4. Eigene Untersuchungen

Unterschiede im Penetrationsverhalten topisch applizierter Stoffe durch die Haut innerhalb verschiedener Tiere, sowie auch zwischen Mensch und Tier, können nur durch die Untersuchung der penetrationsbestimmenden physiologischen Gegebenheiten dieser äußeren Barriere geklärt werden.

Haarfollikeldichte und -größe werden bestimmt, um den potentiellen Einfluss der Follikel auf die Penetration abschätzen und vergleichen zu können. Die Anteile der Hauptkomponenten Cholesterol, Ceramide, freie Fettsäuren und Cholesterolester in der isolierten Stratum corneum Lipidmatrix verschiedener Spezies werden analysiert und deren Bedeutung für das unterschiedliche Penetrationsverhalten durch den Vergleich mit der Hautpermeabilität der einzelnen Tiere diskutiert.

Es ist einleuchtend, dass bei der vergleichenden Untersuchung einheitliche Methoden gewählt werden müssen. Die Vermessung der Haarfollikel, sowie die Analyse der Lipide im Stratum corneum, erfolgt daher für jede Spezies nach dem gleichen Verfahren.

4.1 Methoden zur Vermessung der Haarfollikel

4.1.1 Hautoberflächenbiopsie mit Cyanacrylat

Für die Vermessung der Haarfollikel verschiedener Tiere wurde das Cyanacrylat (UHU® Sekundenkleber, UHU GmbH, Brühl) auf die trockene und saubere Hautoberfläche aufgetragen und sofort mit einem Klebestreifen bedeckt. Bei dichtem Haarkleid war es erforderlich, die entsprechende Stelle vorher trocken zu rasieren. Nach 10 Minuten war der Kleber vollständig gehärtet. Der Klebestreifen wurde ruckartig abgerissen und auf einen Objektträger geklebt. Die so erhaltenen Follikelabgüsse wurden anschließend lichtmikroskopisch untersucht und vermessen.

4.1.2 Spalthautentnahme beim Schwein

Beim Schwein ist die Follikelteilbiopsie mit Cyanacrylat nur unbefriedigend. Dies liegt zum einen darin begründet, dass die Primärhaare bis zu 5 mm tief in die Haut eingesenkt und fest im Unterhautfettgewebe verankert sind [Meyer 1986]. Auch der relativ spitze Einsenkungswinkel der Primärfollikel [Meyer 2001] führt dazu, dass sich die Borsten schwer extrahieren lassen. Diesem Problem konnte begegnet werden, indem Spalthaut der äußeren Ohrhaut entnommen wurde. Dabei wurde die Haut parallel zur Oberfläche geschnitten. Die Primärhaarfollikel wurden somit im unteren Teil durchtrennt. Folglich konnte der in der Haut verbliebene obere Teil durch das Cyanacrylat leicht gelöst werden.

Das Dermatom (Aesculap® Typ GA 140, Aesculap Werke AG 72, Tuttlingen) ermöglicht es, Haut in einer definierten Dicke zu schneiden. In der Dermatochirurgie werden mit diesem Gerät Hautareale für Transplantationen zugeschnitten. Für die Spalthautentnahme wurde eine Schnittdicke von 0,7 mm eingestellt. Das Schweineohr wurde rasiert und auf einer Unterlage so befestigt, dass es flach aufliegt. Beginnend am Ohrrand wurde das Dermatom mit starkem Druck über die Haut geführt. Die abgetrennte Hautschicht wurde von einer zweiten Person mit zwei Pinzetten entnommen. Auf der ausgebreiteten Spalthaut erfolgte der Cyanacrylatabriss wie bereits beschrieben.

4.1.3 Lichtmikroskopie und digitales Bildimaging

Die Follikelteilbiopsie stellt einen Abguss des Infundibulums dar, der lichtmikroskopisch betrachtet und vermessen werden kann. Lichtmikroskopie beruht auf dem Prinzip von Reflektion und Transmission von Licht mit Wellenlängen des sichtbaren Spektrums. Unter dem Mikroskop (Olympus BX60M System Mikroskop) stellen sich die Infundibulaabgüsse mit den eingeschlossenen Haaren als dreidimensionale Objekte dar. Durch ein entsprechendes Software-Programm (analySIS®, Soft Imaging System SIS, Münster) wird die Vermessung dieser Abgüsse möglich. Das Programm berechnet aus dem dreidimensionalen Follikel ein zweidimensionales Bild, eine sogenannte EFI-Abbildung (Extended Focal Imaging), indem es mit einer Tischautomatik durch die gesamte z-Ebene des Objektes fährt. Der Wert für die gesamte Objekttiefe wird als z-Distanz angegeben. Anhand der so abgebildeten Aufnahmen können die Infundibula direkt am Bildschirm vermessen werden.

Folgende Größenparameter des Follikels werden direkt gemessen:

- Durchmesser der Follikelöffnung (d_g)
- Haarschaftsdurchmesser (d_k)
- Gesamtlänge des Follikels (Basisstrecke e)
- Länge des Infundibulums (l)

Vor der Vermessung wurden die Cyanacrylatabrisse aller 6 Tiere einer Spezies untersucht und nach der Gleichförmigkeit der Follikel beurteilt. Bei Tieren, deren Follikel sich hinsichtlich der Größe stark unterschieden, wurde eine Einteilung in „groß“, „mittel“ und „klein“ vorgenommen. Jeder Follikel in dem auszuzählenden Quadratzentimeter wurde einer der drei Gruppen zugeordnet. Somit wurde der durchschnittliche prozentuale Anteil der „kleinen“, „mittleren“ und „großen“ Follikel ermittelt. Dieser bildete die Grundlage für die Auswahl der zu vermessenden 50 Follikel je Tier. Wenn demnach zum Beispiel lediglich 10% aller Follikel als „groß“ eingestuft wurden, wurden aus dieser „Kategorie“ nur 5 Follikel vermessen. Mit diesem einheitlichen Auswahlmuster war sichergestellt, dass interindividuelle Unterschiede durch Messfehler möglichst gering gehalten wurden.

4.1.4 Die Berechnung der Porenfläche, der Follikeloberfläche und des Volumens

Anhand der ermittelten Follikelparameter wurden die Porenfläche, das Volumen und die Gesamtoberfläche aller Follikel in einem Quadratzentimeter bestimmt. Die Berechnung der Porenfläche A_P erfolgte durch Einsetzen des Porendurchmessers d_g in die Kreisflächenformel:

$$A_P = \pi r^2 \qquad \text{(Gl.1)}$$

Da die Follikel schräg in die Haut eingesenkt sind, entspricht die Objekttiefe (z-Distanz) nicht der tatsächlich bestehenden Follikellänge. Analog ist die in der EFI-Abbildung gemessene Basisstrecke e nicht identisch mit der wahren Follikellänge. Für deren Bestimmung wurde daher der Satz des Pythagoras angewendet:

$$z^2 + e^2 = l^2 \qquad \text{(Gl.2)}$$

Mit dem erhaltenen Wert wurde die Länge des Infundibulums ebenfalls korrigiert. Aufgrund der glockenähnlichen Form des Infundibulums lässt es sich schematisch als Kegel darstellen. Dabei entspricht die korrigierte Länge l_i der Kegelhöhe h_i, der Porendurchmesser d_g dem unteren, und der Haardurchmesser d_k dem oberen Kegeldurchmesser. Mit den entsprechenden Formeln ist somit die Berechnung von Oberfläche (A_i) und Volumen (V_i) möglich:

$$A_i = \pi s\ (d_g/2 + d_k/2) \qquad \text{(Gl.3)}$$

$$s = (d_g/2 - d_k/2)^2 + h_i \qquad \text{(Gl.4)}$$

$$V_i = \pi/12 h_i\ (d_g^2 + d_k^2 + d_g d_k) \qquad \text{(Gl.5)}$$

Bei der Berechnung der Oberfläche wurden die Deckplatten weggelassen. Für die exakte Bestimmung des Follikelvolumens war es notwendig, das Volumen des im Infundibulum befindlichen Haares (V_h) zu berechen und dieses vom Gesamtwert zu subtrahieren. Bei zusammengesetzten Follikeln, bei welchen mehrere Haare als Bündel durch ein gemeinsames Infundibulum nach außen treten, wurde das Haarbündel als ganzes an seiner schmalsten Stelle erfasst und mit diesem Wert das Volumen (V_h) für die Gesamtheit aller im Follikel befindlichen Haare kalkuliert. Dafür wurde die folgende Formel verwendet:

$$V_h = \pi r^2 h \qquad \text{(Gl.6)}$$

Die Werte aller vermessenen Follikel eines Körperareals wurden gemittelt und mit der entsprechenden Dichte multipliziert. Das Ergebnis repräsentiert die Gesamtoberfläche, das Volumen aller Follikel, sowie den Anteil der Follikelöffnungen in einem Quadratzentimeter Haut.

4.1.5 Bestimmung der Follikeldichte

4.1.5.1 Die Hautoberflächenbiopsie mit Cyanacrylat

Mit Hilfe der Hautoberflächenbiopsie wurde die Follikeldichte lichtmikroskopisch bestimmt. Dazu wurde auf der Rückseite des Objektträgers auf eine Folie kopiertes Millimeterpapier geklebt und eine Fläche von 1 cm² mit einem wasserfesten Filzstift markiert. Alle Follikel innerhalb dieses Areals wurden unter dem Mikroskop ausgezählt. Wegen der größeren Genauigkeit erfolgte die Follikelzählung bei Tieren mit sehr hoher Dichte auf lediglich einem Viertel der Fläche, worauf der Wert mit vier multipliziert wurde.

4.1.5.2 Photographie der Hautoberfläche

Zusätzlich zum Auszählverfahren wurden zur Follikeldichtebestimmung bei Tieren zwei andere Verfahren herangezogen: die digitale Photographie der Borsten beim Schwein und die Sichtbarmachung der Haare im TrichoScan bei allen anderen untersuchten Tierarten. Meyer *et al.* (2001) zeigten anhand makroskopischer und mikroskopischer Follikeldichteanalyse des Schweineohrs, dass die Primärhaare (PH) an der Dorsalfläche mit Ausnahme der Ohrspitze und der freien Ränder sehr homogen verteilt sind.

Die Dichte der Primärhaare allerdings schwankte zwischen 19 und 36 PH/cm². Da die follikulären Größenparameter auf jeweils einen Quadratzentimeter kalkuliert wurden, war eine möglichst exakte mittlere Dichteangabe vonnöten. Die digitale Photographie ist ein einfaches und sicheres Verfahren, um beim Schwein die makroskopisch gut sichtbaren Primärhaare darzustellen und andererseits auch die weniger gut erkennbaren Sekundärhaare zu erfassen. Im Gegensatz dazu sind die Haare, respektive die Haarbündel, bei den untersuchten Tieren mit sehr viel dichterem Fell dünner und zarter und damit viel schlechter sichtbar. Mit dem TrichoScan war es durch eine starke Vergrößerung möglich, auch diese zu erfassen.

4.1.5.2.1 Färben der Haare bei den verschiedenen Tieren

Für die Follikeldichtebestimmung mit Hilfe optischer Methoden waren die meisten Haare zu kontrastarm. Daher war es zunächst erforderlich, das Fell zu färben. Als Färbelösung wurde herkömmliche Haarfarbe (Si naturelle® Loréal Paris, Frankreich) auf die gesamte äußere Oberfläche des Schweineohrs aufgetragen. Nach einer Einwirkzeit von 45 min wurde diese mit Leitungswasser entfernt und das Ohr trockengerieben.

Bei Kaninchen, Katze, Maus, Meerschweinchen und Ratte erfolgte die Färbung mit herkömmlicher Augenbrauen- und Wimpernfarbe (Refectocil® Gschwentner Haarkosmetik, Wien). Diese besteht aus zwei Komponenten und wird unmittelbar vor der Verwendung angerührt indem eine Spatelspitze Färbemasse mit 4 Tropfen Entwicklerlösung versetzt wird. Vor dem Auftragen wurde das Fell an der entsprechenden Stelle bis auf 1 – 2 Millimeter gekürzt. Nach Beendigung der Einwirkzeit von 45 Minuten wurde die Farbe mit nassen Papiertüchern abgerieben. Da die Haare beim Hund und bei Affen dicker und kontrastreicher sind, war die vorherige Färbung bei diesen Tieren nicht zwingend notwendig.

4.1.5.2.2 Digitale Photographie und Bildbearbeitung

Da die Spalthautentnahme über große Flächen des gesamten Schweineohrs erfolgte und die Cyanacrylatabrisse zufällig über die Spalthaut verteilt entnommen wurden, erfolgte die Dichtebestimmung an vier verschieden Stellen:

1. 1 cm unterhalb des Margo antragicus proximal, am Übergang zur Cauda helicis
2. 1 cm unterhalb des Margo antragicus distal, nahe der Ohrspitze
3. in der Mitte des Ohres, distal der Ohrmarkenstelle
4. 1 cm unterhalb des Margo tragicus, auf halber Länge

An den bezeichneten Arealen wurde eine Fläche von jeweils 1 x 1 cm mit einem wasserfesten Filzstift markiert und nummeriert. Das Kürzen der Haare mit einer Schere erleichterte das spätere Auszählen.

Als digitale Kamera diente eine Olympus Camedia C-2000 Zoom (2.110.000 Bildpunkte, 3faches Zoomobjektiv, 32 MB Smart Media Speicherkarte) mit Makroaufsatz (macro coversion lens, f = 40 cm). Das Hautareal wurde aus einer Entfernung von 20 cm aufgenommen. Mit dem entsprechenden Software-Programm (Olympus Camedia Master 1.1., ©1998, Image Software, OLYMPUS OPTICAL CO., LTD.) wurde das Bild auf einen Rechner geladen. Mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogamms (Adobe® Photoshop® 5.5) ist es möglich, das Bild weiter zu vergrößern und die in dem Hautareal wachsenden Haare zu markieren, um Mehrfachzählen zu vermeiden.

4.1.5.2.3 TrichoScan

Mit dem TrichoScan werden in der humandermatologischen Diagnostik zwei Ansätze verfolgt. Zum einen kann ein Trichogramm erstellt werden. Zum anderen ermöglicht es die Bestimmung der Haarzahl, der Haardichte von Vellus- und Terminalhaaren, sowie des Anteils an anagenen und katagenen Haare. Somit können beispielsweise auch Therapieverläufe von Alopezien kontrolliert werden [Hoffmann 2002]. Das Gerät (FotoFinderSystems Inc., Columbia, USA) besteht aus einer Auflichtmikroskopieoptik, in die eine Kamera integriert ist, und einem Rechner mit entsprechendem Software-Progamm. Mit Hilfe eines aufsteckbaren Plastiktubus wird die Optik luftblasenfrei auf das noch nasse Hautareal gedrückt. Nach Scharfstellung wird zunächst eine Übersichtsaufnahme angefertigt. Je nach Objektgröße kann anschließend die 20fache, 40fache, 60fache oder 70fache Vergrößerung gewählt werden. Für die Analyse werden die Bilder in die TrichoScan-Software geladen. Aufgrund der Vielzahl, der geringen Dicke und der schlechteren Anfärbbarkeit der Haare war es bei Tieren mit dichtem Fell im Gegensatz zum Menschen nicht möglich, eine korrekte Dichteanalyse mit dem TrichoScan durchzuführen. Die aufgenommenen Bilder wurden daher auf einem externen Datenträger gespeichert, und, analog zur Borstendichtebestimmung am Schweineohr, im Bildbearbeitungsprogamm ausgezählt. Um eine Information über die Größe des ausgezählten Areals zu erhalten, wurden vorher Aufnahmen von Millimeterpapier in der gleichen Vergrößerung angefertigt. Im Bildbearbeitungsprogramm wurden die beiden Aufnahmen übereinander gelegt.

4.1.5.2.4 Nikon Coolpix Optizoom

Die Nikon Optizoom Kamera wurde verwendet, wenn es aus organisatorischen Gründen unmöglich war, das Tier mit den TrichoScan zu untersuchen. Das Gerät arbeitet jedoch in ähnlicher Weise. Es besteht aus einer digitalen Kamera mit einer aufschraubbaren Optik, in die ein Plastiktubus integriert ist, der direkt auf das Hautareal gesetzt wird. Nach Einstellung des Menüprogramms für makroskopisch kleine Aufnahmen kann das Objekt mit Hilfe des Zooms stark vergrößert aufgenommen werden.

