



1D- und 3D-Computersimulationen zur Versuchsplanung und -interpretation bei pharmakokinetischen Studien am Innenohr nach lokaler Medikamentenapplikation

Stefan Plontke¹, Norbert Siedow², Hartmut Hahn¹, Raimund Wegener², Hans-Peter Zenner¹ und Alec N. Salt³

¹Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde am Universitätsklinikum Tübingen und Hörforschungszentrum D-Tübingen (THRC), ²Fraunhofer-Institut für Techno- und Wirtschaftsmathematik D-Kaiserslautern, ³Department of Otolaryngology, Washington University School of Medicine, USA-Washington

Zusammenfassung

Zur weiteren Entwicklung der lokalen Medikamentenapplikation an das Innenohr als vielversprechende Alternative zur systemischen Therapie von Innenohrerkrankungen sind präklinische pharmakokinetische Studien erforderlich. Aufgrund der sehr kleinen Flüssigkeitsräume und der damit verbundenen technischen und analytischen Schwierigkeiten waren bisherige Untersuchungen mit jeweils einer Volumenprobe pro Tier sehr Tierversuchsaufwändig und zudem häufig artefaktbehaftet.

Wir zeigen hier, wie mit Hilfe von Computersimulationen, welche die Anatomie des Innenohres, allgemeine pharmakokinetische Prinzipien und Verteilungsprozesse sowie Probenentnahmetechniken berücksichtigen, die Anzahl von Tierversuchen bei pharmakokinetischen Studien am Innenohr reduziert werden kann. Dies wird erreicht durch: (1) Optimierung von Probenvolumen und Entnahmeort durch Computersimulationsgestützte Versuchsplanung, (2) bessere Interpretation von Messergebnissen, (3) Möglichkeit der Einführung vorteilhafter Techniken wie der Mikrodiyalyse zur kontinuierlichen Konzentrationsbestimmung und (4) durch die Entwicklung eines dreidimensionalen Modells, mit welchem möglichst genaue Vorhersagen für die Verhältnisse bei anderen Tierspezies oder für andere Medikamente getroffen werden sollen.

Summary: 1D-and 3D- computer simulation for planning and interpretation of pharmacokinetic studies in the inner ear after round window drug delivery.

The local delivery of drugs to the cochlea is a promising alternative to systemic treatment of inner ear disorders. Whilst new drugs are being developed for this purpose, it is important to determine the time course and total dose required for the various target regions within the inner ear. Due to the small fluid spaces of the inner ear and the resulting experimental and analytical difficulties, many animal studies have only obtained one sample per animal. This results in limited information about drug time courses at specific locations in the inner ear.

We show here how computer models considering general pharmacokinetic principles and inner ear geometry are used for application of the 3R-principle in animal research while avoiding experimental sampling artefacts. This can be achieved by: (1) careful planning and interpretation of experiments to study pharmacokinetics in the inner ear, (2) optimising volume sampling techniques, (3) facilitating the use of advantageous, continuous sampling methods like microdialysis and (4) developing a 3D-model that will permit consideration of the complex geometry of the inner ear when transferring results from one species to another.

1 Einleitung

1.1 Topische Medikamentenapplikation an das Innenohr

Innenohrerkrankungen gehören zu den häufigsten chronischen Erkrankungen. Allein in der Bundesrepublik Deutschland leiden etwa 12-15 Millionen Betroffene und damit ca. 20% der Bevölkerung

an einer Innenohrschwerhörigkeit. Ca. 2,9 Millionen Deutsche leiden an Ohrgeräuschen (Tinnitus). Etwa 15.000 Menschen erleiden jedes Jahr in Deutschland einen Hörsturz. Dies entspricht der Inzidenz von Hörstürzen, die innerhalb eines gesamten Jahres in Ländern der westlichen Welt auftreten (5-20/10⁵ Einwohner) (Byl, 1984).

Schwindelerkrankungen wie z.B. der Morbus Menière führen bei den Betroffenen zu starken Einschränkungen im privaten und beruflichen Bereich.

Der Stand der Therapie bei akuten und chronischen Innenohrerkrankungen ist jedoch noch unbefriedigend.

Bei der chronischen Innenohrschwerhörigkeit besteht die Rehabilitation in

Das Manuskript wurde am 22.12.2003 eingereicht; am 9.2.2004 wurde die revidierte Fassung zum Druck angenommen



der Versorgung mit Hörgeräten, *Cochlear Implants* oder mit modernen Hörimplantaten. Aber auch bei der Versorgung mit diesen Hörhilfen sind die Ergebnisse hinsichtlich der Kommunikationsfähigkeit suboptimal. Derzeitige medikamentöse Therapiestrategien für akute Schädigungen des Hör- und Gleichgewichtsorgans beinhalten eine systemische intravenöse oder orale Therapie mit verschiedenen Substanzklassen. Die systemische Therapie führt häufig zu einer Reihe von unerwünschten, zum Teil schwerwiegenden Nebenwirkungen. Zum Beispiel werden bei der derzeitigen Therapie des Hörsturzes mit Prednisolon nur bei hohen systemischen Medikamentenspiegeln messbare Konzentrationen im Innenohr erreicht (Niedermeyer et al., 2003). Die Nebenwirkungen einer langdauernden Hochdosistherapie mit systemischen Kortikosteroiden sind hinlänglich bekannt. Bei der systemischen Therapie mit Neurotransmittern oder Neurotransmitterantagonisten (z.B. bei Tinnitus) ist vor allem mit unerwünschten zentralnervösen Wirkungen zu rechnen.

Seit einigen Jahren wird deshalb die Idee der lokalen Medikamentenapplikation zur Behandlung peripherer Störungen des Hör- und Gleichgewichtsorgans verfolgt. Medikamente werden an die Rundfenstermembran gebracht unter der Prämisse, dass diese in das Innenohr diffundieren (Goycoolea, 2001).

Aktuell stehen verschiedene Medikamentenklassen wie Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter, Neurotransmitterantagonisten, Antioxidantien, Apoptoseinhibitoren und Antisense-Oligonukleotide im Zentrum der Erforschung ihrer Wirksamkeit bei der Behandlung von Erkrankungen des Hör- oder Gleichgewichtssinns. Von besonderem Interesse ist auch der lokale virale und nonvirale Gentransfer zur Behandlung von Innenohrerkrankungen (Lalwani et al., 2002; Stover et al., 1999). Hier stellt die lokale Medikamentenapplikation an das Innenohr eine vorteilhafte Alternative zur systemischen Therapie dar. Die am längsten angewandte lokale Therapieform am Innenohr ist die Injektion von Gentamicin in das Mittelohr zur selektiven chemischen Labyrinthablation beim Morbus Menière. Die Steuerbarkeit des erwünschten therapeutischen Effektes –

die Ausschaltung des Gleichgewichtsorgans ohne Beeinträchtigung des Hörvermögens – ist jedoch schwierig und bisher nur empirisch gelöst (Lange, 1995). Weltweit ist noch kein einziges Medikament für die topische Medikamentenapplikation an das Innenohr zugelassen. Neue Medikamente zur Therapie von Innenohrerkrankungen sind in Entwicklung (für eine Übersicht siehe: Plontke und Zenner, 2004). Es ist zu erwarten, dass sich in den nächsten Jahren nicht zuletzt im Rahmen der Zulassung dieser Medikamente an den Wirksamkeitsnachweis zahlreiche Tierversuchsstudien zur Pharmakokinetik anschließen werden.

