

**Aus dem
Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin**

**Entwicklung eines Hautperforationsmodells am Kaninchenohr mit geschlossenem
Kreislauf und Erprobung mittels einer öligen Testosteronlösung**

**INAUGURAL- DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
DOKTORS DER VETERINÄRMEDIZIN
an der Freien Universität Berlin**

**Vorgelegt von
MANJA HARTIG
Tierärztin aus
Cottbus**

Berlin 1997

Journal Nr: 2046

**Meiner Schwester
Janett**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.- Prof. Dr. K. Hartung

1. Gutachter: Univ.- Prof. Dr. habil. W. Heinze

2. Gutachter: Univ.- Prof. Dr. habil. R. Berg

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 06. 1997

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	7
2. LITERATURÜBERSICHT	9
2. 1. Modellversuche	9
2. 1. 1. <u>In- vitro</u> - Hautmodelle	9
2. 1. 1. 1. Diffusionszellen	9
2. 1. 1. 2. Die isoliert perfundierte Haut	14
2. 1. 1. 3. Das isoliert perfundierte Kaninchenohr	17
2. 2. Das Perfusionsmedium	22
2. 3. Die Vitalität des isolierten Organs	26
2. 4. Perfusionsdruck und Flußrate	28
2. 5. Struktur und Funktion der Haut	31
2. 5. 1. Oberhaut (Epidermis)	32
2. 5. 2. Lederhaut (Dermis, Corium)	34
2. 5. 3. Unterhaut (Tela subcutanea)	34
2. 6. Morphologie des Kaninchenohrs	35
2. 6. 1. Anatomie der Ohrmuschel	35
2. 6. 2. Blutversorgung des Kaninchenohrs	36
2. 6. 3. Bau und Struktur der Haut des Kaninchenohrs	37
2. 7. Untersuchungssubstanz Testosteron	39
2. 7. 1. Chemie	39
2. 7. 2. Anwendung	40
2. 7. 3. Pharmakokinetik	41
2. 7. 4. Wirkung	42

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	44
3. 1. Versuchsmaterial	44
3. 1. 1. Organgewinnung	44
3. 1. 2. Perfusionsmedium	44
3. 2. Verwendete Substanz	46
3. 3. Versuchsaufbau	47
3. 4. Vorversuche	49
3. 5. Versuchsablauf	50
3. 5. 1. Präparationstechnik	50
3. 5. 2. Perfusionsversuch	51
3. 6. Nachweismethoden	52
3. 6. 1. Radioimmunologischer Nachweis von Testosteron	52
3. 6. 1. 1. Standardreihe	52
3. 6. 2. Glukosebestimmung aus dem Perfusat	53
3. 6. 3. LDH- Bestimmung aus dem Perfusat	53
3. 6. 4. Kaliumbestimmung aus dem Perfusat	54
4. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE	55
4. 1. Wirkstoffresorption	55
4. 1. 1. Testosteronkonzentration im Perfusat	55
4. 1. 2. Statistische Auswertung	57
4. 2. Vitalitätsparameter	60
4. 2. 1. Glukoseverbrauch aus dem Perfusat	60
4. 2. 2. LDH- Aktivität im Perfusat	62
4. 2. 3. Kaliumfreisetzung in das Perfusat	64
4. 3. Ergänzende Untersuchungen	66
4. 3. 1. Perfusionsdruck und Flußrate	66
4. 3. 2. Gewichtszunahme des Organs	68
4. 3. 3. Mikroskopische Untersuchung	70
5. DISKUSSION	73
6. ZUSAMMENFASSUNG	84
7. SUMMARY	85
8. LITERATURVERZEICHNIS	86

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CO ₂	Kohlendioxid
et al.	et alii
Fa.	Firma
H.- E.	Hämatoxylin- Eosin
LDH	Laktatdehydrogenase
N.	Nervus
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	Nicotin-adenin-dinucleotid
O ₂	Sauerstoff
Str.	Stratum
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
V.	Vena
z.B.	zum Beispiel

1. EINLEITUNG

Die Haut bildet die Grenzfläche zwischen dem Organismus und seiner Umwelt. Sie erfüllt vielfältige Aufgaben, so z.B. Schutzfunktionen gegenüber mechanischen, thermischen, chemischen und biologischen Einwirkungen von außen. Auch thermoregulatorische Funktionen werden durch die Haut realisiert.

Als Aufnahme- und Abwehrorgan stellt die Haut eine physiologische Barriere für alle Substanzen mit denen der Organismus in Berührung kommt, dar. Diese Eigenschaft macht man sich bei der therapeutischen Anwendung von Wirkstoffen über die Haut zunutze. Topisch verabreichte Substanzen sollen in die Haut eindringen oder hindurchtreten und ihre Wirkung lokal bzw. systemisch entfalten. Die Penetration, Resorption und Biotransformation erfolgt in Abhängigkeit von den Eigenschaften dieser Stoffe und ihrer Formulierung.

In den letzten Jahren konnte in der Pharmaindustrie und der kosmetischen Industrie eine stetig fortschreitende Entwicklung von Dermatika beobachtet werden. In der Veterinärmedizin sind vergleichbare Tendenzen bei der Entwicklung von Arzneimitteln und Applikationsverfahren zur topischen Anwendung zu verzeichnen. Hierbei handelt es sich z.B. um transkutane therapeutische Systeme, Pour- on- und Spot- on- Technik zur Verabreichung von Antektroparasitika sowie die ständige Entwicklung neuartiger Pflegemittel, z. B. Shampoos für Haut und Haar.

Neuentwickelte Pharmaka müssen in aufwendigen und umfangreichen Untersuchungen auf ihre Resorption, Verteilung und Eliminierung, aber auch auf ihre Verträglichkeit und Nebenwirkungen getestet werden.

Derartige Tests werden zum großen Teil an lebenden Tieren durchgeführt, wobei die Resorptionsquote meist indirekt über die Wirkstoffkonzentration im Plasma oder im Urin ermittelt wird. Eine weitere Einflußgröße ist die Verteilung und Biotransformation des Arzneistoffes im Organismus.

Als Modell für das Hautorgan wurden zunächst Diffusionszellen verwendet. Hier wird menschliche oder tierische Haut zwischen zwei flüssigkeitsgefüllte Kammern gespannt und der

Übertritt der zu testenden Substanz von der oberen in die untere Kammer gemessen. Bei der Wertung der Ergebnisse ist zu beachten, daß das getestete Pharmakon bis zum Erreichen der unteren Kammer die gesamten Hautschichten durchwandern muß, was zu einer Zeitverzögerung führt, da normalerweise bereits im Corium der Übertritt in die Blutbahn erfolgt. Dieses Modell wird aufgrund der mangelnden Substratversorgung der Haut den physiologischen Bedingungen nur unzureichend gerecht, deshalb arbeitet man heute zunehmend mit isoliert perfundierten Hautlappen.

Bei Versuchen mit isoliert perfundierten Organen, wie z.B. dem Kaninchenohr, besteht die Möglichkeit, natürliche Bedingungen wie die Temperatur, pH- Verhältnisse, die Sauerstoff- und Substratversorgung, den Durchblutungsgrad sowie den Blutdruck zu realisieren und somit die Vitalität des Organs in vollem Umfang zu erhalten. Die erzielbaren Ergebnisse dieser Modellversuche sind aufgrund ihrer Standardisierbarkeit jederzeit reproduzierbar. Weiterhin können bei Versuchen mit isolierten Organen auch toxische Dosen und radioaktiv markierte Substanzen getestet werden. Beides ist bei In- vivo- Versuchen nur sehr eingeschränkt möglich.

Schließlich muß jedoch auch angemerkt werden, daß die aus In- vitro- Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse nicht unkritisch auf den lebenden Organismus übertragen werden können. Organmodelle sind in gewissem Umfang dazu geeignet, die früher übliche Anzahl von Tierversuchen einzuschränken.

Ziel dieser Arbeit ist es, ein Hautperfusionsmodell mit einem geschlossenen Kreislauf zu entwickeln und mittels Testosteron zu erproben. Gleichzeitig wird besonders darauf geachtet, daß die Vitalität des Organs bis zum Versuchsende erhalten bleibt, was durch biochemische und histologische Untersuchungen belegt wird. Das Organ wird von einer blutäquivalenten Flüssigkeit durchströmt, die weitgehend den physiologischen Parametern entspricht. Als Vertreter des Organs Haut wurde das isolierte Kaninchenohr gewählt, weil es sich aufgrund seiner anatomischen Beschaffenheit und der hohen Penetrationsrate besonders als Perfusionspräparat eignet. Die Abwesenheit von Fettgewebe am Kaninchenohr ist für die Durchführung von Resorptionsversuchen vorteilhaft.

Um die praktische Anwendbarkeit dieses Modells zu prüfen, wurde die dermale Resorption des Hormons Testosteron untersucht, da Testosteron perkutan relativ gut resorbiert wird (ZESCH u. SCHÄFER, 1989) und für diesen Wirkstoff bereits Ergebnisse aus anderen Modellversuchen vorliegen.

2. LITERATURÜBERSICHT

2. 1. Modellversuche

2. 1. 1. In- vitro- Hautmodelle

Schon seit nahezu einem Jahrhundert bedient man sich der In- vitro- Modelle, um bestimmte Vorgänge oder Reaktionen des menschlichen und tierischen Organismus zu erforschen. Es wurden die verschiedensten Organe isoliert und in einem künstlichen Kreislauf perfundiert. Bereits 1898 arbeitete SALASKIN (WARD u. BUTTERY, 1979) mit der isolierten Säugerleber, welche er mit Blut perfundierte. Zu den meistgenutzten Organen zählen die Leber, die Niere (LEVIN et al., 1965), die Lunge (BRYAN- LLUKA u. O'DONNELL, 1992; URBAIN et al., 1992) und das Herz (RADDINO et al., 1992). Es wurden aber auch endokrine Drüsen und Knochen erfolgreich perfundiert.

WARD u. BUTTERY (1979) weisen darauf hin, daß bei der Verwendung von isolierten Geweben oder Organen auch die Untersuchung der Biotransformation von Stoffen prinzipiell möglich ist, es müssen jedoch die Versuchsbedingungen den physiologischen Verhältnissen angepaßt sein. Die Vitalität des isolierten Organs muß in allen Phasen des Tests in vollem Umfang erhalten bleiben. Erst wenn diese Bedingungen erfüllt sind, kann man dazu übergehen, In- vivo- Untersuchungen teilweise durch Modellversuche zu ersetzen.

2. 1. 1. 1. Diffusionszellen

Um genaue Kenntnisse über die dermale Resorption zu gewinnen, arbeitete man zunächst mit Diffusionszellen (FRANZ, 1975; 1978; ANDO et al., 1977; BRONAUGH et al., 1981; 1982). Das Grundprinzip dieses Modells besteht darin, daß zwischen zwei flüssigkeitsgefüllten

Kammern ein Stück isolierte Haut vom Mensch oder Tier gespannt wird (siehe Abb. 2.1.). Die Perfusionsflüssigkeit der oberen Kammer wird als Donorflüssigkeit und die der unteren Kammer als Rezeptorflüssigkeit bezeichnet.

Die zu untersuchende Substanz wird auf die gespannte Haut aufgetragen und in der Rezeptorflüssigkeit wird der Wirkstoffspiegel in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Der Vorteil eines In- vitro- Modells liegt in der genauen und direkten Bestimmung der perkutanen Absorption, da bisher meist indirekt die ausgeschiedene Menge des untersuchten Wirkstoffs ermittelt wurde (BRONAUGH et al., 1982).

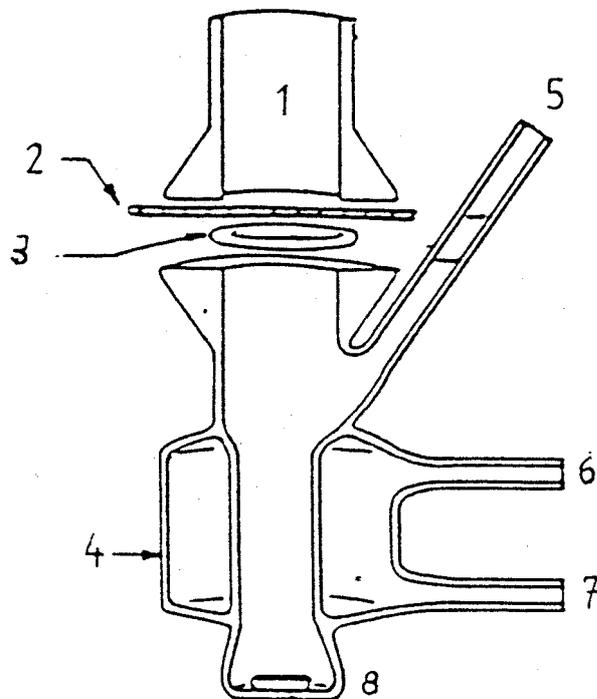


Abb. 2.1.: Schematische Darstellung der Diffusionszellen (FRANZ, 1975).

- 1 nach außen geöffnetes Oberteil, 2 Haut, 3 "O"- Ring,
- 4 Wärmemantel, 5 Probeentnahme, 6 Abfluß zum Wasserbad,
- 7 Zufluß, 8 Magnetprüher.

Am geeignetsten für derartige Resorptionsversuche erscheinen Labortiere, weil hier geringe technische und finanzielle Aufwendungen erforderlich sind. Besonders oft wird die Haut der haarlosen Maus verwendet, da sie annähernd gleiche Resorptionseigenschaften wie die menschliche Haut besitzt. Dies gilt für die Resorption von entzündungshemmenden Steroiden und von C₁- bis C₈- Alkoholen. Die Haut der Ratte ist diesbezüglich durchlässiger als Menschenhaut.

Unter den häufig genutzten Labortieren besitzt das Kaninchen die Haut mit der höchsten Permeabilität (BRONAUGH et al., 1982a). CHOWHAN und PRITCHARD (1978) untersuchten die perkutane Absorption von Naproxen bei Kaninchen, Ratte und Mensch. Die Versuchsdauer betrug 14 Stunden bei Kaninchen und Ratte bzw. 100 Stunden beim Menschen. Es bestätigt sich auch in diesem Versuch, daß die Kaninchenhaut im Vergleich zu anderen Tierarten, z. B. der Ratte, eine relativ hohe Permeabilität besitzt.

PRIBORSKI und MÜHLBACHOVA (1989) verglichen die perkutane Absorption der Haut von Ratte, Maus, Meerschwein, Kaninchen, Ferkel und Mensch im Diffusionszellversuch miteinander. Sie stellten fest, daß die größte Übereinstimmung der Permeabilität zwischen Mensch und Meerschwein besteht. Die Ergebnisse weisen hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Spezies auf. Dagegen zeigt die Haut der viel häufiger verwendeten Labortiere Ratte und Maus 5- bis 7fach höhere Penetrationsraten als die menschliche Haut. Die Autoren schlußfolgerten, daß In- vitro- Modelle zur Testung neuer Wirkstoffe sinnvoll eingesetzt werden können. Die optimale Konzentration für den Menschen kann mit dieser Methode jedoch nicht festgestellt werden.

Befunde vom Tier sind demnach nicht ohne Einschränkung auf den Menschen übertragbar, was auch KELLNER et al.(1985) in ihrer Arbeit betonten. Untersuchungen von BARTEK et al. (1972) führten ebenfalls zu dieser Erkenntnis. Im Rahmen ihrer Studie testeten sie die Hautpermeabilität unterschiedlicher Spezies anhand von sechs verschiedenen Substanzen, darunter Cortison, Testosteron, Coffein und Buttersäure. Die Permeabilitätsquoten wurden mit Hilfe des Wirkstoffgehalts im Urin der untersuchten Tiere ermittelt und verhielten sich in absteigender Reihenfolge wie folgt: Kaninchen > Ratte > Schwein > Mensch.

Die Schweinehaut wies bei allen getesteten Substanzen sehr niedrige Resorptionsraten auf, die denen der menschlichen Haut sehr nahe kamen. Das unterstreicht auch die Studie von BRONAUGH et al. (1982), in der die Permeabilität menschlicher und tierischer Haut für 19 verschiedene Substanzen verglichen und ins Verhältnis gesetzt wurde. Bei den untersuchten

Substanzen Acetylsalizylsäure und Harnstoff betrug die Permeabilität der Schweinehaut lediglich das 1,2- bis 1,5fache der menschlichen Haut, wobei die Haut der Maus eine 5,8- bis 8,7fach höhere Permeabilität als die menschliche Haut aufwies. Auch die Permeabilität der Kaninchenhaut betrug häufig ein Vielfaches der menschlichen Haut, so ist z.B. die Permeabilität für Cortison 9mal höher als bei der menschlichen Haut.

FRANZ (1975) kritisierte in seiner Studie, daß die aus In-vitro- Untersuchungen gewonnenen Daten selten mit den vorliegenden In- vivo- Werten auf Übereinstimmung geprüft werden. Er verglich die perkutane Absorption 12 organischer Substanzen an der Menschenhaut in vivo und mit Hilfe von Diffusionszellen. Das Ergebnis stimmt in 11 Fällen überein.

Mögliche Fehlerquellen, welche unterschiedliche Ergebnisse bedingen können, sieht FRANZ (1975) in der Verwendung von Haut verschiedener Körperstellen für die In- vivo- Applikation bzw. den Diffusionszellversuch. Hinzu kommt, daß von dem entnommenen Hautpräparat keine Schuppen mehr abgestoßen werden. Um diese In- vivo- In- vitro- Differenzen auszugleichen, erarbeitete er ein Äquivalent der Versuchszeitspannen und fand heraus, daß einem In- vitro- Absorptionsversuch von 5 Tagen ein zweitägiger In- vivo- Versuch entspricht.

In einer Studie von MARZULLI et al. (1969) wird die Penetration von radioaktiv markiertem Testosteron durch das Str. corneum menschlicher Haut mittels Diffusionszellen und in vivo miteinander verglichen. Im Diffusionszellversuch wurden Testosteronkonzentrationen von 0,4 und 4 % untersucht. Nach 48 Stunden ergab sich eine durchschnittliche Penetrationsrate von 1,5 % der applizierten Dosis. Bei der In- vivo- Studie wurde der markierte Wirkstoff über einen Zeitraum von 5 Tagen im Urin gemessen. Die Ergebnisse sind der Tab. 2. 1. zu entnehmen.

Tabelle 2. 1.: Maximale Penetration von radioaktiv markiertem Testosteron durch die menschliche Haut (in vivo) nach MARZULLI et al. (1969). Jede Testosteronkonzentration wurde an 6 Personen getestet.

applizierte Menge ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Penetrationsrate (% d. appl. Dosis/ h)
4,5	0,32
40,0	0,19
2000,0	0,01

MARZULLI et al. (1969) fassen zusammen, daß in den In- vivo- Versuchen 13 % des verabreichten Testosterons und in der In- vitro- Studie dagegen weniger als 5 % des markierten Wirkstoffs am Versuchsende nachweisbar waren. Die Ergebnisse beider Versuchsmethoden unterscheiden sich hier deutlich voneinander.

BRONAUGH et al.(1982) untersuchten die perkutane Absorption von Benzoesäure und Acetylsalicylsäure bei Ratten. Sie führten ebenfalls In- vivo- und Diffusionszellversuche durch und erhielten Übereinstimmungen beider Methoden in quanti- und qualitativer Hinsicht. CREASEY et al. (1978) sind der Meinung, daß zur Erlangung objektiv vergleichbarer Ergebnisse bei Untersuchungen am lebenden Organismus und an isolierten Organen unbedingt auf die annähernde Gleichheit der Versuchsbedingungen zu achten ist. Dabei ist weiterhin zu berücksichtigen, daß die Körperstelle, das Alter des Individuums, der Grad der Durchblutung sowie die Schweißabsonderung, einen Einfluß auf die Resorptionsvorgänge der Haut haben (CREASEY et al., 1978).

Diffusionszellen eignen sich für die Untersuchung von lipophilen Substanzen. Für Resorptionsversuche mit Stoffen, die der Biotransformation unterliegen, sind lebende Epidermiszellen erforderlich und Diffusionszellen deshalb ungeeignet (RIVIERE et al., 1986). CARVER et al. (1989) beschäftigten sich mit der Hypothese, daß die Vitalität exzidierte Haut nur einen geringen oder keinen Einfluß auf perkutane Absorptionsmechanismen habe. Sie sind der Meinung, daß diese Vermutung aufgrund des Wissens um die kutane Biotransformation unhaltbar ist.

Ein weiteres Problem bei Diffusionszellversuchen sehen CREASEY et al. (1978) in der Tatsache, daß hier die gesamte Haut einschließlich der Fettschicht verwendet wird, durch die der zu untersuchende Wirkstoff hindurchtreten muß, bis er die Rezeptorflüssigkeit erreicht und dort nachgewiesen werden kann. Ein Vergleich mit Ergebnissen aus In- vivo- Studien wäre nur dann möglich, wenn die Blutzirkulation der Haut in vivo vollkommen ruhen würde. Die Versuchsergebnisse der Autoren belegen diese Aussage.

2. 1. 1. 2. Die isoliert perfundierte Haut

Einen weiteren Schritt zur Annäherung von In- vivo- und In- vitro- Methoden stellt die Entwicklung von Hautperfusionsmodellen mittels isolierter Organe dar. Mit ihrer Hilfe werden genaue Kenntnisse über Biotransformationsvorgänge sowie die Resorption bestimmter Stoffe über die Haut gewonnen.

Die Permeabilität der Schweinehaut ähnelt der der menschlichen Haut am meisten. Aus diesem Grunde eignet sie sich in besonderem Maße zur Testung der Hauttoxizität (BARTEK et al., 1972) oder zur Bestimmung der transdermalen Resorption (KELLNER et al., 1985) für den Menschen.

Um die Eignung der Haut verschiedener Haussäugetiere als Modell für die menschliche Haut zu ermitteln, verglichen MEYER et al. (1978) die Haut dicht behaarter Spezies (Hund und Katze) mit der spärlich behaarter Arten (Hausschwein) in morphologischer und enzymhistochemischer Hinsicht. Sie kamen zu dem Schluß, daß die Haut von Hund und Katze aufgrund abweichender morphologischer und funktioneller Charakteristika nicht als Äquivalent für die menschliche Haut geeignet ist.

Die Untersuchungsergebnisse von BRONAUGH et al. (1982a) bestätigen die morphologische Übereinstimmung der Haut von Mensch und Schwein. Sie ermittelten die in Tab. 2. 2. aufgeführte Dichte sowie den Durchmesser der Haarfollikel mehrerer Spezies als resorptionsbestimmende Faktoren.

Tabelle 2. 2.: Dichte und Größe der Haarfollikel verschiedener Spezies nach BRONAUGH et al. (1982a).

Spezies	Hautregion	Haarfollikel je cm ²	Durchmesser der Follikel in µm
Mensch	Abdomen	11 ± 1	97 ± 3
Schwein	Rücken	11 ± 1	177 ± 4
Ratte	Rücken	298 ± 21	25 ± 1
Maus	Rücken	658 ± 38	26 ± 1

Die Haardichten von Mensch und Schwein gleichen einander und sind mit Abstand geringer als bei den dicht behaarten Labortieren (Ratte und Maus). Die Haarfollikel der untersuchten spärlich behaarten Spezies (Mensch und Schwein) weisen wesentlich größere Durchmesser auf.

Die Haut des Hausschwein besitzt neben der spärlichen Behaarung noch einige andere Merkmale, die mit der Haut des Menschen identisch sind und einen äquivalenten Vergleich erlauben. Hierzu gehören die relativ dicke Epidermis mit der charakteristischen Verankerung in den entsprechenden Papillen der Dermis, ein hoher Anteil an elastischen Fasern in der Dermis, ein ähnlicher Durchblutungsgrad der Haarfollikel, vergleichbare Enzymmuster der Epidermis und teilweise auch der apokrinen Drüsen sowie auffallende Parallelen in der Zusammensetzung des Lipidfilms der Hautoberfläche.

Andererseits sind einige Aspekte zu beachten, in denen sich die Haut des Schweines von der des Menschen unterscheidet. Das sind vor allem stark ausgeprägte subkutane Fetteinlagerungen, die geringere Blutversorgung kutaner Drüsen und die Abwesenheit ekkriner Drüsen in der Schweinehaut sowie voneinander abweichende Enzymreaktionen wie z.B. der alkalischen Phosphatase im Str. basale der Epidermis (MEYER et al., 1978).

CARVER et al. (1989) entwickelten in ihren Laboratorien den isoliert perfundierten Schweinehautlappen zu einem alternativen In-vitro-Modell für die Untersuchung perkutaner Absorptionsprozesse an intakter, lebender Haut.

Als Präparat wurde narkotisierten Schweinen ein 12 x 4 cm großer Hautlappen aus der kaudalen Abdominal- bzw. Inguinalgegend entnommen und die A. epigastrica superficialis caudalis kanüliert. Danach wurde das Präparat in den Perfusionsapparat (siehe Abb. 2.2.) verbracht, der für konstante Temperatur (37°C), Feuchtigkeit (60% - 80%) und Perfusatflußrate sorgte.

Das aus den Venen abfließende Perfusat wurde mittels Trichter in einem Reservoir gesammelt. Als Perfusionsflüssigkeit diente Krebs-Ringer-Bikarbonatpuffer, welcher mit Glukose und Rinderalbumin angereichert war. Dieses Medium wurde mit Carbogen (5% Kohlendioxid in 95% Sauerstoff) begast.

Stündlich wurden arterielle und venöse Proben entnommen und anhand der Glukosenutzung die Lebensfähigkeit des Hautlappens beurteilt. Präparate, die nach 2 Stunden keine Glukosenutzung von 10 mg/h erreichten, sich aufblähten oder extrem tropften, wurden vom Versuch ausgeschlossen.

