleinen Stückchen Kimwipes® (Kimberly Clark, Koblenz, Deutschland) austamponiert, um ein Volllaufen der Bulla mit Blut bei der Eröffnung zu verhindern. Mit der Spitze eines Skalpells wurde mit kreisenden Bewegungen ein Loch in die Bulla gebohrt, das sich anschließend mit einer anatomischen Pinzette mühelos erweitern ließ. Um möglichst viel Platz für die Applikationskapillare zu erhalten, wurde das Gewebe über der Bulla zusätzlich mit Umstechungen zur Seite gedrängt.

2.1.1.3 Präparation der Cochleaspitze

Nach vorsichtigem Entfernen der Schleimhaut wurde der Apex der Cochlea mit einer dünnen Schicht Cyanacrylat-Kleber (tesa, Hamburg, Deutschland)

bedeckt, um einen Haftgrund für das anschließend folgende Zwei-Komponenten-Silikon (Kwik-Cast[®], World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) zu schaffen. Nun wurde der Apex – bis auf den Bereich, in dem die Probenentnahme erfolgen sollte – mit Kwik-Cast[®] bedeckt, um durch dessen hydrophobe Eigenschaften einen ungewollten Verlust von dort austretender Perilymphe zu verhindern (siehe Abb. 8).

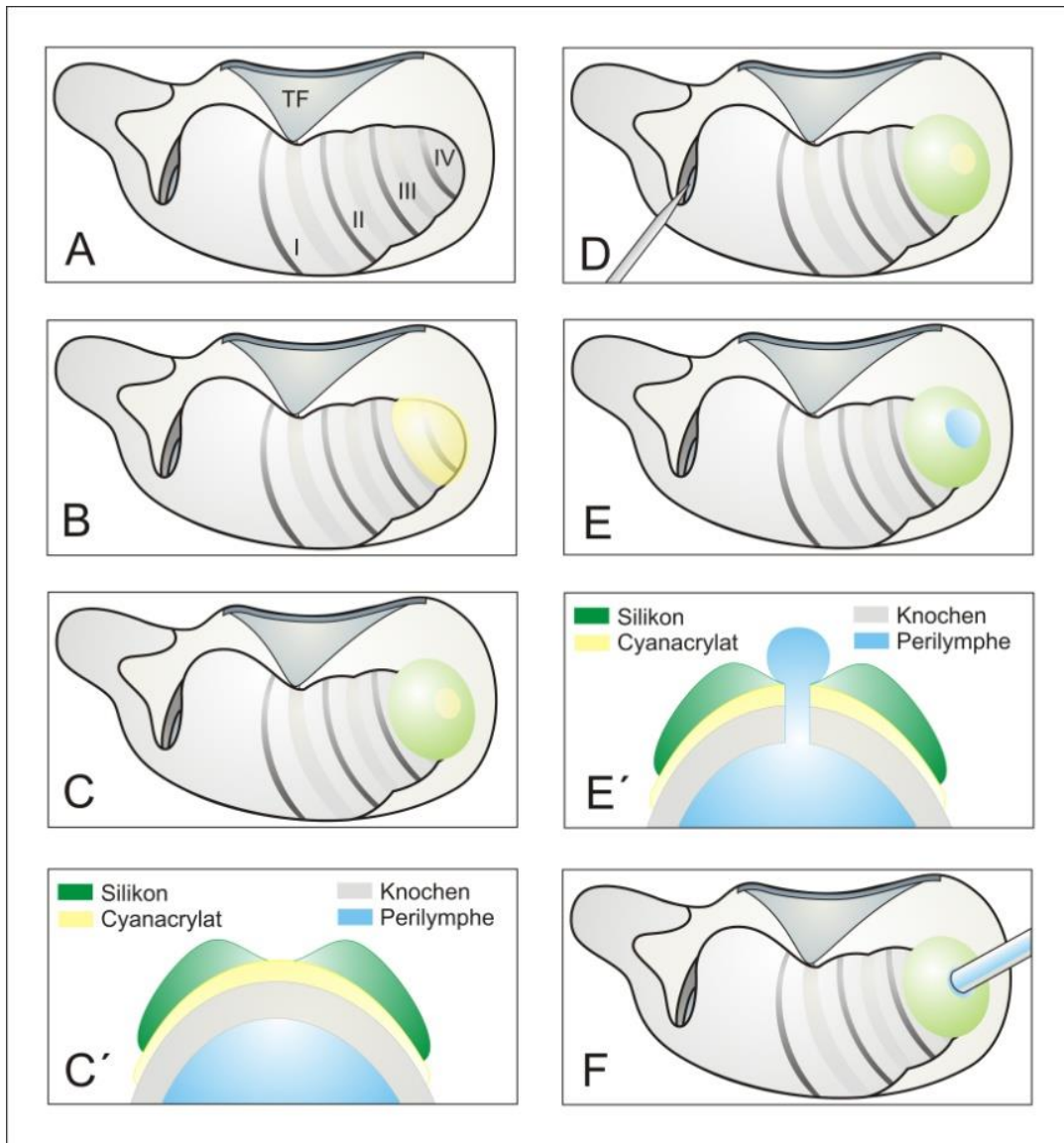


Abb. 8: Präparation der Cochleaspitze für die sequentielle apikale Probenentnahme

A: Blick auf die eröffnete Bulla. TF: Trommelfell; I-IV: Cochleawindungen. B: Der Apex der Cochlea wird mit einer dünnen Schicht Cyanacrylat-Kleber (gelb) bedeckt um einen guten Haftgrund zu erhalten. C: Um den Apex herum wird ein trichterförmiger Wall bestehend aus Kwik-Cast® aufgebaut. C': Schnitt durch den präparierten Apex. D: Es erfolgt die lokale Applikation an die Rundfenstermembran mittels einer Glaskapillare. E: Nach Perforation des Apex tritt Perilymphe aus und bleibt aufgrund der hydrophoben Eigenschaften des Kwik-Cast® an Ort und Stelle und bildet einen Tropfen. E': Schnitt durch den perforierten Apex. F: Die austretende Perilymphe kann nun unter Zuhilfenahme einer Glaskapillare problemlos gesammelt werden. *Nach: Plontke S (2006) mit freundlicher Genehmigung.*

2.1.2 Applikation

Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt, die sich hinsichtlich der Applikation von Dexamethasondihydrogenphosphat unterschieden. Das erste Applikationsprotokoll beinhaltete die *lokale Applikation an die Rundfenstermembran*, das zweite Protokoll verwendete die *intracochleäre Applikation*, die über eine Injektion durch die Rundfenstermembran in die Scala tympani der Cochlea erfolgte.

2.1.2.1 Lokale Applikation an die Rundfenstermembran

Falls erforderlich wurde die Cochleabasis zur ausreichenden Darstellung der Rundfensternische weiter freigelegt. Zur Applikation wurde eine dünn ausgezogene Glaskapillare, an deren Ende ein Schlauch mit Zweikomponenten-Epoxidharzkleber befestigt wurde, verwendet (Abb. 9).

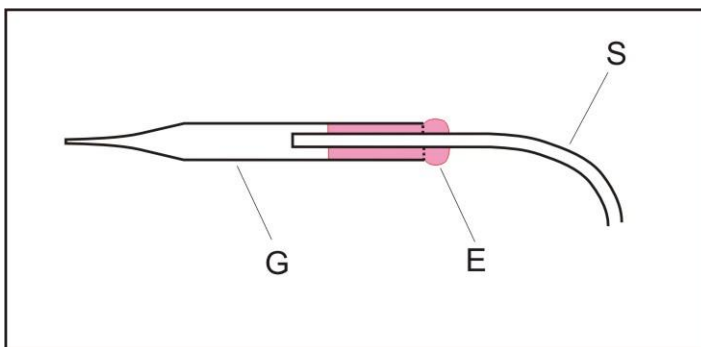


Abb. 9: Applikationskapillare

G: Glaskapillare, E: Zweikomponenten-Epoxidharzkleber, S: Silikonrohr.

Die Applikationskapillare wurde über eine Pipettenhalterung in einem Mikromanipulator eingespannt. Auf diese Weise war es möglich, die Kapillarspitze an der Rundfensternische exakt auszurichten ohne die Rundfenstermembran zu verletzen (siehe Abb. 10).

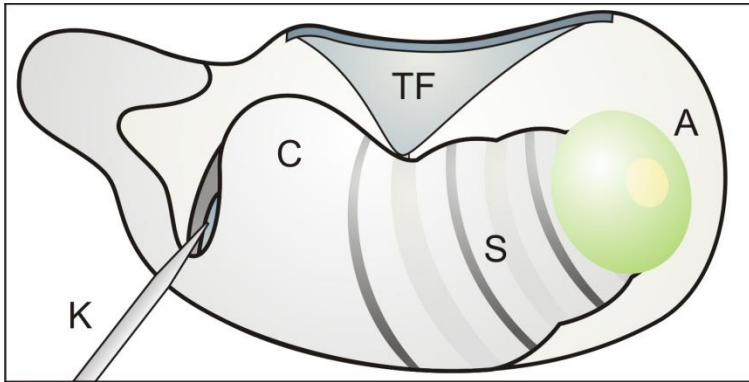


Abb. 10: Lokale Applikation an die Rundfenstermembran

Blick auf die eröffnete Bulla. Zu sehen sind die Cochlea (C) mit durchscheinender Stria vascularis (S), der bereits mit KWIK-Cast® präparierte Apex der Cochlea (A), das Trommelfell (TF) sowie die zur lokalen Applikation an die Rundfenstermembran in der Rundfensternische positionierte Glaskapillare (K). *Nach: Plontke S (2006) mit freundlicher Genehmigung.*

Die Applikation erfolgte über einen Perfusor (CMA/102 Microdialysis Pump, CMA Microdialysis, Kista, Schweden), der mit dem Schlauch der Applikationskapillare verbunden war. Zu Beginn der Applikation wurde jeweils die Rundfensternische kurzzeitig mit der höchsten Flussrate des Perfusors (20 µl/min) mit Dexamethason-21-dihydrogenphosphat (Fortecortin® Inject, Merck, Darmstadt, Deutschland, 10 mg/ml) geflutet. Anschließend erfolgte die Applikation mit einer Flussrate von 2 µl/min über einen Zeitraum von 2 bis 3 Stunden.

2.1.2.2 Intracochleäre Applikation

Zunächst wurde die Rundfenstermembran mit einer Schicht Healon® (Abbott Laboratories Inc., Abbott Park, Illinois, USA) bedeckt um ein Austrocknen der Membran zu verhindern sowie einem ungewollten Austritt von Perilymphe beim Durchstechen der Rundfenstermembran vorzubeugen. Anschließend erfolgte unter mikroskopischer Sichtkontrolle das Durchstechen der Rundfenstermembran mit einer dünn ausgezogenen Glaskapillare (siehe Abb. 11), die an einem Pumpensystem mit Mikromanipulator befestigt war. Mit Hilfe des Pumpensystems (Micropump, World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) war es möglich eine kontinuierliche Injektion in die Scala tympani der Cochlea zu gewährleisten.

Die intracochleäre Injektion von Dexamethason-21-dihydrogenphosphat (Fortecortin® Inject, Merck, Darmstadt, Deutschland, 10 mg/ml) erfolgte mit einer Flussrate von 100 nl/min über einen Zeitraum von 20 Minuten, die injizierte Menge betrug somit 2 µl mit 20 µg Dexamethasondihydrogenphosphatlösung.

Nach erfolgter Injektion wurde die Injektionskapillare weitere 5 Minuten in der Scala tympani belassen, um eine vollständige Entleerung der Kapillare zu gewährleisten. Anschließend wurde die Kapillare aus der Scala tympani durch vorsichtiges Zurückziehen entfernt.

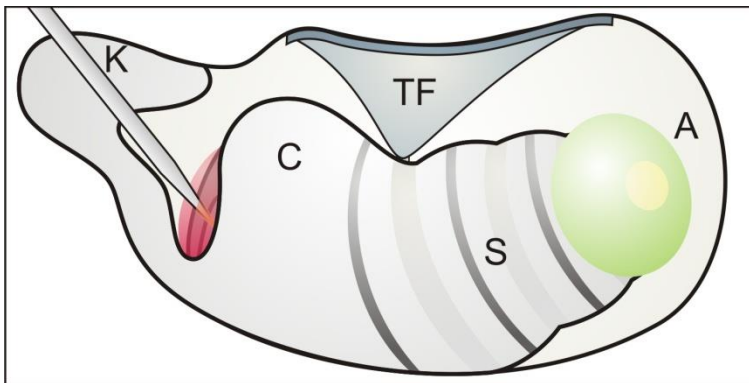


Abb. 11: Intracochleäre Applikation

Blick auf die eröffnete Bulla. Die Rundfenstermembran wurde zunächst mit Healon® (rot) bedeckt, anschließend wurde mit einer dünnen Glaskapillare (K) die Rundfenstermembran durchstoßen. C: Cochlea, TF: Trommelfell, S: Stria vascularis, A: mit KWIK-Cast® präparierter Apex der Cochlea. Nach: Plontke S (2006) mit freundlicher Genehmigung.

2.1.3 Probenentnahme

In beiden Versuchsreihen wurden die Perilymphproben der Cochlea mit Hilfe der *sequentiellen apikalen Probenentnahmetechnik* gewonnen, die eine Modifikation der *apikalen Probenentnahmetechnik* darstellt.

2.1.3.1 Apikale Probenentnahmetechnik

Die Perilymphe der Scala tympani steht, bedingt durch die Verbindung mit dem Aquaeductus cochlearis unter intrakraniellm Druck. Wird nun der Apex eröffnet, kommt es zu einem druckbedingten Austritt von Perilymphe aus der Scala tympani an der Perforationsstelle. Die apikal austretende Perilymphe wird dabei im basalen Anteil der Cochlea durch über das Aquädukt einströmende zerebrospinale Flüssigkeit ersetzt. Die am Apex austretende Perilymphe kann nun mittels speziellen kalibrierten Kapillaren (Blaubrand® intraMARK, BRAND GmbH, Wertheim, Deutschland) problemlos gesammelt werden (siehe Abb. 12). Es ist so möglich die gesamte Perilymphe aus der Scala tympani zu sammeln, denn durch den nach apikal zur Perforationsstelle hin gerichteten Perilymphstrom tritt nur Perilymphe aus der Scala tympani nicht jedoch aus der Scala vestibuli aus.

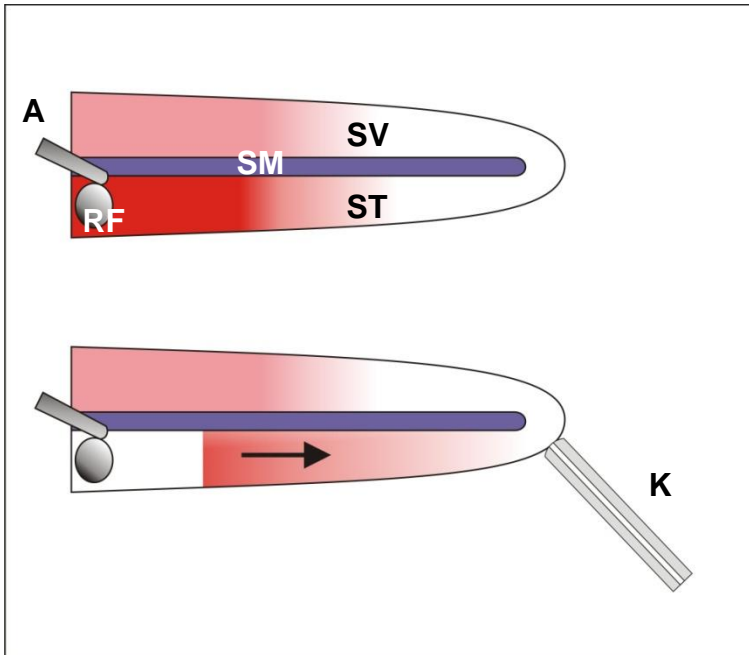


Abb. 12: Apikale Probenentnahmetechnik

Schema einer „entrollten Cochlea“ nach lokaler Medikamentenapplikation an die Rundfenstermembran (RF). Die das Medikament enthaltende Perilymphe ist rot dargestellt. Bei Perforation des Apex tritt die Perilymphe der Scala tympani aus infolge einströmender zerebrospinaler Flüssigkeit (weiß) über das Aquädukt (A) in den basalen Anteil der Cochlea. Mit Hilfe einer Glaskapillare (K) lässt sich die so am Apex austretende Perilymphe leicht sammeln. SM: Scala media, ST: Scala tympani, SV: Scala vestibuli. *Nach: Plontke S (2006) mit freundlicher Genehmigung.*

2.1.3.2 Sequentielle apikale Probenentnahmetechnik

Eine Modifikation der apikalen Probenentnahmetechnik stellt die sequentielle apikale Probenentnahmetechnik dar. Im Unterschied zur erstgenannten Technik wird bei dieser nicht ein einzelnes Probenvolumen sondern mehrere kleine, meist 1 µl messende, Probenvolumina kurz nacheinander entnommen (siehe Abb. 13).

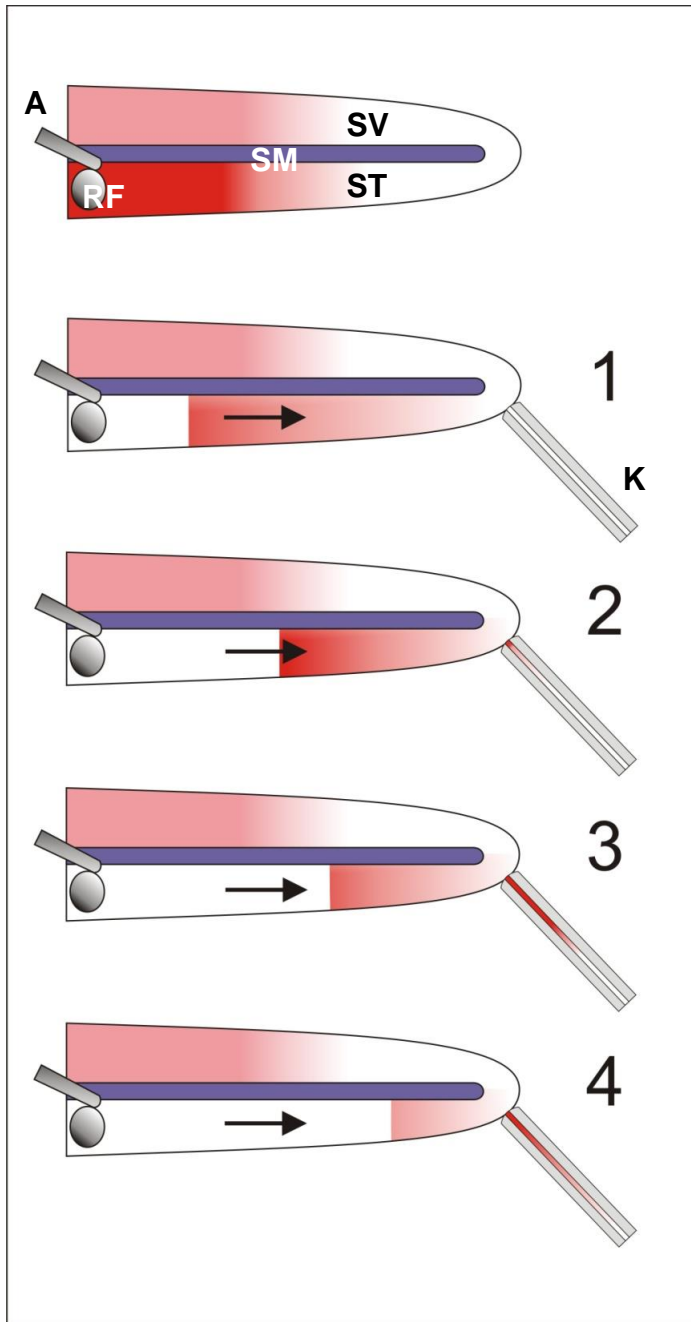


Abb. 13: Sequentielle apikale Probenentnahmetechnik

Schema einer „entrollten Cochlea“ nach lokaler Medikamentenapplikation an die Rundfenstermembran (RF). Die das Medikament enthaltende Perilymphe ist rot dargestellt. Bei Perforation des Apex tritt die Perilymphe der Scala tympani aus infolge einströmender zerebrospinaler Flüssigkeit (weiß) über das Aquädukt (A) in den basalen Anteil der Cochlea. Mit Hilfe einer Glaskapillare (K) lässt sich die so am Apex austretende Perilymphe leicht sammeln. Die Zahlen kennzeichnen einzelne nacheinander entnommene Proben. Beachte die Konzentrationsunterschiede in den Proben, gekennzeichnet durch unterschiedliche Rottöne. SM: Scala media, ST: Scala tympani, SV: Scala vestibuli. *Nach: Plontke S (2006) mit freundlicher Genehmigung.*

Die jeweils 1 μl messenden Probevolumen lassen sich nun entsprechend der Reihenfolge ihrer Entnahme bestimmten Bereichen der Scala tympani zuordnen. So enthält z.B. die erste Probe Perilymphe aus dem apikalen Anteil der Scala tympani, wohingegen die nachfolgenden Proben Perilymphe aus mehr basal lokalisierten Anteilen der Scala tympani enthalten (siehe Abb. 14). Nach einer Entnahme von ungefähr 4 μl kommt es zu einer zunehmenden Kontamination der Perilymphe durch über das Aquädukt einströmende zerebrospinale Flüssigkeit. Da das Perilymphvolumen der Scala tympani ca. 4,7 μl beträgt, setzt sich die gesammelte Flüssigkeit der fünften 1 μl -Probe zusammen aus ungefähr 0,7 μl Perilymphe und 0,3 μl zerebrospinaler Flüssigkeit.

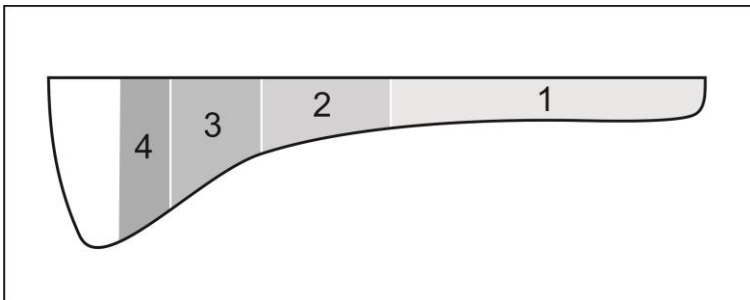


Abb. 14: Scala tympani in 1 μl -Kompartimente unterteilt

Schema einer „entrollten“ Scala tympani. Einteilung der Scala tympani in jeweils 1 μl messende Kompartimente (grau). Die Zahlen geben die Probennummern an, in denen sich nach sequentieller apikaler Probenentnahme Perilymphe aus diesen Abschnitten wiederfinden würde.

In den durchgeführten Experimenten wurden jeweils 10 kurz aufeinander folgende Perilymphproben mit einem Volumen von jeweils ungefähr 1 μl mit Hilfe von speziellen kalibrierten Kapillaren (Blaubrand® intraMARK, BRAND GmbH, Wertheim, Deutschland) entnommen. Lediglich in einem Experiment wurden anstatt der ersten 1 μl -Probe zwei 0,5 μl messende Proben entnommen, die Gesamtzahl der Proben betrug hier also 11. Der Grund für die Unterteilung der ersten Probe ist die Annahme, dass das erste entnommene 1 μl messende Probevolumen Perilymphe aus einem sehr großen apikalen Bereich von ungefähr 10 mm Länge entlang der Scala tympani (entspricht mehr als 50 % der Gesamtlänge der Scala tympani) enthält.

Bei der Analyse der beiden 0,5 µl messenden Proben zeigte sich jedoch, dass beide unterhalb des Detektionslimits lagen, woraufhin in den darauf folgenden Experimenten auf eine erneute Unterteilung der ersten Probe verzichtet wurde.

2.1.3.3 Vorgehensweise

2.1.3.3.1 Lokale Applikation an die Rundfenstermembran

Nach Applikationsende wurde die Kapillare vorsichtig entfernt, die Rundfenstermembran mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und mit Hilfe von kleinen vorgefertigten Stückchen Kimwipes® trockengelegt. Der Apex der Cochlea wurde ebenfalls auf die gleiche Weise gespült und trockengelegt, um eine eventuelle Kontamination des Apex zu minimieren.

