

Aus der Tierexperimentellen Einrichtung
Charité Universitätsmedizin Berlin
Campus Virchow – Klinikum
Eingereicht über den
Fachbereich Veterinärmedizin
Freie Universität Berlin

**Untersuchung der perkutanen Resorption von Benzoesäure
an der isoliert hämoperfundierten Schweineextremität**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ira Maschmann
Tierärztin aus Twistringen

Berlin 2008

Journal-Nr.:3238

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunberg
Erster Gutachter: PD Dr. Christian Große-Siestrup
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Pigs, laboratory animals, absorption, resorption, benzoic acid, perfusion, animal testing
alternatives, skin, skin absorption (MeSH), hemoperfusion (MeSH)

Tag der Promotion: 03. September 2008

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-493-9

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mbv 2008

Nordendstr. 75 - 13156 Berlin – 030-45494866
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG | 6 |
| 2. | LITERATURÜBERSICHT | 8 |
| 2.1 | Dermatologische Wege in und durch die Haut | 8 |
| 2.2 | <i>In vitro</i> Modelle zur Untersuchung der perkutanen Penetration, Permeation und Resorption | 9 |
| 2.2.1 | Diffusionszellen | 10 |
| 2.2.2 | Zellkulturen und künstliche Haut | 10 |
| 2.2.3 | Dermale <i>in vitro</i> Perfusionsmodelle | 11 |
| 2.3 | Pharmakologische Eigenschaften und Vorkommen von Benzoessäure | 15 |
| 2.4 | Die Benzoessäure als Testsubstanz für dermale Resorptionsuntersuchungen an unterschiedlichen Modellen | 16 |
| 2.5 | Blutgerinnung, Ischämie und Reperfusion | 17 |
| 2.6 | Aufbau und Funktion der Haut (Cutis) | 19 |
| 2.6.1 | Epidermis, Oberhaut | 20 |
| 2.6.2 | Dermis, Corium, Lederhaut | 20 |
| 2.6.3 | Subcutis, Unterhaut | 21 |
| 2.6.4 | Hautanhangsgebilde (Drüsen und Haare) | 21 |
| 2.6.5 | Gefäße der Haut | 21 |
| 2.7 | Die Haut als Resorptionsorgan | 22 |
| 2.7.1 | Transdermale therapeutische Systeme | 22 |
| 2.7.2 | Pharmakokinetik lokal applizierter Stoffe | 23 |
| 2.8 | Schweinehaut als Modell für die Haut des Menschen | 25 |
| 3. | MATERIAL UND METHODEN | 27 |
| 3.1 | Perfusionsmodell | 27 |
| 3.1.1 | Versuche am Modell der isoliert perfundierten Schweineextremität | 27 |
| 3.1.2 | Ein- und Ausschlusskriterien | 27 |
| 3.1.3 | Organ- und Blutgewinnung sowie Organvorbereitung | 28 |
| 3.1.4 | Ischämiezeiten | 29 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.1.5 | Vorbereitung der Applikationsfläche der Prüfsubstanz | 29 |
| 3.1.6 | Dialysatzusammensetzung | 31 |
| 3.2 | Verwendete Prüfsubstanz für die topische Applikation | 31 |
| 3.3 | Versuchsaufbau zur Extremitätenperfusion | 32 |
| 3.3.1 | Die extrakorporalen Kreisläufe und ihre Funktionen | 33 |
| 3.3.2 | Computergestützte Systemüberwachung | 35 |
| 3.3.3 | Blutentnahmestellen | 35 |
| 3.4 | Versuchsablauf | 35 |
| 3.5 | Äquilibration und Stabilitätsüberprüfung des Systems sowie Bestimmungsmethoden und Geräte | 37 |
| 3.5.1 | Vitalitätskontrolle des Organs | 40 |
| 3.5.2 | Probengewinnung und Analytik | 40 |
| 3.6 | Benzoessäureanalytik | 41 |
| 3.6.1 | Berechnung der resorbierten Benzoessäuremenge | 42 |
| 3.7 | Statistische Auswertung | 42 |
| 4. | ERGEBNISSE | 44 |
| 4.1 | Perkutane Resorption von Benzoessäure an der isoliert hämoperfundierten Schweineextremität | 44 |
| 4.1.1 | Prozentuale Benzoessäureresorption | 44 |
| 4.1.2 | Benzoessäuremenge im Perfusat | 45 |
| 4.1.3 | Benzoessäuremenge im Dialysat | 46 |
| 4.2 | Charakterisierung des Modells | 47 |
| 4.2.1 | Ödematisierung des Gewebes | 47 |
| 4.2.2 | Hämodynamische Parameter | 48 |
| 4.2.2.1 | Mittlerer arterieller Perfusionsdruck (MAP) | 48 |
| 4.2.2.2 | Arterieller Perfusionsfluss | 48 |
| 4.2.2.3 | Organwiderstand | 49 |
| 4.2.3 | Hämatologische Parameter | 49 |
| 4.2.3.1 | Arterieller Hämoglobingehalt | 49 |
| 4.2.3.2 | Freies Hämoglobin im arteriellen Perfusat | 50 |
| 4.2.3.3 | Arterielle Lactatdehydrogenase (LDH) | 50 |
| 4.2.3.4 | Arterielle Kaliumkonzentration | 51 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.2.3.5 | Arterielle Natriumkonzentration | 51 |
| 4.2.4 | Stoffwechselfparameter | 52 |
| 4.2.4.1 | Sauerstoffverbrauch | 52 |
| 4.2.4.2 | Glucoseverbrauch | 52 |
| 4.2.4.3 | Lactatkonzentration im venösen Perfusat | 53 |
| 4.2.5 | Arterieller pH-Wert | 53 |
| 5. | DISKUSSION | 54 |
| 5.1 | Diskussion der Resorptionsergebnisse | 54 |
| 5.2 | Diskussion des verwendeten Modells | 58 |
| 5.2.1 | Hämolyse und Blutgerinnung | 59 |
| 5.2.2 | Ischämie und Reperfusion, Ödembildung | 61 |
| 5.2.3 | Hämodynamik und Stoffwechsellage | 62 |
| 6. | ZUSAMMENFASSUNG | 65 |
| 7. | SUMMARY | 67 |
| 8. | LITERATURVERZEICHNIS | 69 |
| 9. | ANHANG | 83 |
| 9.1 | Abkürzungsverzeichnis | 83 |
| 9.2 | Abbildungsverzeichnis | 85 |
| 9.3 | Tabellenverzeichnis | 87 |
| 9.4 | Ergebnistabellen | 88 |
| 9.5 | Formeln | 91 |
| | DANKSAGUNG | 92 |
| | SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG | 93 |

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Die Haut des erwachsenen Menschen hat eine Fläche von eineinhalb bis zwei Quadratmetern. Als äußere Begrenzung des Körpers sind ihre Hauptaufgaben der Schutz des Organismus und die Regulierung der Körpertemperatur. Sie ist das größte Sinnesorgan des Menschen und durch ihren engen Kontakt mit der Umwelt ständig vielfältigen, zum Teil schädlichen Einflüssen ausgesetzt. Eine Vielzahl von Umweltstoffen, Industriechemikalien, Kosmetika und Arzneimitteln wirken auf dieses Organ ein. Es stellt neben dem Gastrointestinaltrakt und der Lunge ein Organsystem dar, über das Fremdstoffe den Organismus erreichen. Während bei einer potentiellen Penetration von toxischen Stoffen die Barrierefunktion der Haut unterstützt werden soll, ist aus pharmazeutischer Sicht die Überwindung dieser Barriere von Interesse, um Arzneimittel über die Haut in den Organismus zu schleusen.

Der Bestimmung der perkutanen Resorption von Substanzen wird demnach besondere Bedeutung beigemessen. Zum Schutz des Verbrauchers sind vom Gesetzgeber sicherheitstoxikologische Prüfungen von Arzneistoffen, Chemikalien und Inhaltsstoffen von Kosmetika unter anderem an der Haut von Tieren vorgeschrieben.

Andererseits darf nach der EU Richtlinie 86/609/EWG zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere ein Tierversuch nicht durchgeführt werden, wenn eine wissenschaftlich fundierte, tierversuchsfreie Methode zur Verfügung steht, die in der Praxis experimentell erprobt ist.

Bereits Ende der 1950er Jahre formulierten die britischen Wissenschaftler W. M. S. Russel und R. L. Burch das 3 R-Konzept. Dieses Konzept bezieht sich auf Maßnahmen, die Anzahl von Versuchstieren zu verringern (*reduce*), die Untersuchungsmethoden ständig zu verfeinern (*refine*) um den körperlichen und psychischen Stress der Tiere während des Versuchs auf das Minimum zu reduzieren und neue Möglichkeiten zu entwickeln, welche einen Tierversuch ersetzen und damit überflüssig machen (*replace*). Nach erfolgreicher Validierung hat die OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) inzwischen bestimmte *in vitro* Tests zur Prüfung der Phototoxizität, der Ätzwirkung an der Haut, der Hautpenetration und der Sensibilisierung der Haut anerkannt.

Für Untersuchungen der perkutanen Resorption steht derzeit eine Vielzahl von *in vitro* Testmethoden zur Verfügung. Ein großer Vorteil der *in vitro* Methoden gegenüber dem Tierversuch besteht darin, dass auch das Penetrationsverhalten von hochtoxischen, teratogenen, mutagenen oder kanzerogenen Stoffen durch die Haut untersucht werden kann ohne ein Tier zu belasten. Die Versuche werden zumeist an menschlicher und tierischer

Haut und an so genannten Hautäquivalenten („künstliche Haut“) durchgeführt. Die Methoden reichen von der einfachen Diffusionszelle, bis hin zu komplexen Organperfusionen. Grundlegende Bedeutung kommt dabei dem Modell zu, welches in dem zu untersuchenden Phänomen möglichst große Ähnlichkeiten zum Menschen hat, um auf diesen übertragbar zu sein. Im Vergleich zu den bekannten Haussäugerarten ist die Haut des hellhäutigen Zuchtschweins für vergleichende Untersuchungen mit dem Menschen eher geeignet [Netzlaff et al., 2006; Meyer, 1996; Bartek et al., 1972]. Aus diesem Grunde wird als ein Testsystem für transdermale Resorptionsstudien die isoliert normotherm hämoperfundierte Schweineextremität verwendet [Große-Siestrup et. al, 2002; Wagner et al., 2003]. Die isoliert normotherm hämoperfundierte Schweineextremität erlaubt eine kontinuierliche Durchblutung der Haut und der anschließenden Gewebe, welches bei der vielfach in der medizinischen Forschung eingesetzten Diffusionszelle nach Franz nicht der Fall ist. Auch eine Metabolisierung der zu prüfenden Substanz durch Leber und Niere, welche beim Tierversuch stattfindet, wird bei der isolierten Extremität ausgeschlossen. Die isoliert normotherm hämoperfundierte Schweineextremität verfügt über ein geschlossenes Perfusionssystem, welches Versuchsdurchführungen mit nur geringen Mengen an Blut ermöglicht. Bei anderen Perfuionsmodellen, wie z. B. dem isoliert perfundierten Schweinehautlappen, dem isoliert perfundierten Schweineohr oder dem isoliert perfundierten Rindereuter existiert kein geschlossenes System und bei längeren Versuchszeiten ist mit hohen Mengen an Perfusat zu rechnen. Um den physiologischen Aspekten der *in vivo* Methoden am nächsten zu kommen wird die Perfusion der Schweineextremität zudem mit körperwarmem, autologem Blut durchgeführt.

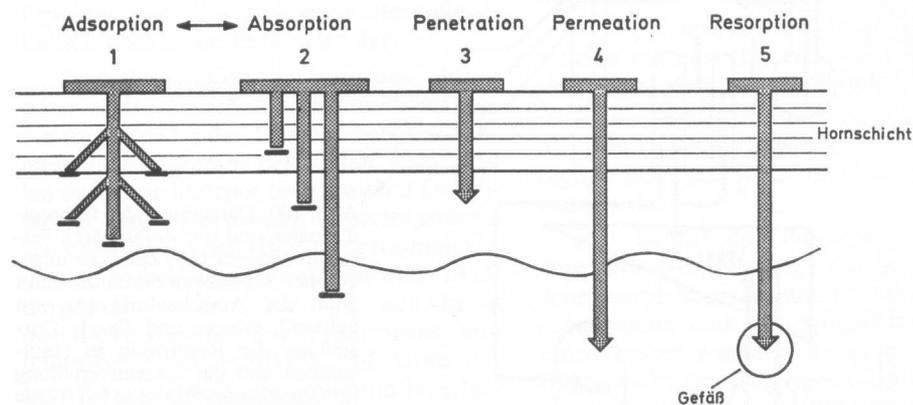
Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen in der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité Universitätsmedizin Berlin vorhandenen Perfusionsaufbau zu modifizieren und die Funktionsfähigkeit der isoliert hämoperfundierten Schweineextremität als zuverlässiges perkutanes Perfusionsmodell zu demonstrieren.

In diesem Zusammenhang sollen 3–6 Hämoperfusionen durchgeführt werden, mit der Option zuverlässig stabile Perfusionsbedingungen herstellen zu können. Anschließend soll die Resorption von Benzoesäure, eine vielfach in vorliegenden Studien eingesetzte Testsubstanz, in einer Konzentration von 40 mg/100 cm² Haut an mindestens 6 Schweineextremitäten gemessen werden. Die Benzoesäurekonzentration soll mittels HPLC erfasst werden.

2. Literaturübersicht

2.1 Dermatologische Wege in und durch die Haut

Die in der Dermatologie zur Beschreibung der Passage von Substanzen durch die Haut verwendeten Bezeichnungen werden in der Literatur nicht einheitlich eingesetzt. Daher ist es erforderlich, mit Hilfe von Abbildung 1 einleitend kurz auf die Definition einiger Begriffe einzugehen.



Die Wege der Substanzaufnahme durch die Haut. Graphische Darstellung der Begriffe. 1 Bindung an Hautstrukturen, 2 Aufnahme von Substanzen durch bestimmte Schichten der Haut, 3 Eindringen in die Haut (allgemein), 4 Durchdringen der Haut, 5 Durchdringen der Haut und Aufnahme in Blut- bzw. Lymphgefäße

Abb. 1: Schematische Darstellung der Bezeichnungen, die den Durchtritt von Substanzen in bzw. durch die Haut beschreiben [Stüttgen und Schäfer, 1974]

Als Resorption wird im Allgemeinen die Aufnahme eines Stoffes aus dem Magen-Darm-Trakt, aus den Atemwegen oder über die Haut ins Blut bezeichnet [Bock und Klotz, 1999].

Bei der Resorption müssen Zellmembranen permeiert werden. Die hydrophoben Fettsäureester der Phospholipiddoppelschicht der Zellmembran stellen eine Permeationsbarriere für hydrophile, geladene Substanzen dar. Stoffe werden gut resorbiert und im Organismus verteilt, wenn sie lipophil sind, d.h. wenn sie Zellmembranen durch passive Diffusion überwinden können [Bock und Klotz, 1999].

Außer durch passive Diffusion können bestimmte Stoffe auch aktiv aufgenommen werden:

- durch spezifische Transportsysteme (Carrier)
- durch Pinozytose oder Phagozytose
- über Poren
- über interzelluläre Brücken

Am häufigsten ist jedoch die passive Diffusion durch Zellmembranen [Bock und Klotz, 1999].

Der Resorptionsweg durch die Haut kann transepidermal oder transfollikulär (entlang der Haarfollikel und der damit assoziierten Drüsen) erfolgen [Stüttgen und Schäfer, 1974]. Im Vergleich zu den Schleimhäuten ist die Resorption durch die Haut wesentlich geringer [Starke und Freiburg, 2001]. Die hauptsächliche Resorptionsbarriere stellt das nicht kapillarisierte Stratum corneum mit einem sehr niedrigen Wassergehalt von ca. 10% und einem hohen Gehalt an apolarer Lipide dar [Mutschler et al., 2001]. Bei der Herstellung und Anwendung von Pharmaka muss diese Eigenschaft der Hautresorption berücksichtigt werden. So bleibt zum Beispiel die Wirkung von hydrophilen Desinfektionsmitteln (u. a. Invertseifen) auf die Hautoberfläche beschränkt, während die lipophilen Phenole resorbiert werden und damit toxische Wirkungen im Organismus verursachen können [Starke und Freiburg, 2001].

2.2 *In vitro* Modelle zur Untersuchung der perkutanen Penetration, Permeation und Resorption

Für das Testen der Resorption von Substanzen durch die Haut werden in der biomedizinischen Forschung bereits seit vielen Jahren *in vivo* Modelle vor allem bei Maus, Ratte, Kaninchen genutzt [Hara et al., 2007; Bartek et al., 1972]. Parallel dazu verstärkte sich die öffentliche Diskussion über die moralische Rechtfertigung von Tierversuchen. Seit 1990 werden Tiere juristisch auch nicht mehr als Sache behandelt, sondern haben den Status eines Mitgeschöpfes erhalten. 2002 wurde der Schutz der Tiere als Staatsziel in das Grundgesetz aufgenommen. Die 7. Änderung der EU-Kosmetikrichtlinie 76/768/EEC sieht eine stufenweise Einschränkung und ab dem Jahr 2013 ein endgültiges Verbot von Tierversuchen für Kosmetika vor. Aus Gründen des Tierschutzes und aus Gründen der besseren Reproduzierbarkeit von standardisierten Ersatzmethoden wird in zunehmendem Maße verlangt, die Untersuchung der perkutanen Penetration, Permeation und Resorption

nicht mehr am Tier durchzuführen. Eine solche schon seit 1975 genutzte Ersatzmethode ist die Diffusionszelle nach Franz.

2.2.1 Diffusionszelle nach Franz

Bisher am häufigsten wurde das Penetrationsverhalten von Substanzen in der nach dem Prinzip einer als Diffusionszelle funktionierenden Franz-Kammer [Franz, 1975; Bronaugh et al., 1982 und 1985] untersucht. Bei dieser Methode wird ein Stück exzidierte tierische Haut, humane Haut oder biotechnologisch hergestellte Haut (vgl. Kap. 2.2.2) zwischen zwei Glasplatten eingespannt. Während auf die epidermale Seite der Stoff appliziert wird, liegt die dermale Seite in der Regel in einer physiologischen Kochsalzlösung, die zum Auffangen des transdermal penetrierenden Stoffes dient.

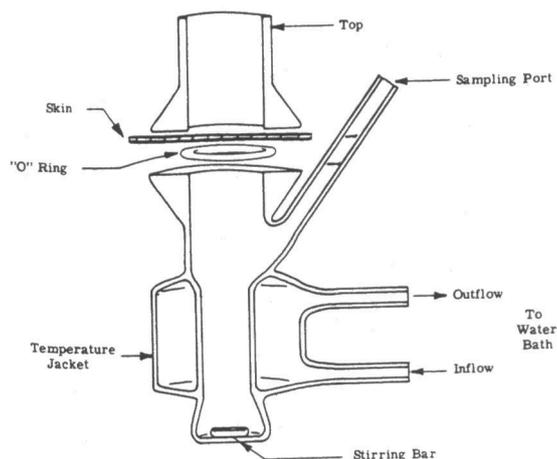


FIG. 1. Schematic representation of the diffusion cell used in these studies. Top is open to the ambient laboratory environment.

Abb. 2: Diffusionszelle, so genannte „Franz-Kammer“ [Franz, 1975]

2.2.2 Zellkulturen und künstliche Haut

Zur Überprüfung der dermalen Permeation und Metabolisierung von Fremdschubstanzen können auch Zellkulturen verwendet werden [Reinhardt, 1992]. Zur Anzüchtung eines Zellkulturepithels werden menschliche Keratinozyten gewonnen und zusammen mit letal bestrahlten 3T3-Fibroblasten ausgesät [Rheinwald und Green, 1975]. Nach etwa 12 Tagen werden sie entweder erneut in große Zellkulturgefäße oder direkt in Mikrotiterplatten

ausgesät. Es entstehen konfluente, mehrschichtige Epidermisäquivalente, die für Tests einsetzbar sind. Die Keratinozyten stammen zum Teil aus menschlicher Vorhaut und aus Haut, die bei plastischen Operationen entnommen wird.

Für die Gewinnung von künstlicher Haut werden Keratinozyten auf mesenchymalem Gewebe (isoliertem Korium oder in Kollagen eingebettete Fibroblasten) gezüchtet und durch Inkubation an der Luft-Medium-Grenze zur Verhornung gebracht [Schäfer-Korting, 1996]. Diese „Ersatzhaut“ weist allerdings eine schlechtere Barrierefunktion als gesunde Humanhaut auf. Die verstärkte Durchlässigkeit tierischer Haut ist auf eine Vielzahl von Haarfollikeln (Shuntweg der Penetration) zurückzuführen [Schäfer-Korting, 1996]. Die verminderte Barrierefunktion der Kunsthaut ist die Folge einer Fettstoffwechselstörung. Die epidermalen Lipide, sogenannte Ceramide, entstehen in geringerer Konzentration, werden unzureichend sezerniert und zudem nicht zu den üblichen Lipidhüllen arrangiert [Schäfer-Korting, 1996].

Rekonstruierte humane Hautmodelle gehören zu den viel versprechenden *in vitro* Systemen, welche ein großes Potential für den Ersatz von Tierversuchen zur Feststellung topischer Toxizität besitzen. Biotechnologisch hergestellte, kommerziell verfügbare Epidermismodelle sind unter anderem Episkin[®], EpiDerm[™] und SkinEthic[®] [Schäfer-Korting et al., 2006].

2.2.3 Dermale *in vitro* Perfusionsmodelle

Die Versuchsanordnung der oben beschriebenen Franz-Kammer erlaubt Aussagen zur dermalen Penetration, jedoch nicht zur Resorption einer topisch applizierten Substanz [Kietzmann und Löscher, 1993]. Die zu testende Substanz muss erst die gesamten Hautschichten durchwandern, um anschließend analysiert werden zu können. Dieses hat eine Zeitverzögerung zur Folge, da normalerweise bereits in der Dermis der Übertritt in die Blutbahn erfolgt. Das Interesse richtet sich daher auf *in vitro* Modelle, die eine Perfusion der Haut einschließen und damit auch das Ausmaß der Resorption erfassen lassen [Kietzmann und Löscher, 1993].

Eine klassische Versuchsanstellung stellt das isoliert perfundierte Kaninchenohr dar. Bereits im Jahre 1913 beschreibt Rischbieter das isoliert perfundierte Kaninchenohr als überlebendes Gefäßpräparat zur Prüfung der vasoaktiven Substanzen Adrenalin und Hypophysin [Rischbieter, 1913]. Das abgetrennte Ohr eines Kaninchens wird mit Stecknadeln auf einem Holzbrett mit Korkauflage befestigt. Eine Glaskanüle wird jeweils in die Zentralarterie und Zentralvene eingeführt und das so vorbereitete Organ mit Ringerlösung perfundiert.

Verschiedene Modifikationen dieses Modells sind später für Untersuchungen zur Resorption und zum Hautmetabolismus topisch applizierter Substanzen (Acetylsalicylsäure und Dihydrotestosteron) entwickelt worden [Ekerdt et al., 1985].

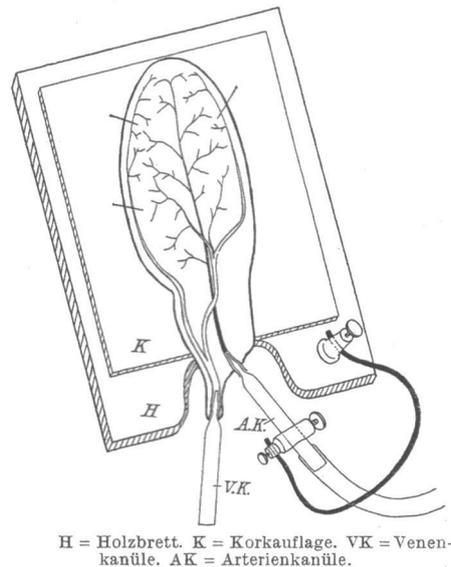


Abb. 3: Modell des isoliert durchströmten Kaninchenohrs [Rischbieter, 1913]

Bei der isoliert perfundierten Hundehaut wird die Haut des Hinterlaufes exzidiert und über die Arteria saphena mit heparinisiertem Hundeblood perfundiert [Kjaersgaard, 1954].

Ebenso sind Modelle der isoliert perfundierten Humanhaut [Hiernickel, 1986] und des isoliert perfundierten Schweinehautlappens [Riviere, 1986] entwickelt worden.

De Lange et al. [1992] gewinnen für das isoliert perfundierte Schweineohr die Schweineohren vom Schlachthof und perfundieren diese mit Carbogen (95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid) begastem Blut.

Besonders intensiv untersucht und genutzt wurde das isoliert perfundierte Rindereuter (The Bovine Udder System) [Kietzmann und Löscher, 1993; Kietzmann et al., 1993; Pittermann et al., 1995; Pittermann und Kietzmann, 2006]. Abbildung 4 zeigt den Versuchsaufbau mit einem Sammelbehälter für Perfusionsflüssigkeit (Tyrodelösung), die mit einem Sauerstoff-Kohlendioxid-Gemisch begast wird, einer Schlauchpumpe, einem Wasserbad zur Erwärmung der Perfusionsflüssigkeit und einem Fraktionssammler im schematischen Überblick. Die Milchdrüse wird über die jeweilige Arteria pudenda externa mit erwärmter und mit Carbogen begasteter Tyrodelösung, welche in ihrer Zusammensetzung weitgehend dem

Ionengehalt des Blutserums entspricht, perfundiert [Kietzmann und Löscher, 1993; Kietzmann et al., 1993].

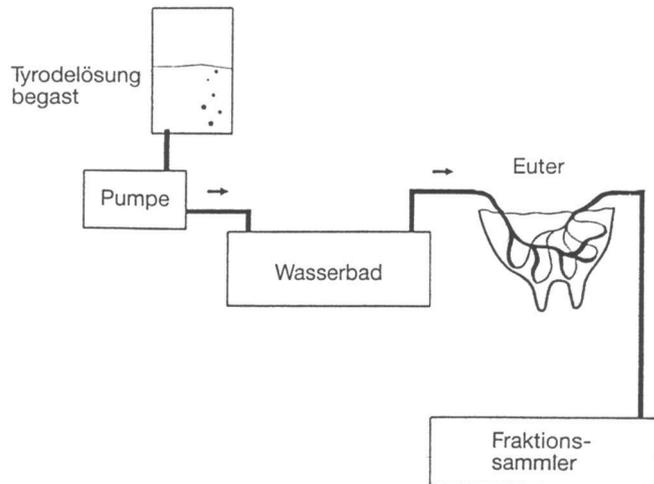


Abb. 4: Isoliert perfundiertes Rindereuter. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus [Kietzmann und Löscher, 1993]

Während das Eutermodell als Ersatz- und Ergänzungsmethode zu Tierversuchen zunächst für Penetrations- und Irritationsstudien im Pharma-, Kosmetik- und Chemiebereich eingesetzt wurde, wird jüngst seine Verwendung für die Ermittlung des Gefährdungspotentials von Prozesschemikalien und der Wirksamkeit von Hautschutzmitteln vorgestellt [Pittermann und Kietzmann, 2006].