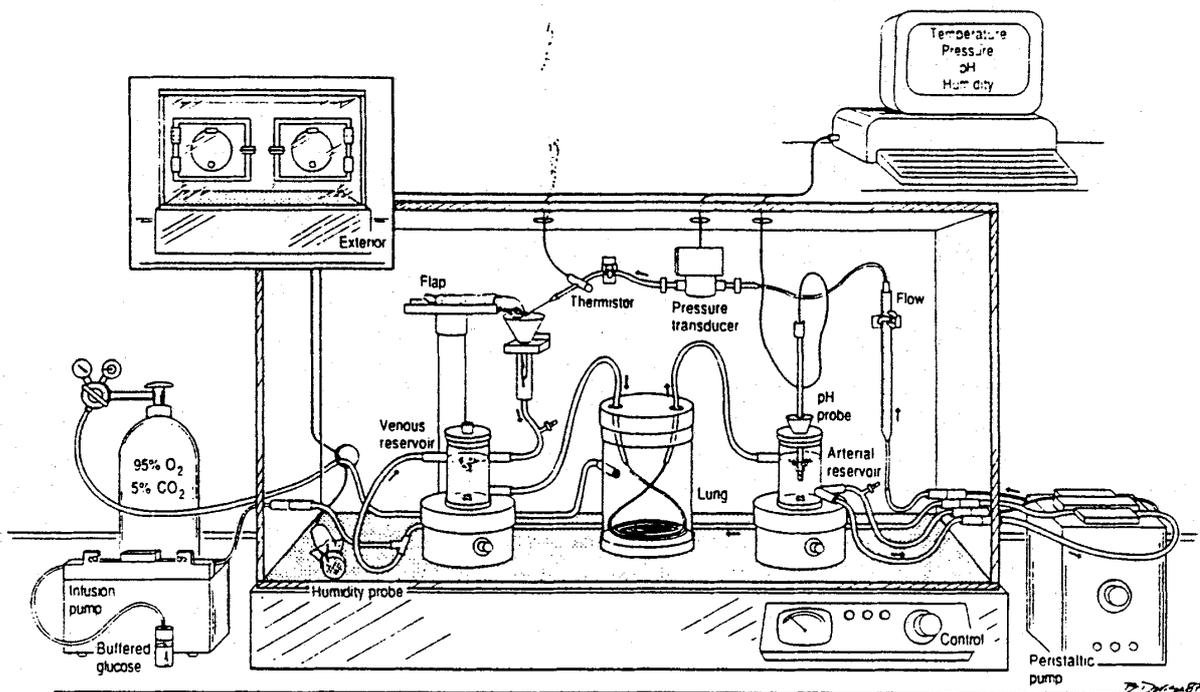


Abb. 2.2.: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Perfusion isolierter Schweinehautlappen mit konstanter Temperatur, Feuchtigkeit, Druck und Flußrate nach CARVER et al. (1989).

Das Modell des isolierten Schweinehautlappens erwies sich als geeignet, die Physiologie der Haut (RIVIERE et al., 1987; CARVER et al., 1989), biochemische und histologische Anzeichen von Hauttoxizität (MONTEIRO- RIVIERE et al., 1987) sowie die Biotransformation von Wirkstoffen während der perkutanen Absorption zu untersuchen (CARVER et al., 1988).

2. 1. 1. 3. Das isoliert perfundierte Kaninchenohr

Das Ohr des Kaninchens findet schon sehr lange Verwendung als isoliert perfundiertes Organ. Bereits 1913 beschreibt RISCHBIETER das isolierte Kaninchenohr als überlebendes Gefäßpräparat zur Prüfung von vasoaktiven Substanzen, speziell Adrenalin und Hypophysin. Dabei ging es vorerst darum, die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus bisher so häufig angewandten Durchströmungen von Kaltblüterorganen auf Säugetierverhältnisse zu prüfen. Die Vorzüge des Kaninchenohrs sieht RISCHBIETER (1913) darin, daß es als Gefäßpräparat vom Warmblüter relativ leicht zu gewinnen und bei Zimmertemperatur nutzbar ist. Das Präparat ist relativ lange Zeit in seiner Empfindlichkeit bezüglich seiner Reaktion auf die erprobten vasoaktiven Substanzen konstant. Zudem bedarf es nur einer einfachen Perfusionsapparatur.

Die Methode RISCHBIETERS (1913) besteht darin, daß das abgetrennte Ohr eines langohrigen Kaninchens mit Stecknadeln auf einem Korkbrett befestigt, jeweils eine Glaskanüle in die Zentralarterie und -vene einführt und das so vorbereitete Organ mit Ringer- Lösung perfundiert wird. Der Perfusionsdruck beträgt 30- 40 cm Wassersäule.

Nach Zugabe des Adrenalis bzw. Hypophysins wird die Tropfenzahl als Kennzahl der Gefäßweite gemessen. Die Gefäßweite wird außerdem wesentlich von der Temperatur der Umgebung und der Ringer- Lösung beeinflusst. Treten an unterschiedlichen Versuchstagen Temperaturschwankungen auf, sollte im Versuchsvorfeld durch Regulieren des Perfusionsdruckes eine konstante Tropfenzahl eingestellt werden..

Nach Auswertung der Einzelergebnisse erhielt RISCHBIETER (1913) für Adrenalin und Hypophysin typische Tropfkurven, die sich deutlich voneinander unterscheiden.

Einen Vorteil der Untersuchung am Kaninchenohr sieht er darin, daß sich nach der Injektion von vasoaktiven Substanzen in wirksamen Konzentrationen die anfängliche Tropfenzahl nach 2- 3 Minuten Wirkzeit wieder einstellt. Ist dies nicht der Fall, wurden Fehler bei der Injektion gemacht oder die Lebensfähigkeit des Gewebes ist stark herabgesetzt (RISCHBIETER, 1913).

Bis heute nehmen Versuche am isoliert perfundierten Kaninchenohr oder auch nur an einem isolierten Segment der Zentralarterie ein weites Feld ein. Größtenteils wird das Kaninchenohr allerdings als Gefäßmodell genutzt. Mit seiner Hilfe wurden Untersuchungen der Wirkung vasokonstriktorischer und -dilatatorischer Stoffe, wie z.B. Acetylcholin und Nikotin (GRAHAM et al., 1971), Kokain (APPERLEY u. HUMPHREY, 1976), Adrenalin, Bradykinin (JUAN u. LEMBECK, 1974), Histamin (ERCAN u. TÜRKER, 1975), PGE und PGF_{2α} (SUHAILA et al., 1972) durchgeführt. MIETKIEWSKI (1956) perfundierte Kaninchenohren, welche vom Blutkreislauf des lebenden Tiers vollständig isoliert, deren Nervenverbindung zum Körper aber noch aufrechterhalten blieb. Er untersuchte ebenfalls die Wirkung von Acetylcholin, Adrenalin und Nikotin auf die Chemorezeptoren der mit Tyrode- Lösung perfundierten Blutgefäße des Kaninchenohrs. Die zugesetzten Untersuchungssubstanzen bewirkten eine reflektorische Senkung des arteriellen Blutdrucks sowie eine Erhöhung der Atemtätigkeit mit unterschiedlich starker Ausprägung. Durchspült man die Ohrgefäße vorher mit Novokain oder einem anderen Lokalanästhetikum, bleibt die reflektorische Änderung trotz Reizung der Chemorezeptoren aus (MIETKIEWSKI, 1956).

Als Perfusionsmedium wurde hauptsächlich eine Krebs-Henseleit-Lösung, eine Holmans- oder Tyrode- Lösung genutzt. Diesen Elektrolyt- Pufferlösungen wurde in einigen Fällen 5% Dextran zugesetzt, um den kolloidosmotischen Gefäßdruck zu erhöhen und somit der Ödembildung vorzubeugen, welche gerade bei azellulären Perfusionsmedien zu befürchten wäre.

Die Perfusionslösungen werden mit einer Mischung aus 5% Kohlendioxid und 95% Sauerstoff begast, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Gewebes zu gewährleisten. Die Durchströmung erfolgt entweder unter konstanten Druckverhältnissen oder einer konstanten Flußrate. Anhand der Änderung der Variablen läßt sich das Ausmaß der Gefäßerweiterung bzw. -erschaffung unter Einfluß des untersuchten Wirkstoffs ermitteln.

Das Modell Kaninchenohr ist auch für Untersuchungen der dermalen Resorption und Biotransformation geeignet (KELLNER et al., 1985). Mehrere Forschergruppen arbeiteten damit, um die Resorptionsfähigkeit der Haut für die unterschiedlichsten Pharmaka zu testen. Aufgrund der Tatsache, daß Kaninchen im Vergleich zu anderen Tierarten eine überdurchschnittlich hohe Hautpermeabilität besitzen, ist es für derartige Untersuchungen geradezu prädestiniert. Die Penetrationsrate der menschlichen Haut ist wesentlich geringer und

ist mit der Schweinehaut am ehesten vergleichbar, was in der Arbeit von BARTEK et al. (1972) deutlich wird.

KELLNER et al. (1985) führte umfangreiche Untersuchungen über die Pharmakokinetik und Biotransformation des Kortikoids Prednikarbat nach topischer Anwendung an Ratten- und Schweinehaut sowie am isolierten Kaninchenohr durch. Der Wirkstoff wurde radioaktiv markiert. Er kanülierte die Ohrarterie des frisch isolierten Kaninchenohrs und verbrachte das Präparat in einen Trichter, wodurch das Perfusat abfließen und in einem gesonderten Gefäß gesammelt werden konnte (siehe Abb. 2.3.). Krebs- Ringer- Bikarbonatpuffer diente als Perfusionsmedium und wurde mit Rinderalbumin und Glukose angereichert sowie mit Carbogen bei einer konstanten Temperatur von 37°C begast. Das Durchflußvolumen betrug 1,2-1,6 ml/ min. Auf die konvexe Seite des Ohrs wurde die prednikarbathaltige Salbe auf einer Fläche von 9 cm² aufgebracht und verrieben. Als Salbengrundlage wurde Vaselinum album verwendet und mit radioaktiv markiertem Prednikarbat versetzt. Die Wirkstoffkonzentration der Salbe betrug 2,5 mg/ g (0,25%).

Die in 6 Stunden durch die Kaninchenhaut penetrierte Menge betrug 3,33 % ± 0,6 % der aufgetragenen Dosis und war damit fast 13mal höher als bei Rattenhaut, deren Penetrationsrate im Durchschnitt 0,26 % ± 0,08 % betrug. Allerdings wurden als In- vitro- Modell der Rattenhaut Diffusionszellen genutzt. Aus diesem Grunde ist die Vergleichbarkeit der Ergebnisse eingeschränkt.

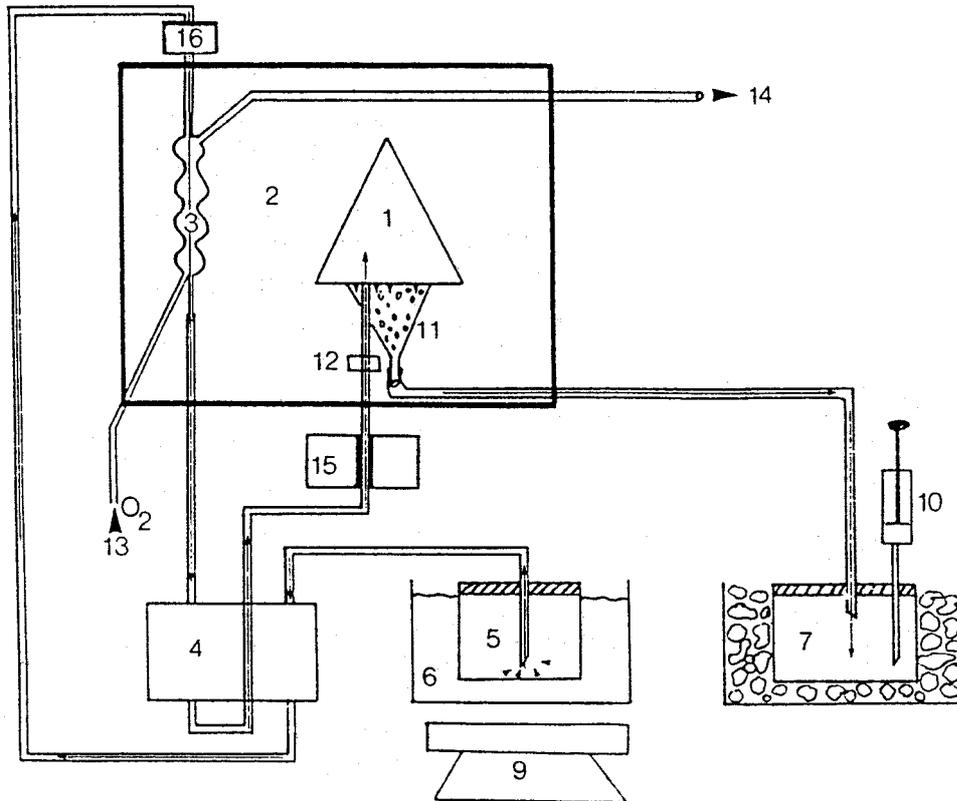


Abb. 2.3.: Perfusionsmodell des isolierten Kaninchenohrs nach KELLNER et al. (1985).

- 1 Hautpräparat; 2 Klimakammer; 3 Oxygenator; 4 Pumpe; 5 Perfusionsflüssigkeit;
 6 Wasserbad (38°C); 7 Perfusat; 8 Eis; 9 Magnetrührer; 10 Probeentnahme;
 11 Trichter; 12 Temperaturfühler; 13 Sauerstoffzufuhr; 14 Entlüftung;
 15 Wasserbad (38°C); 16 Filter.

Da die Hornschicht der Haut für Prednikarbat Reservoir- und Barrierefunktion besitzt, führte die Schädigung des Str. corneum zu einer Erhöhung der durch die Haut penetrierten Wirkstoffmenge, mit tierartlichen Unterschieden. Die Konzentration der in Isopropylmyristat gelösten Wirkstoffe betrug 10 %.

Bei der Ratte ergab sich bei intakter Haut eine Resorptionsrate von 14 %, während durch die mittels Tesafilm- Abrißmethode geschädigte Haut 22 % resorbiert wurden. Aufgrund dieser Ergebnisse nehmen KELLNER et al. (1985) an, daß Prednikarbat auf seinem Weg durch den Organismus von diesem zunehmend verändert wird, wobei eine Vielzahl von Metaboliten entsteht, was die geringe systemische Wirkung des Präparates erklären würde.

Das Modell des isolierten Kaninchenohrs hat sich hinsichtlich der Überlebenszeit und der Simulation natürlicher Verhältnisse als günstig erwiesen. Aufgrund der hohen dermalen Resorption ist dieses Modell besonders für Biotransformationsstudien an der Haut geeignet (KELLNER et al., 1985).

BEHRENDT und KAMPFFMEYER (1987) perfundierten das Kaninchenohr mit einer Tris-Pufferlösung, welcher Dextran, Glukose, Fruktose und Elektrolyte zugesetzt wurden, um die Resorptionsrate von Methylsalizylat und Prokain zu untersuchen.

Während der Perfusion stieg die Flußrate von 90 auf 400 $\mu\text{l}/\text{min}\cdot\text{g}$, der arterielle Perfusionsdruck von 20 auf 50 mmHg und der Sauerstoffverbrauch von 0,2 auf 0,4 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$. Die Endwerte wurden nach dem Erreichen der steady-state- Konzentration erfaßt. Als Vitalitätsparameter wurde die Laktatproduktion gemessen. Sie zeigte bei einer Flußrate von 200- 300 $\mu\text{l}/\text{min}\cdot\text{g}$ keine signifikante Erhöhung und betrug nach der Perfusion 0,15- 0,3 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$.

Innerhalb von 60 Minuten wurden 10% des Prokains bzw. Methylsalizylats resorbiert. Es wurde eine steady-state- Resorptionsrate von 8 $\text{nmol}/\text{min}\cdot\text{cm}^2$ bei einer Flußrate von 250 $\mu\text{l}/\text{min}\cdot\text{g}$ ermittelt. Auch BEHRENDT und KAMPFFMEYER (1987) schreiben, daß höhere Flußraten eine vermehrte Ödembildung zur Folge haben.

2. 2. Das Perfusionsmedium

Der Erfolg des Perfusionsversuches und die Verwertbarkeit der Ergebnisse hängen in hohem Maße von dem verwendeten Perfusionsmedium ab. Wie auch die anderen Versuchsbedingungen, sollte die Zusammensetzung des Perfusionsmediums die physiologischen Verhältnisse so gut wie möglich widerspiegeln, um die Lebens- und Funktionsfähigkeit des isolierten Organs zu gewährleisten und Schlüsse auf In- vivo- Verhältnisse ziehen zu können. Da die Gründe für eine unzulängliche Perfusion sogar hauptsächlich im Perfusionsmedium gesehen werden, sollte sich dessen Wahl an physiologischen Gesichtspunkten und an den Zielen der angestrebten Untersuchung orientieren.

WARD u. BUTTERY (1979) listen in ihrer Arbeit über die pathophysiologische Basis für Tests mit isoliert perfundierten Organen einige Komplikationen auf, die zum verminderten Fluß in den Kapillaren und infolgedessen zur inadäquaten Perfusion führen können.

Bei der Verwendung von zellhaltigen Medien gehören dazu die Freisetzung von Vasokonstriktoren und der daraus folgende erhöhte Kapillarwiderstand, die Bildung von Konglomeraten aus roten und weißen Blutkörperchen wie auch die Lipoprotein-konglomeratbildung besonders bei pH- Wert- und Temperaturschwankungen, welche dann zur Entstehung von Emboli führt. Nicht zuletzt erwähnen die Autoren die Hypothermie, welche ebenfalls einen verminderten Kapillarfluß und damit eine mangelhafte Blutversorgung des Gewebes zur Folge hat. Das Ergebnis einer unzureichenden Durchblutung sind hypoxische Zustände, eine Unterversorgung mit Substraten sowie eine verminderte Energieproduktion.

Bei ausreichender Versorgung des Organs mit Sauerstoff und Substraten wird durch die aerobe Glykolyse Energie in Form von 38 Molekülen ATP aus einem Molekül Glukose gewonnen. In unterversorgten Zellen und Geweben kommt es zur anaeroben Glykolyse bei der aus 1 Molekül Glukose nur noch 2 Moleküle ATP entstehen und zusätzlich 2 Laktatmoleküle anfallen (KARLSON, 1978). Der Energiegewinn ist hier bei gleichem Glukoseverbrauch also deutlich geringer. Diesen Verhältnissen folgt der Ausfall der Na- K- Pumpe mit dem daraus resultierenden verstärkten Wassereinstrom in den intrazellulären Raum (HIERNICKEL, 1983).

Eine weitere Konsequenz hypoxischer Zustände wäre die Blockade der oxidativen Phosphorylierung durch Erhöhung des intrazellulären Ca- Spiegels und das Absinken des extra- und intrazellulären pH- Wertes (HIERNICKEL, 1983). Die genannten Faktoren verursachen weiterhin eine Zerstörung der lysosomalen Membranen, die Freisetzung von Proteasen, Proteindenaturierung und im Endeffekt die Lysis der Zelle und deren Tod (WARD u. BUTTERY, 1979). Die Wahl eines geeigneten Perfusionsmediums kann dazu beitragen, daß die oben beschriebenen Zustände über einen angemessen langen Zeitraum nicht eintreten.

Grundsätzlich kann man Perfusionsmedien in folgende Gruppen einteilen:

- a) einfache Salzlösungen z.B. Krebs- Henseleit Bikarbonatpuffer
- b) halbsynthetische Medien wie physiologischer Puffer mit Albumin oder Dextran und mit Erythrozyten angereichert
- c) Vollblut mit Puffer verdünnt (WARD u. BUTTERY, 1979)

HIERNICKEL (1983) nutzte für die Perfusion menschlicher Haut eine azelluläre Pufferlösung und begründete seine Entscheidung damit, daß die Haut als bradytrophes Gewebe auch ohne die O₂- Transportkapazität der Erythrozyten auskommt und die Gefahr der Hämolyse nicht besteht.

Durch die Verwendung einer azellulären Lösung kann eine stabile Ionenkonzentration bzw. pH- Werte realisiert werden. Veränderungen in der Perfusionsflüssigkeit sind nur auf physiologische bzw. pathophysiologische Stoffwechselprodukte des Präparates zurückzuführen. Außerdem wird aufgrund der niederen Viskosität der Perfusionsflüssigkeit schon bei einem Perfusionsdruck von 5,5 kPa eine ausreichende Durchströmung des Gewebes erreicht, was wiederum die Gefahr der Ödematisierung vermindert.

GILLESPIE und McKNIGHT (1976) untersuchten die negativen Effekte des häufig genutzten Tris- Puffers und fanden heraus, daß dieses Perfusionsmedium eine Hemmung der Reaktion auf adrenerge Stimulation motorischer Nerven in glatter Muskulatur verursacht. Als Testobjekte nutzten sie den M. anococcygeus der Ratte und die Kaninchenohrarterie. Hier ergab sich außerdem eine Potenzierung der Reaktion auf Noradrenalin beim Einsatz von Tris-Puffer sowie eine geringgradige Verminderung des Gefäßtonus, während alle anderen untersuchten Gefäße, darunter auch die Kaninchenaorta, eine Tonuserhöhung aufwiesen.

Eine Reihe von Autoren (LEVIN et al., 1965; LOVE et al., 1970) befürworten die Verwendung von Blut als Perfusionsmedium. LEVIN et al. (1965) unternahmen Versuche an der isolierten Kaninchenniere und stellten einen Vergleich zwischen Blut, gewaschenen Erythrozyten und einem zellfreien Perfusionsmedium anhand von Funktionsparametern der Niere an.

Bei der Verwendung von Blut konnten höhere Flußraten sowie ein Clearance von 50% - 75% der In- vivo- Verhältnisse realisiert werden. Für LEVIN et al. (1965) steht es außer Frage, daß gewaschene Erythrozyten und zellfreie Medien schlechter geeignet sind als Blut.

Auch LOVE et al. (1970) hob die Vorzüge der Perfusion mit zellreichen Medien hervor, welche in einer verminderten Ödembildung bestehen. Die Versuche wurden an der isolierten Hintergliedmaße der Ratte durchgeführt. Das verwendete Perfusat bestand aus 20 % humanem Albumin, 47 % Tyrode-Lösung und 33 % Rattenplasma mit bzw. ohne Blutzellen.

Im Ergebnis dieser Arbeit fand man heraus, daß bei Organen, die mit einer azellulären Perfusionsflüssigkeit durchströmt wurden, höhere Drücke erforderlich waren, die Flußrate nach und nach abnahm sowie Ödeme schon sehr frühzeitig auftraten. Bereits in der ersten Stunde der Perfusion begann die Gewichtszunahme des Organs und erreichte ein Niveau, daß dreimal so hoch wie bei der Perfusion mit zellhaltigen Medien war. Unter Verwendung von zellulären Perfusionsmedien konnte dahingegen mit konstanten Drücken und Flußraten gearbeitet werden.

An der isolierten Hundenniere stellten EICHHOLTZ und VERNEY (1924) bei der Perfusion mit defibriniertem Blut spontan erscheinende Vasotonine fest und schrieben diesem Perfusionsmedium vasokonstriktorische Eigenschaften zu, welche durch den Zusatz von Chloralhydrat oder Hirudin vermieden werden können.

Welchen Einfluß die Wahl eines für die Versuchszwecke geeigneten Perfusionsmediums auf die Versuchsergebnisse hat, machen auch Ausführungen von ZIEGLER und BLATTNER (1967) deutlich. Sie untersuchten die Aufnahme und Freisetzung von Noradrenalin in den Blutgefäßen des isolierten Kaninchenohrs unter aeroben und anaeroben Bedingungen und durchströmten das Organ mit Tyrode- Lösung.

Bei Serumzusatz läßt sich die Aktivität von Noradrenalin um den Faktor 100 steigern. Die Reaktion des Gefäßtonus weist darauf hin, daß sympathische Synapsen der Ohrgefäße unter Serumschutz Noradrenalin speichern und freisetzen können. Unter anaeroben Bedingungen ist

die Gefäßreaktion durch Noradrenalin- Depletion, einen niedrigen Tonus und geringe Empfindlichkeit gegenüber Noradrenalin- Einzelgaben gekennzeichnet. Unter aeroben Verhältnissen wird eine gegenteilige Reaktionsweise beobachtet. Aus den Untersuchungsbefunden wird geschlußfolgert, daß die lokale Anpassung der Durchblutung an die Stoffwechselbedürfnisse der Gewebe indirekt über eine Hemmung bzw. Aktivierung des Noradrenalin- Bindungsmechanismus in den sympathischen Synapsen der Gefäße reguliert wird (ZIEGLER und BLATTNER, 1967).

Eine umfassende Analyse zur Optimierung der Perfusion isolierter Kaninchennieren mit unterschiedlichen Perfusionsmedien führten PACINI und BOCCI (1983) durch. Sie verwendeten Krebs- Henseleit- Bikarbonatpuffer mit und ohne Erythrozytenzusatz, zellfreies heparinisiertes Plasma, heparinisiertes Vollblut, sowie zell- und leukozytenarmes heparinisiertes Blut. Die Verwendung der Niere für die Perfusion gestaltet sich in bezug auf die Vermeidung rascher und irreversibler Beeinträchtigungen des renalen Blutflusses, der glomerulären Filtrationsrate und der renalen Reabsorptionsfähigkeit als sehr schwierig. Bei einigen Versuchsorganen, z. B. der Rattenniere, kann mit Hilfe einer hohen Perfusatflußrate die Abwesenheit von Erythrozyten kompensiert werden, um auf diese Weise eine ausreichende Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten und die Funktionsfähigkeit des Organs zu erhalten. Bei der Kaninchenniere hingegen stellt sich eine Funktionsminderung ein, wobei trotz hoher Perfusatflußrate keine genügende Sauerstoffversorgung gesichert werden konnte. Auch nach Erythrozytenzusatz trat keine Änderung ein, was zu der Annahme führte, daß die Abwesenheit bestimmter Plasmafaktoren dieses Problem verursacht. Bei dem Einsatz von Vollblut mußte die Perfusion jedoch oft aufgrund irreversibler Vasokonstriktion abgebrochen werden. Sichtbare Zeichen der Nierenschädigung sind der verminderte renale Gefäßdruck bei steigenden Flußraten, die sehr geringe Kaliumreabsorption sowie Hämaturie. PACINI und BOCCI (1983) gelangten zu der Überzeugung, daß die Aggregation von Blutplättchen und Leukozyten für die renale Vasokonstriktion in vitro verantwortlich sind.

2. 3. Die Vitalität des isolierten Organs

Viele Forschergruppen beschäftigten sich mit der Optimierung der Versuchsbedingungen bei der Durchführung von Untersuchungen an isoliert perfundierter Haut. Ihre Zielstellung ist die Schließung von Lücken zwischen Versuchen am lebenden Organismus und In- vitro-Modellversuchen (CARVER et al., 1989). So ist es notwendig, der Vitalität des isolierten Organs während des Perfusionsversuches ausreichend Beachtung zu schenken, um so den Erhalt der Lebens- und Funktionsfähigkeit des Präparates zu gewährleisten. Anderenfalls würde der Versuch zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

Grundsätzlich zeigt HILLER (1989) zwei Methoden zur Beurteilung der Vitalität eines biologischen Präparates auf:

- die Überprüfung der Funktion mit Hilfe eines Funktionstests,
- die Verwendung geeigneter Vitalitätsindikatoren.

Bei In- vitro- Untersuchungen anhand von Hautmodellen werden biochemische Parameter gewählt, die für das verwendete isolierte Organ aussagekräftig sind. Im Verlauf des Versuchs wird die Konzentrationsveränderung dieser Parameter im Perfusat registriert und anschließend ausgewertet.

