

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie  
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

---

**Untersuchung der perkutanen Resorption von  
Benzoessäure, Hydrocortison und Testosteron am  
isoliert perfundierten Rindereuter**

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Veterinärmedizin  
(Dr. med. vet.)  
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von  
**Elisabeth Schaper (geb. Buck-Wiese)**  
aus Otterndorf

Hannover 2003

Wissenschaftliche Betreuung: Univ.-Prof. Dr. M. Kietzmann

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. M. Kietzmann

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. J. Rehage

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Juni 2003

Meinen Eltern



# Inhaltsverzeichnis

<b><u>1</u></b>	<b><u>Einleitung</u></b> .....	<b>1</b>
<b><u>2</u></b>	<b><u>Literaturübersicht</u></b> .....	<b>2</b>
<u>2.1</u>	<u>Aufbau der Haut</u> .....	2
<u>2.1.1</u>	<u>Epidermis</u> .....	2
<u>2.1.2</u>	<u>Dermis</u> .....	6
<u>2.1.3</u>	<u>Hypodermis</u> .....	8
<u>2.1.4</u>	<u>Hautanhangsgebilde</u> .....	8
<u>2.1.5</u>	<u>Gefäße der Haut</u> .....	9
<u>2.1.6</u>	<u>Die Haut als Resorptionsorgan</u> .....	10
<u>2.1.6.1</u>	<u>Barrierefunktion</u> .....	10
<u>2.1.6.2</u>	<u>Reservoirfunktion</u> .....	17
<u>2.1.6.3</u>	<u>Penetration, Permeation, Resorption</u> .....	19
<u>2.1.6.4</u>	<u>Metabolisierung</u> .....	26
<u>2.1.6.5</u>	<u>Transdermales System</u> .....	28
<u>2.2</u>	<u>Pharmakokinetik lokal applizierter Stoffe</u> .....	29
<u>2.3</u>	<u>Testsubstanzen</u> .....	35
<u>2.3.1</u>	<u>Benzoessäure</u> .....	35
<u>2.3.2</u>	<u>Hydrocortison</u> .....	36
<u>2.3.3</u>	<u>Testosteron</u> .....	37
<u>2.3.4</u>	<u>Benzoessäure, Hydrocortison und Testosteron als Testsubstanzen der transdermalen Penetration</u> .....	37
<u>2.4</u>	<u>Das isoliert perfundierte Rindereuter</u> .....	39
<u>2.4.1</u>	<u>Anatomie des Rindereuters</u> .....	40
<u>2.4.2</u>	<u>Blutgefäßversorgung, Lymphsystem, Innervation</u> .....	40
<u>2.4.3</u>	<u>Untersuchungen an isoliert perfundierten Rindereutern</u> .....	43
<u>2.5</u>	<u>Mikrodialyse</u> .....	46
<b><u>3</u></b>	<b><u>Material und Methoden</u></b> .....	<b>49</b>
<u>3.1</u>	<u>Das Modell des isoliert perfundierten Rindereuters</u> .....	49
<u>3.1.1</u>	<u>Versuchsmaterial</u> .....	49
<u>3.1.2</u>	<u>Versuchsaufbau</u> .....	49
<u>3.1.2.1</u>	<u>Perfusionsapparatur</u> .....	49
<u>3.1.2.2</u>	<u>Perfusionsmedium</u> .....	51
<u>3.2</u>	<u>Verwendete Testsubstanzen</u> .....	51
<u>3.3</u>	<u>Versuchsablauf</u> .....	52
<u>3.4</u>	<u>Vitalität des isoliert perfundierten Rindereuters</u> .....	54
<u>3.4.1</u>	<u>Glukoseverbrauch</u> .....	54
<u>3.4.2</u>	<u>Laktatproduktion</u> .....	54
<u>3.4.3</u>	<u>Hauttemperatur</u> .....	55