Nun wurde der Apex an der beabsichtigten Entnahmestelle vorsichtig mit einem feinen Häckchen eröffnet, und die austretende Perilymphe mit speziellen Glaskapillaren (Blaubrand® intraMARK, BRAND GmbH, Wertheim, Deutschland) entnommen. Es wurden jeweils 10 kurz aufeinanderfolgende Proben zu je ca. 1 µl Volumen entnommen.

Die Perilymphproben wurden im Anschluss daran in 7-13 µl Aqua dest. verdünnt und tiefgekühlt bei -20°C gelagert bis zur Übergabe an die Mitarbeiter des Instituts für klinische Pharmakologie zur Analytik.

2.1.3.3.2 Intracochleäre Injektion

Nach erfolgter Injektion wurde die Injektionskapillare weitere 5 Minuten in der Scala tympani belassen, um den Druckabbau in der Injektionspipette nach Ausschalten der Pumpe zu gewährleisten. Anschließend wurde die Kapillare aus der Scala tympani durch vorsichtiges Zurückziehen entfernt. Nach einer Wartezeit von 15 Minuten (Experimente 9-15) bzw. 75 Minuten (Experimente 16-19) wurde der Apex der Cochlea, wie bei der lokalen Applikation weiter oben bereits beschrieben, eröffnet und 10 aufeinanderfolgende Perilymphproben mit jeweils ca. 1 µl Volumen unter Zuhilfenahme geeichter Glaskapillaren entnommen.

Alle Proben wurden anschließend in 9 bzw. 13 µl Aqua dest. verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.1.4 Probenanalyse

Die quantitative Analytik von Dexamethason-21-dihydrogenphosphat und Dexamethasonbase erfolgte durch eine Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) in dem Institut für klinische Pharmakologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Die quantitative Analytik wurde durch Frau Dr. rer. nat. Ursula Delabar und Herrn PD Dr. rer. nat. Bernd Kammerer im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation durchgeführt.

Das HPLC-System setzte sich zusammen aus einer Pumpe (Sykam S 1121, Fa. Sykam, Gilching, Deutschland) mit einem Gradientenmischer (Sykam S 8111), einem UV-Vis Photometer (S 3240), einem Säulen Thermo Regler (S 4011) und einem automatischen Probengeber (S 5200). Der mit Hilfe des UV-Detektors untersuchte UV-Bereich betrug 200- 600 nm in 3 nm-Intervallen.

Die Reversed-Phase-Chromatographie wurde durchgeführt in einer Grom-SIL 120 ODS-3 CP-Trennsäule (5 µm, 250x4 mm; Grom Analytik, Rottenburg, Deutschland), der eine Vorsäule (Grom-Sapphire 110 C18; 5 µm, 10x4 mm; Grom Analytik) zur Vermeidung von Verunreinigungen der Hauptsäule vorgeschaltet war.

Die mobile Phase setzte sich zusammen aus Kaliumdihydrogenphosphat (25 mM) und Acetonitril (70:30 v/v) mit einer Flussrate von 600 µl/min unter isokratischen Bedingungen. Die detektierten UV-Wellenlängen betragen 241 nm und 254 nm.

Die Peaks für Dexamethason-21-dihydrogenphosphat und Dexamethasonbase zeigten sich nach einer Retentionszeit von 7,0 min bzw. 26,1 min. Das *limit of detection* (LOD) lag für Dexamethason-21-dihydrogenphosphat bzw. Dexamethasonbase bei 0,1 µg/ml bzw. 0,5 µg/ml, das *limit of quantification* (LOQ) betrug 0,195 µg/ml bzw. 1,0 µg/ml.

2.1.5 Computersimulation

Zur Computersimulation wurde das öffentlich verfügbare Finite-Element-Computermodell der Washington University School of Medicine "Fluidsim" (©

Alec N. Salt) verwendet (<http://oto.wustl.edu/cochlea/>). Für die Simulation der lokalen Applikation an die Rundfenstermembran kam die zum damaligen Zeitpunkt aktuellste Version 16i zum Einsatz. Für die Simulationen zur intracochleären Injektion wurde Version 17a verwendet, die um einige Parameter zur intracochleären Applikation erweitert wurde (u.a. wurde ein „Perilymph-Leak“ in die Simulation aufgenommen).

Basierend auf den Messdaten wurden für jedes Experiment zahlreiche Computersimulationen durchgeführt und dabei jeweils einzelne Parameter verändert bis sich eine beste Übereinstimmung der simulierten Werte mit den Messdaten ergab [42]. Darauf aufbauend war es möglich, ein Konzentrationsprofil der applizierten Substanz entlang der Scala tympani zu einem beliebigen Zeitpunkt zu erstellen. Somit war es auch möglich, die Konzentrationsverteilung einer applizierten Substanz in der Scala tympani kurz vor dem eigentlichen Probenentnahmevorgang darzustellen.

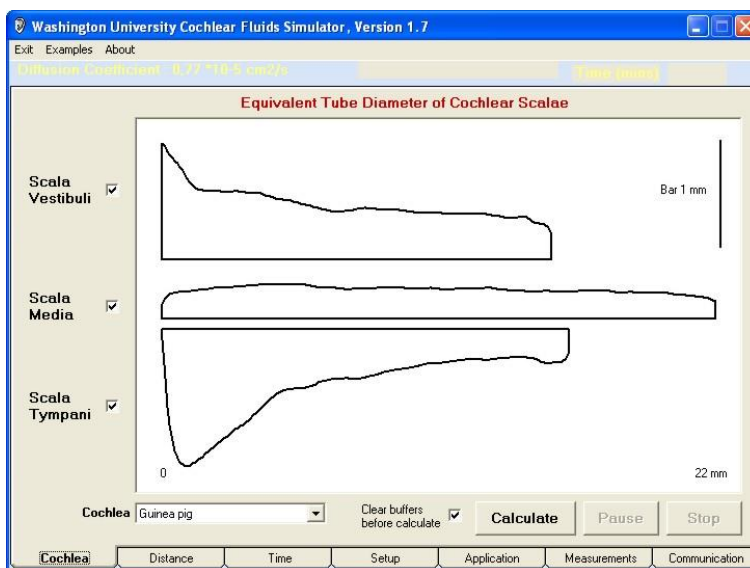


Abb. 15: Das Finite-Element-Computermodell „Fluidsim“ (© Alec N. Salt)

Das Simulationsprogramm berücksichtigt die geometrischen Verhältnisse der Meerschweinchencochlea wie beispielsweise den Durchmesser der Rundfenstermembran oder deren geometrische Beziehung zur Scala tympani [13]. Jede Scala wird in Segmente von 0,1mm Länge mit der jeweils

dazugehörenden Fläche und Volumen aufgeteilt. Die einzelnen Scalae werden dabei in Querschnittsflächen in Abhängigkeit ihrer jeweiligen Entfernung zur Basis der Cochlea unterteilt [53].

Weiterhin werden Substanzverteilungsprozesse wie die Diffusion entlang den Scalae sowie die Clearance einer Substanz aus den cochleären Flüssigkeiten hin zu anderen Kompartimenten (wie z.B. Blut) als auch der Substanztausch zwischen den einzelnen Scalae oder der Übertritt von Substanzen in die der Scala tympani benachbarte Kompartimente und die Flussrate der Perilymphe in der nicht eröffneten Cochlea berücksichtigt.

Der Clearance kommt in der Computersimulation eine besondere Bedeutung zu: sie umfasst alle Eliminationsprozesse und beinhaltet somit auch die Bindung der applizierten Substanz an Lipide und Proteine sowie andere metabolische Prozesse.

Die quantitative Genauigkeit des Simulationsprogrammes wurde mehrfach experimentell bestätigt [31,49].

2.1.6 Anpassung der Computersimulation an die experimentellen Messdaten

Für jedes Experiment wurden die exakte zeitliche Dauer der Applikation, die benötigte Entnahmezeit der einzelnen Perilymphproben, das jeweilige Probevolumen sowie ein für das applizierte Medikament spezifischer Diffusionskoeffizient in das Computermodell eingetragen. Zusätzlich zu diesen in jedem Experiment konstant bleibenden Werten wurden bestimmte pharmakokinetische Parameter variiert, um eine möglichst genaue Anpassung der aus der Simulation gewonnenen Daten an die gemessenen Perilymphprobenwerte zu erhalten (Abb. 16). Auf diese Weise war es somit möglich, über die optimale Anpassung der Simulationsdaten an die gemessenen Werte durch Variation pharmakokinetischer Parameter, diese näher zu bestimmen.

Bei den variierten Parametern handelte es sich um:

- 1) Clearance
- 2) Diffusion aus Scala tympani in Nachbarkompartimente
- 3) Perilymphfluss

4) In Abhängigkeit von der Applikationsmethode:

a. *lokale Applikation an die Rundfenstermembran:*

Permeabilität der Rundfenstermembran

b. *intracochleäre Injektion:*

Perilymph-Leak im Bereich der Rundfenstermembran

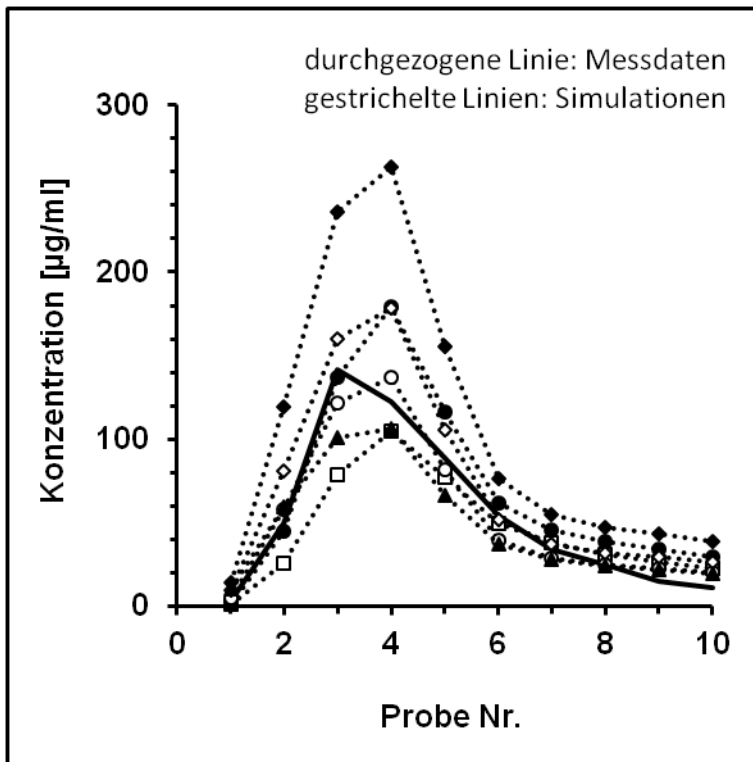


Abb. 16: Anpassung der Computersimulation an die Messdaten

Als Maß für die Genauigkeit der Kurvenanpassung wurden die Differenzen der mit Hilfe der Computersimulation berechneten Werte zu den Messdaten der entsprechenden Perilymphprobenreihe errechnet. Aus diesen Differenzen wurde anschließend die Quadratsumme gebildet, die hierbei ein geeignetes arithmetisches Mittel zur Quantifizierung der Kurvenübereinstimmung darstellte. Eine optimale Anpassung der Werte wurde erreicht, wenn die Quadratsumme den geringst möglichen Wert ergab (Methode der kleinsten Summe der quadrierten Differenzen, [42]).

3 Ergebnisse

3.1 Lokale Applikation an die Rundfenstermembran

3.1.1 Auswertung der experimentellen Daten

Es wurden insgesamt 9 Experimente durchgeführt mit einer geplanten Applikationsdauer von 2, 2,5 und 3 Stunden. Bei 7 Experimenten wurden 10 Perilymphproben mit einem Volumen von jeweils 1 µl entnommen. Bei einem Experiment (Nr. 2) wurde die erste Probe in zwei Proben zu je 0,5 µl Volumen unterteilt, die Gesamtzahl der Proben betrug hier folglich 11. In einem weiteren Experiment (Nr. 8) wurden nur 9 Proben entnommen. Das Volumen der zweiten entnommenen Probe betrug hier 2 µl. Alle Proben wurden anschließend mit Aqua dest. verdünnt, um ein ausreichendes Probenvolumen für die HPLC-Analyse zu erhalten. Die Perilymphproben eines Experiments lagen unterhalb des Detektionslimits (0,1 µg/ml) der HPLC für Dex-P, so dass die Daten dieses Experiments von den weiteren Berechnungen ausgeschlossen wurden. Lagen die Konzentrationen einzelner Proben unterhalb der Nachweisgrenze (0,1 µg/ml), so wurden diese Proben entsprechend „dummy-codiert“, d.h. ihnen wurde der Wert der unteren Nachweisgrenze (0,1 µg/ml) zugeordnet. Die beiden bei Experiment Nr. 2 entnommenen und nur 0,5 µl messenden Perilymphproben wurden, da beide unterhalb der Nachweisgrenze lagen, zu einer Probe mit einem Gesamtvolumen von 1 µl zusammengefasst. Eine entsprechende Übersicht der Dex-P-Konzentrationsverteilungen in den Perilymphproben der einzelnen Experimente gibt Abb. 17.

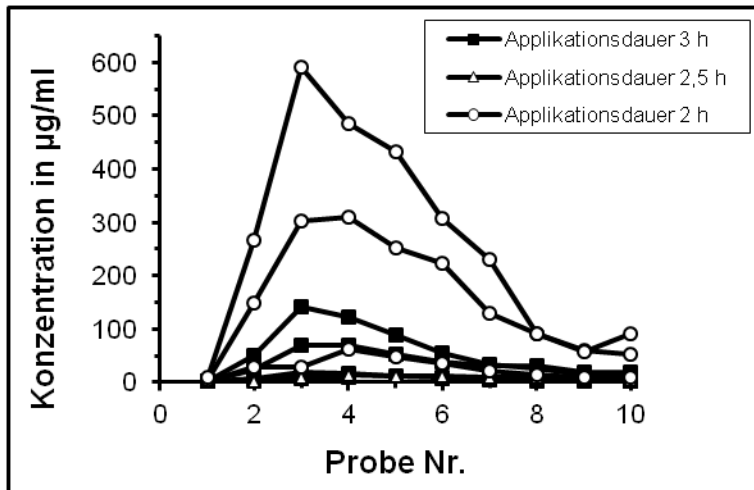


Abb. 17: Lokale Applikation an die Rundfenstermembran

Verteilung der Konzentrationen an Dex-P in den einzelnen Perilymphproben bei unterschiedlicher Applikationsdauer

Die höchste gemessene Konzentration an Dex-P betrug 591,78 µg/ml, die niedrigste Konzentration betrug 1,0 µg/ml (entspricht dem Detektionslimit der HPLC unter Berücksichtigung der Probenverdünnung mit Aqua dest.). Vergleicht man diese Werte mit der Ausgangskonzentration des applizierten Dex-P (10 mg/ml), so beträgt der Anteil des in den Perilymphproben enthaltenen Dex-P <0,01 % bis 5,92 %.

Die gemessenen Konzentrationen an Dex-P zeigten in den 10 kurz nacheinander entnommenen Perilymphproben einen Anstieg der Dex-P-Konzentration von der ersten bis zur dritten (Experimente Nr. 2, 3, 4) bzw. vierten Probe (Experimente Nr. 1, 5, 6, 7, 8). In den darauffolgenden Proben (Nr. 5 - 10) sank die Konzentration von Dex-P wieder ab (siehe Tab. 1).

Experiment-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Applikationsdauer	3h	3h	3h	2h	2,5h	2h	3h	2h
Probe-Nr.	Konzentration in µg/ml							
1	2,98	3,16	1,40	9,66	1,54	5,17	1,40	1,00
2	4,64	49,14	7,84	266,28	1,40	149,05	23,01	29,10*
3	6,76	<u>141,40</u>	<u>18,06</u>	<u>591,78</u>	9,24	301,62	68,46	-
4	<u>9,79</u>	122,36	17,22	485,24	<u>13,13</u>	<u>310,20</u>	<u>68,88</u>	<u>61,80</u>
5	3,15	88,48	12,32	433,16	12,46	253,00	51,38	46,90
6	7,34	54,32	8,96	307,30	11,48	224,14	38,22	35,30
7	3,91	34,02	7,70	231,28	9,66	129,25	31,36	21,60
8	2,23	25,26	3,92	91,00	8,26	90,42	30,66	14,10
9	2,75	14,98	3,72	58,52	7,28	60,64	19,74	10,10
10	1,74	11,06	1,40	92,12	3,86	52,69	18,76	8,60

Tab. 1: Spitzenkonzentrationen der einzelnen Experimente

Aufgelistet sind die Konzentrationen von Dex-P in den einzelnen Perilymphprobenreihen. Die jeweilige Spitzenkonzentration eines Experiments ist unterstrichen.

* das entnommen Probevolumen betrug hier 2 µl.

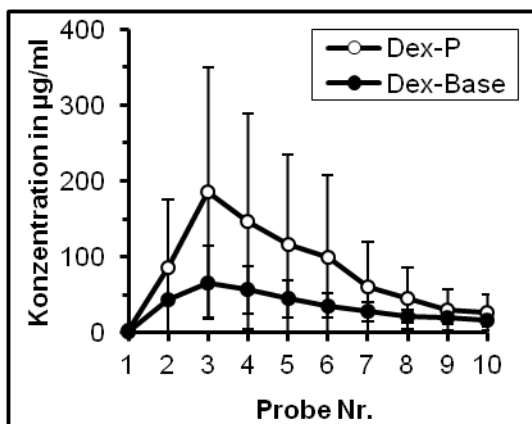
Bei einer Applikationsdauer von zwei Stunden (Experimente Nr. 4, 6, 8) reichten die höchsten in den Perilymphproben gemessenen Konzentrationen von 61,80 µg/ml bis 591,78 µg/ml (MW: 321,3 µg/ml; SD: 265,2 µg/ml). Nach 2,5-stündiger Applikation wurden Spitzenwerte von 13,13 µg/ml (Experiment Nr. 5) erreicht. In vier weiteren Experimenten (Nr. 1, 2, 3, 7) wurden die Proben erst nach einer Applikationsdauer von 3 Stunden entnommen. Die Maximalkonzentrationen betragen hierbei zwischen 9,79 µg/ml und 141,40 µg/ml (MW: 59,5 µg/ml; SD: 60,5 µg/ml).

Bei drei Versuchen war nach der Bestimmung von Dex-P noch ausreichend Probevolumen übrig, um die Konzentrationen an Dex-Base, der dephosphorylierten Form von Dex-P, in den Perilymphproben zu bestimmen (siehe Tab. 2). Vergleicht man die Konzentrationen von Dex-Base und Dex-P in den einzelnen Perilymphproben, so finden sich Übereinstimmungen in den

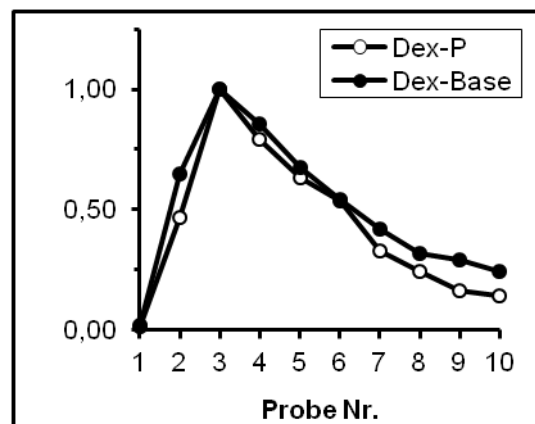
Konzentrationskurvenverläufen. Dies wird besonders in einer normalisierten Darstellungsweise erkenntlich (siehe Abb. 18).

Experiment-Nr.	6		7		8	
Probe Nr.	Dex-P	Dex-Base	Dex-P	Dex-Base	Dex-P	Dex-Base
1	5,17	1,1	1,4	1,4	1	1
2	149,05	73,04	23,01	12,97	29,1	36,52
3	301,62	100,54	68,46	31,92	-	-
4	310,2	92,84	68,88	40,74	61,8	36,4
5	253	72,82	51,38	31,78	46,9	29,8
6	224,14	54,67	38,22	28	35,3	24,8
7	129,25	42,68	31,36	17,92	21,6	22,8
8	90,42	30,36	30,66	18,76	14,1	14,2
9	60,64	29,33	19,74	14,84	10,1	14
10	52,69	24,2	18,76	16,94	8,6	7

Tab. 2: Vergleich der Konzentrationen von Dex-P und Dex-Base



A



B

Abb. 18: Konzentrationsverlauf von Dex-P und Dex-Base bei lokaler Applikation an die Rundfenstermembran

A: dargestellt ist der Konzentrationsverlauf der aus den Proben der Experimente Nr. 6, 7 und 8 gebildeten Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen für Dex-P und Dex-Base. B: zu Perilymphprobe Nr. 3 hin normalisierte Darstellung. In dieser Abbildung ist der nahezu identische Verlauf der Konzentrationen von Dex-P und Dex-Base in den entnommenen Perilymphproben deutlich erkennbar.

Da die Dex-Base ein Metabolit des applizierten Dex-P darstellt, lässt sich durch Addition der entsprechenden Dex-P- und Dex-Base-Werte die Gesamtmenge

des in den Proben befindlichen Dexamethasons bestimmen. Die auf diese Weise ermittelten Konzentrationen bewegten sich dabei in einem Bereich von 2,00 µg/ml bis hin zu 403,04 µg/ml. Die höchsten Konzentrationen der einzelnen Probenreihen lagen zwischen 98,20 µg/ml und 403,04 µg/ml (MW: 203,62 µg/ml; SD: 172,80 µg/ml). Eine Übersicht der Konzentrationsprofile dieser Versuche ist in Abb. 19 dargestellt:

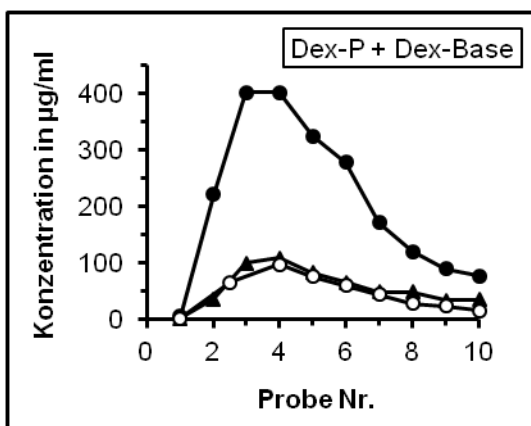


Abb. 19: Konzentrationsprofile von Dex-P inklusive Dex-Base

Gezeigt sind die Konzentrationsprofile für die drei Versuche, in denen zusätzlich neben Dex-P auch Dex-Base bestimmt wurde. Die angegebenen Konzentrationen stellen somit eine Addition der entsprechenden Dex-P- und Dex-Base-Werte dar.