1.2 Probleme pharmakokinetischer Studien am Innenohr

Über die Grundlagen der Pharmakokinetik im Innenohr liegen nur wenige Erkenntnisse vor. Unser Wissen über die Konzentration von Medikamenten im Innenohr bei systemischer oder topischer Applikation beruhen größtenteils auf Probenentnahmen und Analysen von Perilymphflüssigkeit. Aufgrund der ausgesprochen kleinen Volumina in den Flüssigkeitsräumen des Innenohres stellt die Entnahme und Analyse von Proben aus dem Innenohr jedoch eine technische Herausforderung dar. Das gesamte Perilymphvolumen in der Hörschnecke des Meerschweinchens beträgt z.B. weniger als 10 µl (Thorne et al., 1999). Zur Gewinnung ausreichender Proben volumina für die Analytik von Pharmaka wurde deshalb bisher von fast allen Arbeitsgruppen nur jeweils eine Probe aus dem Innenohr pro Tier entnommen. Diese Vorgehensweise hat zur Folge, dass zahlreiche, jeweils mehrstündige Tierversuche (unter Betäubung) durchgeführt wurden, um jeweils nur eine einzige Konzentrations-Zeit-Kurve für nur eine bestimmte Substanz und ein bestimmtes Applikationsprotokoll zu erhalten (Bachmann et al., 2001; Chen et al., 2003; Hoffer et al., 1997, 1999, 2001). Hoffers Gruppe z.B. verwendete mehr als 80 Chinchillas zur Beschreibung der Konzentrations-Zeit-Kurve von Gentamicin mittels Probenentnahme aus dem *Vestibulum* (Hoffer et al., 1997, 1999).

1.3 Eingeschränkte Interpretierbarkeit von Probenentnahmen aus den Innenohrflüssigkeiten

Neben der großen Anzahl von Tieren, die für die Bestimmung der Pharmakokinetik im Innenohr mittels Entnahme von Volumenproben erforderlich ist, muss zusätzlich von einer stark eingeschränkten Interpretierbarkeit der Messdaten ausgegangen werden. Die von Hoffers Gruppe entnommenen Perilymphproben von 15 µl aus dem *Vestibulum* enthalten z.B. eine Kombination von Perilymphe aus *Vestibulum*, *Scala vestibuli* und *Scala tympani* und lassen deshalb keine Rückschlüsse auf lokale Substanzkonzentrationen (z.B. in den verschiedenen Frequenzbereichen der Hörschnecke) zu (Hoffer et al., 1999). Mit Hilfe eines etablierten eindimensionalen (1D) Berechnungsmodell des Innenohres konnten jedoch – ohne die Notwendigkeit erneuter Tierexperimente – die zeitabhängigen Gentamicin-Konzentrationen in den Flüssigkeitsräumen des Innenohres analysiert und somit Kenntnisse über die Prinzipien der Substanzverteilung im Innenohr im allgemeinen und speziell über die Gentamicinverteilung beim Chinchilla nach lokaler Applikation erlangt werden (Plontke et al., 2002).

Eine andere Problematik besteht darin, dass Flüssigkeitsproben, die aus der *Scala tympani* entnommen werden, nicht nur Perilymphe enthalten. Entnommene Perilymphe aus der *Cochlea* wird vor allem durch zerebrospinale Flüssigkeit (CSF), die durch den *Aquaeductus cochlearis* in die basale Windung von *Scala tympani* nachströmt, kontaminiert. In Perilymphproben gemessene Arzneimittelkonzentrationen repräsentieren somit nicht die Konzentration des Wirkstoffs in der Perilymphe (Salt et al., 2003). Einige experimentelle Studien berücksichtigen den Fakt der Kontamination von Perilymphproben mit zerebrospinaler Flüssigkeit zumindest qualitativ und versuchen, die Kontamination der Probenflüssigkeit mit CSF zu minimieren (Bachmann et al., 2001; Scheibe et al., 1984). Andere Studien berücksichtigen diese Möglichkeit der Missinterpretation von Medikamentenspiegeln durch Probenkontamination mit CSF im

Innenohr gar nicht (Hoffer et al., 1997, 1999, 2001; Parnes et al., 1999). Der tatsächliche Konzentrations-Zeit-Verlauf unterscheidet sich dann erheblich von den gemessenen Konzentrationen in der Probenpipette, und die Interpretierbarkeit der Ergebnisse aus diesen Tierexperimenten ist eingeschränkt. Die Analyse publizierter, scheinbar widersprüchlicher experimenteller Ergebnisse mit unserem Computer-Modell ermöglichte jedoch eine Korrektur der durch Probenentnahme bedingten Artefakte (Plontke und Salt, 2003; Salt et al., 2003).

Im ersten Teil dieser Arbeit soll gezeigt werden, wie mit der Verwendung dieses Computer-Modells quantitative Schätzungen des Ausmaßes der Kontamination von Perilymphproben durch nachströmende zerebrospinale Flüssigkeit bei Probenentnahmen aus dem Innenohr ermöglicht werden und dadurch Tierexperimente besser geplant und interpretiert werden können.

1.4 Mikrodialyse-Technik

Die Technik der Mikrodialyse bietet (1) den Vorteil einer kontinuierlichen Konzentrationsbestimmung in den Flüssigkeitsräumen des Innenohres und damit der deutlichen Reduzierung der Anzahl von Tierversuchen im Vergleich zu der üblichen Vorgehensweise, bei der pro Tier nur eine Probe gewonnen wird, (2) werden, bedingt durch die geringen Stoffaustauschraten, die störenden Einflüsse auf die Physiologie der Innenohrflüssigkeiten reduziert, und (3) wird die Kontaminationsgefahr der gesammelten Innenohrflüssigkeit mit Zerebrospinalflüssigkeit minimiert, da bei der Probengewinnung das Perilymphvolumen konstant bleibt. Trotz kleiner Wiederfindungsraten im Dialysat wird auch bei der Mikrodialysetechnik Substanz aus den Innenohrflüssigkeiten entfernt und damit eine zusätzliche, künstliche „Clearance“ aus der Cochlea hinzugefügt. Dieser Fakt ist von Bedeutung für die Interpretation von Messergebnissen, die mit dieser Methode gewonnen werden. Bei aktuellen pharmakokinetischen Studien am Innenohr wurde dies bisher nicht berücksichtigt (Hibi et al., 2001; Hunter et al., 2003). Deshalb wurde das bestehende 1D-Modell zur Berechnung der Sub-

stanzverteilung in den Innenohrflüssigkeiten erweitert und mit Hilfe von *in vitro* Experimenten validiert.