<b><u>3.5</u></b>	<b><u>Bestimmungsmethoden der Testsubstanzen</u></b> .....	<b>55</b>
<u>3.5.1</u>	<u>Bestimmung von Benzoesäure mittels HPLC</u> .....	55
<u>3.5.2</u>	<u>Prinzip des Enzymimmunoassays</u> .....	57
<u>3.5.3</u>	<u>Aufarbeitung und Untersuchung der Perfusatproben</u> .....	57
<u>3.5.4</u>	<u>Tesafilmabrissproben</u> .....	58
<u>3.5.5</u>	<u>Hautproben</u> .....	58
<u>3.5.6</u>	<u>Mikrodialysat</u> .....	59
<b><u>3.6</u></b>	<b><u>Geräte, Lösungen, Reagenzien</u></b> .....	<b>60</b>
<b><u>3.7</u></b>	<b><u>Berechnung der resorbierten Wirkstoffmenge</u></b> .....	<b>62</b>
<b><u>3.8</u></b>	<b><u>Statistische Auswertung</u></b> .....	<b>62</b>
<b><u>4</u></b>	<b><u>Untersuchungsergebnisse</u></b> .....	<b>64</b>
<u>4.1</u>	<u>Benzoessäure</u> .....	64
<u>4.1.1</u>	<u>Benzoessäurekonzentration im Perfusat</u> .....	64
<u>4.1.2</u>	<u>Benzoessäurekonzentration in den Hautproben</u> .....	66
<u>4.1.3</u>	<u>Benzoessäurekonzentration in der Hornschicht</u> .....	68
<u>4.2</u>	<u>Hydrocortison</u> .....	70
<u>4.2.1</u>	<u>Hydrocortisonkonzentration im Perfusat</u> .....	70
<u>4.2.2</u>	<u>Hydrocortisonkonzentration in den Hautproben</u> .....	72
<u>4.2.3</u>	<u>Hydrocortisonkonzentration in der Hornschicht</u> .....	74
<u>4.3</u>	<u>Testosteron</u> .....	76
<u>4.3.1</u>	<u>Testosteronkonzentration im Perfusat</u> .....	76
<u>4.3.2</u>	<u>Testosteronkonzentration in den Hautproben</u> .....	78
<u>4.3.3</u>	<u>Testosteronkonzentration in der Hornschicht</u> .....	80
<u>4.4</u>	<u>Mikrodialyse</u> .....	82
<u>4.4.1</u>	<u>Benzoessäurekonzentration im Mikrodialysat</u> .....	82
<u>4.4.2</u>	<u>Hydrocortisonkonzentration im Mikrodialysat</u> .....	84
<u>4.4.3</u>	<u>Testosteronkonzentration im Mikrodialysat</u> .....	85
<u>4.5</u>	<u>Vergleichende Darstellung der Versuchsergebnisse</u> .....	87
<u>4.5.1</u>	<u>Perfusatproben</u> .....	87
<u>4.5.2</u>	<u>Hautproben</u> .....	88
<u>4.5.3</u>	<u>Tesafilmabrissproben</u> .....	90
<u>4.5.4</u>	<u>Mikrodialyseproben</u> .....	91
<b><u>5</u></b>	<b><u>Diskussion</u></b> .....	<b>93</b>
<b><u>6</u></b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b> .....	<b>107</b>
<b><u>7</u></b>	<b><u>Summary</u></b> .....	<b>109</b>
<b><u>8</u></b>	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b> .....	<b>111</b>
<b><u>9</u></b>	<b><u>Anhang</u></b> .....	<b>143</b>

## Verzeichnis der in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
c	Konzentration
cm	Zentimeter
et al.	et alii = und andere
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
g	Gramm
h	Stunde
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
l	Liter
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
N	Nervus
ng	Nanogramm
NWG	Nachweisgrenze
s.	siehe
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TEWL	Transepidermaler Wasserverlust
u.	und
UV	Ultraviolett
V.	Vena



## 1 Einleitung

Die Haut ist das Kontaktorgan zwischen Organismus und Umwelt. Sie ist nicht nur exogenen und endogenen Einflüssen ausgesetzt, sondern ist selbst auch an wichtigen biologischen Funktionen des Organismus beteiligt. Es ist daher von medizinischem Interesse, therapeutisch nutzbare sowie kosmetisch und toxisch wirkende Substanzen und deren Einfluss auf die Haut und den Gesamtorganismus zu untersuchen.