RIVIERE et al. (1987) richteten bei ihren Perfusionsversuchen mit dem isolierten Schweinehautlappen das Hauptaugenmerk auf die biochemischen Vitalitätsparameter. Als Zeichen der Membranintegrität wurde die LDH- Aktivität im Perfusat bestimmt. Eine signifikante Erhöhung dieses intrazellulären Enzyms im Perfusat würde auf die irreversible Schädigung von Zellmembranen hinweisen (MONTEIRO- RIVIERE et al., 1987; RIVIERE et al., 1986). Im Verlauf des Versuchs zeigte sich eine Erhöhung der Laktatkonzentration im Perfusat, welche sich linear zur Glukosenutzung verhält. Dieses Laktat ist als Endprodukt der epidermalen Glykolyse ausschlaggebend für die arterielle pH-Wertabsenkung. Durch die kontinuierliche Zufuhr entsprechender Mengen von Natriumbikarbonat kann der Ansäuerung des Perfusats entgegengewirkt werden (RIVIERE et al., 1986).

RIVIERE et al. (1987) beurteilen einen isolierten Schweinehautlappen als lebensfähig, wenn die Flußrate mehr als 1 ml/ min, der Glukoseverbrauch mindestens 12 mg/ h, die LDH- Aktivität nicht mehr als 30 IU/ l beträgt und keine abweichenden licht- und elektronenmikroskopischen Befunde vorliegen.

BEHRENDT und KAMPPMEYER (1987) perfundierten isolierte Kaninchenohren mit TRIS-Pufferlösung und führten Resorptionsversuche durch. Als Vitalitätsparameter wurden die Laktatproduktion, der Sauerstoffverbrauch sowie die Pyruvatproduktion gemessen. Bei Perfusatflußraten zwischen 200- 250µl/ min·g erfolgte keine wesentliche Steigerung der Laktatproduktion. Der Sauerstoffverbrauch betrug 0,02- 0,04 µmol/ min·g. Überstieg die Flußrate den Wert von 250 µl/ min·g, konnten Gewichtszunahmen des Organs bis zu 13 % festgestellt werden.

In ihren Untersuchungen mit dem isoliert perfundierten Schweinehautlappen bestimmten CARVER et al. (1989) den Glukoseverbrauch als Indikator für die Lebensfähigkeit des Organs. Bei Hautlappen, die nach zweistündiger Perfusion einen Glukoseverbrauch von weniger als 10 mg/ h aufwiesen, wurde der Versuch abgebrochen. Bei den als lebensfähig eingestuften Organen betrug die Glukosenutzung vor der Wirkstoffapplikation $0,68 \pm 0,04$ mg/ g · h. Die nicht lebensfähigen Hautlappen wiesen eine durchschnittliche Glukosenutzung von lediglich $0,2 \pm 0,04$ mg/g · h auf.

Auch HIERNICKEL (1985) legte in seiner Studie über In- vitro- Perfusionen menschlicher Hautlappen, einschließlich Fettgewebe und Lymphknoten, einen Schwerpunkt auf die Untersuchung vitalitätsbestimmender Parameter. Dazu verfolgte er u.a. die Entwicklung des Glukose-, LDH- und Kaliumspiegels während des Versuchszeitraums. Die entnommenen Hautpräparate entstammten der Iliofemoralgegend und wurden mit einer azellulären Lösung in einem offenem Kreislauf perfundiert. Nach 10 bzw. 30 stündiger Versuchsdauer erhielt er die in Tabelle 2. 3.. zusammengefaßten Ergebnisse.

Tabelle 2. 3.: Kalium-, Glukose- und LDH- Konzentrationen im Verlauf der Perfusion menschlicher Haut nach HIERNICKEL (1985).

	0 Std	10 Std	30 Std
Kalium	6,7 mmol/ l	5,2 mmol/ l	5,7 mmol/ l
Glukose	169,0 mg/ dl	150,0 mg/ dl	126,0 mg/ dl
LDH	6,0 U/ l	236,0 U/ l	319,0 U/ l

Nach Versuchsende wurde 1ml Patentblau- Lösung (1:100) in die Hautlappen injiziert, um das Perfusionsgebiet zu kennzeichnen. Ungefähr 90 % des Präparats färbten sich an.

2. 4. Perfusionsdruck und Flußrate

Bei der Entwicklung eines Perfusionsmodells stellt sich auch in Bezug auf den Perfusionsdruck und die Flußrate die Frage nach den günstigeren Perfusionsbedingungen. Grundsätzlich unterscheidet man druckkonstante von flußkonstanten Perfusionen. Im Falle einer Gefäßkontraktion erfolgt bei der druckkonstanten Perfusion eine konstriktorische Flußverminderung aufgrund der einsetzenden Verminderung des Gefäßradius und der Zunahme der Gefäßwanddicke, wobei der Innendruck unverändert bleibt. Bei der flußkonstanten Perfusion kommt es durch die Kontraktion zum Druckanstieg. Im Organismus funktioniert die Blutverteilung der meisten Teilkreisläufe unter druckkonstanten Verhältnissen. Die Lungenstrombahn und der Pfortadereinstrom der Leber bilden mit einer flußkonstanten Durchblutungsregulation die Ausnahme (LUTZ, 1989).

Das verwendete Perfusionsmedium kann den Verlauf des Perfusionsdruckes und der Flußrate beeinflussen. Aus diesem Grunde sollte die Wahl des Perfusionsmediums dem jeweiligen Versuchsziel angepaßt sein. HOCHBERGER und ZWEIFACH (1968) untersuchten den Einfluß verschiedener Perfusionsmedien am isolierten Kaninchenohr. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 2.4. dargestellt. Die Untersuchungen fanden unter konstanten Druckbedingungen statt. Als Parameter für die Flußrate wurden die aus den Venenkathetern abfließenden Tropfen gezählt und die Menge des venösen Abflusses gewogen. Die Organe wurden zunächst mit einer azellulären Lösung perfundiert, die 5% Albumin enthielt. Nach Stabilisierung der Flußrate wurden dieselben Organe mit Kaninchenplasma perfundiert. Sofort erfolgte eine Verminderung des Flusses durch eine Steigerung des Gefäßwiderstandes um durchschnittlich 122 %. Den Grund für diesen Effekt sehen die Autoren darin, daß Kaninchenplasma einen hohen Anteil an Vasotoninen aufweist, was zu einer fortschreitenden Vasokonstriktion der durchströmten Gefäße führt. Durch die Dialyse des Plasmas können diese Substanzen entfernt werden (HOCHBERGER und ZWEIFACH, 1968). In ihren Versuchen stellte sich eine Steigerung des Gefäßwiderstandes um 102 % und die damit verbundene Verminderung der Flußrate ein, wenn die Organe erst mit dialysiertem und anschließend mit nichtdialysiertem Plasma perfundiert wurden.

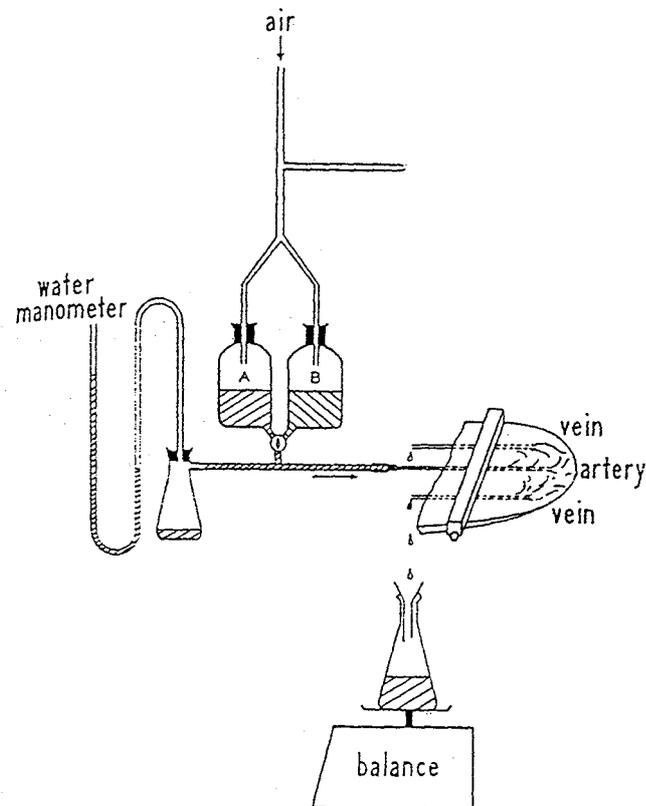


Abb. 2.4.: Schematische Darstellung der Kaninchenohrperfusion unter konstanten Druckbedingungen (HOCHBERGER u. ZWEIFACH, 1968).

GAGOV et al. (1976) kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, daß es bei der Verwendung von Blut als Perfusionmedium für isolierte Kaninchenohren zu einer Steigerung des Gefäßwiderstandes kommt. Die Ursachen sehen sie in der Anreicherung von Katecholaminen im Blut. Bei der Perfusion eines Kaninchenohres mit dem Blut eines Spendertieres wurde eine Erhöhung des Perfusionsdruckes auf 220 mmHg beobachtet. Das entspricht 325 % des Ausgangswertes im Vergleich zu der vorangegangenen Perfusion mit Tyrode- Lösung (GAGOV et al., 1976).

Die vasoaktiven Eigenschaften von Plasmaproteinen wurden von WURZEL et al. (1964) genauer untersucht. Sie sind der Meinung, daß das Plasmaalbumin neben der Gewährleistung des intravasalen kolloidosmotischen Druckes auch die Reaktionsfähigkeit der Gefäßwand auf humorale Stimuli beeinflusst. So wird die Reaktion eines isolierten Aortenabschnitts des Kaninchens auf Noradrenalin schon bei der Anwesenheit sehr geringer Plasmaproteinmengen potenziert. Bereits $\frac{1}{500}$ der normalerweise im Blut vorhandenen Albuminkonzentration ruft eine maximale Potenzierung hervor. WURZEL et al. (1964) schlußfolgerten, daß Noradrenalin unter physiologischen Bedingungen seine Wirkung erst entfalten kann, wenn die Empfindlichkeit der Gefäße gegenüber dem zirkulierenden Noradrenalin durch die Innervation oder humorale Faktoren gegeben ist.

Bei ihren Versuchen mit dem von Ringer- Bikarbonat- Lösung durchströmten isolierten Schweinehautlappen arbeiteten CARVER et al. (1989) mit einer durchschnittlichen Flußrate von 2,5 ml /min, welche sich im Verlauf des 6- 8 stündigen Versuchs langsam um 10- 20 % erhöhte. Bei Resorptionsversuchen mit Koffein wurden nach der Applikation teilweise Steigerungen der Flußrate von über 100 % beobachtet.

BEHRENDT und KAMPFMEYER (1987) registrierten am isoliert perfundierten Kaninchenohr eine schrittweise Steigerung der Flußrate von 90 auf 400 $\mu\text{g}/\text{g} \cdot \text{min}$, wobei der arterielle Perfusionsdruck von 20 auf 50 mmHg stieg. Am isolierten Rinderohr arbeiteten WILSON und GENTRY (1985) ebenfalls mit einem Perfusionsdruck von 25- 40 mmHg. HIERNICKEL (1982) perfundierte menschliche Haut mit Drücken von umgerechnet 34- 40 mmHg und mit Flußraten von 1,5- 2 ml/ min. Bereits RISCHBIETER (1913) arbeitete mit ähnlichen Werten am isolierten Kaninchenohr. Mit Hilfe einer Mariotteschen Flasche wurde ein Perfusionsdruck von 30- 40 mmH₂O erzeugt. Das entspricht einem Druck von ungefähr 22- 30 mmHg. Die Flußrate wurde in Form der Tropfenzahl ermittelt und betrug durchschnittlich 10- 20 Tropfen/ Minute.

Eine Reihe von Arbeitskreisen perfundierte isolierte Kaninchenohren mit azellulären Perfusionsmedien, um die Wirkung vasoaktiver Substanzen zu untersuchen. RANDALL et al. (1992; 1993; 1994) arbeiteten dabei mit konstanten Flußraten von 3,5 ml/ min. Der Initialperfusionsdruck lag zwischen 16 und 35 mmHg. In den Versuchen von GRAHAM und SUHAILA (1971; 1972) stellte sich ein konstanter Perfusionsdruck von 70 mmHg ein. Sie beobachteten Flußraten von 0,5- 2 ml/ min. MacPHERSON et al. (1992) und GILLESPIE et

al. (1976) begannen bei ihren Perfusionsversuchen ebenfalls mit einem Initialperfusionsdruck von 60 mmHg.

2. 5. Struktur und Funktion der Haut

Die Haut (Cutis) bildet die äußere Körperhülle und stellt somit die Kontakt- und Grenzfläche des Organismus zu seiner Umwelt dar. Sie nimmt Schutzfunktionen gegenüber mechanischen, chemischen, thermischen und biologischen Einwirkungen aus der Umwelt wahr. Aufgrund der Möglichkeit zur Schweißsekretion, der Verdunstung von Wasser über die Körperoberfläche und der reichlichen Blutversorgung werden durch Haut und Haarkleid thermoregulatorische Funktionen realisiert. Die starke Vaskularisierung des Organs Haut erlaubt zudem die Speicherung größerer Mengen von Blut. Die Ausscheidung von Abbauprodukten, insbesondere von CO₂, findet ebenfalls über das Integumentum commune statt. Über Schweiß- und Talgdrüsen werden antibakteriell wirksame Schutzstoffe an die Körperoberfläche abgegeben. Diese Tatsache sowie die Anwesenheit von Langerhanszellen verdeutlichen die Eigenschaft der Haut als immunologische Barriere. In der Oberhaut (Epidermis) sind zahlreiche Rezeptoren unterschiedlicher Struktur und Qualität, z.B. für das Druck-, Temperatur- und Schmerzempfinden, lokalisiert (MOSIMANN u. KOHLER, 1990; KOLB, 1991; LIEBICH, 1992).

Schichten der Haut (Cutis, Derma)

Oberhaut (Epidermis)	-Str. corneum -Str. lucidum -Str. granulosum -Str. spinosum -Str. basale
Lederhaut (Dermis, Corium)	-Str. papillare -Str. reticulare
Untershaut (Tela subcutanea)	

Es ist eine strukturelle und funktionelle Vielfalt der Ausbildung dieses Organs in Abhängigkeit von der Rasse, der Tierart, der Körperregion und dem Ernährungszustand erkennbar, obgleich dem Bau der 3 Schichten ein einheitliches Prinzip zugrunde liegt (MONTAGNA, 1967; BRONAUGH u. STEWART, 1985).

2. 5. 1. Oberhaut (Epidermis)

Die Oberhaut besteht aus einem mehrschichtigen, verhornenden Plattenepithel, dessen Dicke tierartliche und regionale Unterschiede aufweist (SCHULZ, 1991) und sich proportional zur mechanischen Beanspruchung sowie chronischer Reizwirkungen (Kälte, Strahlen, Chemikalien) verhält. Des Weiteren existiert ein Zusammenhang zwischen der Behaarung und der Dicke der Epidermis, welche an haarlosen Bezirken dicker ist, weshalb Tiere mit dichter Behaarung z. B. das Schaf in der Regel eine dünnere Epidermis als weniger dicht behaarte Spezies, wie z. B. Rind oder Ziege, besitzen (SMOLLICH u. MICHEL, 1992).

Die Verhornung (Keratinisierung) erfolgt während der Verlagerung der Epithelzellen von der Epithelbasis zur Oberfläche. Sie werden daher als Keratinozyten bezeichnet und verändern in dieser Zeit Funktion und Gestalt. Die iso- bis hochprismatischen Zellen des Str. basale liegen der Basallamina an und sind durch feine Zytoplasmafortsätze (Semidesmosomen) im Str. papillare der Lederhaut verankert. So erfolgt die Ernährung der gefäßlosen Epidermis durch die Dermis. Im Str. basale findet die Erneuerung der Keratinozyten durch mitotische Zellteilung statt, wodurch die an der Oberfläche abgeschilferten Hornzellen kontinuierlich ersetzt werden (LIEBICH, 1992). Es kann das Str. basale als Keim- oder Regenerationsschicht betrachtet werden, wogegen das Str. granulosum, das Str. lucidum und das Str. corneum als eigentliche Schutzschichten wirken und die epidermale Grenzbarriere darstellen.

Die Basalzellen weisen neben Zellorganellen für Syntheseleistungen und für die Reduplikation auch Tonofilamente (Keratinfilamente) auf. Dies sind Proteinfäden, welche vom Zellinneren zu den Desmosomen ziehen (MATOLSKY, 1970). Ihr Hauptbestandteil ist Keratin, ein charakteristisches Strukturprotein, was im Zytoskelett das wichtigste Bauelement der Epidermis darstellt. Es erhöht durch seinen helikalen Aufbau die Stabilität und Elastizität des verhornenden Epithels.

Bereits im Str. spinosum beginnt die Keratinsynthese und verstärkt sich zur Oberfläche hin (LIEBICH, 1992). Durch den höheren Gehalt an Tonofibrillen unterscheiden sich die Basalzellen von den Spinosazellen, welche zur Oberfläche hin immer mehr abflachen (BOWDEN u. CUNLIFFE, 1981). Ihre Stoffwechselaktivität ist bereits reduziert, was durch die Verringerung der Zellorganellen morphologisch sichtbar wird (LEONHARDT, 1985). Im Str. spinosum angelangt, sind die Zellen als polygonale Stachelzellen mit zahlreichen Desmosomen und dazwischenliegenden Interzellularspalten zu charakterisieren. Das darauffolgende Str. granulosum (Körnerschicht) weist auffällig große basophile Keratohyalingranula in größerer Menge auf. Die Keratozyten dieser Schicht werden von Keratohyalingranula, bestehend aus histidinreichem Protein, ausgefüllt. Die Granula liegen den Tonofibrillen eng an und sind so an der Bildung von Keratohyalin- Tonofibrillenkomplexen beteiligt. Außerdem sind in die Körnerzellen ca. 0,2 µm große membranbegrenzte Granula eingelagert. Ihre Inhaltsstoffe werden ausgeschieden und breiten sich im Interzellularraum aus (LIEBICH, 1992). Die Membranlipide bilden gemeinsam mit der Hornschicht eine Barriere, die verhindert, daß Körperflüssigkeit über den Interzellularspalt verlorengeht. Zugleich können hier Lipide von der Oberfläche her eindringen und sich ausbreiten, was z.B. für die Anwendung von Resorptivsalben bedeutsam ist (LEONHARDT, 1985).

Das Str. corneum ist durch abgestorbene, dehydrierte, mehrschichtige und extrem abgeflachte Keratozyten gekennzeichnet, deren Hauptbestandteil die Keratinbündel bilden. Sämtliche anderen Zellbestandteile sind degeneriert. Es läßt sich das dichtere Str. corneum compactum vom lockeren oberflächlichen Str. corneum disjunctum unterscheiden (SPEARMAN, 1970). Durch dieses Gefüge wird eine transepitheliale Stoffpassage in den tieferen Schichten erschwert. Des Weiteren wird die Barrierefunktion des Str. corneum durch die Anwesenheit epithelialer Lipide deutlich (MELNIK, 1990). Der Wassergehalt der lebenden Epidermis beträgt 60- 80 % und sinkt in der Hornschicht bis auf 20 % ab (WARNER et al., 1988). Dieses Gefälle kommt durch die lipidreiche Substanz zwischen den Hornzellen (Korneozyten) zustande und bedingt die Rolle der Hornschicht bei der passiven Lipiddiffusion topisch applizierter Arzneistoffe (MATOLSKY, 1970). Nach dem Abbau der Interzellularsubstanz, z.B. durch saure Hydrolasen, wird die Abschilferung der Korneozyten ermöglicht, welche mit Lipidanteilen zu Schuppen verklumpen und abgestoßen werden (LLOYD u. GARTHWAITE, 1982).

Neben den Keratinozyten sind in der Epidermis auch andere Zellformen mit den unterschiedlichsten Funktionen anzutreffen. Dies sind z. B. Melanozyten, welche als Pigmentzellen Schutzfunktion wahrnehmen, Langhanszellen als Makrophagen mit Abwehrfunktion und Merkel- Zellen als Tastzellen mit Sinnesfunktion (LIEBICH, 1992).

2. 5. 2. Lederhaut (Dermis, Corium)

Die Dermis bildet die bindegewebige Unterlage der Epidermis und wird in zwei unscharf ineinander übergehende Schichten, das Str. papillare und das Str. reticulare, unterteilt. Das Str. papillare bildet regional und tierartlich unterschiedlich ausgeprägte konische Vorwölbungen, die mit kongruenten Vertiefungen der Epidermis alternieren. Das Str. papillare und das Str. reticulare sind durch ein räumliches Netzwerk von kollagenen Fasern miteinander funktionell verbunden. Auf diese Weise wird eine hohe mechanische Stabilität der Lederhaut erreicht. Im Str. papillare sind Blut- und Lymphgefäße, Nerven, Nervenend-körperchen sowie Abwehrzellen anzutreffen. Haarbälge, Talg- und Schweißdrüsen sind ebenfalls hier angesiedelt. Die kräftigen Kollagenfaserbündel des Str. reticulare verlaufen, begleitet von elastischen Fasernetzen, vorwiegend parallel zur Hautoberfläche (SMOLLICH u. MICHEL, 1992; BRONAUGH u. STEWARDT, 1985). Plastizität und Verformbarkeit der Haut werden so gewährleistet.

2. 5. 3. Unterhaut (Tela subcutanea)

Die Tela subcutanea fungiert als Bindeglied zwischen Lederhaut und oberflächlicher Körperfaszie und besteht aus lockerem, unregelmäßig angeordnetem Bindegewebe, wodurch die Haut auf ihrer Unterlage verschieblich ist. Sie ist Träger wichtiger versorgender Einrichtungen, wie Blutgefäßgeflechte, Nerven- und Lymphbahnen. In Abhängigkeit von Tierart, Geschlecht, Körperregion und Ernährungszustand ist die Tela subcutanea unterschiedlich reich an Fettgewebe. Durch die Fetteinlagerungen werden

thermoregulatorische und Energiespeicherfunktionen wahrgenommen. Des Weiteren können an apikalen Organen, wie Extremitäten und Ohr, quergestreifte Muskelzüge Bestandteil der Unterhaut sein (LIEBICH, 1992). An den verschiedenen Körperregionen einer Spezies können die einzelnen Anteile der Unterhaut sehr unterschiedlich ausgeprägt sein. So ist z.B. die Tela subcutanea des Pferdehufes bis auf die Blutgefäße reduziert. Am Wand- und Sohlensegment liegt die Lederhaut dem Periost auf.

2. 6. Morphologie des Kaninchenohrs

2. 6. 1. Anatomie der Ohrmuschel

GERHARD (1909) beschreibt die Ohrmuschel des Kaninchens als ein langes, schallempfangendes, den Kopf überragendes, trichterartiges Organ, das mit stützendem Knorpel und besonderer Muskulatur ausgestattet ist. Sie schließt sich unmittelbar an den knorpeligen Gehörgang an und bildet eine nach außen konkave Fortsetzung der medialen Gehörgangswand. Die konvexe Innenseite der Ohrmuschel ist durchgehend behaart, am dichtesten allerdings am Rande. Die Lateralseite weist, mit Ausnahme von Randbezirken und Spitze, eine recht spärliche Behaarung auf.

Die obere Hälfte der lateralen Ohrfläche bildet die Scapha- ein äußerst dünner Knorpel, der ventral der blattförmigen Verbreiterung der Ohrmuschel als Concha bezeichnet wird. Als Helix spricht man die Leiste an, die den gesamten Ohrrand umzieht. An ihrer Basis wird die Ohrmuschel über eine kurze Strecke durch den Tragus zur Röhre geschlossen. Alle Knorpelteile sind durch Bänder miteinander verbunden (GERHARD, 1909).

Für die hochgradige Beweglichkeit der Ohrmuschel des Kaninchens ist die sehr gut entwickelte Muskulatur verantwortlich, welche durch Differenzierung der Gesichtsmuskulatur entstanden ist. Einige Muskelzüge stehen in Verbindung mit der Schädeloberfläche, andere entspringen oder heften Teile der Ohrmuschel an. Sämtliche Muskeln des Ohrs werden vom N. facialis innerviert (GERHARD, 1909).

2. 6. 2. Blutversorgung des Kaninchenohrs

Die arterielle Blutversorgung des Ohrs wird von Gefäßen realisiert, die der A. carotis externa entspringen, welche neben der A. carotis interna der größere Ast der A. carotis communis ist. Sie spaltet sich in der Gegend des Kieferwinkels unter dem ventralen Teil der Ohrspeicheldrüse in ihre beiden Äste.

Die A. carotis externa gibt die A. temporalis superficialis ab, die hinter dem Kieferwinkel am Kopf aufwärts steigt und mehrere Äste, so die A. auricularis caudalis und die A. auricularis rostralis, abgibt (POPESKO, 1992; GERHARD, 1909).

Von der A. temporalis superficialis zweigt dicht vor der Ohrmuschel noch die A. transversa faciei ab, die für die Blutversorgung des Ohrs von geringerer Bedeutung ist (BERG, 1988).

Die Hauptarterie des Kaninchenohrs ist die A. auricularis caudalis (siehe Abb. 2.5.). Sie gibt zunächst mehrere kleine Äste, wie die A. auricularis profunda und die A. auricularis interna ab, welche die Ohrknorpel und -muskeln versorgen (BERG, 1988). Die A. auricularis caudalis gibt in ihrem weiteren Verlauf einen Ramus intermedius, der ungefähr auf der Mittellinie der Ohrmuschel verläuft, und einen Ramus rostralis ab, welcher sich bis hin zum vorderen Ohrrand erstreckt und dort neben der A. auricularis rostralis in Richtung Ohrspitze zieht (BARONE et al., 1973).

An der Ohrmuschel verlaufen die Venen gemeinsam mit ihren arteriellen Partnern. Die V. auricularis caudalis (siehe Abb. 2.5.) nimmt ihren Ramus intermedius sowie ihren Ramus rostralis in sich auf (SCHEDENOV, 1962) und mündet, genau wie die V. auricularis rostralis, in der V. temporalis superficialis (POPESKO, 1992).

Sie fließt in die V. maxillaris und bildet gemeinsam mit der V. linguofacialis die äußere Drosselvene- V. jugularis externa.