4.1.6 Studiendesign für die Vermessung der Haarfollikel bei verschiedenen Tieren

Die Studie wurde von Oktober 2004 bis August 2005 durchgeführt. Die Probennahme bei Maus, Ratte und Schweineohr, sowie die Auswertung aller Proben, erfolgte im Bereich experimentelle Hautphysiologie der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité Universitätsmedizin Berlin. Hingegen wurden die Cyanacrylatabrisse bei den Affen, Hunden, Kaninchen, Katzen und Meerschweinchen in den Räumlichkeiten der jeweiligen Eigentümer entnommen.

4.1.6.1 Tierarten

In erster Linie wurden für die Untersuchung Tiere ausgewählt, die häufig als kleine Haus- und Heimtiere gehalten und bei denen Dermatotopika therapeutisch eingesetzt werden (Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, begrenzt Ratte und Maus). Darüber hinaus wurden die Tierarten für die Untersuchung herangezogen, die häufig im Dienste der Forschung eingesetzt werden und für die demnach im Hinblick auf die Vergleichbarkeit, sowohl mit der Haut des Menschen, als auch der Kleinsäuger untereinander, die Notwendigkeit für die Quantifizierung penetrationsbeeinflussender Faktoren besteht (Affe, Schweineohr, Maus, Ratte, Kaninchen, Meerschweinchen). Tabelle 1 (S. 32) gibt den Umfang der beprobten Spezies einschließlich deren spezifischer Merkmale wieder.

Tabelle 1: Beschreibung der für die Haarfollikelvermessung verwendeten Tiere

Tierart	Rasse/Stamm	Geschlecht/Anzahl	Alter	Gewicht	Euthanasie
Affe	Makaka cynomolgus	weiblich (2) männlich (2)	4 Jahre 5 Jahre	3,8-4,1 kg 5,4-6,8 kg	ketavet®
Hund	Beagle	männlich (6)	1-2 Jahre	8-12 kg	ketavet®
Kaninchen	Deutsches Hauskaninchen	weiblich (4) männlich (2)	2 Jahre	4-5 kg	ketavet®
Katze	Europäisch Kurzhaar	weiblich (4) männlich (2)	0,5-7 Jahre	1-5 kg	Narcoren®
Maus	BALP	weiblich (6)	6 Wochen	20 g	Atlantookzipital-dislokation
Meerschwein	englisches Glatthaarmeerschwein	weiblich (3) männlich (3)	4 Monate	200-400 g	ketavet®
Ratte	Wistar, Spraque Dawley	männlich (6)	3 Monate	250 g	Narcoren®
Schwein	Deutsche Landrasse	unbekannt (6)	7-8 Monate	unbekannt	Schlachtung

Für die Beprobung wurden, mit Ausnahme der Katzen, ausschließlich gesunde Tiere herangezogen. Keines der Tiere zeigte Hinweise auf Alopezie, dermatologische Erkrankungen oder hormonelle Dysregulationen. Alle Tiere waren normalgewichtig.

Bei den untersuchten Tieren handelte es sich ausschließlich um kurz vorher getötete Tiere. Dies liegt vor allem darin begründet, dass die Entnahme von Cyanacrylatabrissen an toten Tieren problemlos möglich ist, solange die Beprobung rasch nach Eintritt des Todes durchgeführt wird. Für die Durchführung an lebenden Tieren bestand daher keine Notwendigkeit.

Die Mäuse und Ratten entstammten Negativkontrollen aus Versuchen zweier Arbeitsgruppen in der Klinik für Infektiologie der Charité Berlin. Die vier Makaken, die Beagle, die Meerschweinchen und die Kaninchen kamen aus Negativkontrollgruppen der Firma Schering Berlin und wurden nach der Sektion für die Beprobung zur Verfügung gestellt.

Bei den Katzen handelte es sich um aus Tierschutzgründen euthanasierte Individuen. Zwei der Tiere wurden aufgrund von multiplen Frakturen nach Unfällen, eine Katze wegen chronischen Nierenversagens, und eine weitere aufgrund einer hypertrophen Kardiomyopathie eingeschläfert. Ein Tier mit einer Diaphragmahernie verstarb intraoperativ. Alle Tiere wurden spätestens 3 Stunden post mortem beprobt.

Die Schweineohren stammten vom Schlachthof. Sie wurden unmittelbar nach dem Entbluten, jedoch noch vor dem Brühen, abgetrennt. Bei 4 ºC gekühlt, wurden alle Schweineohren spätestens am nächsten Tag für den Versuch verwendet.

4.1.6.2 Versuchsdurchführung

Vor der weiteren Verwendung wurden die Schweineohren gründlich unter fließendem lauwarmem Leitungswasser gereinigt, sowie Ohrgrund und äußerer Gehörgang mit einem Skalpell abgetrennt. Das jeweils rechte Ohr eines Tieres wurde für die Follikeldichtebestimmung durch Einfärben und digitale Photographie herangezogen, während das linke Ohr der Entnahme von Spalthaut und Cyanactylatabrissen diente. Von der Spalthaut wurden so viele Abrisse wie möglich entnommen. Bei Maus, Ratte, Meerschweinchen und Kaninchen erfolgte die Beprobung dorsal auf der linken Körperhälfte: im thorakalen Rückenbereich, paravertebral, fingerbreit hinter der Scapula. Vor Entnahme der Cyanacrylatabrisse musste das Fell in einem etwa 3 x 3 cm großem Areal (Maus entsprechend kleiner) gekürzt und rasiert werden.

Anschließend erfolgten mehrere Abrisse in der genannten Region. Das bezeichnete Areal auf der rechten Körperhälfte wurde für die Dichtebestimmung mit dem TrichoScan vorbereitet. Die Lokalisation der Cyanacrylatabrisse beim Hund und bei der Katze bezog sich ebenfalls auf den paravertebralen Bereich des Rückens, kaudal der Scapula. Vor der Entnahme der Abrisse wurden die Haare mit der Schermaschine auf einer Fläche von 3 x 3 cm geschoren. Das gekürzte Fell neben dem beprobten Areal wurde ohne vorherige Färbung mit der digitalen Kamera Nikon Coolpix® bei starker Vergrößerung photographiert, um anhand dieses Bildes die Dichtebestimmung durchführen zu können. Bei den Affen erfolgte die Beprobung an jeweils zwei verschiedenen Körperstellen: am Sternum, etwa handbreit über dem Manubrium sterni und am Rücken, Regio scapularis ungefähr in Höhe des 5. Brustwirbelkörpers.

Die Entnahme der Hautoberflächenbiopsien, sowie die Follikeldichtebestimmung, wurden analog zu der des Hundes durchgeführt. Bei der anschließenden Auswertung der Proben wurden von jedem Tier, beim Affen von jeder Lokalisation, 50 Follikel vermessen.

4.2 Methoden zur Analyse der interzellulären Lipide des Stratum corneum

4.2.1 Vorbereitung der Haut

Das entsprechende Hautareal mit einer Größe von ca. 15 x 15 cm wurde unmittelbar nach dem Tod des Tieres mit dem Skalpell extrahiert und in feuchte, saubere Tücher eingeschlagen und gekühlt zum Labor transportiert. Beim Schweineohr wurden die Epidermis, sowie der obere Teil der Dermis, mit dem Dermatom vom darunterliegenden Gewebe getrennt. Damit soll eine Kontamination der Probe durch subkutanes Fettgewebe vermieden werden. Die exzidierte Haut der anderen Spezies wurde mit dem Skalpell vom anhaftenden subkutanen Fettgewebe befreit. Anschließend wurden die Haare mit einer Schere auf maximal einen Millimeter Länge gekürzt. Die Hautoberfläche wurde vorsichtig mit einem feuchten Tuch von eventuellen Verschmutzungen befreit und getrocknet. Die Inkubation der Proben in 2,4 U/ml Dispaselösung gewährleistet eine Abtrennung der Epidermis von der Dermis. Dispase ist eine bakterielle Protease und spaltet im Bereich des Stratum basale. Nach 3 - 4 Stunden im Brutschrank bei 38 °C lässt sich die Epidermis mit zwei Pinzetten leicht lösen.

4.2.2 Separierung des Stratum corneum

Für die Analyse der Lipidkomposition im Stratum corneum ist es erforderlich, dieses von den darrunterliegenden Schichten der Epidermis zu trennen. Dazu wurde die Epidermis mit der äußeren Oberfläche nach oben auf Filterpapier gelegt, welches mit einer 0,5 %igen Trypsinlösung in PBS Puffer (pH 7,4) getränkt war. Trypsin ist eine Protease aus der Bauchspeicheldrüse. Das Enzym ist in der Lage, die Proteine der Desmosomen aufzuspalten. Nach Inkubation für 16 Stunden bei 4 ºC lässt sich die Hornzellschicht mit einer Pinzette von den zerstörten unteren Zellschichten lösen.

Um eventuell anhaftende Zellreste zu entfernen, wurde die Probe in destilliertem Wasser gespült und erneut auf frischer Trypsinlösung für 3 Stunden bei 38 ºC im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das separierte Stratum corneum in ein mit destilliertem Wasser gefülltes Reagenzglas gegeben und gevortext. Dieser Prozess wurde mehrmals wiederholt, um sicher zu stellen, dass die Probe völlig frei von Zell- und Geweberesten ist. Das gereinigte Stratum corneum wurde in ein gewogenes 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt.

4.2.3 Kontrollmethoden

Der Erfolg der Separierung des Stratum corneum wurde durch zwei verschiedene Methoden verifiziert. Zum einen wurde die präparierte Schicht gefärbt und mikroskopisch betrachtet, zum anderen erfolgte eine Kontrolle mit dem Laser – Scan – Mikroskop.

4.2.3.1 Histologische Untersuchung

Zum Nachweis und zur Unterscheidung der Zellen wurde das Stratum corneum mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Hämatoxylin ist ein Pflanzenfarbstoff, welcher aus Blauholz gewonnen wird. Durch Oxidierung und Zugabe von Alaunen entsteht der Farbstoff Hämalaun. Dieser ist positiv geladen und bindet an alle sauren „basophilen“ Gewebebestandteile. Schleimbestandteile, Bakterien, Kalk und vor allem Zellkerne werden somit blau gefärbt. Eosin hingegen ist negativ geladen und färbt Verbindungen mit positiver Ladung. Da somit vor allem Eiweiße angefärbt werden, stellt sich das Zytoplasma von Zellen rötlich dar [Burck 1982].

Das präparierte Stratum corneum wurde in zwei Teile gespalten. Während ein Teil mit der Oberfläche nach oben auf den Objektträger gelegt wurde, wird die andere Hälfte gedreht, so dass es mit der Unterseite nach oben zu liegen kommt. Nachdem die Präparate über Nacht getrocknet waren, wurden sie nach entsprechender Anleitung gefärbt. Das kernlose Stratum corneum erscheint durch die HE - Färbung leuchtend rot. Hingegen stellen sich sowohl die Zellkerne, als auch die Keratohyalingranula der Granulosazellen blauviolett dar. Bei der anschließenden mikroskopischen Untersuchung konnte das Stratum corneum nun von zwei Seiten betrachtet werden. Dabei werden die großen, kernlosen hexagonalen Korneozyten von eventuell vorhandenen Granulosazellen unterschieden.

Letztere sind um das bis zu 3fache kleiner [Militzer 1982] und besitzen einen vollständigen Zellkern.

4.2.3.2 Laser – Scan – Mikroskopie

Die Untersuchung mit dem Laser - Scan - Mikroskop „Stratum“ (OPTISCAN Pty. Ltd., Notting Hill, Victoria, Australia) erlaubt eine histologische Darstellung der Haut *in vivo*. Durch die Kombination eines Laserlichtes und dem Einsatz eines optischen Systems können die epidermalen Schichten bis zu einer Tiefe von 200 µm dargestellt und beurteilt werden. Eine enzymatisch separierte Stratum corneum Probe wird auf einen plastischen Untergrund gelegt und mit einem Tropfen Fluoreszein versehen. Der Messkopf wird auf die Probe gesetzt und die erzielten Strukturen am Bildschirm ausgewertet.

4.2.4 Lipidextrahierung

Das separierte Stratum corneum wurde im Eppendorfgefäß bei –20°C über Nacht eingefroren. Im gefrorenen Zustand wurde die Probe auf Styropor gebettet in den Eppendorf-Lyophilisator gegeben und gefriergetrocknet. Durch anschließendes Wiegen wurde das Trockengewicht der Stratum corneum Probe bestimmt. Bei den im Vergleich zum Schwein stärker behaarten Hunden, Katzen und Kaninchen wird bei der Separierung des Stratum corneum eine bestimmte Anzahl an Haaren mit extrahiert. Diese führen zu einer Verfälschung des eigentlichen Trockengewichtes. Zur Korrektur wurde die Stratum corneum Probe nach der Extraktion im Alkoholgemisch (s.u.) noch einmal für 10 Stunden in 10%iger Trypsinlösung inkubiert und anschließend für eine Stunde in ein Ultraschallbad bei 60°C gestellt. Damit sollten noch vorhandene Zellkontakte gelöst werden, so dass das Gewebe zerfällt und Haare von Zellresten befreit werden. Anschließend wurde das angedaute Zellmaterial der Probe durch ein engmaschiges Teesieb gefiltert, wobei die Haare im Sieb hängen blieben. Diese wurden in einem mit Wasser gefülltem Becherglas ausgewaschen, durch Gaze gefiltert, getrocknet und gewogen. Das ermittelte Haargewicht wurde anschließend vom Stratum corneum Trockengewicht subtrahiert. Die getrocknete Stratum corneum Probe wurde in ein entfettetes Reagenzglas, in dessen Schraubverschluss ein in Alkohol gewaschenes Teflonscheibchen eingelegt wurde, überführt. Dazu wurden 5 ml des Extraktionsmittels Chloroform – Methanol (2:1) pipettiert.

Das Gemisch wurde mehrfach gevortext und lichtgeschützt 10 Stunden stehen gelassen. Die im Extraktionsmittel gelösten Lipide mussten von Geweberesten und anderen Verunreinigungen befreit werden. Dazu wurde die gesamte Flüssigkeit mit einer entfetteten Glaspipette aufgesaugt, und durch eine zweite, mit entfetteter Watte gestopfte Glaspipette in ein neues, gewogenes Reagenzglas laufen gelassen. Das Reagenzglas wurde mit 1 ml Chloroform – Methanolgemisch nachgespült, um anhaftende Lipide mit zu entfernen. Anschließend wurde das Lösungsmittel im kontinuierlichen Stickstoffstrom weggeblasen, wobei die Reagenzgläser auf einer Heizplatte bei 50 °C warm gehalten wurden. Zurück blieben die extrahierten Lipide als feiner Film am Boden des Gefäßes. Dieses wurde erneut gewogen. Durch Subtraktion des Leergewichtes wurde das Lipidtrockengewicht ermittelt.

4.2.5 High Performance Thin Layer Chromatographie (HPTLC)

4.2.5.1 Methodik

Chromatographie (*griechisch; deutsch* = Farbenschreiben) wird in der Chemie als ein Verfahren bezeichnet, das die Auftrennung eines Stoffgemisches in seine Einzelbestandteile erlaubt. Dieses Prinzip wurde erstmals 1903 durch den Botaniker Michail S. Tswett beschrieben. Er untersuchte eintönige Pflanzenfarbstoffe und konnte diese mit Hilfe der Chromatographie in verschiedene Einzelfarbstoffe zerlegen. Die Auftrennung erfolgt, indem Substanzgemische in einer mobilen Phase an einer stationären Phase vorbeibewegt werden. Aufgrund von Wechselwirkungen werden die einzelnen Komponenten unterschiedlich in der stationären Phase festgehalten, und können somit nicht von der mobilen Phase weitertransportiert werden. Dadurch erreichen die Substanzen zu unterschiedlichen Zeiten das Ende der Trennstrecke, bzw. werden nur über eine bestimmte Strecke von der mobilen Phase mitgeführt. Hinsichtlich der mobilen Phasen lässt sich die Chromatographie in Flüssig-, Gas- und überkritische Fluidchromatographie unterteilen. Dünnschichtchromatographie (DC) gehört zur Flüssigchromatographie. Als stationäre oder feste Phase wird eine Trägerplatte aus Kunststoff, Aluminium oder Glas verwendet, die mit sehr feinkörnigem Material wie Kieselgel, Aluminiumoxid oder Cellulose beschichtet ist. Die Platte wird nach dem Auftragen der zu trennenden Substanz in ein Gefäß mit dem geeigneten Fließmittel, der mobilen Phase, senkrecht eingetaucht. Durch Kapillarkräfte wird das Fließmittel in die stationäre Phase nach oben gesaugt und nimmt dabei die aufgetragene Testsubstanz mit.