Diese Arbeit soll einen Beitrag zum besseren Verständnis der Haut als Barriere gegenüber exogenen Substanzen liefern. Für die Durchführung der für diese Arbeit notwendigen Untersuchungen wurde das isoliert perfundierte Rindereuter gewählt. Es handelt sich dabei um ein *In-vitro*-Modell, das sich bereits in vorhergehenden Studien zur transdermalen Penetration und Absorption bewährt hat und sich als geeigneten Ersatz zu Tierversuchen anbietet (KIETZMANN *et al.* 1993,1995; MEYER 1997).

Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe des isoliert perfundierten Rindereuters die transdermale Penetration, Permeation und Resorption der Substanzen Benzoesäure, Hydrocortison und Testosteron zu beschreiben. Bei diesen drei Wirkstoffen handelt es sich um Modellsubstanzen, die sich in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften und damit in ihrer Pharmakokinetik deutlich unterscheiden. Sie wurden daher bereits in verschiedenen Resorptionsstudien eingesetzt. Damit ist ein Vergleich der Resultate dieser Arbeit mit Ergebnissen, die man aus Untersuchungen an anderen Tierarten und an Menschen erhalten hat, möglich.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Aufbau der Haut

Die Haut bildet als allgemeine Körperdecke eine Grenz- und Kontaktschicht zur Umwelt. Die äußere Haut besteht aus drei Schichten: Oberhaut (Epidermis), Lederhaut (Dermis, Corium) und Unterhaut (Hypodermis, Subcutis, *Tela subcutanea*). Die Haut übernimmt viele Funktionen. Sie schützt den Körper vor mechanischen, thermischen und chemischen Einflüssen, verhindert das Eindringen von Krankheitserregern und bewahrt den Organismus vor zu hohem Wasserverlust. Durch eine ausgeprägte Hämodynamik und Vaskularisation wird zudem der Wärme- und Wasserhaushalt des Körpers reguliert. Ferner dient die Haut durch das Fettgewebe in der Unterhaut als Energiespeicher sowie als Sinnesorgan aufgrund vorhandener Rezeptoren und durch Einlagerung von Immunzellen als immunologische Barriere (LIEBICH 1999).

#### 2.1.1 Epidermis

Die Epidermis (Abb. 1) stellt den äußeren Anteil der Haut dar; sie besteht aus einem mehrschichtigen, an der Oberfläche verhornten Plattenepithel, dessen Dicke und Verhornungsgrad von der jeweiligen mechanischen Belastung abhängig sind. Die Epidermis ist die dünnste Schicht der Hautdecke (*Integumentum commune*). Ihre Dicke variiert beim Menschen zwischen 50 und 120  $\mu\text{m}$  (HABERMEHL 1996). ODLAND (1983) beschreibt beim Menschen Werte zwischen 75 und 150  $\mu\text{m}$ . Beim Rind schwankt die Epidermisdicke im Bereich des Euters bedingt durch die variable Ausprägung der Papillarkörper zwischen 60 bis 200  $\mu\text{m}$  (LUDEWIG *et al.* 1996).

Die verhornenden Epithelzellen sind Keratinozyten, die den Hauptzelltyp darstellen. Zwischen ihnen sind Melanozyten, Langerhans-Zellen, Merkelzellen und T-

Lymphozyten eingebettet. Die Keratinozyten sind aufgrund ihres Zytoskeletts für die mechanische Widerstandsfähigkeit der Haut verantwortlich. Die Hauptkomponenten des Zytoskeletts sind von den Keratinozyten produzierte Zytokeratine, fibrilläre Proteine, von denen ein basischer und ein saurer Subtyp paarweise vorkommen (SMOLLE 1998). Mikroskopisch sind in der Epidermis verschiedene Schichten differenzierbar, die Keratinozyten in verschiedenen Funktionszuständen enthalten und sich dadurch morphologisch unterscheiden. Es erfolgt eine Differenzierung der Keratinozyten über mehrere Zwischenstufen von jungen Basalzellen, über die Zellen des *Stratum spinosum* und des *Stratum granulosum* zu teilungsunfähigen Korneozyten (HEYMANN 1994). Der Verhornungsprozess dauert bis zum Abschilfern der Hornzellen etwa 30 Tage. Die Epidermis ist einer ständigen Erneuerung unterworfen (FRITSCH 1998).