3.1.2 Interpretation der experimentellen Daten mit Hilfe von Computersimulationen

Als Software kam das im Methodenteil bereits beschriebene Simulationsprogramm „Fluidsim“ zum Einsatz. Mit Hilfe dieses Programms war es möglich, schrittweise einzelne pharmakokinetische Parameter in der Computersimulation (Clearance, Diffusion aus Scala tympani in Nachbarkompartimente, Perilymphfluss nach apikal, Rundfenstermembranpermeabilität) zu verändern, bis sich schließlich eine optimale Anpassung der aus der Simulation gewonnenen Daten an die Messdaten ergab. Abb. 20 zeigt exemplarisch für einen Versuch die bestmögliche Anpassung der Computersimulation an die Messdaten:

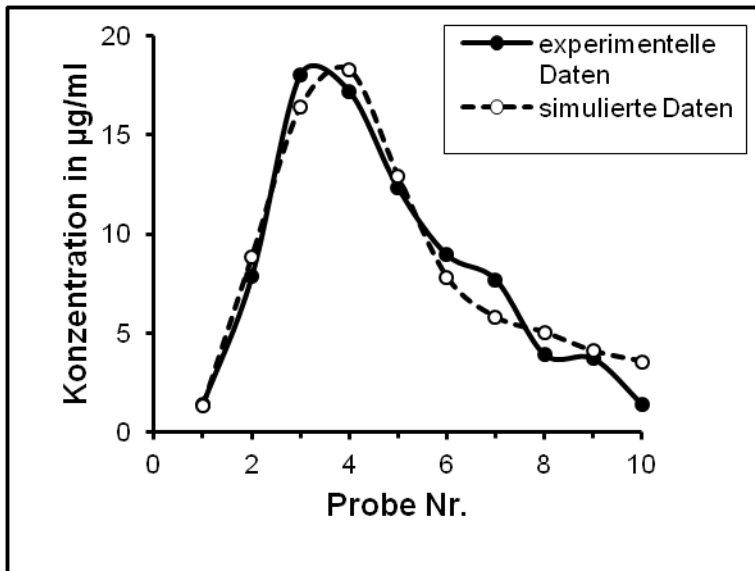


Abb. 20: Optimale Anpassung der Simulation an die gemessenen Werte

Die Werte der einzelnen Parameter, die zu einer optimalen Anpassung führten, sind für Dex-P sowie für diejenigen Versuche, in den zusätzlich Dex-Base bestimmt wurden, in Tab. 3 zusammengefasst:

EXPERIMENT	1	2	3	4	5	6	7	8	6	7	8
	<i>Dex-P</i>								<i>Dex-P + Dex-Base</i>		
Clearance	65	500	65	65	65	-	-	65	-	500	-
RWP	0,207	1	0,35	16	0,4	4	0,58	1	5	1	1
Acc	0,2	0,01	0,04	0,02	0,2	0,03	0,04	0,05	5	5	10
Flow	0,02	0,005	0,015	0,015	0,005	0,015	0	0	0,02	0	0,01

Tab. 3: Auflistung der einzelnen Parameter, die zu einer optimalen Anpassung der Simulationsdaten an die experimentellen Daten führten

Clearance: Halbwertszeit des applizierten Medikaments in Scala tympani in min; RWP: Rundfenstermembranpermeabilität in 10^{-8} m/s; Acc: Diffusion aus Scala tympani in Nachbarkompartimente, bezogen auf den Anteil der Gesamtfläche der Scala tympani; Flow: Perilymphfluss nach apikal in $\mu\text{l}/\text{min}$.

Mit Hilfe des Computersimulationsprogramms und den in Tab. 3 aufgeführten pharmakokinetischen Parametern war es außerdem möglich, ein Konzentrationsprofil für Dex-P bzw. für Dex-P mit seinem Metabolit Dex-Base entlang der Scala tympani zu einem Zeitpunkt kurz vor der Entnahme der Perilymphproben zu erstellen (siehe Abb. 21). Die auf diese Weise errechneten Profile unterschieden sich teilweise deutlich voneinander. So schwankten beispielsweise die Konzentrationen von Dex-P in der Scala tympani an einem

ausgewählten Messpunkt, der sich 0,1 mm von der Basis der Cochlea entfernt befand und somit kurz hinter der Rundfenstermembran lokalisiert war, zwischen 22,1 $\mu\text{g/ml}$ und 1307,4 $\mu\text{g/ml}$ (MW: 321,3 $\mu\text{g/ml}$; SD: 451,6 $\mu\text{g/ml}$). Für die Gesamtmenge des in den Proben bestimmten Dexamethasons (Dex-P + Dex-Base) ergaben sich in der Computersimulation Werte im Bereich von 203,2 $\mu\text{g/ml}$ und 797,7 $\mu\text{g/ml}$ (MW: 410,7 $\mu\text{g/ml}$; SD: 335,4).

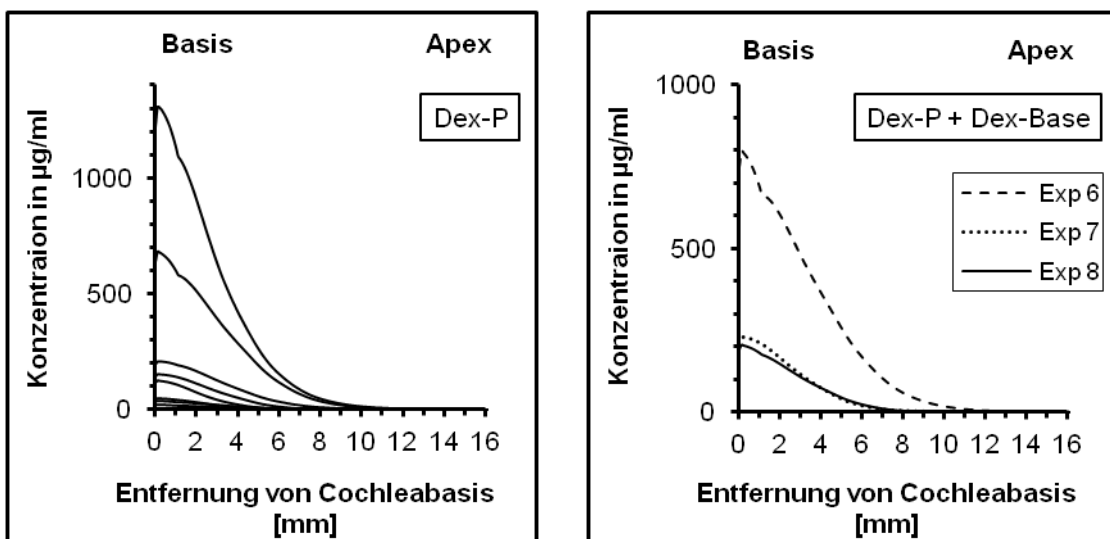


Abb. 21: Mit Hilfe der Computersimulation errechnete basoapikale Konzentrationsprofile

Unter Verwendung des Simulationsprogramms ließen sich Konzentrationsprofile für Dex-P (linkes Bild) sowie für Dex-P und Dex-Base (rechtes Bild) entlang der Scala tympani zu einem Zeitpunkt kurz vor der eigentlichen Entnahme der Perilymphproben bestimmen. Auffallend ist die große Variabilität der Konzentrationen in den einzelnen Versuchen.

3.2 Intracochleäre Applikation

3.2.1 Auswertung der experimentellen Daten

Zu dieser Applikationsform wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt, die sich hinsichtlich des Probenentnahmezeitpunkts voneinander unterschieden. Bei beiden Reihen wurde Dex-P in einer Konzentration von 10 mg/ml über einen Zeitraum von 20 Minuten mit einer Flussrate von 100 nl/min in die Scala tympani der Cochlea injiziert. Dies entsprach einem applizierten Gesamtvolumen von 2 μl bzw. einer Gesamtmenge von 20 μg Dex-P.

In der ersten Versuchsreihe (Experimente Nr. 9 - 15) wurden die Perilymphproben 20 Minuten nach der erfolgten Injektion entnommen. Bei der

zweiten durchgeführten Versuchsreihe (Experimente Nr. 16 - 19) wurde mit dem Entnahmevorgang der Probevolumina erst 80 Minuten nach Beendigung der Applikation begonnen. In beiden Versuchsreihen wurden 10 kurz aufeinander folgende Perilymphproben mit einem Volumen von jeweils etwa 1 μ l entnommen. Lediglich bei einem Versuch (Nr. 11) konnte die 10. Probe mangels am Apex austretender Perilymphe nicht gewonnen werden.

Sämtliche Proben wurden nach der Entnahme mit Aqua dest. verdünnt um ausreichende Probevolumina für die Analyse mittels HPLC zu erhalten.

In den Perilymphproben beider Versuchsreihen wurde neben der Konzentration von Dex-P zusätzlich die Konzentration seines Metabolits Dex-Base bestimmt. Die Ergebnisse der Probenanalysen sind in Tab. 4 und Tab. 5 dargestellt:

Experiment		9		10		11		12	
Probe-Nr.	Dex-P	Dex-Base	Dex-P	Dex-Base	Dex-P	Dex-Base	Dex-P	Dex-Base	
1	3,8	120,3	56,1	148,9	394,4	<u>567,5</u>	28,3	38,8	
2	<u>413,7</u>	205,9	<u>1649,6</u>	316,3	<u>1686,5</u>	309,5	<u>405,5</u>	<u>83,2</u>	
3	341,8	237,6	1211,8	234,2	1230,4	193,4	317,0	53,0	
4	44,9	247,5	1210,1	<u>325,1</u>	717,3	140,2	221,8	50,3	
5	8,4	<u>304,7</u>	487,9	211,7	541,3	274,6	120,9	41,6	
6	1,0	5,0	383,9	256,2	515,0	227,0	71,9	44,8	
7	1,0	163,7	336,9	160,3	360,7	253,7	64,6	40,6	
8	2,0	189,9	266,1	204,4	203,2	401,1	30,3	35,6	
9	4,8	127,3	260,2	181,4	67,1	541,4	21,7	25,0	
10	5,9	88,9	199,0	224,4	-	-	20,8	37,2	

Experiment		13		14		15	
Probe-Nr.	Dex-P	Dex-Base	Dex-P	Dex-Base	Dex-P	Dex-Base	
1	4,4	22,6	91,1	<u>278,4</u>	205,1	177,8	
2	<u>206,8</u>	<u>192,7</u>	1254,5	161,2	1534,2	93,4	
3	153,0	92,2	<u>1382,0</u>	148,5	<u>1965,8</u>	<u>195,4</u>	
4	79,8	54,8	971,4	110,4	1278,5	86,1	
5	44,1	40,7	857,0	152,7	1081,5	80,5	
6	40,2	40,5	486,6	90,9	627,9	164,7	
7	25,0	14,7	276,1	48,7	459,9	69,8	
8	20,1	28,6	280,9	73,3	314,4	67,6	
9	14,6	9,2	199,5	70,1	247,8	57,7	
10	11,2	19,4	161,5	72,1	211,1	54,3	

Tab. 4: Perilymphkonzentrationen 20 Minuten nach Beendigung der Applikation

Alle angeführten Konzentrationen sind in $\mu\text{g/ml}$ angegeben. Die Spitzenkonzentrationen an Dex-P bzw. Dex-Base der einzelnen Versuche sind unterstrichen.

Experiment	16		17		18		19	
Probe-Nr.	Dex-P	Dex-Base	Dex-P	Dex-Base	Dex-P	Dex-Base	Dex-P	Dex-Base
1	7,3	165,2	84,2	132,0	1,1	5,3	81,1	250,3
2	871,4	<u>744,8</u>	808,2	150,9	8,5	29,8	651,4	<u>280,7</u>
3	866,9	520,0	<u>1217,9</u>	<u>189,3</u>	14,4	62,2	<u>873,1</u>	236,9
4	<u>1014,6</u>	423,0	900,1	184,9	22,2	<u>74,6</u>	580,6	251,6
5	855,1	366,7	711,9	156,2	<u>26,8</u>	37,4	439,3	188,7
6	552,2	299,7	525,2	134,5	25,9	32,6	186,4	336,2
7	399,6	338,3	381,3	112,4	13,4	23,6	232,5	122,0
8	330,4	278,8	278,0	97,5	12,8	19,3	181,8	122,2
9	235,7	241,1	186,9	76,3	14,0	18,6	179,2	123,3
10	107,0	178,5	145,0	68,1	6,4	17,4	72,1	147,0

Tab. 5: Perilymphkonzentrationen 80 Minuten nach Beendigung der Applikation

Alle angeführten Konzentrationen sind in $\mu\text{g/ml}$ angegeben. Die Spitzenkonzentrationen an Dex-P bzw. Dex-Base der einzelnen Versuche sind unterstrichen.

Versuchsreihe 1 (Probenentnahme 20 Minuten nach erfolgter Injektion)

Die hierbei bestimmten Konzentrationen an Dex-P in den entnommenen Probevolumina reichten von $1,0 \mu\text{g/ml}$ bis hin zu $1965,8 \mu\text{g/ml}$. Die höchsten Konzentrationen für Dex-P wurden in der zweiten (Experimente 9- 13) bzw. dritten Perilymphprobe (Experimente 14,15) gemessen. Diese Spitzenkonzentrationen erreichten dabei Werte zwischen $206,8 \mu\text{g/ml}$ und $1965,8 \mu\text{g/ml}$ (Mittelwert: $1101,4 \mu\text{g/ml}$; SD: $733,3 \mu\text{g/ml}$).

Für die Konzentrationen der ebenfalls in den Perilymphproben gemessenen Dex-Base ergaben sich Werte zwischen $5,0 \mu\text{g/ml}$ und $567,5 \mu\text{g/ml}$. Die Maximalkonzentrationen der einzelnen Versuche ($83,2 - 567,5 \mu\text{g/ml}$; Mittelwert: $278,1 \mu\text{g/ml}$; SD: $152,1 \mu\text{g/ml}$) lagen unterhalb der hierzu entsprechenden Werte für Dex-P. Die Spitzenkonzentrationen für Dex-Base zeigten im Vergleich zu denjenigen für Dex-P (Maximalwerte in der ersten oder zweiten Probe) eine variabler ausgeprägte Verteilung auf die entnommenen Perilymphproben. In Abb. 22 sind die unterschiedlichen Konzentrationsverläufe von Dex-P und Dex-Base in den entnommenen Probenreihen noch einmal vergleichend gegenübergestellt. Anhand dieser Abbildung ist ebenfalls erkennbar, dass sich die Messergebnisse hinsichtlich ihrer erreichten Substanzkonzentrationen in zwei Gruppen unterteilen lassen.

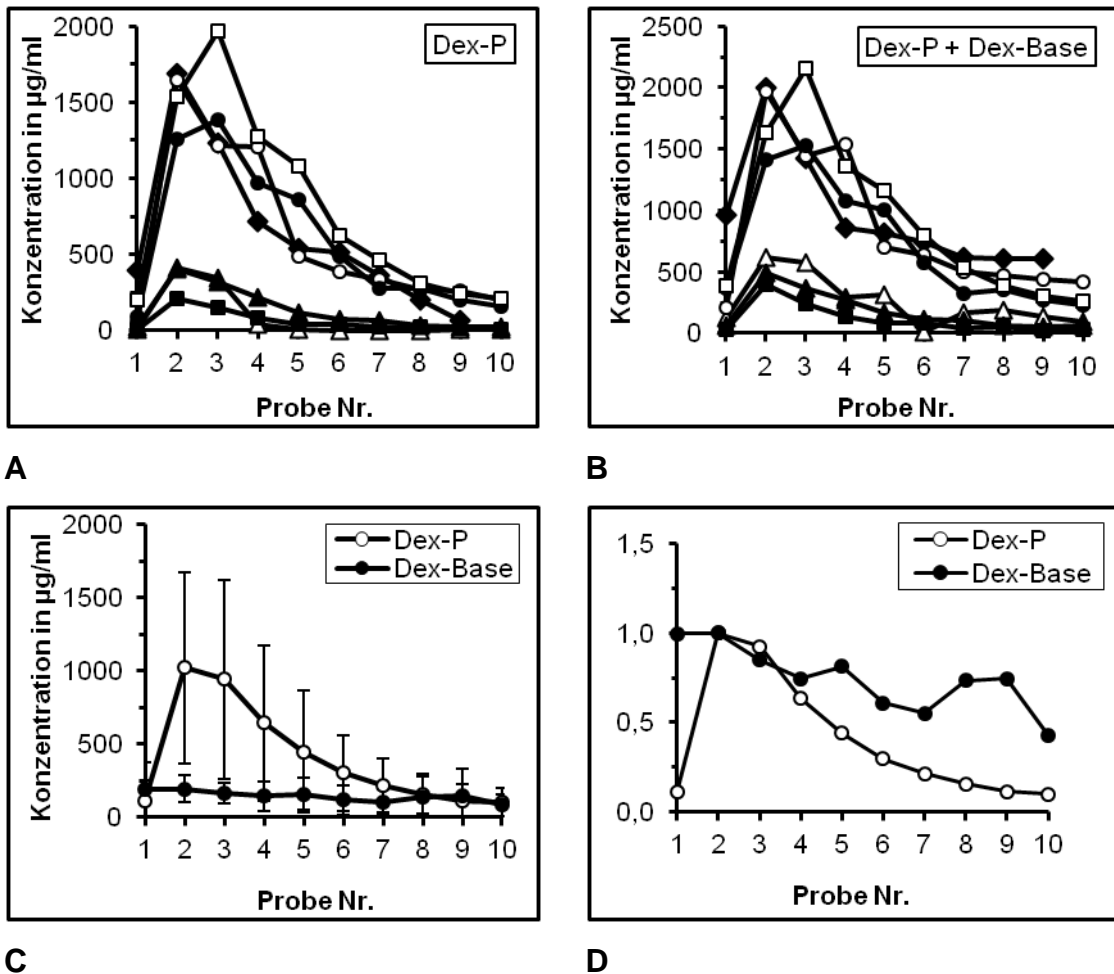


Abb. 22: Verteilung von Dex-P und Dex-Base in den Perilymphproben

A und B: gemessene Konzentrationen von Dex-P bzw. Dex-P + Dex-Base in den entnommenen Perilymphproben der einzelnen Versuche. In der Abbildung ist deutlich erkennbar, dass sich die Messergebnisse in zwei Gruppen unterteilen lassen: die erste Gruppe beinhaltet Versuche mit hohen Medikamentenkonzentrationen, die zweite hingegen niedrige Konzentrationen.

C und D: Vergleich der Verteilung von Dex-P und Dex-Base in den Probenreihen. C: absolute Darstellung der Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen; D: auf Probe Nr. 2 hin normalisierte Darstellungsweise der Mittelwerte von Dex-P und Dex-Base.

Betrachtet man die Gesamtmenge des in den Proben bestimmten Dexamethasons (also Dex-P + Dex-Base), so ergaben sich hierfür Werte zwischen 6,0 µg/ml und 2161,2 µg/ml. Die Maximalkonzentrationen, die sich bei 5 Experimenten (Nr. 9- 13) in der zweiten sowie in 2 Experimenten (Nr. 14 und 15) in der dritten Perilymphprobe zeigten, reichten hierbei von 399,6 µg/ml bis hin zu 2161,2 µg/ml (Mittelwert: 1308,8 µg/ml; SD: 780,4 µg/ml).

Da für jede Probe das Volumen sowie die entsprechende Konzentration des in den Proben enthaltenen Dexamethasons (Dex-P + Dex-Base) bekannt war, war es außerdem möglich, die in den Probenreihen wiedergefundene Menge an appliziertem Dexamethason zu bestimmen. Diese betrug in den Perilymphproben der einzelnen durchgeführten Versuche 1,03 - 8,91 µg, was bei einer applizierten Gesamtmenge von 20 µg einem Anteil von 5 - 45 % (MW: 27 %; SD: 17 %) entsprach.

Versuchsreihe 2 (Probenentnahme 80 Minuten nach erfolgter Injektion)

Die in dieser Reihe bestimmten Konzentrationen der entnommenen Perilymphproben bewegten sich für Dex-P in einem Bereich zwischen 1,1 µg/ml und 1217,9 µg/ml. Die Maximalkonzentrationen wurden bei zwei Versuchen (Nr. 17 und 19) in der dritten sowie jeweils einmal in der vierten bzw. fünften Probe (Versuche 16 und 18) erreicht. Die Werte dieser Spitzenkonzentrationen betragen 26,8 µg/ml bis hin zu 1217,9 µg/ml (MW: 783,1 µg/ml; SD: 523,7 µg/ml).

Für Dex-Base wurden Werte zwischen 5,3 µg/ml und 744,8 µg/ml gemessen. Die Spitzenkonzentrationen der Probenreihen betragen 74,6 µg/ml - 744,8 µg/ml (MW: 336,2 µg/ml; SD: 292,6 µg/ml). Wie in der ersten Versuchsreihe wurden auch hier die Maximalkonzentrationen in jeweils unterschiedlichen Proben (Nr. 2, 3, 4, 6) erreicht (siehe Abb. 29).

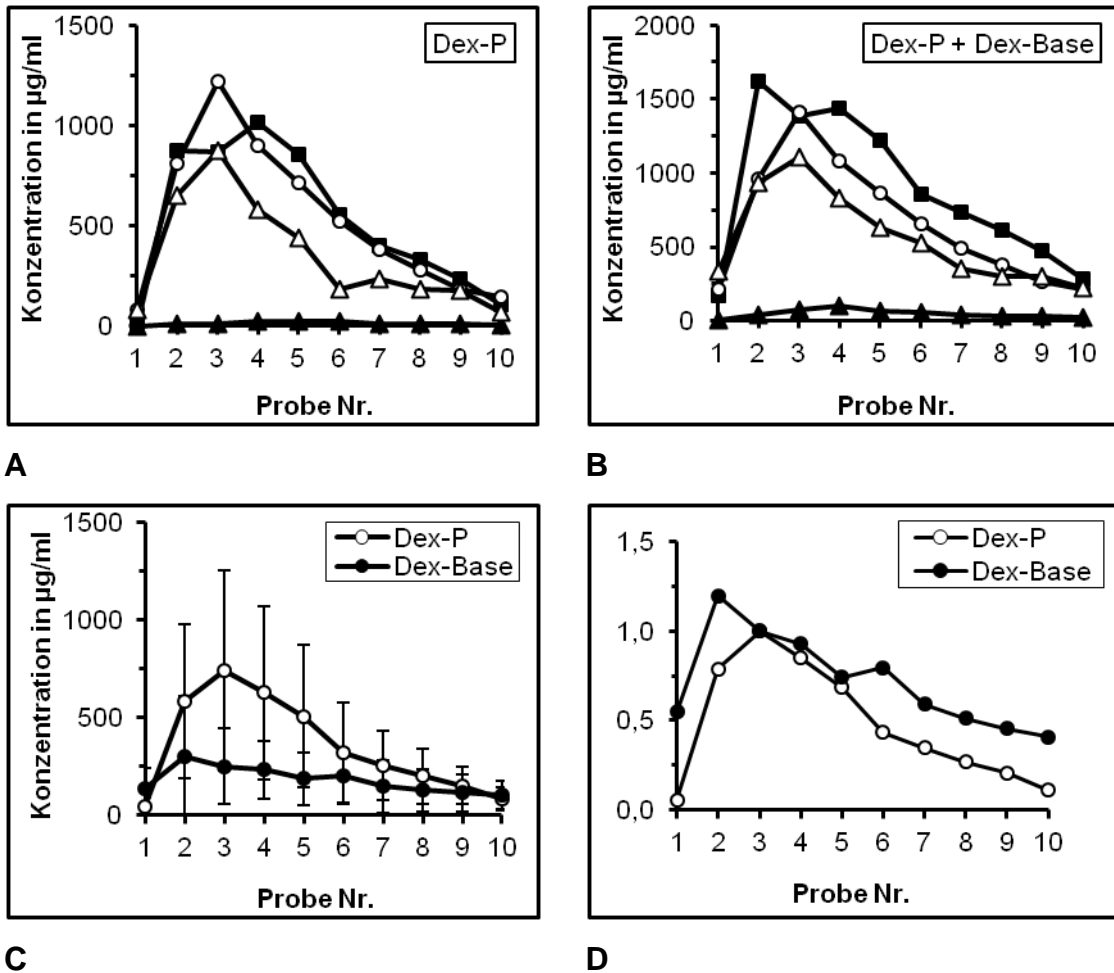


Abb. 23: Verteilung von Dex-P und Dex-Base

A und B: ermittelte Probenkonzentrationen von Dex-P bzw. Dex-P + Dex-Base in den einzelnen Versuchen.

C und D: unterschiedliche Verteilung der beiden bestimmten Substanzen Dex-P und Dex-Base in den Probenreihen. C: absolute Darstellung der Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen; D: auf Probe Nr. 3 hin normalisierte Darstellungsweise der Mittelwerte von Dex-P und Dex-Base.

Nach Addition von Dex-P und Dex-Base lagen die so ermittelten Konzentrationen in einem Bereich von 6,4 µg/ml bis 1616,1 µg/ml. Die Maximalkonzentrationen betragen 96,8 µg/ml - 1616,1 µg/ml (MW: 1057,5 µg/ml; SD: 673,3 µg/ml) und wurden bei 2 Versuchen (Nr. 17 und 19) in der dritten Perilymphprobe sowie jeweils einmal in der zweiten (Nr. 16) bzw. vierten Probe (Nr. 18) erreicht.

Die in den Probenreihen wiedergefundene Gesamtmenge (Dex-P + Dex-Base) lag zwischen 0,46 µg und 8,16 µg. Dies entspricht bei einer applizierten

Gesamtmenge von 20 µg Dex-P einem Anteil von 2 - 41 % (MW: 26 %; SD: 17 %).