Dabei wandern kleine Moleküle schneller durch die stationäre Matrix als große. Auf diese Weise wird das Stoffgemisch getrennt. Die getrennten Substanzen müssen anschließend durch Besprühen mit Reagenzien sichtbar gemacht werden. Durch mitgeführte Standardlösungen lassen sich die einzelnen Komponenten identifizieren.

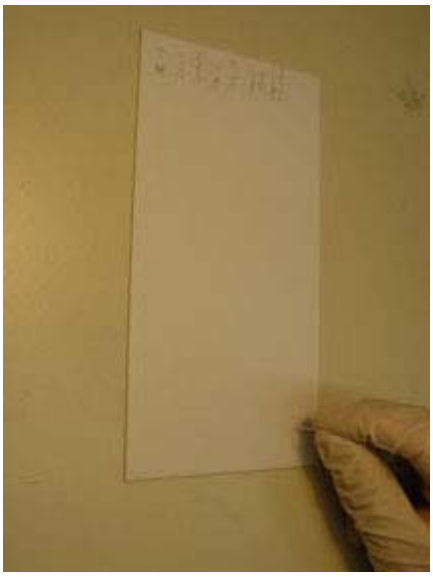
Die HPTLC entspricht dem Prinzip der klassischen DC, stellt jedoch eine weitere Verbesserung hinsichtlich Trennvermögen, Zeitbedarf und Materialverbrauch dar. Die stationäre Phase der HPTLC – Platten liegt auf einem Glasträger und ist mit Schichtdicken von 0,1 – 0,2 mm wesentlich dünner aufgetragen als bei konventionellen DC-Platten. Weiterhin werden für die HPTLC - Platten kleinere und einheitlichere Korngrößen eingesetzt. Dies führt zu einer Verbesserung der Trennleistung bei gleichzeitiger Verringerung der Trennstrecke. Die nachweisbaren Banden zeigen eine verbesserte Auflösung. Schließlich sind bei der HPTLC das aufzutragende Probenvolumen sowie der Fließmittelbedarf geringer als bei der klassischen DC [Goppel und Franz 2004].

4.2.5.2 Technische Durchführung

Zunächst wurden die Platten (Merck, Darmstadt) im Trockenschrank auf 110°C erhitzt und dabei von anhaftender Feuchtigkeit befreit. Sie wurden anschließend im Exsikator gelagert. Vor ihrer Verwendung in der DC wurden die vorgesehenen Auftragepunkte mit einem weichen Bleistift markiert. Dabei mussten die acht Auftragungsstellen einen Abstand von jeweils einem Zentimeter zueinander, sowie 1,5 cm zu den Rändern der Platte haben. Zusätzlich wurden bei Platten, auf die der Standard 1 (Tabelle 2, S. 40) aufgetragen werden sollte, Markierungspunkte bei 10 cm und bei 14 cm angebracht.

Für die Bestimmung der Ceramide wurde eine Markierung bei 12 cm eingezeichnet. Das extrahierte Lipidgemisch wird mit 100 µl Chloroform/Methanol (2:1) resuspendiert. Die Standardlösung 1a für Cholesterol und Ölsäure wurde in vier unterschiedlichen Konzentrationen in einer Menge von 1 µl auf jeweils einen Markierungspunkt aufgebracht. Da die Bestimmung von Triglyceriden und Cholesterolestern (Standardlösung 1b) mit Hilfe desselben Fließmittels (Tabelle 2) erfolgte, konnten die einzelnen Verdünnungsstufen dieses Standards zusammen mit den Standardlösungen 1a auf die Markierungspunkte aufgetragen werden. Anschließend wurde 1 µl der Probe mit einer Kapillare auf eine der verbleibenden vier Markierungen aufgebracht. (Abb. 6, S. 39) Die Platte wurde mit den Auftragungsstellen nach unten in ein Glasgefäß gestellt, welches mit dem Fließmittel I (Tabelle 2) gefüllt war.

War die mobile Phase bis zur 10 cm - Markierung gewandert, wurde die Platte herausgenommen, mit einem Fön getrocknet und in das Glasbecken mit dem zweiten Lösungsmittel (Petrolether) gestellt, bis die 14 cm - Markierung erreicht wurde. (Abb. 6) Analog wurden die vier Verdünnungsstufen des Standards für die Bestimmung des Ceramidgehaltes zusammen mit der zu untersuchenden Probe auf eine neue Platte aufgetragen. Das Trennsystem wurde anschließend in das entsprechende Fließmittel gestellt, bis diese zur 12 cm – Markierung aufgestiegen war.



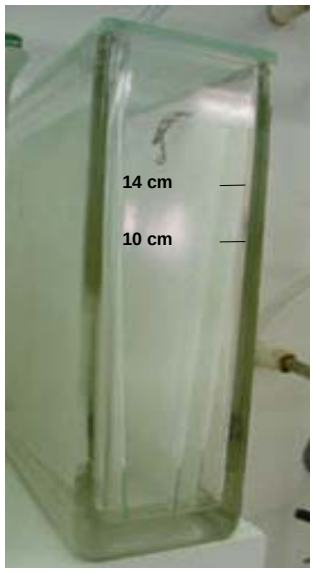


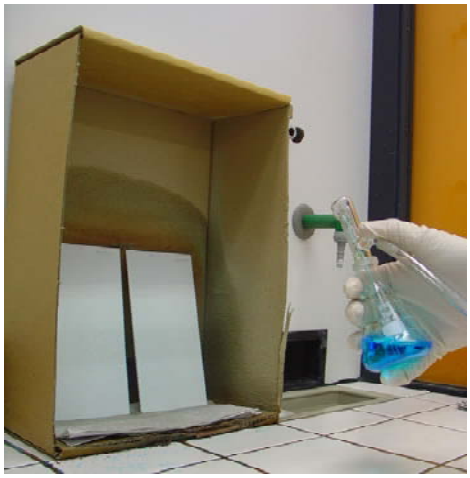
Abb. 6: Lipidanalyse durch HPTLC: ***links:*** Auftragen der Probe auf die DC Platte mit Hilfe einer Kapillare; ***rechts:*** DC Platten in der Trägerflüssigkeit I

Die Standardlösungen enthielten jeweils zwei Vertreter einer Lipidklasse in vier unterschiedlichen Konzentrationen. So wurde beispielsweise Triolein benutzt, um die gesamte Fraktion der Triglyceride zu detektieren. Es handelte sich dabei um ein Glycerin, das mit drei Molekülen Ölsäure verestert ist. Alle verwendeten Standards wurden vor der Analyse frisch angesetzt und lichtgeschützt, sowie gekühlt, aufbewahrt.

Tabelle 2: Standardlösungen, sowie deren benötigtes Fließmittel für die Bestimmung der einzelnen Lipidkomponenten mittels HPTLC

Standard 1	a) Cholesterol + Ölsäure b) Triolein Cholesteryoleat	**Standard 2**	Ceramide III und IV
Verdünnung	35 mg je 5 ml Chloroform/Methanol 15 mg je 5 ml Chloroform/Methanol 1:2 Verdünnung aus 15mg/5ml 1:4 Verdünnung aus 15 mg/5ml	Verdünnung	35 mg je 5 ml Chloroform/Methanol 15 mg je 5 ml Chloroform/Methanol 1:2 Verdünnung aus 15 mg/5ml 1:4 Verdünnung aus 15 mg/5 ml
Fließmittel I Fließmittel II	80 ml Hexan 20 ml Diethylether 10 ml Essigsäure 100% 100 ml Petrolether 40-60	Fließmittel	95 ml Chloroform 4,5 ml Methanol 0,5 ml Essigsäure 100%

Nachdem die Platte getrocknet ist, wird sie für einige Minuten auf eine 110°C heiße Heizplatte gelegt. Zur Sichtbarmachung der Lipidkomponenten wird die Platte mit einer fein vernebelten Lösung aus Kupfersulfat und Phosphorsäure besprüht und anschließend erneut auf die Heizplatte gelegt. Während sie sich von 110°C auf 160°C erwärmt, werden die Wanderungspunkte der einzelnen Lipidfraktionen als braun-violette, runde oder ovale Flächen auf der Platte sichtbar. Farbintensität und Größe dieser Flächen repräsentieren den quantitativen Anteil der jeweiligen Komponente (Abb. 7, S. 41) Die Flächen werden hinsichtlich ihrer Auswertbarkeit überprüft: je nach Farbintensität, Größe und Abgegrenztheit werden die aufzutragende Probenmenge, bzw. deren Konzentration weiter variiert.



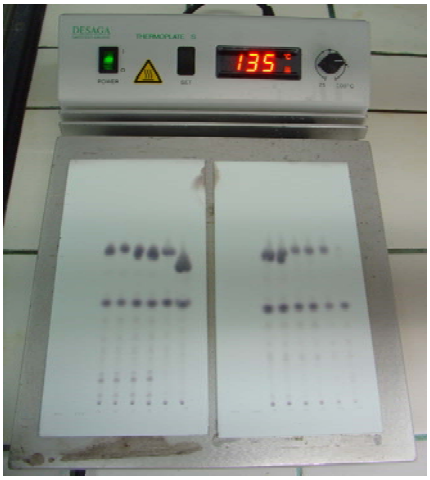


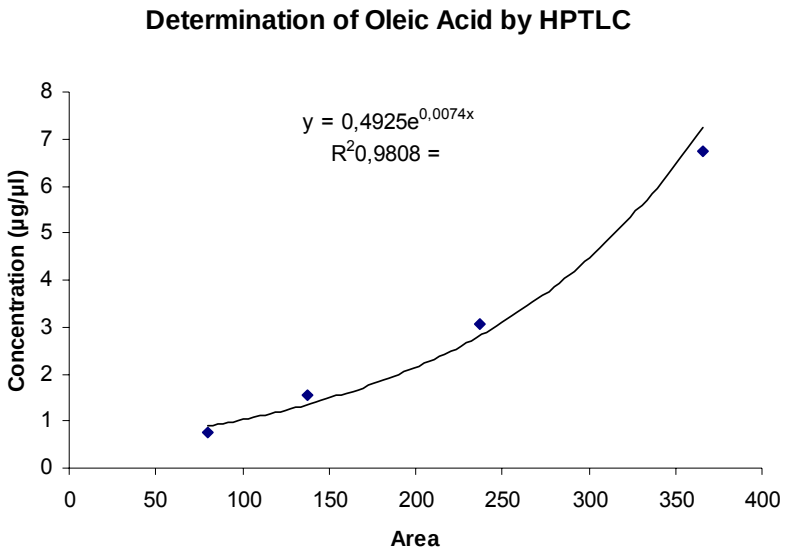
Abb.7: Entwickeln der DC Platten*: **links:*** Besprühen mit Kupfersulfatlösung; ***rechts:*** Sichtbarwerden der Spots durch Hitzeeinwirkung

4.2.5.3 Auswertung

Für die quantitative und qualitative Bestimmung der Lipidanteile mussten die entwickelten Platten zunächst eingescannt werden. Mit Hilfe eines Computerprogramms (TN Image für das Betriebssystem Linux, SUSE®) wurden die Spots der einzelnen Lipidfraktionen, sowie die der verschiedenen Konzentrationen der Standardlösungen, ermittelt. Anhand einer Eichkurve, die für die vier Standardflächen in Microsoft Excel erstellt wurde, konnte die aufgetragene Menge in µg/Spot errechnet werden. Dazu wurde in die aus der Eichkurve ermittelte exponentielle Gleichung der Wert für die Fläche der Probe eingesetzt. Aus der aufgetragenen Menge je Spot ließ sich schließlich der prozentuale Anteil der jeweiligen Lipidfraktion am Trockengewicht des Stratum corneum, bzw. am Gesamtlipidgehalt, errechnen. Abb. 8 (S. 42) zeigt ein Rechenbeispiel.

Abb. 8: Rechenbeispiel für die Ermittlung der Anteile der einzelnen Lipidfraktionen durch Auswertung der HPTLC – Platte

	Y: Konzentration	**X:** Fläche
Standard 1	0,77	80
Standard 2	1,54	136
Standard 3	3,08	237
Standard 4	6,73	366



Fläche Probe A 122 = x

µg/Spot = $0{,}4925\ e^{0{,}0074*122}$

= 1,2

% vom SC Trockengewicht

= µg/Spot * Verdünnung/aufgetragene Menge/10000/SC TG in g

= 1,2 * 200 µl/1µl/10000/0,0192g

= 7,94 %

4.2.6 Studiendesign für die Analyse der Stratum corneum Lipide bei verschiedenen Tieren

Die Analyse der Lipidzusammensetzung im Stratum corneum verschiedener Tiere wurde zwischen Mai und August 2005 durchgeführt. Die Vorbereitung der Hautproben bis zur Extraktion der Lipide erfolgte im Bereich für Experimentelle Hautphysiologie der Klinik für Dermatologie der Charité Berlin, während die eigentliche Analyse mittels Dünnschichtchromatographie am Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie der Universität Saarbrücken durchgeführt wurde.

4.2.6.1 Tierarten

Für die Analyse der Lipide im Stratum corneum wurden vier Vertreter der bisher untersuchten Tierspezies ausgewählt: Hund, Katze, Kaninchen und Schwein. Hinsichtlich der Penetration topisch applizierter Substanzen existieren bei diesen Tieren nach verschiedenen Studien große Differenzen. Demnach wurden für die Untersuchung zum einen Tiere verwendet, deren Hautpermeabilität sich besonders stark unterscheidet. Zum anderen ist die Analyse für Hund, Katze, Kaninchen und Schwein sowohl von veterinär-pharmakologischen Interesse, als auch im Hinblick auf die Einsetzbarkeit als Tiermodelle für die Haut des Menschen von Nutzen.

Die Hunde sowie die Kaninchen stammten aus Kontrollgruppen der Firma Schering Berlin. Bei den Katzen handelte es sich um Tiere, die aus verschiedenen Gründen in einer Tierklinik euthanasiert wurden. Die Schweineohren wurden vom Schlachthof besorgt. Genaue Angaben zu den untersuchten Tieren finden sich unter 3.1.6.1 (S. 30). Das zu beprobende Hautareal wurde bei allen Tieren spätestens drei Stunden post mortem für die Analyse exzidiert.

Bei den Tieren handelte es sich ausschließlich um hautgesunde Vertreter. Die Tiere zeigten weder aktuell Anzeichen von dermatologischen Erkrankungen oder hormonellen Dysregulationen noch litten sie in den letzten Jahren an schweren Erkrankungen. Alle waren normalgewichtig.

4.2.6.2 Versuchsdurchführung

Unmittelbar nach der Euthanasie wurde ein etwa 15 x 15 cm großes Hautareal im Bereich des Rückens exzidiert, in saubere OP – Tücher gelegt und in einer Kühlbox zum Labor transportiert. Im Gegensatz zu den anderen Tierarten, wurden die beprobten Katzen sowohl für die Follikelvermessung, als auch für die Lipidanalyse, herangezogen. Um einen möglichen Einfluss des Cyanacrylats auszuschließen, wurde zunächst Haut für die Lipidbestimmung exzidiert und erst danach Cyanacrylatabrisse angefertigt. Der Prozess der Separierung des Stratum corneum, sowie der Lipidextraktion, erfolgte an vier aufeinander folgenden Tagen. Die Lipide in den Reagenzgläsern wurden sofort nach dem Wiegen bei –20°C eingefroren und innerhalb von zwei Wochen auf Trockeneis gebettet in das Analyselabor verschickt. Dort wurden die Proben sofort analysiert.