Das ***Stratum basale***, auch *Stratum germinativum* (Keimschicht) genannt, besteht aus einer Reihe hochprismatischer Zellen. Hier finden die meisten Mitosen statt, wobei eine der beiden Tochterzellen der Mitose als Keratinozyt zur Oberfläche wandert, während die andere sich erneut teilt (LEONHARDT 1990). Ein *Feedback*-Mechanismus steuert die Teilungsrate abhängig vom Verlust der Hornzellen an der Hautoberfläche (LIEBICH 1999). Das *Stratum basale* ist mit der Basalmembran durch Hemidesmosomen verbunden. Da der lebende Anteil der Epidermis zapfenförmig in die Dermis als sogenannte Reteleisten hineinragt, ist die Fläche der Basalschicht um ein Mehrfaches größer als die Hautoberfläche (NEUBERT *et al.* 2001).

Die Zellen des ***Stratum spinosum*** sind runde oder polygonale Zellen, die am Übergang zum *Stratum granulosum* weiter abflachen. Sie sind durch stachelförmige Fortsätze über Desmosomen miteinander verbunden (Stachelzellschicht) und bilden zwei bis fünf Zellschichten. Intrazellulär verlaufen Bündel aus Intermediärfilamenten (Tonofilamente, Zytokeratinfilamente), die in die Zellfortsätze ziehen und in den Desmosomen inserieren. Funktionell setzt sich das Filamentgerüst über diese mechanischen Haftplatten auf die Nachbarzellen fort, ohne in die Zellen überzutreten. Im *Stratum spinosum* beginnt die Keratinisierung der Zellen, vereinzelt können, insbesondere nach einer Proliferationsstimulation, noch Mitosen stattfinden

(LIEBICH 1999). Für die Zellen dieser Schicht sind die sogenannten Odland-Körper (Keratinosomen, *lamellar bodies*) charakteristisch, die für die epidermale Lipidsynthese verantwortlich sind. Sie enthalten Polysaccharide, Ceramide und hydrolytische Enzyme (ELIAS 1983). In der Euterhaut des Rindes sind bis zu acht Zelllagen ausgebildet (LUDEWIG *et al.* 1996).

Das sich anschließende zwei bis drei Zelllagen dicke **Stratum granulosum** (Körnerschicht) enthält typische basophile Keratohyalin granula. Im oberen *Stratum granulosum* werden die ausgeprägten Differenzierungsvorgänge der Keratinozyten offensichtlich. Die Zellen sind abgeplattet, Zellkerne und Zellorganellen sind nicht mehr vorhanden. Es kommt zur Dehydration, zur Ausbildung einer zementartigen Lipidsubstanz im Interzellularraum und zur Bildung des „*cornified envelope*“ (stabile Membran von hoher chemischer Resistenz um keratinisierte Korneozyten) und schließlich zur Verhornung. Die Zellen werden starr und in einer streng geometrischen (*brick and mortar*) Anordnung aneinander fixiert (FRITSCH 1998). Dem *Stratum granulosum* kann sich eine weitere Schicht, das *Stratum lucidum* anschließen.

Das **Stratum lucidum** ist als eigenständige Schicht meistens nicht ausgebildet (HABERMEHL 1996). Es fehlt in der behaarten Haut und findet sich nur in spezifischen Körperregionen (SCHWARZ *et al.* 1981). Bei einigen Tierarten ist es überhaupt nicht vorhanden (TRAUTWEIN 1991). Ist das *Stratum lucidum* erkennbar, stellt es sich homogen azidophil dar, Zellkerne oder Zellgrenzen sind nicht zu erkennen. Als durchgehende Schicht wird es nur in einer hohen Epidermis sichtbar (LEONHARDT 1990). Es entsteht durch die Verflüssigung der im *Stratum granulosum* vorkommenden Keratohyalinkörnchen zu Eleidin, so dass die Schicht leuchtend und transparent erscheint (HABERMEHL 1996). In der Epidermis der Euterhaut ist das *Stratum lucidum* nicht ausgebildet (LUDEWIG *et al.* 1996).