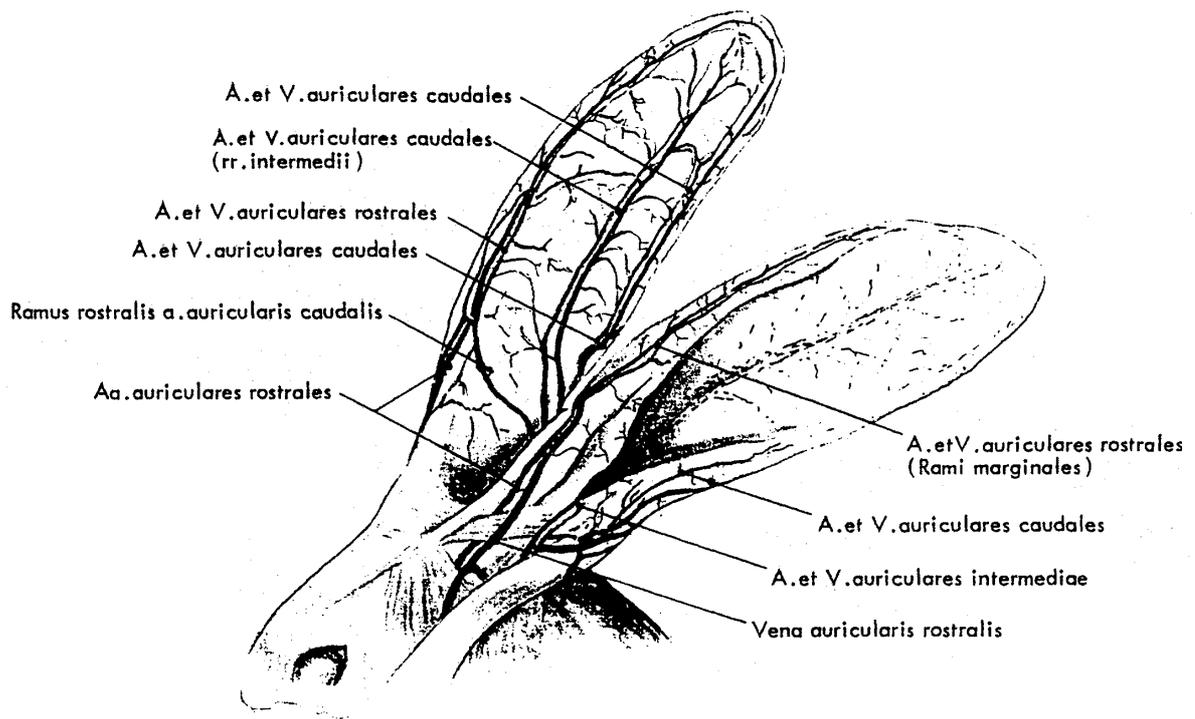


Abb. 2.5: Blutgefäße der Ohrmuschel (BARONE et al., 1973).

2. 6. 3. Bau und Struktur der Haut des Kaninchenohrs

Der histologische Aufbau der Kaninchenhaut gleicht weitgehend der in Abs. 2.5. beschriebenen Histologie der Säugerhaut. Eine Besonderheit der Lederhaut (Dermis, Corium) besteht darin, daß ein Papillarkörper mit seinen typischen Fortsätzen und die Verzahnung mit der Oberhaut (Epidermis) nicht vorhanden ist. An weniger behaarten Regionen, wie Nase und Sohlenballen, sind Andeutungen von Papillen zu erkennen. Die Papillarschicht und damit die Hautoberfläche ist am Kaninchenohr annähernd eben (ANDREEFF, 1926).

Die Epidermis ist in 3 Schichten unterteilt. Bei der mikroskopischen Untersuchung erkennt man die typisch kompakte ineinandergreifende Struktur des Str. corneum, welche aus 6 Zellebenen besteht. Eine einzelne Zelle des Str. corneum hat eine Größe von 0,3 - 0,5 μm , wobei der Interzellularraum 0,16 μm groß ist (CREASEY et al., 1978). Ein Str. lucidum ist in der Kaninchenhaut nicht vorhanden.

Die Dicke der Haut läßt sich nur ungefähr angeben, da sie von Einflußgrößen wie Rasse, Geschlecht, Ernährungszustand und Körperstelle abhängig ist. Am Kanninchenohr beträgt die Hautdicke insgesamt 2 mm, an Rücken, Bauch und Extremitäten 3- 4 mm sowie etwa 0.5 mm in Weichteilbereichen, wie z. B. unter dem Schwanz und zwischen den Schenkeln. Die Dicke der Epidermis ist am Kaninchenohr mit 30- 40 μm angegeben. Im Vergleich dazu mißt sie am Rücken, Bauch und an den Extremitäten etwa 15 μm . An der Ober- und Unterlippe wurden Hautdicken von 20- 25 μm gemessen (ANDREEFF, 1926).

Von CREASEY et al. (1978) wurde die Histologie der lateralen Kaninchenohrfläche eingehend untersucht. Er ermittelte eine Dicke der Epidermis und Dermis von ca. 0,2 mm. Subkutanes Fettgewebe ist nicht vorhanden. Im Vergleich zur medialen konvexen Ohrseite zeigte die Lateralseite bei mikroskopischen Untersuchungen eine Epidermis, die eine dicke Keratinozytenlage besitzt, was eine wesentlich geringere Absorptionsrate aufgetragener Stoffe bedingt (ARENS, 1991).

Die Hauptblutgefäße der Ohrmuschel fanden CREASEY et al. (1978) in den unteren Schichten der Dermis, dem Perichondrium angrenzend. Es waren allerdings auch einige Gefäße in oberflächlicher gelegenen Schichten vorhanden.

Im elektronenmikroskopischen Bild stellt sich die Oberfläche durchgehend schuppig mit Ähnlichkeit zur menschlichen Brusthaut dar. Haarfollikel sind in einem Abstand von ungefähr 2 mm angesiedelt. Die Haardichte auf der konkaven Lateralseite beträgt im Gegensatz zur kaudomedialen Ohrseite nur ein Drittel.

Bei allen Rassen ist die Haut pigmentiert, das gilt ebenfalls für Kaninchen mit weißem Haarkleid. Eine Ausnahme bilden dabei Albinos, welche eine durchgehend weiße Behaarung, rosafarbene Haut und rote Augen besitzen (ANDREEFF, 1926).

2. 7. Untersuchungssubstanz Testosteron

2. 7. 1. Chemie

Testosteron, das wichtigste androgene Hormon, wird in den Leydigischen Zwischenzellen des Hodens gebildet (HESSE, 1947). Geringe Mengen von Androgenen befinden sich darüber hinaus in den Nebennieren und in Ovarien. Die männliche Testosteronsynthese bzw. -sekretion unterliegt einem zirkadianen Rhythmus, der höchste Serumspiegel wird beim Menschen, als tagaktives Lebewesen, am Morgen registriert. Testosteronsekretion und Spermienbildung werden über Hypothalamus und Hypophyse gesteuert, und zwar im Sinne eines negativen Feedback (AMMON, 1992).

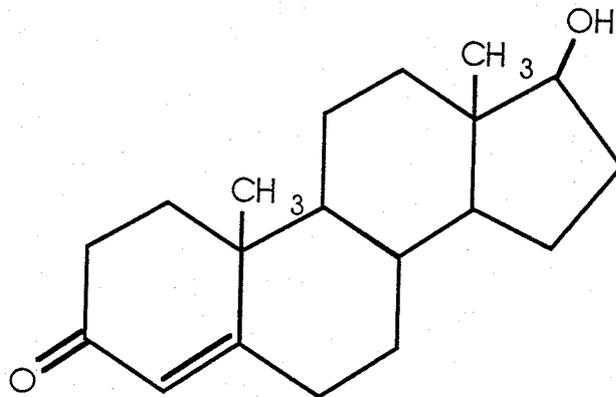


Abb.2.6.: Strukturformel von Testosteron

Androgene sind nach ihrem Grundkörper C₁₉ - Steroide (siehe Abb. 2.6.). Sie sind praktisch wasserunlöslich, meist aber löslich in organischen Lösungsmitteln und empfindlich gegen Luft und Licht (AMMON, 1992).

In den meisten Zielorganen, z.B. in der Prostata, ist die reduzierte Form des Testosterons, das 5 α -Dihydrotestosteron, das biologisch wirksamste Androgen (FORTH et al., 1992).

Zwischen den einzelnen in der Therapie verwendeten Androgenen gibt es eine Reihe pharmokokinetischer und pharmakodynamischer Unterschiede. Die Versuche, nur anabol bzw. nur androgen wirksame Steroide zu synthetisieren, verliefen lange Zeit unbefriedigend. Es gelang lediglich Substanzen herzustellen, bei denen die anabole Wirkung stärker im Vordergrund stand als die androgene, ohne daß letztere vollständig eliminiert werden konnte (AMMON, 1992).

Eine gute orale Wirksamkeit wird durch Alkylierung am C- 17 Atom (Methyltestosteron) erreicht. Durch Veresterung mit längerkettigen Fettsäuren an der Hydroxylgruppe des C-17 Atoms entstehen Depotpräparate wie Testosteronpropionat oder Testosteronenantat. Die Fettsäure des Testosteronenantats enthält 7 Kohlenstoffatome. Die biologische Wirksamkeit wird bei i.m. Injektionen in Abhängigkeit von der Kettenlänge der Fettsäure verlängert (FORTH et al., 1992).

2. 7. 2. Anwendung

Androgene werden in der Humanmedizin zur Substitutionstherapie bei primärer Hodeninsuffizienz, bei männlicher Impotenz, Hodenretention sowie bei Oligospermie eingesetzt. Der therapeutische Einsatz von Androgenen ist nur bei verminderter Hodenfunktion sinnvoll. Eine normale Potenz kann nicht weiter erhöht werden. Wegen der den Geschlechtstrieb steigernden Wirkung bei der Frau werden Androgene gelegentlich zur Behandlung der Frigidität verwendet. Auch Kastrate werden mit Androgenen behandelt, so können Libido und sekundäre Geschlechtsmerkmale erhalten werden. Beim metastasierenden Mammakarzinom werden Androgene wegen ihrer antiöstrogenen Wirkung zur Suppressionstherapie verwendet (AMMON, 1992).

Anabolika werden bei zehrenden Erkrankungen, in der Rekonvaleszenz, nach schweren Operationen, bei verschlechtertem Allgemeinzustand, nach Strahlen- und Zytostatikabehandlung, bei anämischen Zuständen, aplastischer Anämie, chronischer Leber- und Nierenerkrankung sowie bei Muskeldystrophie eingesetzt (AMMON, 1992; OETTEL, 1996). Heute sind Anabolika in Deutschland nur noch für die Indikation der aplastischen Anämie zugelassen. Bei Anämie infolge Niereninsuffizienz hat sich Erythropoetin als hochwirksam erwiesen (FORTH et al., 1992).

In der Veterinärmedizin werden Androgene zur Behandlung des Hypogonadismus und der Oligospermie eingesetzt. Hier macht man sich das "Rebound-Phänomen" zunutze. Eine Testosteronbehandlung über mehrere Wochen hemmt die Spermiogenese bis hin zur Azoospermie. Nach Absetzen der gonadotropinblockierenden Androgenbehandlung kommt es zur überschießenden Gonadotropinsekretion und zu einer Erhöhung der Spermienanzahl. Aus züchterischen Erwägungen sollte diese Behandlung allerdings unterbleiben (FORTH et al., 1992).

Bei Kleintieren wird Testosteron zur Läufigkeitsblockade, zur Mammarkarzinomtherapie und bei bestimmten Gelenkaffektionen eingesetzt (OETTEL, 1982).

2. 7. 3. Pharmakokinetik

Testosteron ist zu 98 % im Blut an ein Transportprotein gebunden (FORTH et al., 1992). Etwa 1,4 % sind frei dialysierbar und nur dieser freie Anteil des Hormons ist biologisch aktiv, wobei weiterhin zu berücksichtigen ist, daß zumindest bei den peripheren androgenen Effekten die eigentliche Wirkform des Testosterons das 5 α -Hydrotestosteron darstellt (OETTEL, 1982). Die Plasmahalbwertszeit beträgt 10 bis 20 Minuten, die biologische Halbwertszeit ist jedoch länger (AMMON, 1992).

Für Steroide kommt möglicherweise hauptsächlich der transfollikuläre und transglanduläre Penetrationsweg in Betracht, da sie die Hornschicht schlecht überwinden können (PFEIFFER et al., 1984). Der transzelluläre Transport von Testosteron erfolgt durch Carrierproteine, welche in die Lipiddoppelschicht der Membranen eingebettet sind. Die Carrier binden die Transportsubstrate und schleusen sie nach dem Prinzip der peristaltischen Pumpe durch die Membran (PFEIFFER et al., 1984).

Der Abbau des Testosterons findet vorwiegend in der Leber statt. Es erfolgt eine Oxydation am Kohlenstoffatom 17 zu mehreren Abbauprodukten, welche man auch als 17-Ketosteroide bezeichnet. Dazu gehören Androsteron, Androstendion, Etiocholanolon und Etiocholandirol. Ein geringer Anteil wird zu Östrogenen aromatisiert. Die Ausscheidung der Metaboliten erfolgt über die Nieren, was eine angemessene Wasserlöslichkeit erfordert. Die meisten Metabolite liegen als Glucuronsäureester oder Schwefelsäureester vor (FORTH et al., 1992).

2. 7. 4. Wirkung

Nach Permeation des Testosterons in die Zelle wird dieses durch die 5 α - Reduktase in 5 α - Dihydrotestosteron (DHT) überführt und an einen zellinternen Rezeptor gebunden. Der DHT-Rezeptorkomplex entfaltet im Zellkern seine Wirkung auf die DNA (AMMON, 1992).

Testosteron hat eine 3fache Wirkung:

- Förderung und Entwicklung der Aufrechterhaltung männlicher sekundärer Geschlechtsmerkmale (androgene Wirkung),
- Förderung des Eiweißauf- und umbaus (anabole Wirkung),
- antagonistische Wirkung zu Östrogenen.

FORTH et al. (1992) unterscheiden die physiologische Wirkung der Androgene in sexualspezifische wie Funktion der Geschlechtsdrüsen, Reifung von Samenzellen, Geschlechtstrieb und Ausbildung männlicher Geschlechtsorgane sowie in sexualunspezifische Wirkungen. Zu den pharmakologisch wichtigsten sexualunspezifischen Wirkungen gehört der eiweißaufbauende Einfluß auf den Stoffwechsel, aber auch die Wirkung auf Knochenreifung und Längenwachstum, Beschaffenheit der Muskulatur und der Haut sowie die Funktion der Talgdrüsen. Die männliche Glatzenbildung wird ebenfalls durch Androgene verursacht, was für die Frau infolge genetischer Disposition und erhöhter Androgenproduktion in Nebenniere und/oder Ovar gleichfalls gelten kann (FORTH et al., 1992).

Durch den Einfluß auf den Proteinstoffwechsel führen Androgene zur Positivierung der Stickstoffbilanz und fördern den Schluß der Epiphysenfugen der langen Knochen, wodurch das Längenwachstum beendet wird. Des weiteren kommt es zu einer mäßigen Natrium-, Kalium-, Calcium-, Sulfat-, Phosphat- und Wasserretention und zur Vergrößerung der Nieren.

Androgene führen zur Senkung des Blutspiegels an Cholesterin, Phospholipiden, Fettsäuren und Triglyzeriden (AMMON, 1992).

Bei der Verabreichung von Testosteron tritt durch die Erhöhung des Blutspiegels gleichzeitig eine Erniedrigung der LH- Werte ein. Das hat eine Verringerung der endogenen

Testosteronproduktion sowie der Spermatogenese zur Folge. Nebenwirkungen stellen sich auch bei einer Langzeitapplikation von 17α - Methyltestosteron ein. Diese Verbindung ist oral wirksam, aber auch hepatotoxisch (OETTEL, 1982; 1996).

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Es wurden Perfusionsversuche an insgesamt 30 Kaninchenohren durchgeführt.

3. 1. Versuchsmaterial

3. 1. 1. Organgewinnung

Es werden langohrige Kaninchen männlichen und weiblichen Geschlechts genutzt, die zwischen 4 und 5 Monaten alt sind. Die Körpermasse der verwendeten Kaninchen beträgt 2,5 bis 3 kg.

Die Tiere werden ad libitum mit Kaninchenmischfutterpellets gefüttert.

Der Tod wird durch Genickschlag herbeigeführt. Es schließt sich sofort die Präparation an.

3. 1. 2. Perfusionsmedium

Für die Versuche am isolierten Kaninchenohr wurde ein eigens hergestelltes erythrozytenhaltiges Perfusionsmedium gewählt, weil der Anspruch an diese Arbeit auch die weitgehende Simulation physiologischer Verhältnisse beinhaltet.

Andererseits sollten auch die Konzentrationen der Inhaltsstoffe konstant sein, um Variablen wie tageszeitliche Schwankungen oder Metaboliten im Vollblut zu minimieren. Das verwendete Perfusionsmedium wurde in zahlreichen Vorversuchen entwickelt und getestet.

Der verwendete Krebs- Henseleit- Bikarbonatpuffer liegt zunächst in pulveriger Form vor und enthält folgende Inhaltsstoffe in Gramm je Liter:

D-Glukose	2,000
Magnesiumsulfat	0,141
Kaliumphosphat	0,160
Kaliumchlorid	0,350
Natriumchlorid	6,900

Der Bikarbonatpuffer wurde speziell für In- vitro- Untersuchungen von der Firma SIGMA entwickelt. Es wird empfohlen, den Puffer mit Natriumbikarbonat zu ergänzen. Die Perfusionsflüssigkeit wurde für jeden Versuch frisch hergestellt und ist folgendermaßen zusammengesetzt:

Krebs-Henseleit Bikarbonatpuffer der Fa. SIGMA	2,4 g
Bovines Albumin der Fa. ROTH	10,0 g
Na-Bikarbonat der Fa. FLUKA	0,8401 g

Diese Komponenten werden in 250 ml Aqua bidest, mit Hilfe eines Magnetrührers gelöst, wodurch eine gelbliche, leicht trübe Lösung entsteht.

Am Tage der Durchführung der Organperfusion wird einem Rind Blut entnommen, welches in 500 ml Blutkonservierungsflaschen der Firma BIOTRANS aufgenommen und mit 100 ml einer Konservierungsflüssigkeit folgender Rezeptur versetzt wird:

Natriumcitrat 2H ₂ O	13,2 g
Citronensäure	4,4 g
Glukose- Monohydrat für Inj.zwecke	14,7 g
Wasser für Inj.zwecke	ad 1000 ml

Das Rinderblut wird danach 10 Minuten bei 3000 U/ min zentrifugiert und der Überstand mit einer Glaspipette abgesaugt. Die verbliebenen Erythrozyten werden mit der vorgefertigten Pufferlösung gemischt und vorsichtig in einen sterilen Glaszylinder mit einem Fassungsvermögen von 1000 ml gegeben, in dem sich bereits 1ml Heparin und 0,16 ml Selen + Vit. E (Fa. ALBRECHT) befinden, um die Bildung von Blutgerinnseln zu vermeiden sowie die Gefäßwände des Organs während der Perfusion zu kräftigen.

Unter Verwendung der 250 ml Puffer und der Erythrozyten von ca. 40 Zentrifugengläsern erhält man ein Perfusatvolumen von 400 ml. Die Menge der zugeführten Erythrozyten ist so gewählt, daß der Hämatokrit 0,25 beträgt.

Die Osmolarität dieses Mediums liegt bei 321 osmol/ kg. Der pH-Wert wird bei 37° C mittels Salzsäure (HCl) bzw. Natriumhydroxid (NaOH) auf 7,45 eingestellt.

3. 2. Verwendete Substanz

Es wird Testoviron- Depot- 250 der Firma SCHERING als Untersuchungssubstanz verwendet. Bei diesem Präparat handelt es sich um eine ölige Lösung. Sie enthält 250 mg Testosteronenantat je Milliliter. Der Wirkstoff Testosteronenantat stellt die Veresterung des Testosterons an der Hydroxylgruppe des C-17 Atoms mit einer länger-kettigen Fettsäure dar (siehe Abb. 3.1.).

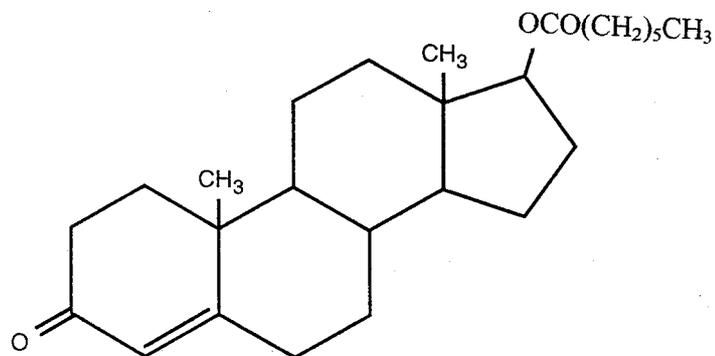


Abb. 3.1.: Strukturformel von Testosteronenantat

Durch die Kombination mit einem Fettsäureester wird eine Erhöhung der Lipophilie und damit die Depotwirkung von Testosteronenantat erreicht (PFEIFFER et al., 1984).

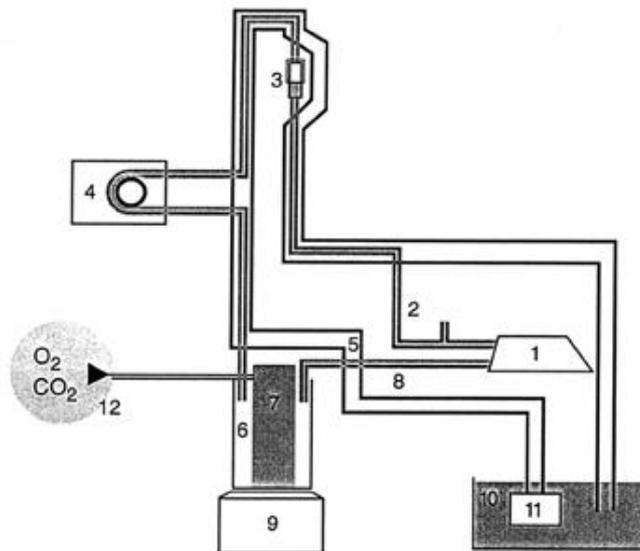
Als Hilfsstoffe sind Benzylbenzoat und Rizinusöl in Testoviron- Depot- 250 enthalten.

Rizinusöl besitzt eine günstige Löslichkeit für Arzneimittel, es verhält sich physiologisch indifferent und ist gut verträglich (VOIGT, 1993). Aufgrund der nicht gegebenen Mischbarkeit der öligen Lösung mit dem Blutserum, ist das Präparat ausschließlich intramuskulär zu injizieren. Ölige Lösungen verbleiben relativ lange am Applikationsort, wodurch der Wirkstoff über einen längeren Zeitraum (Depoteffekt) freigesetzt wird (VOIGT, 1993).

3. 3. Versuchsaufbau

Für die Organperfusion wurde im Verlauf mehrerer Jahre im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FU Berlin ein relativ einfaches Perfusionsmodell mit geschlossenem Kreislauf entwickelt.

In Abbildung 3.2. ist der Versuchsaufbau schematisch dargestellt. Das zylindrische Reservoir für die Perfusionsflüssigkeit (6) steht auf einer regelbaren Heizplatte (9). Im Zentrum des Reservoirs befindet sich ein Glaszylinder mit geringerem Durchmesser, um den ein Silikonschlauch (7) in engen Windungen aufgerollt ist. Seine Enden werden außerhalb des Gefäßes fixiert, wobei ein Ende an eine Carbogen- Druckflasche (12) angeschlossen wird. Der Schlauch besitzt eine Wanddicke von 0,3 mm und einen Innendurchmesser von 2 mm. Aufgrund des engen Lumens und der geringen Wanddicke ist der Silikonschlauch gasdurchlässig und das Perfusat wird gleichmäßig mit Sauerstoff und Kohlendioxid begast. Aus dem Reservoir heraus führt der arterielle Schlauch, welcher über eine Peristaltikschauchpumpe (4) geleitet wird, um die Perfusionsflüssigkeit möglichst schonend zu transportieren.



1 isoliertes Kaninchenohr, 2 arterieller Zufluß mit Überlauf, 3 Tropf, 4 Peristaltikpumpe, 5 Wärmemantel, 6 Perfusionsflüssigkeit, 7 aufgerollter Gasschlauch, 8 venöser Abfluß, 9 regelbare Heizplatte, 10 Wasserbad, 11 Pumpe, 12 Gaszufuhr

Abb. 3.2.: Modell des isoliert perfundierten Kaninchenohrs mit geschlossenem Kreislauf.

In einer Höhe von 90 cm befindet sich ein auswechselbarer Transfusionstropf. Nachdem der arterielle Zuflußschlauch (2) auf die Höhe des Organs geführt wurde, kann mittels zwischengeschaltetem Manometer (Meßbereich 0- 300 mm Hg) der Perfusionsdruck gemessen werden, bevor der Schlauch in eine Braunüle führt, welche in die Hauptarterie des Kaninchenohrs (1) eingebunden ist. Der venöse Abfluß (8) nimmt das Perfusat nach Durchfluß des Organs auf und leitet es in das Reservoir zurück.

Der arterielle Zufluß ist auf der Strecke vom Reservoir zum Organ weitestgehend von einem dickeren Schlauch (5) mit einem Innendurchmesser von 3 cm ummantelt, in dem 37⁰C warmes Wasser zirkuliert, das einen eigenen Kreislauf bildet. Seine beiden Enden führen in ein beheizbares Wasserbad (10) , wobei eines an eine Zirkulationspumpe angeschlossen ist. So kann das erwärmte Wasser bis in Höhe des Tropfes transportiert werden und wird durch das freie Ende wieder in das Wasserbad zurückgeführt.

3. 4. Vorversuche

Um in den Perfusionsversuchen physiologische Bedingungen zu realisieren, wurden einige Vorversuche, meist ohne Kaninchenohr, durchgeführt. Dabei ging es zunächst um technische Probleme bei der Umsetzung der Carbogenbegasung des Perfusats. Die Verwendung azellulärer Medien gestaltet sich in dieser Hinsicht problemlos, da das Perfusat durch einen mit der Gasflasche verbundenen Schlauch direkt begast werden kann (ARENS, 1991). Aufgrund des Eiweißgehalts unseres erythrozytenhaltigen Mediums kam es zum starken Schäumen und zu erheblichen Perfusatverlusten. Diese Methode der Begasung ist hier keinesfalls anwendbar, da die mechanische Belastung für die Erythrozyten viel zu hoch, das Blut am Versuchsende stark hämolytisch und damit die Sauerstofftransportkapazität sehr eingeschränkt ist. Die Begasung mittels eines englumigen und dünnwandigen Silikonschlauchs (siehe Abs. 3. 3.) verursacht dahingegen keine Blasen- oder Schaumbildung. Das Perfusat wird gleichmäßig über eine große Oberfläche und unter Schonung der Erythrozyten mit Sauerstoff und Kohlendioxid versorgt. Nach zweistündiger Perfusion konnte durch die mikroskopische Auswertung von Blutausstrichen festgestellt werden, daß die roten Blutkörperchen nach Ablauf des Versuchs weitestgehend unverändert waren.

Im Rahmen der Vorversuche wurden auch einige Blutgas- und Oximetriebefunde überprüft und durch Veränderungen am Versuchsaufbau und -ablauf auf physiologische Werte eingestellt. In den Perfusionsversuchen betrug der pH- Wert der arteriellen Perfusionsflüssigkeit 7,40- 7,45. Die Proben des venösen Abflusses wiesen pH- Werte von 7,35- 7,41 auf. Der O₂- Partialdruck lag im arteriellen Blut zwischen 10 und 16 kPa und der CO₂- Partialdruck zwischen 4,2 und 5,6 kPa. Im venösen Blut wurde ein durchschnittlicher O₂- Partialdruck von 5,1 kPa sowie CO₂- Partialdrücke zwischen 5,0 und 7,2 kPa gemessen. Die Hämoglobinkonzentration des verwendeten Perfusats lag bei 5,5 mmol/ l. Der Hämatokrit wurde auf 0,25 eingestellt. Mittels der in Abs. 3. 1. 2. beschriebenen Rezeptur des Perfusionsmediums wurde eine Konzentration der Bikarbonationen von 24 mmol/ l realisiert. Erst nach der Überprüfung dieser Parameter in mehreren Blindversuchen, wurde mit den Hauptversuchen begonnen.