3.2.2 Computersimulation basierend auf den experimentellen Daten

Zur Simulation der Messdaten wurde ebenfalls die Software „Fluidsim“ verwendet.

Zunächst wurde basierend auf den Daten der Gesamtmenge des in den Proben gemessenen Dexamethasons (Dex-P mit Dex-Base) eine Kurvenanpassung vorgenommen. Hierzu wurden spezifische pharmakokinetische Parameter (Clearance, Diffusion aus Scala tympani in Nachbarkompartimente, Perilymphfluss nach apikal und Austritt von Perilymphe aus der Scala tympani in das Mittelohr an der Injektionsstelle) schrittweise verändert, bis sich schließlich eine optimale Anpassung der Computersimulation an die Messdaten ergab.

In einer zweiten Simulationsreihe wurden die errechneten Werte an die Messwerte von Dex-P angepasst. Für diese Simulationsreihe wurden die bereits errechneten Werte für den nach apikal gerichteten Perilymphfluss (Flow) sowie der Austritt von Perilymphe aus der Scala tympani in das Mittelohr an der Injektionsstelle (Peri-Leak) übernommen, da diese beiden Parameter lediglich Flüssigkeitsverschiebungen darstellten und somit für beide Simulationsreihen gleich groß sein mussten. Variiert wurden somit nur die Parameter „Clearance“ (Eliminationshalbwertszeit) und Diffusion aus Scala tympani in Nachbarkompartimente (Acc), da hier für Dex-P und Dex-Base unterschiedliche Werte angenommen werden mussten.

Eine entsprechende Übersicht über die mit Hilfe des Simulationsprogramms erstellten Parameter, die jeweils zu einer optimalen Anpassung der computersimulierten Daten an die Messdaten führten, gibt Tab. 6.

Probenentnahme 20 Minuten nach erfolgter Applikation							
<i>Dex-P + Dex-Base</i>							
Experiment	9	10	11	12	13	14	15
Clearance	500	65	125	125	250	65	250
Peri-Leak	0,08	0	0,01	0,01	0,14	0,01	0,01
Acc	5	0	0	0	0	0	0
Flow	0,08	0,05	0,07	0,04	0,04	0,05	0,05
<i>Dex-P</i>							
Experiment	9	10	11	12	13	14	15
Clearance	30	90	40	90	40	70	70
Peri-Leak	0,08	0	0,01	0,01	0,14	0,01	0,01
Acc	5	0	0	0	0	0	0
Flow	0,08	0,05	0,07	0,04	0,04	0,05	0,05
Probenentnahme 80 Minuten nach erfolgter Applikation							
<i>Dex-P + Dex-Base</i>							
Experiment	16	17	18	19			
Clearance	500	500	30	250			
Peri-Leak	0	0	0,03	0			
Acc	0	5	5	5			
Flow	0,01	0,02	0	0,03			
<i>Dex-P</i>							
Experiment	16	17	18	19			
Clearance	120	240	40	160			
Peri-Leak	0	0	0,03	0			
Acc	0	5	30	5			
Flow	0,01	0,02	0	0,03			

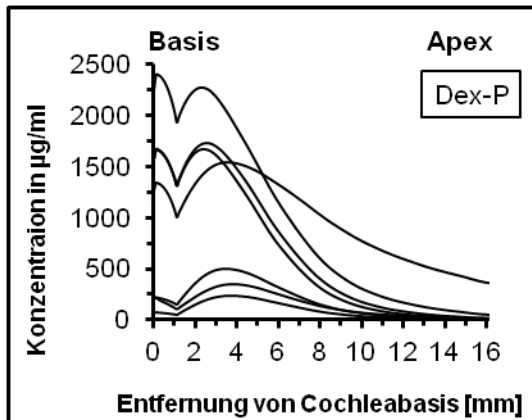
Tab. 6: Mit Hilfe des Computermodells ermittelte pharmakokinetische Parameter

Clearance: Halbwertszeit des applizierten Medikaments in Scala tympani in min; Peri-Leak: Austritt von Perilymphe (in $\mu\text{l}/\text{min}$) aus der Scala tympani in das Mittelohr an der Injektionsstelle; Acc: Diffusion aus Scala tympani in Nachbarkompartimente, bezogen auf den Anteil der Gesamfläche der Scala tympani; Flow: Perilymphfluss nach apikal in $\mu\text{l}/\text{min}$.

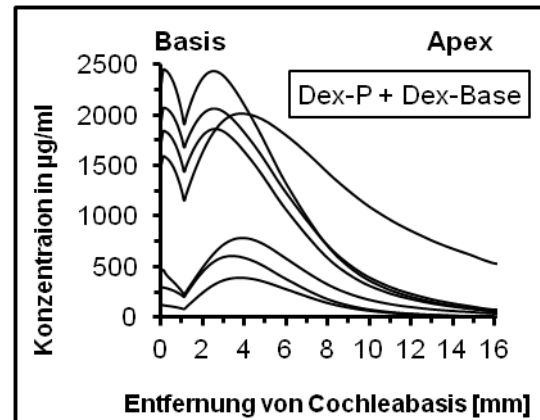
Mit Hilfe der durch das Simulationsprogramm errechneten Werte ließ sich hier ebenfalls ein Konzentrationsgradienten-Profil entlang der Scala tympani kurz vor dem eigentlichen Probenentnahmevorgang erstellen (siehe Abb. 24). Auch hier ist bei der ersten Versuchsreihe (Probenentnahme 20 Minuten nach erfolgter Applikation) die Aufteilung der Konzentrationsprofile in zwei Gruppen erkennbar (Abbildung A und B). Sämtliche erstellten Scala tympani-Profile zeigten einen Abfall der Substanzkonzentration mit punctum maximum an einer

Stelle, die 1,1 mm von der Cochleabasis entfernt war. Diese Stelle entspricht anatomisch der Einmündung des Aquädukts, über das ein Teil der intracochleär applizierten Substanz aus der Scala tympani austreten kann.

20 Minuten nach Injektionsstopp

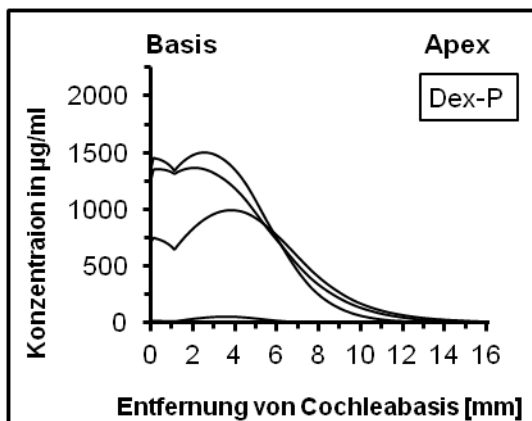


A

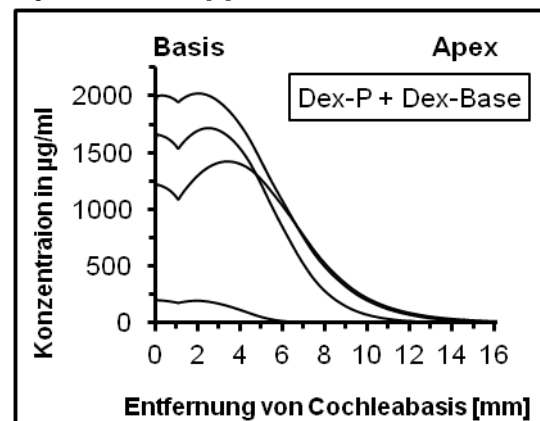


B

80 Minuten nach Injektionsstopp



C



D

Abb. 24: Mit Hilfe des Computermodells berechnete Konzentrationsprofile entlang der Scala tympani

A und B: Verteilung von Dex-P bzw. von Dex-P mit Dex-Base entlang der Scala tympani 20 Minuten nach erfolgter Substanzapplikation. In den Abbildungen ist deutlich die Aufteilung in zwei Gruppen, die sich hinsichtlich den Konzentrationen voneinander unterscheiden, erkennbar. C und D: Konzentrationsprofile 80 Minuten nach Applikation von Dex-P.

Da die Variation der Konzentrationsprofile besonders im basalen Bereich ausgeprägt war, wurden hierzu die Konzentrationsunterschiede für einen

ausgewählten Messpunkt, der sich kurz hinter der Rundfenstermembran befand (0,1 mm von der Basis der Cochlea entfernt), in Tab. 7 zusammengefasst.

<i>Probenentnahme 20 Minuten nach Applikation</i>			
	Wertebereich	MW	SD
Dex-P	73,9 - 2394,2	1082,6	911,5
Dex-P + Dex-Base	118,7 - 2446,5	1261,4	946,0
<i>Probenentnahme 80 Minuten nach Applikation</i>			
	Wertebereich	MW	SD
Dex-P	17,9 - 1446,5	889,8	659,1
Dex-P + Dex-Base	195,6 - 1995,4	1266,8	781,8

Tab. 7: Variation der basalen Konzentrationen

Für beide Versuchsreihen angegebene (durch das Simulationsprogramm errechnete) basale Konzentrationen (in $\mu\text{g/ml}$) für einen ausgewählten Messpunkt, der sich direkt hinter der Rundfenstermembran befand.

4 Diskussion

4.1 Pharmakokinetische Unterschiede der einzelnen Applikationsformen

An dieser Stelle soll zunächst auf die unterschiedlichen pharmakokinetischen Eigenschaften der einzelnen Applikationsarten eingegangen sowie auf die Auswirkungen des verwendeten Probenentnahmeverfahrens auf die in den Proben befindlichen Substanzkonzentrationen hingewiesen werden.

4.1.1 Lokale Applikation an die Rundfenstermembran

Bei lokaler Applikation von Dex-P an die Rundfenstermembran zeigten sich in allen durchgeführten Versuchen folgende Konzentrationsverläufe für Dex-P und Dex-Base in den entnommenen Perilymphproben:

Die Substanzkonzentrationen nahmen kontinuierlich zu, bis schließlich eine Maximalkonzentration in der dritten bzw. vierten Perilymphprobe erreicht wurde [37]. In den darauf folgenden Proben sank die Konzentration der darin bestimmten Substanzen mit zunehmender Probenanzahl wieder ab. In Abb. 25 ist die Verteilung der gemessenen Substanzkonzentrationen auf die einzelnen Perilymphproben noch einmal exemplarisch dargestellt:

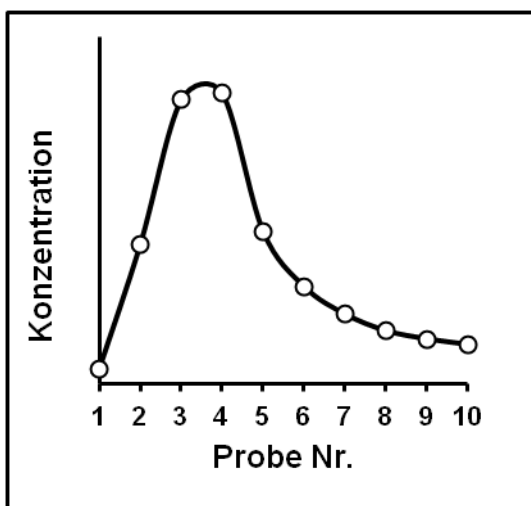


Abb. 25: Konzentrationsverlauf von Dex-P und Dex-Base in den entnommenen Perilymphproben

In dieser Abbildung ist ebenfalls gut erkennbar, dass in allen 10 entnommenen Proben (Gesamtvolumen 10 μl) die applizierte Substanz nachgewiesen werden konnte. Das Perilymphvolumen eines Meerschweins beträgt jedoch nur ca. 4,7 μl . Der restliche Volumenanteil setzt sich aus Zerebrospinalflüssigkeit zusammen, die während des Entnahmeprozesses über das Aquädukt in die Scala tympani einströmt. Somit befindet sich lediglich in den ersten fünf entnommenen 1 μl -Proben Perilymphe, wobei das fünfte Probevolumen bereits ca. 30 % Zerebrospinalflüssigkeit enthält. Die darauf folgenden Proben (Nr. 6-10) enthalten demzufolge nur zerebrospinale Flüssigkeit jedoch keine Perilymphe. Diese Proben sollten daher auch kein Dex-P enthalten, da dieses ausschließlich an die Rundfenstermembran appliziert wurde. Bei der Applikation sowie bei der späteren Probenentnahme gilt es jedoch einige pharmakokinetische Aspekte zu beachten, die zu einer Anreicherung der applizierten Substanz in den Proben der zerebrospinalen Flüssigkeit führen können:

1. Diffusion von Dex-P in die über das Aquädukt einströmende Zerebrospinalflüssigkeit während der Probenentnahme:

Apikal entnommene Perilymphe wird durch zerebrospinale Flüssigkeit ersetzt, die im Bereich der Cochleabasis über das Aquädukt in die Scala tympani gelangt. Hierdurch kommt es zu einer Durchmischung von basaler Perilymphe, die eine hohe Konzentration an appliziertem Dex-P aufweist, mit zerebrospinaler Flüssigkeit. Auf diese Weise kommt es zu einer Ausbreitung per diffusionem von Dex-P innerhalb der einströmenden Zerebrospinalflüssigkeit.

2. Rückdiffusion aus benachbarten Kompartimenten während der Probenentnahme:

Während der Applikationsphase kommt es zu einer gradientenabhängigen Diffusion von Dex-P in die der Scala tympani benachbarten Kompartimente. Durch den Probenentnahmeprozess kommt es innerhalb der Scala tympani zu einer apikalwärts gerichteten Verschiebung der Dex-P enthaltenden

Perilymphe. Infolge dieser Verschiebung stellen sich neue Konzentrationsgradienten entlang der Scala tympani ein, die zu einer Rückdiffusion des applizierten Medikaments aus den benachbarten Kompartimenten in die Scala tympani führen (Abb. 26). Das Prinzip ist auch als "Partitionierung" und "Repartitionierung" aus der Pharmakokinetik bekannt. Die Folge dieser Rückdiffusion ist ein Anstieg der Medikamentenkonzentration in den später entnommenen Proben.

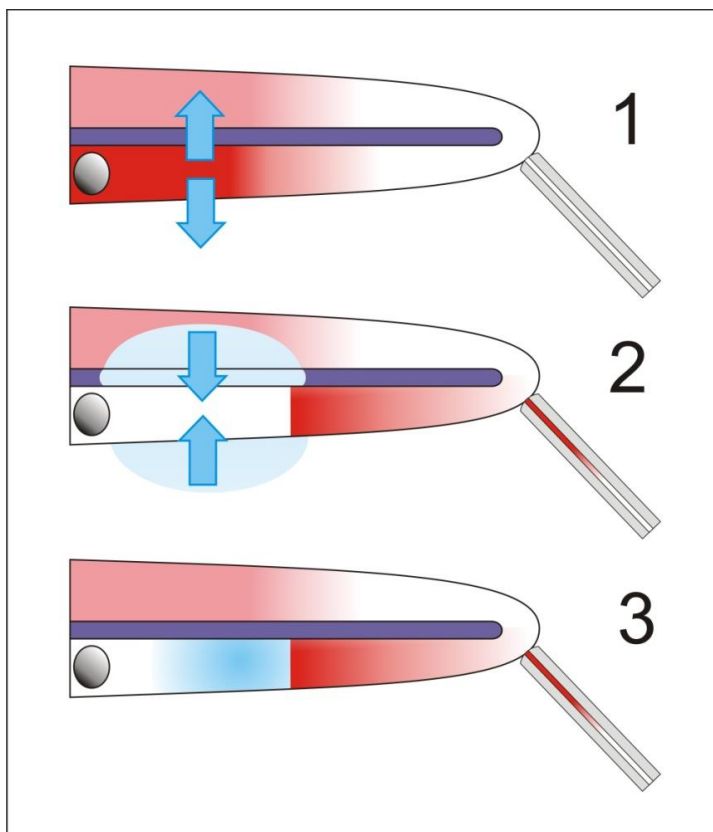


Abb. 26: Rückdiffusion der applizierten Substanz aus benachbarten Kompartimenten während der Probenentnahme

Schema einer „entrollten Cochlea“ nach erfolgter Substanzapplikation. Die das Medikament enthaltende Perilymphe ist rot dargestellt. Während der Applikation kommt es zu einer Diffusion des Medikaments in benachbarte Kompartimente entlang des Konzentrationsgradienten (blaue Pfeile) (1). Während der Probenentnahme kommt es durch den apikalwärts gerichteten Perilymphstrom zu einer Umkehrung der Konzentrationsgradienten mit einer Rückdiffusion des Medikaments (hier blau dargestellt) in die Scala tympani (2) und (3). *Nach: Plontke S (2006) mit freundlicher Genehmigung.*

3. Diffusion von Dex-P in das Aquädukt während der Applikationsphase:

Während der Applikation diffundiert Dex-P nicht nur entlang der Scala tympani in Richtung des Apex der Cochlea sowie in benachbarte Kompartimente sondern auch in das Aquädukt und die darin enthaltene zerebrospinale Flüssigkeit. Werden dann im Anschluss an die Applikationsphase Perilymphproben am Apex entnommen, so kommt es an der Basis der Cochlea zum Einstrom von Dex-P-haltiger Zerebrospinalflüssigkeit in die Scala tympani.

Die in den Perilymphprobenreihen erreichten Maximalkonzentrationen wiesen bei dieser Applikationsform zudem eine ausgeprägte Variabilität auf mit einem Konzentrationsunterschied um das bis zu Vierzehnfache. In Abb. 27 ist die Variabilität der gemessenen Konzentrationen getrennt nach Dauer der Applikation für Dex-P veranschaulicht:

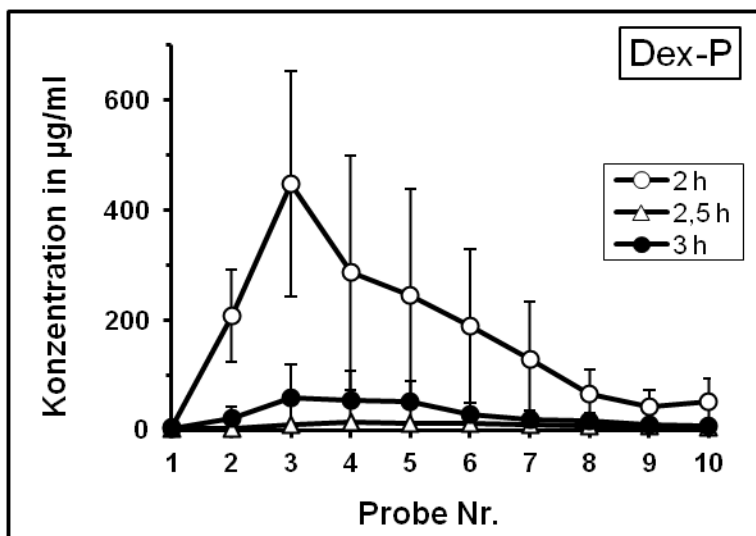


Abb. 27: Variabilität der ermittelten Konzentrationen

Ursachen für die variablen Substanzkonzentrationen in den einzelnen Probenreihen können neben unterschiedlichen Eliminationszeiten Unterschiede in der Permeabilität der Rundfenstermembran sein. Die Durchlässigkeit dieser Membran bestimmt zunächst die Menge an Dex-P, die in die Perilymphe der Scala tympani gelangt. Diffundiert ein entsprechend großer Anteil in die Scala

tympani, so sind auch höhere Perilymphkonzentrationen der applizierten Substanz zu erwarten.

Dieser Einfluss der Rundfenstermembran-Permeabilität auf die Substanzkonzentrationen in der Scala tympani ließ sich auch mit Hilfe des Simulationsprogramms demonstrieren. Es wurden hierzu mehrere Simulationen durchgeführt, in denen ausschließlich die Permeabilität der Rundfenstermembran variiert wurde. Anschließend wurden mit Hilfe des Simulationsprogrammes die zu erwartenden Konzentrationen in den Perilymphproben errechnet (siehe Abb. 28). Es zeigte sich, dass bei großen Permeabilitätsraten die zu erwartenden Substanzkonzentrationen gleichfalls hoch sind und bei klein gewählten Raten niedrige Konzentrationen zu erwarten sind.

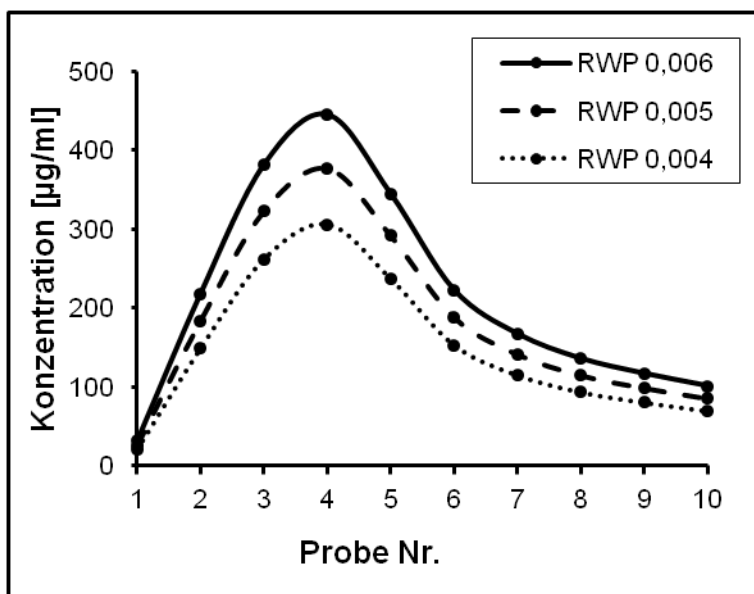


Abb. 28: Rundfenstermembran-Permeabilität

Darstellung der Auswirkung unterschiedlicher Permeabilitätsraten der Rundfenstermembran (RWP; in 10^{-5} m/s) auf die zu erwartenden Substanzkonzentrationen in den Perilymphproben.

Die oben bereits erwähnte Eliminationshalbwertszeit (Clearance) stellt den zweiten pharmakokinetischen Parameter dar, der maßgeblich die Substanzkonzentrationen in der Scala tympani beeinflusst. Substanzen, die eine lange Halbwertszeit aufweisen und somit auch eine entsprechend lange Verweildauer in der Scala tympani haben, können sich dadurch dort anreichern

und führen auf diese Weise zu hohen Medikamentenspiegeln. Bei kurzen Halbwertszeiten hingegen würde man niedrige Substanzkonzentrationen erhalten.

Auch dies konnte durch das Simulationsprogramm durch mehrere Simulationen mit unterschiedlich groß gewählten Clearance-Werten gezeigt werden (Abb. 29).

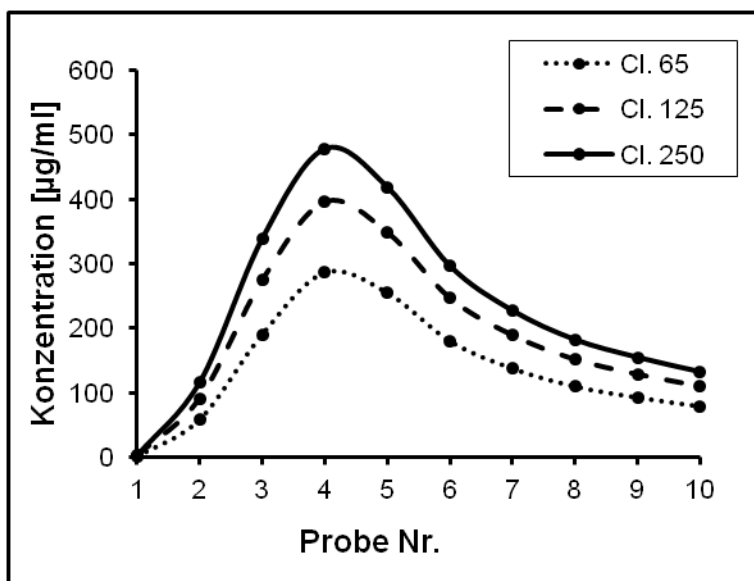


Abb. 29: Clearance

Einfluss der Clearance (Cl., in min) auf die zu erwartenden Perilymphkonzentrationen. Hohe Werte für die Clearance führen zu hohen Medikamentenspiegeln, niedrige Clearance-Werte erzeugen entsprechend geringe Substanzkonzentrationen.