Das **Stratum corneum** besteht aus 10 bis 20 Zelllagen abgestorbener keratinisierter Korneozyten und lässt sich in das *Stratum corneum conjunctum* und das *Stratum corneum disjunctum* aufteilen. Das tiefer liegende *Stratum corneum conjunctum* ist eine schmale Zone, die flache, verhornte, kernlose Zellen zu einer kompakten zusammenhängenden Schicht vereint. Der Zusammenhalt der Hornzellen erfolgt

über Zellkontakte (Desmosomen) und insbesondere über den Interzellularkitt. Durch eine enzymatisch induzierte Lockerung des Interzellularkitts kommt es zu einem Abschilfern der Hornzellen. Diese abgelösten, locker aufliegenden Hornlamellen bilden das an der Oberfläche liegende *Stratum corneum disjunctum*. Der Interzellularkitt stellt die entscheidende Barriere des Organismus gegen Wasserverluste über die Körperoberfläche dar und verhindert das Eindringen fremder Substanzen und pathogener Keime in die Haut (LIEBICH 1999; NEUBERT *et al.* 2001).

Die bereits genannten weiteren Zellen der Epidermis sind Melanozyten, Langerhans-Zellen, Merkelzellen und T-Lymphozyten.

Die **Melanozyten** liegen im *Stratum basale*. Ihre Vorläufer, die Melanoblasten, wandern in der Embryonalentwicklung aus der Neuralleiste zur Epidermis. Die Melanozyten produzieren *post partum* die Pigmente der Haut- und Haarfarbe; es handelt sich dabei um die schwarzbraunen Eumelanine und die gelben bis rotbraunen Phäomelanine. Diese werden in Form von Pigmentkörperchen, Melanosomen, an die Zellen der Epidermis abgegeben. Das Pigment schützt die empfindlichen Mitosen im *Stratum germinativum* vor den schädlichen UV-Strahlen (LEONHARDT 1990).

Die **Merkelzellen** liegen in der Basalschicht der Epidermis und stehen immer mit einem Neuriten in Verbindung (Merkelsche Tastscheiben). Sie enthalten neurosekretorische Granula und sind zuständig für die Vermittlung von Tastempfindungen (SMOLLE 1998). Dabei haben sie die Funktion eines langsam adaptierenden Mechanorezeptors (ODLAND 1983).

**Langerhans-Zellen** sind dendritische Zellen der Haut, die zum mononukleären Phagozytose-System gehören. Sie entwickeln sich aus Makrophagen und wandern sekundär in die Epidermis ein (LIEBICH 1999). Ihre Funktion ist es, die in die Schichten der Epidermis eingedrungenen Antigene aufzunehmen und zu den lymphatischen Organen zu transportieren, um sie dort T-Zellen zu präsentieren (JANEWAY u. TRAVERS 1995).

Die ebenfalls für immunologische Reaktionen in der Epidermis verantwortlichen **T-Lymphozyten** (T-Helferzellen) treten in den basalen Schichten auf und kommunizieren auch mit den Langerhans-Zellen, durch die sie aktiviert werden können (LIEBICH 1999).