Bei der Durchführung von Organperfusionen kommt nun hinzu, daß die Lebensfähigkeit des Kaninchenohrs erhalten und kontrolliert werden muß. Mit Hilfe des Glukoseverbrauchs, der LDH- und Kaliumfreisetzung in das Perfusat ist es möglich, die Vitalität des Organs zu beurteilen. Zu diesem Zwecke wurden im Verlauf des Versuchs Perfusatproben genommen und die angegebenen Parameter bestimmt. Die Befunde dieser biochemischen Untersuchungen sind in Abs. 4. 2. (Vitalitätsparameter) zu finden.

3. 5. Versuchsablauf

3. 5. 1. Präparationstechnik

Zunächst wird die konvexe Seite des Ohrs gründlich aber schonend mit einem AKKUBELLA-Elektrogerät rasiert. Anschließend wird das Ohr möglichst nahe seiner Basis vom Kopf abgesetzt, um eine ausreichende Gefäßstrecke zum Kanülieren zu erhalten. An der Schnittfläche werden im Bereich der Gefäßaustrittsstellen einige Masseligationen gesetzt. So wird die Blutfülle der Zentralgefäße und ein erleichtertes Einführen der Kanülen gewährleistet. Die A. und V. auricularis caudalis verlaufen gemeinsam in Richtung der kaudalen Ohrbasis auf der konvexen Seite. Etwa 2 cm bevor die Gefäße um den kaudalen Ohrrand

ziehen, wird in die Haut ein Fenster mit einer Größe von 1 x 0,5 cm geschnitten und der darunterliegende Gefäßstamm am Ohrgrund von Fettgewebe befreit. Sodann wird in die A. auricularis caudalis eine Braunüle mit einem Durchmesser von 0,8 cm eingeführt, wobei die starre Metallkanüle nur als Einführhilfe für die Braunüle dient und sofort wieder entfernt wird. Zur Perfusion verbleibt also nur die Braunüle im Gefäß. Für die Vene wird in gleicher Weise eine Braunüle mit einem Durchmesser von 1,2 cm verwendet. Die Braunülen werden maximal 2 cm eingeführt.

Sind beide Gefäße kanüliert, erfolgt eine Spülung des Organs mit erwärmtem Perfusat, um das verbliebene Blut zu entfernen. Zur Organvorbereitung werden etwa 10- 15 Minuten benötigt.

3. 5. 2. Perfusionsversuch

Vor Beginn des eigentlichen Perfusionsversuches wird das Perfusat im Reservoir 15 Minuten mit Carbogen unter einem Gasdruck von 2 bar begast, um eine ausreichende Sauerstoffsättigung der Erythrozyten zu gewährleisten. Danach erst wird die Pumpe eingeschaltet und so der Kreislauf in Gang gesetzt. Nach weiteren 5 Minuten wird das Organ in das System verbracht und die Silikonschläuche des arteriellen Zuflusses sowie des venösen Abflusses mit den entsprechenden Braunülen verbunden. Das Organ wird 15 Minuten durchströmt, bevor dem venösen Abfluß die erste Perfusatprobe entnommen wird. Die Entnahme dieser Kontrollprobe wird dem Ausgangszeitpunkt 0 Minuten gleichgesetzt. Im Verlauf der ersten 15 Minuten haben sich eventuelle Schwankungen des Druckes oder der Flußgeschwindigkeit stabilisiert.

Mittels Schablone wird auf der konvexen Ohrseite eine Fläche von 20 cm² gekennzeichnet, auf die eine definierte Wirkstoffmenge appliziert wird. Die Probenentnahme erfolgt im Abstand von 30 Minuten und über einen Zeitraum von 120 Minuten. Um beurteilen zu können, ob die durchgeführten Perfusionsversuche unter physiologischen Bedingungen erfolgten, wird im Anschluß an die Perfusion neben dem Testosterongehalt auch die Glukose-, LDH- und Kaliumkonzentration der Perfusats bestimmt.

Während der gesamten Perfusionszeit werden der Perfusionsdruck sowie die Flußgeschwindigkeit gemessen und registriert.

Nach Beendigung des Perfusionsversuches wird über die Arterienkanüle Methylenblau in das Kaninchenohr injiziert. Auf diese Weise werden die perfundierten Areale farblich sichtbar gemacht. Abschließend wird eine Organprobe für die mikroskopische Untersuchung genommen. Bis zur Aufbereitung wird sie zunächst in BUIN'scher Lösung, später in Formalinlösung konserviert.

3. 6. Nachweismethoden

3. 6. 1. Radioimmunologischer Nachweis von Testosteron

Die durch die Haut penetrierte Testosteronmenge im Serum wird mittels Festphasen Radioimmunoassay (RIA) der Firma DPC Biermann GmbH ermittelt. Dieser Test ermöglicht Wirkstoffbestimmungen nach dem Prinzip des kompetitiven Immunoassays.

Es werden 50 µl des zu testenden Serums sowie 1000 µl ¹²⁵I-markiertes Testosteron in beschichtete Polypropylen- Röhren gegeben. An der Innenwandung dieser Röhren befinden sich hochspezifische Antikörper. Das Testosteron der Serumproben und das ¹²⁵I- markierte Testosteron konkurrieren um die begrenzten Bindungsstellen der Antikörper. Nach dreistündiger Inkubation bei 37^o C ist diese Reaktion abgeschlossen, d. h. es hat sich ein Gleichgewicht eingestellt. Anschließend wird das freie, nicht an die Antikörper gebundene Testosteron zusammen mit der Flüssigkeit abgesaugt. Mit Hilfe eines Gamma- Counters wird die Radioaktivität der leeren Röhren gemessen. Die Höhe dieser Meßwerte steht in umgekehrtem Verhältnis zur Testosteronkonzentration des Serums.

3. 6. 1. 1. Standardreihe

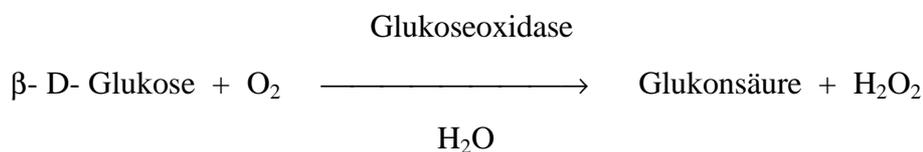
Bei jedem Testansatz wird ebenfalls eine Standardreihe angefertigt. Aus den Meßwerten der Radioaktivität, die sich bei den vorgegebenen Testosteronkonzentrationen von 0, 20, 100, 400, 800 und 1600 ng/ dl ergeben, wird eine Eichkurve erstellt. Anhand dieser Standardreihe lassen sich die Testosteronkonzentrationen der Probeseren, die unter den gleichen Bedingungen behandelt wurden, ermitteln.

Die Standards sowie die Probeseren werden doppelt angesetzt und anschließend der Durchschnitt beider Meßwerte ermittelt.

Liegt die Testosteronkonzentration eines Probeserums über 1600 ng/ dl, wird es mit dem Standard der Konzentration 0 ng/ dl im Verhältnis 1: 2 verdünnt. Die ermittelten Konzentrationswerte dieser Proben werden bei der Auswertung entsprechend ihrer Verdünnungsstufe multipliziert.

3. 6. 2. Glukosebestimmung aus dem Perfusat

Die Bestimmung der Glukosekonzentration in den Perfusatproben erfolgt mit dem BECKMAN Glukose- Analysator 2. Die Meßmethode dieses Gerätes basiert auf dem Verbrauch von Sauerstoff bei der enzymatischen Oxidation der β - D- Glukose in Gegenwart von Glukoseoxidase (siehe Schema). Dieser Sauerstoffverbrauch wird mit Hilfe eines Sauerstoffsensors gemessen.



Sauerstoffabnahme und Glukosekonzentration verhalten sich direkt proportional zueinander. Die Bestimmung wird nicht durch Antikoagulantia oder hämolytische Proben beeinträchtigt.

3. 6. 3. LDH- Bestimmung aus dem Perfusat

Zur Bestimmung der LDH- Aktivität im Perfusat wird der LD opt. Testsatz der Firma RANDOX Laboratories Ltd. verwendet. Die Proben werden entsprechend aufbereitet und anschließend werden die Extinktionswerte im Spektralphotometer gemessen. Anhand der Extinktionswerte wird die LDH- Aktivität ermittelt.

3. 6. 4. Kaliumbestimmung aus dem Perfusat

Die Kaliumkonzentration im Perfusat wird mit dem AVL ISE Analysator der AVL LIST GmbH MEDIZINTECHNIK durchgeführt. Das Meßprinzip beruht auf einer Wechselwirkung der freibeweglichen Ionen einer Probe mit dem aktiven Sensormaterial. Mittels ionenselektiver Elektroden wird die Aktivität des Kaliums gemessen. Sie gilt als Maß für die Fähigkeit der Ionen, mit anderen wechselseitig zu reagieren. Anschließend wird aus dieser Aktivität die Ionenkonzentration errechnet.

4. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

4. 1. Wirkstoffresorption

4. 1. 1. Testosteronkonzentration im Perfusat

Die Menge von 0,2 ml einer öligen Testosteronlösung (50 mg) wurde auf 20 cm² Kaninchenohrhaut der konvexen Seite gleichmäßig aufgetragen. Das verwendete Präparat enthielt Rizinusöl als Lösungsmittel. Die applizierte Wirkstoffkonzentration betrug 2,5 mg/ cm² Hautfläche. Im Abstand von 30 Minuten wurde die Testosteronkonzentration im Perfusat bestimmt. Die resorbierte Wirkstoffmenge wurde, ausgehend von einer Perfusatsmenge von 400 ml, anhand der gemessenen Werte errechnet.

Nach Ablauf der zweistündigen Versuchsdauer liegt die durchschnittliche Menge des resorbierten Testosterons bei 14.395 ng (siehe Tab. 4. 1.). Das entspricht einer Resorptionsrate von 0,0288 % der applizierten Dosis (siehe auch Abb. 4. 1.). Die Einzelwerte der im Perfusat gemessenen Testosteronmenge sind der Tab. 4.1. zu entnehmen und in der Abb. 4. 2. graphisch dargestellt.

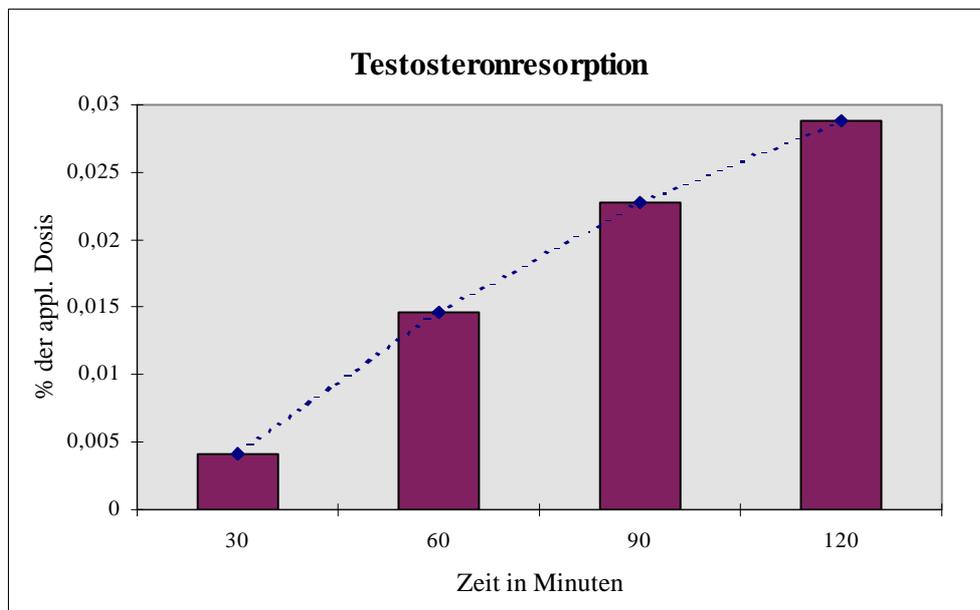


Abb. 4. 1.: Graphische Darstellung der durchschnittlichen Testosteronresorption (in % der applizierten Dosis).

Tab. 4.1.: Darstellung der in 30 minütigen Abständen gemessenen Testosteronmenge im Perfusat (kumulativ). Angegeben werden die Einzelwerte, die durchschnittliche ResResorptionsquote, Median-, Minimal- und Maximalwert (in ng) sowie die Testosteronresorption (in % der applizierten Dosis).

Versuch	Testosteronmenge im Perfusat (in ng)			
	30 Minuten	60 Minuten	90 Minuten	120 Minuten
1	7.680	16.400	26.000	34.560
2	2.780	2.900	3.064	4.720
3	2.080	6.960	12.840	18.120
4	3.484	5.920	6.600	7.040
5	648	5.380	5.828	7.972
6	3.080	14.892	24.156	30.552
7	1.061	21.732	31.452	35.024
8	5.264	24.312	34.288	36.976
9	992	7.008	17.256	22.488
10	1.772	11.976	16.572	19.452
11	1.300	8.484	11.896	15.912
12	972	3.500	6.256	9.380
13	604	2.404	5.228	6.376
14	512	2.736	4.968	7.240
15	928	3.932	6.508	10.492
16	828	2.648	6.376	6.792
17	1.444	5.256	8.068	10.752
18	968	5.824	6.352	8.540
19	1.152	7.728	14.052	16.524
20	2.332	3.488	6.924	10.092
21	2.332	3.232	5.504	8.048
22	1.064	2.872	4.980	6.544
23	1.100	4.360	5.252	8.312
24	2.900	6.568	10.784	15.072
25	1.288	7.420	11.384	14.096
26	1.772	3.260	3.968	5.532
27	2.124	5.800	9.640	12.080
Minimal- und Maximalwert	512- 7680	2404- 24312	3064- 34288	4720- 36976
Medianwert	1.432	5.800	6.924	10.492
Durchschn. Resorption	2.062	7.296	11.340	14.395
Resorption in % der appl. Dosis	0,0041	0,0146	0,0227	0,0288

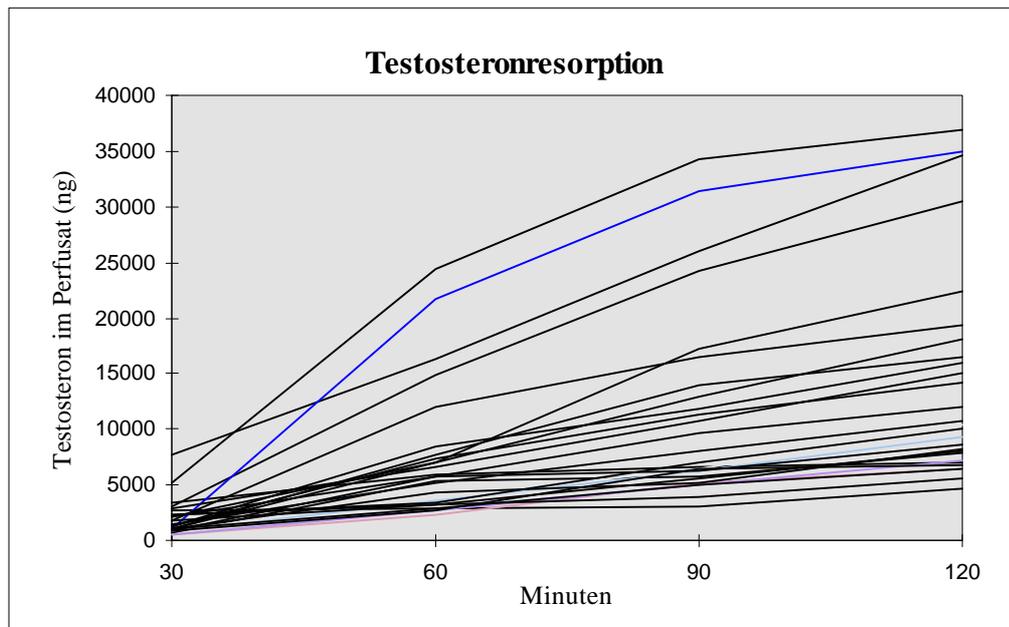


Abb. 4.2.: Einzelkurven der Testosteronresorption (kumulativ) im Verlauf der zweistündigen Versuchszeit (in ng).

4. 1. 2. Statistische Auswertung

Um den Verlauf der Testosteronresorption unabhängig von der absolut resorbierten Wirkstoffmenge zu veranschaulichen, wurde die relative Änderung des Testosteronspiegels ermittelt. Dabei wurde die nach 30 Minuten im Perfusat gemessene Wirkstoffmenge zugrunde gelegt und mit den nach 60, 90 und 120 Minuten ermittelten Werten ins Verhältnis gesetzt. So entstehen 3 Gruppen (60/ 30; 90/ 30 und 120/ 30 Minuten), die getrennt betrachtet werden (Einzelwerte siehe Tab. 4.3.).

In Tabelle 4.2. erfolgt die statistische Auswertung und in Abb. 4.3. die graphische Darstellung der relativen Änderung der Testosteronkonzentration. Die in Abb. 4.3. verwendeten Boxen kennzeichnen den Bereich, in dem sich die mittleren 50 % der Werte befinden. Die untere Begrenzung der Box entspricht dabei dem 0.25- Quartil und die obere Begrenzung entspricht dem 0.75- Quartil, in Tab. 4.2. als $X(.25)$ und $X(.75)$ beschrieben. Die Linie, welche die Box teilt, stellt den Medianwert dar. Die Werte, die sich in einem Bereich bis zu maximal 1,5facher Boxlänge befinden, sind gestrichelt abgebildet. Als Sternchen sind die außerhalb des eben beschriebenen Intervalls liegenden Werte dargestellt. Die Standardabweichung wird in Tab. 4.2. unter $S(X)$ angegeben.

Tab. 4.2.: Statistische Auswertung der relativen Änderung der Testosteronkonzentration im Perfusat

Min.	N(X)	MIN(X)	X(.25)	Median	X(.75)	MAX(X)	X	SD
60/30	27	1.04	2.44	3.96	5.76	8.30	4.12	1.96
90/30	27	1.10	4.54	6.51	8.84	17.40	6.63	3.47
120/30	27	1.70	5.69	8.28	10.98	22.67	8.67	4.44

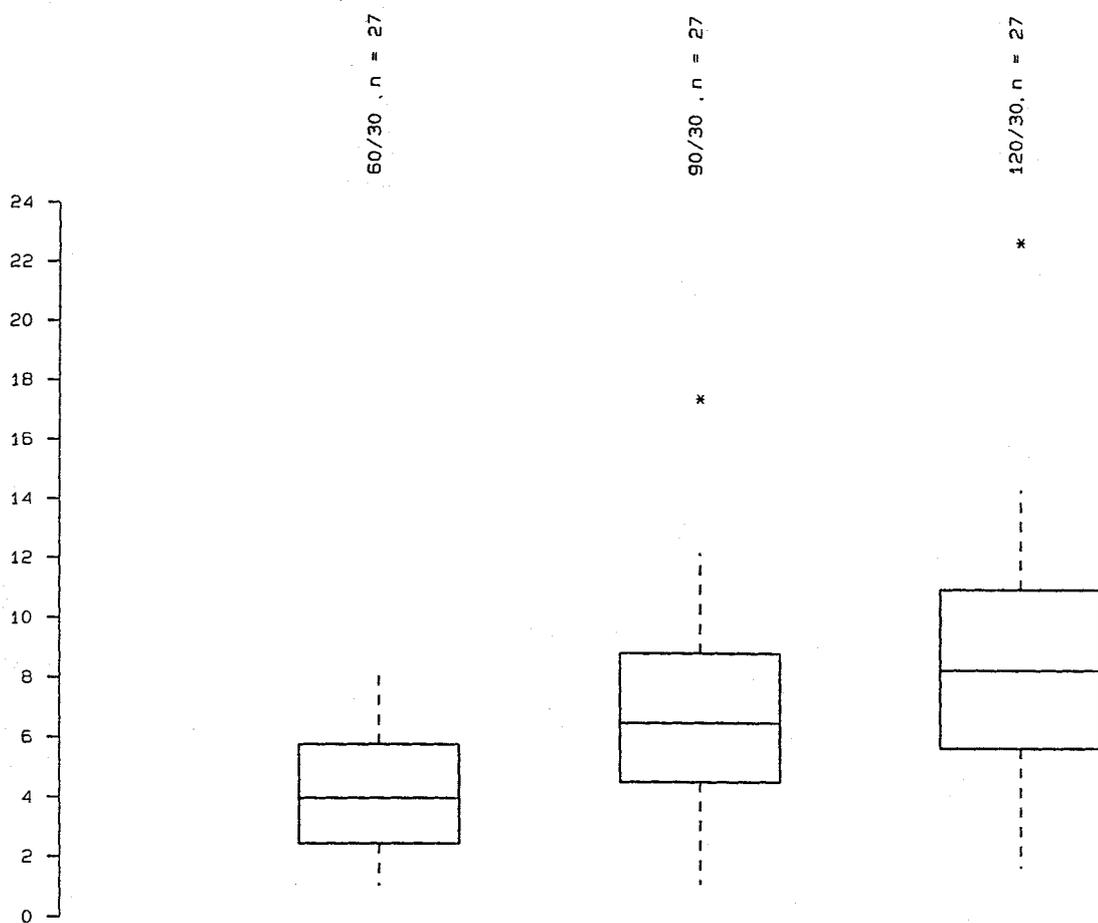


Abb. 4.3.: Darstellung der relativen Änderung der Testosteronkonzentration im Perfusat. An der linken Skala ist der Steigerungsfaktor im Verhältnis zum 30 Minuten-Wert abgetragen.

Tab. 4.3.: Einzelwerte der relativen Änderung der Testosteronkonzentration im Perfusat. Angegeben wird der Steigerungsfaktor im Verhältnis zu dem nach 30 Minuten gemessenen Wert.

Versuch	relative Änderung der Testosteronkonzentration Steigerungsfaktor zum 30 Minuten- Wert		
	60/ 30 Minuten	90/ 30 Minuten	120/ 30 Minuten
1	2,14	3,39	4,50
2	1,04	1,10	1,70
3	3,35	6,17	8,71
4	1,70	1,89	2,02
5	8,30	8,99	12,30
6	4,84	7,84	9,92
7	5,14	7,44	8,28
8	4,62	6,51	7,02
9	7,06	17,40	22,67
10	6,76	9,35	10,98
11	6,53	9,15	12,24
12	3,60	6,44	9,65
13	3,98	8,66	10,56
14	5,34	9,70	14,14
15	4,24	7,01	11,31
16	3,20	7,70	8,20
17	3,64	5,59	7,45
18	6,02	6,56	8,82
19	6,71	12,20	14,34
20	2,44	4,84	7,05
21	1,39	2,36	3,45
22	2,70	4,68	6,15
23	3,96	4,78	7,56
24	2,27	3,72	5,20
25	5,76	8,84	10,94
26	1,84	2,24	3,12
27	2,73	4,54	5,69

4. 2. Vitalitätsparameter

4. 2. 1. Glukoseverbrauch aus dem Perfusat

Als ausschlaggebender Vitalitätsparameter wurde der Verbrauch von Glukose als Energielieferant ermittelt. Dieser Wert ermöglicht die Beurteilung der Lebensfähigkeit des isolierten Organs.

Zu Beginn und nach Ablauf der Perfusionszeit wurde die Glukosekonzentration im Perfusat bestimmt. Aus der Differenz dieser Konzentrationen läßt sich der Verbrauch des Organs ermitteln.

Während einer Perfusionszeit von 120 Minuten beträgt der durchschnittliche Glukoseverbrauch der Kaninchenohren 32,5 mg/ h (siehe Tab. 4.4.). Dabei sinkt der gemessene Glukoseverbrauch bei keinem der Versuche unter 13,5 mg/ h. Der Maximalwert liegt bei 72 mg/ h. Die Einzelwerte sind in Abb. 4.4. dargestellt.

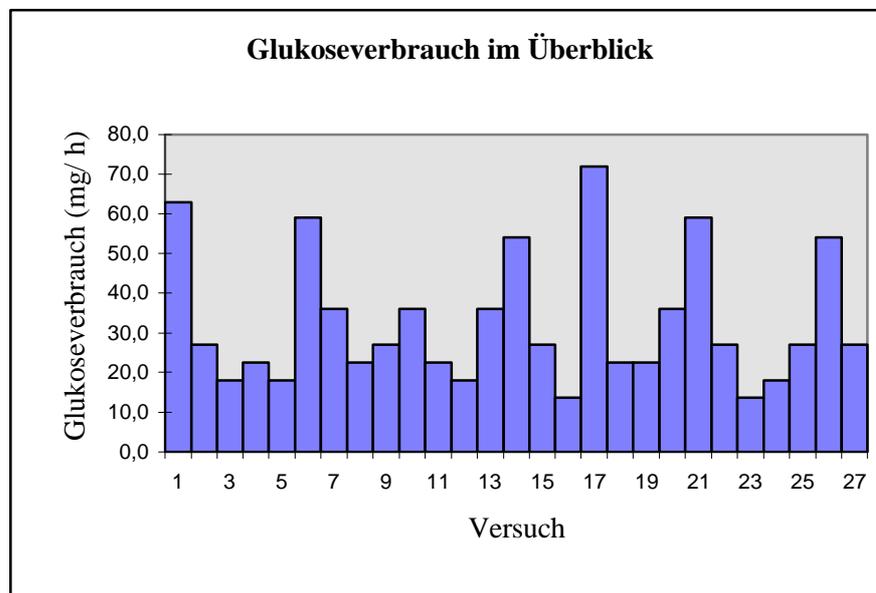


Abb. 4.4.: Darstellung des Glukoseverbrauchs der Organe in allen Versuchen, gemessen im Perfusat (in mg/ h).

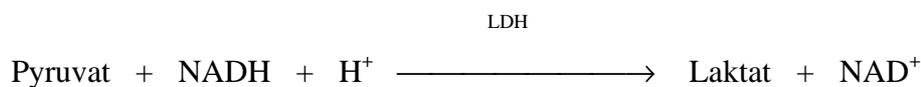
Tab.4.4.: Einzelwerte, Schwankungsbreite, Median- und Durchschnittswert des Glukoseverbrauchs durch das perfundierte Kaninchenohr nach 120 minütiger Perfusion (in mg/ h).