4.3 Studiendesign für die Vermessung der Korneozyten bei verschiedenen Tieren

Parallel zu der Analyse der Lipidzusammensetzung wurde das separierte Stratum corneum einer Kontrollfärbung unterzogen. In den Proben der vier Tierarten wurde neben der Untersuchung auf mögliche Reste des Stratum granulosum eine Bestimmung des Korneozytendurchmessers vorgenommen. Demnach wurde die Vermessung beim Hund, bei der Katze, beim Kaninchen und beim Schwein durchgeführt. Für die Trennung des Stratum corneum von darunterliegendem Gewebe wurde das unter 3.2.2 (S. 33) beschriebene Verfahren angewendet. Analog wurde auch die HE – Färbung der Proben wie im Punkt 3.2.3.1 (S. 33) durchgeführt. Die Untersuchung erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskopes (Olympus BX 60M, System Mikroskop) in Verbindung mit einer Kamera. Durch das Programm analySIS® (soft imaging SIS, Münster) wurden die Zellen direkt am Bildschirm vermessen. Dabei wurden von jedem Tier insgesamt 50 Zelldurchmesser ermittelt. Die Auswahl der Zellen erfolgte willkürlich; jeder Korneozyt wurde aufgrund seiner sechseckigen Form an seiner breitesten Stelle von Ecke zu Ecke vermessen (Abb. 9, S. 45).

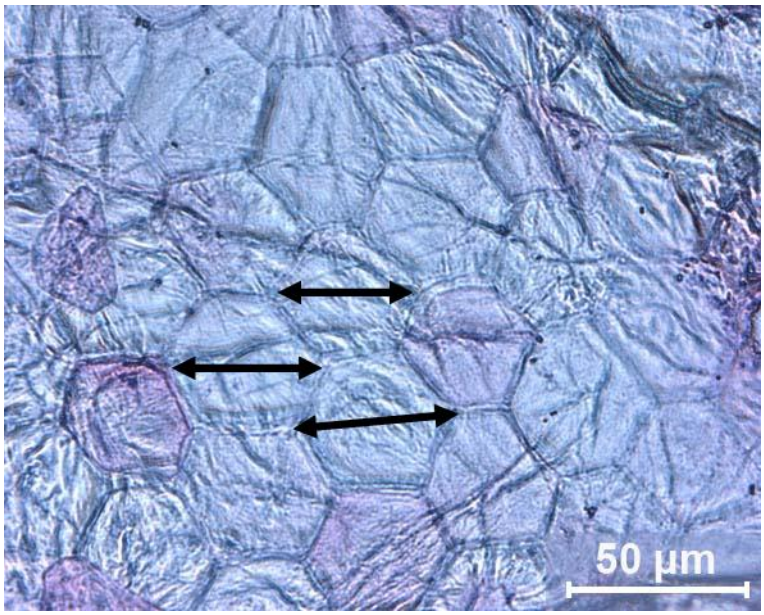


Abb. 9: Bestimmung des Korneozytendurchmessers beim Hund

4.4 Chemikalienliste

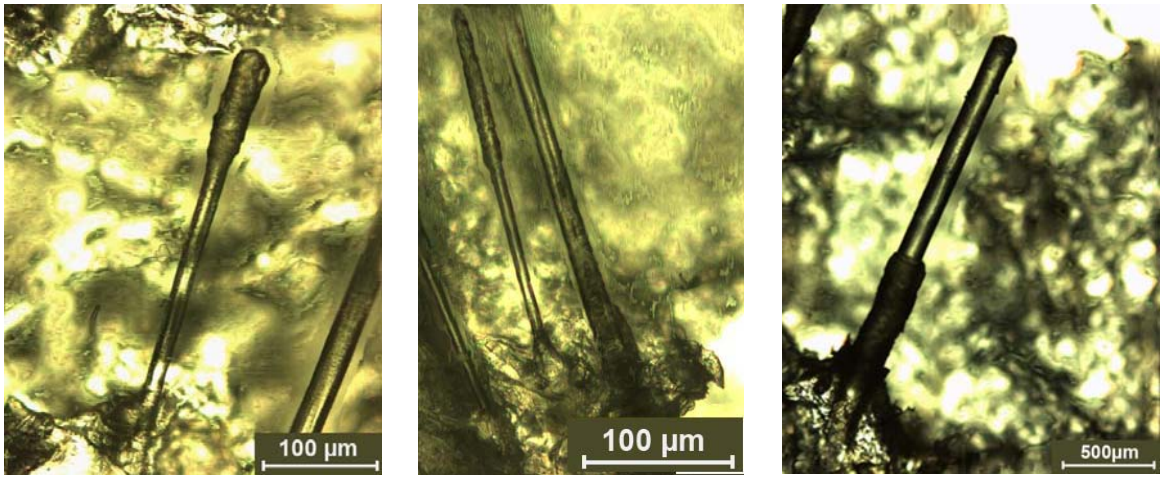
Stoff	*Hersteller*
Chloroform	Fisher Chemicals
Diethlyether, extra pure, stabilisiert mit 7 ppm 2,6 Di-tert-butyl-Methylphenol	Merck, Darmstadt
Dispase, from Bacillus polymyxa, > 6 U/mg	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Essigsäure 96%	Merck, Darmstadt
Hexan	Fisher Chemicals
Methanol Chromasolv®	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PBS Puffer without Ca + Mg	Dulbecco´s, PAA Labor GmbH, A - Pasching
Petrolether	Merck, Darmstadt
Trypsin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

4.5 Ergebnisse

4.5.1 Untersuchung der Haarfollikel bei verschiedenen Tierspezies

4.5.1.1 Anordnungsmuster der Haarfollikel

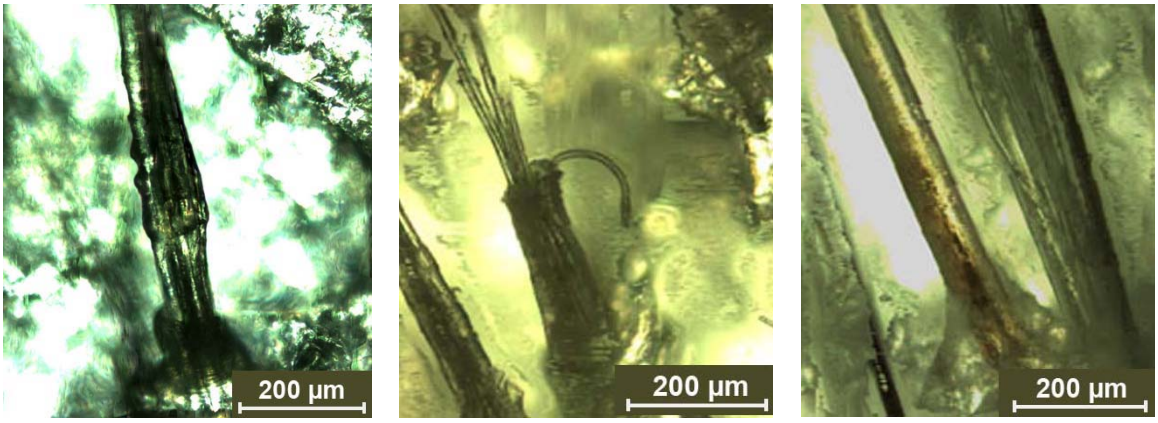
Unter dem Lichtmikroskop konnte die Anatomie der mit Cyanacrylat extrahierten Haarfollikel, sowie deren Anordnungsmuster, beurteilt werden. Am Schweineohr, beim Meerschweinchen und beim Affen wurden ausschließlich Einzelfollikel beobachtet. Abb. 10 zeigt die dreidimensionalen Aufnahmen der Follikelteilbiopsien in den Cyanacrylatabrissen der genannten Tiere. Bei letzteren beiden waren sie gruppenweise in versetzten Reihen angeordnet. Beim Meerschweinchen bestanden diese meist aus 1 oder 2 Leithaaren und mehreren mittleren Beihaaren. Weiterhin fiel auf, dass sehr große Leithaare immer von jeweils zwei kleinen Follikeln flankiert sind. Die Follikel des Schweins hingegen erschienen mehr zufällig verteilt. Je Quadratzentimeter wurden 0 - 3 kleinere Sekundärhaare gezählt. Eine Gruppenbildung wurde nicht beobachtet.



a b c

Abb. 10: Follikelteilbiopsien beim Affen (a), Meerschweinchen (b) und am Schweineohr (c)

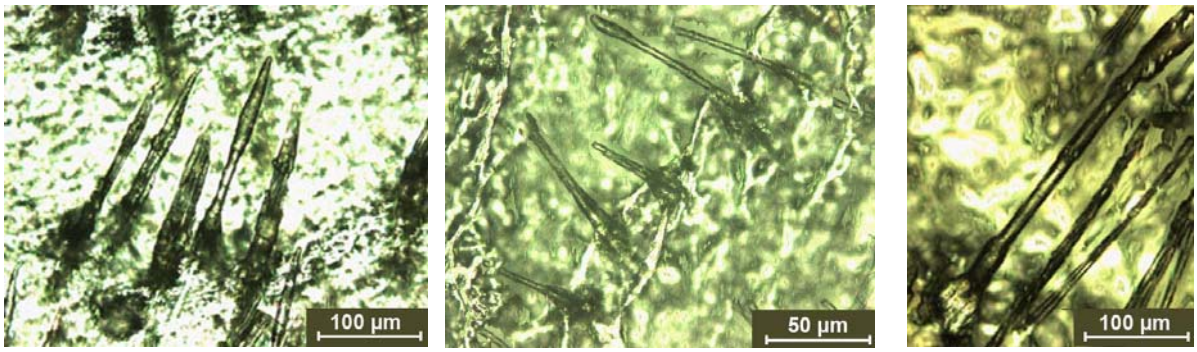
Bei den Fleischfressern Hund und Katze wurden meist Haarbündel relativ konstanter Größe gefunden. Abb. 11. zeigt EFI (Extended Focal Imaging) – Aufnahmen der Haarfollikel eines Hundes. In den Abbildungen a und b sind die Haare mehrerer Follikel, die aus einem gemeinsamen Infundibulum ragen, deutlich zu erkennen. Die Haarbündel standen meist in Dreiergruppen zusammen, die ihrerseits in Längsreihen angeordnet waren. Zusätzlich existierten einzelne Follikel (Abb. 11 c).



a b c

Abb. 11: Follikelteilbiopsien des Hundes: Formation als Haarbündel (a, b) sowie als Einzelfollikel (c)

Auch beim Kaninchen konnte eine typische Gruppenbildung der Haarfollikel beobachtet werden. Dabei wurde das Leithaar als zentraler Einzelfollikel kranzförmig von mehreren Haarbündeln umgeben. Abb. 12 a zeigt die dreidimensionale Aufnahme einer solchen Gruppe. Daneben kamen aber auch Gruppen ohne einen zentralen Leithaarfollikel vor. In den Cyanacrylatabrissen von Maus und Ratte wurden sowohl einfache, als auch zusammengesetzte Haarfollikel entdeckt. Sie waren in versetzten Reihen angeordnet und in ihrer Größe relativ konstant. In Abb. 12 b und c sind die Follikelteilbiopsien von Maus und Ratte als dreidimensionale EFI – Aufnahmen dargestellt.



a b c

Abb. 12: Follikelteilbiopsien in den Cyanacrylarabrissen von Kaninchen (a), Maus (b) und Ratte (c)

Wie in den Abb. 10 – 12 zu erkennen ist, wurden vor allem bei den zusammengesetzten Follikeln oftmals nicht alle Haare mit extrahiert. In den Infundibula waren daher manchmal nur wenige Haare zu finden. Meist waren dies die dünneren Sekundärhaare. Vereinzelt wurden auch leere Infundibula angetroffen. Abb. 13 zeigt zwei Beispiele dafür.

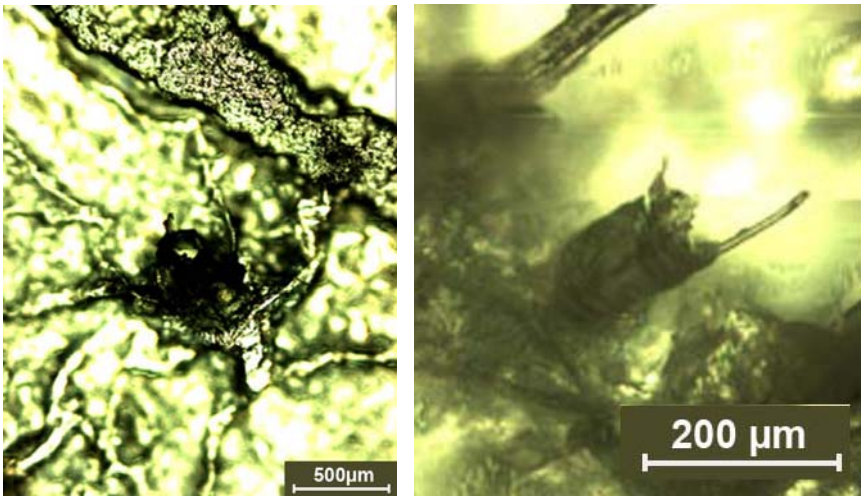


Abb. 13: EFI – Aufnahmen „leerer“ Infundibula in Cyanacrylatabrissen vom Schweineohr (a) und Hund (b)

4.5.1.2 Größenparameter der Haarfollikel bei verschiedenen Tieren

Für die Bestimmung des follikulären Reservoirs wurden Cyanacrylatabrisse der Haut von 8 verschiedenen Spezies entnommen: Affe, Hund, Kaninchen, Katze, Maus, Meerschweinchen, Ratte und Schwein. Wie im Methodenteil unter 3.1 (S. 22) beschrieben, wurden die Follikel vermessen und entsprechende Parameter mit den Werten kalkuliert.

4.5.1.2.1 Haarfollikeldichte

Die Bestimmung der Follikeldichte erfolgte durch zwei unterschiedliche Verfahren. Zunächst wurden die Follikelteibiopsien der Cyanacrylatabrisse unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Dazu wurde auf der Rückseite der Objektträger eine Fläche von einem Quadratzentimeter markiert. Bei Tieren mit sehr hoher Dichte wurde lediglich ein Viertel ausgezählt und anschließend mit vier multipliziert. Tabelle 3 (S.50/51) zeigt die Ergebnisse der Follikeldichtebestimmung bei den unterschiedlichen Tieren. Die geringste Follikeldichte wurde für das Schweineohr (22/cm²) bestimmt. Dabei wurden im Schnitt 10 Cyanacrylatabrisse je Tier ausgewertet. Von den stärker behaarten Tieren besitzt der Affe die geringste Follikeldichte (173/cm² am Thorax, 292/cm² am Rücken), gefolgt von Hund (367/cm²) und Katze (627/cm²). Die Follikeldichten beim Meerschweinchen (1282/cm²), bei der Ratte (1598/cm²) und beim Kaninchen (1728/cm²) liegen relativ eng beieinander. Die meisten Follikel in einem Quadratzentimeter wurden bei der Maus gezählt (5047/cm²).

Tabelle 3: Haarfollikeldichte je cm² Hautoberfläche bei den untersuchten Tieren, bestimmt durch Auszählen im Cyanacrylatabriss; **A**: Hund, Katze, Affe und Schwein; **B**: Maus, Ratte, Meerschwein und Kaninchen

A

Probennr.	Hund	Katze	Affe	Schwein
1	320	796	320	18
2	416	520	292	22
3	396	540	295	24
4	393	625	281	19
5	333	588		24
6	344	692		23
MW (± SD)	**367** (± 39)	**627** (± 103)	**297** (± 17)	**22** (± 3)

B

Probennr.	Maus	Ratte	Meerschwein	Kaninchen
1	5635	1484	1292	1616
2	3989	1376	1314	1826
3	4757	1820	1304	1432
4	5690	1760	1204	1780
5	4973	1473	1346	1680
6	5228	1677	1234	2032
MW (± SD)	**5045** (± 633)	**1598** (± 179)	**1282** (± 53)	**1728** (± 204)

(**MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung)

Zur Kontrolle wurde die Dichte durch eine weitere Methode ermittelt. Mit Hilfe optischer Geräte wurde die Hautoberfläche photographiert und anhand der Bilder die Follikeldichte bestimmt. Abb. 14 zeigt die mit der Nikon Coolpix photographierte Hautoberfläche eines Hundes, sowie eine TrichoScan - Aufnahme von Rattenhaut, wie sie für die Dichtebestimmung herangezogen wurde.