1.5 3D-Simulation

Topisch an die RFM (Rundfenstermembran) applizierte Medikamente verteilen sich nicht gleichförmig im Innenohr. Berechnungen für verschiedene Substanzen mit unserem 1D-Modell zeigten, dass Spitzenkonzentrationen (C_{max}) und Dosis (Fläche unter der Kurve, *area under the curve*, AUC) longitudinale Gradienten entlang den *Scalae* und zwischen den Kompartimenten aufweisen, wobei basale Abschnitte (Hochfrequenzbereich) weitaus höhere Dosen erfahren als apikale Abschnitte (Tiefrequenzbereich) (Plontke et al., 2002; Plontke und Salt, 2003; Salt und Ma, 2001). Da die Substanzverteilung entlang den *Scalae* von Diffusion, Clearance und Austausch zwischen den *Scalae* bestimmt wird, ist zu erwarten, dass Konzentrationsgradienten in größeren *Cochleae* auch stärker ausgeprägt sind. Insofern erscheint es sinnvoll, vor experimentellen Studien in anderen Tierspezies die benötigte Dosis für einen gewünschten therapeutischen Effekt mit Hilfe eines Computer-Modells abzuschätzen, um die Anzahl notwendiger *in vivo* Versuche zu optimieren und damit zu reduzieren. Beim Transfer von Erkenntnissen von einer Tierspezies auf eine andere inklusive des Menschen könnte allerdings die Reduktion der 3D-Geometrie auf 1D-Verhältnisse in einigen Bereichen des Innenohres zu Fehlern in den Berechnungen führen. Erfahrungsgemäß ist die Reduktion der 3D-Geometrie auf 1D-Verhältnisse gut möglich, wenn der entsprechende Körper eine große Länge im Vergleich zum Querschnitt aufweist. Dies ist bei der Gehörschnecke im Wesentlichen gegeben. Nur im basalen Bereich direkt hinter dem Applikationsort sind bei einigen Spezies (z.B. Chinchilla) besonders große Querschnittflächen vorhanden. Diffusion in dieser Ebene kann möglicherweise nicht mehr vernachlässigt werden. Ziel ist es deshalb, ein 3D-Modell zu entwickeln, mit welchem Berechnungsfehler aufgrund geometrischer Aspekte möglichst klein gehalten werden können.

2 Material und Methode

2.1 Eindimensionales Berechnungsmodell des Innenohres

Die Grundzüge des hier verwendeten und erweiterten 1D-Computer-Modells zur Simulation von Substanzverteilungen im Innenohr sind andernorts bereits ausführlich beschrieben (Plontke et al., 2002; Salt, 2002). In Kürze: Jede *Scala* wird in 0.1 mm-Segmente geteilt, deren ortsabhängige Querschnittsflächen für verschiedene Spezies (Mensch, Meerschweinchen, Fledermaus, Ratte, Maus, Wüstenrennmaus und Chinchilla) bekannt sind (Plontke et al., 2002; Thorne et al., 1999). Als Parameter für die Simulationen werden Konstanten (Diffusionskoeffizient, Anfangskonzentration an der Rundfenstermembran, appliziertes Volumen) und Variablen (Permeabilität der Rundfenstermembran, Clearance aus Innenohr und Mittelohr und Austausch zwischen den Kompartimenten) bei der Kalkulation der Substanzverteilungsprozesse berücksichtigt (Abb. 1 und 2). Zwischen den Segmenten wird passive Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten, ggf. über eine Barriere, angenommen. Der longitudinale Volumenfluss der Perilymphe ist vernachlässigbar klein (Ohyama et al., 1988). Die Berechnung erfolgt alle 100 ms. Das Modell ist öffentlich verfügbar (<http://oto.wustl.edu/cochlea>) und wurde in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Versuchen unter Verwendung von Ionenmarkern validiert (Ohyama et al., 1988; Salt et al., 1991a, 1991b; Salt und Ma, 2001; Salt et al., 2003).

2.2 Simulation von Messfehlern durch Probenentnahmen aus der *Scala tympani*

Für eine spezifische Situation der lokalen Medikamentenapplikation an die Rundfenstermembran beim Meerschweinchen wurde zunächst die Substanzverteilung im Innenohr simuliert. Als Beispiel wurde eine experimentell häufig verwandte Strategie, die einwöchige, kontinuierliche Applikation in diesem Fall von Methylprednisolonsuccinat (MW = 374,48 g/mol) über eine Medikamentenpumpe simuliert. Bei dieser langen Applikationsdauer kann von einem sta-



Abb. 1a

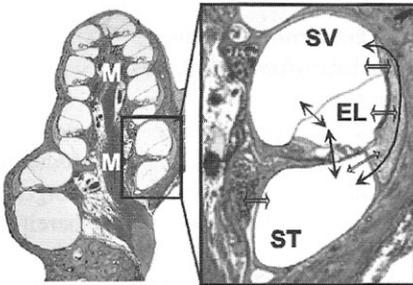


Abb. 1b

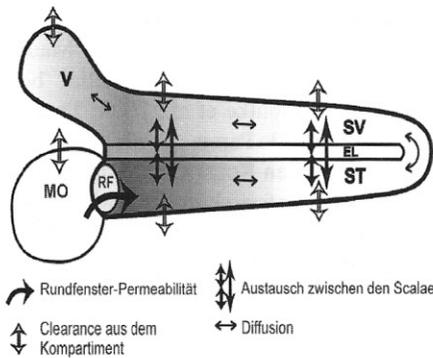


Abb. 1: Prinzipien der Substanzverteilung im Innenohr

(A): Querschnitt durch eine Gehörschnecke (*Cochlea*) beim Meerschweinchen. Die *Cochlea* ist ein komplexes geometrisches Gebilde, bei dem drei aneinanderliegende, sich zur Spitze hin verkleinernde Flüssigkeitsräume spiralförmig um eine gemeinsame Achse, den *Modiolus* (M), angeordnet sind. *Scala tympani* (ST) und *Scala vestibuli* (SV) sind mit Perilymphe gefüllt. Die *Scala media* beinhaltet auch den Endolymphraum (EL).

Die in dem etablierten 1D-Computermodell berücksichtigten „radialen Prozesse“ umfassen den Austausch zwischen den verschiedenen Kompartimenten (*Scalae*) und die Clearance aus den *Scalae* in den Blutkreislauf des Körpers oder in den *Modiolus*.

(B): Schema von *Cochlea* und *Vestibulum* „aufgerollt“: Zu den „longitudinalen Prozessen“ gehören die Dimensionen der *Scalae*, Diffusion entlang der *Scalae*, über das Helikotrema und in das *Vestibulum* (V) und der Eintritt der Substanz über die Rundfenstermembran (RF) bei lokaler Applikation in das Mittelohr (MO) (nach Plontke und Salt, 2002, mit freundlicher Genehmigung des Verlages).

tionären Zustand (Sättigungszustand) ausgegangen werden. Die Parameter (Anfangskonzentration 40 mg/ml, Diffusionskoeffizient $0,784 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, Rundfenstermembranpermeabilität $2 \cdot 10^{-11} \text{ m/s}$, Clearance aus dem Innenohr $t_{1/2} = 130 \text{ min}$ und Austausch zwischen den *Scalae* $t_{1/2} = 45 \text{ min}$) entsprachen den in früheren Simulationen durch inverse Parameteranpassung ermittelten Werten (Plontke und Salt, 2003).

