

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob das isoliert perfundierte Rindereuter als ein *In-vitro*-Entzündungsmodell etabliert werden kann. Die Euter für die Untersuchungen stammten von gesunden laktierenden Schlachtkühen und wurden mit erwärmter, begaster Tyrodellösung perfundiert.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Haut des isoliert perfundierten Rindereuters nach Arachidonsäureapplikation, vergleichbar dem Mäuseohr, mit einem Anstieg der Eicosanoidsynthese, einer Hyperämie und einem Ödem reagiert. Zusätzlich wurde der Einfluß von Arachidonsäure auf den Histamingehalt der Haut und auf die Zellvitalität mit Hilfe des MTT-Tests untersucht.

Von den untersuchten Entzündungsparametern zeigte die Eicosanoidsynthese einen dem Mäuseohr vergleichbaren signifikanten Anstieg nach topischer Arachidonsäureapplikation. Dabei fiel auf, daß sowohl der Anstieg der Prostaglandine ( $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) als auch der der Leukotriene ( $\text{LTB}_4$ ,  $\text{LTC}_4/\text{D}_4/\text{E}_4$ ) über den gesamten Meßzeitraum von drei Stunden erhalten blieb, während es bei den Prostaglandinen im Mäuseohr innerhalb von einer Stunde zu einem deutlichen Abfall kam. Erklärbar ist dieser Effekt am Euter durch das Einbringen der Arachidonsäure in eine Salbe, die Arachidonsäure kontinuierlich an die Haut abgibt. Dieser langanhaltende Anstieg der Eicosanoidsynthese erlaubte es, den Einfluß von Antiphlogistika auf die Eicosanoidsynthese in einem Zeitraum von drei Stunden zu untersuchen.

Hyperämie und Ödem konnte nach Arachidonsäurereizung nicht festgestellt werden. Auch auf den Histamingehalt und den MTT-Umsatz in der Haut hatte topisch applizierte Arachidonsäure keinen Einfluß.

Anschließend wurde der Einfluß von steroidalen und nichtsteroidalen Antiphlogistika auf die durch Arachidonsäure induzierte Eicosanoidsynthese untersucht. Indometacin ( $1,6 \text{ mg/cm}^2$ ) und Clobetazol-17-propionat ( $90 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$ ) wurden eine Stunde vor Arachidonsäureirritation topisch auf die Euterhaut appliziert. Flunixin ( $1 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ), Meloxicam ( $3 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ) und Dexamethason ( $50 \text{ ng/ml}$ ) wurden „systemisch“ über die Perfusionsflüssigkeit verabreicht. Zur „systemischen“ Verabreichung wurden die Antiphlogistika der Perfusionsflüssigkeit zugesetzt. Die Dosierungen orientierten sich an wirksamen Plasmakonzentrationen beim Rind.

Meloxicam und Dexamethason wurden eine Stunde vor, Flunixin 30 Minuten nach Arachidonsäureapplikation verabreicht.

Die topische Applikation von Indometacin eine Stunde vor Arachidonsäureirritation führte zu einer hochsignifikanten Hemmung der Prostaglandin  $E_2$ -Synthese. Die Peptidoleukotriensynthese blieb durch Indometacin erwartetermaßen unbeeinflusst.

Die „systemische“ Applikation von Flunixin resultierte drei Stunden nach Arachidonsäureapplikation in einem signifikanten Abfall der Prostaglandin  $E_2$ -Synthese. Die Peptidoleukotriensynthese wurde nicht gehemmt.

Drei Stunden nach Arachidonsäureapplikation kam es durch Meloxicam zu einem tendenziellen Abfall der Prostaglandin  $E_2$ -Synthese.

Topisch appliziertes Clobetasol-17-propionat führte zeitabhängig zu einer tendenziellen bis schwach signifikanten Hemmung der durch Arachidonsäure induzierten Prostaglandin  $E_2$ -Synthese, während die Peptidoleukotriensynthese unbeeinflusst blieb.

Über die Perfusionsflüssigkeit verabreichtes Dexamethason hatte im Untersuchungszeitraum weder auf die Prostaglandin  $E_2$ -Synthese noch auf die Peptidoleukotriensynthese einen Einfluß.

Der dritte Teil der Arbeit befaßte sich mit der Prostaglandin  $E_2$ -Messung in der Haut von isoliert perfundierten Rindereutern mit Hilfe der Mikrodialysetechnik. Diese minimal invasive Technik lieferte vergleichbare Ergebnisse bezüglich der Prostaglandin  $E_2$ -Gehalte wie sie in homogenisierten Hautstanzen zu finden sind. Durch die kontinuierliche Messung sind kinetische Aussagen über die Prostaglandinsynthese nach Arachidonsäureapplikation möglich. Noch zwei Stunden nach Arachidonsäureapplikation kam es zu einem stetigen Anstieg der Prostaglandin  $E_2$ -Konzentration im Mikrodialysat.