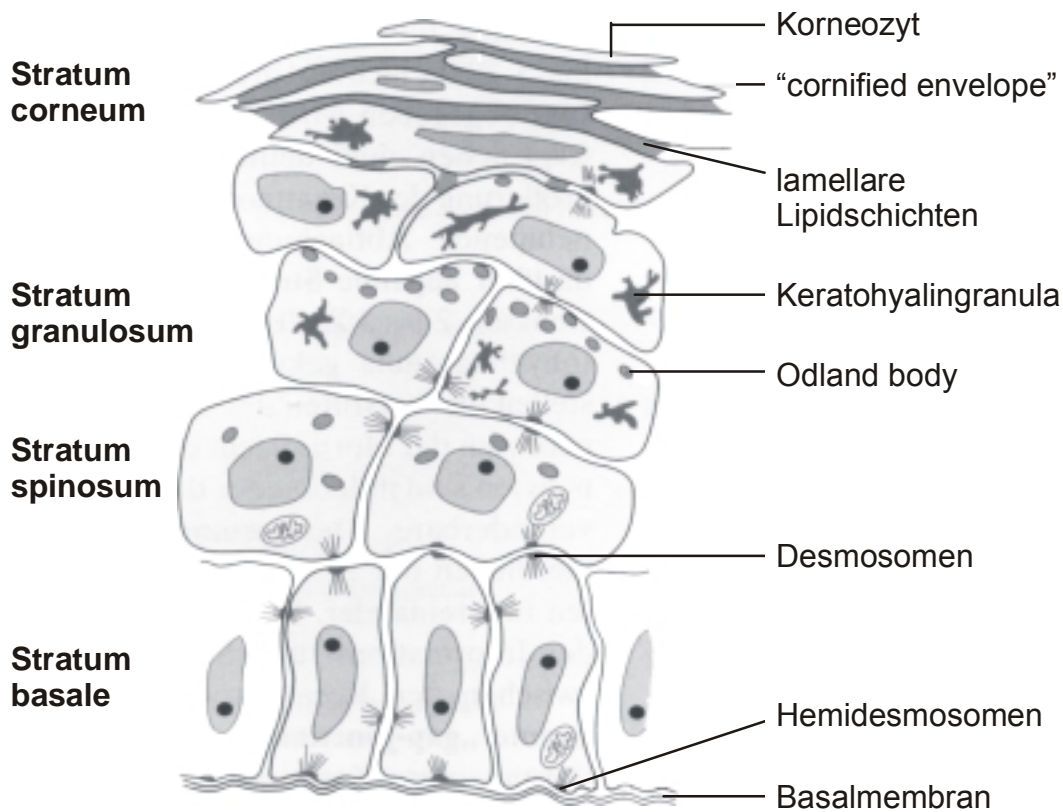


Abb. 1: Schematischer Aufbau der Epidermis (nach FRITSCH 1998)

### 2.1.2 Dermis

Die Dermis oder Lederhaut liegt zwischen der Epidermis, mit der sie innig verzahnt ist und der Unterhaut. Den Namen Lederhaut erhielt sie, weil aus ihr durch den Gerbungsprozess Leder gewonnen wird. Vom Grad ihrer Ausbildung wird die Dicke der Haut bestimmt (HABERMEHL 1996). Die Dicke der Dermis nimmt mit der Dichte der Behaarung zu. Eine dickere Dermis unter einer dichten Behaarung geht mit einer dünnen Epidermis einher (MONTAGNA 1967; MULLER *et al.* 1993).

Die Dermis übernimmt wichtige Funktionen. In ihr befinden sich Immunzellen, und sie ist Träger von Nerven, Blut- und Lymphgefäßen, die der Versorgung der Epidermis dienen. Ferner gibt sie der Haut ihre mechanische Festigkeit (SMOLLE 1998). HIERNICKEL (1985) fand an perfundierter menschlicher Haut heraus, dass die Versorgung einzelner Hautbezirke kreisförmig von einem zentralen Gefäßbaum erfolgt.

Die Dermis enthält lose ineinander vernetzte Kollagenfasern und elastische Fasern. Sie wird unterteilt in das dünne, zell- und gefäßreiche, subepidermale *Stratum papillare* und in ein dickes, faserreiches *Stratum reticulare* (SMOLLE 1998).

Aus dem Fasergeflecht des ***Stratum papillare*** scheren zur Grenzflächenvergrößerung zapfenförmige Schleifen von Kollagenfasern aus und ragen als Bindegewebspapillen in Vertiefungen der Epidermis. Höhe und Anzahl der Papillen sind abhängig von der mechanischen Beanspruchung des Hautabschnitts (LEONHARDT 1990). Die Papillen sind mit feinen haarnadelförmigen Kapillarschlingen und nervösen Endapparaten ausgestattet und dringen in die Epidermis ein. Aus der intensiven Verzahnung zwischen dem *Stratum papillare* und den Basalzellen der Epidermis resultiert die hohe mechanische Stabilität der äußeren Hautschichten. Außerdem fördert sie die Diffusion von Nährstoffen in die Epidermis und damit insbesondere die Regenerationsleistung des *Stratum germinativum*.