Danach wurde die Medikamentenkonzentration in der Probenpipette für verschiedene Szenarien berechnet, bei denen jeweils entweder der Ort der Probenentnahme oder das entnommene Volumen an Perilymphe variiert wurden. Das Verhältnis der Werte von „gemessener“ und „tatsächlicher“ Substanzkonzentration am Entnahmeort vor der Probenentnahme ergab einen Faktor, der dem zu erwartenden Messfehler im Experiment entspricht.

2.3 Kontinuierliche Konzentrationsbestimmung durch Mikrodialyse

Eine Fluoreszenzfarbstofflösung (Natriumfluoreszein, 1 mg/ml) wurde in Acrylglasmodellen mit Flüssigkeitsräumen unterschiedlicher Volumina (100 μl und 10 μl) kontinuierlich bei einer Perfusionsrate von 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ mit dem Trägermedium der Fluoreszenzfarbstofflösung dialysiert (Mikrodialyse-sonde-Membran 1mm-0,24 mm, CMA, S-Stockholm). Anschließend wurde die Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes im Dialysat mit einem Fluorometer (Tecan Fluorescence Reader; Tecan Deutschland GmbH, D-Crailsheim) bestimmt (Anregungswellenlänge 485 nm, Emissionswellenlänge 535 nm). Die Simulation der Probenentnahme erfolgte mit Hilfe unseres oben beschriebenen 1D-Modells, welches in Bezug auf die Möglichkeit der Probenentnahmetechnik der Mikrodialyse erweitert wurde. Dabei wurde der Substanzverlust durch die Mikrodialyse (ohne Volumenverlust an Perilymphe) als zusätzliche Clearance an einem frei wählbaren Ort im Innenohr in das Modell inkorporiert. Dieses zusätzliche Modul berücksichtigte neben der Lokalisation der Dialyse-sonde die Perfusionsrate und die Wiederfindungsrate von Fluoreszin, welche vorher in

großen Reservoiren von 1000 μl ermittelt wurde. Die Ergebnisse der Computersimulationen wurden dann mit den Messungen aus den *in vitro* Experimenten verglichen.

2.4 Entwicklung eines 3D-Modells der Cochlea

Die *Cochlea* ist ein komplexes, dreidimensionales geometrisches Gebilde, bei dem drei aneinanderliegende, sich zur Spitze hin verkleinernde Flüssigkeitsräume (*Scala tympani*, *Scala vestibuli* und *Scala media*) spiralförmig um eine gemeinsame Achse, den *Modiolus*, angeordnet sind (Abb. 1A). Aufgrund des hohen Aufwands bei der Erstellung eines geometrischen CAD-Modells aus vorhandenen Schnittbildern (z.B. MRT-Aufnahmen), wurde für erste Modellrechnungen mit Hilfe des kommerziellen Programmpakets ANSYS (Version 6.1, ANSYS Inc., Canonburg, USA) ein genähertes 3D-*Cochlea*-Modell erstellt. Durch die Berücksichtigung vorhandener Daten zur Querschnittfläche von *Scala tympani* und *Scala vestibuli* entlang der cochleären Achse (Thorne et al., 1999) kommt die Geometrie der realen Meerschweinchen-*Cochlea* sehr nahe (Abb. 5).

Im Unterschied zu dem oben beschriebenen 1D-Modell ist hier der Bereich der lateralen Wand mit dem Spiralligament

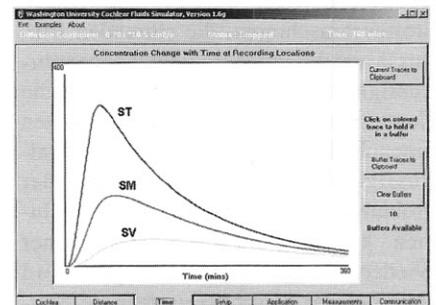


Abb. 2: 1D-Modell zur Berechnung der Substanzkonzentration in den Innenohrflüssigkeiten nach lokaler oder systemischer Medikamentenapplikation Beispiel für die grafische Ausgabe berechneter Konzentrations-Zeit-Kurven in den drei cochleären *Scalae* des Meerschweinchens nach 30-minütiger lokaler Applikation von Methylprednisolonsuccinat an die Rundfenstermembran des Innenohres (Parameter für die Simulation aus Plontke und Salt, 2003).

berücksichtigt, da angenommen wird, dass die Clearance aus der *Cochlea* hauptsächlich über diesen gut durchbluteten Bereich stattfindet.

Die Substanzverteilung in den *Scalae* der *Cochlea* kann durch bekannte Diffusionsgleichungen beschrieben werden:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = k_i \Delta C_i, \quad \forall \in \Omega_i, \quad i = ST, SV, SM, SL$$

C_i bezeichnet dabei die Konzentration in der *Scala tympani* ($i = ST$), *Scala vestibuli* ($i = SV$), der *Scala media* ($i = SM$) und dem Spiralligament ($i = SL$), die von der Zeit t und der Position \forall abhängen, und k_i sind die entsprechenden Diffusionskoeffizienten der *Scalae* Ω_i . Zwischen den Kompartimenten kann ein Stoffaustausch stattfinden. Dabei wird angenommen, dass der Fluss $k_i \frac{\partial C_i}{\partial n}$ entlang der Oberflächennormalen n proportional der Konzentrationsdifferenz $C_i - C_j$ ist ($i, j = ST, SV, SM, SL, i \neq j$):

$$k_i \frac{\partial C_i}{\partial n} = -k_{i-j} (C_i - C_j).$$

Die Proportionalitätsfaktoren k_{i-j} bezeichnen die sogenannten Übergangskoeffizienten, die ein Maß für die Barriere zwischen den Kompartimenten darstellen.

An der Rundfenstermembran wird eine konstante Konzentration D appliziert

$$k_{ST} \frac{\partial C_{ST}}{\partial n} = -\beta (C_{ST} - D).$$

Die Clearance erfolgt im Wesentlichen durch das Spiralligament

$$k_{SL} \frac{\partial C_{SL}}{\partial n} = -k_{SL, \text{Clear}} C_{SL}.$$

Alle anderen Kompartimentoberflächen werden als vollständig isoliert betrachtet:

$$k_i \frac{\partial C_i}{\partial n} = 0, \quad i = ST, SV, SM, SL.$$

Dieses System partieller Differentialgleichungen beschreibt den Diffusionsprozess in der *Cochlea* in Abhängigkeit der Parameter $k_i, k_{i-j}, k_{SL, \text{Clear}}, \beta, D$ eindeutig.

Das erstellte 3D-Modell wurde in das kommerziell erhältliche Programmpaket ANSYS implementiert, und für einen ausgewählten Parametersatz $k_i, k_{i-j}, k_{SL, \text{Clear}}, \beta, D, i, j = ST, SV, SM, SL$ wurden Testrechnungen durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Simulation von Messfehlern durch Probenentnahmen aus *Scala tympani*

Abbildung 3 zeigt eine graphische Darstellung der berechneten Abweichungen zwischen „gemessenen“ und „tatsächlichen“ Medikamentenkonzentrationen in der Perilymphe in Abhängigkeit vom Entnahmeort und vom entnommenen Probenvolumen. Es lässt sich deutlich erkennen, dass die Substanzkonzentration in der Probe die lokale Konzentration vor der Probenentnahme zum Teil erheblich unter- oder überschätzt. Der jeweilige Faktor hängt stark vom vorliegenden Konzentrationsgradienten entlang der *Cochlea* und damit von den definierten pharmakokinetischen Parametern, insbesondere von Clearance und Diffusion und vom gewählten Applikationsprotokoll ab. Diese Berechnungen können noch kleine Fehler aufweisen, sind allerdings den größeren Interpretationsfehlern vorzuziehen, die entstehen, wenn man annimmt, die Probenkonzentration entspräche der Substanzkonzentration in der Perilymphe.