Die Perfusion von ganzen Gliedmassen gelang Friedmann [1966] mit dem isoliert perfundierten Hundebein. Das Hinterbein wird dabei im Bereich des Hüftgelenkes abgesetzt und über die Arteria femoralis und die Vena saphena medialis an die Perfusionsapparatur angeschlossen [Friedmann, 1966]. Auch das isoliert perfundierte Hinterbein der Ratte dient als Perfusionsmodell für dermale Absorptionsstudien [Cross et al., 1994].

Die Hauptschwierigkeit bei der Organperfusion besteht darin, eine möglichst physiologische Perfusion des Organs zu bewirken. Das Organ sollte ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden, als auch der Abtransport von Stoffwechselprodukten muss gewährleistet sein. Wie bereits einleitend erwähnt, akkordiert die Perfusion mit Blut folgende Vorteile: hohes O₂-Bindungsvermögen, guter Substanztransport und infolgedessen Erhalt der Hautvitalität. Die Perfusion der isolierten Schweineextremität wird daher mit Blut durchgeführt [Große-Siestrup et al., 2002; Nogueira et al., 1999; Wagner et al., 2003; Godt,

2007]. Für den Gas- und Stoffaustausch, im Sinne einer Dialyse, dient dabei ein High Flux Polysulphon-Oxygenator.

Eine kurze Übersicht über die unterschiedlichen *in vitro* Hautmodelle liefert die nachstehende Tabelle:

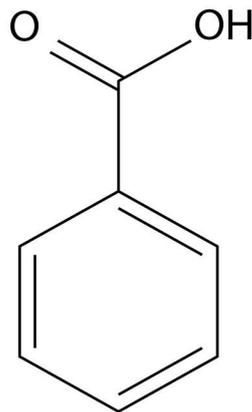
| Modell | Material | Methode | Vorteile (V) Nachteile (N) | Literatur |
|--|--|--|---|---|
| Isoliert perfundiertes Rindereuter | Rindereuter von Schlachttieren | Das Euter wird an eine Perfusionsapparatur angeschlossen und mit Carbogen begaster Tyrodelösung perfundiert. | V: Nutzung von Schlachttieren; große Hautfläche verfügbar N: keine Hautdurchblutung; große Wundfläche; aufwendige Handhabung | Pittermann et al., 1995; Kietzmann et al., 1993; Pittermann und Kietzmann, 2006 |
| Isoliert perfundierte Schweinehautlappen | Haut von Yorkshire weanling pigs | Über kanülierte Gefäße Perfusion mit Krebs-Ringer-Bicarbonatlösung (pH 7,4) | V: jederzeit verfügbar N: keine Hautdurchblutung | Riviere et al., 1986 |
| Isoliert perfundiertes Schweineohr | Ohren von Schlachtschweinen | Perfusion mit undialysiertem, oxygeniertem Blut. | V: Nutzung von Schlachttieren N: durch hohen Knorpelanteil schlechte Hautdurchblutung; nur kleine Hautfläche vorhanden | de Lange et al., 1992 |
| Isoliert perfundierte Schweineextremität | Am Schlachthof gewonnene Vorderbeine eines Schweines | Perfusion mit autologem, oxygeniertem und dialysiertem Blut. | V: Nutzung von Schlachttieren; Hautdurchblutung; Perfusion mit autologem Blut; N: aufwendige Handhabung | Große-Siestrup et al., 2002; Nogueira et al., 1999; Godt, 2007 |

Tab. 1: *In vitro* Hautmodelle

2.3 Pharmakologische Eigenschaften und Vorkommen von Benzoessäure

Benzoessäure ist die einfachste aromatische Carbonsäure. Sie besteht aus einem Benzolring (Phenylrest), an dem eine Carboxylgruppe gebunden ist. Ihre konservierende, antimikrobielle Wirkung basiert auf dem Säureanteil. Sie wird als chemisch-synthetisch hergestelltes Konservierungsmittel E 210 in Lebensmitteln wie Mayonnaisen, Fruchtsäften, Gemüse- und Obstkonserven verwendet. Benzoessäure wird bei der Herstellung von Benzoessäureestern benötigt, welche in der Parfümindustrie Anwendung finden. Als natürlicher Stoff kommt die Benzoessäure in Lebensmitteln wie Pflaumen, Preisel-, Heidel-, oder Johannisbeeren vor.

Benzoessäure (C_6H_5COOH)



Molmasse 122.12

Abb. 5: Strukturformel der Benzoessäure

2.4 Die Benzoessäure als Testsubstanz für dermale Resorptionsuntersuchungen an unterschiedlichen Modellen

Die dermale Resorption von Benzoessäure ist in den letzten Jahrzehnten bereits an *in vivo* und *in vitro* Modellen getestet worden. Eine kurze Übersicht liefert die folgende Tabelle.

| Jahr/ Literatur | Methode | Material |
|------------------------|--|----------------------|
| 1970 Feldmann et al. | <i>In vivo</i> | Menschenhaut |
| 1975 Franz | <i>In vitro</i> (Diffusionszelle) | Menschenhaut |
| 1978 Hunziker et al. | <i>In vivo</i> | Mexican hairless dog |
| 1984 Seubert et al. | <i>In vivo</i> | Menschenhaut |
| 2003 Schaper | <i>In vitro</i> (Perfundiertes Euter) | Rinderhaut |

Tab. 2: *In vitro* und *in vivo* Hautmodelle mit Benzoessäure als Testsubstanz

Feldmann und Maibach [1970] untersuchten die dermale Resorption von insgesamt 21 Substanzen am Menschen. Dazu wurde die jeweilige Substanz, u. a. auch Benzoessäure in Aceton gelöst und auf eine 13 cm² große Unterarmfläche der Versuchspersonen in einer Dosis von 4 µg/cm² aufgetragen. Die Probanden durften 24 Stunden lang die Hautstelle nicht waschen. Der gesamte Urin wurde 5 Tage gesammelt und der Gehalt an resorbierter Substanz gemessen. In den ersten 12 Stunden des Versuches gelangten 3 % der verabreichten Benzoessäuredosis pro Stunde in den Urin. In den 5 Tagen wurden 42,62 % der applizierten Benzoessäuredosis resorbiert, wobei bereits nach 48 Stunden die Resorption abgeschlossen war. Feldmann und Maibach [1970] kamen zu dem Erkenntnis, dass chemisch eng verwandte Verbindungen große Resorptionsunterschiede aufweisen können. So ist zum Beispiel die Resorptionsrate von Benzoessäure 200 mal höher, als die von ihrem Glycin-Konjugat, Hippursäure [Feldmann und Maibach, 1970].

Zwölf der von Feldmann und Maibach [1970] untersuchten 21 organischen Substanzen verwendete auch Franz für seine *in vitro* Resorptionsstudien an der Diffusionszelle („Franz-Zelle“). Er bestimmte die Resorption von Benzoessäure an Humanhaut, welche als schnell durch die Haut penetrierende Substanz eingestuft werden kann [Franz, 1975]. Bereits nach vier Stunden war das Resorptionsmaximum erreicht.

Hunziker et al. [1978] führten Resorptionsversuche von Benzoesäure an Mexikanischen haarlosen Hunden durch. Dabei wurde die Benzoesäure entweder auf die Nackenhaut der Hunde aufgetragen oder subkutan injiziert. Die Benzoesäurekonzentration im Urin der Hunde wurde anschließend 10 Tage lang analysiert und mit den von Feldmann und Maibach 1970 am Menschen gewonnenen Benzoesäureresorptionsergebnissen verglichen [Hunziker et al., 1978]. Bei den Versuchen in denen die Benzoesäure auf die Haut aufgetragen wurde, liegt die maximale Resorptionsrate (% der applizierten Dosis pro Stunde) beim Menschen bei 3 %, während sie bei den Hunden nur bei 0,25 % liegt [Hunziker et al., 1978]. Versuche bei Hunden mit der subkutan applizierten Benzoesäure führten zu den gleichen Resultaten wie beim Menschen [Hunziker et al., 1978]. Seubert et al. [1984] untersuchten die Penetration von Benzoylperoxid in die Haut am Menschen. Die Untersuchungen wurden an 5 männlichen und 5 weiblichen Personen im Alter zwischen 17-25 Jahren durchgeführt. Eine 10 %ige Öl/Wasseremulsion von Benzoylperoxid wurde auf eine begrenzte Fläche der angefeuchteten Rückenhaut aufgetragen. Um die Konzentration von Benzoylperoxid und Benzoesäure zu messen, wurden die einzelnen Schichten des Stratum corneums der Haut mittels Tesafilm (Hornschichtabrissverfahren, „stripping“) entfernt. Die Ergebnisse zeigten, dass Benzoylperoxid unter *in vivo* Bedingungen rasch in die Haut penetriert und in der Hornschicht innerhalb von 8 Stunden völlig zu Benzoesäure umgesetzt wird [Seubert et al., 1984]. Benzoesäure bildet kein Depot im Stratum corneum und penetriert rasch durch die Epidermis und Dermis.

Schaper [2003] untersuchte die perkutane Resorption von Benzoesäure, Testosteron und Hydrocortison am isoliert perfundierten Rindereuter. Die Ergebnisse legen dar, dass Benzoesäure schnell in das Stratum corneum penetriert, schnell aus diesem wieder abflutet und in das Gefäßsystem resorbiert wird (siehe auch Diskussion, S. 56 f).

2.5 Blutgerinnung, Ischämie und Reperfusion

Die Anerkennung eines *in vitro* Modelles und die Verwendbarkeit der Ergebnisse hängen in hohem Maße davon ab, ob es gelingt, die Lebens- und Funktionsfähigkeit des isolierten Organs zu gewährleisten. Die Ursachen für eine unzulängliche Organperfusion werden hauptsächlich im Perfusionsmedium gesehen. Die Perfusion der Schweineextremität wird deshalb mit Vollblut durchgeführt. Im Gegensatz zu zellfreien Perfusionslösungen (z.B. Tyrodelösung) erfüllt Blut auf Grund seiner spezifischen Zusammensetzung eine Reihe von Aufgaben, die für die Funktionstüchtigkeit des Organs lebenswichtig sind [Höchel et al., 2003]. Zum Beispiel gewährleistet das Hämoglobin der Erythrozyten den Transport von

Sauerstoff und Kohlendioxid für die Zellatmung; Albumine des Blutes dienen der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes und der Beförderung körpereigener (Hormone) und körperfremder Stoffe (Pharmaka) im Gefäßsystem. Die Perfusion mit Blut birgt jedoch auch gewisse Risiken. Durch Koagulation des Blutplasmas kann es beispielsweise zur Blutgerinnung und damit zur Ischämie der betroffenen Gewebe führen. *In vitro* kann die Gerinnung durch die autokatalytische Aktivierung des Faktors XII an negativ geladenen Oberflächen (z. B. Glas) ausgelöst werden (Intrinsisches Gerinnungssystem). Die Aktivierung des Faktors XII zu XIIa führt über die Faktoren XI/XIa sowie IX/IXa zur Aktivierung von X zu Xa [Engelhardt et al., 2005]. Der Faktor Xa bildet mit dem Cofaktor Va den Faktor-Xa/Va-Komplex (Prothrombinaktivator), der nun die Aktivierung von Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin (Faktor IIa), der wichtigsten Protease in der Gerinnungskaskade, bewirkt. Thrombin spaltet schließlich aus dem Fibrinogenmolekül 4 Peptide ab, wodurch die Bindungsstellen für die Polymerisierung der Fibrinmonomere zu Fibrinfäden freigelegt werden. Zugleich aktiviert Thrombin auch den Faktor XIII zu XIIIa, der die Quervernetzung der Fibrinfäden zu einem Fibrinnetz katalysiert [Engelhardt et al., 2005]. Die Blutgerinnung bedingt im perfundierten Organ Mikrozirkulationsstörungen und als deren Folge Schädigungen des Organparenchyms [Isselhard, 1986].

Ein Organ wird zwischen der Entnahme vom Spender und dem Anschluss an den Perfusionskreislauf zwangsläufig nicht durchblutet. Während dieser Ischämiezeit ist durch den Sauerstoffmangel in den Zellen die Bereitstellung von intrazellulärer Energie in Form von Adenosintrophosphat (ATP) nur über anaerobe Glycolyse möglich. Es kommt zum Abfall des Energiestoffwechsels und damit zu einer Einschränkung der jeweiligen Gewebefunktion. Die Ursache hierfür ist, dass der Organismus bei ausreichender Sauerstoffversorgung aus einem Molekül Glucose, mittels aerober Glykolyse, Pyruvat-Dehydrogenase-Reaktion und Citronensäure-Cyclus, 36 Moleküle ATP bilden kann, welches dann als Energielieferant der gesamten Zelle zur Verfügung stehen. Im Gegensatz dazu ermöglicht die anaerobe Glykolyse im ischämischen Gewebe lediglich die Bildung von 2 Molekülen ATP pro verbrauchtem Glucosemolekül. Darüber hinaus entstehen aus einem Glucosemolekül zwei Lactatmoleküle, wodurch sich intrazellulär saure Valenzen ansammeln [Dittrich et al., 2002; Knight et al., 2001]. Der schnelle Abfall der ATP-Konzentration während der Minderdurchblutung des Gewebes führt zu einer Aktivitätsminderung der membranständigen, ATP verbrauchenden Ionenpumpen (Na^+/K^+ ATPase, Ca^{2+} ATPase). Es kommt zu einer intrazellulären Na^+ - und Ca^{2+} Akkumulation und somit zu einer Senkung des Membranpotentials [Gasbarrini et al., 1992]. Die Differenzen im osmotischen Druck zwischen Cytoplasma und extrazellulärer Flüssigkeit führen zum Einstrom von Wasser in die Zelle. Die Zellen schwellen an, was im kapillaren Endstrombett eine Einengung der Kapillaren zur Folge hat. Dieses Phänomen wurde als „no-reflow“ beschrieben, da selbst bei

Wiedereinsetzen der Perfusion der kapillare Widerstand im Endstrombett erhöht ist und damit weniger Blut die Kapillaren erreicht [Menger et al., 1992].

Der während der Ischämie stattfindende Abbau von ATP über ADP zu AMP führt zu einer Ansammlung von Adenosin in den Zellen. Überschüssiges Adenosin wird in den Purinbasenabbau eingeschleust. Durch die sauerstoffarmen Bedingungen kann das bei dem Abbau von Adenosin über Inosin entstehende Hypoxanthin nicht weiter zu Xanthin umgesetzt werden. Hypoxanthin reichert sich in der Zelle an. In der Ischämiephase wird durch proteolytische Prozesse die Xanthin-Dehydrogenase zur Xanthin-Oxidase konvertiert [Mc Cord, 1985, Mc Cord et al., 1985]. Bei der Reperfusion mit Reoxygenierung des Gewebes erfolgt dann, mit Hilfe der Xanthin-Oxidase, ein schneller Umsatz des Hypoxanthins zu Xanthin [Granger, 1988]. Bei dieser Reaktion werden O₂-Radikale freigesetzt. Freie O₂-Radikale gelten als toxisch, sie induzieren durch Lipidperoxidation Membran- und Gewebeschäden [Kurokawa und Takagi, 1999; Menger, 1992; Bosco und Schweizer, 1988].

2.6 Aufbau und Funktion der Haut (Cutis)

Die Haut bildet die äußere Körperdecke. Sie schirmt zum einen den Organismus von der Umwelt ab und schafft zum anderen eine breite Kontaktfläche zu dieser. Sie bildet ein Schutzorgan gegenüber mechanischen, thermischen, chemischen und biologischen Einflüssen. Durch eine ausgeprägte Hämodynamik und Vaskularisation reguliert sie den Wärme- und Wasserhaushalt des Körpers. Durch Ablagerung von Fett in das Unterhautfettgewebe dient sie als Energiespeicher. Die äußere Schicht der Haut entwickelt sich wie das Nervengewebe aus dem ektodermalen Gewebe. Das Nervengewebe der Haut dient dazu, unterschiedliche Reize zu erkennen, aufzunehmen und an das Gehirn weiterzuleiten. Somit wird der Haut unter anderem die Funktion eines Sinnesorgans zugeschrieben. Durch Einlagerung von unspezifischen und spezifischen Immunzellen ist sie Teil des Abwehrsystems des Körpers [Liebich, 2003].

Die unterschiedliche Dicke und Festigkeit der Haut ist je nach Tierart, Rasse, Alter, individueller Anlage und Körpergegend verschieden. Im Allgemeinen ist die Haut am Rücken stärker als am Bauch. Mechanisch beanspruchte Partien wie die Zehenendorgane sind dicker als die mehr geschützt liegenden Zwischenschenkelbereiche [Habermehl et al., 1996]. An behaarten Körperstellen ist die Hautdicke geringer und nimmt in haarlosen und haararmen Regionen zu. Trotz unterschiedlicher Funktion und Struktur liegt dem Bau der Haut ein einheitliches Grundprinzip vor [Liebich, 2003].

Die Haut besteht aus drei Schichten:

Oberhaut (Epidermis)

Lederhaut (Corium, Dermis)

Unterhaut (Subcutis)

2.6.1 Epidermis, Oberhaut

Das Epithel der Haut, die Epidermis, ist mehrschichtiges verhornendes Plattenepithel [Leonhardt, 1990]. Es setzt sich aus der oberflächlichen Hornschicht (Stratum corneum) und der tiefen Keimschicht (Stratum germinativum) zusammen [Habermehl et al., 1996]. Die Epithelzellen (Keratinocyten) schieben sich von der Epithelbasis zur Oberfläche und verhornen in dieser Zeit (Keratinisierung) [Liebich, 2003].

Die Epidermisdicke der behaarten Haut unterschiedlicher Spezies in Mikrometer beträgt:

Fleischfresser: 10-45

Schaf: 25-40

Ziege + Rind: 40-60

Pferd: 30-90

Schwein: 70-140

Mensch: 50-120 (Epidermis der allgemeinen Körperdecke)

[Habermehl et al., 1996]

2.6.2 Dermis, Corium, Lederhaut

Das Corium besteht aus einem dichten Kollagenfasergeflecht und bildet die bindegewebige Unterlage der Epidermis. Es verleiht der Haut Reißfestigkeit und reversible Verformbarkeit. Aus dem Corium tierischer Häute wird durch Gerben Leder gewonnen („Lederhaut“). Aufgrund der Faseranordnung wird das Corium in zwei Schichten eingeteilt. Das Stratum papillare, welches unmittelbar an die Epidermis grenzt und das Stratum reticulare, welches die Verbindung zur Subcutis herstellt [Leonhardt, 1990].

2.6.3 Subcutis, Unterhaut

Die Subcutis besteht aus lockerem, unregelmäßig angeordnetem Bindegewebe, welches die Haut verschieblich mit Faszien und Muskulatur verbindet. Die Unterhaut ist reich an Fettgewebe, das tierartabhängig, geschlechtsspezifisch und regional verschieden ausgeprägt ist [Liebich, 1999]. Die Fettzellen werden von kollagenem Bindegewebe in Läppchen untergliedert [Weyerstahl, 1990]. Die Fetteinlagerungen dienen als Energiereserven (Fettdepots) und als Kälteschutz.

2.6.4 Hautanhangsgebilde (Drüsen und Haare)

Die Haut wird von einem dünnen Fett- und Säuremantel bedeckt, der von Drüsen aus der Lederhaut an die Oberfläche abgesondert wird. Man unterscheidet zwei Arten von Hautdrüsen:

Talgdrüsen (*Glandulae sebaceae*) und Schweißdrüsen (*Glandulae sudoriferae*) [Liebich, 2003].

Während die allgemeine Körperdecke des Menschen vor allem Schweißdrüsen in Form von ekkrin sezernierenden Schlauchdrüsen („echte Schweißdrüsen“) enthält, findet man bei den Haussäugetieren nur apokrin sezernierende Schlauch- bzw. Knäuldrüsen [Meyer et al., 1978d; Banks, 1993]. Die Sekrete sind Träger individualspezifischer Duftstoffe und befinden sich in Nachbarschaft zu Haaren [Liebich, 2003]. Eine spontane Sekretabgabe („Schwitzen“) der Schlauchdrüse ist unter allen Haussäugetieren nur beim Pferd nachgewiesen worden [Meyer et al., 1978c]. Talgdrüsen sind holokrin sezernierende Drüsen [Liebich, 2003]. Das fettige Sekret (Sebum) der Talgdrüsen verteilt sich auf der Hautoberfläche und überzieht die Epidermis mit einem dünnen Fettfilm [Liebich, 2003]. Haare (Pili) dienen dem Wärmeschutz und der Tastempfindung.

2.6.5 Gefäße der Haut

Die Blutgefäße der Haut dienen außer der Ernährung auch der Blutdruck- und Temperaturregulation des Organismus. Die Arterien entstammen in der Regel Blutgefäßen, welche die oberflächliche Körpermuskulatur mit Blut versorgen. Von diesen gehen feine Äste ab, die sich zu Netzen (arterieller Zu- und venöser Abfluss) formatieren. Die Ernährung der

gefäßlosen Epidermis erfolgt auf dem Weg der Diffusion, aber auch aktiver Transporte, vermutlich mit Hilfe der Interzellularspalten [Habermehl et al., 1996].

2.7 Die Haut als Resorptionsorgan

Während bis vor einigen Jahren der Haut als Resorptionsorgan für systemisch wirkende Arzneistoffe keine große Bedeutung zukam, wird nunmehr versucht, durch Entwicklung geeigneter Zubereitungsformen die Haut als Applikationsort zu nutzen.

2.7.1 Transdermale therapeutische Systeme

Transdermale therapeutische Systeme (TTS), die als Pflaster auf die Haut geklebt werden, stellen für einige Substanzen eine Alternative zur oralen Gabe dar. Mit dieser Applikationsform können über einen relativ langen Zeitraum annähernd konstante Plasmaspiegel erreicht werden [Mutschler et al., 2001]. Dabei muss die Geschwindigkeit der Freigabe aus dem System als Geschwindigkeitsbestimmender Schritt kleiner sein als die Diffusion durch die Hornschicht, damit die Geschwindigkeit der Resorption durch das System und nicht durch die Haut bestimmt wird [Stüttgen et al., 1986]. Als Beispiele für transkutane Therapieformen in denen systemische Wirkungen erzielt werden sind u. a. zu nennen:

TTS mit Scopolamin bei Kinetosen, mit Nitroglyzerin zur Prävention von Angina-pectoris-Anfällen, mit Clonidin gegen Hypertonie, mit Östradiol zur Östrogensubstitution in der Menopause [Stüttgen et al., 1986].



Abb. 6: Therapeutisches System zur transdermalen Arzneistoffapplikation.
[aus Starke und Freiburg, 2001]

Der Weg über die Haut hat für das Eindringen von Arzneistoffen in den Organismus unter anderem folgende Vorteile:

- Eliminierung der unberechenbaren Variablen, welche die gastrointestinale Resorption oraler Arzneimittel in konventioneller Formulierung beeinflussen;
- Reduktion des Arzneistoffmetabolismus durch primäre Umgehung der Leber (Umgehung des first-pass-effect);
- Vermeidung einer initialen Überdosierung des Wirkstoffs beim Eintritt in den Kreislauf und Reduzierung der damit verbundenen Nebenwirkungen;
- Schmerzlose Therapie, dadurch Verbesserung der Patienten-Compliance (vor allem bei Kindern);
- Möglichkeit, die Arzneimitteltherapie durch Entfernung des Systems von der Haut jederzeit und kurzfristig zu beenden;

[aus Heilmann, 1984].

Ein gewisser Nachteil der perkutanen Applikation von Medikamenten besteht darin, dass eine Resorption der Wirksubstanz in die Haut häufig erst nach einer Schädigung bzw. nach einer Zerstörung der epidermalen Barriere gegeben ist [Neurand und Meyer, 1987]. Die hierzu benötigten Stoffe können als Vehikel (Trägersubstanzen für Medikamente) oder Akzeleranzien (permeationsfördernde Beschleuniger) bezeichnet werden. Bei den letzteren sind als Beispiele Propylenglykol, Isopropanol und Dimethylsulfoxid (DMSO) zu nennen. Es handelt sich jedoch oft um toxisch wirkende Chemikalien, deren Anteil am Medikament daher stets genau zu überwachen und/oder möglichst klein zu halten ist.

2.7.2 Pharmakokinetik lokal applizierter Stoffe

Für die Penetration von Substanzen in die Haut gelten prinzipiell die physikalischen Gesetze der Diffusion durch Membranen [Stüttgen et al., 1986]. Die physikalische Grundlage der passiven Diffusion von Substanzen ist die Brown-Molekularbewegung. Durch die zufällig ungerichtete Bewegung der Moleküle kommt es zu einem Nettomassefluss in Richtung eines Konzentrationsgradienten, der durch die Fick'schen-Gesetze beschrieben wird [Stüttgen et al., 1986]. Bringt man ein Pharmakon in einem Vehikel in Kontakt mit einer Membranoberfläche, so kommt es nach einer gewissen zeitlichen Verzögerung (lag time), während der die Substanz in die Membran eindringt, allmählich zur Ausbildung eines konstanten Flusses (steady state flux). Dieser hält solange an, wie auf der

Membranoberfläche ein genügend großer Substanzvorrat vorhanden ist und auf der anderen Seite für ein kontinuierlichen Substanzabstrom gesorgt ist [Stüttgen et al., 1986].

Betrachtet man den Weg der Wirkstoffaufnahme durch die Haut, so kann man das in Abbildung 7 dargestellte, vereinfachte pharmakokinetische Modell zu Grunde legen.