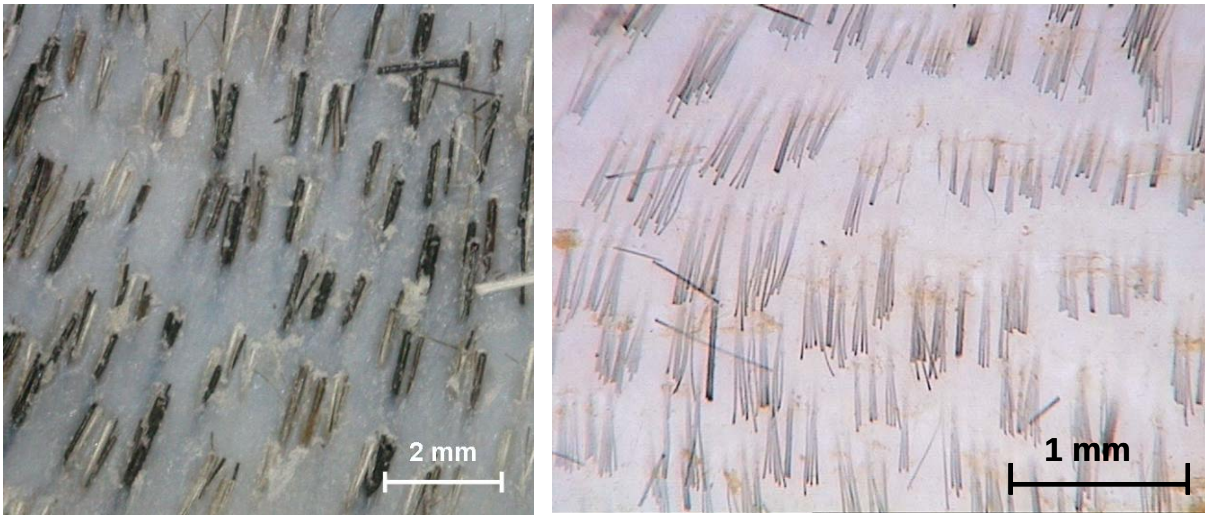


Abb. 14: Bestimmung der Follikeldichte durch Photographie: ***links**:* Aufnahme der Hautoberfläche eines Hundes (Nikon Coolpix®); ***rechts**:* Aufnahme der gekürzten Haare einer Ratte (TrichoScan®)

In Tabelle 4 ist die mit den beiden unterschiedlichen Methoden bestimmte Follikeldichte bei den einzelnen Spezies vergleichend dargestellt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte, die aus den Follikeldichten der jeweils 6 beprobten Individuen einer Tierart errechnet wurden. Analog ergeben sich die Standardabweichungen aus interindividuellen Schwankungen bezüglich der Follikeldichte. Generell lagen die mit den beiden Methoden ermittelten Werte relativ im gleichen Bereich. Dennoch wurden, außer bei der Ratte, durch das Auszählen unter dem Mikroskop bis zu 28% (Hund) geringere Werte im Vergleich zum TrichoScan und Digitalphotographie ermittelt.

Tabelle 4: Vergleich der Ergebnisse aus der Ermittlung der Haarfollikeldichte durch zwei unterschiedliche Methoden: I Bestimmung der Dichte durch Auszählen der Follikel im Cyanacrylatabriß, II Bestimmung der Dichte mit Hilfe des TrichoScans, bzw. der Nikon Coolpix

Tierart	**I Cyanacrylat**	**II Photographie**
n = 6 *	Anzahl der Follikel je cm² (±SD)	
Affe *Rücken*	**297** (± 16)	**340** (± 13)
Affe *Thorax*	**173** (± 23)	nicht bestimmt
Hund	**367** (± 39)	**507** (± 18)
Kaninchen	**1728** (± 204)	**2034** (± 189)
Katze	**627** (± 103)	**702** (± 91)
Maus	**5045** (± 921)	**6220** (± 712)
Meerschwein	**1282** (± 53)	**1032** (± 80)
Ratte	**1598** (± 179)	**1500** (± 95)
Schwein	**22** (± 3)	**24** (± 6)

* *Affe: n=4*

SD = Standardabweichung

Für die Berechnung der Follikelparameter, die sich auf einen Quadratzentimeter Haut beziehen, wurde der durch Auszählen der Teilbiopsien im Cyanacrylatabriss ermittelte Wert verwendet.

4.5.1.2.2 Durchmesser der Haarfollikelöffnung und Haarstärke

In Tabelle 5 (S. 53/54) sind die Durchmesser der Follikelöffnungen vergleichend bei den untersuchten Tierarten dargestellt. Die größten Porenöffnungen fanden sich am Schweineohr mit durchschnittlich 200 µm. Von den Tieren mit dichtem Fell besitzt der Hund (155 µm) mit Abstand den größten Follikeldurchmesser. Im Gegensatz dazu weist die Katze sehr viel kleinere Werte auf (85 µm). Der Affe (70 µm), das Meerschweinchen (61 µm) und das Kaninchen (59 µm) liegen relativ dicht beieinander. Die kleinsten Follikelöffnungen wurden bei der Ratte (38 µm) und der Maus (24 µm) ermittelt. Aus den Standardabweichungen der Mittelwerte wird ersichtlich, dass zwischen den einzelnen Tieren einer Art nur relativ geringe Schwankungen zu beobachten waren. Nur bei Hund und Schwein, als die Spezies mit den größten Durchmessern, unterschieden sich die beprobten Individuen etwas stärker.

Tabelle 5: Durchmesser der Haarfollikelöffnung bei den untersuchten Spezies; **A**: Hund, Katze, Affe und Schwein; **B**: Maus, Ratte, Meerschwein und Kaninchen

A

Probennr.	Hund	Katze	Affe	Schwein
1	173 (± 31)	77 (± 17)	71 (± 24)	221 (± 53)
2	167 (± 34)	92 (± 22)	64 (± 22)	199 (± 57)
3	126 (± 35)	88 (± 18)	69 (± 22)	173 (± 57)
4	138 (± 39)	89 (± 24)	72 (± 19)	229 (± 56)
5	173 (± 39)	84 (± 17)		174 (± 52)
6	155 (± 45)	83 (± 18)		206 (± 81)
MW (± SD)	**155** (± 20)	**85** (± 5)	**70** (± 4)	**200** (± 24)

B

Probennr.	Maus	Ratte	Meerschwein	Kaninchen
1	20 (± 5)	43 (± 13)	64 (± 26)	60 (± 14)
2	22 (± 5)	36 (± 15)	59 (± 32)	63 (± 13)
3	21 (± 5)	41 (± 11)	59 (± 23)	63 (± 17)
4	22 (± 4)	38 (± 11)	61 (± 36)	50 (± 15)
5	26 (± 5)	37 (± 10)	60 (± 29)	60 (± 15)
6	30 (± 10)	34 (± 9)	66 (± 27)	56 (± 14)
MW (± SD)	**24** (± 20)	**38** (± 3)	**62** (± 3)	**59** (± 5)

(**MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung)

Wird die Porengröße einer Spezies der Körpergröße gegenübergestellt, ergibt sich eine positive Korrelation. Je größer die Körperoberfläche und je schwerer eine Tierart ist, desto größer sind auch die Haarfollikelöffnungen. Eine Ausnahme bildete das Kaninchen, das trotz des größeren Körpergewichts geringere Werte als das leichtere Meerschweinchen aufwies. Ein direkter Zusammenhang zwischen Körpergewicht und Follikelöffnung innerhalb der einzelnen Individuen einer Art besteht jedoch nicht.

Aufgrund der Follikelanatomie war es nicht bei allen Tieren möglich, die Haarstärke mit der beschriebenen Methode zu bestimmen. Die meisten der untersuchten Tierarten besitzen zusammengesetzte Follikel, bei denen mehrere Haare durch ein gemeinsames Infundibulum an die Oberfläche treten. Diese Haare waren meist spiralig umeinander gewunden und stellten sich im Cyanacrylatabriss unter dem Mikroskop als mehr oder weniger dickes Bündel dar. Da es mitunter schwierig war, einzelne Haare zu identifizieren, wurde auf eine Analyse der Haardicke bei diesen Tieren verzichtet. Tabelle 6 (S. 55) gibt die Haarschaftsdurchmesser beim Affen, Meerschweinchen und am Schweineohr wieder. Die Borsten am Schweineohr waren im Schnitt 95 µm dick. Beim Meerschweinchen wurde eine Haarstärke von 32 µm gemessen und beim Affen lag der Mittelwert bei 33 µm.

Tabelle 6: Durchmesser des Haarschaftes bei Affen, Meerschweinchen und Schwein

Probennr.	Affe	Meerschwein	Schwein
1	33 (± 13)	33 (± 18)	89 (± 23)
2	33 (± 14)	29 (± 21)	86 (± 22)
3	36 (± 12)	29 (± 14)	97 (± 29)
4	32 (± 9)	36 (± 27)	111 (± 33)
5		30 (± 19)	90 (± 29)
6		37 (± 27)	96 (± 30)
MW (± SD)	**33** (± 2)	**32** (± 4)	**95** (± 9)

(**MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung)

4.5.1.2.3 Anteil der Follikelöffnungen an der Hautoberfläche

Der prozentuale Anteil der Poren an der Hautoberfläche wurde analog zur Bestimmung am Menschen kalkuliert. In Tabelle 7 (S. 56) sind die Ergebnisse für die verschiedenen Tiere dargestellt. Die Werte unterschieden sich innerhalb der einzelnen Spezies sehr deutlich. Der Hund wies den mit Abstand größten Anteil der Follikelöffnungen auf. Bei ihm bildten die Poren knapp 7% der gesamten Hautoberfläche. Die Follikelöffnungen des Kaninchens erreichten einen Mittelwert 4,69% und standen damit an zweiter Stelle, gefolgt von Meerschweinchen (3,82%), Katze (3,54%), Maus (2,02%), Ratte (1,84%) und Affe (1,11%). Trotz der großen Follikelöffnungen wurden für das Schweinohr lediglich Werte um 0,68% kalkuliert, was auf der geringen Follikeldichte beruht.

Tabelle 7: Anteil der Porenfläche je cm² Hautoberfläche; **A**: Hund, Katze, Affe und Schwein; **B**: Maus, Ratte, Meerschwein und Kaninchen

A

Probennr.	Hund	Katze	Affe	Schwein
1	7,53	3,70	1,25	0,69
2	9,06	3,43	0,94	0,68
3	4,93	3,23	1,09	0,56
4	5,91	3,88	1,15	0,78
5	7,07	3,27		0,57
6	6,50	3,72		0,77
MW (± SD)	**6,97** (± 1,48)	**3,54** (± 0,27)	**1,11** (± 0,13)	**0,68** (± 0,09)

B

Probennr.	Maus	Ratte	Meerschwein	Kaninchen
1	1,73	2,18	4,20	5,09
2	1,46	1,40	3,55	5,70
3	1,58	2,41	3,56	4,03
4	2,22	1,99	3,56	3,54
5	2,03	1,55	3,83	4,82
6	3,08	1,53	4,23	4,97
MW (± SD)	**2,02** (± 0,59)	**1,84** (± 0,41)	**3,82** (± 0,32)	**4,69** (± 0,78)

(**MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung)

4.5.1.2.4 Volumen und Oberfläche der Haarfollikel

In den Tabellen 8 und 9 (S. 57–59) sind die Ergebnisse der Volumen- und Oberflächenberechnungen für die Follikel der einzelnen Tierarten aufgeführt. Sie repräsentieren das Gesamtvolumen, bzw. die gesamte Oberfläche aller Follikel in einem Quadratzentimeter. Das follikuläre Reservoir, das durch das Volumen der Infundibula wiedergegeben wird, war beim Hund (0,48 mm³) sehr viel größer als bei allen anderen untersuchten Tieren. Die Werte für das Meerschweinchen (0,19 mm³), Kaninchen (0,16 mm³) und Schwein (0,16 mm³) lagen in etwa in einem Bereich.

Die Follikel der Katze besaßen mit nur 0,13 mm³ ein vergleichsweise geringes Reservoir. Das follikuläre Volumen von Maus und Ratte war in etwa gleich groß (0,06 mm³ und 0,08 mm³). Die geringsten Volumina der Haarfollikel wurden für den Affen errechnet; der durchschnittliche Wert beträgt 0,04 mm³.

Tabelle 8: Volumen der Infundibula je cm² Hauoberfläche bei den untersuchten Spezies; **A**: Hund, Katze, Affe und Schwein; **B**: Maus, Ratte, Meerschwein und Kaninchen

A

Probennr.	Hund	Katze	Affe	Schwein
1	0,42 (± 0,29)	0,11 (± 0,09)	0,04 (± 0,04)	0,18 (± 0,33)
2	0,50 (± 0,68)	0,15 (± 0,08)	0,03 (± 0,02)	0,15 (± 0,15)
3	0,57 (± 0,42)	0,13 (± 0,12)	0,04 (± 0,03)	0,13 (± 0,10)
4	0,45 (± 0,26)	0,13 (± 0,11)	0,05 (± 0,03)	0,18 (± 0,26)
5	0,42 (± 0,31)	0,13 (± 0,08)		0,12 (± 0,12)
6	0,50 (± 0,33)	0,12 (± 0,09)		0,19 (± 0,36)
MW (± SD)	**0,48** (± 0,06)	**0,13** (± 0,01)	**0,04** (± 0,01)	**0,16** (± 0,03)

B

Probennr.	Maus	Ratte	Meerschwein	Kaninchen
1	0,07 (± 0,04)	0,08 (± 0,09)	0,17 (± 0,17)	0,20 (± 0,11)
2	0,06 (± 0,05)	0,07 (± 0,11)	0,22 (± 0,30)	0,18 (± 0,14)
3	0,05 (± 0,03)	0,10 (± 0,09)	0,21 (± 0,18)	0,24 (± 0,14)
4	0,05 (± 0,03)	0,10 (± 0,08)	0,18 (± 0,28)	0,12 (± 0,09)
5	0,05 (± 0,03)	0,08 (± 0,06)	0,18 (± 0,22)	0,11 (± 0,06)
6	0,07 (± 0,07)	0,04 (± 0,03)	0,19 (± 0,17)	0,13 (± 0,06)
MW (± SD)	**0,06** (± 0,01)	**0,08** (± 0,02)	**0,19** (± 0,02)	**0,16** (± 0,05)

(**MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung)

Die follikuläre Oberfläche stellt eine Vergrößerung der Hautoberfläche und damit auch eine Vergrößerung der Penetrationsfläche dar. Die Follikel des Kaninchens und des Hundes bildten mit 34,45 mm², bzw. 32,20 mm², die größten Oberflächen. Dies bedeutet, dass die Haarfollikel bei diesen Tieren die Hautoberfläche um ein Drittel vergrößern. Die nächst kleineren Werte wurden bei Meerschweinchen (24,40 mm²), Maus (22,72mm²), Ratte (17,43 mm²) und Katze (16,03 mm²) gefunden. Die geringsten Oberflächen wurden für die vergleichsweise wenigen, großen Follikel am Schweineohr (5,87 mm²) sowie für die des Affen (4,88 mm²) kalkuliert. Demzufolge bildeten die Follikel hier nur eine um knapp 6%, bzw. 5% vergrößerte Penetrationsfläche.

Tabelle 9: Oberfläche der Infundibula je cm² Hautoberfläche bei den untersuchten Spezies; **A**: Hund, Katze, Affe und Schwein; **B**: Maus, Ratte, Meerschwein und Kaninchen

A

Probennr.	Hund	Katze	Affe	Schwein
1	32,61 (± 14,78)	22,24 (± 38,73)	4,77 (± 2,80)	4,57 (± 2,39)
2	23,27 (± 9,80)	15,38 (± 5,49)	4,42 (± 2,17)	5,73 (± 3,79)
3	35,11 (± 18,57)	12,50 (± 4,39)	4,97 (± 2,54)	6,94 (± 3,46)
4	37,06 (± 17,54)	18,37 (± 23,35)	5,35 (± 2,45)	6,47 (± 3,58)
5	32,43 (± 18,48)	15,30 (± 7,98)		5,50 (± 3,18)
6	32,70 (± 14,50)	12,36 (± 6,54)		6,01 (± 4,33)
MW (± SD)	**32,20** (± 4,74)	**16,03** (± 3,77)	**4,88** (± 0,39)	**5,87** (± 0,82)

B

Probennr.	Maus	Ratte	Meerschwein	Kaninchen
1	29,81 (± 11,64)	14,77 (± 8,23)	22,05 (± 12,99)	46,05 (± 14,98)
2	21,49 (± 14,27)	14,18 (± 10,53)	25,77 (± 19,30)	40,12 (± 14,43)
3	20,20 (± 9,00)	20,88 (± 13,29)	27,48 (± 15,63)	46,92 (± 15,99)
4	22,26 (± 10,20)	21,95 (± 12,28)	23,38 (± 24,84)	24,90 (± 11,98)
5	20,90 (± 8,62)	18,90 (± 9,11)	22,27 (± 18,09)	22,09 (± 9,14)
6	21,67 (± 11,14)	13,92 (± 7,18)	25,43 (± 18,12)	26,60 (± 13,07)
MW (± SD)	**22,72** (± 3,54)	**17,43** (± 3,59)	**24,40** (± 2,17)	**34,45** (± 11,21)

(**MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung)

4.5.1.3 Follikuläres Reservoir vs. Stratum corneum Reservoir

In Abhängigkeit der Dicke des Stratum corneum kann das Reservoir, das die äußerste Hautschicht für topisch applizierte Substanzen besitzt, kalkuliert werden. Eine dünne Hornschicht kann weniger Stoffe aufnehmen als eine dickere. Demnach besitzt die Maus ein geringeres Reservoir im Stratum corneum als beispielsweise das Schwein. Die Menge an Stoffen, die theoretisch durch die Haarfollikel aufgenommen werden kann, wird durch das berechnete Volumen der Infundibula widergespiegelt. In Abb. 15 (S. 60) sind die potentiellen Reservoire der beiden Hautstrukturen bei den untersuchten Tieren angegeben. Für die Berechnung des Reservoirs im Stratum corneum wurden Dickenangaben aus der Literatur verwendet (siehe Punkt 2.1.3.1, S. 7).