3.2 Konzentrationsbestimmung durch Mikrodialyse

Die Messung der Substanzkonzentration in den Flüssigkeitsreservoirs zeigt eine Abnahme der Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes Natriumfluoreszein im Dialysat im Verlauf des Experiments (Abb. 4). Dieser Effekt ist erwartungsgemäß in einem kleinen Gefäß von 10 μl stärker ausgeprägt als in einem größer volumigen Gefäß von 100 μl . Zum Vergleich: Das gesamte Perilymphvolumen der Meerschweinchen-*Cochlea* beträgt weniger als 10 μl . Die Ergebnisse der Computersimulationen (Abb. 4, offene Symbole) liegen deutlich innerhalb der Standardabweichungen der Messwerte (Abb. 4, volle Symbole) und stimmen damit gut mit den experimentellen Ergebnissen überein.

3.3 Berechnungen mit einem 3D-Modell der *Cochlea*

Mit Hilfe des dreidimensionalen Modells der *Cochlea* wurde die zeitliche und räumliche Konzentrationsänderung des Wirkstoffs simuliert. Der Wirkstoff wird

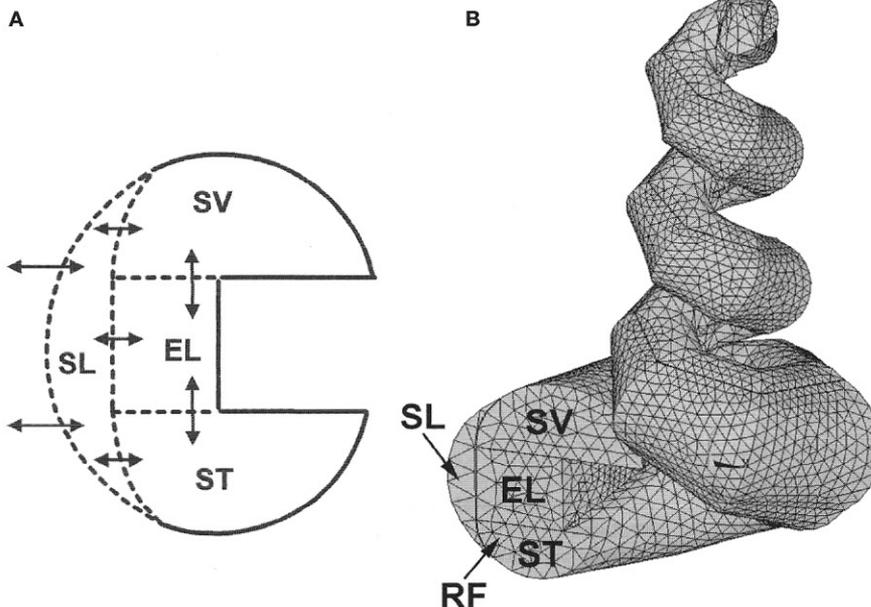


Abb. 5: Rekonstruktion der Hörschnecke des Meerschweinchens

(A): Querschnitt durch eine Windung des 3D-Hörschneckenmodells. (ST: *scala tympani*, SV: *scala vestibuli*, EL: cochleärer Endolymphraum, SL: Spiralligament). Die Pfeile geben den Stoffaustausch zwischen den Kompartimenten bzw. zwischen Spiralligament und systemischem Blutkreislauf an.

(B): Gitternetzkonstruktion unter Berücksichtigung vorhandener Daten zur Querschnittsfläche von *scala tympani* und *scala vestibuli* entlang der cochleären Achse. RF: Rundfenstermembran.



an das runde Fenster gebracht und diffundiert von dort in die *Cochlea*. Die Simulationsergebnisse sind in den Abbildung 6A und 6B dargestellt.

Nach 30-minütiger Applikation (Abb. 6A) erkennt man einen großen Konzentrationsgradienten zwischen dem basalen Abschnitt am runden Fenster und dem am weitesten apikalen Abschnitt am Helikotrema (Verbindung zwischen *Scala tympani* und *Scala vestibuli*). Der Wirkstoff befindet sich zu diesem Zeitpunkt in der Nähe des runden Fensters. Die Zeit hat für die Diffusion noch nicht ausgereicht, um den Wirkstoff in die „tieferen“ Bereiche zu bringen. Maximale Konzentration (am runden Fenster)

und minimale Konzentration (an der Spitze der *Cochlea*) unterscheiden sich um einen Faktor von ca. $9 \cdot 10^{10}$. Neben einer longitudinalen Diffusion sieht man ein Profil in der Querschnittfläche. Ein eindimensionales Modell kann die Diffusion im Querschnitt nicht erfassen.

Nach ca. einwöchiger Applikation (Abb. 6B) erkennt man dann ein Konzentrationsprofil, das ein Maximum an der Rundfenstermembran aufweist, das ungefähr 25 mal größer ist als das Minimum an der Spitze der *Cochlea* (Helikotrema). Im Sättigungszustand ist der applizierte Wirkstoff auch im Helikotrema nachweisbar.

Die Bedeutung dieser Konzentrationsgradienten entlang der Achse der Gehör-

schnecke liegt in der sogenannten tonotopischen Anordnung der Sinneszellen und der sie kontaktierenden Hörnervenfaser. Hohe Frequenzen werden in den basalen Abschnitten (nahe dem Medikamentenapplikationsort – der Rundfenstermembran) kodiert, während tiefe Frequenzen inklusive des Hauptsprachbereichs in den apikalen Windungen der Gehörschnecke aufgenommen werden. Das *Vestibulum* des Gleichgewichtsorgans ist pharmakokinetisch mit der angrenzenden *Scala vestibuli* und über die laterale Wand (Spiralligament), die nur eine geringe Diffusionsbarriere darzustellen scheint, mit der basalen Windung von *Scala tympani* verbunden (Abb. 1B).