Betrachtet man die Clearance als einen pharmakokinetischen Parameter, der weitestgehend konstant ist, so können durch ihn nicht die unterschiedlichen Medikamentenkonzentrationen in den Perilymphproben erklärt werden. Da aber Unterschiede in der Permeabilität der Rundfenstermembran sehr ähnliche Auswirkungen auf die Perilymphkonzentrationen haben, könnte dies eine Erklärung für die Variabilität der Medikamentenspiegel darstellen.

In einigen tierexperimentellen Studien wurde ebenfalls schon auf unterschiedliche Permeabilitäten der Rundfenstermembran sowie deren Auswirkungen auf die Substanzkonzentrationen in der Scala tympani hingewiesen [3,18,30]. Bisherige Studien zeigten auch, dass sich variable Spitzenkonzentrationen bei lokaler Applikation an die Rundfenstermembran

nicht nur für Glukokortikoide [3,18,30] ergaben, sondern auch für eine Reihe anderer Substanzen, wie z.B. Gentamicin [22,24,38], Ionenmarker [46,48,49] sowie Inulin und Mannitol [8]. Teilweise wurde in diesen Studien die Rundfenstermembran durch Vorbehandlung mit trockener Luft durchlässiger gemacht, was zu höheren Konzentrationen der applizierten Substanz verglichen mit den nicht auf diese Weise vorbehandelten Versuchstieren führte [38,46].

Bisherige klinische Studien, deren Zielsetzung es war, die Wirksamkeit topischer Medikamentenapplikation an das Innenohr z.B. nach Hörsturz zu untersuchen, lieferten teilweise widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Wirksamkeit derartiger Therapieverfahren. So besserte sich beispielweise das klinische Outcome einer Probandengruppe, die sich einer topischen Medikamentenapplikation unterzog, in einigen Studien [26,35,43,54]. In anderen Studien jedoch konnte keine signifikante Verbesserung des Hörvermögens durch lokale Applikationsverfahren nachgewiesen werden [1,5,29]. Diese widersprüchliche Studienlage ist sicherlich einerseits durch die Verwendung unterschiedlicher Medikamente sowie unterschiedlicher Applikationsstrategien erklärbar. Auch spielen die dabei eingesetzten audiometrischen Verfahren (insbesondere die untersuchten Frequenzbereiche) sowie die in den klinischen Studien oftmals sehr unterschiedlich definierte Hörverbesserung eine Rolle [36]. Es ist jedoch auch zu bedenken, dass variable Rundfenstermembran-Permeabilitäten bei topischer Applikation zu unterschiedlich hohen Medikamentenspiegeln im Innenohr führen können und somit auch eine Erklärung für die Unterschiede hinsichtlich des Outcome der Patienten liefern können.

4.1.2 Intracochleäre Injektion

4.1.2.1 Probenentnahme 20 Minuten nach erfolgter Applikation

Im Unterschied zur lokalen Applikation an die Rundfenstermembran mit einem Konzentrationsmaximum von Dex-P bzw. des Gesamt-Dexamethasons (Dex-P und Dex-Base) in der dritten bzw. vierten Perilymphprobe wurden bei

intracochleärer Injektion und einer Probenentnahme 20 Minuten nach Beendigung der Injektion die höchsten Konzentrationen in der zweiten bzw. dritten Probe gemessen.

Betrachtet man die Konzentrationsverläufe der einzelnen Experimente (Abb. 22, Bild A und B), dann lassen sich diese in zwei Gruppen aufteilen: Die erste Gruppe beinhaltet die Versuche mit hohen Konzentrationen (Experimente 10, 11, 14, 15), die zweite diejenigen mit niedrigen Konzentrationen (Experimente 9, 12, 13). Um den Konzentrationsverlauf in den einzelnen Proben beider Gruppen besser vergleichen zu können, wurden in Abb. 30 die einzelnen Versuche auf ihre jeweilige Maximalkonzentration hin normalisiert dargestellt:

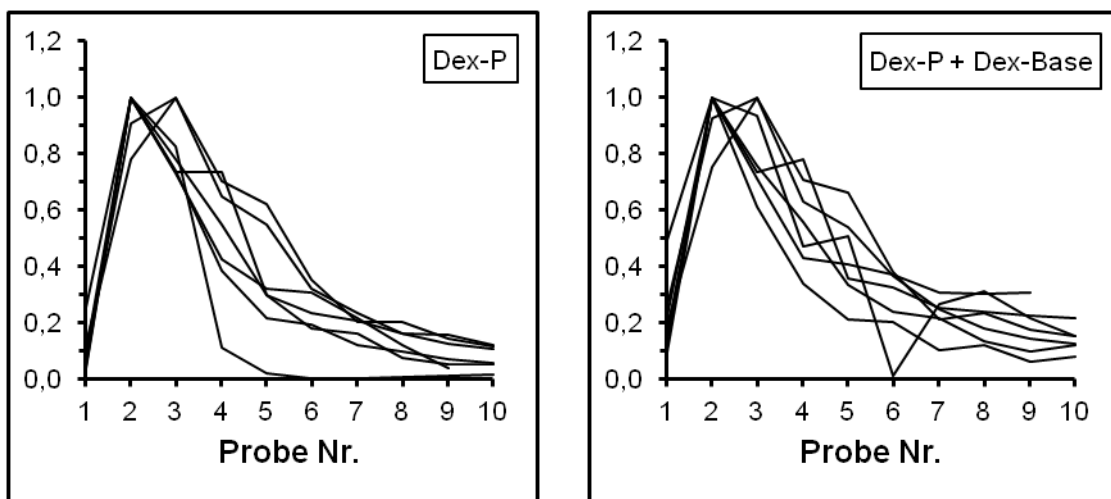


Abb. 30: normalisierte Darstellung der einzelnen Versuche mit Probenentnahme 20 Minuten nach Beendigung der Injektion

Ursachen für eine derartige Gruppenbildung mit unterschiedlich hohen Konzentrationen können variierende Clearance-Raten (siehe Abb. 29) oder ein variabel ausgeprägter Perilymphaustritt in das Mittelohr an der Injektionsstelle (Perilymph-Leck oder "Leak") sein. Geht man davon aus, dass die Clearance auch bei dieser Applikationsform weitestgehend konstant ist, so kommt als Erklärung für die unterschiedlich hohen ermittelten Konzentrationen der entnommenen Probenreihen nur ein unterschiedlich stark ausgeprägter "Perilymph-Leak" in Frage.

Im Methodenteil wurde bereits näher auf den pharmakokinetischen Parameter Clearance eingegangen, der in dem verwendeten Simulationsprogramm alle diejenigen Prozesse aufsummiert, die zu einer Elimination der applizierten Substanz aus der Scala tympani führen. Tritt nun im Bereich der Injektionsstelle Flüssigkeit in das Mittelohr aus infolge eines "Perilymph-Leaks", so stellt dies ebenfalls eine Art der Elimination dar, da auch hier ein Teil der applizierten Substanz die Scala tympani verlässt. Es muss deshalb folglich einen Zusammenhang zwischen Clearance und "Perilymph-Leak" geben, da die Änderung des einen Parameters auch eine Änderung des anderen Parameters zur Folge hat. Dieser Zusammenhang beider Parameter konnte auch bei den durchgeführten Computersimulationen beobachtet werden: Wählte man beispielsweise eine schnelle Clearance (kurze Eliminationshalbwertszeit), so ergaben sich niedrige Konzentrationen in den durch das Programm simulierten Perilymphproben. Gleichfalls erhielt man geringe Probenkonzentrationen, wenn ein entsprechend hoher "Perilymph-Leak" gewählt wurde.

Bei der Computersimulation der durchgeführten Experimente wurden feste Clearance-Werte gewählt, an die die anderen pharmakokinetischen Parameter so lange angepasst wurden, bis sich eine bestmögliche Übereinstimmung der aus dem Simulationsprogramm errechneten Probenkonzentrationen mit den Messdaten ergab. Hier zeigte sich, dass sich jedem Clearance-Wert ein entsprechender Wert für den "Perilymph-Leak" zuordnen ließ. Je größer der vorgegebene Clearance-Wert war, umso größer war auch der dazu passende Wert des "Perilymph-Leaks" (Abb. 31).

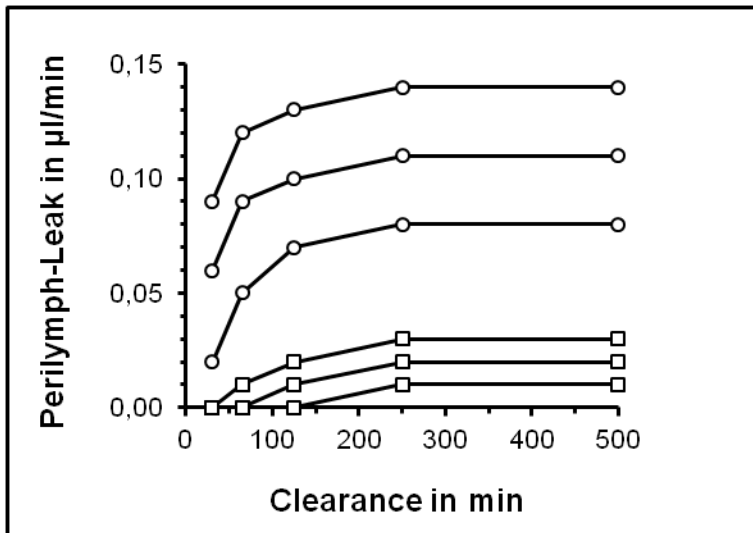


Abb. 31: Zusammenhang von Clearance und Perilymph-Leak

Bei der Simulation der einzelnen Versuche konnte jedem Clearance-Wert ein entsprechender Wert für den "Perilymph-Leak" zugeordnet werden. Je größer der Wert für die Clearance war, desto höher mussten auch die Werte für den Perilymph-Leak gewählt werden, damit die Spitzenkonzentrationen der durch das Simulationsprogramm errechneten Probenreihen denjenigen der Versuche entsprach. Die Kreise markieren diejenigen Versuche, die hohe Probenkonzentrationen beinhalteten, die Quadrate stehen für Versuche mit geringen Spitzenkonzentrationen.

Auch in dieser Abbildung lässt sich die weiter oben bereits angesprochene Unterteilung der Ergebnisse in zwei Gruppen, die sich hinsichtlich ihrer erreichten Probenkonzentrationen voneinander unterscheiden, deutlich erkennen. So waren in der Simulation bei den Versuchsreihen mit hohen Substanzkonzentrationen in den Proben wesentlich geringere Werte für den "Perilymph-Leak" notwendig um eine optimale Datenanpassung zu erzielen. Experimente mit geringen Dexamethason-Spiegeln benötigten jedoch höhere "Leak"-Werte im Simulationsprogramm. Hieraus lässt sich folgern, dass somit die Versuche, in denen nur geringe Konzentrationen gemessen wurden, durch einen großen "Perilymph-Leak" während der Applikationsphase gekennzeichnet waren. Anhand des Simulationsprogramms ist es jedoch möglich, diese Artefaktbildung bei hohem "Perilymph-Leak" auszugleichen, in dem für die erneute Simulation ein entsprechend geringerer Wert für den "Leak" gewählt wird. Auf diese Weise lässt sich errechnen, wie hoch die Konzentrationen in den einzelnen Proben gewesen wären, wenn keine Artefaktbildung durch einen zu hohen "Leak" eingetreten wäre (Abb. 32).

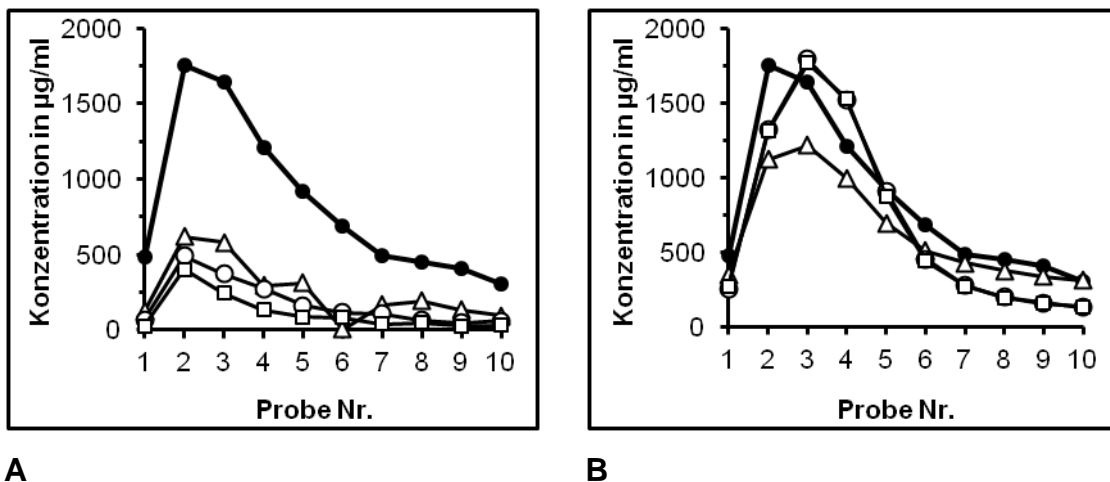


Abb. 32: Artefaktbildung durch hohe "Perilymph-Leaks"

Dargestellt sind die mittels HPLC bestimmten Probenkonzentrationen (Dex-P + Dex-Base) für die Mittelwerte der Versuche mit hohen Substanzkonzentrationen (Nr. 10, 11, 14, 15; volle Kreise) sowie die ebenfalls gemessenen Konzentrationen der anderen Versuche (Nr. 9, 12, 13; leere Symbole), die wesentlich geringere Substanzkonzentrationen aufwiesen (A). Nach einer Computersimulation der Versuche mit niedrigen Medikamentenspiegeln, bei der die Werte für den "Perilymph-Leak" an diejenigen der anderen Versuche (mit hohen Konzentrationen) angepasst wurden, zeigten sich deutlich höhere Substanzkonzentrationen, die nun weitestgehend denen der anderen Versuche entsprachen.

4.1.2.2 Probenentnahme 80 Minuten nach erfolgter Applikation

In drei der vier durchgeführten Versuche (Nr. 16, 17, 19) zeigten sich Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Spitzenkonzentrationen. So lagen in diesen Versuchen die Werte für Dex-P beispielsweise in einem Bereich von 873,1 µg/ml - 1217,9 µg/ml (MW: 1035,2 µg/ml; SD: 173,3 µg/ml). Für die aufsummierten Konzentrationen von Dex-P und Dex-Base ergaben sich Werte zwischen 1110,0 µg/ml und 1616,1 µg/ml (MW: 1377,8 µg/ml; SD: 254,3 µg/ml). Das vierte Experiment (Nr. 18) unterschied sich jedoch deutlich von diesen Versuchen. Die hier erreichten Spitzenkonzentrationen waren wesentlich geringer (Dex-P: 26,8 µg/ml; Dex-P + Dex-Base: 96,8 µg/ml). Dieser Versuch zeigte ebenfalls Unterschiede in der jeweiligen Probennummer, in der die Spitzenkonzentration einer Probenreihe erreicht wurde. Während sich in den drei anderen Versuchen die höchsten Konzentrationen für Dex-P mit Dex-Base in der zweiten bzw. dritten Perilymphprobe nachweisen ließen, so befand sich bei diesem Versuch die Maximalkonzentration in der vierten entnommenen

Probe. Auch bei alleiniger Betrachtung der Dex-P-Konzentrationen wichen diese voneinander ab: In den Versuchen Nr. 16, 17 und 19 zeigten sich die Spitzenkonzentrationen in der dritten bzw. vierten Probe, bei Experiment Nr. 18 hingegen ließ sich die Maximalkonzentration erst in der fünften entnommenen Perilymphprobe nachweisen.

Auch hier lassen sich die insgesamt geringen erreichten Probenkonzentrationen des Versuchs Nr. 18 durch einen hohen "Perilymph-Leak" erklären. Anhand der Computersimulation konnte dies ebenfalls bestätigt werden. So waren für die Anpassung der errechneten Probenkonzentrationen an die Messdaten in der Computersimulation für eine optimale Datenanpassung wesentlich höhere Werte für den "Perilymph-Leak" notwendig als bei den anderen Versuchen (Abb. 33).

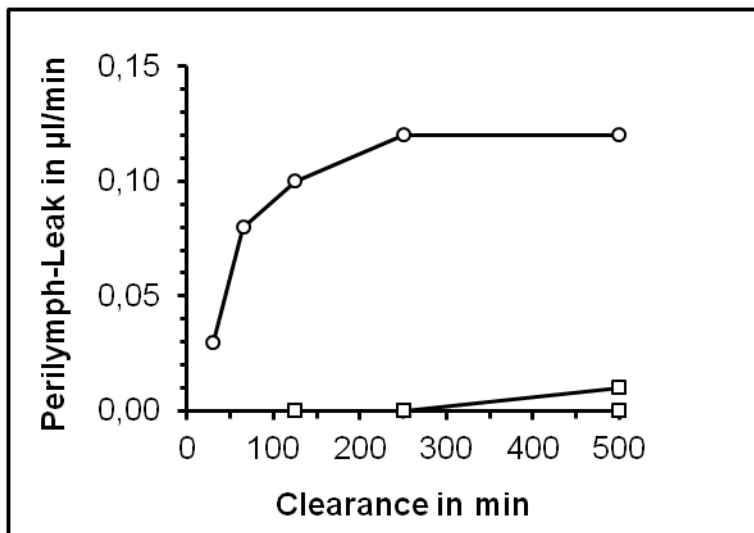


Abb. 33: Vergleich der unterschiedlichen "Perilymph-Leaks"

In der Abbildung ist der Zusammenhang zwischen Clearance und "Perilymph-Leak" in den durchgeführten Simulationen erkennbar: hohe Clearance-Werte benötigten ebenfalls einen großen "Perilymph-Leak". Dies ist besonders deutlich an Versuch Nr. 18 (Kreise) ersichtlich, für den wesentlich höhere Werte des "Perilymph-Leaks" verwendet werden mussten als bei den anderen Versuchen (Quadrate).

Es konnte hier ebenfalls mit Hilfe der Computersimulation gezeigt werden, wie hoch die zu erwartenden Probenkonzentrationen wären, wenn ein kleinerer "Perilymph-Leak" (vergleichbar zu den Experimenten Nr. 16, 17 und 19) während der Versuchsdurchführung bestanden hätte. Dazu wurde eine erneute

Computersimulation des Versuchs durchgeführt, in der lediglich der Wert des "Perilymph-Leaks" verkleinert wurde, so dass er denjenigen aus den anderen drei Versuchen entsprach (Abb. 34). Die restlichen pharmakokinetischen Parameter (Clearance, Accessibility und Perilymph-Flow) wurden hierbei unverändert beibehalten.

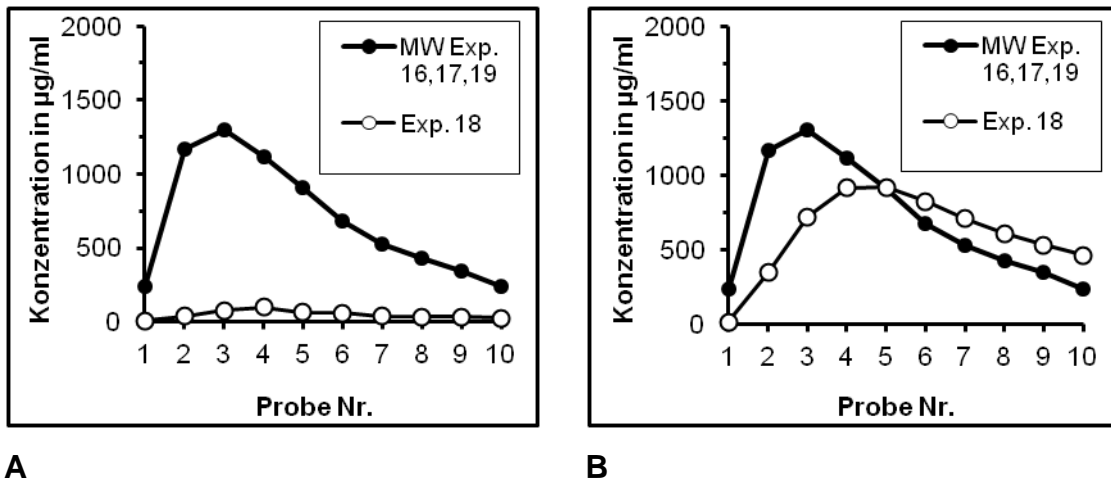


Abb. 34: Einfluss des "Perilymph-Leaks"

In den Abbildungen sind die mittleren Probenkonzentrationen von Dex-P mit Dex-Base der Versuche 16, 17 und 19 (volle Kreise) sowie die Konzentrationen für Experiment Nr. 18 (leere Kreise) aufgeführt. Im linken Bild (A) sind die gemessenen Konzentrationen des Versuchs Nr. 18 eingezeichnet. Nach Durchführung einer Computersimulation, in der die Werte des "Perilymph-Leaks" von Versuch Nr. 18 an die Werte der anderen drei Versuche angepasst wurden, zeigten sich wesentlich höhere Dexamethason-Konzentrationen in den Perilymphproben (B).

4.1.2.3 Berechnung der Halbwertszeit

Bei der intracochleären Applikation von Dex-P wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt, in denen die Perilymphproben zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen wurden. Da die gemessenen Konzentrationen beider Versuchsreihen bekannt waren, konnte anhand dieser Daten die Halbwertszeit von Dexamethason in der Scala tympani der Cochlea abgeschätzt werden. In die Berechnung der Halbwertszeit flossen ausschließlich Daten derjenigen Versuche ein, die nicht durch einen hohen Perilymph-Leak gekennzeichnet waren. Aus der ersten Versuchsreihe, in der eine Probenentnahme 20 Minuten nach abgeschlossener Applikation erfolgte, wurden die Daten der Versuche Nr.

10, 11, 14 und 15 in die Berechnung aufgenommen. In der zweiten Versuchsreihe (Probenentnahme 80 Minuten nach erfolgter Injektion) wurden die Ergebnisse der Versuche Nr. 16, 17 und 19 zur Bestimmung der Halbwertszeit verwendet. Die weiteren Berechnungen wurden ausschließlich mit den Probenkonzentrationen des Gesamt-Dexamethasons (Dex-P + Dex-Base) durchgeführt.

Zunächst wurde für jeden Versuch die Menge an Dexamethason in den 10 entnommenen Proben bestimmt. Anschließend wurde für jede Versuchsreihe der entsprechende Mittelwert errechnet. Eine Übersicht der hierdurch erhaltenen Werte zeigt Tab. 8.

intracochleäre Applikation						
Probenentnahme	Menge [μg]				MW	SD
nach 20 min	8,1	8,3	7,0	8,9	8,1	0,8
<i>Experiment Nr.</i>	10	11	14	15		
nach 80 min	8,2	6,4	5,5		6,7	1,3
<i>Experiment Nr.</i>	16	17	19			

Tab. 8: in den Proben wiedergefundenen Gesamtmenge an Dexamethason (Dex-P + Dex-Base)

Bei den folgenden Berechnungen wurde davon ausgegangen, dass die Elimination von Dexamethason aus der Scala tympani einer Kinetik 1. Ordnung unterliegt, d.h. nach einer Zeitdauer, die genau einer Halbwertszeit entspricht, verringert sich die Menge an Dexamethason auf exakt die Hälfte der Ausgangsmenge. Eine derartige Elimination lässt sich durch folgende Formel beschreiben:

$$N(t) = N(0) \times \left(\frac{1}{2}\right)^{\frac{t}{T_{1/2}}}$$

mit $N(0)$ = Ausgangsmenge; $N(t)$ = Menge zum Zeitpunkt t .

Nach Umformung ergibt sich:

$$T_{1/2} = \frac{t}{\log_{1/2} \left(\frac{N(t)}{N(0)}\right)}$$

In diese Gleichung konnten nun die bereits errechneten Werte eingesetzt werden: Die Ausgangsmenge $N(0)$ entsprach hier 8,1 μg , das beobachtete

Zeitintervall lag bei $t = 60$ Minuten und $N(60)$ betrug somit $6,7 \mu\text{g}$. Hieraus folgte eine berechnete Halbwertszeit für Dexamethason von:

$$T_{1/2} \approx 223,5 \text{ min}$$

Dieser Wert stimmt überein mit Literaturangaben, in denen für Dexamethason eine Eliminationshalbwertszeit von 201- 255 Minuten genannt wird [11]. Im Internet (<http://www.gifte.de/Antidote/fortecortin.htm>) finden sich ebenfalls Angaben zur Serum-Eliminationshalbwertszeit von Dexamethason, die für eine erwachsene Person im Mittel 4 Stunden (170- 330 Minuten) betragen soll. Die Elimination im Liquor nach intravenöser Applikation findet jedoch laut dieser Quelle viel langsamer statt. Die Maximalkonzentrationen im Liquor sind zwar schon 4 Stunden post injectionem erreicht, jedoch sind nach weiteren 20 Stunden noch ungefähr $2/3$ der Maximalkonzentration vorhanden.