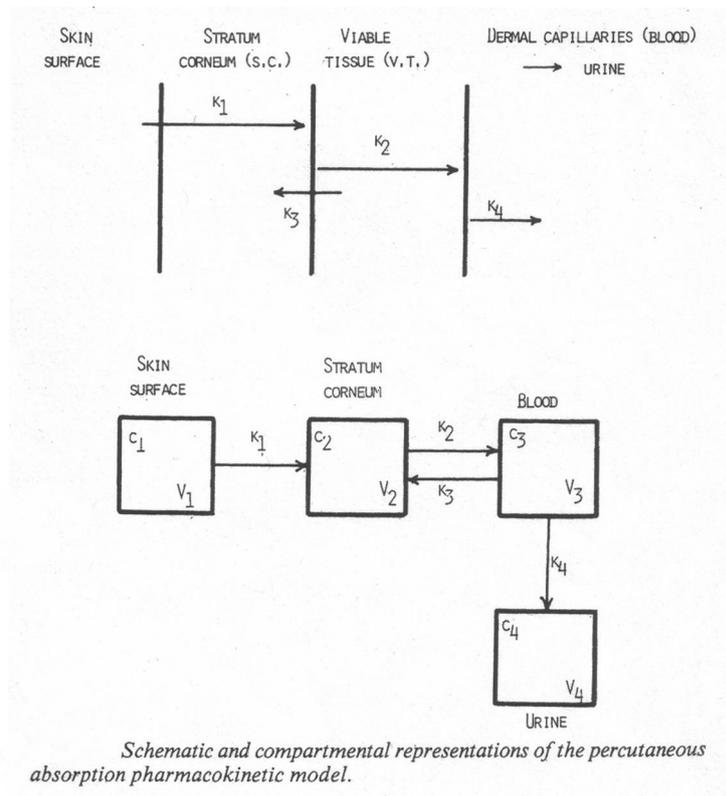


Abb. 7: Kompartimentmodell [nach Guy und Hadgraft, 1984]

Guy und Hadgraft [1984] entwickelten ein Vier-Kompartiment-Modell mit den Kompartimenten Hautoberfläche (1), Stratum corneum (2), Blut (3) und Urin (4) mit den dazugehörigen Konzentrationen (C_{1-4}) und den Volumina (V_{1-4}) in den Kompartimenten sowie den Geschwindigkeitskonstanten (k_{1-4}) für die perkutane Resorption. Der Weg eines Wirkstoffmoleküls aus einer galenischen Zubereitung auf der Hautoberfläche bis zur Elimination geht durch die einzelnen Kompartimente. Die Geschwindigkeit des Wirkstoffübertritts zwischen den jeweiligen Kompartimenten ist verschieden und wird durch entsprechende Konstanten beschrieben [Guy und Hadgraft, 1984]. Die Geschwindigkeitskonstante k_1 beschreibt den Stoffeintritt in das Stratum corneum, k_2 den Durchtritt durch den lebenden wässrigen Anteil der Epidermis und die anschließende Aufnahme des Wirkstoffes in die Gefäße der Dermis. Die berechnete kinetische Konstante k_3

steht für die Rückdiffusion aus dem Blut ins Stratum corneum. Diese Konstante ist im Vergleich zu k_2 groß, wenn Substanzen eine hohe Affinität zum Stratum corneum aufweisen und ein Reservoir in der Hornschicht ausbilden. Die berechnete Geschwindigkeitskonstante k_4 beschreibt die Elimination eines Wirkstoffs aus dem Organismus, also den Übertritt vom 3. Kompartiment (Blut) ins 4. Kompartiment (Urin).

2.8 Schweinehaut als Modell für die Haut des Menschen

Bereits seit Jahren wird die Frage diskutiert, ob die Haut unserer Haussäugetiere als Modell für die Haut des Menschen dienen kann [Meyer et al., 1978c; Bosse, 1963; Bosse, 1965; Meyer et al., 1978a].

Im Vergleich zu den herkömmlichen Labortieren wie Mäusen, Ratten, Kaninchen ist die Haut des hellhäutigen Zuchtschweins für vergleichende Untersuchungen mit dem Menschen eher geeignet [Bartek et al., 1972; Netzlaff et al., 2006]. Experimente mit kleinen Labortieren lassen aufgrund des außerordentlich dichten Haarkleides bei diesen Säugerarten nur sehr bedingt direkte Parallelen zum Menschen zu [Meyer et al., 1978a, 1978b, 1978c; Militzer, 1982]. Auch bei Katze, Hund und Wiederkäuern ist zu beachten, dass deren dichtes Haarkleid typische strukturelle und funktionelle Charakteristika besitzt, welche dem Menschen fehlen [Meyer, et al., 1978a, 1978c]. Meyer [1986] kommt zu dem Ergebnis, dass von den bekannten Haussäugerarten nur das hellhäutige Zuchtschwein als mögliches Modell für die Haut des Menschen herangezogen werden sollte. Von den verschiedenen Hautschichten entsprechen am ehesten Epidermis und Dermis in Dicke, Struktur und Funktion denen des Menschen.

Zu den deutlichen Parallelen zum Menschen gehören: Bau, Biochemismus, grundlegende stoffwechselphysiologische Vorgänge, Verteilung der Bindegewebelemente, Gehalt, Struktur und Verteilung von Glykoproteinen, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen [Meyer, 1996]. Auch das Kollagen der Schweinehaut entspricht in der Aminosäurezusammensetzung weitgehend dem Kollagen der menschlichen Haut [Meyer, 1996]. Die Anzahl der intraepithelialen Langerhans-Zellen (Derivate des mononukleären Phagozyten-Systems) ist beim Schwein wesentlich geringer und die Immunbarriere der Haut dadurch schwächer und/oder andersartig entwickelt als beim Menschen [Meyer, 1986]. Die Übereinstimmung der Aminosäurezusammensetzung und die niedrige Zahl der Langerhans-Zellen sind Gründe für die geringe antigene Wirkung der Schweinehaut gegenüber dem Menschen [Meyer, 1996; Heinrich et al., 1971]. Dieses bietet Vorteile der Schweinehaut für die Transplantationschirurgie [Kerrigan et al., 1986].

Ein großer Unterschied zwischen der behaarten Haut des Schweins und der des Menschen zeigt sich hingegen im Vergleich der Hautdrüsen. Die apokrinen Schlauchdrüsen des Schweins sondern ein Sekret ab, welches an der Körperoberfläche ein Milieu um pH 6-7 hervorruft, während die ekkrinen Schlauchdrüsen des Menschen ein Milieu um pH 5 schaffen [Meyer, 1986; Meyer, 1996].

3. Material und Methoden

3.1 Perfusionsmodell

3.1.1 Versuche am Modell der isoliert perfundierten Schweineextremität

In vier Vorversuchen wird eine normotherme Hämoperfusion ohne Applikation der Prüfsubstanz durchgeführt. Diese Versuche dienen der Äquilibrierung und Stabilitätsüberprüfung des Systems. Im Anschluss daran wird in einer Testreihe von acht Hauptversuchen die perkutane Resorption von Benzoesäure an der isoliert normotherm hämoperfundierten Schweineextremität untersucht.

Die Versuche werden mit einer Perfusionsapparatur für isolierte Säugetierorgane der Charité Berlin durchgeführt. Das Perfusionsmedium ist autologes Blut, das während der Organentnahme, unmittelbar vor Versuchsbeginn gewonnen wird. Perfundiert wird über einen Zeitraum von 210 Minuten. Die Benzoesäure wird auf die Haut im Bereich des medialen Unter- und Oberarmes der isolierten Schweineextremität aufgetragen. Während des Versuches werden in bestimmten Zeitabständen Blut- und Dialysatproben entnommen. Aus diesen wird die Benzoesäureanflutung im System bestimmt und die hämatologische und biochemische Stabilität des Systems kontrolliert.

Nach Auftragen der Benzoesäure auf die Extremität erfolgt die Untersuchung der Benzoesäureresorption im Abstand von 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 Minuten. Die Kontrolle der biochemischen und hämatologischen Parameter erfolgt alle 30 Minuten während der Perfusion. Es werden bestimmt: Hämoglobingehalt, Sauerstoffsättigung des Hämoglobin, freies Hämoglobin, pH-Werte, Natrium, Kalium, Glucose, Lactat und Lactatdehydrogenase. Außerdem erfolgt eine ständige computergestützte Überwachung des arteriellen Perfusionsflusses, des arteriellen Perfusionsdruckes sowie der Blut- und Hauttemperatur.

3.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Für die Versuche dienen die Vorderextremitäten von Schweinen der Deutschen Landrasse mit einer Lebendmasse von 30 bis 42 kg. Die Schweine stammen aus konventioneller Nutztierhaltung und sind für die Schlachtung bestimmt. Es werden nur Tiere verwendet, deren Haut unbeschädigt ist und die keine Verletzungen oder Anzeichen von Hauterkrankungen im Bereich des Ober- und Unterarmes aufweisen. Es werden hellhäutige

Zuchtschweine ausgewählt, da deren Haut für vergleichende Untersuchungen mit dem Menschen eher geeignet ist [Netzlaff et al., 2006; Meyer, 1986] (vgl. Kap. 2.8).

3.1.3 Organ- und Blutgewinnung sowie Organvorbereitung

Die Prämedikation (Sedation) der Tiere erfolgt mit Azaperon¹ i.m. (4-6 mg/kg KG), Ketamin² i.m. (10 mg/kg KG) und Atropin³ i.m. (0,05 mg/kg KG).

Nach Einleitung der Injektionsnarkose mit Etomidat⁴ und der Intubation⁵, wird eine Inhalationsnarkose mit 40 % O₂ + 60 % N₂O + 1,5-1,8 % Isofluran durchgeführt.

Die chirurgische Entfernung der Vordergliedmaßen erfolgt zwischen Scapula und Brustwand. Die Nieren, die Leber und der Darm eignen sich für weitere Versuchszwecke und werden ebenfalls dem Tier entnommen [Unger et al., 2007; Unger et al., 2006; Thewes et al., 2007]. Während der Operation hemmt eine intravenöse Gabe von 10.000 I.E. Heparin-Natrium⁶ die Blutgerinnung.

Die abgesetzte Vordergliedmaße wird über die Arteria brachialis kanüliert⁷. Über diese Kanülierung erfolgt eine Spülung der Extremität mit einer auf ca. 35° Celsius erwärmten und mit Heparin-Natrium versehenen 0,9 %igen Natriumchloridlösung (20.000 I.E Heparin-Natrium/Liter NaCl 0,9 %). Gespült wird solange, bis das aus den Venen austretende Perfusat klar und frei von Blut ist. Mit dieser Spülung wird beabsichtigt, die während der Ischämiezeit entstandenen Zelldebris aus den Blutgefäßen zu entfernen.

Das für die Hämoperfusion benötigte autologe Blut wird während der Tötung und Organgewinnung durch Entbluten der Tiere aus der Vena jugularis externa gewonnen. Dazu wird die Vena jugularis externa kanüliert⁸ und das Blut in einem mit 1.000 I.E. Heparin-Natrium⁹ benetzten Leerbeutel 500 ml mit Einstichdorn¹⁰ aufgefangen. Des Weiteren wird dem Blut ein Antibiotikum¹¹ zugesetzt, um einem Keimwachstum innerhalb des Versuchszeitraumes entgegenzuwirken.

¹ Stresnil® Firma Janssen

² Ursotamin® Firma Serumwerk Bernburg AG

³ Atropinsulfat B. Braun® 0,5µg/ml, Firma B. Braun Melsungen AG

⁴ Etomidat-® Lipuro, Firma B. Braun Melsungen AG

⁵ Mallinckrodt Medical, Athlone, Ireland. Hi-Lo Evac Tracheal Tube, Size 9, Oral 12, Innendurchmesser 35 mm

⁶ Liquemin® N 25000 Ampullen, Hoffmann-La Roche AG, 79639 Grenzach Wyhlen

⁷ Verbindungsleitung (Heidelberger Verlängerung) für den Anschluss und zur Verlängerung der Infusions- und Transfusionssysteme. 75 cm Länge. Fresenius HemoCare GmbH, 61352 Bad Homburg

⁸ Verbindungsleitung (Heidelberger Verlängerung) für den Anschluss und zur Verlängerung der Infusions- und Transfusionssysteme. 75 cm Länge. Fresenius HemoCare GmbH, 61352 Bad Homburg

⁹ Liquemin® N 25000 Ampullen, Hoffmann-La Roche AG, 79639 Grenzach Wyhlen

¹⁰ Compoflex® Fresenius HemoCare GmbH, 61346 Bad Homburg

¹¹ Augmentan® i.v. 1,2 g, GlaxoSmithKline GmbH & Co., 80700 München (Auf 1 Liter Blut: 1g Amoxicillin und 200 mg Clavulansäure)

3.1.4 Ischämiezeiten

Warme Ischämie:

Der Zeitraum vom Tod des Tieres durch Entbluten bis zur Kanülierung und Spülung der Extremität wird als warme Ischämie bezeichnet. In dieser Zeit ist die arterielle Blutzufuhr unterbrochen und die Extremität hat noch annähernd Körpertemperatur.

Die warme Ischämiezeit während der jeweiligen Versuche beträgt zwischen 15 und 45 Minuten.

Kalte Ischämie:

Der Zeitraum von der Spülung des Beins mit heparinierter 0,9 %iger Natriumchloridlösung bis zum Anschluss der Extremität an die Perfusionsapparatur wird als kalte Ischämiezeit bezeichnet.

Die kalte Ischämiezeit während der jeweiligen Versuche beträgt zwischen 5 und 10 Minuten.

3.1.5 Vorbereitung der Applikationsfläche der Prüfsubstanz

Um vergleichbare Bedingungen für die transdermale Resorption zu schaffen, wird bei jedem Versuch nach gleicher Prozedur vorgegangen:

Als erstes wird die Haut der Vorderextremität im Bereich des medialen Ober- und Unterarmes mit Seifenwasser gewaschen und mit klarem Wasser abgespült. Anschließend werden die Borsten in diesem Bereich mit einem Einmalrasierer¹² entfernt. Dieses geschieht unter Schonung der Epidermis, damit es zu keinerlei Hautverletzungen oder Blutungen kommt. Anschließend wird nochmals mit klarem Wasser nachgespült und die Haut trocken getupft. Im Anschluss wird mit Hilfe einer Digitalwaage¹³ die Masse der einzelnen Extremitäten bestimmt. Die Masse der jeweiligen Präparate beträgt zwischen 2.000 g und 3.300 g.

Die Prüfsubstanz Benzoesäure wird erst auf das vorbereitete Hautareal aufgetragen, wenn die Vordergliedmaße bereits an die Perfusionsapparatur angeschlossen ist (vgl. Kap. 3.4 Versuchsablauf).

¹² Wilkinson Sword GmbH, 42659 Solingen

¹³ Soehnle-Waage, max. 50 kg

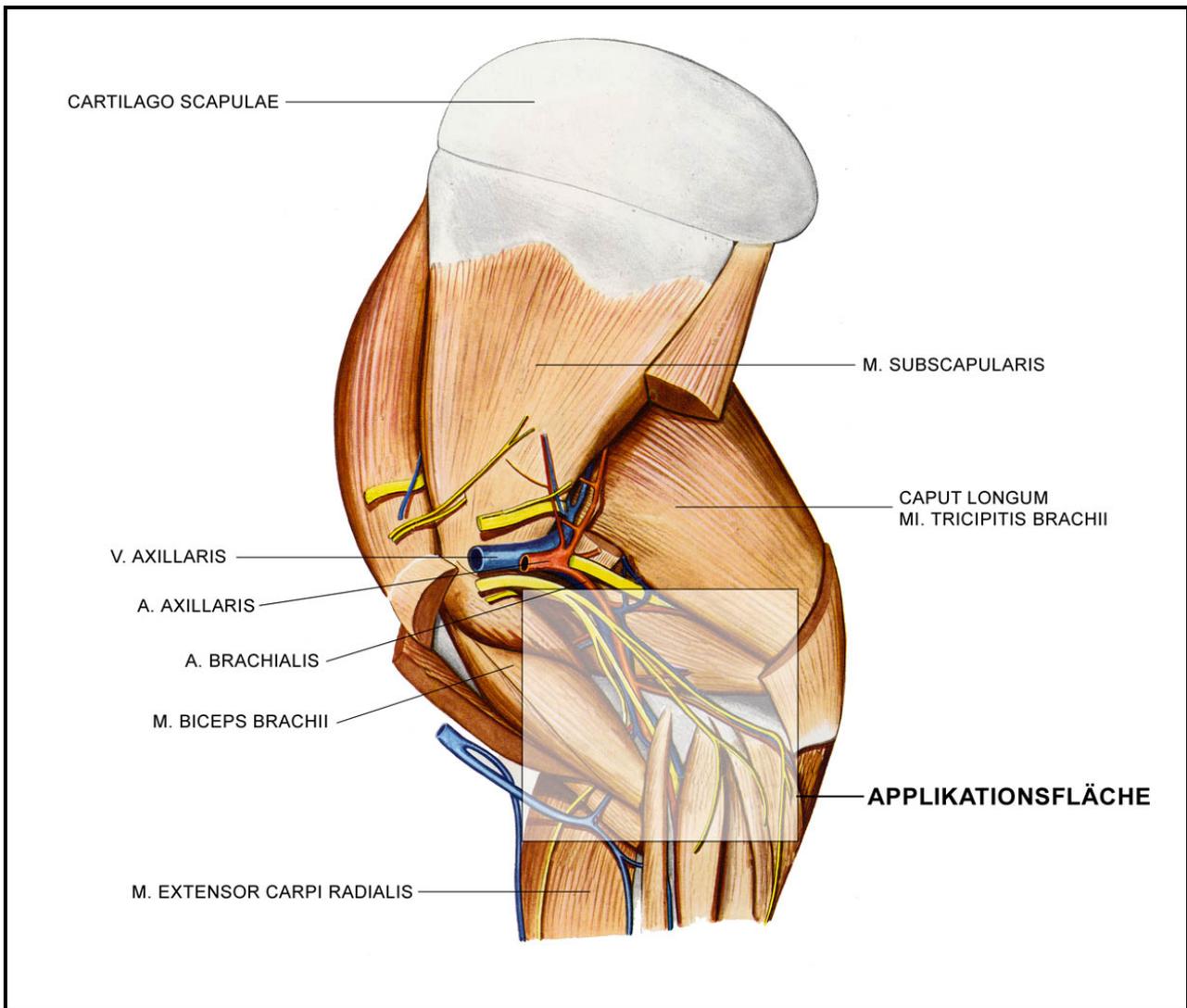


Abb. 8: Schweinextremität mit Applikationsfläche der Prüfsubstanz.

Präparation der Schulter und des Oberarmes, Ansicht von medial. 2. Schicht

[aus Popesko, 1993]

3.1.6 Dialysatzzusammensetzung

Die für die Versuche verwendete Dialysatflüssigkeit setzt sich wie folgt zusammen:

| Stoff | Molekulargewicht | g/5l |
|--------------------------------------|------------------|-------|
| NaCl | 58,44 | 32,14 |
| KCl | 74,56 | 1,49 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 147,02 | 1,10 |
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | 203,31 | 1,02 |
| NaHCO ₃ | 84,01 | 8,40 |
| NaH ₂ PO ₄ | 137,99 | 0,30 |
| D-Glucose | 180,16 | 7,21 |
| Harnstoff | 60,06 | 1,50 |
| Kreatinin | 113,12 | 0,28 |

Tab. 3: Zusammensetzung der Dialysatflüssigkeit

3.2 Verwendete Prüfsubstanz für die topische Applikation

Die in diesen Versuchsreihen verwendete Benzoesäure steht als Reinsubstanz zur Verfügung und entspricht der Prüfvorschrift des PH. EUR.4.00. Vor Applikation wird die Benzoesäure in Lösung gebracht. In Anlehnung an Riedel [2003] und Schaper [2003] werden 400 Mikrogramm pro Quadratzentimeter der Testsubstanz auf die Haut appliziert.

| Testsubstanz | Menge | Lösungsmittel | Applikationsvolumen |
|--------------|-------|---------------|--------------------------|
| Benzoesäure | 40 mg | 2 ml Aceton | 2 ml/100 cm ² |

3.3 Versuchsaufbau zur Extremitätenperfusion

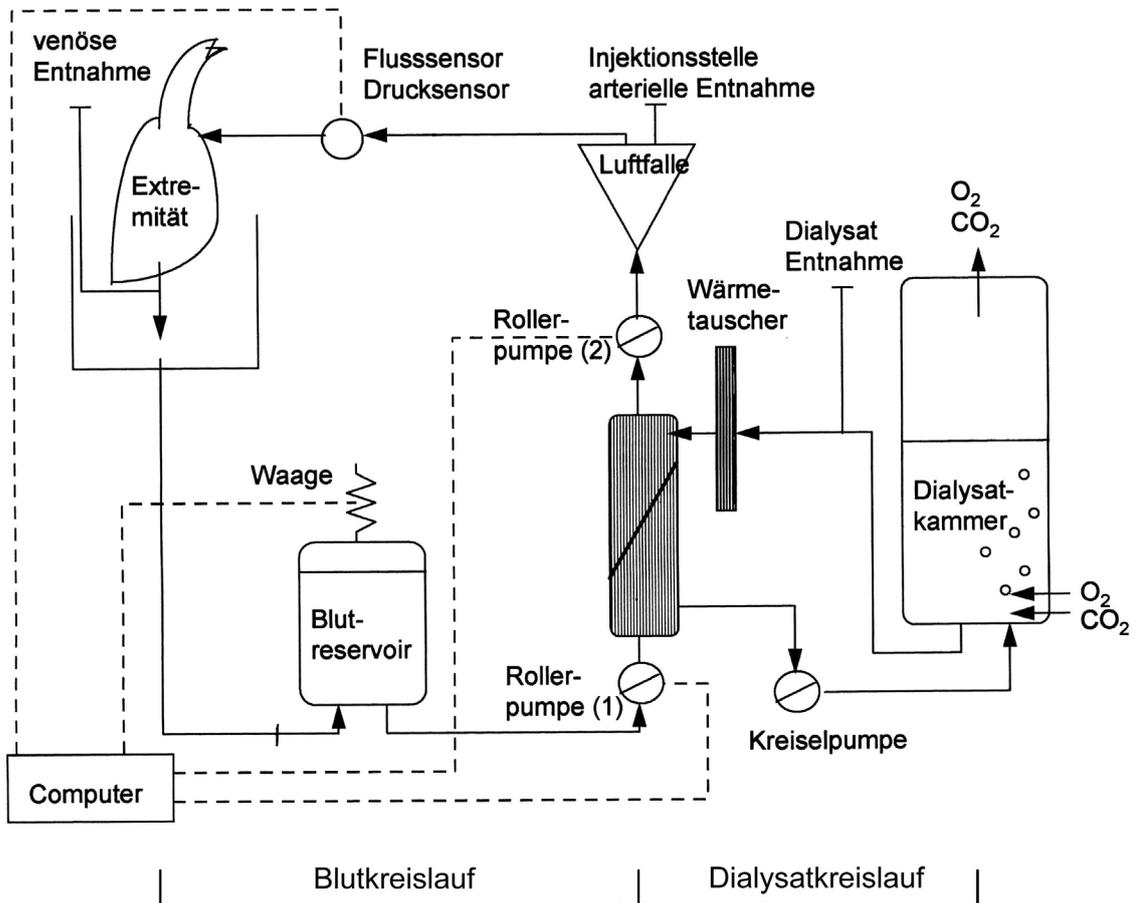


Abb. 9: Schema der *in vitro* Vollblut-Perfusion einer isolierten Schweineextremität

Die Perfusionsapparatur besteht aus zwei separaten Kreisläufen:

1. Blutkreislauf
2. Aufbereitungs- / Dialysatkreislauf

Diese Kreisläufe stehen miteinander in Verbindung und bilden ein *in vitro* Kreislaufsystem.

Im Dialysatkreislauf liegt ein Wärmetauscher¹⁴, der zur Erwärmung des Dialysates und nachfolgend des Blutes führt.

Der Dialysatkreislauf ist über ein Dialysem modul¹⁵ mit dem Perfusatkreislauf verbunden.

Im Dialysem modul¹⁵ erfolgt sowohl der Gasaustausch als auch der Austausch von Metaboliten (Dialyse). Das Modul dient der Eliminierung von Abbauprodukten und führt zur Aufnahme von Sauerstoff und zur Abgabe von Kohlendioxid. Im Dialysem modul werden dem Blut über das Dialysat Substanzen wie zum Beispiel Glucose und Elektrolyte zugeführt. Dieser Stoffaustausch ist für die Aufrechterhaltung der metabolischen Stabilität des Organs sowie der Homöostase des Perfusates notwendig.

Zum Aufbau der Apparatur werden jeweils Schlauchsets und Behältnisse aus Silikon verwendet. Dieses Material eignet sich zur Verwendung in blutführenden Systemen, da dessen hämolysierende Effekte minimal sind [Yarborough et al., 1966].

3.3.1 Die extrakorporalen Kreisläufe und ihre Funktionen

Dialysatkreislauf

Der in Abbildung 9 dargestellte Dialysatkreislauf dient der Aufbereitung des Blutes. Er besteht aus einem Schlauchsystem, an das eine Kreislumppe¹⁶, ein Dialysatbehältnis mit Begasungszufuhr, ein Wärmetauscher¹⁷ und ein Dialysem modul¹⁸ angeschlossen sind.

Das Dialysatreservoir befindet sich in einem 5 Liter Glasbehälter. Durch Einleiten eines Gasgemisches aus Kohlendioxid¹⁹ und Sauerstoff²⁰ findet die Äquibrierung des Dialysats statt. Aus dem Glasbehälter wird das Dialysat über einen zuführenden Schlauch, der mit einer Kreislumppe²¹ verbunden ist, zum Wärmetauscher gepumpt und von dort weiter zum Dialysem modul. Beim Durchströmen des Wärmetauschers erfolgt die Erwärmung des Dialysates auf 40°-42° Celsius. Über das Dialysem modul wird diese Wärme mit leichtem Wärmeverlust an das Blut abgegeben. Das Blut erreicht so die physiologische Temperatur

¹⁴ CSC 14: steril, aus Edelstahl und Polykarbonat, Füllvol. 30 ml; max. Strömungsmenge 2500ml/min. Sorin Biomedica Cardio, Via Crescentino, 13040 Saluggia (VC)- Italy

¹⁵ Hemoflow F7 HPS, Fresenius Polysulfone^R Kapillardialysator, Fresenius Medical Care AG, 61346 Bad Homburg

¹⁶ Stöckert Instrumente, Type 10-00-00, Fabr.-Nr. 10F912. 220 V, 50 Hz, 1,8 A.