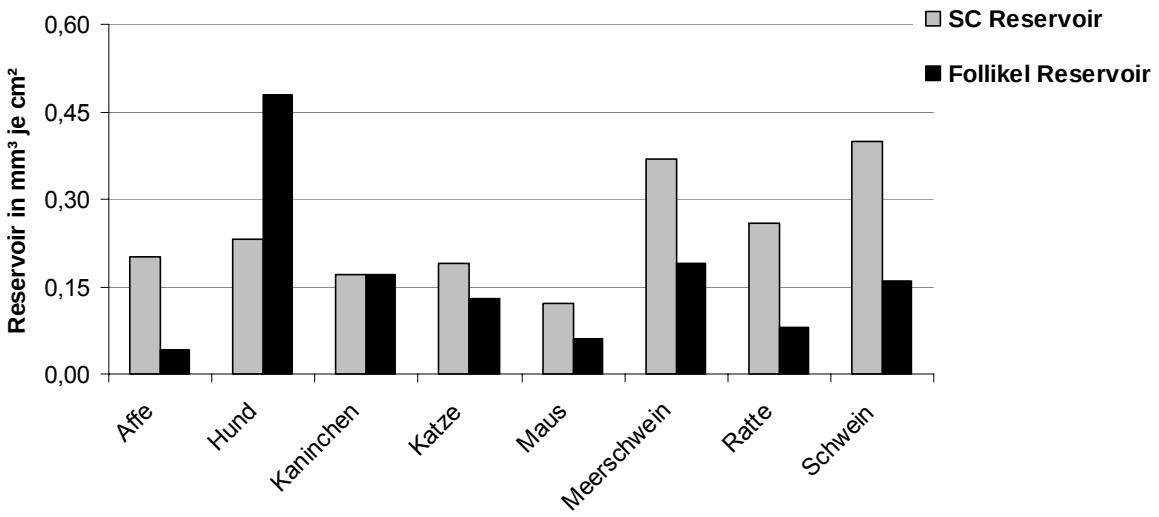


Abb. 15: Das Reservoir des Stratum corneum sowie das follikuläre Reservoir im Vergleich bei den untersuchten Tierarten

Im Säulendiagramm wird deutlich, dass die Haarfollikel eine beachtliche Reservoirkapazität besitzen. Sie erreichen bei allen der untersuchten Tiere mindestens ein Fünftel des Stratum corneum Reservoirs. Beim Meerschweinchen, am Schweineohr und bei der Maus entspricht das potentielle Follikelreservoir etwa der Hälfte dem des Stratum corneum. Bei der Ratte erreichen die ermittelten Werte ungefähr ein Drittel der Stratum corneum Kapazität. Die Haarfollikel am Rücken des Affen bilden nicht nur absolut, sondern auch im Vergleich zum Stratum corneum, das kleinste Reservoir. Da die Hornzellschicht beim Kaninchen verhältnismäßig dünn ist, für die Follikel jedoch ein großes mittleres Volumen berechnet wurde, sind beide Reservoirkapazitäten gleich groß. Ähnlich verhält es sich bei der Katze; das follikuläre Volumen kommt dem Reservoir der Hornschicht sehr nahe. Der Hund besitzt ein enormes follikuläres Volumen, es übersteigt das Volumen des Stratum corneum um das Doppelte.

4.5.1.4 Talgdrüsentiefe

Bei der Vermessung der Follikel wurde die Länge der einzelnen Infundibula bestimmt. Definitionsgemäß reicht dieser Teil des Follikels von der Haarfollikelöffnung an der Hautoberfläche bis zur Mündung der Talgdrüse. Daher entspricht dieser Wert auch der Angabe, wie tief in der Haut die Talgdrüsen in den Follikel münden.

Die Länge des Infundibulums wurde, wie den anderen ermittelten Parametern, von jeweils 50 Follikeln je Tier bestimmt und gemittelt. Die Werte sind, vergleichend für alle beprobten Spezies, in Abb. 16 dargestellt. Am Schweineohr mündete die Talgdrüse durchschnittlich mehr als einen halben Millimeter, und damit am weitesten unter der Haut, in den Haarfollikel. Beim Hund waren die Infundibula 225 µm lang, beim Kaninchen 132 µm, beim Meerschweinchen 118 µm und bei der Ratte 113 µm. Am dichtesten unter der Hautoberfläche lag der Isthmus der Talgdrüse beim Affen mit 98 µm, und bei der Maus mit 83 µm.

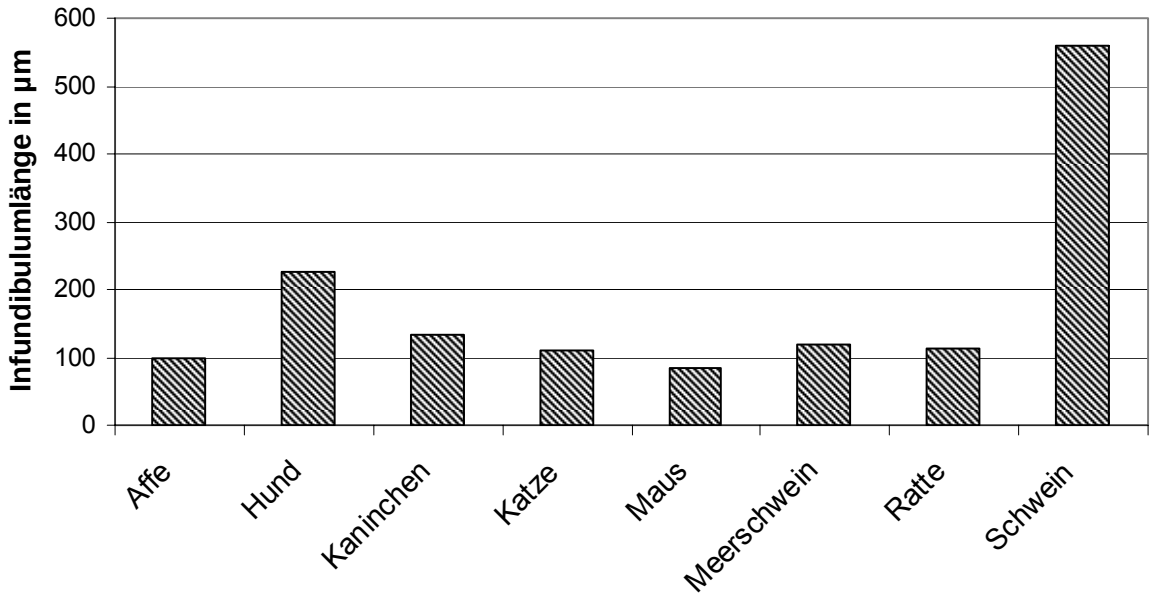


Abb. 16: Mittlere Tiefe der Talgdrüsenmündung in der Haut der beprobten Tierspezies. Die Strecke zwischen Hautoberfläche und Einmündung des Isthmus in den Haarfollikel entspricht der Länge des Infundibulums und ist in µm angegeben.

4.5.1.5 Follikelparameter bei Mensch und Tier im Vergleich

Da Tiermodelle in Forschung und Entwicklung häufig als Ersatz für die Haut des Menschen eingesetzt werden, müssen die hautphysiologischen Gegebenheiten von Mensch und Tier exakt charakterisiert und miteinander verglichen werden. Demnach wurden die follikulären Parameter der einzelnen Tierarten denen des Menschen gegenübergestellt. Als Vertreter wurde dafür der kaukasische Hauttyp ausgewählt. Für den Vergleich wurden die am Rücken des Menschen erhobenen Follikelparameter herangezogen.

4.5.1.5.1 Anteil der Follikelöffnungen an der Hautoberfläche

Abb. 17 stellt die prozentualen Anteile der Porenöffnungen in einem Quadratzentimeter Haut bei den Tieren, sowie beim Menschen als Säulendiagramm dar. Wie dort ersichtlich, besitzt der Mensch einen wesentlich geringeren Anteil der Follikelöffnungen an der Gesamthautoberfläche als alle untersuchten Tiere. Diese Differenzen sind bei Hund, Kaninchen, Meerschweinchen und Katze am größten. So bilden die Follikelöffnungen bei diesen Tieren 10fach bis 21fach höhere Anteile als der Mensch am Rücken. Generell sind die prozentualen Anteile der Poren beim Schwein und beim Affen denen der Menschen am ähnlichsten. Beim Affen besitzen die Follikelöffnungen einen nur dreifach höheren Anteil an der Hautoberfläche als beim Menschen, während für das Schweineohr Werte berechnet wurden, die ungefähr im fünffachen Bereich des Menschen liegen.

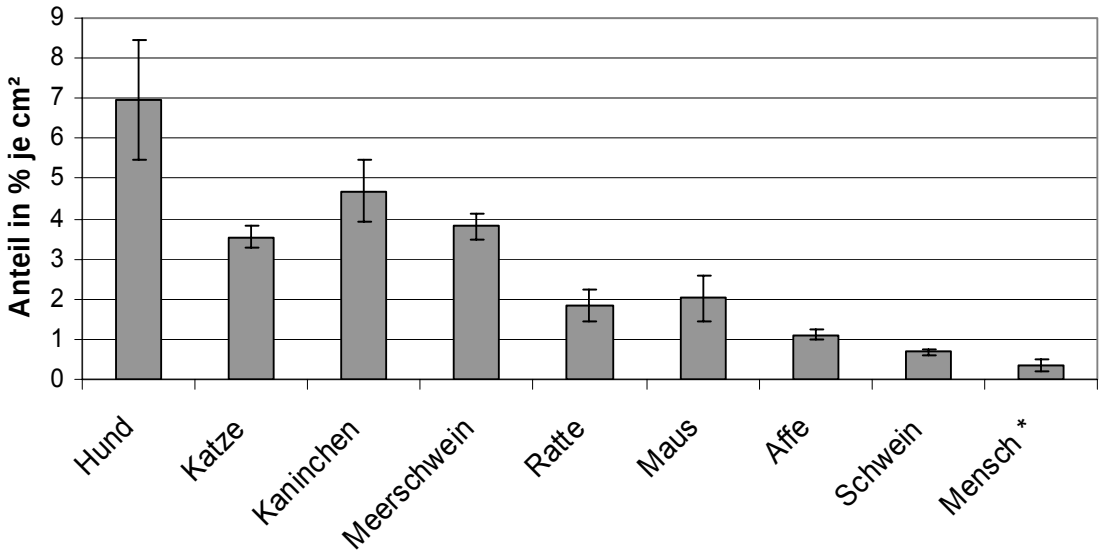


Abb. 17: Anteil der Follikelöffnungen bei Mensch und Tier im Vergleich (* für den Vergleich wurden die Ergebnisse von Otberg *et al*., 2004 am Rücken des Menschen zugrunde gelegt)

4.5.1.5.2 Oberfläche der Infundibula

Ein ähnlicher Trend konnte auch für die Oberfläche der Follikel beobachtet werden (Abb. 18, S. 63). Wieder wiesen alle der untersuchten Tiere weit größere Werte auf als alle Körperregionen des Menschen, mit Ausnahme der Stirn. Der Affe und das Schwein besitzen die geringsten Werte und sind dem Menschen am ähnlichsten.

Bei diesen beiden Tieren bilden die Haarfollikel nur etwas größere Oberflächen als der Mensch am Rücken. Alle anderen beprobten Tiere kontrastieren wiederum sehr stark mit dem Menschen: für diese Spezies wurden knapp 5fach (Katze) bis 10fach (Kaninchen) größere Oberflächen kalkuliert.

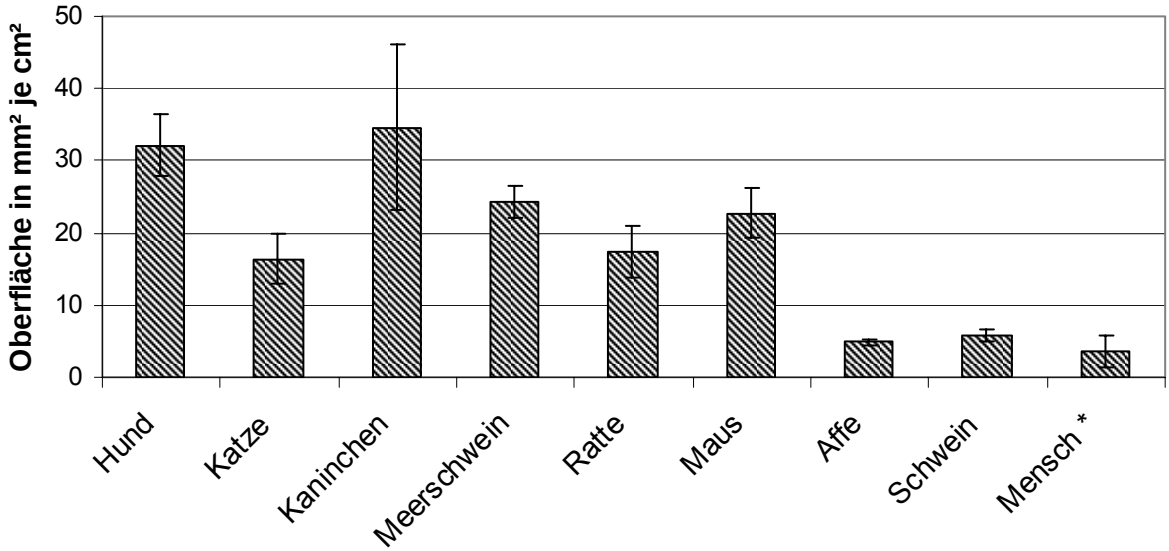


Abb. 18: Oberfläche der Infundibula bei Mensch und Tier im Vergleich, (* für den Vergleich wurden die Ergebnisse von Otberg *et al*., 2004 am Rücken des Menschen zugrunde gelegt)

4.5.1.5.3 Volumen der Infundibula

Hinsichtlich des kalkulierten follikulären Volumens sind die Differenzen zwischen Mensch und Tier nicht so extrem wie bei den anderen Follikelparametern (Abb.19, S. 64). Der Mensch besitzt am Rücken sogar ein größeres follikuläres Reservoir als einige der Tiere. So liegen die berechneten Werte von Maus, Ratte und Affe unter denen des Menschen. Die Haarfollikel des Meerschweinchens, des Kaninchens, der Katze und am Schweineohr bilden ein etwas höheres, aber dennoch vergleichbares Volumen. Lediglich der Hund weist ein vielfach erhöhtes Volumen auf.