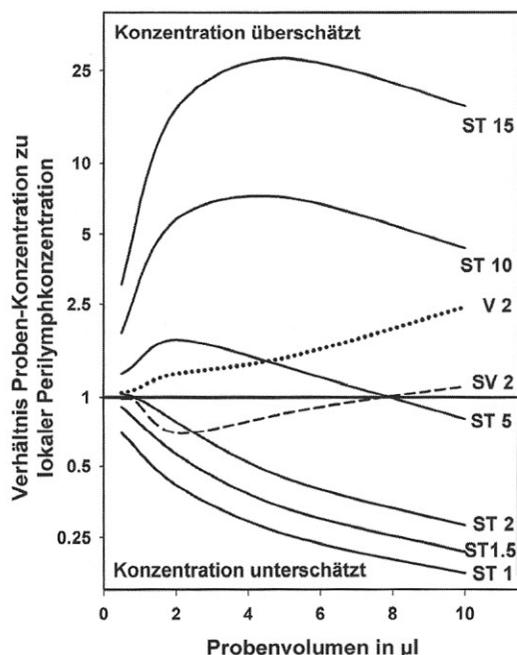


Abb. 3: Computersimulationen zur Artefaktentstehung durch Probenentnahme aus dem Innenohr

Aufgrund der geringen Volumina in den Flüssigkeitsräumen des Innenohres und bestehender Konzentrationsgradienten nach lokaler Applikation haben der Ort der Probenentnahme und das entnommene Probenvolumen einen deutlichen Einfluss auf die Substanzkonzentration am Entnahmestellenort. Dargestellt ist die berechnete Größe des Messfehlers als Quotient von Probenkonzentration in der Messkapillare nach der Entnahme und der Substanzkonzentration an der Entnahmestelle vor der Probenentnahme für ein spezifisches Applikationsprotokoll und eine bestimmte Substanz (siehe Text). Das Modell sagt für diese Art der Probenentnahmetechnik erhebliche Messartefakte voraus, die z.B. durch Computersimulationen korrigiert werden können. Die Zahlen hinter den Abkürzungen für *Scala tympani* (ST) und *Scala vestibuli* (SV) geben den Probenentnahmestellenort als Abstand von der Basis der *Cochlea* in Millimeter an. V: *Vestibulum*.

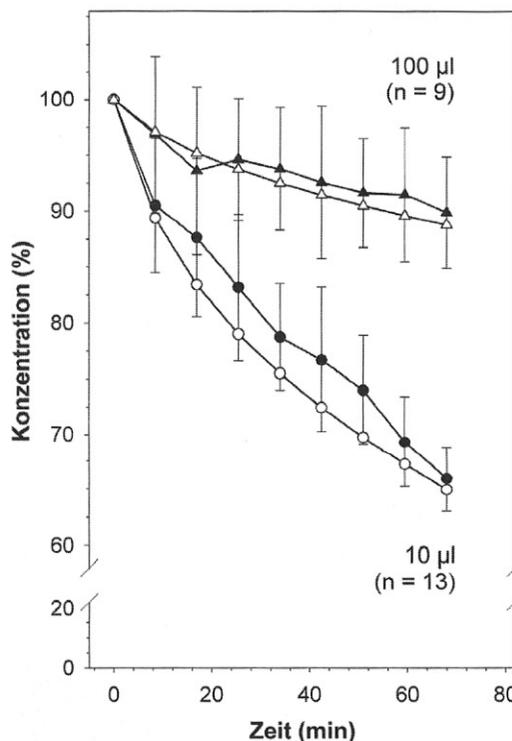


Abb. 4: Computersimulationen und Messergebnisse von Probenentnahmen durch Mikro dialyse in einem in vitro Modell

Trotzdem die Wiederfindungsrate des Fluoreszenzfarbstoffes im Dialysat nur 2-3% beträgt, führt die Mikro dialyse schon im Verlauf ca. einer Stunde zu einem deutlichen Absinken der Natriumfluoreszin-Konzentration. Dies ist bei kleinvolumigen Reservoirs wie dem Innenohr stärker ausgeprägt als bei großvolumigen Gefäßen und würde zu schwer interpretierbaren Artefakten im *in vivo* Versuch führen. Die Messungen sind nur mit einer bestimmten Genauigkeit möglich (volle Symbole: Mittelwert und Standardabweichung). Die Berechnungen mit dem Modell (offene Symbole) liegen gut innerhalb dieser Genauigkeit.

4 Diskussion

4.1 Simulation von Messfehlern durch Probenentnahmen aus der *Scala tympani*

Die Bestimmung von Konzentrations-Zeit-Kurven auf der Grundlage von Probenentnahmen aus der *Cochlea* birgt eine große Gefahr der Missinterpretation. Die Ursache dafür bildet die Beobachtung, dass die Probenentnahme selbst die Substanzkonzentration im Innenohr beeinflusst (Hara et al., 1989; Salt et al., 2003; Scheibe et al., 1984). Bei Proben, die direkt durch die Membran des runden Fensters oder sehr weit basal in der *Scala tympani* entnommen werden, kann der Kontaminationsgrad mit CSF – wegen der Nähe zum *Aquaeductus cochlearis*, welcher *Cochlea* und Liquorraum miteinander verbindet – sehr hoch sein. Proben mit einem Volumen größer als wenige Mikroliter werden weniger als 50%

Perilymphe enthalten. Sogar kleine Proben bestehen nicht vollständig aus Perilymphe (Salt et al., 2003).

Das Computer-Modell erlaubt die Berechnung der Probenkonzentration bei den spezifischen Bedingungen eines Experiments und lässt Rückschlüsse auf die Perilympfkonzentration vor Probenentnahme zu.

Mit Hilfe der Computersimulationen können somit Probenmenge und Entnahmeort vor dem Experiment optimiert, gewonnene Messergebnisse aus *in vivo* Experimenten besser interpretiert und dadurch die Anzahl notwendiger Tierversuche reduziert werden.

4.2 Reduzierung von Tierversuchen durch Anwendung der Mikrodialysetechnik

Die Mikrodialyse ist eine wertvolle Technik für die Bestimmung der Pharmakokinetik von Substanzen in den

Innenohrflüssigkeiten nach topischer Medikamentenapplikation an die Rundfenstermembran. Durch die fehlende Entnahme von Perilympfvolumen verursacht diese Technik weniger Artefakte als konventionelle Probenentnahmetechniken. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch die Mikrodialysetechnik in kleinen Flüssigkeitsreservoirs wie dem Innenohr trotz der geringen Wiederfindungsraten der zu messenden Substanz im Dialysat zu Messfehlern führen kann. Bisherige pharmakokinetische Studien, in welchen auch Parameter wie z.B. die cochleäre Clearance ermittelt wurden, haben diese Tatsache nicht berücksichtigt (Hibi et al., 2001; Hunter et al., 2003). Unter Zuhilfenahme eines Computer-Modells können die mit der Mikrodialysetechnik gewonnenen Messergebnisse besser interpretiert und durch die Entnahmetechnik bedingte Artefakte korrigiert werden (Abb. 4). Als nachteilig