¹⁷ CSC 14: steril, aus Edelstahl und Polykarbonat, Füllvol. 30 ml; max. Strömungsmenge 2500ml/min. Sorin Biomedica Cardio, Via Crescentino, 13040 Saluggia (VC)- Italy

¹⁸ Hemoflow F7 HPS, Fresenius Polysulfone^R Kapillardialysator, Fresenius Medical Care AG, 61346 Bad Homburg

¹⁹ Medizinische Kohlensäure CO₂, 1kg Gas = mind. 997g CO₂. AGA Linde Healthcare GmbH & Co KG, Edisonstr. 2, 85716 Unterschleißheim

²⁰ Sauerstoff aus dem charitéeigenem Leitungssystem.

²¹ Stöckert Instrumente, Type 10-00-00, Fabr.-Nr. 10F912. 220 V, 50 Hz, 1,8 A.

von 38,3°-39,5° Celsius. Bei dem Dialysemodul²² handelt es sich um einen Kapillardialysator, wie er in der Humanmedizin für die einmalige Anwendung bei der chronischen Hämodialyse bestimmt ist. Im Dialysemodul findet über die Membran ein Gas- (Kohlendioxid, Sauerstoff) und Substanztausch (Glucose, Elektrolyte, Lactat, Benzoesäure etc.) zwischen Dialysat und dem Perfusionsmedium Blut statt. Dieser Austausch erfolgt entlang des Konzentrationsgefälles bis zum Konzentrationsausgleich (Hämodialyse). Vom Dialysemodul fließt das Dialysat über einen abfließenden Schlauch zurück in den Glasbehälter.

Perfusatkreislauf

Durch den in Abbildung 9 gezeigten Perfusatkreislauf wird die Blutversorgung und damit die Vitalität der Extremität temporär aufrechterhalten.

Der Perfusatkreislauf besteht aus einem Schlauchsystem, einem Blutreservoir, einem Filter, zwei Rollenpumpen²³ (1 und 2), dem Dialysemodul²⁴, der Luftfalle und dem isolierten Organ.

Das aus der Extremität frei abfließende venöse Blut wird in einem Trichter aufgefangen und über einen Schlauch in das Blutreservoir geleitet. Aus dem Reservoir wird es von der Rollenpumpe²³ (1) über einen Filter²⁵ in das Dialysemodul²⁴ gefördert. Der Filter²⁵ verhindert, dass Blutkoagula, Zelltrümmer und etwaige Verunreinigungen die Membranen des Dialysemoduls verstopfen. Im Dialysemodul fließt das Blut im Gegenstromprinzip am Dialysat vorbei, es kommt dabei zum oben beschriebenen Soluten-, Gas- und Wärmeaustausch. Mit Hilfe der Rollenpumpe (2) gelangt das arterialisierte, auf ca. 38° C vorgewärmte, hämofiltrierte Perfusat über die Luftfalle in die kanülierte Arteria brachialis der Vordergliedmaße. Die Luftfalle verhindert, dass im Blut enthaltene Luftblasen in das Blutgefäßnetz der Extremität gelangen und es somit zu Embolusbildung und dadurch zu Zirkulationsstörungen im Präparat kommt. Das Perfusat fließt aus den Vena brachialis und Vena radialis über den Trichter ab und gelangt aufgrund der Erdanziehung zum Blutreservoir zurück.

²² Hemoflow F7 HPS, Fresenius Polysulfone^R Kapillardialysator, Fresenius Medical Care AG, 61346 Bad Homburg

²³ Stöckert Instrumente Doppelpumpe

²⁴ Hemoflow F7 HPS, Fresenius Polysulfone^R Kapillardialysator, Fresenius Medical Care AG, 61346 Bad Homburg

²⁵ Emoplus 200 Micron Blutfilter, ISO 1135-4 TS. Plast Medical S.p.A., 45030 Villamarzana-Italy

3.3.2 Computergestützte Systemüberwachung

Zur online-Überprüfung des Perfusionsdruckes, der Perfusatemperatur und der Hauttemperatur werden verschiedene Messfühler in das System eingebaut:

Der Drucksensor²⁶ und der Temperaturfühler²⁷ für das Perfusat befinden sich hinter der Luftfalle unmittelbar vor der Extremität. Der Hauttemperaturfühler ist in der Nähe der vorbereiteten Applikationsstelle für die Prüfsubstanz angebracht.

Der Perfusionsdruck und die Temperaturen werden auf einem Monitor über Module²⁸ angezeigt.

3.3.3 Blutentnahmestellen

Zur Entnahme des venösen Blutes befindet sich ein 3-Wege-Hahn²⁹ zwischen der Extremität und dem Blutreservoir. Zur Entnahme des arteriellen Blutes ist ein 3-Wege-Hahn²⁹ zwischen der Luftfalle und der Extremität eingeführt worden.

3.4 Versuchsablauf

Als günstig erweist es sich, den Dialysatkreislauf als erstes in Betrieb zu nehmen, um eine Erwärmung des Dialysates zu erreichen. Im Anschluss erfolgt eine Spülung des Perfusatkreislaufes mit heparinierter 0,9 %iger Natriumchloridlösung (20.000IE Heparin-Natrium³⁰/1000 ml). Diese über einige Minuten andauernde Spülung verringert die Blutgerinnungsneigung im Schlauchsystem und die Thrombenbildung im Organ. Anschließend wird die heparinisierte Natriumchloridlösung 0,9 % aus dem Schlauchsystem abgelassen und das heparinisierte Blut (20.000IE Heparin-Natrium³⁰/1000 ml) in den Kreislauf eingefüllt. Die Blutmenge beträgt in den einzelnen Versuchen zwischen 500-800 ml.

Mittels der Dialysatflüssigkeit wird durch Hämodilution der Hämoglobingehalt des Blutes auf 6-8 g/dl eingestellt. Das Perfusat wird solange gepumpt, bis der arterielle pH-Wert und die arterielle Sauerstoffsättigung physiologische Werte erreicht haben.

²⁶ Combidyn Druckschlauch, 150 cm red or blue, Braun Meisungen AG

²⁷ HP Hewlett & Packard

²⁸ Hewlett & Packard, Druck M100 6 BT, MedGV, Zul.-Nr. 01/M-033/88

²⁹ 3-Wege-Hahn, rot oder blau, 360°, Smiths Medical Deutschl. GmbH, Hauptstr. 45-47, 85614 Kirchseeon

³⁰ Liquemin[®] N 25000 Ampullen, Hoffmann-La Roche AG, 79639 Grenzach Wyhlen

Um die Schweineextremität in den Perfusatkreislauf zu integrieren, werden die Rollenpumpen für kurze Zeit gestoppt. Das Organ wird senkrecht, mit der Wundseite nach unten und der Klauenspitze nach oben, in den Trichter gehängt. Die kanülierte Arteria brachialis wird über ein Verbindungsstück³¹ an die Perfusionsapparatur angeschlossen. Jetzt beginnt die Anpassungsphase der Extremität an das System. Die Rollenpumpen werden wieder in Betrieb genommen. Hierbei ist es wichtig, den Perfusionsfluss und damit den Perfusionsdruck langsam zu erhöhen, um eine Ödematisierung des Gewebes zu vermeiden. In den ersten 10 Minuten sollte mit Blick auf den Organwiderstand und dem daraus resultierenden Perfusionsdruck maximal ein Druck von 60 mmHg erreicht werden [Müller et al., 1989]. Während der gesamten Perfusion ist darauf zu achten, dass der gemessene Druck nicht über 160 mmHg steigt, da dieses zu Schäden im Organ führt. Der Perfusionsfluss wird je nach Perfusionswiderstand auf ein Perfusionsvolumen von 3-5 ml/min*100 g eingestellt.

Nachdem der arterielle pH-Wert, Hämoglobingehalt und der Perfusionsdruck stabil sind („steady state“ nach ca. 15 bis 30 Minuten), wird mit dem experimentellen Teil des Versuches begonnen.

Im Bereich der vorbereiteten Applikationsstelle der Prüfsubstanz wird ein 10 cm x 10 cm großes Areal auf der Haut markiert. Zur Kontrolle der biochemischen und hämatologischen Parameter werden arterielle und venöse Blutproben entnommen. Dieses erfolgt dann alle 30 Minuten während der gesamten Perfusion. Die in Aceton gelöste Benzoesäure wird mit einer 2 ml Einmalspritze auf das 100 cm² große Feld gleichmäßig aufgetragen. Dieses geschieht zügig und mit größter Sorgfalt, damit keine Benzoesäure in den Wundbereich der Extremität und somit schon vorab in den Blutkreislauf gelangt.

³¹ Konnektor: Jostra AG, Hechinger Str. 38, 72145 Hirrlingen

3.5 Äquilibration und Stabilitätsüberprüfung des Systems sowie Bestimmungsmethoden und Geräte

Um die Kontrolle der Stabilität des Systems zu sichern, werden während der Perfusion unterschiedliche biochemische und hämatologische Versuchsparameter bestimmt und protokolliert. Die bei der Versuchsdurchführung ermittelten Messwerte werden mit physiologischen oder experimentell bestätigten Referenzwerten verglichen, wie in nachstehender Tabelle 4 dargestellt.

| Parameter | Referenzbereich | Literatur | Gerät bzw. Methode |
|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|--|
| Art. Perfusionsdruck (MAP) | 40-120 mmHg | de Lange et al., 1992 | HP Drucksensor |
| Art. Perfusionsfluss (PF) | 4,7-5,21 ml/min*100 g | Große-Siestrup et al., 2002 | Rollenpumpeneinstellung |
| Organwiderstand | 15,5-19,1 mmHg*min*100g/ml | Große-Siestrup et al., 2002 | Errechnet nach: <u>MAP</u> BF |
| Hämatokrit | 18-25 % | Smith et al., 1997 | Sysmex, XE 2100 + SP 100 22848 Hamburg |
| Hämoglobin | 8 g/dl | Nogueira et al., 1999 | OSM 3, Hemoximeter. Radiometer A/S, Emdrupvej, DK-2400 Copenhagen NV. |
| Albumingehalt im Plasma | 1,9-3,9 g/dl | Kaneko et al., 1997 | Modular, P800 Modul, Roche diagnostics, 10627 Berlin/68305 Mannheim |
| Art. pH | 7,38-7,42 | Smith et al., 1997 | ABL 505, Radiometer Medical A/S, Emdrupvej 72, DK-2400 Copenhagen NV |

| Parameter | Referenzbereich | Literatur | Gerät bzw. Methode |
|---|---|--|---|
| Art. Sauerstoffsättigung des Hb | 87,3-96,1 % | Thielscher, 1985 | OSM 3, Hemoximeter. Radiometer A/S, Emdrupvej, DK-2400 Copenhagen NV. |
| Sauerstoffverbrauch Skelettmuskel in Ruhe | 15-25 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot 100 \text{ g}$ | Engelhardt et al., 2000; Schmidt et al., 2000 | Errechnet nach: Formel 1 siehe Anhang |
| Natriumgehalt / Plasma | 140-160 mmol/l | Kraft und Dürr, 1999; Bickhardt, 1992 | ABL 505, Radiometer Medical A/S, Emdrupvej 72, DK-2400 Copenhagen NV |
| Kaliumgehalt / Plasma | 4,0-5,0 mmol/l | Kraft und Dürr, 1999; Bickhardt, 1992 | ABL 505, Radiometer Medical A/S, Emdrupvej 72, DK-2400 Copenhagen NV |
| Art. LDH-Gehalt | 380-634 IU/l | Kaneko et al., 1997 | Modular, P800 Modul, Roche Diagnostics, 10627 Berlin/68305 Mannheim |
| Ödembildung | Maximal 10 % | de Lange et al., 1992 | Errechnet nach: $\frac{\text{Organgewicht Ende}}{\text{Organgewicht Beginn}} \times 100$ |
| Glucoseverbrauch | >als 250 $\mu\text{g}/\text{min} \cdot 100 \text{ g}$ | de Lange et al., 1992; Große-Siestrup et al., 2002 | Errechnet nach: Formel 2 siehe Anhang |
| Laktat | 0-11 mg/dl | Waldmann und Wendt, 2004; Schmidl, 1985 | Modular, P800 Modul, Roche Diagnostics, 10627 Berlin/68305 Mannheim |

Tab. 4: Ausgewählte Parameter, ihre Referenzwerte mit Literaturangabe und Bestimmungsmethoden

Es besteht die Möglichkeit, während der Perfusion durch unterschiedliche Regelmechanismen Einfluss auf bestimmte Messwerte zu nehmen:

pH-Wert

Durch Regulierung der CO₂ Begasung des Dialysates wird der arterielle pH-Wert im Bereich zwischen 7,38 und 7,42 gehalten. Die CO₂ Begasung variiert zwischen 5 und 40 ml/min. Bei einem sehr niedrigen pH-Wert kann durch Gabe von 20-80 ml Natriumhydrogen-carbonatlösung 8,4 % in das Dialysat der arterielle pH-Wert angehoben werden.

Hämoglobingehalt

Durch unterschiedliche Pumpeinstellungen der einzelnen Rollenpumpen kommt es zu einer Netto-Flüssigkeitsverschiebung vom Dialysat zum Perfusat oder umgekehrt. Je nach Rollenpumpeneinstellung ist die Folge eine Perfusatverdünnung (Hämoglobinkonzentration sinkt) oder eine Perfusateindickung (Hämoglobinkonzentration steigt):

Ist die Flussgeschwindigkeit (ml/min) der Rollenpumpe 1 höher eingestellt als die der Rollenpumpe 2, entsteht ein vermehrter Perfusateinstrom in das Modul als ein Perfusatabtransport aus dem Modul. Dieses bewirkt einen Druckanstieg im Modul und Flüssigkeit wird aus dem Perfusat in den Dialysatkreislauf gepresst. Das hat die Eindickung des Blutes und damit die Erhöhung der Hämoglobinkonzentration zur Folge.

Ist die Flussgeschwindigkeit (ml/min) der Rollenpumpe 2 höher eingestellt als die der Rollenpumpe 1, wird mehr Perfusat aus dem Modul herausgepumpt als hereingepumpt. Es entsteht ein Unterdruck im Modul, durch den das Dialysat ins Modul gesogen wird. Dieses bewirkt eine Blutverdünnung, die Hämoglobinkonzentration sinkt.

Arterieller Druck

Die Drucksonde³² befindet sich im Lumen des Gefäßzuganges vor der Schweineextremität. Der arterielle Druck wird über ein Druckmodul³³ vom Hewlett & Packard Monitor angezeigt. Durch Einstellung der Rollenpumpe (2) wird das Durchflussvolumen des Blutes durch die Schweineextremität und damit der arterielle Druck während der Perfusion ausgerichtet. Eine Durchflussgeschwindigkeit von 3-5 ml/min*100 g ermöglicht eine Druckeinstellung im physiologischen Bereich von 40-120 mmHg.

³² Combidyn Druckschlauch, 150 cm red or blue, Braun Meisungen AG

³³ Hewlett & Packard, Druck M100 6 BT, MedGV, Zul.-Nr. 01/M-033/88

Arterielle Sauerstoffsättigung des Hämoglobins

Durch eine Sauerstoffbegasung des Dialysates von 300-800 ml/min O₂ bei 1,013 bar wird eine Sauerstoffsättigung des Blutes von 88-95,2 % erreicht.

Elektrolyte und Glucose

Durch Gabe von Natrium, Kalium, Calcium und Glucose³⁴ in das Dialysat wird auf die Ionenkonzentration und Glucoseversorgung des Blutes Einfluss genommen. Um die Glucoseaufnahme in die Zellen zu fördern wird stündlich 0,8 I.E. Insulin intraarteriell appliziert.

Bluttemperatur

Durch Regulierung der Wassertemperatur auf 40°-42°C wird über die Dialysattemperatur die Bluttemperatur im physiologischen Bereich von 38,3°-39,5°C gehalten.

3.5.1 Vitalitätskontrolle des Organs

Um die Vitalität der isoliert perfundierten Schweineextremität festzustellen und die Kontrolle der Stabilität des Systems zu sichern, werden in halbstündigen Zeitabständen Blutproben und Dialysatproben entnommen. Als Zellschädigungsparameter dient dabei die Messung des freien Hämoglobins, der Kalium-, Natrium- und LDH-Konzentration im Blut. Die Kontrolle der Stoffwechselaktivität erfolgt über die Messung des Sauerstoff- und Glucoseverbrauchs sowie der Lactatkonzentration.

3.5.2 Probengewinnung und Analytik

Einige Parameter können direkt während der Perfusion bestimmt werden. Dazu zählen Elektrolyte, pH-Wert, Hämoglobingehalt sowie arterielle Sauerstoffsättigung des Hämoglobins der Blut- und Dialysatproben. Vor Ort stehen dafür ein Blutgas³⁵- und Elektrolytanalysegerät³⁵, sowie ein Hemoximeter³⁶ zur Verfügung. Die Blutproben, welche der klinischen Chemie dienen und nicht unmittelbar bestimmt werden können (zum Beispiel Hämatokrit, LDH-Konzentration, Glucosekonzentration), werden heparinisiert, zur

³⁴ Glucose-Lösung 5%, Berlin-Chemie AG, 12474 Berlin, PF 1108

³⁵ ABL 505, Blutgas- und Elektrolyt-System. Radiometer Medical A/S, Emdrupvej 72, DK-2400 Kopenhagen

³⁶ OSM 3, Hemoximeter. Radiometer A/S, Emdrupvej 72, DK-2400 Kopenhagen

Plasmagewinnung zehn Minuten bei 3.000 U/min zentrifugiert und in das Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Universitätsklinik Charité Berlin (Direktor: Prof. Dr. med. E. Köttgen) verbracht.

Die Geräte, die zur Bestimmung der einzelnen Blutparameter genutzt werden, sind in Tabelle 4 aufgeführt.

3.6 Benzoessäureanalytik

Die zu untersuchenden Perfusatproben werden nach Versuche zehn Minuten bei 3.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand des zentrifugierten Perfusates wird in Eppendorfröhrchen pipettiert und mit den Dialysatproben bei -18° Celsius tief gefroren. Anschließend erfolgt der Nachweis von Benzoessäure und deren Konzentrationsermittlung mittels Hochdruck-flüssigkeitschromatographie (HPLC, Shimadzu Japan)³⁷.

HPLC-Parameter:

| | | | |
|----------------|---------------------|---------------------|------------|
| Pumpe: | 2 x LC-10 AT VP | Flussrate: | 1.0 ml/min |
| Detektor: | SPD-M 10 A VP | Wellenlänge: | 230 nm |
| Steuerteil: | SCL-10 A VP | Säulenschaltventil: | FCV-12 AH |
| Ofen: | CTO-10 AS VP | Ofen-Temperatur: | 40°C |
| Injektionsart: | Autosampler SIL-10A | Probenvolumen: | 50 µl |

Säule: Nucleosil 100, 125 x 4 mm, C18

Vorsäule: Nucleosil 100-5-C18

Für die Ermittlung der Verfahrenskenndaten wurde Leerplasma/Dialysat-analoge Matrix mit entsprechenden Mengen an Analyt versetzt. Die Kalibration erfolgte als 6-Punkt-Kalibration im Bereich von 0-10 µg/ml. Die Linearität wurde bis 20 µg/ml geprüft. Die Bestimmungsgrenze wurde zu 0,3 µg/ml ermittelt.

Für die Präzisionsmessungen wurde ein Plasma-Pool hergestellt. Die Ergebnisse lieferten einen VK-Wert von 3,81 % und einen Bias-Wert von 1,61 %.

³⁷ Berliner Betrieb für Zentrale Gesundheitliche Aufgaben, Institut für Toxikologie – Klinische Toxikologie und Giftnotruf, Oranienburgerstraße 285, 13437 Berlin.

3.6.1 Berechnung der resorbierten Benzoesäuremenge

Aus den gemessenen Konzentrationen im Perfusat und Dialysat wird die resorbierte Menge an Benzoesäure berechnet. Die noch im Organgewebe verbleibenden Restmengen an Benzoesäure werden hierbei vernachlässigt, da Benzoesäure rasch durch Epidermis und Dermis penetriert und sich nicht im Gewebe anreichert [Seubert et al., 1984]. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Perfusat- und Dialysatmengen eines jeden Versuches errechnet sich die Benzoesäuremenge (μg) nach folgender Gleichung:

$$M_P = C \times P$$

M_P = resorbierte Menge (μg) im Perfusat

C = gemessene Benzoesäurekonzentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

P = Menge des Perfusates (ml)

$$M_D = C \times D$$

M_D = resorbierte Menge (μg) im Dialysat

C = gemessene Benzoesäurekonzentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

D = Menge des Dialysates (ml)

Im Ergebnisteil sind die Werte grafisch als Flächendiagramm und in Box-and-Whisker-Plots zusammengefasst. Im Anhang unter 9.4 Ergebnistabellen sind die Werte einzeln aufgelistet.

3.7 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten werden mit Hilfe von Microsoft® Excel 2002 und SPSS für Windows 2002 analysiert.

Die grafische Darstellung in Form von Box-and-Whisker-Plots bietet eine Information über die Symmetrie der Verteilung bezüglich des Medians (Zentralwert) [Trampisch et al., 1997]. Die Box wird durch das 25 %- und das 75 %-Quartil (auch als 1. und 3. Quartil bezeichnet) begrenzt. In den Kasten ist der Median als waagerechte Linie eingezeichnet. An das obere und untere Ende des Kastens schließen sich die so genannten whiskers an. Üblicherweise stellen die whiskers das 10 %- (90 %-) oder das 5 %- (95 %-) Quantil dar.

Die resorbierte Benzoesäuremenge wird als Box-and-Whisker-Plots und als Flächendiagramm dargestellt. Der signifikante Anstieg innerhalb einer Gruppe - zwei verbundene Stichproben - wurde mit dem Wilcoxon Test (nichtparametrischer Test) ermittelt und mit einem * markiert. Eine statistische Signifikanz liegt vor bei * $p < 0,05$.

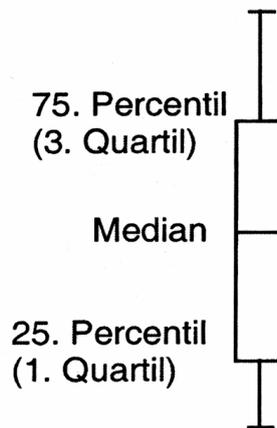


Abb. 10: Box-and-Whisker Plot

4. Ergebnisse

Es wurden insgesamt zwölf Extremitäten über die geplante Versuchsdauer von 210 Minuten perfundiert. In vier Vorversuchen erfolgte die Justierung des Versuchsaufbaues.

In acht Hauptversuchen (n=8) wurde die Untersuchung der perkutanen Resorption von Benzoesäure an den normotherm hämoperfundierten Schweineextremitäten durchgeführt.

4.1 Perkutane Resorption von Benzoesäure an der isoliert hämoperfundierten Schweineextremität

In den Hauptversuchen wurde die Benzoesäureresorption gemessen. Während eines Versuches sind 40 mg Benzoesäure auf 100 cm² Haut der isolierten Schweineextremität appliziert worden. Während der Perfusion kam es zu einem signifikanten Anstieg der Benzoesäurekonzentration im Perfusat und Dialysat.

4.1.1 Prozentuale Benzoesäureresorption

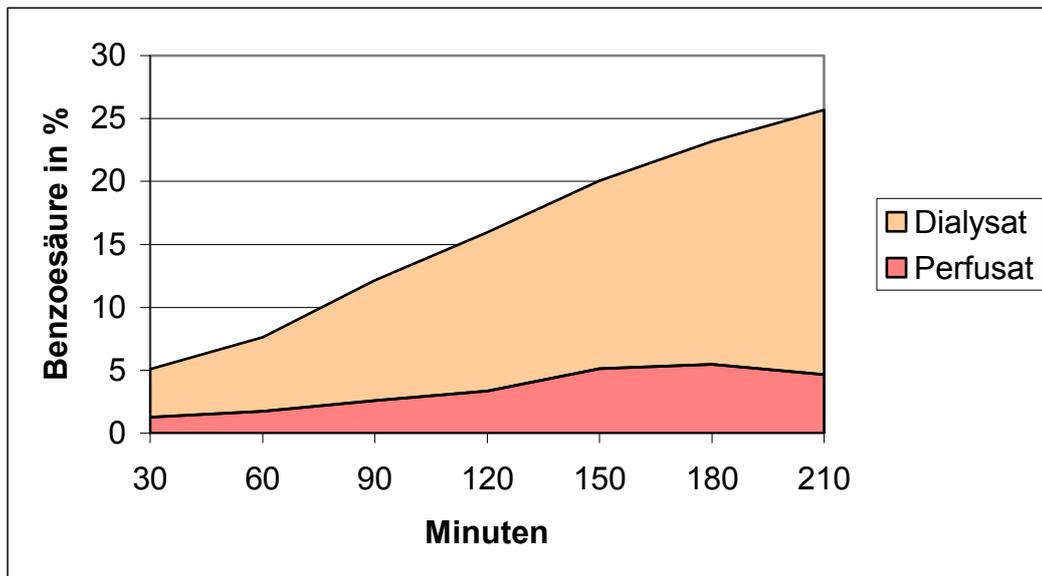


Abb. 11: Über einen Perfusionszeitraum von 210 Minuten wurden 10,28 mg Benzoesäure resorbiert. Das entspricht 25,7 % der applizierten Dosis (Angabe der Medianwerte aus 8 Einzelversuchen; n=8).

4.1.2 Benzoesäuremenge im Perfusat

Der Medianwert der Benzoesäuremenge im Perfusat betrug 30 Minuten nach Versuchsbeginn 509,75 µg, nach 60 Minuten 699,5 µg, nach 90 Minuten 1033 µg, nach 120 Minuten 1.334,25 µg, nach 150 Minuten 2.040,5 µg, nach 180 Minuten 2.190,5 µg und zu Versuchsende nach 210 Minuten 1.853,5 µg. Zu jeder Versuchszeit war der Benzoesäuregehalt im Perfusat höher als zu Versuchsbeginn.