Eine deutlich kürzere Halbwertszeit für Dexamethason in der Scala tympani (22,5 min) wurde in einer weiteren tierexperimentellen Arbeit ermittelt, in der jedoch die Medikamentenapplikation und Probengewinnung am lateralen Bogengang erfolgte [47].

Bei der Berechnung der Halbwertszeit anhand der Versuchsdaten ist zu bedenken, dass diese unter der Annahme vorgenommen wurde, dass die Elimination von Dexamethason aus der Scala tympani einer Kinetik 1. Ordnung unterliegt. Aufgrund der Datenlage (Entnahme von Proben zu zwei verschiedenen Zeitpunkten) lässt sich dies jedoch nur vermuten. Zur genaueren Untersuchung der Eliminationskinetik sind jedoch weitere Versuche mit unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten der Perilymphproben zwingend erforderlich. Weiterhin ist zu bedenken, dass die gesammelten Probevolumina nicht nur der Scala tympani entstammten und Perilymphe enthielten, sondern dass insbesondere die zuletzt entnommenen Proben Zerebrospinalflüssigkeit beinhalten. Möglicherweise bestehen Unterschiede hinsichtlich der Elimination von Dexamethason in beiden Flüssigkeiten.

4.2 Vergleich der unterschiedlichen Applikationsformen

4.2.1 Konversion von Dex-P in Dex-Base

Bei der Verteilung von Dex-Base in den entnommenen Probenreihen zeigten sich Unterschiede in den zwei durchgeführten Applikationsverfahren. Nach lokaler Applikation an die Rundfenstermembran entsprach die Verteilung der Dex-Base-Konzentration in den Proben derjenigen von Dex-P. Die höchsten Konzentrationen wurden für beide Substanzen in derselben Probe (Nr. 3) gemessen.

Bei intracochleärer Applikation konnte jedoch keine Übereinstimmung der Dex-P- und Dex-Base-Verteilung in den Proben gefunden werden. Hier ergab sich für Dex-Base eine bis auf kleinere Konzentrationsunterschiede nahezu gleichmäßige Substanzverteilung auf alle 10 Proben. In Abb. 35 und Abb. 36 sind die unterschiedlichen Verteilungen von Dex-Base beider Applikationsverfahren noch einmal vergleichend gegenübergestellt:

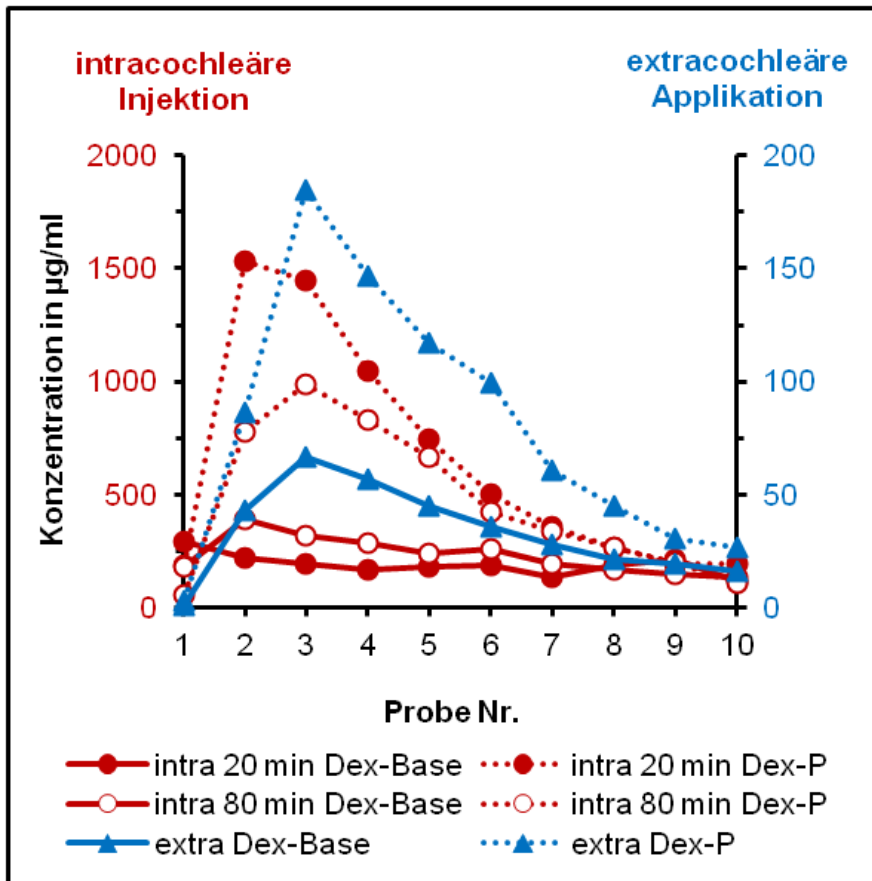


Abb. 35: Vergleich der unterschiedlichen Applikationsformen

Dargestellt sind die Verteilungen von Dex-P und Dex-Base nach extracochleärer Applikation (blau) sowie nach intracochleärer Injektion (rot). Während die Konzentrationsverteilung von Dex-Base in den entnommenen Proben nach lokaler Applikation derjenigen von Dex-P entsprach, so wich die Dex-Base-Verteilung nach intracochleärer Applikation von den entsprechenden Dex-P-Verteilungen deutlich ab und zeigte eine nahezu gleichmäßige Verteilung auf die entnommenen Probevolumina.

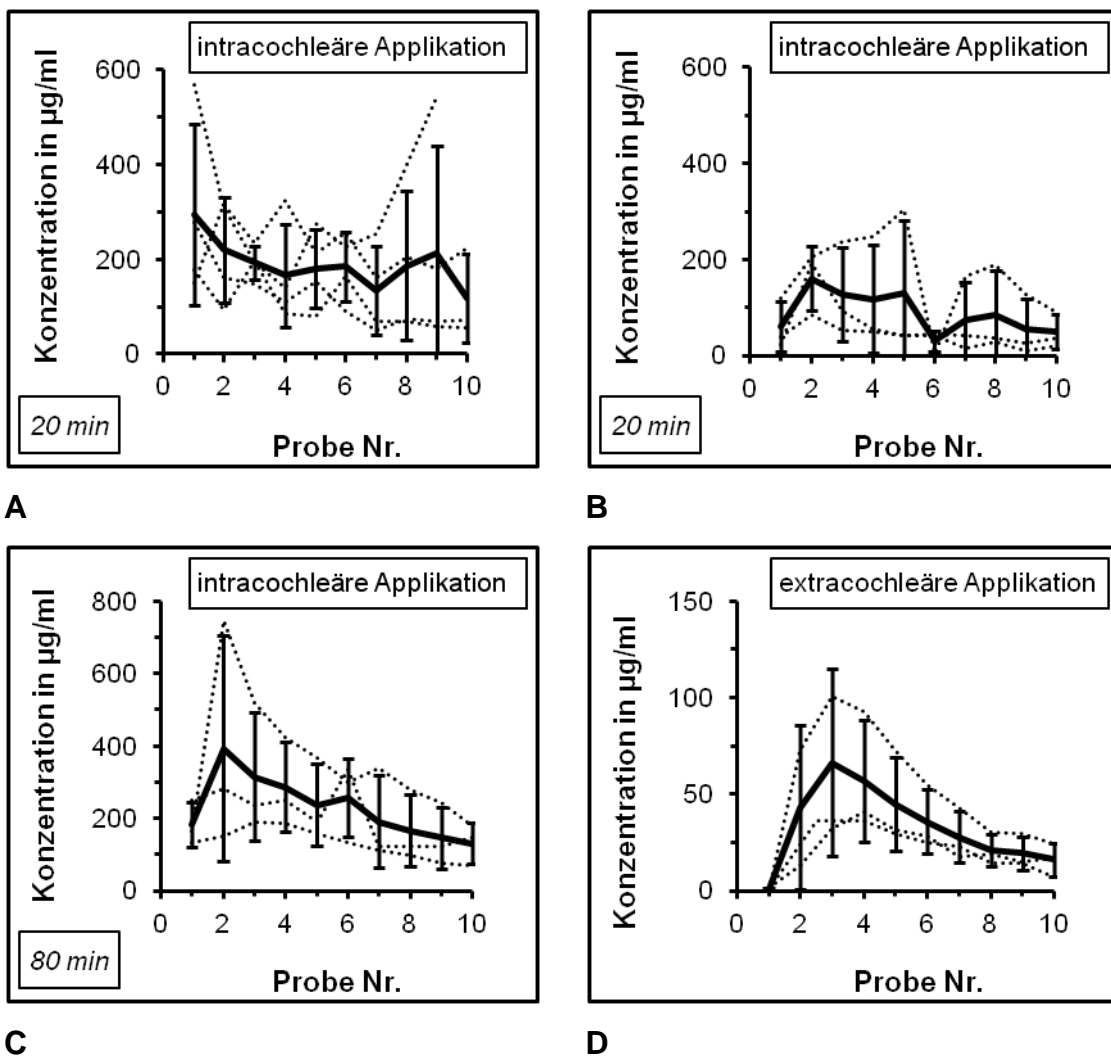


Abb. 36: Verteilung von Dex-Base in den entnommenen Probevolumina

Für jeden Versuch sind die mittels HPLC bestimmten Dex-Base-Konzentrationen der entnommenen Probevolumina (gepunktete Linien) sowie die aus diesen Daten errechnete Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen eingetragen (durchgezogene Linien).

A und B: Verteilung von Dex-Base auf die einzelnen Proben nach intracochleärer Substanzinjektion sowie einer Entnahme der Proben 20 Minuten nach erfolgter Injektion. In Bild A sind die Daten der Versuche Nr. 10, 11, 14 und 15 (hohe Substanzkonzentrationen) eingetragen, wohingegen Bild B diejenigen Versuche berücksichtigt, die durch einen hohen Perilymph-Leak gekennzeichnet waren (Versuche Nr. 9, 12, 13).

C: Werte für Dex-Base nach intracochleärer Applikation und einer Probenentnahme 80 Minuten nach erfolgter Substanzinjektion. In diesem Bild sind die Daten des Versuchs Nr. 18 nicht berücksichtigt, da bei diesem ein hoher Leak bestand und es dadurch zu entsprechend niedrigen Substanzkonzentrationen kam.

D: Nach extracochleärer Applikation ergab sich für alle drei Versuche eine ähnliche Verteilung auf die entnommenen Probevolumina.

Die annähernd gleichmäßige Dex-Base-Verteilung auf die 10 entnommenen Probevolumina nach intracochleärer Substanzapplikation könnte in einer

Sättigung der an der Konversion von Dex-P in Dex-Base beteiligten Enzyme begründet sein. Bei dieser Applikationsform gelangte eine große Menge an Dex-P (20 µg) innerhalb eines relativ kurzen Zeitraumes (20 Minuten) in die Scala tympani der Cochlea. Diese rasche Verfügbarkeit einer großen Menge Dex-P in der Perilymphe könnte so zu einer schnell eintretenden Sättigung der Phosphatasen entlang der Scala tympani führen. Als Folge dieser Sättigung kann an jedem Punkt entlang der Scala tympani immer nur die gleiche Menge an Dex-P dephosphoryliert werden, was schließlich zu einer homogenen Verteilung von Dex-Base entlang der Scala tympani führt.

Bei lokaler Applikation an die Rundfenstermembran hingegen war nicht mit einer Sättigung der Phosphatasen zu rechnen, da bei dieser Applikationsform kontinuierlich über einen Zeitraum von zwei bis drei Stunden nur geringe Mengen Dex-P in die Scala tympani gelangten.

4.2.2 Vergleich der Spitzenkonzentrationen

Verglichen wurden die Konzentrationen von Dex-P mit Dex-Base aus den verschiedenen Applikationsverfahren (lokale Applikation an die Rundfenstermembran, intracochleäre Injektion und Probenentnahme 20 bzw. 80 Minuten nach erfolgter Injektion; siehe Abb. 37).

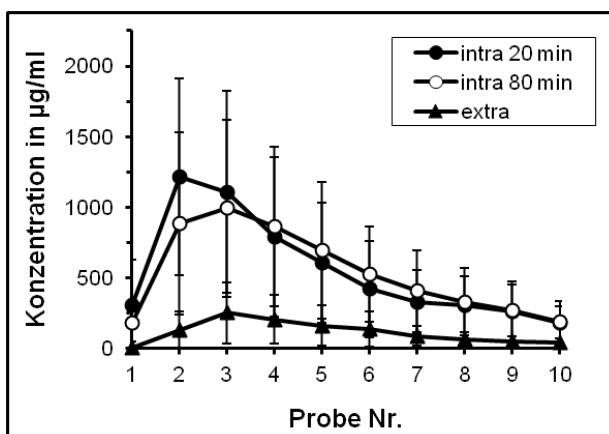


Abb. 37: Substanzkonzentrationen der einzelnen Applikationsarten

Übersicht der für die verschiedenen Applikationsverfahren ermittelten mittleren Probekonzentrationen von Dex-P mit Dex-Base. Die bei intracochleärer Medikamenteninjektion (intra 20 bzw. 80 min) erhaltenen Probekonzentrationen waren deutlich höher als bei extracochleärer Rundfensterapplikation (extra). Die Spitzenkonzentrationen der einzelnen Applikationsarten wiesen eine ausgeprägte Variabilität auf.

Die höchsten Maximalkonzentrationen in den Probevolumina fanden sich nach intracochleärer Injektion. Bei einer frühzeitigen Entnahme der Proben (20 Minuten nach beendeter Injektion) zeigten sich höhere Substanzkonzentrationen (1216,1 µg/ml) als bei einem späteren Entnahmezeitpunkt (80 Minuten nach Injektion; 995,2 µg/ml). Deutlich geringere Spitzenkonzentrationen wurden hingegen bei extracochleärer Applikation beobachtet (251,3 µg/ml) [19]. In Tab. 9 sind die für die einzelnen Applikationsverfahren errechneten Werte zusammenfassend dargestellt:

Probe Nr.	lokale Applikation an die Rundfenstermembran		intracochleäre Injektion			
	MW	SD	20 Minuten nach Injektionsstopp		80 Minuten nach Injektionsstopp	
			MW	SD	MW	SD
1	3,7	2,3	305,4	321,0	181,6	134,7
2	129,0	131,6	1216,1	699,0	886,4	647,9
3	251,3	213,4	1108,0	715,3	995,2	627,2
4	203,6	172,8	791,2	565,8	862,9	567,9
5	161,9	142,0	606,8	424,1	695,5	486,4
6	135,0	124,5	422,2	340,2	523,2	338,0
7	88,5	72,3	325,1	227,6	405,8	292,5
8	66,2	48,5	302,5	208,6	330,2	237,6
9	49,5	35,4	261,1	213,8	268,8	182,8
10	42,7	31,2	184,3	150,8	185,4	112,6

Tab. 9: mittlere Probenkonzentrationen der einzelnen Applikationsverfahren

In der Tabelle sind die Mittelwerte (MW) sowie Standardabweichungen (SD) der Gesamt-Dexamethasonkonzentrationen (Dex-P + Dex-Base) der Proben aus den verschiedenen Applikationsarten angeführt. Alle Substanzkonzentrationen sind in µg/ml angegeben.

Auffallend war eine große Variabilität der Spitzenkonzentrationen innerhalb der verglichenen Applikationsverfahren. Zur genaueren Beurteilung dieser Variabilität wurde der Variationskoeffizient VarK (Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert) gebildet, der einen direkten Vergleich der verschiedenen Applikationsverfahren ermöglichte, da er neben den entsprechenden Standardabweichungen auch die hierbei erreichten mittleren Spitzenkonzentrationen berücksichtigte. Ein großer Wert des VarK beschrieb eine hohe Variabilität, kleine VarK-Werte hingegen stehen für eine geringe Variabilität. Für die extracochleäre Applikation an die Rundfenstermembran betrug der VarK 85 % und stand somit für eine große Variabilität der Maximalkonzentrationen bei diesem Applikationsverfahren.

Die Versuche mit intracochleärer Applikation hingegen wiesen geringere VarK-Werte auf: Bei einer frühen Entnahme der Perilymphproben (20 Minuten nach erfolgter Injektion) ergab sich ein VarK von 57 %, bei einer Entnahme zu einem späteren Zeitpunkt (80 Minuten nach Substanzapplikation) betrug der errechnete VarK 63 %.

Die hohe Variabilität der Maximalkonzentrationen bei extracochleärer Substanzapplikation kann auf die variierende Permeabilität der Rundfenstermembran zurückgeführt werden. Die Permeabilität dieser Membran kann zwar durch entsprechende Vorbehandlung (etwa mit Luft) beeinflusst werden, jedoch stellt sie auch trotz dieser Maßnahmen einen nicht exakt bestimmbar pharmakokinetischen Parameter dar, der zudem einer ausgeprägten Variabilität unterworfen ist.

Wie in Tab. 9 ersichtlich, war auch nach intracochleärer Substanzinjektion eine Schwankung der Spitzenkonzentrationen zu beobachten, die jedoch nicht so ausgeprägt wie nach extracochleärer Applikation war. Es ist hier jedoch zu bedenken, dass für diese Berechnungen alle Versuchsdaten verwendet wurden. Da sich aber bei dieser Applikationsform eine Unterteilung in zwei Gruppen (Versuche mit geringem bzw. mit hohem Perilymph-Leak) vornehmen ließ, schien es sinnvoll, dies ebenfalls bei der Datenauswahl zu berücksichtigen. Es wurden hierzu die Versuche, in denen hohe Substanzkonzentrationen messbar waren, zu einer Gruppe zusammengefasst sowie Versuche mit geringen Probekonzentrationen in eine zweite Gruppe eingeteilt. Die für jede Gruppe berechneten Variationskoeffizienten wiesen nun deutlich geringere Werte auf (siehe Tab. 10).

		MW	SD	VarK	alter VarK
intra 20	<i>geringer Perilymph-Leak</i>				0,57
	höchste [C] in µg/ml	1751,3	279,2	0,16	
intra 80	<i>hoher Perilymph-Leak</i>				0,63
	höchste [C] in µg/ml	502,6	110,7	0,22	
intra 20	<i>geringer Perilymph-Leak</i>				0,63
	höchste [C] in µg/ml	1301,4	166,0	0,13	

Tab. 10: Variationskoeffizienten

In der Tabelle sind die nach der Höhe ihres Perilymph-Leaks in Gruppen unterteilten und neu berechneten Variationskoeffizienten (VarK) für die intracochleäre Substanzapplikation aufgelistet. Diese Koeffizienten waren deutlich geringer als die zuvor berechneten, die die unterschiedlichen Leaks in den Versuchen nicht berücksichtigt hatten (alter VarK). intra 20 bzw. 80: Entnahme der Perilymphproben 20 bzw. 80 Minuten nach erfolgter Medikamentenapplikation.

Zusammenfassend und schlussfolgernd kann gesagt werden, dass sich durch intracochleäre Substanzapplikation wesentlich höhere Medikamentenspiegel in der Scala tympani erreichen ließen als durch extracochleäre Rundfensterapplikation. Die Variabilität der Maximalkonzentrationen war bei intracochleärer Applikation zudem geringer ausgeprägt [19]. Um hohe und gleichmäßige Substanzkonzentrationen in der Perilymphe zu erhalten, ist es außerdem erforderlich den Perilymph-Austritt im Bereich der Injektionsstelle möglichst gering zu halten.

4.2.3 Verteilung der applizierten Substanz in der Scala tympani

In diesem Abschnitt soll näher auf die Substanzkonzentrationen der ersten vier entnommenen Perilymphproben eingegangen werden. Diese Probevolumina sind deshalb von besonderem Interesse, da sie nahezu ausschließlich Perilymphe der Scala tympani enthalten und nur zu einem sehr geringen Grad mit Zerebrospinalflüssigkeit kontaminiert sind. Anhand dieser Proben können daher Aussagen über die Verteilung des applizierten Dexamethasons innerhalb der Scala tympani bei den unterschiedlichen Applikationsverfahren gemacht werden.

Lokale Applikation an die Rundfenstermembran

In den entnommenen Perilymphproben der durchgeführten Versuche war ein Anstieg der Konzentration von Dex-P bis zum Erreichen der Maximalkonzentration in der dritten bzw. vierten Probe erkennbar [37]. Der gleiche Verlauf wurde auch bei den addierten Substanzkonzentrationen von Dex-P und Dex-Base, die in drei Versuchen zusätzlich bestimmt werden konnte, beobachtet (siehe Abb. 38).

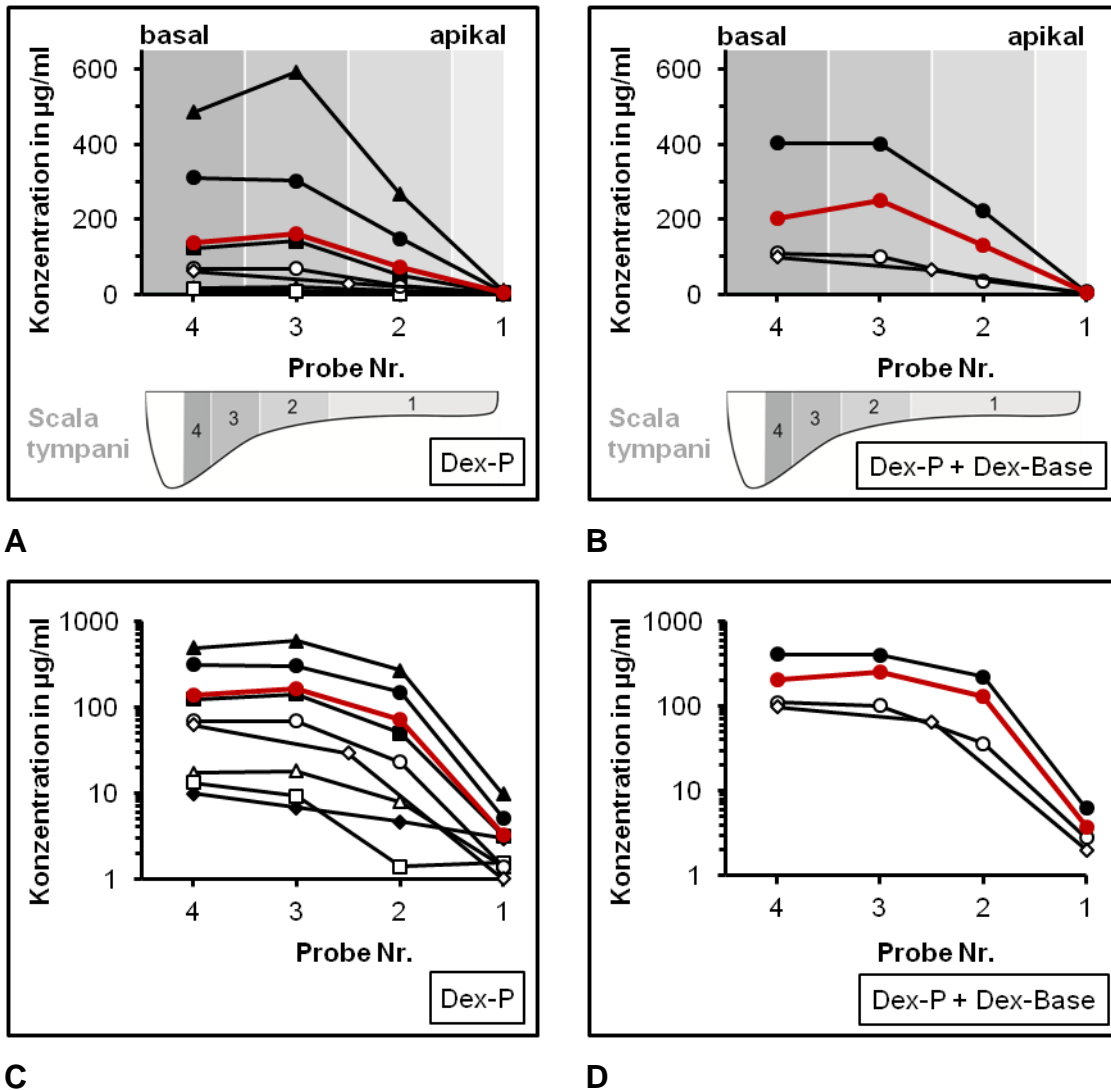


Abb. 38: Konzentrationen der ersten vier Perilymphproben nach extracochleärer Applikation

In den Schaubildern sind diejenigen Perilymphproben aufgeführt, die der Scala tympani entstammten (siehe Abbildung unter Diagramm in A und B) und keine Kontamination mit Zerebrospinalflüssigkeit aufwiesen. Proben mit basalem Ursprung aus der Scala tympani enthielten höhere Medikamentenkonzentrationen. A und B: lineare Darstellung, C und D: logarithmische Darstellung; rot: Mittelwerte.