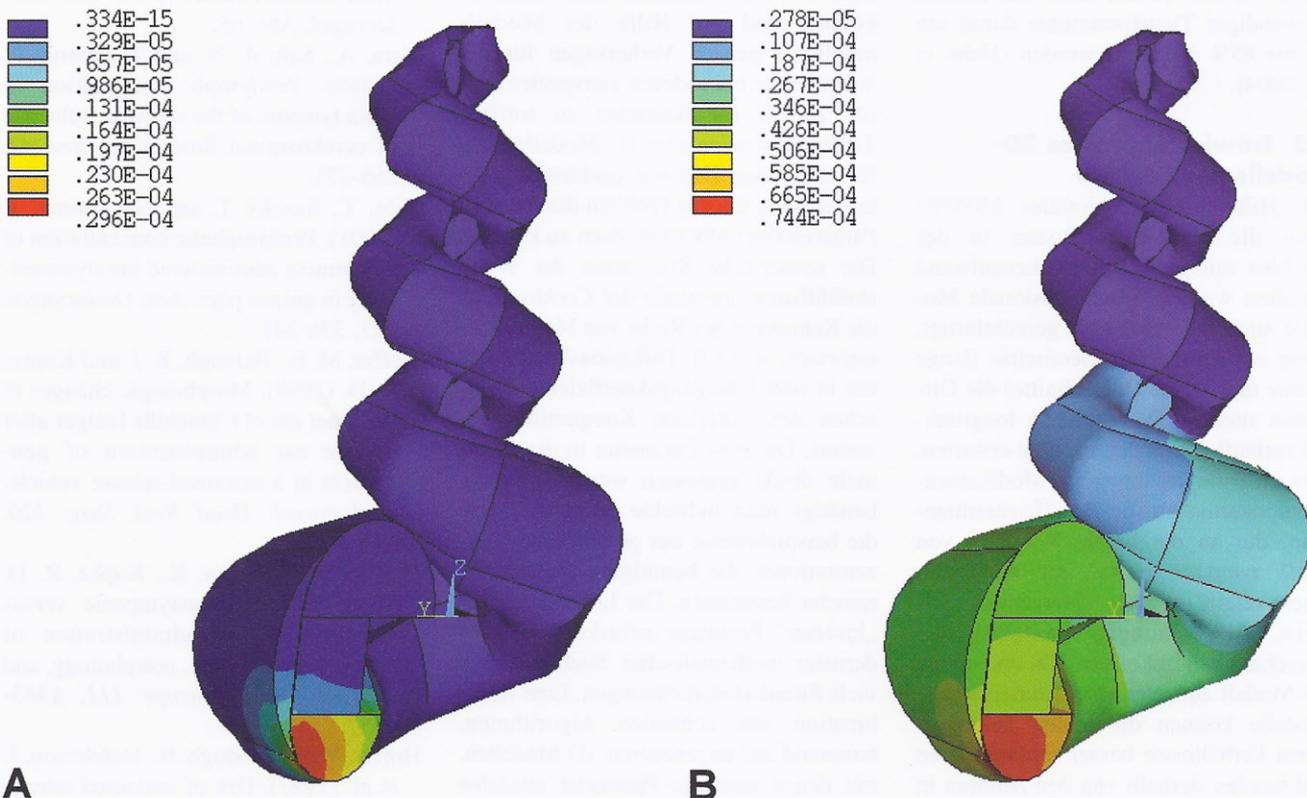

A

Abb. 6: Konzentrationsgradienten im 3D-Modell für zwei unterschiedliche Applikationsstrategien

Entsprechend der Beispielberechnungen zeigt die kurzzeitige Applikation für 30 Minuten (A) deutlich größere Konzentrationsgradienten zwischen basalen Abschnitten der *Cochlea* (Bereiche für hohe Frequenzen) und apikalen Abschnitten (Bereiche für tiefe

B

Frequenzen) als die kontinuierliche Medikamentenapplikation an die Rundfenstermembran (RF) im Sättigungsbereich (B). Zusätzlich zeigt sich ein Konzentrationsprofil in der Querschnittsfläche, die in einem 1D-Modell nicht erfasst werden kann. Die Zahlenangaben in der Legende stellen die normierten Konzentrationen dar.



ist der im Vergleich zur konventionellen Probenentnahmetechnik zu erwartende höhere technische Aufwand (Sondenkalibrierung, Mikrodialysepumpe und Fraktionssammler) bei Mikrodialyse-Versuchen zu sehen.

Aufgrund der kontinuierlichen Konzentrationsbestimmung in den Flüssigkeitsräumen des Innenohres gemeinsam mit der Computer-gestützten Interpretation der Messergebnisse ermöglicht die Mikrodialyse die Messung einer gesamten Konzentrations-Zeit-Kurve pro Tier und damit eine deutliche Reduktion der Anzahl von Tierversuchen bei pharmakokinetischen Studien im Innenohr. Im Vergleich zur bisherigen Vorgehensweise, bei der pro Tier jeweils nur eine Probe aus dem Innenohr gewonnen wird und somit für die Erstellung einer Konzentrations-Zeit-Kurve ca. fünf bis sieben Zeitpunkte erforderlich sind (Bachmann et al., 2001; Chen et al., 2003; Hoffer et al., 1997, 1999, 2001; Parnes et al., 1999), kann die Anzahl notwendiger Tierexperimente damit um 80 bis 85% reduziert werden (Hahn et al., 2004).

4.3 Entwicklung eines 3D-Modells der Cochlea

Mit Hilfe eindimensionaler Modelle kann die Wirkstoffdiffusion in der Cochlea mit geringem Rechenaufwand simuliert werden. Eindimensionale Modelle sind aber nur dann gerechtfertigt, wenn auf Grund der Geometrie (lange *Scalae* und kleine Querschnitte) die Diffusion auch im Wesentlichen longitudinal verläuft. Es ist demnach zu erwarten, dass im Falle der topischen Medikamentenapplikation an die Rundfenstermembran, die an die basale Windung von *Scala tympani* grenzt, die wiederum einen relativ großen Querschnitt aufweist, Abweichungen zwischen den Berechnungen mit einem 1D- und einem 3D-Modell auftreten. Mehrdimensionale Modelle können die realen geometrischen Verhältnisse besser repräsentieren und werden deshalb von den Autoren in zukünftigen Projekten weiterentwickelt. Die Notwendigkeit der Weiterentwicklung ergibt sich aus verschiedenen Gründen. Es ist wichtig, den Einfluss unterschiedlicher Querschnitte (bedingt durch unterschiedlich große Cochleae un-

terschiedlicher Tierspezies) auf die Ergebnisse dreidimensionaler Berechnungen zu untersuchen. Die Auswirkungen unterschiedlicher Applikationsparadigmata (einmalige kurzzeitige oder kontinuierliche Applikation) und der Clearance (Clearance-abhängige oder Clearance-unabhängige Effekte) auf die Ergebnisse dreidimensionaler Berechnungen müssen eingehender studiert werden.

Danach soll das bisherige dreidimensionale geometrische Modell weiter an reale geometrische Strukturen einer Cochlea aus Bilddaten biologischer Objekte angenähert werden. Die Anpassung von Simulationen an vorhandene Daten aus Tierexperimenten, so dass Tierexperimente mit dem mathematischen Modell möglichst genau nachgebildet werden können, sind Voraussetzungen für geeignete Validierungsexperimente.

Ziel ist es, mit einem möglichst genauen 3D-Computer-Modell weltweit gewonnene experimentelle pharmakokinetische Messdaten der Cochlea analysieren zu können und mit Hilfe des Modells möglichst genaue Vorhersagen für die Verhältnisse bei anderen Tierspezies oder für andere Medikamente zu treffen. Trotzdem werden aber 1D-Modelle noch für eine lange Zeit von praktischem Interesse sein, um das Problem der inversen Parameteridentifikation lösen zu können. Die numerische Simulation der Wirkstoffdiffusion innerhalb der Cochlea setzt die Kenntnis einer Reihe von Materialparametern, wie z.B. Diffusionskoeffizienten in und Übergangskoeffizienten zwischen den einzelnen Kompartimenten, voraus. Da diese Parameter in der Regel nicht direkt gemessen werden können, benötigt man indirekte Messverfahren, die beispielsweise aus gemessenen Konzentrationen die benötigten Materialparameter bestimmen. Die Lösung solcher „inverser“ Probleme erfordert trotz modernster mathematischer Suchstrategien viele Simulationsrechnungen. Eine Kombination aus schnellen Algorithmen, basierend auf ungenaueren 1D-Modellen, mit denen man die Parameter zunächst grob bestimmen kann, und langsameren Verfahren auf der Grundlage einer genauen 3D-Modellierung, mit denen die Genauigkeit der Parameter dann in wenigen Schritten verbessert wird, ist dabei ein erfolgversprechender Ansatz.