Innerhalb der Gruppe konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden (Wilcoxon-Test):

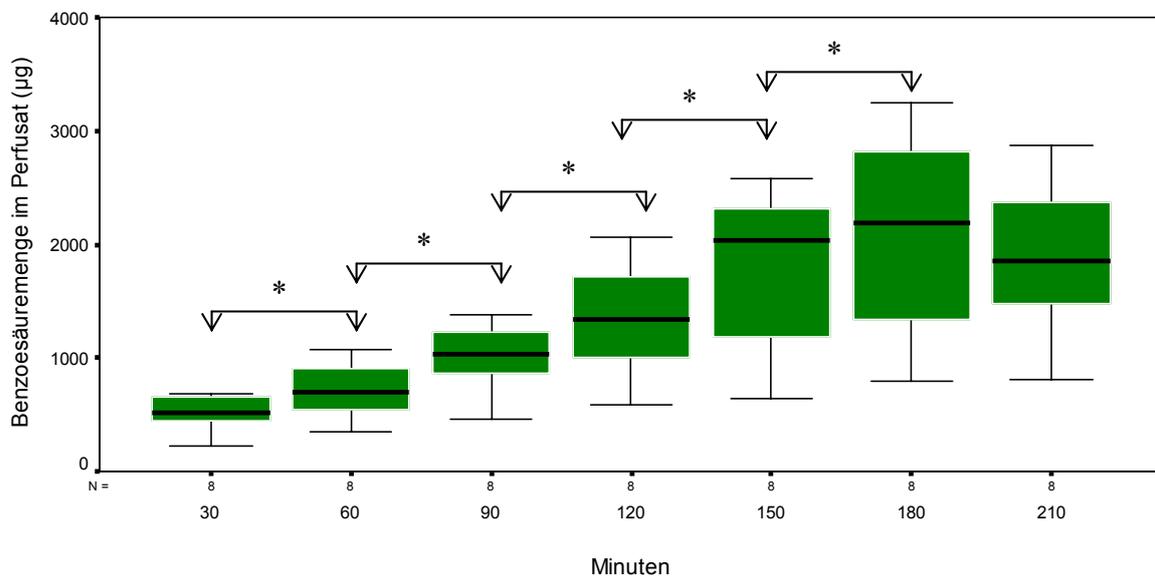


Abb. 12: Benzoesäuremenge im Perfusat.

Signifikanzen: 60-30 = 0,017; 90-60 = 0,012; 120-90 = 0,012;

150-120 = 0,012; 180-150 = 0,036; 210-180 = 0,575 (keine Signifikanz)

4.1.3 Benzoesäuremenge im Dialysat

Der Medianwert der Benzoesäuremenge im Dialysat betrug 30 Minuten nach Versuchsbeginn 1.525 µg, nach 60 Minuten 2.350 µg, nach 90 Minuten 3.825 µg, nach 120 Minuten 5.050 µg, nach 150 Minuten 5.975 µg, nach 180 Minuten 7.090 µg und zu Versuchsende nach 210 Minuten 8.425 µg. Zu jeder Versuchszeit war der Benzoesäuregehalt im Dialysat höher als zu Versuchsbeginn.

Innerhalb der Gruppe konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden (Wilcoxon-Test):

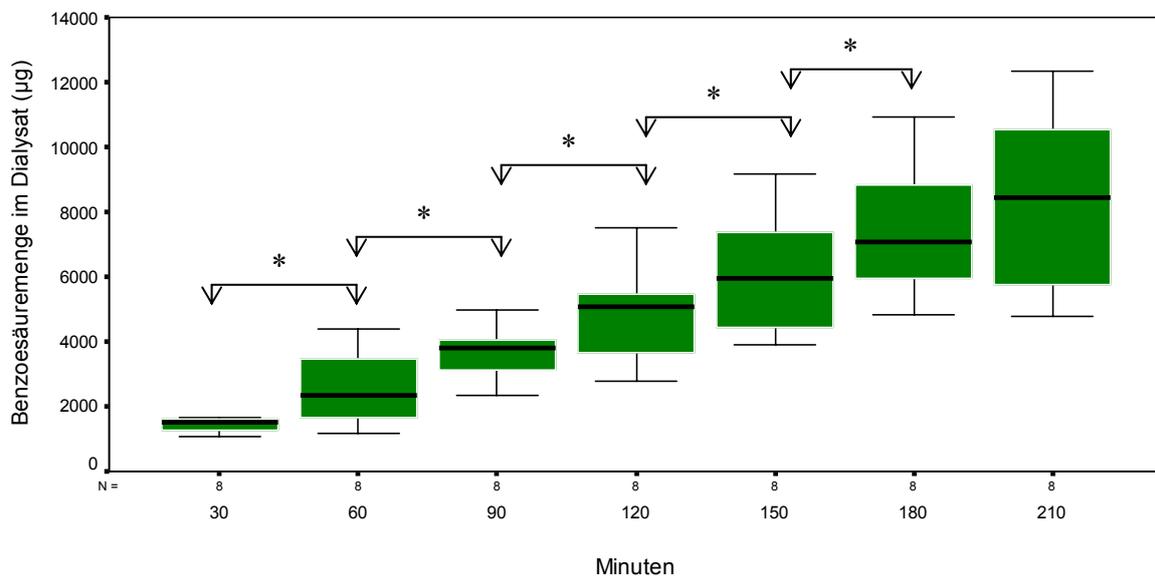


Abb. 13: Benzoesäuremenge im Dialysat.

Signifikanzen: 60-30 = 0,012; 90-60 = 0,012; 120-90 = 0,017;

150-120 = 0,012; 180-150 = 0,012; 210-180 = 0,123 (keine Signifikanz)

4.2 Charakterisierung des Modells

4.2.1 Ödematisierung des Gewebes

Als Maß für die Schädigung der Präparate dient der Umfang der Ödembildung in den Schweineextremitäten. Eine zunehmende Ödematisierung des Gewebes äußert sich in Form einer Gewichtszunahme. Aus diesem Grund wird die Differenz aus Endgewicht und Anfangsgewicht der Schweineextremität ermittelt und daraus die prozentuale Gewichtszunahme im Verhältnis zum Anfangsgewicht errechnet (vgl. Kap. 3.5, Tab. 4). Die maximal tolerierbare Ödembildung liegt bei 10 % [de Lange et al., 1992]. Ein Überschreiten dieses Wertes führt zum Ausschluss der Extremität aus der Versuchsreihe.

| Versuch | Gewicht vor der Perfusion (g) | Gewicht nach der Perfusion (g) | Gewichtszunahme in % |
|---------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------|
| Nr. 1 | 2.747 | 2.998 | 9,1 |
| Nr. 2 | 2.410 | 2.584 | 7,2 |
| Nr. 3 | 3.300 | 3.400 | 3,0 |
| Nr. 4 | 2.900 | 3.100 | 6,8 |
| Nr. 5 | 3.300 | 3.400 | 3,0 |
| Nr. 6 | 2.000 | 2.150 | 7,5 |
| Nr. 7 | 3.150 | 3.300 | 4,8 |
| Nr. 8 | 2.950 | 3.050 | 3,4 |
| Median | 2.925 | 3.075 | 5,8 |

Tab. 5: Organgewichte der isolierten Schweineextremitäten vor und nach der Perfusion der acht Hauptversuche

4.2.2 Hämodynamische Parameter

4.2.2.1 Mittlerer arterieller Perfusionsdruck (MAP)

Ziel war es, den MAP innerhalb des physiologischen Bereiches von 40-120 mmHg zu halten. Über einen Versuchszeitlauf von 210 Minuten liegt der Medianwert des MAP zu Versuchsbeginn bei 54 mmHg, nach 120 Minuten bei 64,5 mmHg und bei Versuchsende nach 210 Minuten bei 57 mmHg. Im gesamten Versuchsverlauf ist ein relativ konstanter Druckverlauf mit nur geringen Schwankungen zu erkennen. Die Medianwerte befinden sich zu jedem Zeitpunkt im physiologischen Bereich von 40-120 mmHg.

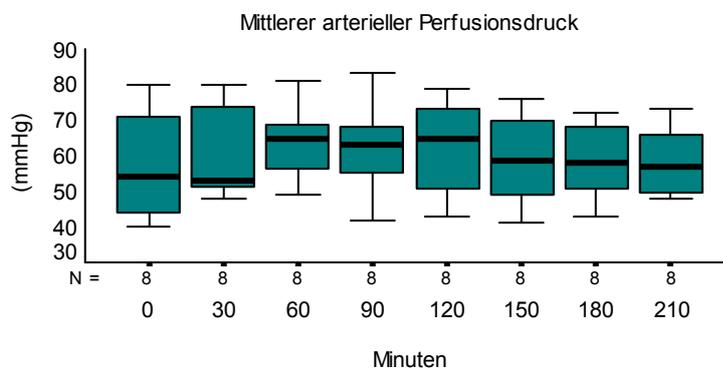


Abb. 14: Mittlerer arterieller Perfusionsdruck (MAP) in mmHg, Hauptversuche

4.2.2.2 Arterieller Perfusionsfluss

Der Arterielle Perfusionsfluss durch die Schweineextremität ist im Versuchsverlauf mit Hilfe der Rollenpumpe 2 im Median auf 4,41 ml/min*100 g eingestellt worden. (Der in Abbildung 14 gezeigte Mittlere arterielle Perfusionsdruck konnte bei diesem arteriellen Perfusionsfluss im physiologischen Bereich gehalten werden.)

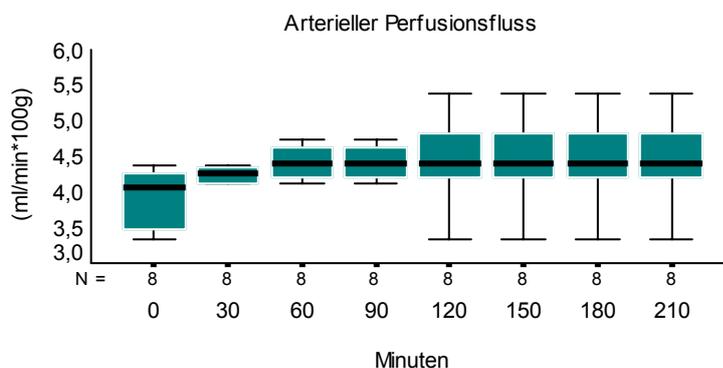


Abb. 15: Arterielle Perfusionsfluss in ml/min*100 g, Hauptversuche

4.2.2.3 Organwiderstand

Der aus den Perfusionsdruck- und flusswerten errechnete Widerstand der Präparate liegt zu Versuchsbeginn im Median bei 12,67 mmHg*min*100 g/ml. Im Laufe der Perfusion kommt es zunächst zum Anstieg des Organwiderstandes. In der 90. Minute liegt der Medianwert bei 14,31 mmHg*min*100 g/ml und fällt bis zum Versuchsende auf 12,31 mmHg*min*100 g/ml wieder ab.

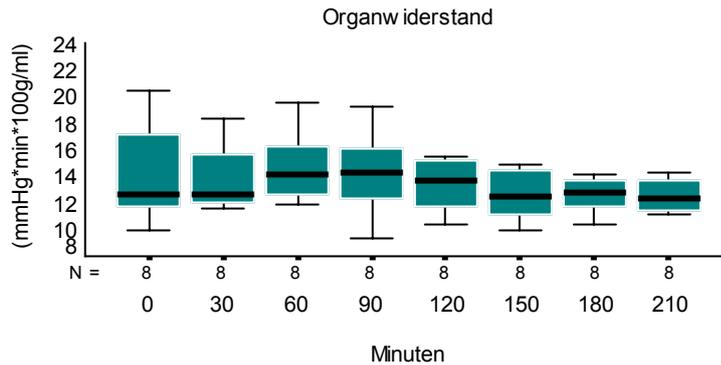


Abb. 16: Organwiderstand in mmHg*min*100 g/ml, Hauptversuche

4.2.3 Hämatologische Parameter

4.2.3.1 Arterieller Hämoglobingehalt

Um die Fließeigenschaft des Blutes zu verbessern und somit eine Optimierung der Gewebepfusion zu gewährleisten wurde das Perfusat soweit verdünnt, dass die Hämoglobinwerte sich unterhalb des physiologischen Bereiches von 10,8-14,8 g/dl befinden. Die Medianwerte des arteriellen Hämoglobingehalts liegen zu Versuchsbeginn bei 6,25 g/dl. In Minute 60 bei 6,6 g/dl, in Minute 120 bei 7,4 g/dl und zu Versuchsende in der 210 Minute bei 6,5 g/dl.

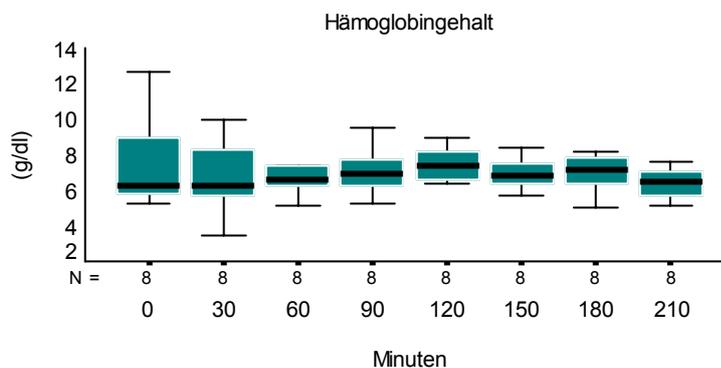


Abb. 17: Arterieller Hämoglobingehalt in g/dl, Hauptversuche

4.2.3.2 Freies Hämoglobin im arteriellen Perfusat

Durch Zerstörung der Blutzellen (zum Beispiel infolge der Rollenpumpentätigkeit) kommt es zur Freisetzung des Hämoglobins aus den Erythrozyten. Die freie Hämoglobinkonzentration steigt während der Perfusion an. Es ergeben sich folgende Medianwerte, 12 mg/dl (Versuchsbeginn), 26 mg/dl (60. Minute), 32,5 mg/dl (120. Minute), 41 mg/dl (210. Minute).

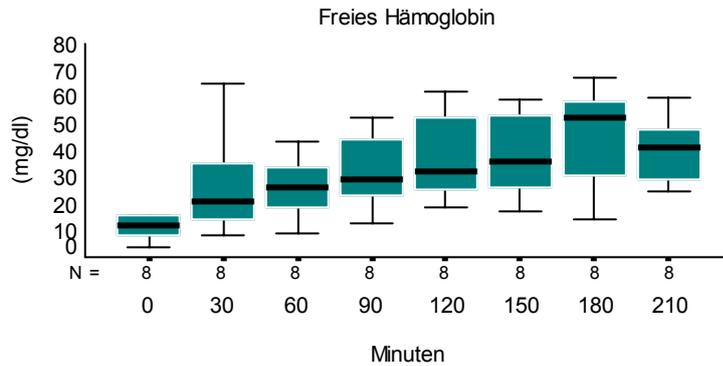


Abb. 18: Freies Hämoglobin in mg/dl im arteriellen Perfusat, Hauptversuche

4.2.3.3 Arterielle Lactatdehydrogenase (LDH)

Die Lactatdehydrogenase kann als Parameter für Muskel- und Lebernekrosen sowie für eine fortschreitende Hämolyse herangezogen werden. Die Ausgangskonzentration der LDH liegt zu Versuchsbeginn im Median mit 999 U/l schon weit oberhalb des Referenzbereiches von 380-634 U/l. Die Konzentration steigt über die Zeitpunkte 60. Minuten 2.424,5 U/l, 120. Minuten 3789,5 U/l bis zum Versuchsende in der 210. Minute auf 5230 U/l an.

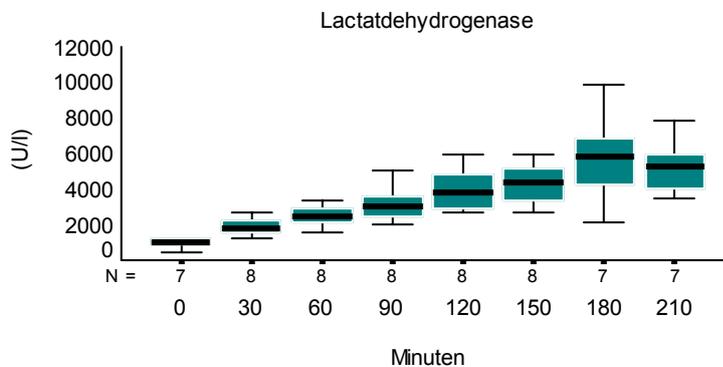


Abb. 19: Arterielle Lactatdehydrogenase in U/l, Hauptversuche

4.2.3.4 Arterielle Kaliumkonzentration

Die Kaliumkonzentration im Perfusat dient als Parameter für eine fortschreitende Zellschädigung. Während der Versuche erhöht sich die Kaliumkonzentration im arteriellen Perfusat. Der Medianwert steigt von 3,9 mmol/l zu Versuchsbeginn über 4,65 mmol/l in der 60. Minute, 5,2 mmol/l in der 120. Minute bis auf 5,25 mmol/l zum Ende der Versuche an.

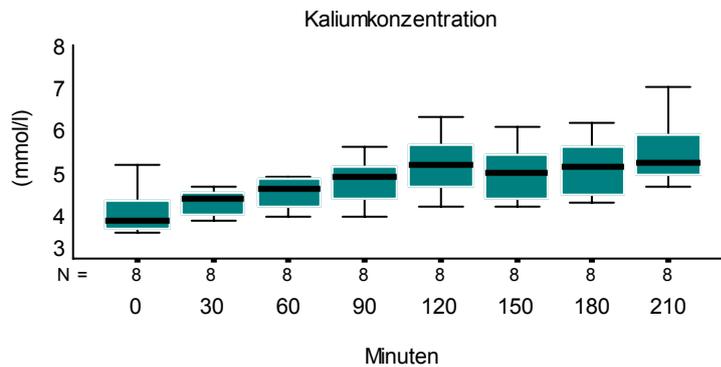


Abb. 20: Arterielle Kaliumkonzentration in mmol/l, Hauptversuche

4.2.3.5 Arterielle Natriumkonzentration

Die mediane Natriumkonzentration im arteriellen Perfusat beträgt zu Versuchsbeginn 143 mmol/l. Im weiteren Versuchsverlauf sind nur geringe Konzentrationsschwankungen zu verzeichnen: 141,5 mmol/l (60. Minute), 141 mmol/l (120. Minute), 141 mmol/l (210. Minute).

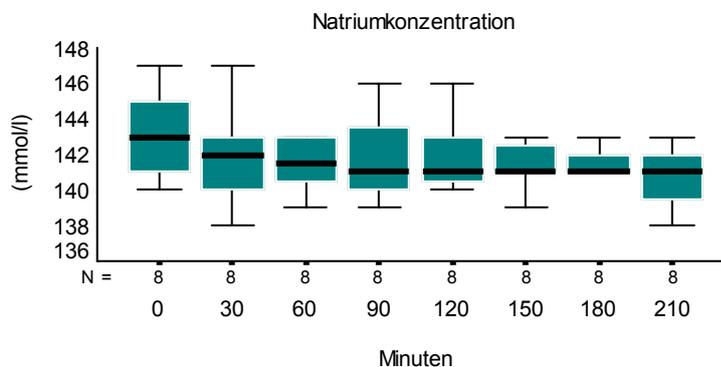


Abb. 21: Arterielle Natriumkonzentration in mmol/l, Hauptversuche

4.2.4 Stoffwechselfparameter

4.2.4.1 Sauerstoffverbrauch

Der Sauerstoffverbrauch, der die Vitalität und Funktionalität des perfundierten Organs widerspiegelt, beträgt zu Versuchsbeginn im Median 5,71 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$. Im Laufe der Perfusion ist zunächst ein Anstieg des Sauerstoffverbrauchs der Extremitäten zu verzeichnen. In der 60. Minute liegt der Medianwert bei 5,87 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$, in der 120. Minute bei 7,94 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$. Gegen Versuchsende nimmt der Sauerstoffverbrauch ab und liegt in der 210. Minute bei 5,99 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$.

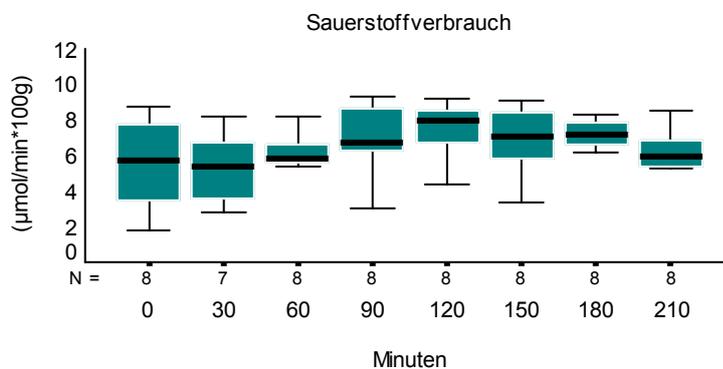


Abb. 22: Sauerstoffverbrauch der Extremitäten in $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$, Hauptversuche

4.2.4.2 Glucoseverbrauch

Der Glucoseverbrauch der (wie auch der Sauerstoffverbrauch) die Vitalität und Funktionalität des perfundierten Organs anzeigt weist bei Versuchsbeginn ein Medianwert von 522,1 $\mu\text{g}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$ auf. Nach 60 Minuten liegt der Median bei 341,14 $\mu\text{g}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$, nach 120 Minuten bei 707,24 $\mu\text{g}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$ und zum Versuchsende in der 210 Minute bei 528,79 $\mu\text{g}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$.

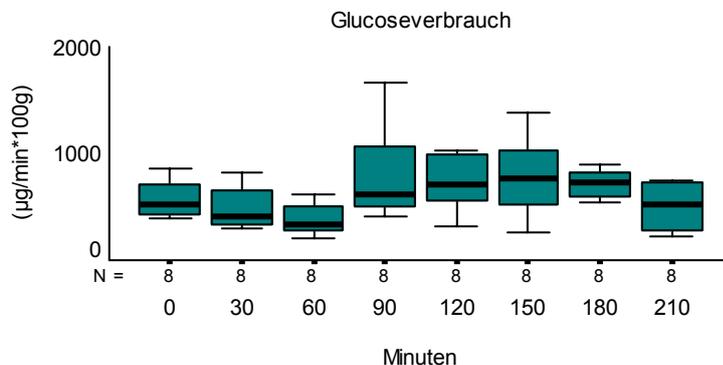


Abb. 23: Glucoseverbrauch der Extremitäten in $\mu\text{g}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$, Hauptversuche

4.2.4.3 Lactatkonzentration im venösen Perfusat

Durch Bestimmung der Lactatkonzentration, als Endprodukt der anaeroben Glykolyse, kann ein Rückschluss auf die Stoffwechsellage der perfundierten Extremitäten gezogen werden. Im venösen Perfusat steigen die Lactatkonzentrationen während der Versuche kontinuierlich an. Der Medianwert liegt zu Versuchsbeginn bei 39,2 mg/dl, nach 60 Minuten bei 41,05 mg/dl, nach 120 Minuten bei 45,6 mg/dl und nach 210 Minuten bei 48,9 mg/dl.

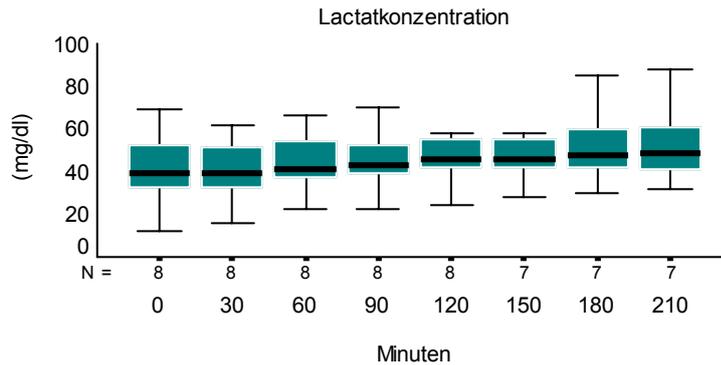


Abb. 24: Lactatkonzentration im venösen Perfusat in mg/dl, Hauptversuche

4.2.5 Arterieller pH-Wert

Der arterielle pH-Wert ist während des Versuchsverlaufs nur leichten Schwankungen unterworfen. Der Median liegt zu Versuchsbeginn bei 7,19. In der 60 Minute bei 7,32, in der 120 Minute bei 7,38 und zu Versuchsende bei 7,36.

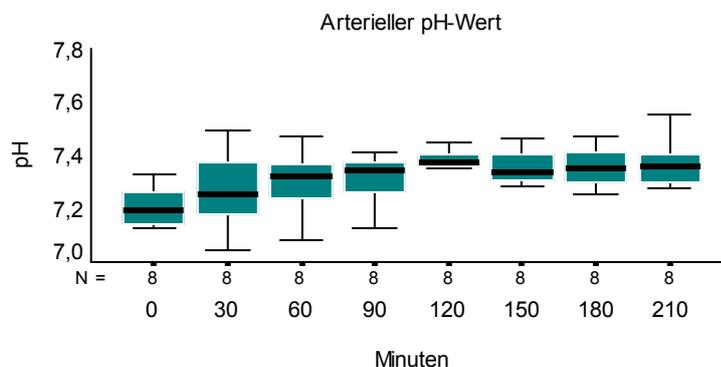


Abb. 25: Arterieller pH-Wert, Hauptversuche

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen in der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité Universitätsmedizin Berlin vorhandenen Perfusionsaufbau zu modifizieren und die Funktionsfähigkeit der isoliert hämoperfundierten Schweineextremität als perkutanes Perfusionsmodell zu demonstrieren. Für die dermalen Resorptionsuntersuchungen dienen dabei die Vordergliedmaßen von Schweinen der Deutschen Landrasse, als Testsubstanz wurde Benzoessäure verwendet.

Im Folgenden werden zunächst die Resorptionsergebnisse der Benzoessäure, sowie die erzielten Ergebnisse aus der Literatur welche aus anderen Systemen gewonnen wurden, diskutiert. Anschließend wird auf das verwendete Modell eingegangen.

5.1 Diskussion der Resorptionsergebnisse

Zur Demonstration der Eignung des Modells der isoliert hämoperfundierten Schweineextremität für dermale Resorptions- und Penetrationsuntersuchungen wurde Benzoessäure in gelöster Form auf die Haut appliziert und deren Resorption durch Nachweis der Substanz im venösen Perfusat und im Dialysat mittels HPLC gemessen.

Nach topischer Applikation der Benzoessäure ist die Substanz in allen durchgeführten Hauptversuchen (n=8) im Perfusat (Blut) sowie im Dialysat nachweisbar. Das Versuchsziel, die perkutane Resorption von Benzoessäure an der isoliert hämoperfundierten Schweineextremität zu untersuchen, wurde erreicht.