Versuch	Verbrauch in mg/ h
1	63,0
2	27,0
3	18,0
4	22,5
5	18,0
6	59,0
7	36,0
8	22,5
9	27,0
10	36,0
11	22,5
12	18,0
13	36,0
14	54,0
15	27,0
16	13,5
17	72,0
18	22,5
19	22,5
20	36,0
21	59,0
22	27,0
23	13,5
24	18,0
25	27,0
26	54,0
27	27,0
Minimal- und Maximalwert	13,5 - 72
Medianwert	27
Durchschnittlicher Glukoseverbrauch	32.5

4. 2. 2. LDH- Aktivität im Perfusat

Die Laktatdehydrogenase ist ein intrazelluläres Enzym. Sie kann als Indikator für die Integrität der Zellmembranen betrachtet werden. Wird eine erhöhte LDH- Aktivität im Perfusat gemessen, deutet das auf die Schädigung von Zellmembranen hin (ARENS, 1991).

Unter dem Einfluß der Laktatdehydrogenase wird Pyruvat zu Laktat reduziert (siehe Schema). Dabei wird $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ oxidiert.



Die durchschnittlich gemessene LDH- Freisetzung während des 120 minütigen Perfusionszeitraumes liegt bei 18,7 U/l (siehe Tab. 4.5.). Die Werte der einzelnen Versuche bewegen sich zwischen 3 und 36 U/l und sind in Abb. 4.5. dargestellt.

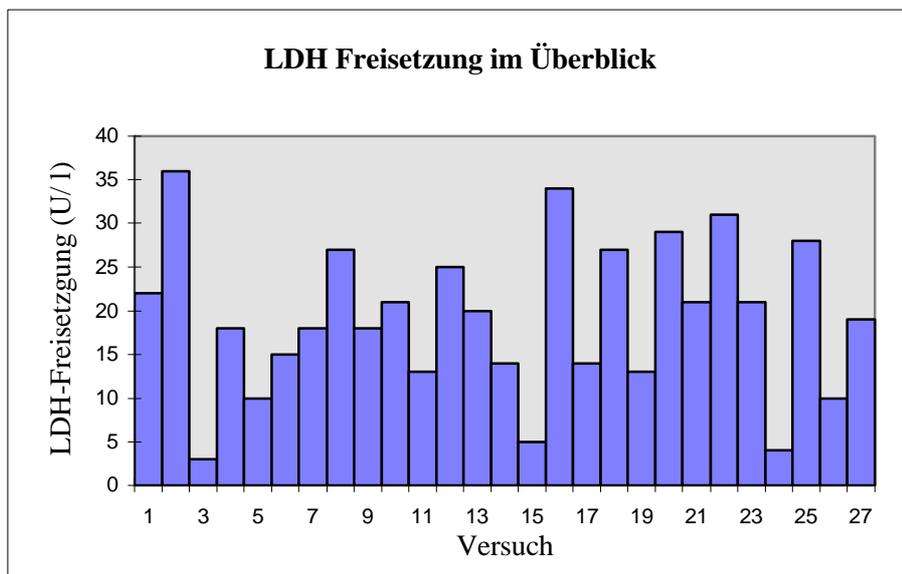


Abb. 4.5.: Darstellung der LDH- Freisetzung der Organe in allen Versuchen, gemessen im Perfusat (in U/l).

Tab.4.5.: Einzelwerte, Schwankungsbreite, Median- und Durchschnittswert der LDH- Freisetzung in das Perfusat nach 120 Minuten (in U/ l).

Versuch	LDH- Freisetzung in U/ l
1	22,0
2	36,0
3	3,0
4	18,0
5	10,0
6	15,0
7	18,0
8	27,0
9	18,0
10	21,0
11	13,0
12	25,0
13	20,0
14	14,0
15	5,0
16	34,0
17	14,0
18	27,0
19	13,0
20	29,0
21	21,0
22	31,0
23	21,0
24	4,0
25	28,0
26	10,0
27	19,0
Minimal- und Maximalwert	3,0-36,0
Medianwert	19,0
Durchschnittliche LDH- Freisetzung	18,7

4. 2. 3. Kaliumfreisetzung in das Perfusat

Die Konzentration des Elektrolyts Kalium, welches unter physiologischen Bedingungen intrazellulär in hohen Konzentrationen vorliegt, wird ebenfalls als Parameter für den einwandfreien Zustand der Zellen herangezogen. Einer erhöhten Kaliumkonzentration im Perfusat geht eine Schädigung von Zellmembranen und der damit verbundene Kaliumausstrom voraus.

Bei den durchgeführten Versuchen beträgt die durchschnittliche Kaliumfreisetzung 0,156 mmol/ l während einer Perfusionszeit von 120 Minuten (siehe Tab. 4.6.). Der Minimalwert beträgt 0,015 mmol/ l und der Maximalwert liegt bei 0,5 mmol/ l. Die Einzelwerte sind in Abb. 4.6. dargestellt.

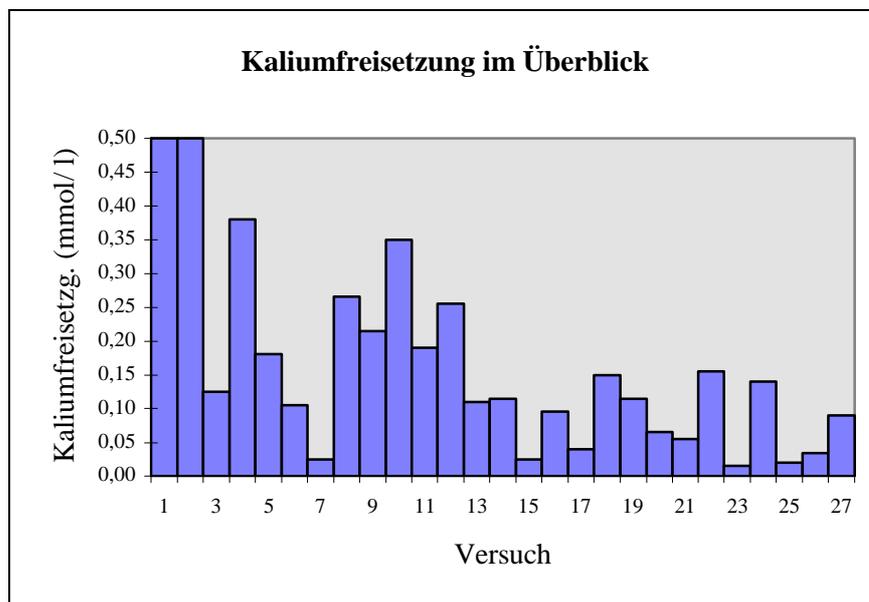


Abb. 4.6.: Darstellung der Kaliumfreisetzung der Organe in allen Versuchen, gemessen im Perfusat (in mmol/ l).

Tab.4.6.: Einzelwerte, Schwankungsbreite, Median- und Durchschnittswert der Kaliumfreisetzung in das Perfusat nach 120 Minuten (in mmol/ l).

Versuch	Kaliumfreisetzung in mmol / l
1	0,500
2	0,500
3	0,125
4	0,380
5	0,180
6	0,105
7	0,025
8	0,265
9	0,215
10	0,350
11	0,190
12	0,255
13	0,110
14	0,115
15	0,025
16	0,095
17	0,040
18	0,150
19	0,115
20	0,065
21	0,055
22	0,155
23	0,015
24	0,140
25	0,020
26	0,035
27	0,090
Minimal- und Maximalwert	0,015 - 0,5
Medianwert	0,115
Durchschnittliche Kaliumfreisetzung	0,156

4. 3. Ergänzende Untersuchungen

4. 3. 1. Perfusionsdruck und Flußrate

Die Perfusionsversuche fanden unter flußkonstanten Bedingungen statt. Der arterielle Perfusionsdruck wurde alle 15 Minuten gemessen. Das Meßgerät befindet sich direkt vor dem arteriellen Zufluß in das Organ. Der gemessene Perfusionsdruck liegt im Durchschnitt bei 36,1 mmHg und bewegt sich dabei zwischen 22 und 55 mmHg (siehe Tab. 4.7.).

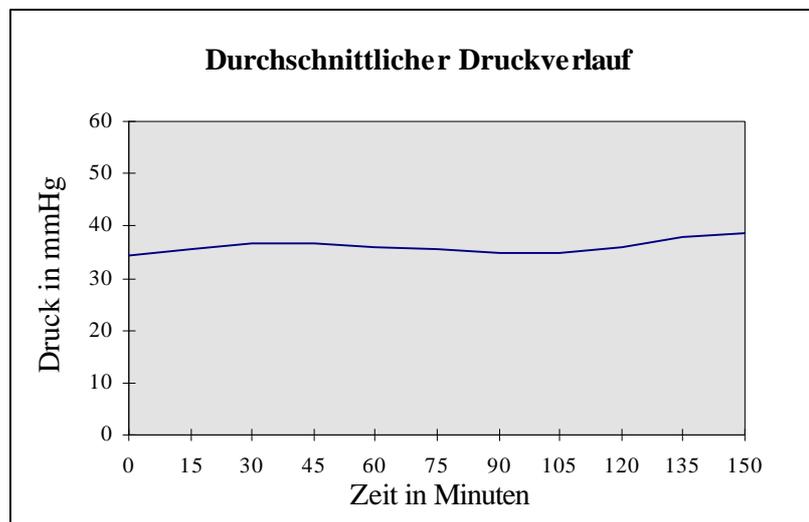


Abb. 4.7.: Darstellung des durchschnittlichen Perfusionsdruckverlaufes (in mmHg).

Die Perfusatflußrate wurde während der Perfusionsversuche in 15 minütigen Abständen gemessen. Sie lag bei 2,5 ml/ min.

Tabelle 4.7.: Einzelwerte, Schwankungsbreite, Median- und Durchschnittswerte
 Einzelwerte, Schwankungsbreite, Median- und Durchschnittswerte
 des Perfusionsdruckverlaufs, gemessen in 15-minütigen Abständen
 (in mmHg).

Versuch	Perfusionszeit in Minuten										
	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
1	42	42	43	40	35	35	35	36	38	40	42
2	39	40	49	48	47	47	46	48	51	52	52
3	31	33	41	41	38	33	28	28	27	27	27
4	42	44	47	47	46	42	39	39	39	40	41
5	35	29	28	28	29	29	32	35	40	50	52
6	44	40	35	33	33	33	33	33	33	34	36
7	43	45	48	48	47	45	43	43	46	55	55
8	30	33	33	32	34	38	35	35	37	44	46
9	41	41	41	42	40	41	44	50	54	55	52
10	32	34	35	34	31	38	40	28	29	29	29
11	25	34	36	34	30	30	30	30	30	37	40
12	41	41	44	41	39	37	37	37	43	46	47
13	47	45	45	45	40	38	36	36	38	42	43
14	29	35	40	40	40	35	31	29	29	29	29
15	33	35	38	41	41	38	37	35	35	35	35
16	37	38	48	49	47	45	45	45	45	45	47
17	33	32	29	29	28	28	28	28	28	28	28
18	28	28	30	32	31	30	30	30	30	30	30
19	23	26	24	22	26	34	35	35	35	35	36
20	29	29	28	34	37	36	35	35	35	36	36
21	40	40	40	37	36	32	32	32	35	37	39
22	32	31	30	30	26	26	26	27	27	28	28
23	25	27	28	34	34	34	34	35	35	36	37
24	38	39	41	41	41	42	42	43	45	45	45
25	33	33	30	27	28	27	27	27	27	27	28
26	29	31	32	32	30	30	30	30	30	31	31
27	28	30	32	32	33	32	31	31	31	31	31
Minimalwert	23	26	24	22	26	26	26	26	27	27	27
Maximalwert	47	45	49	49	47	47	46	46	50	54	55
Medianwert	33	34	36	34	35	35	35	35	35	36	37
Durchsch. Perfusionsdruck	34,4	35,4	36,9	36,8	35,8	35,4	34,8	34,8	36,0	37,9	38,6

4. 3. 2. Gewichtszunahme des Organs

Bei der Perfusion isolierter Organe kann es aufgrund der Schädigung von Gefäßwänden zur Ödematisierung des umliegenden Gewebes kommen. Als meßbares Kennzeichen dieser extravasalen Flüssigkeitsansammlung wurde die Gewichtszunahme des Organs nach der Perfusion ermittelt.

Nach einer Versuchszeit von 120 Minuten ist bei den perfundierten Kaninchenohren ein durchschnittlicher Gewichtszuwachs von 4,6 % zu verzeichnen (siehe Tab. 4.8.). Die gemessene Werte schwanken zwischen 0 und 9,1 %. Sie sind in Abb. 4.8. graphisch dargestellt.

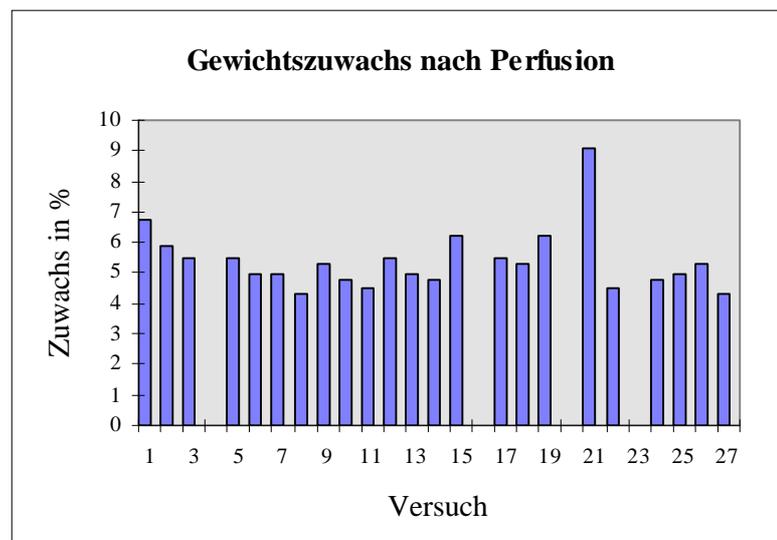


Abb. 4.8.: Darstellung der Gewichtszunahme der Organe in allen Versuchen (in %).

Tab.4.8.: Einzelwerte, Schwankungsbreite, Median- und Durchschnittswert der Gewichtszunahme des Organs nach 120 minütiger Perfusion (in %).

Versuch	Zunahme in %
1	6,7
2	5,9
3	5,5
4	0,0
5	5,5
6	5,0
7	5,0
8	4,3
9	5,3
10	4,8
11	4,5
12	5,5
13	5,0
14	4,8
15	6,2
16	0,0
17	5,5
18	5,3
19	6,2
20	0,0
21	9,1
22	4,5
23	0,0
24	4,8
25	5,0
26	5,3
27	4,3
Minimal- und Maximalwert	0,0 - 9,1
Medianwert	5,0
Durchschnittliche Gewichtszunahme	4,6

4. 3. 3. Mikroskopische Untersuchung

Bei den mikroskopischen Untersuchungen wurden die perfundierten, mit den jeweils nicht perfundierten Kontrollohren verglichen. Es sind keine Zell- oder Gewebeveränderungen sichtbar (siehe auch Abb. 4.11. u. 4.12.). Selten sind vereinzelte Makrophagen oder Granulozyten im mikroskopischen Bild zu sehen. An einigen Stellen kommt es zu Ablösungserscheinungen zwischen Haut und Knorpel, was bei den Kontrollohren gleichermaßen vorkommt und als eine Folge der Präparataufbereitung zu verstehen ist. Der Bau der Haut am Kaninchenohr ist im mikroskopischen Bild, wie in Abs. 2.6.3. beschrieben, erkennbar. Die Haare sind in Gruppen angeordnet. Zu einer Gruppe gehört ein Grannen- oder Stammhaar sowie 3- 5 etwas dünnere und hellere Woll- bzw. Nebenhaare, die um das Stammhaar herum angeordnet sind. Abweichungen von diesem Bild kommen vor. So sind auch Gruppen von Wollhaaren ohne Grannenhaar oder einzelne Wollhaare zu finden. Die Dichte der Haare beträgt an der kaudomedialen (konvexen) Kaninchenohrseite, welche als Applikationsfläche in den Resorptionsversuchen genutzt wird, im Durchschnitt $950/ \text{cm}^2$. In den Randbezirken und an der rostromedialen Ohrseite ist die Behaarung wesentlich dichter. Am Ohrrand liegt die durchschnittliche Dichte bei $1240 \text{ Haaren}/ \text{cm}^2$.

In unmittelbarer Nähe der Haarfollikel befinden sich die mit mäßiger Häufigkeit vorkommenden Talgdrüsen. Meist sind es verzweigte alveoläre Drüsen mit einem mehrschichtigen Drüsenepithel, die um die Haarbälge herum angeordnet sind. Der Ausführungsgang ist kurz und mündet im Haarfollikel. Die Haarbälge und Talgdrüsen reichen weit in die Tela subcutanea hinein. Auffällig ist, daß an der konkaven Ohrseite die Haare in wesentlich geringerer Anzahl vorhanden, aber kräftiger sind und kaum Talgdrüsen vorkommen (siehe Abb. 4.10.).

In der Haut des Kaninchenohrs konnten keine Schweißdrüsen gefunden werden.

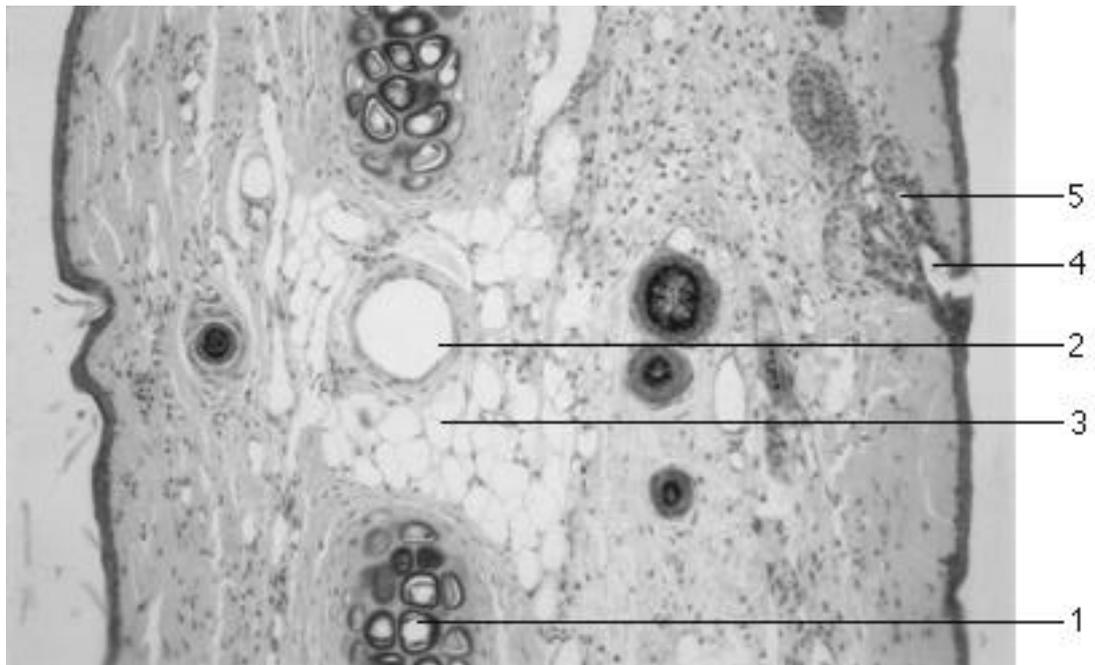


Abb. 4.9.: Kaninchenohr im Querschnitt. Ohrknorpel (1) wird von Blutgefäß (2) durchbrochen, Gefäß in Fettgewebe (3) eingelagert, an der konvexen Ohrseite Epithel mit Haarbälgrichter (4) und Talgdrüsen (5); H.- E. Färbung, ca. 150 fach vergrößert.

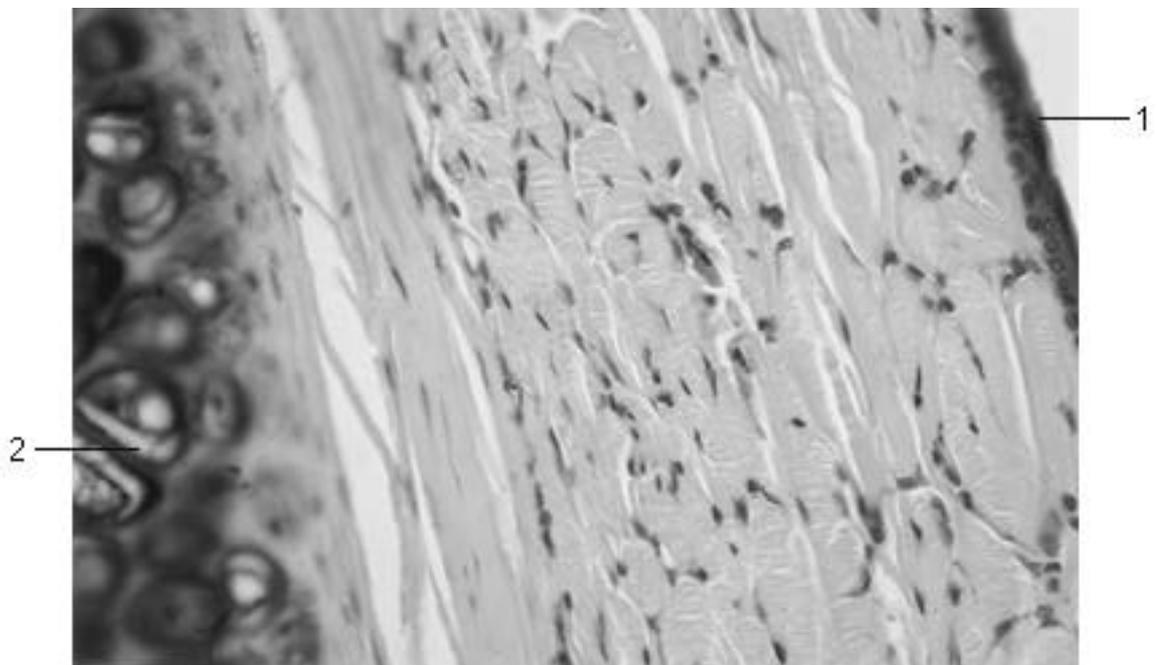


Abb. 4.10.: Konkave Kaninchenohrseite. Epithel ohne Haare (1), Knorpelgewebe (2); H.- E. Färbung, ca. 300 fach vergrößert.

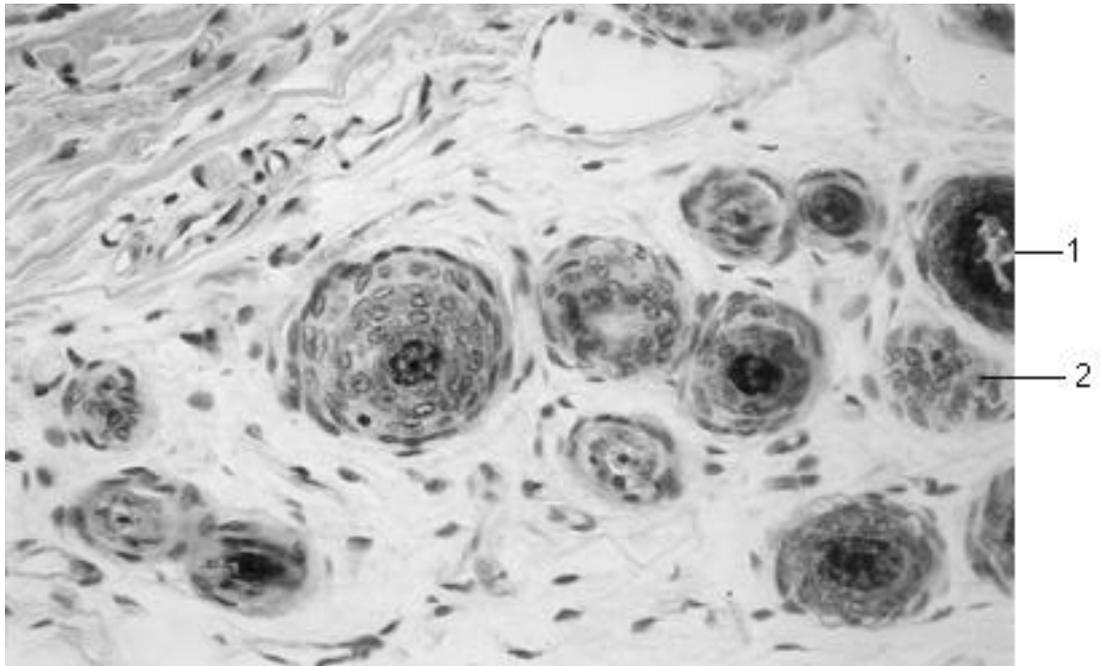


Abb. 4.11.: Konvexe Kaninchenohrseite. Haarfollikel (1) und Talgdrüsen (2); H.- E. Färbung, ca. 300 fach vergrößert.

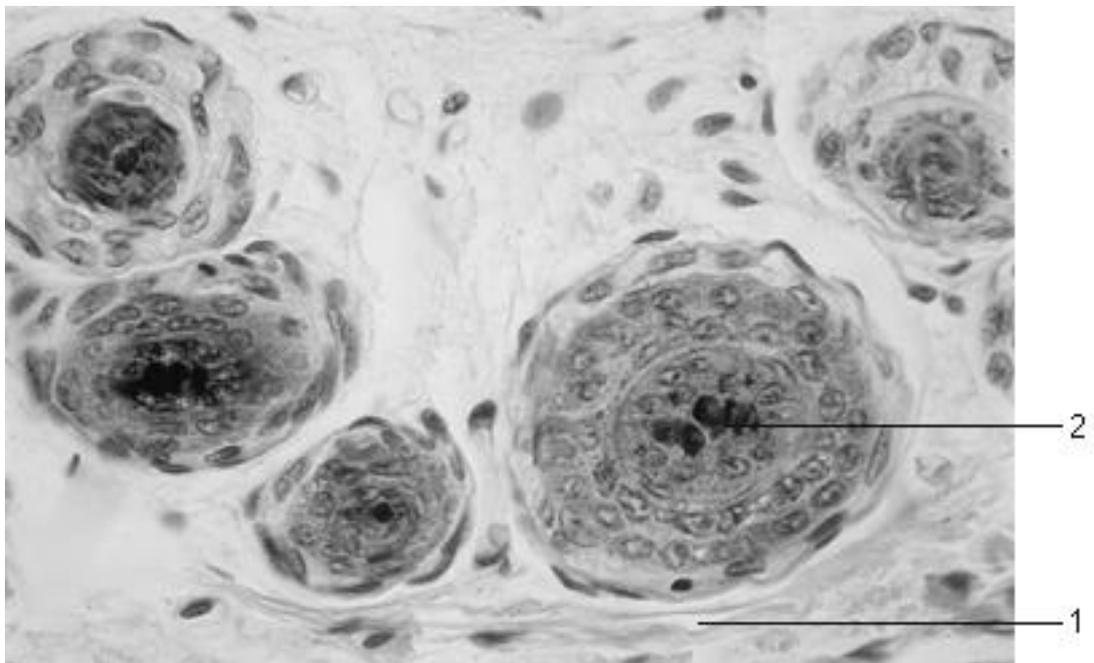


Abb. 4.12.: Konvexe Kaninchenohrseite. Bindegewebe mit Kapillare (1), Haarfollikel (2); H.- E. Färbung, ca. 500- 600 fach vergrößert.