Literatur

- Bachmann, G., Su, J., Zumegen, C. et al. (2001). Permeabilität der runden Fenstermembran für Prednisolon-21-Hydrogensuccinat. *HNO* 49, 538-542.
- Byl, F. (1984). Sudden hearing loss: Eight years experience and suggested prognostic table. *Laryngoscope* 94, 647-661.
- Chen, Z., Duan, M., Lee, H. et al. (2003). Pharmacokinetics of caroverine in the inner ear and its effects on cochlear function after systemic and local administrations in Guinea pigs. *Audiol. Neurootol.* 8, 49-56.
- Goycoolea, M. V. (2001). Clinical aspects of round window membrane permeability under normal and pathological conditions. *Acta. Otolaryngol.* 121, 437-447.
- Hahn, H., Plontke, S., Salt, A. N. and Zenner, H. P. (2004). Microdialysis for studying pharmacokinetics in the inner ear and interpretation of results using a finite element model. *Assoc. Res. Otolaryngol.* Abs. 65.
- Hara, A., Salt, A. N. and Thalmann, R. (1989). Perilymph composition in scala tympani of the cochlea: influence of cerebrospinal fluid. *Hear. Res.* 42, 265-271.
- Hibi, T., Suzuki, T. and Nakashima, T. (2001). Perilymphatic concentration of gentamicin administered intratympanically in guinea pigs. *Acta Otolaryngol.* 121, 336-341.
- Hoffer, M. E., Balough, B. J. and Kopke, R. D. (1999). Morphologic changes in the inner ear of Chinchilla laniger after middle ear administration of gentamicin in a sustained-release vehicle. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 120, 643-648.
- Hoffer, M. E., Allen, K., Kopke, R. D. et al. (2001). Transtympanic versus sustained-release administration of gentamicin: kinetics, morphology, and function. *Laryngoscope* 111, 1343-1357.
- Hoffer, M. E., Balough, B., Henderson, J. et al. (1997). Use of sustained release vehicles in the treatment of Meniere's disease. *Otolaryngol. Clin. North. Am.* 30, 1159-1166.
- Hunter, B. A., Lee, S., Odland, R. M. et al. (2003). Estimation of perilymph concentration of agents applied to



- the round window membrane by microdialysis. *Acta Otolaryngol.* 123, 453-458.
- Lalwani, A. K., Jero, J. and Mhatre, A. N. (2002). Current issues in cochlear gene transfer *Audiol. Neurootol.* 7, 146-151.
- Lange, G. (1995). [27 years experiences with transtympanic aminoglycoside treatment of Meniere's disease]. *Laryngorhinootologie* 74, 720-723.
- Niedermeyer, H. P., Zahneisen, G., Lupp, P. et al. (2003). Cortisol levels in the human perilymph after intravenous administration of prednisolone. *Audiol. Neurootol.* 8, 316-321.
- Ohyama, K., Salt, A. N. and Thalmann, R. (1988). Volume flow rate of perilymph in the guinea-pig cochlea. *Hear Res.* 35, 119-129.
- Parnes, L. S., Sun, A. H. and Freeman, D. J. (1999). Corticosteroid pharmacokinetics in the inner ear fluids: an animal study followed by clinical application. *Laryngoscope* 109, 1-17.
- Plontke, S. K. und Zenner, H. P. (2004). Aktuelle Aspekte zu Gehörschäden durch Berufs- und Freizeitlärm. *Laryngo-Rhino-Otol* 83 Suppl. 1, 122-164.
- Plontke, S. K. and Salt, A. N. (2003). Quantitative interpretation of corticosteroid pharmacokinetics in inner ear fluids using computer simulations. *Hear Res.* 182, 34-42.
- Plontke, S. K., Wood, A. W. and Salt, A. N. (2002). Analysis of gentamicin kinetics in fluids of the inner ear with round window administration. *Otol. Neurotol.* 23, 967-974.
- Salt, A. N. (2002). Simulation of methods for drug delivery to the cochlear fluids. *Adv. Otorhinolaryngol.* 59, 140-148.
- Salt, A. N. and Ma, Y. (2001). Quantification of solute entry into cochlear perilymph through the round window membrane. *Hear Res.* 154, 88-97.
- Salt, A. N., Kellner, C. and Hale, S. (2003). Contamination of perilymph samples from the basal cochlear fluid with cerebrospinal fluid. *Hear Res.* 182, 23-33.
- Salt, A. N., Ohyama, K. and Thalmann, R. (1991a). Radial communication between the perilymphatic scalae of the cochlea. I: Estimation by tracer perfusion. *Hear Res.* 56, 29-36.
- Salt, A. N., Ohyama, K. and Thalmann, R. (1991b). Radial communication between the perilymphatic scalae of the cochlea. II: Estimation by bolus injection of tracer into the sealed cochlea. *Hear Res.* 56, 37-43.
- Scheibe, F., Haupt, H. and Bergmann, K. (1984). On sources of error in the biochemical study of perilymph (guinea pig). *Arch. Otorhinolaryngol.* 240, 43-48.
- Stover, T., Yagi, M. and Raphael, Y. (1999) Cochlear gene transfer: round window versus cochleostomy inoculation. *Hear Res.* 136, 124-130.
- Thorne, M., Salt, A. N., DeMott, J. E. et al. (1999). Cochlear fluid space dimensions for six species derived from reconstructions of three-dimensional magnetic resonance images. *Laryngoscope* 109, 1661-1668.

Danksagung/Fördermittel

Diese Arbeit wurde unterstützt durch das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET), Projekt WK 1-1328-162, (SP, 1D- und 3D-Simulationen), durch das fortüne-Programm der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen Antrag Nr. 1001-0-0 (SP, Mikrodialyse) und das NIH/NIDCD, grant DC01368 (ASN, 1D-Simulationen). Wir danken Herrn S. Pereverzyev und Herrn K. Tatman, Kaiserslautern, für ihre Assistenz bei den 3D-Simulationen. Wir danken Frau Renate Lauf, Tübingen, für den histologischen Schnitt der Cochlea. Abb. 1B nach: Plontke SKR, Wood AW, Salt AN (2002) Analysis of Gentamicin Kinetics in Fluids of the Inner Ear with Round Window Administration. *Otology & Neurootology* 23(6), 967-974, mit freundlicher Genehmigung des Verlags.

Korrespondenzadresse

Dr. med. Stefan Plontke
Klinik für Hals-, Nasen- und
Ohrenheilkunde
am Universitätsklinikum Tübingen
Elfriede-Aulhorn-Str. 5
D-72076 Tübingen
Tel. +49-7-071 298 80 88
Fax +49-7-071 293 311
E-Mail:
Stefan.Plontke@uni-tuebingen.de