Die Substanz wurde in gelöster Form auf die Schweinehaut aufgetragen, da bei anderen galenischen Zubereitungen wie zum Beispiel Pasten, Salben, Cremes oder Gelen eine Abhängigkeit der Wirkstofffreigabe von der Grundlage besteht. Um Vergleiche mit anderen *in vitro* Untersuchungen durchführen zu können, wie beispielsweise am isoliert perfundierten Rindereuter, muss die galenische Formulierung bei beiden Untersuchungsformen gleich sein.

Die vorliegenden Resultate dieser Arbeit zeigen, dass bereits nach 30 Minuten im Median 2,03 mg (5,08 % der applizierten Dosis) Benzoessäure durch die Haut des Schweins penetriert sind und im Perfusat und Dialysat nachweisbar sind. Aus den Abbildungen 12 und 13 ist ersichtlich, dass bis zum Zeitpunkt von 180 Minuten ein kontinuierlicher signifikanter Anstieg von Benzoessäure in Perfusat und Dialysat erfolgt. Danach kommt es zum Abfall der

Benzooesäurekonzentration im Perfusat. Die Konzentration im Dialysat steigt weiter an, was auf einen Ausgleich des Konzentrationsgefälles zurückzuführen sein könnte.

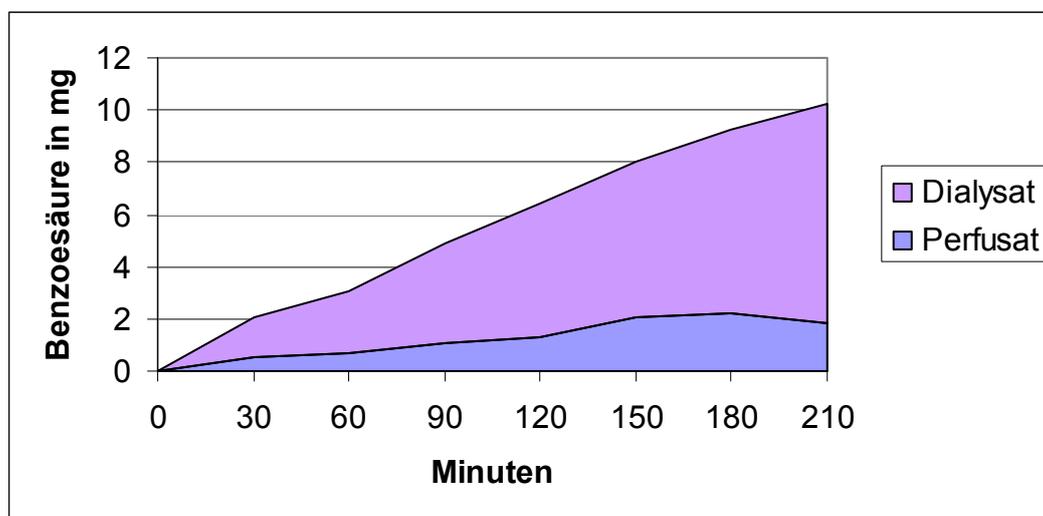


Abb. 26: Während einer Versuchsdauer von 210 Minuten sind 10,28 mg Benzooesäure an der isoliert hämoperfundenen Schweineextremität resorbiert worden. Das entspricht 25,7 % der applizierten Dosis. (7,3 % der applizierten Dosis pro Stunde; Angabe der Medianwerte aus 8 Einzelversuchen)

Die Verwendung von Benzooesäure als Prüfsubstanz hat den Vorteil, dass bereits vorangegangene Untersuchungsergebnisse aus *in vitro* sowie *in vivo* Methoden vorliegen (vgl. Kap. 2.4). Die folgende Abbildung zeigt die kumulative Darstellung der resorbierten Benzooesäuremenge im Perfusionszeitraum von 240 Minuten nach topischer Applikation von 40 mg Benzooesäure auf 100 cm² Euterhaut am isoliert perfundenen Rindereuter.

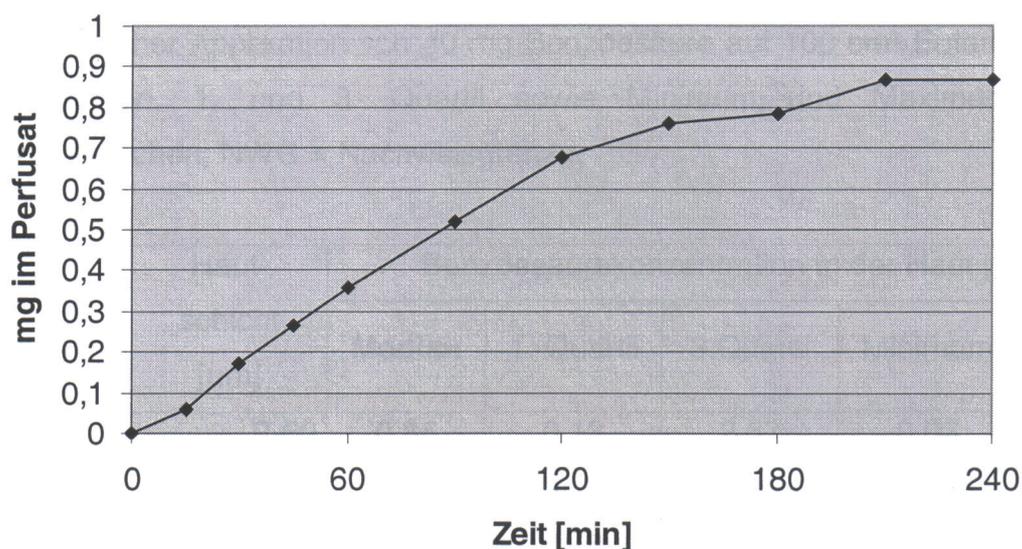


Abb. 27: Während einer Versuchsdauer von 240 Minuten sind am isoliert perfundenen Rindereuter 0,87 mg Benzooesäure resorbiert worden. Das entspricht 2,2 % der applizierten Dosis (Angabe der Medianwerte aus 8 Einzelversuchen.) [Schaper, 2003].

Schaper [2003] führte Resorptionsuntersuchungen mit Benzoesäure am isoliert perfundierten Rindereuter durch. Die große Applikationsfläche sowie die große Menge an Perfusionsflüssigkeit, die das isolierte Organ pro Zeiteinheit durchströmt, erlauben es, auch geringe Wirkstoffmengen nach entsprechender Anreicherung aus dem Perfusat analytisch zu erfassen [Kietzmann und Löscher, 1993]. Als Nachteil ist gleichzeitig die notwendige große Menge an Perfusatflüssigkeit zu nennen. Auf eine Euterhautfläche von 100 cm² wurden 40 mg Benzoesäure aufgebracht [Schaper; 2003]. Über eine Versuchsdauer von 4 Stunden wurde das Rindereuter mit einer Tyrodelösung perfundiert. Währenddessen sind Perfusatproben, Hautproben und Tesafilmabrissproben entnommen und analysiert worden. Die Ergebnisse zeigen, dass Benzoesäure schnell in das Stratum corneum penetriert, schnell aus diesem wieder abflutet und in das Gefäßsystem resorbiert wird. Während einer Versuchszeit von 240 Minuten sind 0,87 mg Benzoesäure resorbiert worden, das entspricht 2,2 % der applizierten Dosis.

Die in dieser Arbeit dargestellten Versuche an der isoliert perfundierten Schweineextremität zeigen eine deutlich höhere Resorptionsrate von Benzoesäure, als am isoliert perfundierten Rindereuter. Auf Grund der unterschiedlichen Hautbeschaffenheit beider Spezies drängen sich eigentlich umgekehrte Schlussfolgerungen auf. Die Epidermisdicke des Schweins beträgt 70-140 µm und die des Rindes hingegen 40-60 µm [Habermehl et al., 1996]. Der Durchtritt der Benzoesäure durch die Epidermis und die Aufnahme in die Blutgefäße müsste demnach bei der Schweineextremität wesentlich langsamer erfolgen als bei dem Rindereuter. Obwohl bei beiden Modellen mit gleicher Benzoesäurekonzentration in gelöster Form und gleicher Applikationsflächengröße gearbeitet wurde, beträgt die Resorptionsrate bei der Schweineextremität schon nach 3,5 Stunden Versuchsdauer 25,7 %, während sie beim Rindereuter nach 4 Stunden Versuchsdauer bei 2,2 % liegt. Als Grund hierfür ist denkbar, dass beim Rindereuter nicht mit Blut perfundiert wurde. Die Verwendung zellfreier Perfusate ist mit einigen Nachteilen behaftet. So ist eine angemessene Sauerstoffversorgung nur mittels unphysiologisch hoher Flussraten zu bewirken. Der dabei notwendige hohe Perfusionsdruck begünstigt die Entstehung von Ödemen [Isselhard, 1986]. Ödeme entwickeln sich auch dann leicht, wenn Perfusate ohne kolloidosmotisch wirksame Substanzen verwendet werden. Blut hingegen verfügt über eine hohe Sauerstofftransportkapazität und ein gutes Substratbindungsvermögen, so dass die Organvitalität während der Perfusion sichergestellt werden kann.

In der Literatur finden sich weitere vergleichbare Untersuchungen mit Benzoesäure als Testsubstanz: Die Resorptionsergebnisse von Feldmann und Maibach [1970] am Menschen zeigen, dass von der auf den Unterarmen aufgetragenen Benzoesäure in den ersten 12 Stunden des Versuches bereits 3 % pro Stunde in den Urin gelangen. Nach 5 Tagen wurden

42,62 % der applizierten Dosis resorbiert, wobei die Resorption bereits nach 48 Stunden abgeschlossen war. Am Modell der isolierten Schweineextremität beträgt die aus eigenen Untersuchungen ermittelte Resorptionsrate von Benzoesäure 7,3 % pro Stunde. Dieser prozentuale Anteil ist deutlich höher als der am Menschen analysierte Wert [Feldmann und Maibach, 1970]. Auf Grund der unterschiedlichen Versuchsdurchführung können diese Ergebnisse jedoch nicht direkt miteinander verglichen werden. Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass die Niere nicht das einzige Ausscheidungsorgan für die getesteten Substanzen ist [Franz, 1975]. Dennoch zeigt sich in beiden Untersuchungen die schnelle hohe Resorptionsrate der Benzoesäure. Diese Ergebnisse werden in den Analysen von Franz [1975] bestätigt. Er bestimmte bereits 1975 die *in vitro* Resorption von Benzoesäure an Humanhaut. An seinem Modell der Diffusionszelle („Franz-Zelle“) kann die Benzoesäure als schnell durch die Haut penetrierende Substanz eingestuft werden. Bereits nach 4 Stunden war das Resorptionsmaximum der Benzoesäure erreicht [Franz, 1975]. In der eigenen Arbeit ist schon nach 3 Stunden ein Rückgang der Benzoesäurekonzentration im Perfusat zu verzeichnen. Als Grund dafür ist denkbar, dass bei der Versuchsanordnung der Diffusionszelle die zu testende Substanz erst die gesamten Hautschichten durchwandern muss, um anschließend analysiert werden zu können. Dieses hat eine Zeitverzögerung zur Folge, da normalerweise bereits in der Dermis der Übertritt in die Blutbahn erfolgt.

Hunziker et al. [1978] verglichen die von Feldmann und Maibach [1970] am Menschen gewonnenen Benzoesäureresorptionsergebnisse mit denen an Mexikanischen haarlosen Hunden gewonnenen Resultate. Demnach liegt die maximale Resorptionsrate (% der applizierten Dosis pro Stunde) beim Menschen bei 3 %, während sie bei den Hunden nur bei 0,25 % liegt. Außerdem hält die renale Ausscheidungsrate der Benzoesäure bei den Hunden bis zum 10 Tag an, während beim Menschen bereits nach 2 Tagen keine Benzoesäure im Harn mehr nachweisbar ist. Als Ursache hierfür ist nicht der unterschiedliche renale Metabolismus der beiden Spezies anzusehen, sondern eine längere Verweildauer der Benzoesäure in der Hundehaut als in der Menschenhaut. Versuche bei Hunden mit subkutan applizierter Benzoesäure führten nämlich zu gleichen Resultaten wie beim Menschen. Die im Tierversuch ermittelten niedrigen Resorptionsraten geben die Verhältnisse an der menschlichen Haut nur sehr unzureichend wieder.

Die von Seubert et al. [1984] an Menschenhaut unter *in vivo* Bedingungen vorgenommenen Resorptionsanalysen zeigen, dass Benzoesäure kein Depot im Stratum corneum bildet und rasch durch Epidermis und Dermis penetriert. Auch bei den eigenen Untersuchungen an der isoliert hämoperfundierten Schweineextremität kommt es zu einem raschen Durchtritt der Benzoesäure durch die Epidermis und Dermis. Bereits nach 30 Minuten konnte ein signifikanter Anstieg der Benzoesäuremenge in Perfusat und Dialysat verzeichnet werden.

5.2 Diskussion des verwendeten Modells

Zur Überprüfung der Resorption von Substanzen durch die Haut stehen neben klinischen Studien an Mensch und Tier mittlerweile eine Reihe von *in vitro* Modellen zur Verfügung. Eine Auswahl häufig genutzter Modelle gibt das Kapitel 2.2 der Literaturübersicht wieder. Jedem Modell sind gewisse Vor- und Nachteile beizumessen die in Folgendem verdeutlicht werden:

Die Verwendung von Hautpräparaten und Zellkulturen (z.B. in Diffusionszellen) ist kostengünstig und einfach in der Handhabung. Es erfolgt jedoch keine fortlaufende Perfusion der Haut und der anschließenden Gewebe. Die zu testende Substanz muss erst die gesamten Hautschichten durchwandern, um anschließend analysiert werden zu können, während *in vivo* bereits in der Dermis der Übertritt in die Blutbahn erfolgt. Folglich ist die Übertragbarkeit der in solchen Systemen gewonnenen Ergebnisse auf den lebenden Organismus mangelhaft.

Bei den aufgezeigten Perfusionsmodellen wie beispielsweise dem isoliert perfundierten Rindereuter [Pittermann et al., 1995, Kietzmann et al., 1993], dem isoliert perfundierten Schweinehautlappen [Riviere et al., 1986], dem isoliert perfundierten Schweineohr [de Lange et al., 1992] und der isoliert perfundierten Schweineextremität [Große-Siestrup et al. 2002; Nogueira et al., 1999; Godt, 2007] ist die Perfusion der Haut und der anschließenden Gewebe gewährleistet. Der entscheidende Vorteil beim Einsatz von Rinder- und Schweineorganen liegt in der Möglichkeit, diese Organe und das für die Perfusion benötigte Blut in ausreichender Menge von kommerziellen Schlachthöfen zu beziehen und auf diese Weise einen Beitrag zur Reduktion von Tierversuchen zu leisten [Modersohn et al., 2001; Große-Siestrup et al. 2002]. Die Komplexität der Versuchsdurchführungen gekoppelt mit den entstehenden Kosten ist bei den aufwendigen Perfusionen jedoch eher als negativ zu bewerten.

Die Perfusion des Rindereuters und des Schweinehautlappens erfolgte nicht mit Blut, sondern mit Tyrodelösung bzw. Krebs-Ringer-Bicarbonatlösung. Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den lebenden Organismus ist daher nicht uneingeschränkt möglich. Die Perfusion des Schweineohrs wurde zwar mit oxygeniertem Blut durchgeführt, jedoch ist kein geschlossenes Perfusionssystem vorhanden. Bei langen Versuchszeiten ist mit hohen Mengen an Blut zu rechnen. Die Perfusion der Schweineextremität hingegen erfolgt in einem geschlossenen System mit körperwarmem, autologem Vollblut. Um Untersuchungsergebnisse an der isoliert hämoperfundierten Schweineextremität mit den am lebenden Tier erzielten Ergebnissen vergleichen zu können, muss die Organvitalität während der Versuche

ausnahmslos sichergestellt sein. Zur Beurteilung dieser Vitalität werden während der Perfusionen in regelmäßigen Abständen hämodynamische und hämatologische Parameter sowie Stoffwechselaktivitäten, pH-Wert und Ödembildung erfasst:

5.2.1 Hämolyse und Blutgerinnung

Die Problematik bei der Verwendung von Blut als Perfusionsmedium liegt hauptsächlich in der Traumatisierung des Blutes durch Kontakt mit den Bestandteilen des künstlichen Kreislaufs wie Dialysatoren, Pumpen, Schläuchen etc. Zu dem Zeitpunkt, in dem das Blut den natürlichen Kreislauf verlässt und mit der körperfremden Oberfläche in Kontakt tritt, kommt es zu Wechselwirkungen zwischen den Blutzellen, Proteinen und der körperfremden Membranoberfläche [Slack und Turitto, 1993]. Verantwortlich hierfür sind u. a. Scherkräfte, die aus dem Ineinandergleiten von Flüssigkeiten und festen Schichten resultieren. Scherkräfte verursachen eine mehr oder weniger starke Quetschung von Zellen und Strukturen, die zwischen den Schichten gefangen sind [Leonard et al., 1983]. Der Blutkontakt mit Materialien wie Silikon, PVC und Polyurethan vermag die Komplementkaskade und damit Leukozyten, Monozyten und Thrombozyten zu aktivieren [Moll et al., 1990; Omokawa et al., 1990]. Des Weiteren kommt es zur Aktivierung des intrinsischen Blutgerinnungssystems [Engelhardt et al., 2005]. Die Blutgerinnung bedingt im perfundierten Organ Mikrozirkulationsstörungen und als deren Folge Schädigungen des Organparenchyms [Isselhard, 1986]. Um einer Blutgerinnung während der Perfusionen der isolierten Schweineextremität entgegenzuwirken, ist bereits dem narkotisierten Tier während der Operation Heparin intravenös verabreicht worden. Heparin verstärkt die Wirkung eines natürlichen Gerinnungshemmstoffes im Blut, des Antithrombin III. Freies im Plasma vorkommendes Antithrombin III ist in der Lage Thrombin, die wichtigste Protease in der Gerinnungskaskade, zu inaktivieren [Engelhardt et al., 2005].

Neben der Inhibition der Blutgerinnung ist bei Organperfusionen mit Vollblut eine Dilution des Blutes notwendig. Sie dient der Verbesserung der Fließeigenschaft des Blutes [Dittrich et al., 2000]. Die **Hämoglobinkonzentration** des Perfusates wurde während der durchgeführten Versuche durch Justierung der Rollenpumpen auf 6-8 g/dl eingestellt.

Die Hämoglobinkonzentration im Blut des Schweines liegt im Normalbereich zwischen 10,8-14,8 g/dl [Waldmann und Wendt, 2004]. Die vorgenommene Perfusatverdünnung auf eine Hämoglobinkonzentration von 6-8 g/dl war erforderlich, um durch Verbesserung der Fließeigenschaften des Perfusates eine Optimierung der Gewebepfusion zu ermöglichen [Nogueira et al., 1999; Klövekorn, 1990].

Von den in künstlichen Kreisläufen eingesetzten Blutpumpen ist bekannt, dass sie eine mechanische Schädigung der Blutzellen verursachen und somit unmittelbar die Parameter LDH-, Kalium- und Natrium und des freien Hämoglobins im Perfusat beeinflussen. Der Umfang einer fortschreitenden Blutschädigung lässt sich durch den Anstieg des **freien Hämoglobins** im Perfusat erfassen [Mora, 1995]. Während der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche ist der Gehalt an freiem Hämoglobin im arteriellen Perfusat kontinuierlich angestiegen. Die Medianwerte bewegen sich zwischen 12 mg/dl zu Versuchsbeginn bis 41 mg/dl zu Versuchsende und liegen unterhalb der freien Hämoglobinkonzentration welche von Wagner et al. [2003] bei der Hämoperfusion von Schweineextremitäten ermittelt wurden. Durch Zerstörung der Blutzellen kommt es nicht nur zur Freisetzung des Hämoglobins aus den Erythrozyten, sondern auch zur Freisetzung des Kaliums und Natriums, welches ebenfalls zur Bewertung der Hämolyse herangezogen werden kann [van der Hoeven et al., 1998; Moen et al., 1994; Reimold und Heinrichs, 1971]. Die **Kaliumkonzentration** steigt bei der vorliegenden Versuchsreihe bis zum Versuchsende auf 5,25 mmol/l an und liegt somit minimal über dem Referenzbereich von 4,0-5,0 mmol/l. Kalium kommt jedoch in allen Körperzellen vor, so dass es auch bei Gewebszerstörung als Folge von Traumen, Operationen, Verbrennungen, Hypoxien zur Hyperkaliämie kommen kann [Hiernickel, 1985; Kraft und Dürr, 1999]. Auch Störungen des Säure-Base-Haushaltes können mit Änderungen der Serum-Kaliumkonzentration einhergehen. So wird bei einem Anstieg der zellulären Protonenkonzentration, Kalium aus dem Intrazellularraum in das extrazelluläre Kompartiment abgegeben [Siegenthaler, 1994].

Während des Versuchsverlaufs ist der **Natriumgehalt** im Perfusat innerhalb der physiologischen Grenzen geblieben.

Im Zusammenhang mit der Blutschädigung sind auch die Ergebnisse der Messungen der **Lactatdehydrogenase (LDH)** zu bewerten. Das Vorkommen der LDH ist zwar gewebeunspezifisch, jedoch sind Muskel- und Lebernekrosen sowie Hämolyse die Hauptquellen für einen erhöhten Gehalt im Serum [Turk und Casteel, 1997]. Die Werte der Lactatdehydrogenase im Perfusat liegen bereits zu Versuchsbeginn im Median bei 999 U/l und befinden sich damit weit oberhalb des von Kaneko et al. [1997] für Schweineblut angegebenen Referenzbereiches von 380-634 U/l. Die Mediankonzentrationen der LDH steigen während des Versuchsverlaufes sogar bis auf das 5 fache der Anfangskonzentration an. Kalium und freies Hämoglobin steigen während der Perfusionen nur auf das 1,3 bzw. 3,4 fache der Anfangskonzentrationen an. Dies lässt die Annahme zu, dass die LDH-Werte hauptsächlich von der umfangreichen Muskelschädigung im Bereich des Wundrandes herrühren und nur zum Teil von der bereits besprochenen Hämolyse durch die Rollenpumpen bedingt sind.

5.2.2 Ischämie und Reperfusion, Ödembildung

Bei der Perfusion von Organen spielen Organschäden, welche durch Ischämie und anschließender Reperfusion induziert werden, eine herausragende Rolle. Bei Organperfusionen wird die Organdurchblutung nach Abklemmen vom systemischen Kreislauf des Spenders komplett unterbrochen und erst nach Anschluss an die Perfusionsapparatur wieder gewährleistet. Nach Induktion einer Ischämie fällt im Gewebe die Konzentration energiereicher Phosphate (ATP) rasch ab. Als Folge ist mit einer, wie bereits im Kapitel 2.5 besprochen, massiven Zellschädigung zu rechnen.

Während der Reperfusion solcher Organgebiete kann zu dem bereits bestehenden Ischämieschaden ein zusätzlicher Gewebeschaden durch entstehende O₂-Radikale induziert werden. Freie O₂-Radikale entstehen vor allem bei der Aufhebung einer hypoxie- bzw. anoxiebedingten Mangelsituation mit Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung auf dem Boden ischämiebedingter Veränderungen intrazellulärer Enzymsysteme [Mc Cord, 1985; Hess et al., 1984] (vgl. Kap. 2.5).

Die **Ödembildung** ist als Indikator für eine durch freie Radikale verursachte Gewebeschädigung zu betrachten. Bei der Reperfusion von isolierten Organen ist, durch die Zunahme des peripheren Widerstandes nach kalter Lagerung, mit einer Ödembildung im Gewebe zu rechnen [Bücherl, 1995; Bartlett, 1981], da eine Ischämie die Schädigung des vaskulären Strombettes zur Folge hat [Isselhard, 1986].

Um die Ischämie-, Reperfusionsschäden und Ödembildungen auf ein Minimum zu beschränken, sind in dieser Arbeit während der Versuchsdurchführungen unterschiedliche Maßnahmen getroffen worden. Zum einen wurde die warme und kalte Ischämiezeit möglichst gering gehalten (Kap. 3.1.4). Zum anderen sind die Schweineextremitäten mit einer auf ca. 35° Celsius erwärmten heparinisierten Natriumchloridlösung gespült worden, um das Ausschwemmen von Blutzellen, Zelldebris und schädlichen Stoffwechselprodukten zu ermöglichen und um dem Auskühlen der Schweineextremitäten entgegen zu wirken. Eine Ödematisierung spiegelt sich in einer Gewichtszunahme der Extremitäten wider. Es ist gelungen, während der Perfusionen die von de Lange et al. [1992] angegebene maximal tolerierbare Ödembildung von 10 % nicht zu überschreiten (Tab. 5). Der Median der Gewichtszunahme der Schweineextremitäten liegt bei 5,8 %.

5.2.3 Hämodynamik und Stoffwechsellage

Neben der Ödembildung ist auch die Zunahme des peripheren Widerstandes Zeichen eines Ischämie- und Reperfusionsschadens. Aus den beiden hämodynamischen Regelgrößen Perfusionsdruck/Perfusionsfluss ergibt sich ein errechneter **Organwiderstand**. Im Versuchsverlauf ist zunächst ein Anstieg der Medianwerte des Organwiderstandes von 12,67 mmHg*min*100 g/ml auf 14,31 mmHg*min*100 g/ml zu verzeichnen. Zu Versuchsende fällt der Organwiderstand auf 12,31 mmHg*min*100 g/ml ab. Ursache hierfür könnte die anfängliche Verengung der Gefäße und die Justierung des Perfusionsflusses zu Versuchsbeginn sein. Die Organwiderstandswerte der eigenen Arbeit liegen leicht unterhalb der Grenzen, die Große-Siestrup et al. [2002] mit 15,5-19,1 mmHg*min*100 g/ml für die Hämoperfusion von isolierten Schweineextremitäten angibt. In Verbindung mit dem Organwiderstand sind auch die Stoffwechsellparameter **Sauerstoffverbrauch** und **Glucoseverbrauch** zu betrachten. Diese beiden Parameter sind wichtige Indikatoren, die die Vitalität und Funktionalität des perfundierten Organs anzeigen [Riviere et al., 1986; de Lange et al., 1992; von Baeyer et al., 1997; Nogueira et al., 1999; Große-Siestrup et al., 2002].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ab der 60. Versuchsminute tendenziell, mit steigendem Sauerstoff- und Glucoseverbrauch, der Organwiderstand abnimmt. Dieses könnte zum einen damit zusammenhängen, dass nach anfänglicher Ischämie, durch das Angebot an Sauerstoff und Glucose im Gewebe, Glucose wieder vermehrt aerob verstoffwechselt werden kann. Dadurch steigt das Angebot an ATP in den Zellen und die membranständigen ATPasen sind wieder in der Lage das osmotische Gleichgewicht zwischen Intra- und Interzellularraum herzustellen. Die Einengung der Kapillaren wird teilweise aufgehoben und der Organwiderstand sinkt. Zum anderen ist nach Aufheben der Ischämie mit einer Vasodilatation der Gefäße zu rechnen, so dass auf diese Weise der Organwiderstand sinkt [Brook et al., 2003].