Die Ergebnisse bezüglich des Eicosanoidstoffwechsels in der Haut des isoliert perfundierten Rindereuters nach Arachidonsäureapplikation und nach Gabe von nichtsteroidalen Antiphlogistika sind vergleichbar mit Ergebnissen an entzündeten Mäuseohren. Das isoliert perfundierte Rindereuter könnte daher für ein Screening vor dem Tierversuch angewendet werden. Da es nicht möglich war, ein ganzheitliches Entzündungsgeschehen auszulösen, stellt das isoliert perfundierte Rindereuter keinen Ersatz, wohl aber eine Ergänzung zum Tierversuch dar.

## 7 Summary

Wolfgang Bäumer

### Studies on inflammation in the skin of the isolated perfused bovine udder

The aim of the presented studies was to examine, whether the isolated perfused bovine udder could be used as a suitable *in-vitro*-inflammation model. Similar to a common inflammation model, the arachidonic acid-induced inflammation in mouse ears (OPAS et al. 1985; RAO et al. 1993), arachidonic acid was administered to the skin of the isolated perfused bovine udder. Following this, the change of eicosanoid synthesis and the development of an edema and hyperemia were examined. Additionally the influence of topically administered arachidonic acid on the histamine-concentration in the skin was determined and the cell-viability was measured with the methyl tetrazolium assay.

Comparable to the mouse ear model, there was a significant increase of the eicosanoid synthesis after topical administration of arachidonic acid. It was striking, that the increase of both the prostaglandins (PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>) and the leukotrienes (LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>) remained significantly high during the measured time period of three hours. The longlasting increase provides a time frame of three hours for testing the influence of antiinflammatory drugs on the eicosanoid synthesis.

Neither hyperemia nor the development of an edema were observed in the skin of the isolated perfused bovine udder after topical administration of arachidonic acid. The histamine concentration in the skin and the methyl tetrazolium assay showed no difference after arachidonic acid administration.

Following this the influence of steroidal and nonsteroidal antiphlogistic drugs on the arachidonic acid-induced eicosanoid synthesis was examined. Indomethacin (1,6 mg/cm<sup>2</sup>) and clobetasol-17-propionate (90 µg/cm<sup>2</sup>) were administered topically to the skin one hour before arachidonic acid administration. Flunixin (1 µg/ml), meloxicam (3 µg/ml) and dexamethasone (50 ng/ml) were given „systemically“ via the tyrode solution. The selected dosages are taken

from *in-vivo*-pharmacokinetic data. Meloxicam and dexamethasone were given one hour before, flunixin thirty minutes after administration of arachidonic acid.

The topical administration of indomethacin resulted in a highly significant inhibition of the arachidonic acid-induced prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis. The concentration of the peptidoleukotrienes in the skin of isolated perfused bovine udders was not influenced by indomethacin.

„Systemically“ applied flunixin resulted in a significant decrease of prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis three hours after arachidonic acid administration. The peptidoleukotriene synthesis was not inhibited. Meloxicam caused a small reduction of the prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis three hours after arachidonic acid administration. Topically administered clobetasol-17-propionate caused a weak to slight significant, time dependent inhibition of the arachidonic acid-induced prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis, whereas the peptidoleukotriene synthesis was not influenced by this glucocorticoid. Dexamethasone, which was applied via the tyrode solution, had no influence on the eicosanoid synthesis (PGE<sub>2</sub>, LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>) in the skin of isolated perfused bovine udders in the examined timeframe.

The third part of the studies deals with the measurement of the prostaglandin E<sub>2</sub> concentration in the skin of isolated perfused bovine udders after topical administration of arachidonic acid by microdialysis technique. This minimal invasive technique lead to results comparable to those for prostaglandin E<sub>2</sub> concentrations in homogenated skin samples. By continuous measuring it was possible to gain information about the kinetics of the prostaglandin concentration after topical administration of arachidonic acid: Even two hours after arachidonic acid administration there was a significant increase in the prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis.

As far as the results for the eicosanoid metabolism in the skin of isolated perfused bovine udders after topical administration of arachidonic acid and after administration of nonsteroidal antiphlogistic drugs are concerned, the results are comparable to those obtained in the mouse ear model. But it was not possible to induce an inflammation characterised by hyperemia, edema and infiltration of polymorphnuclear leukocytes.

The isolated perfused bovine udder therefore seems to be a useful screening model for testing topically and „systemically“ administered nonsteroidal antiphlogistic drugs before using an animal-model.

In conclusion the isolated perfused bovine udder is not a replacement for animal experiments, but may supplement them.