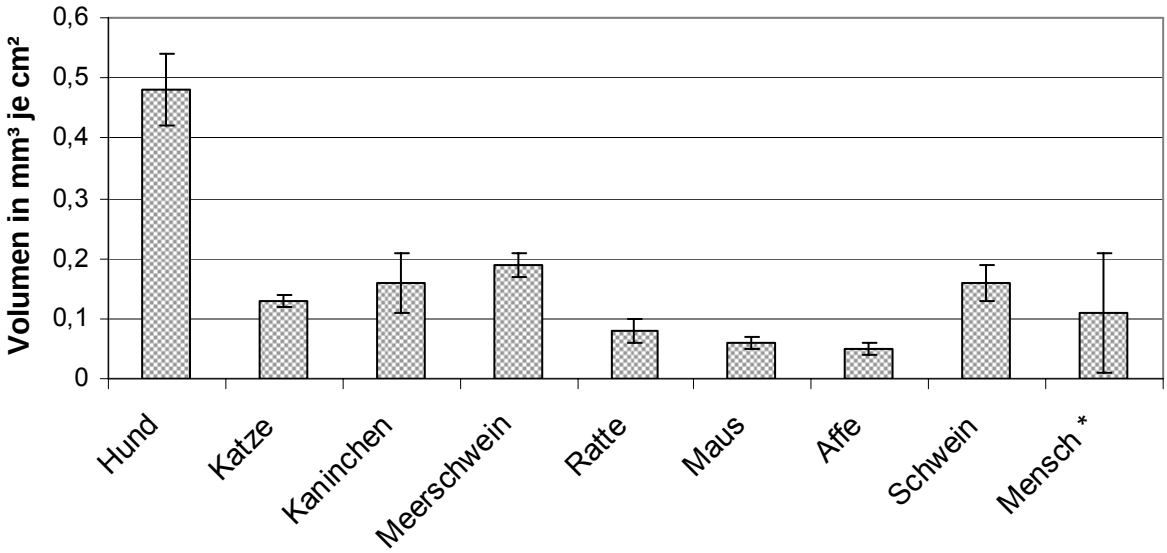


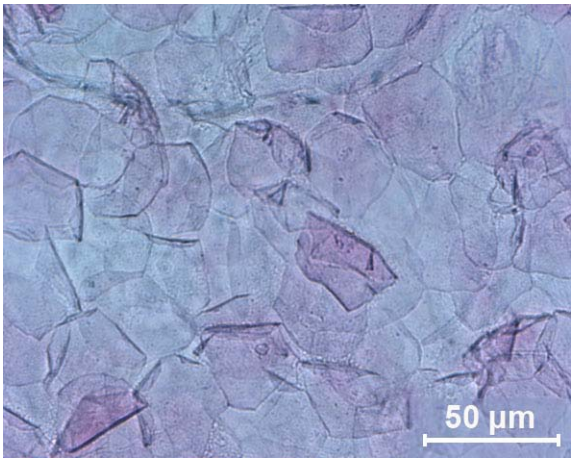
Abb. 19: Volumen der Infundibula bei Mensch und Tier im Vergleich (* für den Vergleich wurden die Ergebnisse von Otberg *et al*., 2004 am Rücken des Menschen zugrunde gelegt)

4.5.2 Analyse der Lipide im Stratum corneum

4.5.2.1 Verifizierung der enzymatischen Stratum corneum Separierung

Parallel zur Lipidanalyse wurde von den einzelnen Proben der untersuchten Tiere jeweils eine HE – Färbung des isolierten Stratum corneum, sowie beim Schwein eine Untersuchung mit dem Laser – Scan – Mikroskop, durchgeführt. Bei keiner der untersuchten Stichproben wurden abweichende Strukturen vom typischen Muster des Stratum corneum entdeckt. Nur sehr vereinzelt wurden deutlich kleinere, basophile Zellen mit einem Zellkern gefunden. Diese bildeten jedoch einen Anteil von unter 1%. Die polygonalen Zellen des Stratum corneum waren durchweg mehr oder weniger stark eosinophil angefärbt und kernlos, bzw. enthielten Reste von Zellkernen. Teilweise waren die papierartigen, flachen Zellen zigarrenförmig eingerollt. Bei der Untersuchung mit dem Laser – Scan - Mikroskop wurde durch die gesamte Schichtdicke ausschließlich die typische Form der Hornzellen verifiziert.

Die Ergebnisse beider Untersuchungsmethoden stellten somit sicher, dass für die Lipidanalyse nur die sauber isolierte Hornzellschicht verwendet wurde. In Abb. 20 ist das isolierte Stratum corneum von einem Schwein in der HE – Färbung und im Laser – Scan – Mikroskop dargestellt.



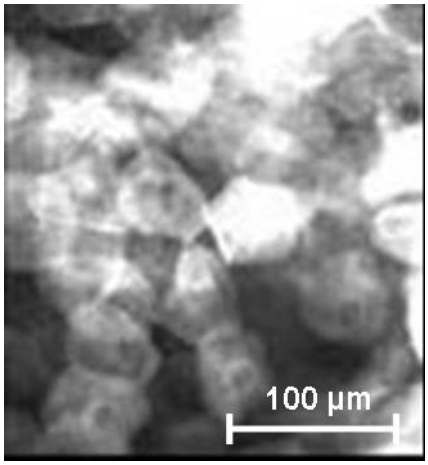


Abb. 20: Stratum corneum vom Schweineohr nach enzymatischer Separierung mit Dispase. ***links:*** HE – Färbung; Betrachtung der basalen Seite der Hornzellschicht: typische, große, polygonale, flache Zellen ohne Zellkern. ***rechts:*** LSM; durch die gesamten Lagen des Stratum corneum messen die meist sechseckigen Zellen ca. 30 µm im Durchmesser und sind kernlos.

4.5.2.2 Lipidanteil in den Stratum corneum Proben

Die Ermittlung des Gesamtlipidanteils im Stratum corneum setzt die Kenntnis des Trockengewichts der jeweiligen Proben voraus. Wie unter 3.2.4 (S. 34) beschrieben, wurde bei Hund, Katze und Kaninchen zusätzlich das Haargewicht in den Proben ermittelt und vom Trockengewicht des Stratum corneum subtrahiert. Der relative Gewichtsanteil der Haare bewegte sich zwischen 33% und 45% (Ergebnisse nicht aufgeführt). Durch die Bestimmung des Lipidtrockengewichtes nach dem Verdunsten des Extraktionsmittels wurde der relative Anteil aller Lipide am Trockengewicht des Stratum corneum kalkuliert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 (S. 66) aufgeführt. Die angegebenen Prozente umfassen alle Lipide, die in der Probe enthalten waren. Den im Mittel höchsten Lipidanteil wties die Katze auf (34%), gefolgt von Hund (24%) und Kaninchen (21%). Mit nur 13% Lipidanteil im Trockengewicht besaß das Schwein die weitaus geringsten Werte der untersuchten Tierarten. Auffällig waren die bei allen Tierarten zu beobachtenden breiten interindividuellen Schwankungen, ausgedrückt durch die hohen Standardabweichungen.

Tabelle 10: Lipidanteil im Stratum corneum bei den untersuchten Tierarten. Alle angegebenen Werte sind Prozentangaben und beziehen sich auf den Anteil am Stratum corneum Trockengewicht.

Probennr.	Kaninchen	Hund	Katze	Schwein
1	21	31	24	15
2	25	22	34	12
3	20	20	37	11
4	18	21	36	11
5	22	31	38	16
6	16	22	34	13
7	26	21		
8		27		
MW (± SD)	**21** (± 4)	**24** (± 4)	**34** (± 5)	**13** (± 2)

(**MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung)

4.5.2.3 Lipidkomposition im Stratum corneum

Mit Hilfe der HPTLC wurde das extrahierte Lipidgemisch in seine einzelnen Komponenten zerlegt und deren Mengenverhältnisse analysiert. Zur Detektierung der Einzelbestandteile wurden, wie unter 4.2.5.2 (S. 38) im Methodenteil aufgeführt, verschiedene Standardlösungen verwendet. Beim Kaninchen betrug der Anteil der analysierten Lipide 60%, beim Hund 47%, bei der Katze 50% und beim Schwein 67%. Diese Angaben wurden aus dem Gesamtlipidanteil (Tabelle 10) und der Summe aller analysierten Bestandteile (Tabelle 11-14; S. 67-69) errechnet.

4.5.2.3.1 Anteil der Einzelkomponenten am SC Trockengewicht

Jede der einzelnen Stratum corneum Proben wurde auf ihren Gehalt an Cholesterol, Cholesterolestern, Fettsäuren, Triglyceriden und Ceramiden untersucht. Die Ceramidfraktionen wurden zusammengefasst und als ganzes ausgewertet. In den Tabellen 11 -14 sind die Gehalte der Lipidkomponenten, sowie deren Summe in den Proben der vier untersuchten Tierarten, dargestellt.

Beim Kaninchen fiel ein verhältnismäßig hoher Gehalt an Cholesterolestern, sowie an Triglyceriden auf. Gleichzeitig waren die interindividuellen Schwankungen bei diesen Fraktionen sehr groß. Die Werte unterschieden sich teilweise um mehr als das Fünffache. Die Angaben für Cholesterol, Fettsäuren und Ceramide waren hingegen homogener. Insgesamt erreichen die analysierten Lipidfraktionen beim Kaninchen einen Anteil von 12,53% vom SC Trockengewicht.

Tabelle 11: Prozentualer Anteil der Lipidkomponenten am jeweiligen Stratum corneum Trockengewicht bei den untersuchten sieben Kaninchen

Probennr.	Cholesterol	Cholesterolester	Fettsäuren	Triglyceride	Ceramide	Summe
1	1,29	7,89	1,32	4,92	0,82	16,24
2	1,24	4,14	1,25	7,18	0,85	14,66
3	1,26	5,68	1,51	2,19	0,96	11,6
4	1,07	3,78	1,23	1,25	0,85	8,18
5	1,38	3,24	1,21	2,75	1,23	9,81
6	1,61	2,2	1,15	3,81	1,1	9,87
7	2,54	4,52	1,83	6,41	2,03	17,33
MW	**1,48**	**4,49**	**1,36**	**4,07**	**1,12**	**12,53**
(± SD)	(± 0,49)	(± 1,84)	(± 0,24)	(± 2,20)	(± 0,43)	(± 3,55)

(**MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung)

Auch bei den untersuchten acht Hunden bildeten Cholesterolester und Triglyceride den größten Teil der erfassten Lipide. Im Gegensatz als beim Kaninchen, bildeten die Ceramide mit 2,32% den drittgrößten Anteil der Lipidfraktion im Stratum corneum. Die Fettsäuren erreichten 1,33%, gefolgt vom Cholesterolanteil von 1,15%. Die Schwankungsbreite war beim Hund auch bei den drei letztgenannten Lipidfraktionen relativ groß.

Tabelle 12: Prozentualer Anteil der Lipidkomponenten am jeweiligen Stratum corneum Trockengewicht bei den untersuchten acht Hunden.

Probennr.	Cholesterol	Cholesterolester	Fettsäuren	Triglyceride	Ceramide	Summe
1	2,7	5,48	3,43	5,95	2,12	19,7
2	0,87	1,74	1	2,18	1,7	7,48
3	0,91	2,07	1,15	2,85	2,32	9,31
4	0,87	1,88	0,67	2,56	2,04	8,03
5	0,88	2,73	0,97	2,25	3,27	10,1
6	1,42	3,13	1,94	2,98	1,87	11,34
7	0,67	4,89	0,73	4,43	2,18	12,89
8	0,88	3,77	0,73	4,34	3,02	12,75
MW	**1,15**	**3,21**	**1,33**	**3,44**	**2,32**	**11,45**
(± SD)	(± 0,66)	(± 1,40)	(± 0,94)	(± 1,33)	(± 0,55)	(± 3,89)

(**MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung)

Bei den untersuchten Katzen war ein extrem hoher Gehalt (11,42%) an Cholesterolestern auffällig. Bei dieser Fraktion existierten gleichzeitig enorme Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren. Der Anteil an Triglyceriden war im Gegensatz zu Hund und Kaninchen verhältnismäßig gering. Im Verhältnis zu Cholesterol und Fettsäuren, deren Wert im ungefähr gleichen Bereich (1,08% und 1,02%) lag, bildeten die Ceramide (1,72%) auch bei den Katzen einen größeren Anteil. Durch den enormen Gehalt an Cholesterolestern lag der Gesamtanteil aller erfassten Lipide bei knapp 17% des SC Trockengewichtes.

Tabelle 13: Prozentualer Anteil der Lipidkomponenten am jeweiligen Stratum corneum Trockengewicht bei den untersuchten sechs Katzen

Probennr.	Cholesterol	Cholesterolester	Fettsäuren	Triglyceride	Ceramide	Summe
1	1,34	9,8	0,75	0,76	1,21	13,,85
2	1,38	19,93	1,2	1,53	1,35	25,39
3	1,23	19,92	1,09	2,74	1,5	26,38
4	0,72	3,09	0,65	0,68	1,12	6,18
5	0,73	4,59	0,79	0,84	0,93	7,87
6	1,08	11,27	1,61	2,47	4,21	20,63
MW	**1,08**	**11,42**	**1,02**	**1,5**	**1,72**	**16,72**
(± SD)	(± 0,29)	(± 7,28)	(± 0,36)	(± 0,91)	(± 1,24)	(± 8,73)

(**MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung)

Der Anteil der untersuchten Lipide war beim Schwein mit 8,66% vergleichsweise gering. Den weitaus größten Anteil bildete die Fraktion der Ceramide (4,31%), gefolgt von Cholesterol (2,15%) und freien Fettsäuren (1,89%). Anders als bei allen anderen untersuchten Spezies, bildeten die Cholesterolester nur einen sehr geringen Teil (0,25%). Triglyceride waren, wenn überhaupt, nur in Spuren nachweisbar. Die Schwankungsbreite der Werte zwischen den Individuen war beim Schwein nicht ganz so stark.

Tabelle 14: Prozentualer Anteil der Lipidkomponenten am jeweiligen Stratum corneum Trockengewicht bei den untersuchten sechs Schweineohren

Probennr.	Cholesterol	Cholesterolester	Fettsäuren	Triglyceride	Ceramide	Summe
1	3,93	0,27	2,43	0,18	5,04	11,86
2	2,06	0,27	1,9	0,16	4,56	8,95
3	2,03	0,18	1,96	0	4,58	8,75
4	0,73	0,19	1,71	0	5,41	8,03
5	2,84	0,24	2,52	0	3,12	8,72
6	1,33	0,34	0,83	0	3,13	5,63
MW	**2,15**	**0,25**	**1,89**	**0,06**	**4,31**	**8,66**
(± SD)	(± 1,13)	(± 0,06)	(± 0,61)	(± 0,09)	(± 0,97)	(± 2,00)

(**MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung)

Werden die einzelnen Lipidfraktionen der vier Tierarten miteinander verglichen, so lassen sich erhebliche Unterschiede feststellen. Abb. 21 (S. 70) stellt die Anteile bei der jeweiligen Spezies als Balkendiagramm dar. Zunächst fällt auf, dass bei Kaninchen, Hund und Katze ein deutlicher Gehalt an Triglyceriden vorhanden war, wohingegen das Schwein kaum wahrnehmbare Werte besaß. Weiterhin besaßen die drei vergleichsweise stärker behaarten Tiere teilweise sehr hohe Anteile an Cholesterolestern. Beim Schwein bildete diese Fraktion den geringsten Anteil. Bei der Betrachtung der Cholesterolwerte fällt auf, dass diese Lipidklasse beim Schwein einen fast doppelt so hohen prozentualen Anteil am SC Trockengewicht hatte als bei Hund und Katze. Auch der Anteil an freien Fettsäuren war bei dieser Tierart höher als bei allen anderen. Der absolute Anteil an Ceramiden war bei den untersuchten Tieren sehr unterschiedlich: die geringsten Werte wurden für das Kaninchen erhoben, gefolgt von Katze, Hund und Schwein. Werden die Summen der Einzelkomponenten zwischen den Tierarten verglichen, so erreichten die Katzen einen fast doppelt so hohen Lipidanteil wie das Schwein. Kaninchen und Hund rangierten im mittleren Bereich.