Da die kurz nacheinander entnommenen Proben zunehmend Perilymphe aus basalen Anteilen der Scala tympani enthielten und die höchsten Konzentrationen in der dritten bzw. vierten Probe gemessen wurden, lässt sich daraus schließen, dass sich bei extracochleärer Rundfensterapplikation in der Scala tympani basal hohe Medikamentenkonzentrationen erreichen lassen, die jedoch nach apikal stark absinken. Es liegt somit ein basoapikal gerichteter

Gradient vor, der zu einer inhomogenen Medikamentenverteilung entlang der Scala tympani führt [37].

Die Bildung von basoapikalen Gradienten nach Applikation an die Rundfenstermembran konnte bereits für andere Substanzen wie Gentamicin [38] und den Ionenmarker Trimethylphenylammonium [30] experimentell nachgewiesen werden. Auch zeigten morphologische Untersuchungen der Cochlea nach Applikation von Meerrettichperoxidase geringere Reaktionsprodukte in apikalen Bereichen der Cochlea [44]. Diese Ergebnisse stimmen mit physiologischen Untersuchungen überein [10,49] und konnten ebenfalls durch Computersimulationen bestätigt werden [39,40,41,42].

Zur Veranschaulichung der basoapikalen Konzentrationsunterschiede in der Scala tympani wurde der Quotient aus der vierten (basalen) und der ersten (apikalen) entnommenen Perilymphprobe gebildet.

Der so gebildete *basoapikale Quotient* betrug in den einzelnen Experimenten für Dex-P 3,3 bis 61,8 (Mittelwert: 35,5; SD: 23,9) (siehe Tab. 11).

Experiment Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Probe Nr.	<i>Konzentration von Dex-P in µg/ml</i>							
1	2,98	3,16	1,40	9,66	1,54	5,17	1,40	1,00
4	9,79	122,36	17,22	485,24	13,13	310,20	68,88	61,80
Quotient (Probe Nr.) 4/1	3,30	38,70	12,30	50,20	8,50	60,00	49,20	61,80

Tab. 11: basoapikale Quotienten für Dex-P nach Rundfensterapplikation

Dieser Quotient unterschätzt jedoch den realen Konzentrationsgradienten in der Perilymphe der Scala tympani, da das Probenentnahmeverfahren selbst die Konzentration an Dex-P in den entnommenen Proben beeinflusst und da die erste Perilymphprobe (1 µl) aus einem großen apikalen Bereich der Scala tympani stammt:

Wie im Methodenteil bereits erläutert, kommt es während der Probenentnahme zu einer Kontamination des basalen Anteils der Scala tympani durch über das Aquädukt einströmende zerebrospinale Flüssigkeit. Dies führt zu einer

Unterschätzung der Dex-P-Konzentration im basalen Anteil der Scala tympani infolge eines Verdünnungseffektes durch zerebrospinale Flüssigkeit.

Die aus dem apikalen Anteil der Scala tympani entnommene erste Probe beinhaltet Perilymphe aus einem ca. 10 mm langen Bereich, der mehr als 50 % der Gesamtlänge der Scala tympani entspricht [38]. Folglich stellt die Konzentration der ersten Probe ein Mittelwert von mehr als der Hälfte der Gesamtlänge der Scala tympani dar. Geht man jedoch davon aus, dass der basoapikale Konzentrationsgradient auf der Gesamtlänge der Scala tympani vorhanden ist und demzufolge die Konzentration nach apikal stetig abnimmt, so wird die Konzentration im apikalen Bereich deutlich überschätzt.

Auch ist die in 5 Versuchen vorgenommene Zuordnung der Substanznachweisgrenze (Dex-P: 0,1 µg/ml) zu den entsprechenden Perilymphproben zu berücksichtigen, bei denen die Werte unterhalb der Nachweisgrenze der HPLC-Analytik lagen. Diese Zuordnung führte ebenfalls zu einer Überschätzung der Substanzkonzentrationen der entsprechenden Proben, da die realen Werte dieser Proben geringer waren.

Da in drei Versuchen zusätzlich zu Dex-P auch die Konzentration der in den Proben enthaltenen Dex-Base bestimmt wurde, konnte für diese Versuche auch der basoapikale Quotient des Gesamt-Dexamethasons (Dex-P + Dex-Base) berechnet werden (Tab. 12).

Experiment Nr.	6	7	8
Probe Nr.	<i>Konzentration von Dex-P und Dex-Base in µg/ml</i>		
1	6,27	2,80	2,00
4	403,04	109,62	98,20
Quotient (Probe Nr.) 4/1	64,28	39,15	49,10
Mittelwert		50,84	
Standardabweichung		12,66	

Tab. 12: basoapikale Quotienten für Dex-P und Dex-Base nach Rundfensterapplikation

Wie bereits im Methodenteil erläutert war es mit Hilfe des Simulationsprogramms „Fluidsim“ möglich, ein Konzentrationsprofil des applizierten Dex-P entlang der Scala tympani kurz vor dem eigentlichen

Probeentnahmevergung zu erstellen und somit die Bildung von Artefakten, die durch den Entnahmevergung selbst bedingt waren, zu vermindern. Durch das Simulationsprogramm ließ sich zudem die Konzentration der applizierten Substanz entlang der Scala tympani alle 0,1 mm bestimmen. Auf diese Weise war es möglich die Substanzkonzentrationen der am weitesten basal bzw. apikal lokalisierten Abschnitte zu ermitteln. Durch diese Art der Bestimmung der apikalen Medikamentenkonzentrationen konnte somit eine Überschätzung dieser Werte zumindest teilweise korrigiert werden. Mit dem aus der Computersimulation erhaltenen Konzentrationsprofil ließ sich der basoapikale Quotient berechnen, jedoch kam es hier nicht zu einer Unterschätzung der basalen bzw. Überschätzung der apikalen Substanzkonzentrationen. Der hierbei erhaltene Quotient mußte demnach größer sein als der auf den Messwerten der Perilymphproben basierende Quotient.

Zur Berechnung dieses Quotienten wurden zwei Messpunkte ausgewählt und mit den Werten der beiden Punkte anschließend der basoapikale Quotient gebildet. Der hierfür verwendete basale Messpunkt befand sich 0,1 mm entfernt von der Basis der Cochlea und war damit direkt hinter der Rundfenstermembran lokalisiert. Der apikale Messpunkt hingegen war 16,2 mm von der Cochleabasis entfernt und lag somit im Bereich des Helikotremas [53]. Die hierbei erhaltenen Quotienten waren - wie erwartet - um ein Vielfaches höher als die aus den Perilymphproben berechneten Quotienten (Tab. 13).

Experiment Nr.	Quotient (basierend auf Versuchsdaten)	Quotient aus Computersimulation	
		absolut	logarithmisch
<i>Dex-P</i>			
1	3,3	1144,3	3,06
2	38,7	3399,8	3,53
3	12,3	1195,9	3,08
4	50,2	2891,9	3,46
5	8,5	783899,9	5,89
6	60,0	3384,0	3,53
7	49,2	81374,7	4,91
8	61,8	2371317,1	6,37
<i>Dex-P + Dex-Base</i>			
6	64,3	1835,0	3,26
7	39,2	103217,5	5,01
8	49,1	733396,1	5,87

Tab. 13: Vergleich der basoapikalen Quotienten

Durch die Computersimulation ließ sich eine Unterschätzung der basalen Perilymphkonzentrationen durch Kontamination mit zerebrospinaler Flüssigkeit sowie eine Überschätzung der apikalen Substanzkonzentrationen durch die großen Probevolumina zumindest teilweise korrigieren. Die aus der Computersimulation errechneten basoapikalen Quotienten wiesen daher wesentlich höhere Werte auf als die Quotienten, die aus den Perilymphproben gebildet wurden.

Die mit Hilfe des Simulationsprogramms errechneten basoapikalen Quotienten aller Versuche betragen für Dex-P (in logarithmischer Darstellung) 3,06 bis 6,37 (MW: 4,23; SD: 1,31). In den Versuchen, in denen zusätzlich Dex-Base bestimmt wurde, ergaben sich für Dex-P mit Dex-Base Werte von 3,26 bis 5,87 (MW: 4,71; SD: 1,33). Ähnliche Werte konnten bereits für Gentamicin festgestellt werden [38]: Die hier errechneten Quotienten betragen 1,3 bis 6,5 (MW: 3,64).

Durch die Auswertung der ersten vier Perilymphproben konnte somit eine Aussage über die Verteilung der applizierten Substanz in der Scala tympani gemacht werden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Verteilung nach lokaler Substanzapplikation keinesfalls homogen erfolgt, sondern dass stattdessen basal hohe Konzentrationen erzielt werden, die aber nach apikal hin stark abfallen. Zur Beschreibung der Konzentrationsunterschiede zwischen basalen und apikalen Anteilen der Scala tympani wurde der basoapikale

Quotient eingeführt. Dieser Quotient wurde zunächst aus der ersten (apikalen) und vierten (basalen) Perilymphprobe gebildet. Der hierbei errechnete Wert unterschätzte allerdings den realen Quotienten. Mit Hilfe des Simulationsprogramms war es jedoch möglich, die Höhe des tatsächlichen Quotienten näherungsweise zu bestimmen.

Intracochleäre Injektion

Zur Untersuchung der Verteilung des intracochleär applizierten Dexamethasons in der Scala tympani wurden die Daten der Versuche Nr. 10, 11, 14, 15, 16, 17 und 19 verwendet. In den restlichen Versuchen mussten Artefaktbildungen durch hohe "Perilymph-Leaks" während der Versuchsdurchführung angenommen werden.

Bei früher Entnahme der Perilymphproben (20 Minuten nach Applikationsende) konnte ein deutlicher Anstieg der Dexamethason-Konzentrationen von der ersten (apikalsten) zur zweiten Probe hin beobachtet werden. In den darauffolgenden Proben (Nr. 3 und 4) sank die Konzentration langsam wieder ab (Abb. 39). Im Vergleich zu der extracochleären Rundfensterapplikation, bei der die Maximalkonzentration erst in der dritten entnommenen Perilymphprobe erreicht wurde, fanden sich hier die höchsten Konzentrationen im Mittel bereits in der zweiten Probe, die einem weiter apikal gelegenen Bereich der Scala tympani entspricht. Somit ließ sich mit Hilfe dieser Applikationstechnik eine Verlagerung der Maximalkonzentrationen in apikalere Anteile der Scala tympani erreichen ohne Ausbildung des ausgeprägten bei lokaler Rundfensterapplikation beobachteten basoapikalen Konzentrationsgradienten.

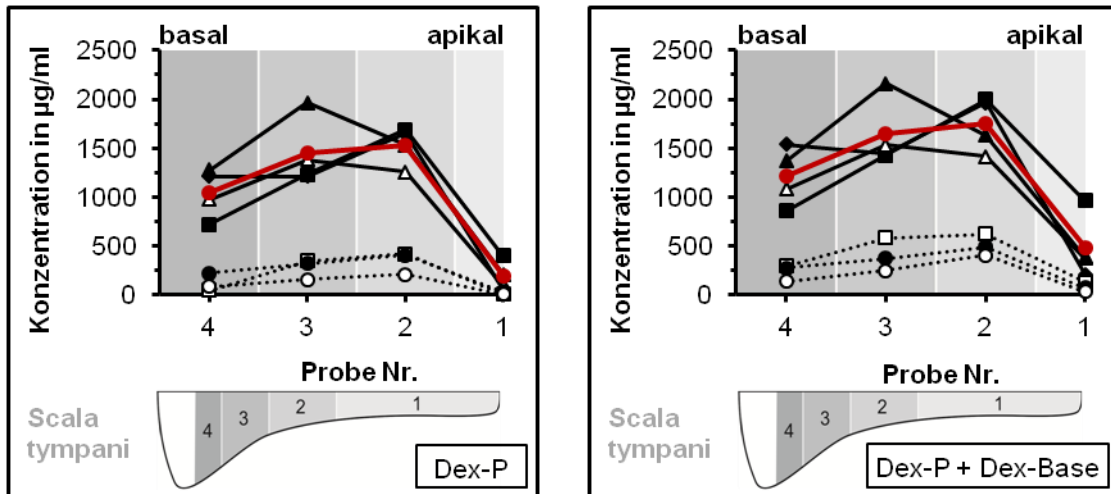


Abb. 39: Konzentrationen der ersten vier Perilymphproben nach intracochleärer Applikation (Probenentnahme 20 Minuten nach Substanzapplikation)

Bei dieser Applikationsform wurden die höchsten Perilymphkonzentrationen im Mittel in der zweiten Probe gemessen (rote Kurve). Zu basaleren Abschnitten hin wurde ein wesentlich geringerer Konzentrationsabfall beobachtet als zu der am weitesten apikal gelegenen ersten Perilymphprobe. Schwarze Kurven: die der Mittelwertberechnung zugrunde liegenden Experimente; gestrichelte Kurven: Versuche, für die ein hoher, artifiziell bedingter Perilymph-Leak angenommen werden mußte.

Bei Entnahme der Perilymphproben zu einem späteren Zeitpunkt (80 Minuten nach Applikation) zeigte sich wiederum eine andere Verteilung der Dexamethason-Konzentrationen auf die Proben. Hier fanden sich die höchsten mittleren Substanzkonzentrationen wie bei extracochleärer Applikation in der dritten entnommenen Perilymphprobe und entstammten somit wieder basaleren Anteilen der Scala tympani (Abb. 40).

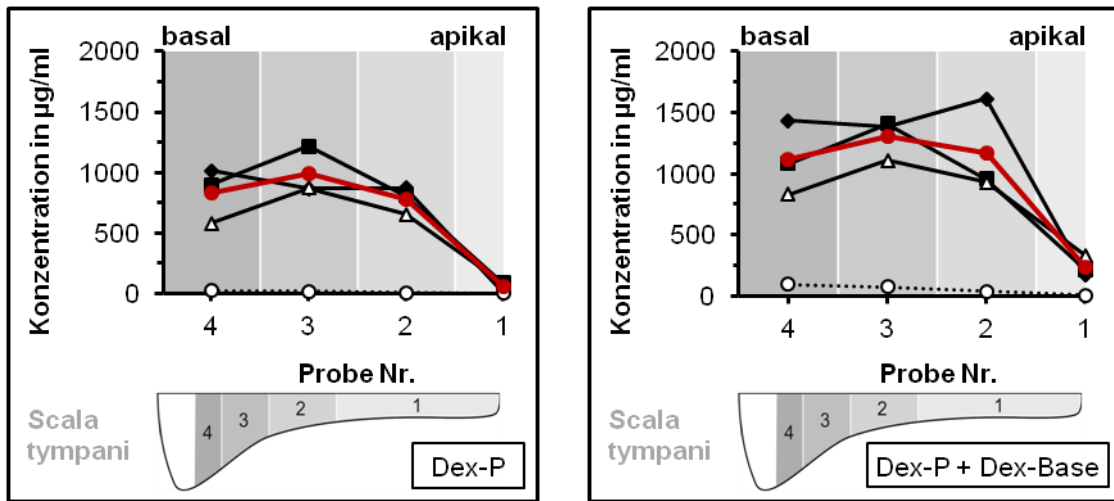


Abb. 40: Konzentrationen der ersten vier Perilymphproben nach intracochleärer Applikation (Probenentnahme 80 Minuten nach Substanzapplikation)

Die Maximalkonzentrationen wurden im Mittel in der dritten Perilymphprobe gemessen (rote Kurve). Proben, die aus einem angrenzenden Kompartiment entstammten (Nr. 2 und 4), zeigten einen geringen Abfall der Konzentration. Ein deutliches Absinken der Perilymphkonzentration wurde hingegen in der ersten (apikalsten) Probe beobachtet. Schwarze Kurven: die der Mittelwertberechnung zugrunde liegenden Experimente; gestrichelte Kurve: Versuch Nr. 18, für den ein hoher, artifizell bedingter "Perilymph-Leak" angenommen werden mußte.

Eine Ursache für die Verlagerung der Maximalkonzentrationen in basale Bereiche der Scala tympani bei späterer Probenentnahme könnte in dem geometrischen Aufbau der Cochlea begründet liegen. Der Querschnitt der Scala tympani nimmt nach apikal hin stetig ab und beeinflusst damit auch die Diffusion, die den wichtigsten pharmakologischen Parameter bei der Substanzverteilung entlang der Scala darstellt. In basalen Anteilen weist die Scala eine große Querschnittsfläche auf und bietet damit eine große Austauschfläche zur Stoffverteilung mittels Diffusion. In apikalen Anteilen hingegen ist der Querschnitt und somit auch die Austauschfläche wesentlich geringer. Die Diffusion kann hier nicht so gut erfolgen wie in den basalen Bereichen. Eine Substanz, die sich in der Scala tympani befindet, wird folglich leichter in basale Anteile diffundieren als in apikale Anteile (Abb. 41).

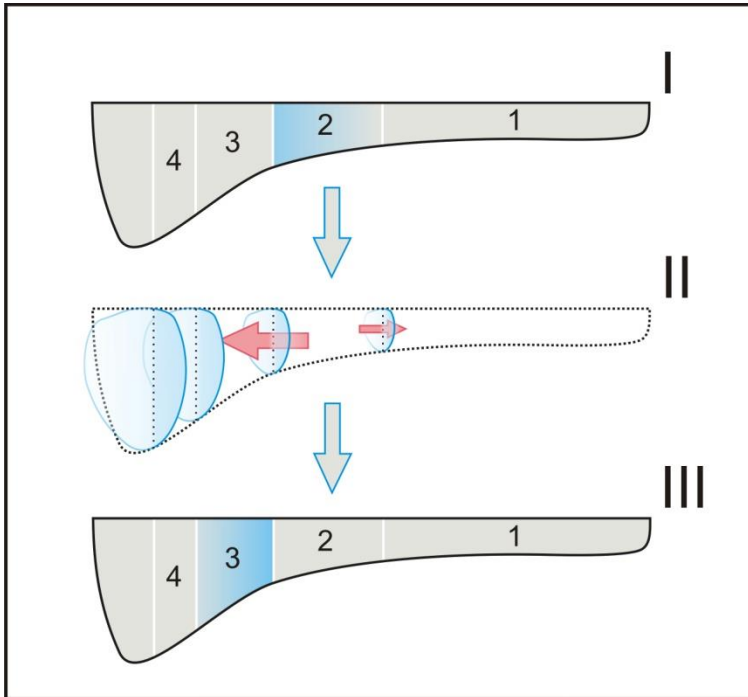


Abb. 41: Einfluss der Geometrie der Scala tympani auf die Stoffdiffusion

Bei einer frühen Entnahme der Perilymphproben (20 Minuten nach Substanzinjektion) zeigten sich die höchsten Konzentrationen im Mittel in der zweiten Probe (I). Wurden die Proben zu einem späteren Zeitpunkt entnommen (80 Minuten nach Substanzapplikation), so fanden sich die mittlere Spitzenkonzentrationen in der weiter basal der Scala tympani lokalisierten dritten Perilymphprobe (III). Eine Ursache für die Verlagerung der Maximalkonzentrationen in basale Anteile könnte in der Geometrie der Scala tympani begründet sein. Da basale Bereiche der Scala tympani eine größere Querschnittsfläche aufweisen, steht in diesen Anteilen somit auch eine größere Austauschfläche zur Substanzdiffusion zur Verfügung (II). Eine Substanz, die sich in der Scala tympani befindet, wird sich daher per diffusionem leichter in basale Anteile verteilen als in apikale Anteile.

Die Dexamethason-Konzentrationen der dritten und vierten Perilymphprobe, die Perilymphe aus den basalen Anteilen der Scala tympani enthielten, unterschieden sich bei beiden Applikationsverfahren (extracochleäre und intracochleäre Applikation) nur geringfügig. In der zweiten Probe, die einem weiter apikal gelegenen Anteil der Scala tympani entstammte, war jedoch nach extracochleärer Substanzapplikation ein Konzentrationsabfall zu beobachten.

Bei intracochleärer Injektion hingegen wurde, sofern kein "Perilymph-Leak" während des Versuchsvorgangs bestand, eine gleichförmigere Verteilung der Dexamethasonkonzentration in den ersten drei Perilymphproben beobachtet (Abb. 42).

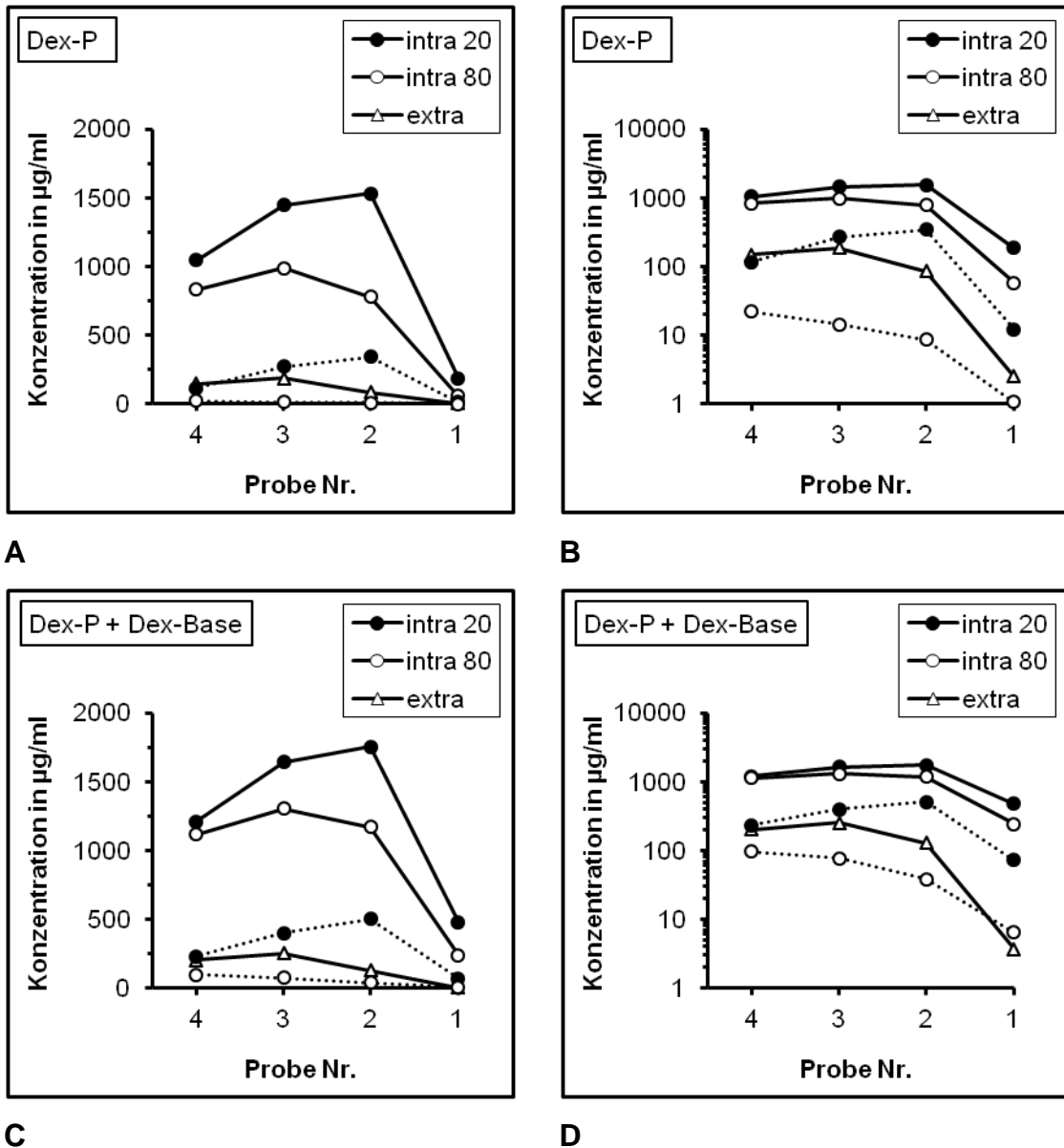


Abb. 42: Perilymphkonzentrationen der ersten vier Proben
 Vergleich der mittleren Substanzkonzentrationen der ersten vier entnommenen Perilymphproben nach extracochleärer Rundfensterapplikation (extra) sowie nach intracochleärer Medikamentenapplikation mit einer Entnahme der Perilymphproben nach 20 bzw. 80 Minuten (intra 20 bzw. 80). Die Versuche, für die ein hoher "Perilymph-Leak" angenommen werden muss, sind gestrichelt dargestellt. Nach intracochleärer Substanzinjektion verteilte sich das applizierte Dexamethason in den Probereihen homogener mit höheren Substanzkonzentrationen als nach Rundfensterapplikation. Lediglich für einen Versuch wurden geringere Substanzkonzentrationen bestimmt. A und C: lineare Darstellung, B und D: logarithmische Darstellungsweise.