5. DISKUSSION

Die Haut gewinnt als Kontakt- und Grenzfläche zwischen dem Organismus und seiner Umwelt in experimenteller und therapeutischer Hinsicht zunehmend an Bedeutung. Sie besitzt die Fähigkeit, Stoffe, mit denen sie in Berührung kommt, aufzunehmen bzw. als physiologische Barriere zu fungieren. Diese Tatsache macht man sich bei dem Einsatz topisch applizierbarer Arzneimittel zunutze. Pharmaka werden in verschiedenen galenischen Formulierungen wie z.B. Salben, Emulsionen oder Gele auf die Haut aufgetragen. Dort erfolgt entsprechend ihren Eigenschaften die Penetration durch die Haut. Die Arzneimittel wirken entweder systemisch, nach Penetration und Resorption über die Haut, oder lokal.

In den letzten Jahren sind viele Fortschritte auf dem Gebiet der Arzneimittelentwicklung sowie neuer Applikationsverfahren zu verzeichnen. Dazu zählen z.B. transkutane therapeutische Systeme, Pour- on- und Spot- on- Verfahren. Bei Pharmaka mit sehr geringer Bioverfügbarkeit nach enteraler Applikation bietet sich ebenfalls die Alternative der parenteralen Anwendung. Im Falle der Verabreichung transkutan resorptiver Arzneimittel, kommt der vorteilhafte Wegfall belastender Injektionen bei Langzeittherapien hinzu (ARENS, 1991). Für solche Situationen wurden z.B. Pflaster entwickelt, aus denen das Pharmakon nach dem Aufbringen auf die Haut gleichmäßig hinhaltend freigesetzt wird.

Aufgrund der fortwährenden Neuentwicklung von Arzneimitteln ist es notwendig, diese in umfangreichen Untersuchungen auf ihre Resorption, Verteilung, Ausscheidung, aber auch auf ihre Verträglichkeit und Nebenwirkungen zu testen, bevor die Präparate letztendlich zugelassen werden. Zur Testung der Wirkung von Pharmaka auf Mensch und Tier werden In- vivo- und In- vitro- Versuche durchgeführt. Die Untersuchungen am lebenden Organismus enthalten viele Variablen und sind oft recht aufwendig. In- vivo- Untersuchungen können durch Versuche an isolierten Organen nicht gänzlich ersetzt werden, da die Befunde nicht ohne weiteres auf den lebenden Organismus übertragbar sind. Andererseits bietet die In- vitro- Studie einige Möglichkeiten, die beim Versuch am lebenden Tier aus ethischen Gründen oft nicht vertretbar sind, so z.B. die Testung von Kosmetika. Dazu gehören aber auch Untersuchungen mit radioaktiv markierten Substanzen oder toxischen Dosen. Ein weiterer Vorteil von In- vitro- Versuchen ist die hohe Standardisierbarkeit. Es ist bei gleichen Versuchsbedingungen möglich, die Ergebnisse jederzeit zu reproduzieren.

Resorptionsvorgänge können exakt erfaßt werden, während die untersuchte Substanz im lebenden Organismus durch den Blutstrom im gesamten Körper verteilt wird. Variablen wie die Speicherung, Verteilung und Umwandlung der Testsubstanz durch andere Kompartimente fallen bei Untersuchungen mit Hautperforationsmodellen weg. Andererseits erhält man aus In- vitro- Versuchen keine Informationen über die systemische Wirkung oder die Wirkung auf einzelne Organe bei Kumulation des Pharmakons. Die Frage der Biotransformation, der Ausscheidung und Verträglichkeit kann ebenfalls nur bei Untersuchungen am Gesamtorganismus geklärt werden. So kann man behaupten, daß sich In- vivo- und In- vitro- Versuche sinnvoll ergänzen müssen.

Neben den Eigenschaften des Pharmakons hat auch die Morphologie der Haut, einschließlich der Behaarung, der Talg- und Schweißdrüsen, einen entscheidenden Einfluß auf die Penetration und Resorption von Substanzen. Da die Haut als Ausscheidungsorgan programmiert ist, müssen sich Permeationsvorgänge gegen den Fluß sekretorischer Prozesse und die Abschilferung der Hornschicht entwickeln (STÜTTGEN, 1972). Die Resorption kann durch die Epidermis bis hin zum gefäßführenden Corium (transepidermal) oder transfollikulär über die Haarfollikel und Talgdrüsen in die Blutbahn erfolgen. Auch Schweißdrüsen können als Permeationsweg dienen (PFEIFER u. BORCHERT, 1980). Die Resorptionsrate verhält sich also direkt proportional zur Anzahl der Epidermalorgankomplexe und nimmt mit steigender Epidermisdicke ab. Den Einfluß der Hautbeschaffenheit auf die Absorption von Stoffen machen auch die Ausführungen von PFEIFER et al. (1984) deutlich. Es wurde die Abhängigkeit der perkutanen Absorption vom Applikationsort beim Menschen bestimmt. Als Testsubstanz wurde radioaktiv markiertes Hydrocortison verwendet. Im Vergleich zur volaren Unterarmseite, deren perkutane Absorption gleich 1 gesetzt wurde, erhielt man für die Hinterohrregion die 13fache sowie eine 42fach höhere Absorption an der Skrotalhaut. Dagegen wurde für die Haut der Fußsohle lediglich $\frac{1}{7}$ der Absorption der volaren Unterarmseite ermittelt. Es liegen also erhebliche Absorptionsunterschiede für die Haut verschiedener Körperregionen innerhalb einer Spezies vor.

Dicht behaarte Spezies, wozu auch das Kaninchen zählt, haben eine wesentlich dünnere Epidermis, als spärlich behaarte Spezies. Beim Kaninchen beträgt die Epidermisdicke am Ohr 30- 40 μm (ANDREEFF, 1926). Nach MEYER et al. (1978) beträgt die Epidermisdicke dicht behaarter Spezies (Hund und Katze) 10- 45 μm , die der Schweinehaut 70- 140 μm und die der menschlichen Haut 50- 120 μm .

Eigene mikroskopische Untersuchungen der kaudomedialen Applikationsfläche des Kaninchenohrs ergaben eine Dichte der Haare von $950/\text{cm}^2$, wobei sie in Gruppen zu je einem Grannen- und 3- 5 Wollhaaren angeordnet sind. Es kommen auch Leithaare vor, die allerdings nur im Winterfell des Kaninchens deutlich über die anderen Haare hervorragen (SCHULZE, 1975). In den dichter behaarten Randbezirken des Kaninchenohrs sind durchschnittlich 1240 Haare/ cm^2 zu zählen. Die Haare der Schweinehaut kommen dagegen nur teilweise in Gruppen von 2- 3 Haaren, meist allerdings als Einzelhaar vor. Auch BRONAUGH et al. (1982a) verglichen mehrere Spezies bezüglich der Haardichte sowie des Durchmessers der Haarfollikel miteinander (siehe Tab. 2. 2.). Wie den Angaben zu entnehmen ist, gleicht sich die Anzahl der Haarfollikel bei Mensch und Schwein ($11 \pm 1/\text{cm}^2$), während die Ratte ($289 \pm 21/\text{cm}^2$) und die Maus ($658 \pm 38/\text{cm}^2$) ein Vielfaches der Haarfollikel besitzen. Der Durchmesser der Haarfollikel und damit auch die Stärke der Haare ist bei Mensch und Schwein im Verhältnis zu den anderen untersuchten Arten wesentlich größer.

Die Funktion der Haare beinhaltet vornehmlich den Schutz des Individuums vor Kälte oder Wärme, also die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur, sowie die Kommunikation z.B. den Ausdruck von Angst, Zorn oder Wut. Des weiteren leisten die Haare einen Beitrag zur Realisierung der kutanen Sensibilität, denn in der Umgebung fast aller Haarfollikel findet man sensorische Nerven und in einigen Haarfollikeln sind Nervenendorgane anzutreffen (MONTAGNA, 1967). Die sehr dichte Behaarung der Kaninchenohren besitzt möglicherweise noch eine weitere Funktion. Sie dient der Streuung von Luftwirbeln beim Lauschvorgang, da die Wahrnehmung bei starker Windbewegung z.B. durch Rauschen getrübt sein würde. Unterstützt wird diese Funktion durch die besonders hohe Haardichte an den Ohrrändern. Die mangelhafte Ausbildung von Schweißdrüsen am Kaninchenohr weist darauf hin, daß im Rahmen der Thermoregulation hauptsächlich die Abgabe von Wärme durch Abstrahlung erfolgt.

In Resorptionsversuchen, bei denen mehrere Spezies untereinander verglichen wurden, ergab sich unter gleichen Versuchsbedingungen bei der Kaninchenhaut die höchste Permeabilität. Gründe dafür sind, wie oben ausgeführt, die geringe Epidermisdicke und die sehr hohe Dichte der Haarfollikel. Die Untersuchungen von PFEIFER et al. (1984) bestätigen dies. Sie ermittelten die perkutane Absorption von Ratten-, Kaninchen-, Schweine-, Affen- und Menschenhaut für verschiedene Substanzen, darunter Coffein, Cortison, Testosteron, DDT,

Lindan, Acetylstylin, Parathion sowie Malathion. Beim Kaninchen ergaben sich bis auf Acetylcystein für alle getesteten Substanzen die höchsten Absorptionsquoten. Die Schweinehaut wies, ähnlich wie die menschliche Haut, recht niedrige Absorptionsquoten auf. Die Autoren stellten fest, daß die Schweinehaut neben der Affenhaut noch als brauchbarstes Tiermodell für den Menschen angesehen werden kann. Dies belegen auch die in Abs. 2. 1. 1. bereits erwähnten Untersuchungen von BRONAUGH et al. (1982a), CHOWHAN u. PRITCHARD (1978) sowie BARTEK et al. (1972). Von MEYER et al. (1978) wurden die wichtigsten Übereinstimmungen in Morphologie und Biochemie der Haut von Schwein und Mensch wie folgt zusammengefaßt:

1. eine spärliche Behaarung,
2. die Epidermisdicke und der charakteristische Bau des Papillarkörpers,
3. eine ähnliche Gefäßversorgung der Haarfollikel,
4. ein hoher Anteil an elastischen Fasern in der Dermis,
5. Parallelen in der Zusammensetzung des Lipidfilms der Hautoberfläche sowie
6. ein ähnliches Enzymmuster der Epidermis und apokriner Drüsen.

Für die eigenen Versuche wird das Kaninchenohr als Organ gewählt, weil es aufgrund der hohen Permeabilität und seiner anatomischen Eigenschaften besonders als Perfusionspräparat geeignet ist. Bei der Verwendung von Kaninchenohren gestaltet sich die Beschaffung der Versuchsorgane unproblematisch. Sie bieten eine ausreichend große Applikationsfläche und besitzen im Gegensatz zu den häufig genutzten isolierten Schweinehautlappen ein in sich geschlossenes Gefäßsystem. Das Einführen der Kanülen in das arterielle und venöse Gefäß bereitet keine Probleme und ist in wenigen Minuten zu bewältigen. Fettgewebe ist kaum vorhanden, was sich günstig auf Präparation und Versuchsergebnis auswirkt.

Um exakte Informationen über Resorptionsvorgänge zu erhalten und die oft umstrittenen und aufwendigen Tierversuche zu reduzieren, begann man mit der Entwicklung von Modellen. Zunächst wurden Diffusionszellen als In-vitro-Modell für das Hautorgan genutzt (FRANZ, 1978; BRONAUGH et al., 1981; 1982; PRIBORSKI u. MÜHLBACHOVA, 1989). Mit dieser Methode ist es möglich, eine direkte Bestimmung der perkutanen Diffusion vorzunehmen. Am lebenden Tier konnte die Resorption von Testsubstanzen oft nur indirekt anhand der im Blut enthaltenen bzw. ausgeschiedenen Menge des zu testenden Wirkstoffs ermittelt werden. Der entscheidende Nachteil von Diffusionszellen liegt aber darin, daß hier eine passive Diffusion nicht nur durch die Epidermis, sondern auch durch das Corium und andere darunterliegende Schichten bis zum Erreichen der unteren Kammer erfolgt. Normalerweise findet bereits im

Corium der Übertritt in die Blutbahn statt. So ergibt sich eine zeitverzögerte Ankunft der Testsubstanz in der Rezeptorflüssigkeit. Auch wird dem Erhalt der Vitalität des isolierten Hautlappens zu wenig Beachtung geschenkt. Perkutane Absorptionsmechanismen und Biotransformationsvorgänge, die in der Epidermis lebender Haut stattfinden sind im Diffusionszellversuch nur eingeschränkt möglich (CARVER et al., 1989). Da in den Membranen keine aktiven Transportprozesse mehr erfolgen, wird der Stoffdurchtritt wesentlich beeinflusst. Die veränderten pH- Verhältnisse des Hautpräparats und damit der Ionisationsgrad des Wirkstoffs sind ebenfalls permaetionsbestimmende Faktoren (PFEIFER et al., 1984). Dies alles führt zu Ergebnissen, die nicht auf lebende Gewebe übertragbar sind, da In- vivo- Verhältnisse hier nur sehr lückenhaft realisiert werden.

Bei der Perfusion des isolierten Kaninchenohrs werden die physiologischen Verhältnisse weitestgehend nachempfunden. Vorteile im Vergleich mit anderen Organmodellen liegen hier in der Wahl eines erythrozytenhaltigen Perfusionsmediums sowie der Konstruktion eines geschlossenen Kreislaufs. Die Untersuchung von Resorptionsvorgängen ist mit Hilfe dieses Modells mit hoher Standardisierbarkeit und einem geringen technischen Aufwand möglich.

Um den natürlichen Verhältnissen so weit wie möglich zu entsprechen, werden die Organe mit einem den physiologischen Bedingungen angepaßten, zellulären Medium perfundiert. Dieses verwendete Perfusionsmedium besteht aus einem Puffer angereichert mit Albumin, Natriumbikarbonat und Rindererythrozyten. Mit Hilfe der roten Blutkörperchen kann eine blutäquivalente Sauerstoffversorgung des Gewebes und die Viskosität des Perfusats realisiert werden. In den eigenen Vorversuchen mit einer azellulären Tyrode- Lösung ließ sich der O₂- Partialdruck nur sehr schwer regulieren und betrug bis zu 60 kPa. Ein physiologischer O₂- Partialdruck von 10- 13 kPa über die gesamte Versuchszeit konnte bei diesem Perfusionsmedium nicht eingestellt werden..

Neben der Simulation von In- vivo- Verhältnissen ist auch die Verminderung der Ödembildung ein Vorteil von zellulären Perfusionsmedien. LOVE et al. (1970) berichten, daß die Verwendung azellulärer Flüssigkeiten zur frühzeitigen Ödematisierung und einer bis zu 3fachen Gewichtszunahme führen kann. Hinzu kommen Schwankungen des Perfusionsdruckes und der Flußrate, welche sich bei Versuchen mit zellhaltigen Medien in einem konstanten Bereich bewegen (LOVE et. al., 1970).

Die Ermittlung der Gewichtszunahme als Indikator für Flüssigkeitsansammlungen im extravasalen Raum hat bei den eigenen Versuchen bestätigt, daß eine Ödematisierung bei der Perfusion mit einem zellhaltigen Medium wirkungsvoll eingeschränkt werden kann. Der durchschnittliche Gewichtszuwachs beträgt bei den durchgeführten Versuchen 4,6 %. BEHRENDT u. KAMPPMEYER (1987) stellten eine bis zu 13 %ige Gewichtszunahme bei der Perfusion isolierter Kaninchenohren mit einem protein- und zellfreien TRIS- Puffer fest. Die Gewichtserhöhung stieg weiterhin beträchtlich, wenn mit einer Flußrate von über 250 $\mu\text{l}/\text{min}$ perfundiert wurde. Bei Versuchen mit isoliert perfundierten Schweinehautlappen über mehrere Tage erhielten RIVIERE et al. (1986) folgende Ergebnisse: nach 2 tägiger Perfusion ergab sich eine durchschnittliche Gewichtszunahme von 25 %. Nach 6 Tagen war bereits eine 42 %ige Erhöhung meßbar. Die Hautlappen wurden mit einer zellfreien Krebs- Ringer- Bikarbonatlösung perfundiert. Die Gründe für diese Gewichtszunahme sehen die Autoren in der Ödembildung und dem hypertrophen Wachstum der Hautlappen.

Um die Lebensfähigkeit der isolierten Organe bis zum Versuchsende zu belegen, werden einige biochemische Untersuchungen durchgeführt. RIVIERE et al. (1987) erarbeiteten Richtlinien für die Vitalität isoliert perfundierter Schweinehautlappen. Demzufolge gilt ein Hautpräparat als lebensfähig, wenn die Flußrate mehr als 1 ml/ min, der Glukoseumsatz mindestens 12 mg/ h, die LDH- Aktivität nicht mehr als 30 U/ l beträgt und keine abweichenden mikroskopischen Befunde vorliegen.

Als Indikator für eine genügende Energieversorgung des Präparates wurde auch in den eigenen Versuchen der Glukoseverbrauch ermittelt. Glukose liefert bei ausreichender Sauerstoffanwesenheit in der aeroben Glykolyseenergie in Form von 38 Molekülen ATP/ Glukosemolekül (KARLSON, 1978). Die Sauerstoffversorgung wird durch die im Perfusionsmedium enthaltenen Erythrozyten gewährleistet. Der durchschnittliche Glukoseverbrauch der Kaninchenohren beträgt 32,5 mg/ h. Gemessen an den von RIVIERE et al. (1987) aufgestellten Richtlinien, wurde ein Glukoseumsatz von mindestens 12 mg/ h deutlich überschritten. Einschränkend muß festgestellt werden, daß bei dem hier genutzten Kaninchenohr neben der Haut auch Knorpelgewebe perfundiert wird, was allerdings ein relativ geringes Substratangebot zum Erhalt der Vitalität erfordert.

Als weiterer Vitalitätsparameter folgte die Bestimmung der LDH- Aktivität.

Laktatdehydrogenase ist ein intrazelluläres Enzym, dessen Auftreten im Perfusat von RIVIERE et al. (1987) als ein Zeichen für den Verlust der Zellmembranintegrität gedeutet

wird. In den eigenen Untersuchungen liegt die durchschnittlich gemessene LDH- Aktivität bei 18,7 U/ l. Nach RIVIERE et al. (1987) sollte die LDH- Aktivität nicht mehr als 30 U/ l betragen, was in unseren Versuchen auch gelang. Die physiologische LDH- Aktivität im Kaninchenblut liegt im Durchschnitt bei 150,5 U/ l und schwankte in den Untersuchungen von FISCHER (1977) zwischen 34 und 539 U/ l.

Außerdem wurde die Konzentrationsveränderung des Elektrolyts Kalium im Perfusat ermittelt. Kalium kommt unter physiologischen Bedingungen zu 98% intrazellulär vor. HIERNICKEL (1985) schreibt, daß die Kaliumfreisetzung der empfindlichste Indikator für den Zelltod ist. Eine signifikante Erhöhung würde, wie die gesteigerte LDH- Aktivität, ebenfalls auf eine Schädigung von Zellmembranen hinweisen. In den durchgeführten Versuchen beträgt die im Durchschnitt gemessene Kaliumfreisetzung 0,156 mmol/ l und ist damit sehr gering.

In dem von HIERNICKEL (1985) verwendeten Perfusat war Glukose ebenfalls die einzige Energiequelle. Der Verbrauch des Präparats lag in den ersten 10 Stunden bei 19 mg/ dl (siehe Tab. 2. 3.). Bezieht man den gemessenen Glukoseverbrauch des isolierten Kaninchenohrs auf die Perfusatsmenge, so erhält man einen Wert von durchschnittlich 16 mg/ dl, die in einer zweistündigen Perfusionszeit umgesetzt wurden. Die LDH- Freisetzung des menschlichen Hautlappens von 230 U/ l in den ersten 10 Versuchsstunden (siehe Tab. 2. 3.) überschreitet die des Kaninchenohrs von durchschnittlich 18,7 U/ l in 2 Stunden bei weitem. Geht man von einer linearen LDH- Freisetzung aus, erhält man für den menschlichen Hautlappen einen Wert von 46 U/ l in 2 Stunden. Um dies realistisch zu vergleichen, müßte man allerdings die Verlaufskurve der LDH- Aktivität in den ersten Versuchsstunden betrachten.

Bei der mikroskopischen Untersuchung der perfundierten Organe konnten keine Zell- und Gewebeschäden festgestellt werden. Nach der Perfusion wurde Methylenblau in die Arterie injiziert. Die Färbung der Hautgefäße machte deutlich, daß das Applikationsgebiet durchströmt wurde. Da Methylenblau nicht paravaskulär festgestellt werden konnte, wird angenommen, daß die Gefäße während der Perfusion in vollem Umfang vital waren.

Die Perfusionszeit beträgt bei allen durchgeführten Versuchen 120 Minuten. Nach Ablauf dieser festgesetzten Zeit wurde der Versuch abgebrochen. Eine Perfusionszeit über 2 Stunden hinaus ist prinzipiell möglich, da die Auswertung der Vitalitätsparameter der hier durchgeführten Versuche die Lebensfähigkeit der Organe bis zum Versuchsende belegen. Es

bleibt zu untersuchen, wie sich diese Parameter und das Organ bei einer längeren Perfusionszeit verhalten.

In den Untersuchungen wurde Testosteron in einer öligen Lösung gleichmäßig auf eine Hautfläche von 20 cm² der konvexen Kaninchenohrseite aufgetragen. Als Lösungsmittel enthält das Präparat Rizinusöl. Die applizierte Menge beträgt 2500 µg/ cm². Die Ergebnisse sind in Tab. 4. 1. zusammengefaßt.

Im Verlauf der zweistündigen Perfusion steigt die Kurve der Testosteronresorption steil. Dies ist der Abb. 4. 1. zu entnehmen. Nach 30 Minuten sind 0,0041% der applizierten Dosis im Perfusat nachzuweisen. In weiteren 30 Minuten, d.h. eine Stunde nach Perfusionsbeginn erhöht sich dieser Wert auf das 3,5fache. Vergleicht man diesen 60 Minuten- Wert mit den nach zwei Stunden resorbierten 0,0288% der applizierten Dosis, so ergibt sich hier eine Verdopplung innerhalb einer Stunde. In den letzten 30 Minuten vor Abbruch der Perfusion ist nur noch eine Steigerung der Resorptionsrate um den Faktor 1,2 zu verzeichnen.

EKERDT et al. (1985) führten ebenfalls Resorptionsversuche am isoliert perfundierten Kaninchenohr durch. Sie untersuchten die Resorption von Dihydrotestosteron und beschreiben einen recht langsamen Anstieg der Wirkstoffkonzentration im Perfusat. Ein Maximum ist nach 50 Minuten erreicht. Diese Beobachtungen stimmen nicht mit den eigenen überein, denn die Steigerung der Resorptionsrate ist hier gerade in den ersten 30 Minuten sehr hoch. Ein Resorptionsmaximum ist ebenfalls nicht vorhanden, denn bis zum Versuchsende stieg die Wirkstoffkonzentration im Perfusat stetig an. Ein Grund für diese unterschiedlichen Resorptionsraten liegt darin, daß Dihydrotestosteron andere Resorptionseigenschaften besitzt. Neben der Absorptionsfläche und -ort, der Beschaffenheit der Haut, dem Durchblutungsgrad sowie dem Arzneistoffträger haben die Stoffkonzentration und -eigenschaft einen entscheidenden Einfluß auf die perkutane Absorption (PFEIFER u. BORCHERT, 1980). Zu diesen Stoffeigenschaften zählt u.a. auch die Lipidlöslichkeit, die für das Durchdringen von Lipidbarrieren von grundlegender Bedeutung ist. Nimmt der Lipoid/ Wasser Verteilungskoeffizient zu, kommt es zu einem Resorptionsanstieg (VOIGT, 1993). Da der überwiegende Teil der Arzneistoffe Säure- oder Basencharakter hat, hängt das Ausmaß der Permeabilität eines Wirkstoffs weiterhin vom Ionisationszustand und damit auch vom pH-Wert des Resorptionsmilieus ab (VOIGT, 1993).

In ihren Versuchen mit dem isoliert perfundierten Schweinehautlappen bestimmten CARVER et al. (1989) die perkutane Absorption von Testosteron. Sie applizierten $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ des in Äthanol gelösten und radioaktiv markierten Wirkstoffs. Die Testosteronkonzentration der Zubereitung betrug $1\text{ml}/\text{mg}$. Nach 30 Minuten sind $0,05\%$ der applizierten Dosis im Perfusat nachzuweisen, nach einer Stunde sind es bereits $0,2\%$ und 2 Stunden nach Perfusionsbeginn $0,4\%$. Zum Versuchsende nach 8 Stunden sind $0,65\%$ des Wirkstoffs im Perfusat wiederzufinden. Ähnlich wie in den eigenen Versuchen, ist hier eine vierfache Erhöhung des resorbierten Wirkstoffs innerhalb der zweiten halben Stunde und eine Verdopplung in der zweiten Stunde des Versuches festzustellen. Ein direkter Vergleich der von CARVER et al. (1989) beschriebenen Ergebnisse mit den vorliegenden Befunden ist aus verschiedenen Gründen nicht möglich. Zum einen erreichten CARVER et al. (1989) in ihren Versuchen höhere absolute Resorptionsraten. Die Ursache liegt u.a. darin, daß das hier verwendete organische Lösungsmittel Äthanol, wie z.B. auch Aceton, die Durchmischung mit dem Hauttalg und damit die Penetration erleichtert (PFEIFER u. BORCHERT, 1980). Dagegen enthielt das in den eigenen Versuchen verwendete Präparat Rizinusöl als Hilfsstoff. Rizinusöl enthält im wesentlichen das Triglyzerid der Rizinolsäure (WAGNER, 1970). Fette Öle führen in wäßrigen Medien infolge der Viskositätserhöhung zu einer mehr oder minder ausgeprägten Resorptionsverringerng (VOIGT, 1993), was bei einer intramuskulären Applikation den Depoteffekt unterstützt. Des weiteren wurden hier isolierte Schweinehautlappen perfundiert, so daß die speziestypischen Unterschiede der Hautmorphologie beachtet werden müssen. Eine Folge kann die unterschiedliche Resorption einzelner Substanzen sein. Auch die regionale Herkunft der Hautpräparate ist unterschiedlich. Die Schweinehautlappen werden der kaudalen Abdominal- bzw. der Inguinalgegend entnommen. Verschiedenen Hautregionen weisen selbst innerhalb eines Individuums voneinander abweichende Permeabilitäten auf (CREASEY et al., 1978; PFEIFER et al., 1984).