Der Glucoseverbrauch der isoliert hämoperfundierten Schweineextremität liegt zu jedem Zeitpunkt der Perfusion über dem in der Literatur von de Lange et al. [1992] und Große-Siestrup et al. [2002] angegebenen Wert von >250µg/min*100 g.

Der Sauerstoffverbrauch der perfundierten Extremitäten erreicht teilweise nur ein Drittel von den in der Literatur von Schmidt et al. [2000] und Engelhardt et al. [2000] angegebenen Referenzwerten. Diese Divergenz mag damit zusammen hängen, dass es sich bei den in der Literatur angegebenen Werten um den Sauerstoffverbrauch eines menschlichen Skelettmuskels unter Ruhebedingungen handelt. Es wird dabei von reinem Muskelgewebe ausgegangen. Der Sauerstoffverbrauch der perfundierten Schweineextremität ist über das Gesamtgewicht der Extremität ermittelt worden. Daher kann es sein, dass die isoliert

normotherm hämoperfundierte Schweineextremität durch ihren Anteil an Knochen, Haut und Knorpel einen niedrigeren Sauerstoffverbrauch aufweist als das tachytrophe Muskelgewebe. Die hämodynamische Situation der Versuche ist durch den **mittleren arteriellen Perfusionsdruck** und den **arteriellen Perfusionsfluss** gekennzeichnet. Es ist gelungen, über einen konstanten arteriellen Perfusionsfluss von 4,41ml/min*100 g, den mittleren arteriellen Perfusionsdruck der isolierten Extremitäten stabil zu halten. Er liegt innerhalb des Bereiches, den de Lange et al. [1992] mit 40-120 mmHg für die Hämoperfusion von isolierten Schweineohren anführt. Inwieweit diese Werte auch Gültigkeit für die Hämoperfusion von Schweineextremitäten haben, bleibt noch zu klären.

Die **pH-Werte** des arteriellen Perfusates lagen zu Versuchsbeginn unterhalb der von Smith et al. [1997] für Schweine angegebenen arteriellen Blut pH-Werte von 7,38-7,42. Als Ursache für niedrige pH-Werte können erhöhte Lactatkonzentrationen im Blut angesehen werden [Riviere, 1986]. Während der Ischämiezeiten kommt es durch die mangelhafte Sauerstoffversorgung minderdurchbluteter Gewebe zur anaeroben Glycolyse mit vermehrter Bildung von Lactat. Des Weiteren ist bei einer Hypoxie der Citratzyklus gestört, wodurch in verstärktem Maße H⁺-Ionen anfallen und der pH-Wert in den sauren Bereich verschoben wird [Schmidl, 1985]. Die **Lactatkonzentrationen** im venösen Perfusat sind bereits zu Versuchsbeginn um das 3 fache höher als die in der Literatur angegebenen Referenzwerte. Die Ursachen hierfür können zum einen die durch die Gewebshypoxie auftretende anaerobe Glycolyse mit verstärkter Lactatbildung sein, als auch die Stressempfindlichkeit der Schweine. Bereits psychischer Stress allein führt zum sofortigen Anstieg der Lactatwerte auf das 10 fache (= 1000 %) über dem Ruhewert [Waldmann und Wendt, 2004]. Während des Versuchsverlaufs von 3,5 Stunden sind die Lactatmedianwerte nur geringfügig von 39,2 mg/dl bis auf 48,9 mg/dl angestiegen, welches für eine ausgewogene Stoffwechsellage der Extremität spricht.

Durch eine intensive Sauerstoffbegasung des Dialysates, verbunden mit einer Sauerstoffsättigung des Perfusates, ist es gelungen die pH-Werte während der Versuche anzuheben und weitestgehend im physiologischen Bereich zu halten.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Untersuchung der perkutanen Resorption von Benzoesäure an der isoliert hämoperfundierten Schweineextremität zufrieden stellend gelungen ist. In Anbetracht der diskutierten Ergebnisse aus der Literatur, welche an anderen Hautmodellen gewonnen wurden, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die an der isoliert hämoperfundierten Schweineextremität ermittelten Resorptionsergebnisse den *in vivo* Resorptionsverhältnissen am Menschen sehr nahe kommen. Dieses Phänomen mag damit zusammenhängen, dass sowohl die Haut des hellhäutigen Zuchtschweins für vergleichende Untersuchungen am Menschen geeignet ist, als auch dass die Perfusionen mit Blut

durchgeführt wurden. Im Blut werden alle für eine suffiziente Präparatefunktion benötigten Stoffe und Gase angeboten. Neben der optimalen Sicherstellung der Organvitalität hat Blut gegenüber anderen Perfusionsflüssigkeiten den Vorteil, dass die resorbierten Substanzen an Plasmaeiweiße gebunden und transportiert werden können.

Anlässlich des Verbots von Tierversuchen für Kosmetika bis zum Jahre 2013 (7. Änderung der EU Kosmetikrichtlinie 76/768/EEC), kann mit der isoliert hämoperfundierten Schweineextremität eine tierversuchsfreie Methode für perkutane Resorptionsprüfungen, beispielsweise für die Testung von Salben, Lotionen etc. zur Verfügung gestellt werden.

6. Zusammenfassung

Die Untersuchung der Resorption von Benzoesäure an tierischer Haut unter *in vitro* Bedingungen wurde bisher lediglich mit zellfreien Flüssigkeiten durchgeführt [Franz, 1975; Schaper, 2003]. Die Methode der isoliert hämoperfundenen Schweineextremität erlaubt eine Perfusion mit autologem, körperwarmem und oxygeniertem Vollblut. Um möglichst *in vivo* nahe Verhältnisse zu schaffen, findet während der Perfusion eine kontinuierliche Dialyse und damit eine permanente Korrektur des Perfusionsblutes in Bezug auf Elektrolyte, Metaboliten und Säure-Base-Status statt.

In vier Vorversuchen konnte das Modell der isoliert hämoperfundenen Schweineextremität überprüft werden. Eine hohe Hämolyserate gemessen an freiem Hämoglobin und der Kaliumkonzentration im Perfusat konnte in den Hauptversuchen durch eine Optimierung der Rollenpumpeinstellungen auf 41 mg/dl freies Hämoglobin und 5,25 mmol/l Kalium verringert werden (Medianwerte zum Versuchszeitpunkt 210. Minute). Die Stoffwechsellage des Modells wurde durch den Sauerstoff- und Glucoseverbrauch sowie der Lactatkonzentration im Perfusat charakterisiert. Bezüglich des Sauerstoffverbrauchs konnte während der Versuche ein Anstieg der Medianwerte von 5,71 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$ (Versuchsbeginn) auf 7,94 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$ (120. Minute) verzeichnet werden. Gegen Versuchsende nimmt der Sauerstoffverbrauch wieder ab, 5,99 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$ und liegt somit unterhalb des in der Literatur für reine Muskelpräparate angegebenen Wertes 15–25 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$. Der Glucoseverbrauch steigt während der Versuche von 522,1 $\mu\text{g}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$ (Versuchsbeginn) auf 769,7 $\mu\text{g}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$ (150. Minute) an und bleibt während der gesamten Perfusion über den in der Literatur angegebenen Wert von $> 250\text{ }\mu\text{g}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$. Die Lactatkonzentration im venösen Perfusat steigt lediglich von 39,2 mg/dl auf 48,9 mg/dl an. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die Sauerstoffversorgung der Extremitäten bei einem Perfusionsfluss von 4,41 $\text{ml}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$ ausreicht und Glucose aerob verstoffwechselt wird. Auch hinsichtlich der prozentualen Gewichtszunahme der Extremität im Versuchsverlauf, als Maß für die Ödematisierung des Gewebes, bewegen sich die Gewichtszunahmen aller Beine bei dem Perfusionsfluss von 4,41 $\text{ml}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$ innerhalb des in der Literatur als tolerierbar angegebenen Bereiches von maximal 10 %.

In 8 Hauptversuchen konnte bei einem Perfusionsfluss von 4,41 $\text{ml}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$ und bei einer Applikation von 40 mg Benzoesäure auf eine 100 cm^2 große Hautfläche eine Resorption von 10,28 mg Benzoesäure, das entspricht 25,7 % der applizierten Dosis, gemessen werden. Es liegt nahe, diese hohe Resorptionsrate mit der hohen Qualität des Perfusionssystems und mit der großen Transportkapazität des Blutes als Perfusat in Zusammenhang zu bringen. Im

Hinblick auf die Entwicklung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch konnte mit der vorliegenden Arbeit die Eignung der isoliert hämoperfundierten Schweineextremität als Modell für Resorptionsstudien an der Haut aufgezeigt werden.

7. Summary

Analysis of percutaneous absorption of benzoic acid at the isolated hemoperfused porcine foreleg.

Until now, transdermal absorption of benzoic acid under *in vitro* conditions has been investigated using cell-free liquids [Franz, 1975; Schaper, 2003]. The method of the isolated hemoperfused porcine foreleg allows perfusion with autologous, tempered and oxygenated whole blood. A continuous dialysis permits a permanent correction of the perfusion blood concerning electrolytes, metabolites and acid-base state to get working conditions close to the *in vivo* situation.

In four preliminary tests, the method of the isolated hemoperfused porcine foreleg was optimised with respect to viability and integrity of the organ.

Due to these preliminary studies, the rate of hemolysis could be reduced in the main tests by adjustment of the perfusion system. This was indicated by the concentrations of free hemoglobine (41 mg/dl) and potassium (5.25 mmol/l) in the perfusion blood (mean values at 210.th minute of testing).

The metabolic status of the model was characterised by the consumption of oxygen and glucose as well as the lactate levels. Concerning the oxygene consumption, an increase of the mean values from 5.71 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$ (beginning of the tests) to 7.94 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$ (120.th minute) could be observed during the experiments. At the end of the perfusion period, the oxygene consumption decreased to 5.99 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$ which is beneath the values of pure muscle preparations (15-25 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$) known from the literature. The glucose consumption increased from 522.1 $\mu\text{g}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$ (beginning of the tests) to 769.7 $\mu\text{g}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$ (150.th minute) and therefore stayed at higher levels than expected from the literature values ($>250\text{ }\mu\text{g}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$) during the whole perfusion period. The lactate levels in the venous perfusion blood increased from 39.2 mg/dl to only 48.9 mg/dl. From these results it can be concluded that using a perfusion flow of 4.41 $\text{ml}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$, the oxygene supply is sufficient to ensure aerobic metabolism of glucose.

To estimate the degree of oedematisation of the tissue, the relative increase of weight of the limb was determined. Under optimised conditions, his increase was in a range of maximal 10 % which is accepted to be tolerable.

Using a perfusion flow of 4.41 $\text{ml}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$, 40 mg of benzoic acid were applicated on an area of 100 cm^2 skin. A resorption of 10.28 mg benzoic acid which means 25.7% of the applicated dosage could be measured. This high rate of absorption is probably due to the quality of the perfusion system and the enormous transport capacity of the blood as

perfusate. Therefore, the isolated hemoperfused porcine foreleg can be considered as a suitable model to replace animal experiments in investigations to study transdermal absorption.

8. Literaturverzeichnis

BANKS, W. J. (1993)

Integumentary System.

in: "Applied Veterinary Histologie". W. J. BANKS

3. Aufl., Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, Missouri, 298-311

BARTEK, M. J., J. A. LaBUDDE, H. I. MAIBACH (1972)

Skin permeability in vivo: comparison in rat, rabbit, pig and man.

J Invest Dermatol 58, 114-123

BARTLETT R. H., A. B. GAZZANGIA (1981)

Physiology and Pathophysiology of Extracorporeal Circulation.

in: "Techniques In Extracorporeal Circulation" M. I. IONESCU

©Butterworth & Co (Publishers)

BICKHARDT, K. (1992)

Kompendium der Allgemeinen Inneren Medizin und Pathophysiologie für Tierärzte.

Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg, 193-196

BOCK, K. W., U. KLOTZ (2000)

Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie.

in: "Pharmakologie und Toxikologie". C.-J. ESTLER

5. Aufl., Schattauer Verlagsgesellschaft mbH

BOSCO, P. J., R. T. SCHWEIZER (1988)

Use of oxygen radikal scavengers on autografted pig kidneys after warm ischemia and 48-hour perfusion preservation.

Arch Surg 123, 601-604

BOSSE, K. (1963)

Comparative dermatology of man and animal. I. The posing of the problem and biological presupposition.

Hautarzt 14, 70-75

BOSSE, K. (1965)

Prospects for comparative dermatology.

in: "Comparative physiologie and pathology of the skin". A. J. ROOK, G. S. WALTON

Verlag Blackwell, Oxford, 3-14

BRONAUGH, R. L., R. F. STEWART (1985)

Methods for in vitro percutaneous absorption studies IV: The flow-through diffusion cell.

J Pharm Sci 74, 64-67

BRONAUGH, R. L., R. F. STEWART, E. R. CONGDON, A. L. GILES, JR. (1982)

Methods for in Vitro Percutaneous Absorption Studies. I. Comparison with in Vivo Results.

Toxicol Appl Pharmacol 62, 474-480

BROOK, N. R., A. J. KNIGHT, M. L. NICHOLSON (2003)

Intra-renal resistance reflects warm ischaemic damage, and is further increased by static cold storage: a model of non-heart-beating donor kidneys.

Med Sci Monit 9, 271-275

BUECHERL, E. S., (1995)

Künstliche Organe.

Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt

CROSS, S. E., Z. WU, M. S. ROBERTS (1994)

Effect of Perfusion Flow Rate on the Tissue Uptake of Solutes After Dermal Application Using the Rat Isolated Perfused Hindlimp Preparation.

J Pharm Pharmacol 46, 844-850

DE LANGE, J., P. VAN ECK, G. R. ELLIOTT, W. L. A. M. DE KORT, O.L. WOLTHUIS (1992)

The Isolated Blood-Perfused Pig Ear: An Inexpensive and Animal-Saving Model for Skin Penetration Studies.

J Pharmacol Toxicol Methods 27, 71-77

DITTRICH S., A. SCHUTH, H. AURICH, J. VON LOEPER, C. GROSSE-SIESTRUP, P. E. LANGE (2000)

Haemodilution improves organ function during normothermic cardiopulmonary bypass: investigations in isolated perfused pig kidneys.

Perfusion 15, 225-229

DITTRICH S., F. LIPPEK, A. GRATOPP, C. GROSSE-SIESTRUP, P. E. LANGE,
C. BUEHREN (2002)

Intravascular granulocyte aggregates caused by the selectin-binding carbohydrate fucoidin
in pig kidneys.

Clin Exp Pharmacol Physiol 29, 909-914

ENGELHARDT v., W., G. BREVES (2000)

Physiologie der Haustiere.

© Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart, 259-260

ENGELHARDT v., W., G. BREVES (2005)

Physiologie der Haustiere.

© Enke Verlag in Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, 207-213

EKERDT, R., S. BRUNNEMANN, C. MULLER (1985)

The Vascular Perfused Rabbit Ear As a Model to Study Percutaneous Absorption of
Topically Applied Drugs.

J Invest Dermatol 84, 445-446

FELDMANN, R. J., H. I. MAIBACH (1970)

Absorption of some organic compounds through the skin in man.

J Invest Dermatol 54, 399-404

FRANZ, T. J. (1975)

Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data.

J Invest Dermatol 64, 190-195

FRIEDMAN, J. J. (1966)

Total, non-nutritional, and nutritional blood volume in isolated dog hindlimb.

Am J Physiol 210, 151-156

GASBARRINI, A., A. B. BORLE, H. FARGHALI, C. BENDER, A. FRANCAVILLA,
D. VAN THIEL (1992)

Effect of anoxia on intracellular ATP, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ and cytotoxicity in rat hepatocytes.

J Biol Chem 267, 6654-6663

GODT, J. (2007)

Analysis of occupational and environmental toxin resorption in the model of the isolated, hemoperfused porcine limb.

Med. Diss. Berlin, Universitätsmedizin Berlin

GRANGER, D. N. (1988)

Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury.

Am J Physiol 255 (6 Pt 2), 1269-1275

GROSSE-SIESTRUP, C., P. M. WIEMER, T. C. FISCHER, C. FEHRENBURG, V. UNGER, A. FISCHER, D. A. GRONEBERG (2002)

Isolated Hemoperfused Porcine Skin as a Valid Model to Assess Percutaneous Absorption.

Invest Dermatol 119, 197-199

GROSSE-SIESTRUP, C., C. FEHRENBURG, H. VON BAEYER, D. A. GRONEBERG (2002)

Multiple-organ Harvesting for Models of Isolated Hemoperfused Organs of Slaughtered Pigs.

Altex 19, 9-13

GUY, R. H. UND J. HADGRAFT (1984)

Prediction of Drug Disposition Kinetics in Skin and Plasma Following Topical Administration.

J Pharm Sci 73, 883-887

HABERMEHL, K.-H., (1996)

Haut und Hautorgane.

in: "Lehrbuch der Anatomie der Haustiere" R. NICKEL, A. SCHUMMER, E. SEIFERLE

Bd. 3, 3. Aufl., Parey Buchverlag Berlin, 443-576

HARA, T., T. NISHIKAWA, H. SUI, K. KAWAKAMI, H. MATSUMOTO, N. TANAKA (2007)

In vivo photochemical skin micronucleus test using a sunlight simulator: Detection of 8-methoxypsoralen and benzo[a]pyrene in hairless mice.

Mutat Res 631, 1-8

HEILMANN, K. (1984)

Therapeutische Systeme: Konzept und Realisation programmierter Arzneiverabreichung.

4. Aufl., Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 48-53

HEINRICH, W., P. M. LANGE, T. STIRTZ, C. IANCU, E. HEIDEMANN (1971)

Isolation and characterization of the large cyanogen bromide peptides from the α 1- and α 2-chains of pig skin collagen.

FEBS Lett 16, 63-67

HESS, M. L., N. H. MANSON (1984)

Molecular oxygen : friend or foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury.

J Mol Cell Cardiol 16, 969 - 985

HIERNICKEL, H. (1985)

An improved method for in vitro perfusion of human skin.

Br J Dermatol 112, 299-305

HOECHEL, J., D. LEHMANN, C. FEHRENBURG, V. UNGER, D. A. GRONEBERG,
C. GROSSE-SIESTRUP (2003)

Effects of different perfusates on functional parameters of isolated perfused dog kidneys.

Nephrol Dial Transplant 18, 1748-1754

HUNZIKER, N., R. J. FELDMANN, H. MAIBACH (1978)

Animals Models of Percutaneous Penetration: Comparison between Mexican Hairless Dogs and Man.

Dermatologica 156, 79-88

ISSELHARD, W. (1986)

Organkonservierung: Grundlagen, Entwicklungen, Perspektiven.

in: "Stand und Gegenstand chirurgischer Forschung". F. W. EIGLER, H. J. PEIPER

Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 171-187

KANEKO J. J., J. H. HARVEY, M. L. BRUSS (1997)

Clinical Biochemistry of Domestic Animals.

5. Aufl., Academic Press, San Diego, California, USA, 890-893

KERRIGAN, C. L., R. G. ZELT, J. G. THOMSON, E. DIANO (1986)

The Pig as an Experimental Animal in Plastic Surgery Research for the Study of Skin Flaps, Myocutaneous Flaps and Fasciocutaneous Flaps.

Lab Anim Sci 36, 408-412

KIETZMANN, M., W. LÖSCHER (1993)

The use of the organs of slaughtered animals for the testing of drugs: suitability of the bovine udder for the study of substances active through the skin.

Dtsch tierärztl Wschr 100, 54-57

KIETZMANN, M., W. LÖSCHER, D. ARENS, P. MAASS, D. LUBACH (1993)

The isolated perfused bovine udder as an in vitro model of percutaneous drug absorption. Skin viability and percutaneous absorption of dexamethasone, benzoyl peroxide and etofenamate.

J Pharmacol Toxicol Methods 30, 75-84

KJAERGAARD, A. R. (1954)

Perfusion of isolated dog skin.

J Invest Dermatol 22, 135-141

KLOEVEKORN, W. P. (1990)

Myocardial oxygen supply in hemodilution in patients with healthy hearts and heart surgery Patients.

Infusionstherapie 17 (Suppl 2), 24-27

KNIGHT, A. J., E. A. O'LEARY, M. L. NICHOLSON (2001)

Cold ischaemia further increases intrarenal resistance when non-heart-beating kidneys are pulsatile machine perfused.

Transplant Proc 33, 893-894

KRAFT, W., U. M. DÜRR (1999)

Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin.

5. Aufl., Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 165, 344-363

KUROKAWA T., H. TAKAGI (1999)

Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion injury.

Transplant Proc 31, 1775-1776

LEONARD, E.F., C. VAN VOOREN, D. HAUGLUSTAINE, S. HAUMONT (1983)

Shear-induced formation of aggregates during hemodialysis.

Contrib Nephrol 36, 34-45

LEONHARDT, H. (1990)

Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen.

Bd. 3, 8. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York

LIEBICH, H.-G., (2003)

Allgemeine Körperdecke (Integumentum commune)

in: „Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis“.

4. Aufl., Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 311-330

MC CORD, J.M. (1985)

Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury.

N Engl J Med 312, 159-163

MC CORD, J. M., R. S. ROY, S. W. SCHAFFER (1985)

Free radicals and myocardial ischemia. The role of xanthine oxidase.

Adv Myocardiol 5, 183-189

MENGER, M. D., D. STEINER, K. MESSMER (1992)

Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of „no reflow“.

Am J Physiol 263 (6 Pt 2), 1892-1900

MEYER, W. (1986)

Die Haut des Schweines. Vergleichende histologische und histochemische Untersuchungen an der Haut von Wildschweinen, Hausschweinen und Kleinschweinen.

Bd. 9, Archiv für tierärztliche Fortbildung.

Schlütersche Verlagsanstalt und Druckerei GmbH & Co., Hannover

MEYER, W. (1996)

Comments on the suitability of swine skin as a biological model for human skin.

Hautarzt 47, 178-182

MEYER, W., K. NEURAND, R. SCHWARZ (1978c)

Die Haut der Haussäugetiere (2). Ihre Bedeutung für die dermatologische Forschung.
Hinweise zur speziellen Funktion einzelner Hautanteile.

Tierärztl Prax 6, 289-298

MEYER, W., K. NEURAND, R. SCHWARZ (1978d)

Significance of the apocrine skin glands in the general body surface of various domestic mammals.

Dtsch tierärztl Wochenschr 85, 194-197

MEYER, W., R. SCHWARZ, K. NEURAND (1978a)

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

MEYER, W., R. SCHWARZ, K. NEURAND (1978b)

Die Haut der Haussäugetiere (1). Ihre Bedeutung für die dermatologische Forschung.
Grundzüge der vergleichenden Morphologie.

Tierärztl Prax 6, 153-162

MILITZER, K. (1982)

Haut und Hautanhangsorgane kleiner Laboratoriumstiere. Teil 1

Bd. 9 Schriftenreihe Versuchstierkunde

Parey Verlag, Berlin, Hamburg

MODERSOHN, D., S EDDICKS, C. GROSSE-SIESTRUP, I. AST, S. HOLINSKI,
W. KONERTZ (2001)

Isolated hemoperfused heart model of slaughterhouse pigs.

Int J Artif Organs 24, 215-221

MOEN, O., F. E. BRATEN, C. ANDERSSON, M. K. FAGERHOL, P. VENGE (1994)

Roller and centrifugal pumps compared in vitro with regard to hemolysis, granulocyte and complement activation.

Perfusion 9, 109-117

MOLL, S., P. DE MOERLOOSE, G: REBER, J. SCHIFFERLI, M. LESKI (1990)

Comparison of two hemodialysis membranes, polyacrylonitrile and cellulose acetate, on complement and coagulation systems.

Int J Artif Organs 13, 273-279

MORA, C. T. (1995)

Cardio-Pulmonary Bypass.

Principles And Techniques Of Extracorporeal Circulation.

Springer Verlag

MUELLER, C., W. ISSELHARD, J. STURZ, A. WAHLE, H. WITMANOWSKI, S. SAAD (1989)

Pressure-Controlled Reperfusion Improves Postischemic Recovery of

LV-Hypertrophied Rat Hearts.

Angiology 40, 574-579

MUTSCHLER, E., G. GEISLINGEN, H. K. KROEMER, M. SCHÄFER-KORTING (2001)

Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.

8. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

NETZLAFF, F., U. F. SCHAEFER, C. M. LEHR, P. MEIERS, J. STAHL, M. KIETZMANN,

F. NIEDORF (2006)

Comparison of bovine udder skin with human and porcine skin in percutaneous permeation experiments.

Altern Lab Anim 34, 499-513

NEURAND, K., W. MEYER, (1987)

Die Säugerhaut – Barriere oder Eintrittspforte?

Effem – Forschung für Kleintiernahrung, Report Nr. 24, 26-36

NOGUEIRA, A. C., S. WAGNER, I. RIEBELING, S. KLUG (1999)

The isolated normothermic hemoperfused porcine leg as model for pharmacological and toxicological investigations.

Altex 16, 90-94

OMOKAWA S., P. S. MALCHESKY, M. YAMASHITA, T. SUZUKI, J. G. GOLDKAMP,
S. MURABAYASHI, Y. NOSÈ (1990)

Effect of anticoagulant on biocompatibility in membrane plasmapheresis.

Int J Artif Organs 13, 768-777

PITTERMANN, W. M. KIETZMANN (2006)

Bovine Udder Skin (BUS): testing of skin compatibility and skin protection.

Altex 23, 65-71

PITTERMANN W., M. KIETZMANN, B. JACKWERTH (1995)

The isolated perfused Bovine Udder Skin.

Altex 12, 196-200

POPESKO, P. (1993)

Atlas der topographischen Anatomie der Haustiere.

Band III: Becken und Gliedmaßen.

4. Aufl., Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 103

REIMOLD, E. W., M. HEINRICHS (1971)

Relation of potassium and hemoglobin in the course of osmotic hemolysis.