Mit Hilfe der Computersimulation ließ sich die Verteilung der Substanzkonzentrationen entlang der Scala tympani vor dem Probenentnahmevergung abschätzen (Abb. 43). Hier zeigte sich bei

intracochleärer Applikation in basalen cochleären Abschnitten eine Plateauphase mit hohen Substanzkonzentrationen mit einem abrupten Konzentrationsabfall, welcher durch das hier einmündende Aquädukt bedingt ist. Ein starker Konzentrationsabfall zeichnete sich erst etwa in 4 mm Entfernung von der Cochleabasis ab. Bei extracochleärer Applikationsform hingegen kam es bereits in basaleren Abschnitten der Cochlea zu einem raschen Absinken der Substanzkonzentrationen.

Die intracochleäre Medikamenteninjektion stellt somit ein adäquates Verfahren dar, zur Erzielung von gleichförmigeren Medikamentenspiegeln in den basalen Abschnitten der Cochlea.

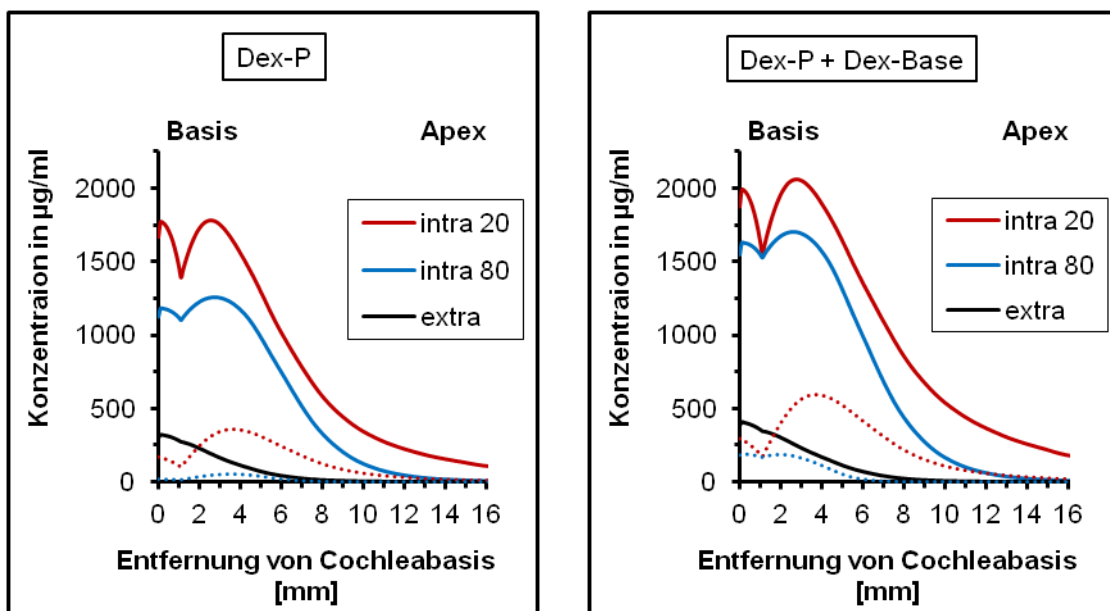


Abb. 43: Konzentrationsprofile entlang der Scala tympani

Berechnete Konzentrationsprofile entlang der Scala tympani bei den unterschiedlichen Applikationsarten. Der abrupte Konzentrationsabfall bei intracochleärer Applikation wird durch das hier einmündende Aquädukt verursacht. Die gestrichelten Kurven für intra 20 bzw. 80 sind durch einen "Perilymph-Leak" gekennzeichnet, der in den weiteren Berechnungen ausgeschlossen wurde (durchgezogene Kurven). extra: extracochleäre Applikation; intra 20 bzw. 80: intracochleäre Medikamentenapplikation mit einer Entnahme der Perilymphproben nach 20 bzw. 80 Minuten.

5 Zusammenfassung

Die topische Medikamentenapplikation an das Innenohr zur Therapie akuter Innenohrschäden stellt ein Therapieverfahren dar, welches mehr und mehr klinische Relevanz erlangt und Gegenstand zahlreicher präklinischer und klinischer Studien ist. Momentan bleibt der Einsatz meist Patienten vorbehalten, die kein oder nur ein geringes Ansprechen auf konventionelle Therapieverfahren zeigen. Die Ergebnisse derartiger "Salvage"-Therapieansätze zeigen bislang jedoch ein uneinheitliches Bild mit unterschiedlichem Heilungserfolg. Ein Grund hierfür sind sicherlich Unterschiede in den verwendeten Applikationsprotokollen, welche neben einer variierenden Applikationsdauer auch unterschiedliche Applikationsverfahren aufweisen (einfache vs. mehrfache Applikation).

Ein weiterer Grund liegt sicherlich in der noch nicht ausreichend erforschten Pharmakokinetik des Innenohrs. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, verteilen sich extracochleär applizierte Substanzen in der Scala tympani in Form eines ausgeprägten basoapikalen Konzentrationsgradienten mit hohen Substanzkonzentrationen an der Cochleabasis, die apikalwärts zunehmend absinken. Es konnte bei dieser Applikationsform ebenfalls gezeigt werden, dass die Rundfenstermembranpermeabilität einen wichtigen pharmakokinetischen Parameter darstellt, der die Maximalkonzentration der applizierten Substanz entscheidend beeinflusst.

Die intracochleäre Medikamentenapplikation führte hingegen zu höheren Substanzkonzentrationen verglichen mit der extracochleären Applikationstechnik. Auch war der basoapikale Konzentrationsgradient hier weniger stark ausgeprägt mit einem hohen, gleichförmigeren Medikamentenspiegel in basalen cochleären Abschnitten. Als ein wichtiger pharmakokinetischer Parameter zeigte sich der "Perilymph-Leak" bei intracochleärer Applikation durch die Rundfenstermembran, der bei hoher Ausprägung nur zu geringen intracochleären Medikamentenkonzentrationen führte.

Zur präklinischen pharmakokinetischen Untersuchung des Innenohrs erwies sich das hier verwendete Tiermodell als adäquat. Durch die hierbei verwendete sequentielle apikale Probenentnahmetechnik war es möglich, Konzentrationsgradienten entlang der Scala tympani nachzuweisen. Allerdings gilt es bestimmte pharmakokinetische Grundsätze zu berücksichtigen, so z. B. die Kontamination durch zerebrospinale Flüssigkeit, welche insbesondere während der Probenentnahme über das Aquädukt einströmt.

Zur besseren Interpretation der Messdaten fand ein Computersimulationsprogramm Verwendung, das es ermöglichte, Substanzkonzentrationen in der Scala tympani vor dem eigentlichen Probenentnahmevergange zu berechnen. Auf diese Weise ließen sich Artefakte, die durch die apikale Probenentnahmetechnik selbst verursacht wurden, deutlich minimieren.

Für einen klinischen Einsatz speziell von intracochleären Applikationsverfahren bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen und Entwicklungsarbeit, insbesondere hinsichtlich des verwendeten Applikationssystems und z. B. des Ausschließens eines Perilymph-Lecks, um durch das Applikationsverfahren selbst verursachte Schädigungen des Innenohrs zu minimieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Ahn JH, Yoo MH, Yoon TH, Chung JW. Can intratympanic dexamethasone added to systemic steroids improve hearing outcome in patients with sudden deafness? *Laryngoscope*; 2008;118:279–282
2. Arnold W, Senn P, Hennig M, Michaelis C, Deingruber K, Scheler R, Steinhoff HJ, Riphagen F, Lamm K. Novel slow- and fast-type drug release round-window microimplants for local drug application to the cochlea: an experimental study in Guinea pigs. *Audiol Neurootol* 2005; 10: 53–63
3. Bachmann G, Su J, Zumegen C, Wittekindt C, Michel O.: Permeabilität der runden Fenstermembran für Prednisolon-21-Hydrogensuccinat. *HNO* 2001; 49: 538–542
4. Banerjee A, Parnes LS. Intratympanic corticosteroids for sudden idiopathic sensorineural hearing loss. *Otol Neurotol* 2005 Sep; 26(5): 878–881
5. Battista RA.: Intratympanic dexamethasone for profound idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005 Jun; 132(6): 902–905
6. Cesarani A, Capobianco S, Soi D, Giuliano DA, Alpini D. Intratympanic dexamethasone treatment for control of subjective idiopathic tinnitus: our clinical experience. *Int Tinnitus J* 2002; 8(2): 111–114
7. Chandrasekhar SS. Intratympanic dexamethasone for sudden sensorineural hearing loss: clinical and laboratory evaluation. *Otol Neurotol* 2001 Jan; 22(1): 18–23
8. Chelikh L, Teixeira M, Martin C, Sterkers O, Ferrary E, Couloigner V. High variability of perilymphatic entry of neutral molecules through the round window. *Acta Otolaryngol*; 2003;123:199–202
9. Chen Z, Duan M, Lee H, Ruan R, Ulfendahl M. Pharmacokinetics of caroverine in the inner ear and its effects on cochlear function after systemic and local administrations in Guinea pigs. *Audiol Neurootol* 2003; 8: 49–56
10. Chen Z, Kujawa SG, McKenna MJ et al. Inner ear drug delivery via a reciprocating perfusion system in the guinea pig. *J Control Release*; 2005;110:1–19
11. Forth, Henschler, Rummel. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban & Fischer Verlag 2001, 8. Auflage: S. 716
12. Garavello W, Galluzzi F, Gaini RM, Zanetti D. Intratympanic steroid treatment for sudden deafness: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Otol Neurotol*. 2012 Jul;33(5):724-9
13. Ghiz AF, Salt AN, DeMott JE, Henson MM, Henson OW Jr, Gewalt SL. Quantitative anatomy of the round window and cochlear aqueduct in guinea pigs. *Hear Res* 2001 Dec; 162(1-2): 105–112
14. Gianoli GJ, Li JC. Transtympanic steroids for treatment of sudden hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001 Sep; 125(3): 142–146
15. Gouveris H, Selivanova O, Mann W. Intratympanic dexamethasone with hyaluronic acid in the treatment of idiopathic sudden sensorineural hearing loss after failure of intravenous steroid and vasoactive therapy. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2005 Feb; 262(2): 131–134

16. Goycoolea MV. Clinical aspects of round window membrane permeability under normal and pathological conditions. *Acta Otolaryngol* 2001; 121: 437–447
17. Goycoolea MV, Lundman L. Round window membrane. Structure function and permeability: a review. *Microsc Res Tech* 1997 Feb 1; 36(3): 201–211
18. Hahn H, Kammerer B, DiMauro A et al. Cochlear microdialysis for quantification of dexamethasone and fluorescein entry into scala tympani during round window administration. *Hear Res*; 2006;212:236–244
19. Hahn H, Salt AN, Biegner T, Kammerer B, Delabar U, Hartsock JJ, Plontke SK. Dexamethasone levels and base-to-apex concentration gradients in the scala tympani perilymph after intracochlear delivery in the guinea pig. *Otol Neurotol*. 2012 Jun;33(4):660-5
20. Hara A, Salt AN, Thalmann R. Perilymph composition in scala tympani of the cochlea: influence of cerebrospinal fluid. *Hear Res* 1989 Nov; 42(2-3): 265–271
21. Haynes DS, O'Malley M, Cohen S, Watford K, Labadie RF. Intratympanic dexamethasone for sudden sensorineural hearing loss after failure of systemic therapy. *Laryngoscope* 2007 Jan; 117(1): 3–15
22. Hibi T, Suzuki T, Nakashima T. Perilymphatic concentration of gentamicin administered intratympanically in guinea pigs. *Acta Otolaryngol*; 2001;121:336–341
23. Ho HG, Lin HC, Shu MT, Yang CC, Tsai HT. Effectiveness of intratympanic dexamethasone injection in sudden-deafness patients as salvage treatment. *Laryngoscope* 2005 Feb; 115(2): 378; author reply 378-9
24. Hoffer ME, Allen K, Kopke RD, Weisskopf P, Gottshall K, Wester D. Transtympanic versus sustained-release administration of gentamicin: kinetics, morphology, and function. *Laryngoscope* 2001; 111: 1343–1357
25. Hoffer ME, Balough B, Henderson J, DeCicco M, Wester D, O'Leary MJ, Kopke R. Use of sustained release vehicles in the treatment of Meniere's disease. *Otolaryngol Clin North Am* 1997; 30: 1159–1166
26. Kilic R SMOHea. Intratympanic methylprednisolone for sudden sensorineural hearing loss. *Otol Neurotol*; 2007;28:312–316
27. Kopke RD, Hoffer ME, Wester D, O'Leary MJ, Jackson RL.: Targeted topical steroid therapy in sudden sensorineural hearing loss. *Otol Neurotol* 2001 Jul; 22(4): 475–479
28. Laurell G, Teixeira M, Sterkers O, Bagger-Sjoberg D, Eksborg S, Lidman O, Ferrary E. Local administration of antioxidants to the inner ear. Kinetics and distribution(1). *Hear Res* 2002; 173: 198–209
29. Lautermann J, Sudhoff H, Junker R. Transtympanic corticoid therapy for acute profound hearing loss. *Eur Arch Otorhinolaryngol*; 2005;262:587–591
30. Mynatt R, Hale SA, Gill RM et al. Demonstration of a longitudinal concentration gradient along scala tympani by sequential sampling of perilymph from the cochlear apex. *J Assoc Res Otolaryngol*; 2006;7:182–193
31. Ohyama K, Salt AN, Thalmann R. Volume flow rate of perilymph in the guinea-pig cochlea. *Hear Res* 1988; 35: 119–129

32. Parnes LS, Sun AH, Freeman DJ. Corticosteroid pharmacokinetics in the inner ear fluids: an animal study followed by clinical application. *Laryngoscope* 1999; 109: 1–17
33. Plaza G, Herráiz C. Intratympanic steroids for treatment of sudden hearing loss after failure of intravenous therapy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007 Jul; 137(1): 74–78
34. Plontke S. Untersuchungen zur lokalen Medikamentenapplikation am Innenohr. Habilitationsschrift. Eberhard-Karls-Universität Tübingen. 2006
35. Plontke S, Löwenheim H, Preyer S, Leins P, Dietz K, Koitschev A, Zimmermann R, Zenner HP. Outcomes research analysis of continuous intratympanic glucocorticoid delivery in patients with acute severe to profound hearing loss: basis for planning randomized controlled trials. *Acta Otolaryngol* 2005 Aug; 125(8): 830–839
36. Plontke SK, Bauer M, Meisner C. Comparison of pure-tone audiometry analysis in sudden hearing loss studies: lack of agreement for different outcome measures. *Otol Neurotol*; 2007;28:753–763
37. Plontke SK, Biegner T, Kammerer B, Delabar U, Salt AN. Dexamethasone concentration gradients along scala tympani after application to the round window membrane. *Otol Neurotol*. 2008 Apr;29(3):401-6
38. Plontke SK, Mynatt R, Gill RM, Borgmann S, Salt AN. Concentration gradient along the scala tympani after local application of gentamicin to the round window membrane. *Laryngoscope*; 2007;117:1191–1198
39. Plontke SK, Salt AN. Quantitative interpretation of corticosteroid pharmacokinetics in inner ear fluids using computer simulations. *Hear Res*; 2003;182:34–42
40. Plontke SK, Salt AN. Simulation of application strategies for local drug delivery to the inner ear. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*; 2006;68:386–392
41. Plontke SK, Siedow N, Wegener R et al. Cochlear pharmacokinetics with local inner ear drug delivery using a three-dimensional finite-element computer model. *Audiol Neurootol*; 2007;12:37–48
42. Plontke SK, Wood AW, Salt AN. Analysis of gentamicin kinetics in fluids of the inner ear with round window administration. *Otol Neurotol*; 2002;23:967–974
43. Roebuck J CCY. Efficacy of steroid injection on idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg*; 2005;135:276–279
44. Saijo S, Kimura RS. Distribution of HRP in the inner ear after injection into the middle ear cavity. *Acta Otolaryngol*; 1984;97:593–610
45. Salt AN.: Simulation of methods for drug delivery to the cochlear fluids. *Adv Otorhinolaryngol* 2002; 59: 140–148
46. Salt AN, Hale S, Plontke SK. Perilymph Sampling from the Cochlear Apex: A Reliable Method to Obtain Higher Purity Perilymph Samples from Scala Tympani. *J Neurosc Meth* 2005
47. Salt AN, Hartsock JJ, Gill RM, Piu F, Plontke SK. Perilymph pharmacokinetics of markers and dexamethasone applied and sampled at the lateral semi-circular canal. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2012 Dec; 13(6):771-83

48. Salt AN, Kellner C, Hale S.: Contamination of perilymph sampled from the basal cochlear turn with cerebrospinal fluid. *Hear Res* 2003; 182(1-2): 24–33
49. Salt AN, Ma Y. Quantification of solute entry into cochlear perilymph through the round window membrane. *Hear Res* 2001; 154(1-2): 88–97
50. Salt AN, Ohyama K, Thalmann R.: Radial communication between the perilymphatic scalae of the cochlea. II: Estimation by bolus injection of tracer into the sealed cochlea. *Hear Res* 1991 Nov; 56(1-2): 37–43
51. Salt AN, Thalmann R, Marcus DC, Bohne BA.: Direct measurement of longitudinal endolymph flow rate in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 1986; 23: 141–151
52. Slattery WH, Fisher LM, Iqbal Z, Friedman RA, Liu N. Intratympanic steroid injection for treatment of idiopathic sudden hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005 Aug; 133(2): 251–259
53. Thorne M, Salt AN, DeMott JE, Henson MM, Henson OW, Jr., Gewalt SL. Cochlear fluid space dimensions for six species derived from reconstructions of three-dimensional magnetic resonance images. *Laryngoscope* 1999; 109: 1661–1668
54. Xenellis J PNNTea. Intratympanic steroid treatment in idiopathic sudden sensorineural hearing loss: a control study. *Otolaryngol Head Neck Surg*; 2006;134:940–945

7 Erklärung zum Eigenanteil

Herr Prof. Dr. Plontke war an der Konzeption der Studie beteiligt. Er hat zudem die Arbeit betreut und das Manuskript korrigiert.

Die Tierversuche wurden während der Einlernphase von Herrn Prof. Dr. Plontke und Dr. rer. nat. Hartmut Hahn durchgeführt. In der Einlernphase assistierte ich bei den operativen Eingriffen. Nach dem Erlernen der Operationstechniken wurden die Versuche von mir durchgeführt.

Die Computersimulationen, die auf den Versuchsdaten basieren, wurden von mir durchgeführt. Hierzu stellte mir Alec N. Salt, Ph. D. das von ihm entwickelte Programm "Fluidsim®" freundlicherweise zur Verfügung.

Die HPLC-Analyse der gewonnenen Perilymphproben wurde von Frau Dr. Ursula Delabar und Herrn PD Dr. Bernd Kammerer vorgenommen.

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgenden Artikeln publiziert:

Plontke SK, Biegner T, Kammerer B, Delabar U, Salt AN. "Dexamethasone concentration gradients along scala tympani after application to the round window membrane. Otol Neurotol. 2008 Apr;29(3):401-6"

Verfasst wurde der Artikel von allen oben angeführten Autoren unter Federführung von Herrn Prof. Dr. Stefan Plontke.

Die zugrunde liegenden Tierversuche wurden von Herrn Prof. Dr. Stefan Plontke und mir durchgeführt.

Die auf den Versuchsdaten basierenden Computersimulationen habe ich vorgenommen.

Die Probenanalytik (HPLC) geschah durch Frau Dr. Ursula Delabar und Herrn PD Dr. Bernd Kammerer.

*Hahn H, Salt AN, Biegner T, Kammerer B, Delabar U, Hartsock JJ, Plontke SK.
"Dexamethasone levels and base-to-apex concentration gradients in the scala
tympani perilymph after intracochlear delivery in the guinea pig. Otol Neurotol.
2012 Jun;33(4):660-5"*

Verfasst wurde Artikel von allen oben angeführten Autoren unter Federführung von Herrn Dr. rer. nat. Hartmut Hahn.

Die zugrunde liegenden Tierversuche wurden von Dr. rer. nat. Hartmut Hahn durchgeführt.

Die auf den Versuchsdaten basierenden Computersimulationen habe ich vorgenommen.

Die Probenanalytik (HPLC) geschah durch Frau Dr. Ursula Delabar und Herrn PD Dr. Bernd Kammerer.

8 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr.med. H.P. Zenner, dass er mir die Arbeit an der Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde Tübingen ermöglicht hat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. habil. Stefan Plontke für die Überlassung des Themas der Doktorarbeit. Im Besonderen möchte ich mich für die unermüdliche Unterstützung sowohl bei der Durchführung der Experimente als auch bei der Auswertung der Daten bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Hartmut Hahn für seine Hilfe und Anleitung bei der Tierpräparation bedanken.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Alec N. Salt, Ph. D. für die sehr freundliche Korrespondenz und Hilfestellung.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Ursula Delabar für die zum Teil sehr zeitintensive HPLC-Analyse der gewonnenen Perilymphproben.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Bernd Kammerer für seine Unterstützung danken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie für ihre Ausdauer und Geduld sowie die finanzielle Unterstützung.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Thorsten Dirk Biegner
geb. am 07.07.1979 in Reutlingen
ledig

Schulische Laufbahn:

1986- 1990	Grundschule in Kusterdingen-Mähringen
1990- 1999	Wildermuth-Gymnasium in Tübingen
06/ 1999	Abitur, Leistungskurse: Mathematik und Latein

Zivildienst:

August 1999	Zivildienst im OP-Bereich der Hals-Nasen-Ohrenklinik in
bis	Tübingen
Juni 2000	

akademische Laufbahn:

Oktober 2001	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
April 2002	Studienortwechsel, Fortsetzung des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität in Tübingen
04.09.2003	Ärztliche Vorprüfung in Herrenberg
14.04.2008 bis	schriftlicher Teil der Ärztlichen Prüfung in Eningen

16.04.2008 u.A.

05.06.2008 bis 06.06.2008 mündlich-praktischer Teil der Ärztlichen Prüfung in Tübingen

seit 01.03.2009 Tätigkeit als Assistenzarzt im Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Tübingen, Abteilung Allg. Pathologie und Pathologische Anatomie

Famulaturen und Praktisches Jahr:

Famulaturen:

01.03.04 bis 30.03.04 Universitätsklinik Tübingen, Klinik für Neurochirurgie

01.09.04 bis 30.09.04 Universitätsklinikum Tübingen Abteilung für Anaesthesiologie

01.03.05 bis 30.03.05 Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde Tübingen

05.09.05 bis 18.09.05 Universitäts-Hautklinik Tübingen

27.09.05 bis 13.10.05 Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde Tübingen

Praktisches Jahr:

28.08.06 bis Medizinische Klinik des Universitätsklinikums Tübingen
17.12.06

18.12.06 bis Chirurgische Klinik des Universitätsklinikums Tübingen
08.04.07

09.04.07 bis Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde Tübingen
29.07.07