Die Ursache für die wesentlich höheren Resorptionsraten im Vergleich mit den eigenen Ergebnissen liegt auch darin, daß CARVER et al. (1989) den Wirkstoff in geringeren Konzentrationen applizierten. Sie verabreichten $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, während in den eigenen Versuchen $2500 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ aufgetragen wurden. MARZULLI et al. (1969) kamen ebenfalls zu dem Resultat, daß bei der Verabreichung geringerer Dosen Testosteron relativ höhere Resorptionsraten erreicht werden. Sie untersuchten die Resorption von radioaktiv markierten und mit $0,1\text{ ml}$ Aceton versetztem Testosteron in vivo an menschlicher Haut. Unter Beachtung der Acetonverdunstung wurde die Substanz in Konzentrationen von $4,5$; 40 und $2000 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf

die ventrale Unterarmseite appliziert. Die Testosteronpenetration wurde anhand der Ausscheidung über den Urin ermittelt (siehe Tab. 2. 1.).

Verabreichte Dosis und Penetrationsrate verhalten sich hier umgekehrt proportional. Die Ergebnisse der Versuche mit den höheren Ausgangskonzentrationen stimmen mit denen am Kaninchenohr überein, wo im Durchschnitt eine Resorptionsrate von 0,0144 % der applizierten Dosis/ h gemessen wurde. PFEIFER et al. (1984) untersuchten die Dosisabhängigkeit der perkutanen Absorption von Benzoesäure, Hydrocortison sowie Testosteron und kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, daß bei einer Erhöhung der verabreichten Dosis/ cm² Hautfläche die Absorptionsquote stetig sinkt. Die Autoren begründen diesen Effekt damit, daß eine Dosiserhöhung ab einer bestimmten Größenordnung nicht mehr zu einem proportionalen Anstieg der diffusionswirksamen Konzentration des entsprechenden Hautbereichs führt. Andererseits nimmt die je Zeiteinheit absorbierte Wirkstoffmenge proportional mit der Absorptionsfläche zu (PFEIFER et al., 1984). Zwar ist die absolute Resorption bei der Verabreichung hoher Dosen auch wesentlich höher, es sollte aber der Einfluß des Arzneiträgers auf die Resorption des Wirkstoffs nicht vernachlässigt werden. So ist es ökonomischer, ein optimales Vehikel für die verwendete Substanz zu suchen, als bei einer ungeeigneten Grundlage die Konzentration des Wirkstoffs zu erhöhen (ZESCH, 1976).

Aber auch die Ergebnisse aus den Untersuchungen von MARZULLI et al. (1969) können nicht unkritisch auf die Versuche mit isolierten Organen übertragen werden, da hier In- vivo-Versuche am Menschen durchgeführt wurden. Neben den speziebedingten Unterschieden sind die bereits genannten Differenzen bei der Verwendung von Haut aus verschiedenen Körperregionen zu beachten. Die Nutzung von Aceton als Lösungsmittel kann die Resorptionseigenschaften des Wirkstoffs günstig beeinflussen. Entscheidend ist jedoch, daß bei den In- vivo- Versuchen die resorbierte Wirkstoffmenge aus dem Urin bestimmt wurde. Dabei wurden Testosteronmengen, die z.B. in der Leber gespeichert sind, nicht erfaßt. Dieser Umstand bedingt eine ungenaue Wiedergabe der eigentlich resorbierten Wirkstoffmenge. Hinzu kommt der unterschiedliche Durchblutungsgrad der Haut bei In- vivo- und In- vitro-Versuchen. Einen deutlichen Einfluß auf die Resorption von Stoffen hat die Durchblutung allerdings nur bei sehr schnell penetrierenden Wirkstoffen, wobei eine reduzierte Durchblutung (Vasokonstriktion) zu einer eingeschränkten Resorption führen kann (PFEIFER et al., 1984).

In anschließenden Untersuchungen könnten weitere Substanzen mit Hilfe des isoliert perfundierten Kaninchenohrs getestet werden und die Ergebnisse mit bereits vorliegenden

Resultaten aus In- vitro- und In- vivo- Versuchen anderer Forschergruppen verglichen werden. Grundsätzlich kann mit diesem Hautperforationsmodell die perkutane Absorption aller transdermal applizierbaren Stoffe untersucht werden. Es wäre weiterhin interessant zu verfolgen, wie sich der Verlauf der Vitalitätsparameter bei Erhöhung der Versuchsdauer gestaltet.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde ein Hautperfusionsmodell am isolierten Kaninchenohr entwickelt und erprobt, das von einem erythrozytenhaltigen, blutäquivalenten Perfusionsmedium in einem geschlossenen Kreislauf durchströmt wird. Mit Hilfe dieses Perfusionsmodells ist es möglich, die dermale Resorption von Substanzen ohne großen technischen Aufwand zu untersuchen. Die Versuchsbedingungen wurden weitestgehend standardisiert und den physiologischen Verhältnissen angepaßt.

Die Vitalität des isolierten Kaninchenohrs ist über den Versuchszeitraum von 2 Stunden gewährleistet, was durch die biochemischen und histologischen Untersuchungen belegt wird. Es wurde der Glukoseverbrauch des Organs, die LDH- und Kaliumfreisetzung in das Perfusat ermittelt. Die Auswertung dieser Parameter und der Vergleich mit den Ergebnissen anderer Forschergruppen ergab keinen Hinweis auf Zell- oder Membranschädigungen.

Im Rahmen der mikroskopischen Untersuchung wurde zusätzlich eine Bestimmung der Haardichte als permeabilitätsbestimmender Faktor durchgeführt. Die Zählung ergab an der Applikationsfläche eine Dichte von ca. 950 Haarfollikeln/ cm^2 . Am Ohrrand befinden sich durchschnittlich 1240 Haare/ cm^2 . Sie kommen in Gruppen zu je einem Grannen- und 3- 5 Wollhaaren vor. In unmittelbarer Nähe der Haargruppen befinden sich Talgdrüsen. Am Kaninchenohr sind keinen Schweißdrüsen angesiedelt.

Zur Erprobung des Modells wurde die perkutane Absorption einer öligen Testosteronlösung untersucht. Sie enthält den Wirkstoff Testosteronenantat sowie Rizinusöl als Hilfsstoff.

In 1 ml der Präparats sind 250 mg Testosteronenantat enthalten. Im Versuch wurde eine Menge von 2500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Hautfläche der konvexen Kaninchenohrseite appliziert. Nach der zweistündigen Versuchszeit wurden 0,0288 % der applizierten Dosis im Perfusat nachgewiesen.

Im Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit den Untersuchungen anderer Autoren sind trotz einiger Einschränkungen, die sich aus den unterschiedlichen Versuchsbedingungen ergeben, Parallelen im Resorptionsgeschehen festzustellen.

7. SUMMARY

Manja Hartig

Development of a skin perfusion model on the rabbit ear with a closed circuit and testing it by an oily testosterone solution

The isolated rabbit ear was perfused by an erythrocyte- containing blood- equivalent medium circulating in a closed circuit. The presented model enables dermal resorption studies with low technical expense. The experimental conditions were as far as possible standardized and adapted to physiological circumstances.

Proved by biochemical and histological examinations the isolated rabbit ear is viable over a period of 2 hours. Glukose utilization, LDH and potassium leakage into the perfusate were measured. The interpretation of these parameters and the comparison with the results of other scientists did not refer to cell or membrane damages.

Within the microscopical examinations the density of hair was found out as a factor influencing the permeability. At the area of application about 950 hair follicles/ cm² were counted and at the margin of the ear are situated 1240 hairs/ cm² on an average. One primary hair and 3- 5 wool hairs are clustered. Sebaceous glands are close to the hair groups. There are no sweat glands at the rabbit ear.

Testing the model, the percutaneous absorption of an oily testosterone solution containing testosteronenanate and castor oil was ascertained. One milliliter of the test substance includes 250 mg Testosteronenanate. In the beginning of the perfusion 2500 µg/ cm² of skin were applied to an area of 20 cm² of the convex side of the rabbit ear. After two hours 0,0288 % of applied dose were determined in the perfusate.

Comparing the present results with the examinations by other authors parallels at resorption behaviour are pointed out. By reason of different experimental conditions there are several restrictions.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. AMMON, H. P. T. (1992):
Androgene und Anabolika.
In: ESTLER, C.- J. (Hrsg)
Pharmakologie und Toxikologie. 3. Auflage.
Schattauer, Stuttgart- New York.
- 2.. ANDO, H. Y., HO, N. F. H.u. HIGUCHI, W. I. (1977):
In vitro estimates of topical bioavailability.
J. Pharmac. Science 66, 755- 757
3. ANDREEFF, A. M. (1926):
Beiträge zum Bau der Haut des Hauskaninchens mit besonderer Berücksichtigung
der Haare.
Vet.- med. Diss., Tierärztl. Hochschule zu Berlin.
4. APPERLEY, E. u. HUMPHREY, P. P. A. (1976):
A proposed mechanism for a biphasic vasoconstrictor responses to
5- hydroxytryptamine and methysergide in the rabbit ear artery.
J. Pharm. Pharmac. 28, 822- 826
5. ARENS, D. (1991):
Untersuchung der dermalen Penetration am isoliert perfundierten Rindereuter.
Vet.- med. Diss., Hannover.
6. BARONE, R., PAVAUUX, C., BLIN, P. C. u. CUQ,P. (1973):
Atlas d' anatomie du lapin.
Masson & C, Paris.
7. BARTEK, M. J., LaBUDDE, J. A. u. MAIBACH, H. I. (1972):
Skin permeability in vivo: Comparsion in rat, rabbit, pig and man.
J. Invest. Dermatol. 58, 114- 124

8. BEHRENDT, H. u. KAMPFFMEYER, H. G. (1987):
The isolated once- through perfused rabbit ear.
Naunyn- Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 335 (Suppl.), R 4/ 14
9. BERG, R. (1988):
Angewandte und topographische Anatomie der Haustiere. 3. Auflage.
Gustav Fischer Verlag, Jena.
10. BOWDEN, P. E. u. CUNLIFFE, W. J. (1981):
Modifikation of human prekeratin during epidermal differentiation.
Biochem. J. 199, 145- 154
11. BRONAUGH, R. L., CONGDON, E. R. u. SCHEUPLEIN, R. J. (1981):
The effect of cosmetic vehicles on the penetration of n- nitrosodiethanolamine through
the excised human skin.
J. Invest. Dermatol. 76: 94- 96
12. BRONAUGH, R. L., STEWART, R. F., CONGDON, E. R. u. GILES, A. L. (1982):
Methods for in vitro percutaneous absorption studies I: Comparison with
in vivo results.
Toxicol. appl. Pharmacol. 62, 474- 480
13. BRONAUGH, R. L., STEWART, R. F. u. CONGDON, E. R. (1982a):
Methods for in vitro percutaneous absorption studies II: Animal models
for human skin.
Toxicol. appl. Pharmacol. 62, 481- 488
14. BRONAUGH, R. L. u. STEWART, R. F. (1985):
Methods for in vitro percutaneous absorption studies IV: the flow- through
diffusion cells.
J. Pharm. Sciences Vol. 74, 64- 67

15. BRYAN- LLUKA, L. J. u. O'DONNELL, S. R. (1992):
Dopamine and adrenaline, but not isoprenaline, are substrates for uptake and metabolism in isolated perfused lungs of rats.
Naunyn- Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 346, 20- 26
16. CARVER, M. P., LEVI, P. E. u. RIVIERE, J. E. (1988):
Significant first- pass bioactivation of parathion during percutaneous absorption in the isolated perfused porcine skin flap.
Toxicologist 8: 125
17. CARVER, M. P., WILLIAMS, P. L. u. RIVIERE, J. E. (1989):
The isolated perfused porcine skin flap III: Percutaneous absorption pharmacokinetics of organophosphates, steroids, benzoic acid and caffeine.
Toxicol. appl. Pharmacol. 97, 324- 337
18. CHOWHAN, Z. T. u. PRITCHARD, R. (1978):
Effects of surfactants on percutaneous absorptions of narboxen I: Comparison of rabbit, rat and human exised skin.
J. Pharmac. Science 67, 1272- 1274
19. CREASEY, N. H., BATTENSBY, J. u. FLETCHER, J. A. (1978):
Factors affecting the permeability of skin.
Curr. Probl. Dermatol. 7, 95- 106
20. EICHHOLTZ, F. u. VERNEY, E. B. (1924):
On some conditions affecting the perfusion of isolated mammalian organs.
J. Physiol. London 59, 340- 344
21. EKERDT, R., BRUNNEMANN, S. u. MÜLLER, C. (1985):
The vascular perfused rabbit ear as a model to study percutaneous absoption of topically applied drugs.
J. Invest. Dermatol. 84, 445- 446

22. ERCAN, Z. S. u. TÜRKER, R. K. (1975):
Histamine receptors in the vasculature of the rabbit ear.
Naunyn- Schneiderberg's Arch. Pharmacol. 291, 23- 29
23. FISCHER, B. (1977):
Klinisch- chemische Untersuchungen im Kaninchenblut.
Diss., Rhein. Friedr.- Wilhelm Universität zu Bonn.
24. FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W. u. STARKE, K. (1992):
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 6. Auflage.
Wissenschaftsverlag, Mannheim/ Leipzig/ Wien/ Zürich.
25. FRANZ, TH. (1975):
Percutaneous absorption, on the relevance of in vitro data.
J. Invest. Dermatol. 64, 190- 195
26. FRANZ, TH. (1978):
The finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous
absorption in man.
Curr. Probl. Dermatol. 7, 58- 68
27. GAGOV, S., PETROV, L. u. POPOVA, A. (1976):
On the neurogenic vasoconstriction of the resistive vessels in cutaneous vascular bed-
rabbit ear.
Acta Physiol. et Pharmacol. Bulgarica 2, 39- 45
28. GERHARD, U. (1909):
Das Kaninchen.
Jena.
29. GILLESPIE, J. S. u. McKNIGHT, A: T: (1976):
Adverse effects of Tris- hydrochloride, a commonly used buffer in
physiological media.
J. Physiol. 259, 561- 573

30. GRAHAM, J. D. P., SUHAILA, A: u. TAI, A. (1971):
Response to acetylcholine and nicotine of the perfused vessels of the rabbit ear.
Brit. J. Pharmacol. 41, 500- 506
31. HESSE, E. (1947):
Angewandte Pharmakologie. 2. Auflage.
Urban & Schwarzenberg, Berlin- München- Wien.
32. HIERNICKEL, H. (1983):
Methode zur Gewinnung langlebiger supravitaler Hautpräparate.
Zeitschr. Hautkr. 58, 820- 833
33. HIERNICKEL, H. (1985):
An improved method for in vitro perfusion of human skin.
Brit. J. Dermatol. 112, 299- 305
34. HILLER, V. (1989):
Grundlagen zur Perfusion und Ventilation der isolierten Rattenlunge.
Fünftes Freiburger Fortbildungsseminar Biomesstechnik, 114- 125
35. HOCHBERGER, A. I. u. ZWEIFACH, B. W. (1968):
Analysis of critical closing pressure in the perfused rabbit ear.
Americ. J. Physiol. 214, 962- 968
36. JUAN, H. u. LEMBECK, F. (1974):
Action of peptides and other algescic agents on parpvascular pain receptors of the
isolated perfused rabbit ear.
Naunyn Schneiderberg's Arch. Pharmacol. 283, 151- 164
37. KARLSON, B. (1978):
Lehrbuch der Biochemie.
Georg Thieme, Stuttgart- New York

38. KELLNER, H.- M., ECKERT, H. G., FEHLHAGER, H. W., HORNKE, I. u. OEKONOMOPULOS, R. (1985):
 Untersuchungen zur Pharmakokinetik und zur Biotransformation nach topischer Anwendung des lokalen Kortikoids Prednicarbat.
 Zeitschr. Hautkr. 61 (Suppl. 1), 18-40
39. KOLB, G. (1991):
 Vergleichende Histologie.
 Springer, Berlin und Heidelberg.
40. LEONHARDT, H. (1985):
 Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. 7. Auflage.
 Georg Thieme, Stuttgart.
41. LEVIN, N. W., RYAN, W. G., HAYASHI, J. u. KARK, R. M. (1965):
 Studies on the perfused isolated rabbit kidney.
 South Afric. J. Med.. Sci. 33, 78
42. LIEBICH, H.- G. (1992):
 Funktionelle Histologie. 2. Auflage.
 Schattauer, Stuttgart- New York.
43. LLOYD, D. H. u. GARTHWAITE, G. (1982):
 Epidermal structure and surface topography of canine skin.
 Res. Vet. Sci. 33, 99- 104
44. LOVE, H. SIMMONS, B., PAPPAS, A. u. FOLKMAN, J. (1970):
 Perfusion of the isolated rat limb.
 Surgical Forum 21, 469- 470
45. LUTZ, J. (1989):
 Vergleich der Stärke von Gefäßkontraktionen bei druck- und flußkonstanter Perfusion.
 Fünftes Freiburger Fortbildungsseminar Biomesstechnik, 75- 77

46. MacPHERSON, R. D., RASIAH, R. L. und McLEOD, L. J. (1992):
Intraarterial propofol is not directly toxic to vascular endothelium.
Anesthesiology 76, 967- 971
47. MARZULLI, F. N.; BROWN, D. u. MAIBACH, H. I: (1969):
Techniques for studying skin penetration.
Tox. appl. Pharmacol., Suppl. 3, 76- 83
48. MATOLTSKY, A. G. (1970):
Keratinization.
J. Invest. Dermatol. 67, 20- 25
49. MELNIK, B.C. (1990):
Biochemie und Pathobiochemie des epidermalen Lipidstoffwechsels.
Georg Thieme, Stuttgart.
50. MEYER, W., SCHWARZ, R. u. NEURAND, K. (1978):
The skin of domestic mammals as a model for the human skin, with special reference
to the domestic pig.
Curr. Probl. Dermatol. 7, 39- 52
51. MIETKIEWSKI, E. (1956):
Über die Chemorezeptoren der Blutgefäße im Kaninchenohr.
Arch. Int. Pharmacodyn., no. 3- 4, 373- 387
52. MONTAGNA, W. (1967):
Comparative anatomy and physiology of the skin.
Arch. Dermatol. 96, 357- 363
53. MONTEIRO-RIVIERE, N. A., BOWMAN, K. F., SCHEIDT, V. J. u. RIVIERE, J. E.
(1987):
The isolated perfused porcine skin flap (IPPSF) II:
Ultrastruktural and histological characterization of epidermal viability.
In- vitro Toxicol. 1, 241- 252

54. MOSIMANN, W. u. KOHLER, T. (1990):
Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere.
Verlag Paul Parey Berlin und Hamburg, 259- 286
55. NOMINA HISTOLOGICA. 2. Auflage.
World Association of Veterinary Anatomists, Gent (Belgium) 1992.
56. OETTEL, M. (1982):
Androgene.
In: BENTZ, H. (Hrsg.)
Vetrinärmedizinische Pharmakologie.
Gustav Fischer, Jena.
56. OETTEL, M. (1996):
Androgene, Anabolika.
In: FREY, H.- H. u. LÖSCHER, W. (Hrsg)
Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin.
Ferdinand Enke, Stuttgart.
58. PACINI, B. A. u. BOCCI, V. (1983):
An analysis of the optimal conditions for perfusing an isolated rabbit kidney with
homologous blood.
Renal Physiol., Basel 6, 72- 79
59. PFEIFER, S., PFLEGEL, P. u. BORCHERT, H.-H. (1984):
Grundlagen der Biopharmazie: Pharmakokinetik, Bioverfügbarkeit,
Biotransformation.
Volk und Gesundheit, Berlin.
60. PFEIFER, S. u. BORCHERT, H.- H., (1980):
Pharmakokinetik und Biotransformation.
Volk und Gesundheit, Berlin.

61. POPESKO, P. (1992):
Anatomy of small laboratory animals, Vol. I: Rabbit, Guinea pig.
Wolfe Publishing Ltd., Bratislava.
62. PRIBORSKI, J. u. MÜHLBACHOVA, E. (1989):
Evaluation of in vitro percutaneous absorption across human skin and in
animal models.
J. Pharm. Pharmacol. 42, 468- 472
63. RADDINO, R., POLI, E. PASINI, E. u. FERRARI, R. (1992):
Effects of the novel calcium channel blocker, anipamil, on the isolated rabbit heart,
Comparison with verapamil and gallopamil.
Naunyn- Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 346, 339- 344
64. RANDALL, M. D. und GRIFFITH, T. M. (1992):
Effects of BRL 38227, sodium nitroprusside and verapamil on collateral perfusion
following acute arterial occlusion in the rabbit isolated ear.
Br. J. Pharmacol. 106, 315- 323
65. RANDALL, M. D., SMITH, J. A. und GRIFFITH, T. M. (1993):
Hypercholesterolaemia severely impairs EDRF- dependent collateral perfusion
following acute arterial occlusion in rabbit isolated ear.
Br. J. Pharmacol. 109, 838- 844
66. RANDALL, M. D.; UJIIE, H. und GRIFFITH, T. M. (1994):
Modulation of vasodilatation to levcromakalim by adenosine analogues in the
rabbit ear: an explantation for hypoxic augmentation.
Br. J. Pharmacol. 112, 49- 54
67. RISCHBIETER, W. (1913):
Das isolierte Kaninchenohr als überlebendes Gefäßpräparat (nach Krakow-
Bissemski), zur Prüfung von Gefäßmitteln, speziell Adrenalin und Hypophysin.
Zeitschr. ges. exp. Med. 1, 355- 368

68. RIVIERE, J. E., BOWMAN, K. F., MONTEIRO- RIVIERE, N. A. et. al. (1986):
The isolated perfused porcine skin flap (IPPSF) I:
A novel in vitro model for percutaneous absorption and cutaneous toxicology studies.
Fundam. Appl. Toxicol. 7, 444- 453
69. RIVIERE, J. E., BOWMAN, K. F. u. MONTEIRO- RIVIERE, N. A. (1987):
On the definition of viability in isolated perfused skin preparation.
Brit. J. Dermatol. 116, 739- 741
70. SCHEDENOV, W. N. (1962):
Anatomia krolika.
Gasudarstwenoje Isdatjelstwo "Sowjetskaja Nauka", Moskwa.
71. SCHULZ, L.- C. (1991):
Pathologie der Haustiere, Teil 1.
Gustav Fischer, Jena.
72. SCHULZE, H. (1975):
Das Kaninchen (Wild- und Hauskaninchen).
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 82, 181- 220
73. SMOLLICH, A.; MICHEL, G. (1992):
Mikroskopische Anatomie der Haustiere. 2. Auflage.
Gustav Fischer, Jena- Stuttgart.
74. SPEARMAN, R. I. C. (1970):
Some light microscopical observations on the stratum corneum of the guinea-pig,
man and common seal.
Brit. J. Dermtol. 83, 582- 590
75. STÜTTGEN, G. (1972):
Die Haut als Resorptionsorgan in pharmakokinetischer Sicht.
Arzneim.- Forsch. 22, 324- 329

76. SUHAILA, A., TAI, A. u. GRAHAM, J. D. P. (1972):
The actions of prostaglandins E₁ and F_{2α} on the perfused vessels of the isolated rabbit ear.
Brit. J. Pharmacol. 44, 699- 710
77. URBAIN, B., GUSTIN, P. u. ANSAY, M. (1992):
Endotoxin- induced microvascular injury in isolated and perfused pig lungs.
Vet. Res. Communic. 61, 453- 464
78. VOIGT, R. (1993):
Pharmazeutische Technologie für Studium und Beruf. 7. Auflage.
Ullstein- Mosby, Berlin.
79. WAGNER, G. (1970):
Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie. 2. überarb. Auflage.
Volk und Gesundheit, Berlin.
80. WARD, L. C. u. BUTTERY, P. J. (1979):
The patho- physiological basis for tests of viability in isolated perfused organs.
Biomedicine 30, 181- 186
81. WARNER, R. R., MYERS, M. C. u. TAYLOR, D. A. (1988):
Electron probe analysis of human skin: Determination of the water concentration profile.
J. Invest. Dermatol. 90, 218- 224
82. WILSON, D. J. und GENTRY, P. A. (1985):
T- 2 toxin can cause vasoconstriction in an in vitro bovine ear perfusion system.
Toxicol. appl. Pharmacol. 79, 159- 165
83. WURZEL, M., BACON, R. C., KALT, R. B. und ZWEIFACH, B. W. (1964):
Vasoactive properties of plasma protein fractions.
Am. J. Physiol. 206, 923- 925

84. ZESCH, A. u. SCHÄFER, H. (1976):
Penetration, Permeation und Resorption von Heparin: In vivo Untersuchungen an der menschlichen Haut.
Arzneim.-Forsch. 26, 1365- 1368
85. ZESCH, A. (1989):
Verträglichkeitsaspekte von Transdermalsystemen aus dermatologischer Sicht.
Arzneim.-Forsch. 38 (II), 1497- 1500
86. ZIEGLER, E. u. BLATTNER, R. (1967):
The uptake and release of noradrenalin in the blood vessels of the isolated rabbit ear under aerobic and anaerobic conditions.
Arzneim.-Forschg. 17, 726- 729

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. W. Heinze danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die Möglichkeit, die Arbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FU Berlin - Standort Mitte anfertigen zu können. Den Mitarbeitern des Instituts, besonders aber Frau Münch, danke ich für die stets vorhandene Hilfsbereitschaft und für die gewährte Unterstützung. Bei Katja Brandt möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bei der Entwicklung des Modells bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Dargel und seinen Mitarbeiterinnen vom Labor der Medizinischen Tierklinik der FU Berlin für die Hilfe bei den Untersuchungen der Blutproben.

Frau Birkelbach aus der Poliklinik für Geburtshilfe und Fortpflanzungsstörungen der FU Berlin danke ich für die Hilfe bei den Testosteronbestimmungen.

Bei Frau Dr. Hünigen bedanke ich mich herzlich für die freundliche Unterstützung bei den histologischen Untersuchungen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen, die mir beim Abfassen der Arbeit in irgendeiner Weise behilflich waren, insbesondere Oliver Alex, Janett Dreier, Stefan Hauff und Christine Magerski.

Tabellarischer Lebenslauf

Name: Manja Hartig
Geburtsdatum: 16. 05. 1970
Geburtsort: Cottbus
Wohnort: Robert- Koch- Str. 4, 44135 Dortmund

Schulbildung: 1976- 1986 Besuch der Allgemeinbildenden Polytechnischen
Oberschule in Berlin- Pankow.
Abschluß: „Mit Auszeichnung“

1986- 1989 Berufsausbildung mit Abitur zum Facharbeiter für
Tierproduktion im Schweinezucht- und Mastbetrieb
Eberswalde- Finow.
Abiturnote: „Mit Auszeichnung“
Facharbeiterabschluß: „Sehr Gut“

Studium: 1989- 1995 Studium der Veterinärmedizin an der
Humboldt Universität zu Berlin, seit August 1993
Freie Universität Berlin.
Abschluß des Staatsexamens im April 1995.
Abschlußnote: „Befriedigend (2,54)“

Dissertation: Seit 1993 Arbeitstitel „Entwicklung eines Hautperfusionsmodells
am Kaninchenohr mit geschlossenem Kreislauf und
Erprobung mittels einer öligen Testosteronlösung“.
Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Freien Universität Berlin, Standort Mitte.