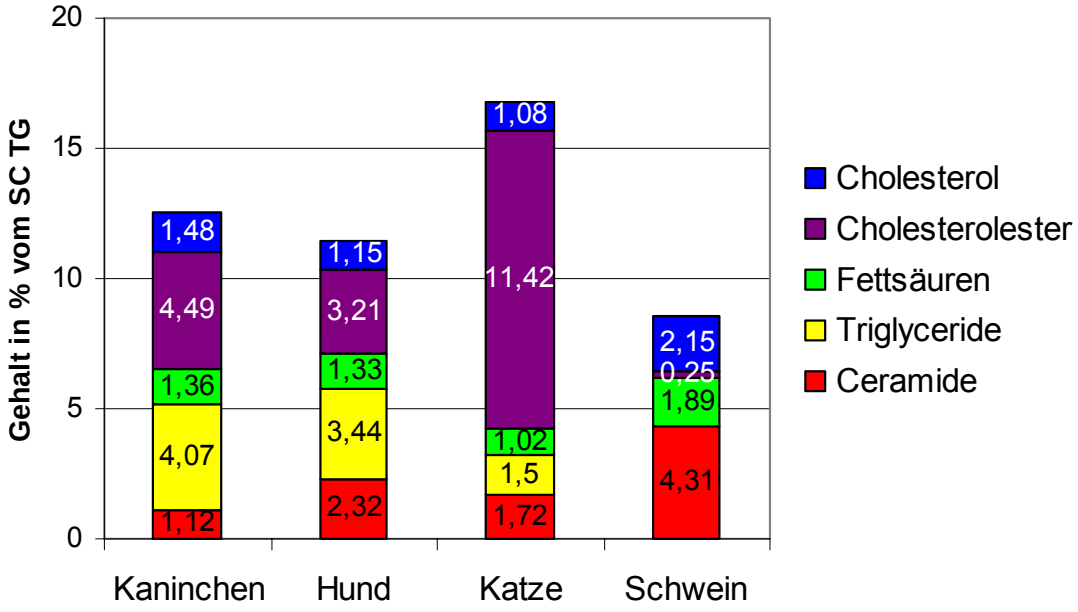


Abb. 21: Anteile der Lipidkomponenten im Stratum corneum bei den untersuchten Spezies im Vergleich. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte, die aus den Werten der einzelnen Individuen einer Art ermittelt wurden (n = 6 – 8)

4.5.2.3.2 Verhältnis der analysierten Lipidanteile untereinander

Soll das Verhältnis der verschiedenen Lipidklassen im Stratum corneum der vier untersuchten Spezies bestimmt werden, müssen die relativen Anteile der Lipidfraktionen an der Gesamtheit der erfassten Lipide ermittelt werden. In der Summe ergeben die in Abb. 22 (S. 71) als Kreisdiagramme dargestellten Anteile daher 100%. Da das Vorhandensein von Triglyceriden auf eine Kontamination der Proben mit subkutanem Fettgewebe schließen lässt, wurde in der Darstellung auf die Einbeziehung dieser Fraktion verzichtet. Jene drei stärker behaarten Tierarten wiesen jeweils Cholesterolester als Hauptanteil auf; die Katze den größten (71%), der Hund den geringsten (39%). Beim Schwein bildeten Cholesterolester gerade 3%. Vergleicht man die verbleibenden drei Lipidfraktionen, so wird ebenfalls eine unterschiedliche Verteilung deutlich. Beim Kaninchen war Cholesterol mit 18% die am stärksten vertretene Lipidklasse, gefolgt von freien Fettsäuren (16%) und Ceramiden (14%). Generell unterschieden sich die relativen Anteile nur gering. Beim Hund bildeten die Ceramide den Hauptteil (31%).

Freie Fettsäuren und Cholesterol waren die zweit- und drittstärkste Fraktion; zusammenaddiert liegen sie im Bereich der Prozentangaben für die Ceramide. Auch bei der Katze wurde als häufigstes der drei Lipide die Ceramidfarktion angegeben. Cholesterol und freie Fettsäuren lagen im gleichen Bereich.

Für das Schwein wurden ähnliche Verhältnisse vorgefunden: größte Fraktion waren die Ceramide mit 51%, gefolgt von Fettsäuren (24%) und Cholesterol (22%). Analog zum Hund lagen die addierten Angaben der freien Fettsäuren und des Cholesterols (46%) knapp unter dem Bereich der Ceramidfraktion.

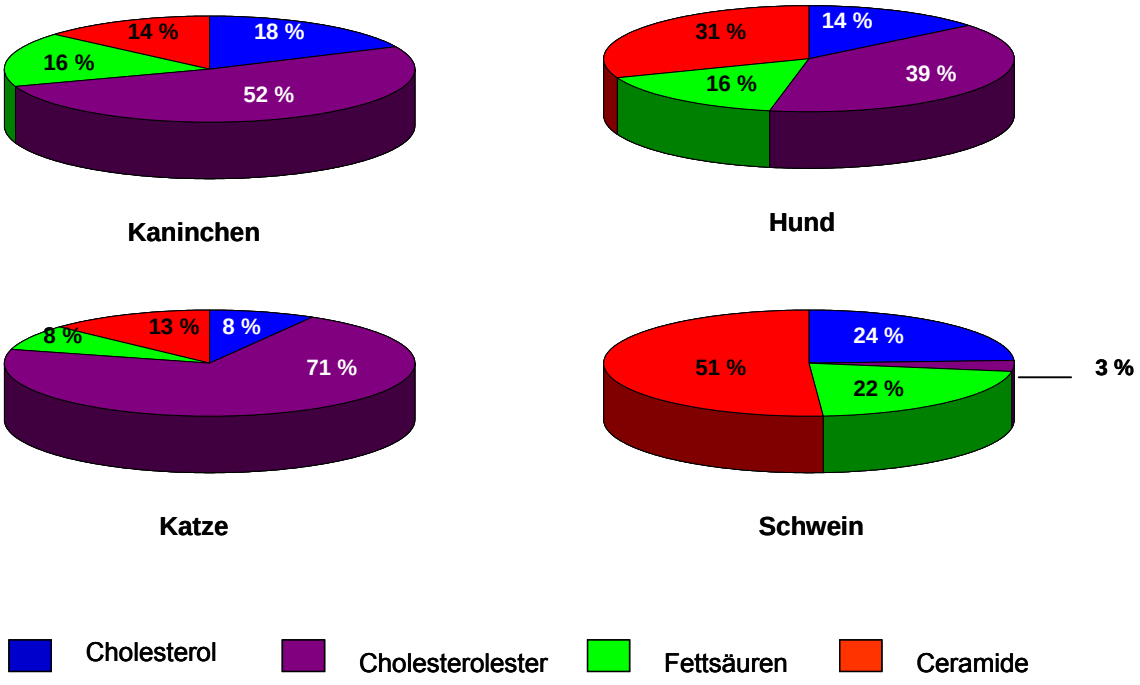


Abb. 22: Durchschnittlicher, prozentualer Anteil der ermittelten Lipidkomponenten bezogen auf alle erfassten Lipide bei den vier Spezies. Bei der Darstellung wurde der Gehalt an Triglyceriden nicht berücksichtigt.

4.5.2.4 Weitere interspezifische Unterschiede

Bei der Analyse der Anteile der vier Hauptlipidklassen im Stratum corneum der Spezies Hund, Katze, Kaninchen und Schwein wurden einige, über die Standardanalyse hinausgehende, Besonderheiten bei den Spezies entdeckt. Von allen untersuchten Hunden besaßen alle einen charakteristischen Spot auf der DC Platte, der bei keinem der Individuen der anderen Tierarten auftrat. Dieser Spot wurde bei der Entwicklung der Platten im Standardmedium I (Tabelle 2, S. 40) deutlich und ist in Abb. 23 mit einem roten Pfeil markiert. Wie aus der Abbildung hervorgeht, befand sich der Spot auf der DC Platte zwischen der Triglycerid- und der Cholesterolesterfraktion. Dieser Lokalisation nach zu urteilen, ist dieses Lipid den Wachsestern zu zuordnen. Über dieses, der Spezies Hund gemeinen Lipids hinaus, wurden auch bei allen untersuchten Kaninchen ein charakteristischer Spot auf den DC Platten lokalisiert. Dieser ist in Abb. 23 mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet und befand sich als isolierter Punkt oberhalb der Cholesterolfraktion.

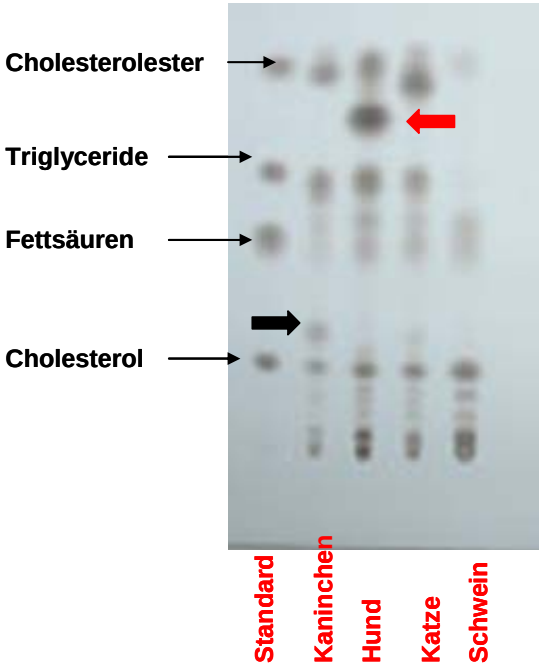


Abb. 23: Lipidmuster auf einer DC Platte nach der Bestimmung von Cholesterol, Cholesterolestern, Triglyceriden und freien Fettsäuren im Stratum corneum von Kaninchen, Hund, Katze und Schwein; individuelle Spots beim Kaninchen (schwarz) und beim Hund (rot) sind mit Blockpfeilen markiert

In Abb. 24 ist die Bestimmung der Ceramide bei jeweils einem Vertreter aller vier Spezies nebeneinander auf einer DC Platte dargestellt. Darauf ist zu erkennen, dass das Muster der Ceramide bei jeder der vier Tierarten unterschiedlich war. Dabei waren die einzelnen Individuen einer Art jeweils deckungsgleich. Die Anteile der verschiedenen Ceramidfraktionen unterschieden sich erheblich zwischen Hund, Katze, Kaninchen und Schwein. Obwohl die genaue Aufschlüsselung in die einzelnen Ceramide mit den verwendeten Standardlösungen nicht möglich war, konnte rein makroskopisch festgestellt werden, dass das Muster, und damit die Zusammensetzung der Ceramide, für jede einzelne untersuchte Tierart spezifisch war.

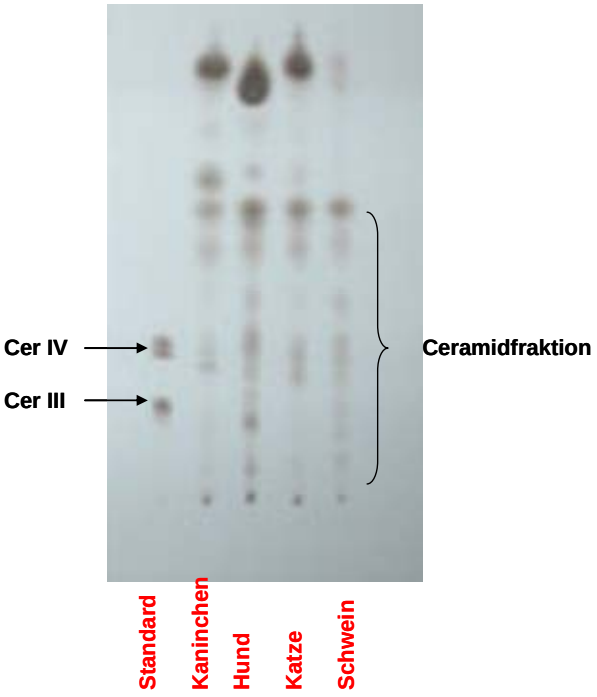


Abb. 24: Lipidmuster auf einer DC Platte nach der Bestimmung der Ceramide im Stratum corneum jeweils eines Vertreters der vier untersuchten Spezies

4.5.3 Vermessung der Korneozyten

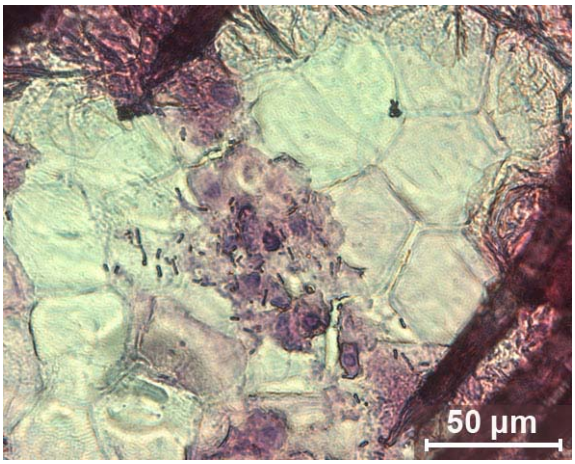
Mit Hilfe der HE gefärbten SC Proben wurde der durchschnittliche Durchmesser der Korneozyten bei den Spezies Hund, Katze, Kaninchen und Schwein bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt. Der geringste Korneozytendurchmesser fand sich mit durchschnittlich 38 µm beim Schwein. Die Durchmesser von Kaninchen, Katze und Hund lagen sehr eng beieinander und unterschieden sich um nur jeweils einen Mikrometer. Auch in diesem ermittelten Parameter waren gewisse Schwankungen innerhalb der einzelnen Individuen einer Spezies präsent. Auffällig geringe Standardabweichungen fanden sich beim Kaninchen und beim Schwein, dahingegen waren die individuellen Variationen beim Hund etwas stärker und bei der Katze am meisten ausgeprägt. Abb. 25 (S. 75) zeigt die gefärbten Korneozyten im Zellverband bei den untersuchten Spezies im Vergleich.

Tabelle 15: Mittlerer Korneozytendurchmesser der vier untersuchten Spezies in µm

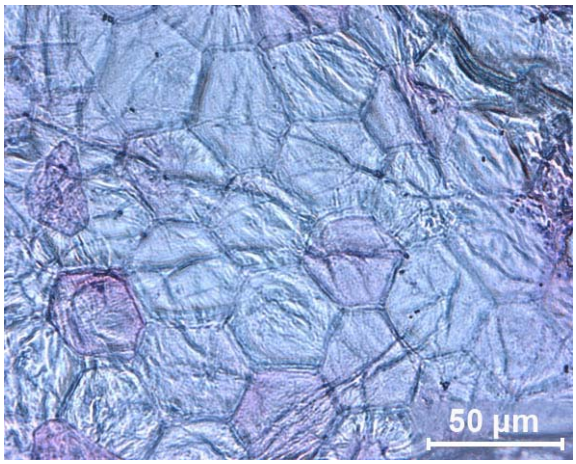
Probennr.	Hund	Katze	Kaninchen	Schwein
1	41	43	44	39
2	45	48	41	39
3	42	42	43	39
4	45	41	41	35
5	46	46	40	38
6	44	40	40	38
MW	**44**	**43**	**42**	**38**
(± SD)	(± 1,94)	(± 3,08)	(± 1,64)	(± 1,55)

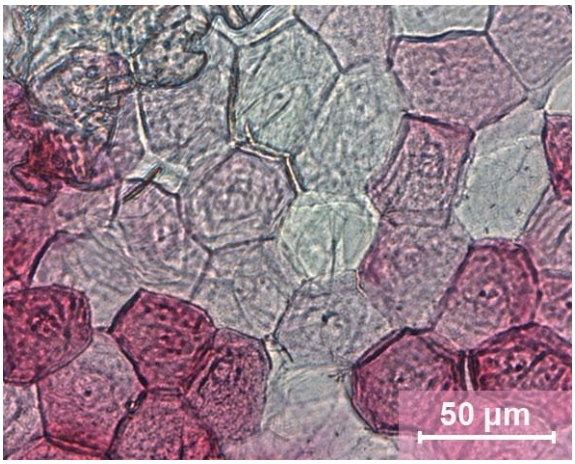
(**MW** = Mittelwert, **SD** = Standardabweichung)

Kaninchen

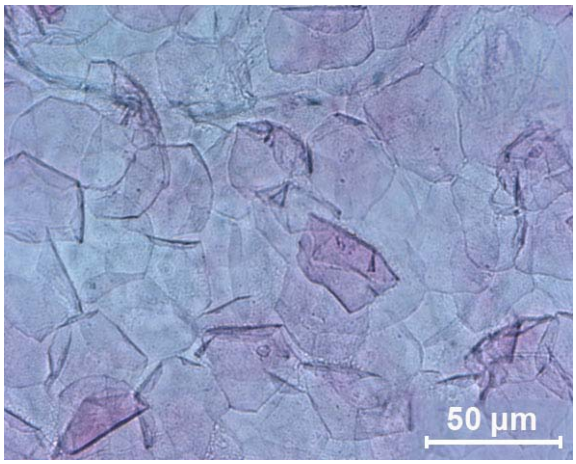


Hund





Katze



Schwein

Abb. 25: Lichtmikroskopische Ansicht des Stratum corneum der vier untersuchten Spezies. HE – Färbung.