Z Kinderheilkunde 109, 176-186

REINHARDT, C. A. (1992)

Toxizitätsprüfung mittels Zellkulturen: Grenzen, Möglichkeiten und Perspektiven.

in: "Möglichkeiten und Grenzen der Reduktion von Tierversuchen". H. SCHOEFFL,

H. SPIEL-MANN, H. A. TRITTHART

Springer-Verlag Wien New York, 28-35

RHEINWALD, J. G., H. GREEN (1975)

Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells.

Cell 6, 331-343

RIEDEL, S. (2003)

Vergleichende Untersuchungen zur dermalen Penetration und Permeation in Diffusionszellen.

Med. Vet. Diss. Hannover, Tierärztliche Hochschule

RISCHBIETER, W. (1913)

Das isolierte Kaninchenohr als überlebendes Gefäßpräparat (nach Krawkow-Bissemski), zur Prüfung von Gefäßmitteln, speziell Adrenalin und Hypophysin.

Zeitschr. ges. exp. Med. 1, 355-368

RIVIERE, J. E., K. F. BOWMAN, N. A. MONTEIRO-RIVIERE, L. P. DIX, P. CARVER (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

SCHÄFER-KORTING (1996)

Nutzen und Grenzen künstlicher Hautmodelle aus der Sicht der Dermatopharmakologie.

in: "Forschung ohne Tierversuche 1996". H. SCHÖFFL, H. SPIELMANN, H. A. TRITTHART
Springer-Verlag Wien New York, 305-313

SCHÄFER-KORTING M., U. BOCK, A. GAMER, A. HABERLAND, M. CACA (2006)

Reconstructed human epidermis for skin absorption testing: results of the German prevalidation study.

Altern Lab Anim 34, 283-294

SCHAPER, E. (2003)

Untersuchung der perkutanen Resorption von Benzoesäure, Hydrocortison und Testosteron am isoliert perfundierten Rindereuter.

Med. Vet. Diss. Hannover, Tierärztliche Hochschule

SCHMIDL, M. (1985)

Veterinärmedizinische Laboruntersuchungen für die Diagnose und Verlaufskontrolle.

3. Aufl., Boehringer Mannheim GmbH, 99-104

SCHMIDT, R. F., G. THEWS, F. LANG (2000)

Physiologie des Menschen.

28. Aufl., Springer-Verlag Berlin, 624-632

SEUBERT, S., A. SEUBERT, H. IPPEN (1984)

Penetration of benzoyl peroxide in the skin.

Der Hautarzt 35, 455-458

SIEGENTHALER, W. (1994)

Klinische Pathophysiologie.

7. Aufl. Thieme Verlag Stuttgart, 193-196

SLACK, S. M, V. T. TURITTO (1993)

“Fluid dynamic and hemorheologic considerations.”

Cardiovasc Pathol 2 Suppl., 11-21

SMITH, A. C., W. J. EHLER, M. SWIDLE (1997)

Anesthesia and Analgesia in Swine.

in: “Anesthesia and analgesia in laboratory animals” D. F. KOHN, S. K. WIXSON,

W. J. WHITE, G. JOHN BENSON

Academic Press, 313-336

STARKE, K., I. FREIBURG (2001)

Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie.

in: “Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie“. W. FORTH, D. HENSCHLER

8. Aufl., Urban & Fischer Verlag München, 1-110

STÜTTGEN, G., H. SCHAEFER (1974)

Funktionelle Dermatologie. Grundlagen der Morphokinetik, Pathophysiologie,

Pharmakoanalyse und Therapie von Dermatosen.

Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 353-376

STÜTTGEN, G., U. TÄUBER, E. BAUER, A. ZESCH (1986)

Local and transcutaneous pharmakotherapy.

Pharmacokinetic principles and clinical evaluation.

Der Hautarzt 37, 65-76

THEWES, S., H. K. REED, C. GROSSE-SIESTRUP, D. A. GRONEBERG, M. MEISSLER,

M. SCHALLER, B. HUBE (2007)

Haemoperfused liver as an ex vivo model for organ invasion of *Candida albicans*.

J Med Microbiol. 56, 266-70

THIELSCHER, H. H. (1985)

Oxygen supply and lactate utilization in the porcine heart.

Berl Münch Tierärztl Wschr 98, 54-57

TRAMPISCH, H. J., J. WINDELER (1997)

Medizinische Statistik.

© Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 59-60

TURK, J. R., S. W. CASTEEL (1997)

Clinical Biochemistry in Toxicology, III. Toxins Affecting Skeletal And Cardiac Muscle
in: "Clinical Biochemistry of Domestic Animals". J. J. KANEKO, J. W. HARVEY, M. L. BRUSS
5. Aufl., Academic Press, San Diego, California, USA, 829-843

UNGER, V., C. GROSSE-SIESTRUP, D. A. GRONEBERG (2006)

Evaluation of renal functional parameters in different settings of
isolated organ hemoperfusions.

Physiol Meas. 27, 1167-75

UNGER, V., C. GROSSE-SIESTRUP, C. FEHRENBURG, A. FISCHER,
M. MEISSLER, D.A.GRONNEBERG (2007)

Reference values and physiological characterization of a specific isolated
pig kidney perfusion model.

J Occup Med Toxicol. 29;2:1.

VAN DER HOEVEN, J. G., A. KILIC, P. VOGEL, D. A. LOUDOVICI,
C. GROSSE-SIESTRUP, K. AFFELD (1998)

Comparative studies of hemolysis in blood pumps of various designs.

Biomed Tech (Berl). 43 Suppl., 332-334

VON BAEYER, H., K. STAHL, M. HAEUSLER, M. MEISSLER, V. UNGER, J. FRANK,
C. GROSSE-SIESTRUP, G. KACZMARCZYK, K. AFFELD, H.-J. FLAIG, B. STEINBACH
(1997)

A New Method for ex vivo Whole-blood Perfusion of Isolated Organs of Large Mammals
Demonstrated in Pig Kidneys.

Biomedizinische Technik 42, 61-68

WAGNER, S. M., A. C. NOGUEIRA, M. PAUL, D. HEYDECK, S. KLUG, B. CHRIST (2003)

The isolated normothermic hemoperfused porcine forelimb as a test system for transdermal
absorption studies.

J Artif Organs 6, 183-191

WALDMANN, K.-H., WENDT, M. (2004)

Lehrbuch der Schweinekrankheiten.

4. Aufl., Parey Verlag·Stuttgart, 172-176

WEYERSTAHL, T. (1990)

Allgemeine und spezielle Histologie. Haut und Hautanhang.

4. Aufl., Jungjohann Verlagsgesellschaft mbH, Neckarsulm·Stuttgart, 55-59

YARBOROUGH, K. A., L. F. MOCKROS, F. J. LEWIS (1966)

Hydrodynamic hemolysis in extracorporeal machines.

J Thoracic Cardiovas Surg 52, 550-557

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|-------------------------------------|
| Abb. | Abbildung |
| art. | arteriell |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| C | Concentration |
| CaCl ₂ | Calciumchlorid |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| D | Menge des Dialysates in Milliliter |
| E 210 | E-Nummer 210 |
| EEC | European Economic Community |
| EU | Europäische Union |
| f | folgende (Seite) |
| g | Gramm |
| GCP | Good Clinical Practice |
| Hb | Hämoglobin |
| HPLC | High liquid pressure chromatography |
| IE | Internationale Einheit |
| i. m. | intramuskulär |
| l | Liter |
| Kap. | Kapitel |
| KCl | Kaliumchlorid |
| KG | Körpergewicht |
| LDH | Lactat-Dehydrogenase |
| M _D | Menge Benzoessäure (µg) im Dialysat |
| M _P | Menge Benzoessäure (µg) im Perfusat |
| mg | Milligramm |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mmHg | Millimeter Quecksilber |

| | |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| mmol | Millimol |
| n | Anzahl |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaHCO ₃ | Natriumhydrogencarbonat |
| NaH ₂ PO ₄ | Natriumdihydrogenphosphat |
| nm | Nanometer |
| O ₂ | Sauerstoff |
| P | Menge des Perfusates in Milliliter |
| p | Druck |
| PVC | Polyvinylchlorid |
| PH.EUR.4.00 | Europäisches Arzneibuch 4. Ausgabe |
| S. | Seite |
| Std. | Stunde |
| Tab. | Tabelle |
| TTS | Transdermale therapeutische Systeme |
| u. a. | unter anderem |
| U/min | Umdrehung pro Minute |
| U/l | Unit pro Liter |
| V | Versuch |
| ven. | venös |
| vgl. | vergleiche |
| VK | Variationskoeffizient |

9.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Schematische Darstellung der Bezeichnungen, die den Durchtritt von Substanzen in bzw. durch die Haut beschreiben.[Süttgen und Schäfer, 1974]
- Abb. 2:** Diffusionszelle, so genannte "Franz-Kammer" [Franz, 1975]
- Abb. 3:** Modell des isoliert durchströmten Kaninchenohrs. [Rischbieter, 1913]
- Abb. 4:** Isoliert perfundiertes Rindereuter. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus [Kietzmann und Löscher, 1993]
- Abb. 5:** Strukturformel der Benzoesäure
- Abb. 6:** Therapeutisches System zur transdermalen Arzneistoffapplikation. [aus Starke und Freiburg, 2001]
- Abb. 7:** Kompartimentmodell [nach Guy und Hadgraft, 1984]
- Abb. 8:** Schweinextremität mit Applikationsfläche der Prüfsubstanz. Präparation der Schulter und des Oberarmes, Ansicht von medial 2. Schicht [aus Popesko, 1993]
- Abb. 9:** Schema der *in vitro* Vollblut-Perfusion einer isolierten Schweineextremität.
- Abb. 10:** Box-and-Whisker Plot
- Abb. 11:** Über einen Perfusionszeitraum von 210 Minuten wurden 10,28 mg Benzoesäure resorbiert. Das entspricht 25,7 % der applizierten Dosis (Angabe der Medianwerte aus 8 Einzelversuchen; n=8).
- Abb. 12:** Benzoesäuremenge im Perfusat mit Signifikanzen
- Abb. 13:** Benzoesäuremenge im Dialysat mit Signifikanzen
- Abb. 14:** Mittlerer arterieller Perfusionsdruck (mmHg)
- Abb. 15:** Arterieller Perfusionsfluss (ml/min*100 g)
- Abb. 16:** Organwiderstand (mmHg*min*100 g/ml)
- Abb. 17:** Arterieller Hämoglobingehalt (g/dl)
- Abb. 18:** Freies Hämoglobin im arteriellen Perfusat in mg/dl
- Abb. 19:** Arterielle Lactat-Dehydrogenase (U/l)
- Abb. 20:** Arterielle Kaliumkonzentration (mmol/l)
- Abb. 21:** Arterielle Natriumkonzentration (mmol/l)

Abb. 22: Sauerstoffverbrauch der Extremitäten in $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot 100 \text{ g}$

Abb. 23: Glucoseverbrauch der Extremitäten in $\mu\text{g}/\text{min} \cdot 100 \text{ g}$

Abb. 24: Lactatkonzentration im venösen Perfusat in mg/dl

Abb. 25: Arterieller pH-Wert

Abb. 26: Während einer Versuchsdauer von 210 Minuten sind 10,28 mg Benzoesäure an der isoliert hämoperfunden Schweineextremität resorbiert worden. Das entspricht 25,7% der applizierten Dosis. (7,2 % der applizierten Dosis pro Stunde; Angabe der Medianwerte aus 8 Einzelversuchen)

Abb. 27: Während einer Versuchsdauer von 240 Minuten sind am isoliert perfunden Rindereuter 0,87 mg Benzoesäure resorbiert worden. Das entspricht 2,2 % der applizierten Dosis (Angabe der Medianwerte aus 8 Einzelversuchen.)
[Schaper,2003].

9.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: *In vitro* Hautmodelle

Tab. 2: *In vitro* und *in vivo* Hautmodelle mit Benzoesäure als Testsubstanz

Tab. 3: Zusammensetzung der Dialysatflüssigkeit

Tab. 4: Ausgewählte Parameter, ihre Referenzwerte mit Literaturangabe und Bestimmungsmethoden.

Tab. 5: Organgewichte der isolierten Schweineextremitäten vor und nach der Perfusion der acht Hauptversuche

Tab. 6: Berechnung der resorbierten Benzoesäuremenge in μg im Perfusat über einen Perfusionszeitraum von 3,5 Stunden.
Der Wert ergibt sich aus der Formel: $M_P = C \times P$

Tab. 7: Benzoesäuremenge (μg) im Perfusat nach Applikation von 40 mg Benzoesäure auf 100 cm^2 Haut der isolierten Schweineextremität während einer 3,5 stündigen Perfusion.

Tab. 8: Berechnung der resorbierten Benzoesäuremenge in μg im Dialysat über einen Perfusionszeitraum von 3,5 Stunden.
Der Wert ergibt sich aus der Formel: $M_D = C \times D$

Tab. 9: Benzoesäuremenge (μg) im Dialysat nach Applikation von 40 mg Benzoesäure auf 100 cm^2 Haut der isolierten Schweineextremität während einer 3,5 stündigen Perfusion.

9.4 Ergebnistabellen

Tab. 6: Berechnung der resorbierten Benzoesäuremenge in μg im Perfusat über einen Perfusionszeitraum von 3,5 Stunden. Der Wert ergibt sich aus der Formel: $M_P = C \times P$

| Versuch | Minuten | C: Benzoesäure- konzentration ($\mu\text{g/ml}$) | P: Perfusatvolumen (ml) | M_P : Benzoesäuremenge (μg) im Perfusat |
|---------|---------|---|-------------------------------|--|
| 1 | 30 | 1,01 | 550 | 555,5 |
| 1 | 60 | 0,94 | 550 | 517 |
| 1 | 90 | 1,68 | 550 | 924 |
| 1 | 120 | 1,83 | 550 | 1.006,5 |
| 1 | 150 | 4,7 | 550 | 2.585 |
| 1 | 180 | 4,84 | 550 | 2.662 |
| 1 | 210 | 3,35 | 550 | 1.842,5 |
| 2 | 30 | 5,58 | 800 | 464 |
| 2 | 60 | 0,91 | 800 | 728 |
| 2 | 90 | 1,73 | 800 | 1.384 |
| 2 | 120 | 2,58 | 800 | 2.064 |
| 2 | 150 | 3,15 | 800 | 2.520 |
| 2 | 180 | 3,71 | 800 | 2.968 |
| 2 | 210 | 3,58 | 800 | 2.872 |
| 3 | 30 | 1,34 | 500 | 670 |
| 3 | 60 | 2,02 | 500 | 1.010 |
| 3 | 90 | 2,24 | 500 | 1.120 |
| 3 | 120 | 3,06 | 500 | 1.530 |
| 3 | 150 | 4,13 | 500 | 2.065 |
| 3 | 180 | 6,5 | 500 | 3.250 |
| 3 | 210 | 4,35 | 500 | 2.175 |
| 4 | 30 | 1,36 | 500 | 680 |
| 4 | 60 | 2,14 | 500 | 1.070 |
| 4 | 90 | 2,41 | 500 | 1.205 |
| 4 | 120 | 3,47 | 500 | 1.735 |
| 4 | 150 | 4,21 | 500 | 2.105 |
| 4 | 180 | 4,94 | 500 | 2.470 |
| 4 | 210 | 5,14 | 500 | 2.570 |
| 5 | 30 | 0,93 | 700 | 651 |
| 5 | 60 | 1,13 | 700 | 791 |
| 5 | 90 | 1,79 | 700 | 1.253 |
| 5 | 120 | 2,43 | 700 | 1.701 |
| 5 | 150 | 2,88 | 700 | 2.016 |
| 5 | 180 | 2,73 | 700 | 1.911 |
| 5 | 210 | 2,41 | 700 | 1.687 |
| 6 | 30 | 0,44 | 500 | 220 |
| 6 | 60 | 0,71 | 500 | 355 |
| 6 | 90 | 0,92 | 500 | 460 |
| 6 | 120 | 1,17 | 500 | 585 |
| 6 | 150 | 1,28 | 500 | 640 |
| 6 | 180 | 1,59 | 500 | 795 |
| 6 | 210 | 1,62 | 500 | 810 |

Anhang

| | | | | |
|---|-----|------|-----|---------|
| 7 | 30 | 0,8 | 550 | 440 |
| 7 | 60 | 1,06 | 550 | 583 |
| 7 | 90 | 1,48 | 550 | 814 |
| 7 | 120 | 1,8 | 550 | 990 |
| 7 | 150 | 2,01 | 550 | 1.105,5 |
| 7 | 180 | 2,14 | 550 | 1177 |
| 7 | 210 | 2,33 | 550 | 1.281,5 |
| 8 | 30 | 0,84 | 550 | 462 |
| 8 | 60 | 1,22 | 550 | 671 |
| 8 | 90 | 1,72 | 550 | 946 |
| 8 | 120 | 2,07 | 550 | 1.138,5 |
| 8 | 150 | 2,28 | 550 | 1.254 |
| 8 | 180 | 2,74 | 550 | 1.507 |
| 8 | 210 | 3,39 | 550 | 1.864,5 |

Tab. 7: Benzoesäuremenge (μg) im Perfusat nach Applikation von 40 mg Benzoesäure auf 100 cm^2 Haut der isolierten Schweineextremität während einer 3,5 stündigen Perfusion

| Versuch | 30 min | 60 min | 90 min | 120 min | 150 min | 180 min | 210 min |
|---------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | 555,5 | 517 | 924 | 1.006,5 | 2.585 | 2.662 | 1.842,5 |
| 2 | 464 | 728 | 1.384 | 2.064 | 2.520 | 2.968 | 2872 |
| 3 | 670 | 1.010 | 1.120 | 1.530 | 2.065 | 3.250 | 2.175 |
| 4 | 680 | 1.070 | 1.205 | 1.735 | 2.105 | 2.470 | 2.570 |
| 5 | 651 | 791 | 1.253 | 1.701 | 2.016 | 1.911 | 1.687 |
| 6 | 220 | 355 | 460 | 585 | 640 | 795 | 810 |
| 7 | 440 | 583 | 814 | 990 | 1.105,5 | 1.177 | 1.281,5 |
| 8 | 462 | 671 | 946 | 1.138,5 | 1.254 | 1.507 | 1.864,5 |
| Median | 509,75 | 699,5 | 1.033 | 1.334,25 | 2.040,5 | 2.190,5 | 1.853,5 |
| % | 1,274375 | 1,74875 | 2,5825 | 3,335625 | 5,10125 | 5,47625 | 4,63375 |

Tab. 8: Berechnung der resorbierten Benzoesäuremenge in μg im Dialysat über einen Perfusionszeitraum von 3,5 Stunden. Der Wert ergibt sich aus der Formel: $M_D = C \times D$

| Versuch | Minuten | C: Benzoesäure- konzentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | D: Dialysatvolumen (ml) | M_D : Benzoesäuremenge (μg) im Dialysat |
|---------|---------|--|-------------------------------|--|
| 1 | 30 | 0,27 | 4.000 | 1.080 |
| 1 | 60 | 0,29 | 4.000 | 1.160 |
| 1 | 90 | 0,58 | 4.000 | 2.320 |
| 1 | 120 | 0,7 | 4.000 | 2.800 |
| 1 | 150 | 0,98 | 4.000 | 3.920 |
| 1 | 180 | 1,67 | 4.000 | 6.680 |
| 1 | 210 | 1,19 | 4.000 | 4.760 |
| 2 | 30 | 0,17 | 4.000 | 680 |
| 2 | 60 | 0,41 | 4.000 | 1.640 |
| 2 | 90 | 0,78 | 4.000 | 3.120 |
| 2 | 120 | 1,3 | 4.000 | 5.200 |
| 2 | 150 | 1,86 | 4.000 | 7.440 |
| 2 | 180 | 2,24 | 4.000 | 8.960 |
| 2 | 210 | 2,78 | 4.000 | 11.120 |
| 3 | 30 | 0,36 | 4.000 | 1.440 |
| 3 | 60 | 0,76 | 4.000 | 3.040 |
| 3 | 90 | 1,01 | 4.000 | 4.040 |
| 3 | 120 | 1,31 | 4.000 | 5.240 |
| 3 | 150 | 1,82 | 4.000 | 7.280 |
| 3 | 180 | 2,17 | 4.000 | 8.680 |
| 3 | 210 | 2,5 | 4.000 | 10.000 |
| 4 | 30 | 0,48 | 5.000 | 2.400 |
| 4 | 60 | 0,88 | 5.000 | 4.400 |
| 4 | 90 | 1 | 5.000 | 5.000 |
| 4 | 120 | 1,5 | 5.000 | 7.500 |
| 4 | 150 | 1,83 | 5.000 | 9.150 |
| 4 | 180 | 2,19 | 5.000 | 10.950 |
| 4 | 210 | 2,47 | 5.000 | 12.350 |
| 5 | 30 | 0,31 | 5.000 | 1.550 |
| 5 | 60 | 0,77 | 5.000 | 3.850 |
| 5 | 90 | 0,81 | 5.000 | 4.050 |
| 5 | 120 | 1,14 | 5.000 | 5.700 |
| 5 | 150 | 1,24 | 5.000 | 6.200 |
| 5 | 180 | 1,5 | 5.000 | 7.500 |
| 5 | 210 | 1,82 | 5.000 | 9.100 |
| 6 | 30 | 0,3 | 5.000 | 1.500 |
| 6 | 60 | 0,33 | 5.000 | 1.650 |
| 6 | 90 | 0,75 | 5.000 | 3.750 |
| 6 | 120 | 0,72 | 5.000 | 3.600 |
| 6 | 150 | 0,85 | 5.000 | 4.250 |
| 6 | 180 | 0,97 | 5.000 | 4.850 |
| 6 | 210 | 1,12 | 5.000 | 5.600 |
| 7 | 30 | 0,32 | 5.000 | 1.600 |
| 7 | 60 | 0,44 | 5.000 | 2.200 |
| 7 | 90 | 0,63 | 5.000 | 3.150 |
| 7 | 120 | 0,74 | 5.000 | 3.700 |

| | | | | |
|---|-----|------|-------|-------|
| 7 | 150 | 0,92 | 5.000 | 4.600 |
| 7 | 180 | 1,1 | 5.000 | 5.500 |
| 7 | 210 | 1,18 | 5.000 | 5.900 |
| 8 | 30 | 0,33 | 5.000 | 1.650 |
| 8 | 60 | 0,5 | 5.000 | 2.500 |
| 8 | 90 | 0,78 | 5.000 | 3.900 |
| 8 | 120 | 0,98 | 5.000 | 4.900 |
| 8 | 150 | 1,15 | 5.000 | 5.750 |
| 8 | 180 | 1,29 | 5.000 | 6.450 |
| 8 | 210 | 1,55 | 5.000 | 7.750 |

Tab. 9: Benzoesäuremenge (μg) im Dialysat nach Applikation von 40 mg Benzoesäure auf 100 cm^2 Haut der isolierten Schweineextremität während einer 3,5 stündigen Perfusion.

| Versuch | 30 min | 60 min | 90 min | 120 min | 150 min | 180 min | 210 min |
|---------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|
| 1 | 1.080 | 1.160 | 2.320 | 2.800 | 3.920 | 6.680 | 4.760 |
| 2 | 680 | 1.640 | 3.120 | 5.200 | 7.440 | 8.960 | 11.120 |
| 3 | 1.440 | 3.040 | 4.040 | 5.240 | 7.280 | 8.680 | 10.000 |
| 4 | 2.400 | 4.400 | 5.000 | 7.500 | 9.150 | 10.950 | 12.350 |
| 5 | 1.550 | 3.850 | 4.050 | 5.700 | 6.200 | 7.500 | 9.100 |
| 6 | 1.500 | 1.650 | 3.750 | 3.600 | 4.250 | 4.850 | 5.600 |
| 7 | 1.600 | 2.200 | 3.150 | 3.700 | 4.600 | 5.500 | 5.900 |
| 8 | 1.650 | 2.500 | 3.900 | 4.900 | 5.750 | 6.450 | 7.750 |
| Median | 1.525 | 2.350 | 3.825 | 5.050 | 5.975 | 7.090 | 8.425 |
| % | 3,8125 | 5,875 | 9,5625 | 12,625 | 14,9375 | 17,725 | 21,0625 |

9.5 Formeln

1. Sauerstoffverbrauch in $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot 100\text{ g}$ Organgewicht:

$$((1,34 \cdot 10.000 \cdot (\text{art.Hb} \cdot \text{art.O2-Sättigung} - \text{art.Hb} \cdot \text{ven.O2-Sättigung})) + (0,024 \cdot 760 \cdot (\text{art.pO2-ven.pO2}))) \cdot \text{Blutfluss} \cdot 1000 / 22,4 \cdot \text{Extremitätengewicht}$$

2. Glucoseverbrauch in $\mu\text{g}/\text{min} \cdot 100\text{ g}$ Organgewicht:

$$(C_{\text{art}} - C_{\text{ven}}) \cdot \text{Art. Perfusionsfluss}$$

Danksagung

Herrn PD Dr. Christian Große-Siestrup danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas, sowie für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit in der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité Universitätsmedizin Berlin durchzuführen. Für die freundliche Aufnahme in das Perfusionsteam und für die Anleitung bei der Abfassung dieser Dissertation bedanke ich mich ebenfalls.

Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité Universitätsmedizin Berlin, insbesondere Herrn Dr. Michael Meissler, Frau Tamara Baskaeva, Frau Vildan Oyanik, den OP-Schwestern und Frau Martina Zimmermann danke ich für die angenehme Zusammenarbeit und die unermüdliche Unterstützung während der Perfusionen.

Bei Herrn Dipl.-Ing. Volker Unger, Charité Universitätsmedizin Berlin, und bei Frau Karen Krainer vom Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung der Freien Universität Berlin bedanke ich mich für die Hilfe bei der Beurteilung von Daten und deren statistischer Auswertung.

Johannes Godt, Andrea Reich, Nadine Koch, Vera Esche und Sandra Artinger sei für kollegialen, hilfreichen Informations,- Material- und Meinungsaustausch Dank gesagt.

Weiter danke ich all denen die mir bei der Anfertigung der Arbeit in irgendeiner Weise behilflich waren u.a. Maike Kandziora, Kai Lölke, Ilona Schweers für die Durchsicht dieser Arbeit, Hinnerk Frickel-Koenig und Ebba Stoffregen für den geduldigen Beistand bei Computerfragen und allen Freunden für ihr stets offenes Ohr und ihre Zuverlässigkeit.

Mein besonderer Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern, die mich zwar nicht immer verstehen mich aber immer unterstützen.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Hannover, den 29. Mai 2008

Ira Maschmann