Die Faserbündel des ***Stratum reticulare*** (Geflechtschicht) sind scherengitterartig angeordnet und ermöglichen die Dehnung der Haut. Zusätzlich sind die Plastizität und die Verformbarkeit der Haut auf die zahlreich vorhandenen elastischen Fasern zurückzuführen, die zwischen den Kollagenfaserbündeln liegen und nach einer Dehnung die Kollagentextur wieder in ihren ursprünglichen Zustand bringen (LIEBICH 1999; SMOLLE 1998).

Beim Rind entspricht die Struktur der Dermis dem oben dargestellten Aufbau. Die relativ stark ausgebildete Dermis enthält im Bereich des *Stratum papillare* zahlreiche acidophile Zellen, Plasmozyten und Lymphozyten (MEYER *et al.* 1978a; LUDEWIG *et al.* 1996).

### 2.1.3 Hypodermis

Die Hypodermis ist ein lockeres, fettgewebsreiches Bindegewebe. Es enthält Bindegewebsfasern, die das Gerüst für die Fettläppchen bilden und Träger der Gefäß- und Nervenversorgung sind (FRITSCH 1998). Die Unterhaut stellt eine Verbindung zwischen der Dermis und den tiefer liegenden Muskeln, Knochen oder Faszien her und ermöglicht die Verschiebbarkeit der Haut. Die Fetteinlagerungen dienen als Energiereserve und als Kälteschutz (ECKERT 1992).

Das Bindegewebe der Hypodermis ist beim Rind allgemein nur spärlich und grobfaserig vorhanden, auch eine ausgeprägte Fetteinlagerung liegt nicht vor (MEYER *et al.* 1978a). In der Hypodermis der Euterhaut sind keine Fettzellen vorhanden (LUDEWIG *et al.* 1996).

### 2.1.4 Hautanhangsgebilde

Zu den Hautanhangsgebilden gehören die in der Dermis liegenden Hautdrüsen und Haare. Es sind Bildungen der Epidermis, an denen sich auch das Bindegewebe beteiligt. Es gibt zwei Formen von Hautdrüsen: Schweißdrüsen (*Glandulae sudoriferae*) und Talgdrüsen (*Glandulae sebaceae*). Während die allgemeine Körperdecke des Menschen Schweißdrüsen vor allem in Form von ekkrin sezernierenden Schlauchdrüsen („echte Schweißdrüsen“) enthält, findet man bei den Haussäugetieren nur apokrin sezernierende Schlauch- bzw. Knäueldrüsen (MEYER *et al.* 1978b; BANKS 1993). Beim Rind sind die Drüsen mit einem sackförmig dilatierendem Endstück mit geringer Windung ausgebildet. Ihr Sekret ist stark wasserhaltig und wird kontinuierlich abgegeben (MEYER *et al.* 1978b). Eine spontane Sekretabgabe („Schwitzen“) der Schlauchdrüse ist unter allen Haussäugetieren nur beim Pferd nachgewiesen worden. Europäische Rinderrassen besitzen diese Fähigkeit bei Anstieg der Umgebungstemperatur nur begrenzt

(MEYER *et al.* 1978c). Die apokrinen Drüsen sind an Haaranlagen gebunden; ihr Sekret ist auch Träger individual-spezifischer Duftstoffe.

Talgdrüsen sind holokrin sezernierende alveoläre Drüsen, die häufig aus Haaranlagen (Haarbalgdrüsen) hervorgehen. Sie liegen meist nur auf einer Seite des Haarbalges und münden in ihn über einen kurzen Ausführungsgang. Ihr Talg bildet auf der Hautoberfläche einen dünnen Fettfilm (LIEBICH 1999).

Das Haar besteht aus dem peripher gelegenen Haarschaft (*Scapus pili*), der die Hautoberfläche überragt und der Haarwurzel (*Radix pili*), die mit der epithelialen Haarzwiebel (*Bulbus pili*) auf der bindegewebigen Haarpapille (*Papilla pili*) sitzt. Bulbus, Papille und umgebendes Bindegewebe bilden den Haarfollikel. Die Haarwurzel ist von der Wurzelscheide (*Vagina radicularis*) umgeben (LEONHARDT 1990). Aufgrund einer sensiblen Innervation der meisten Haarfollikel, nimmt das Haarkleid Anteil an der Hautsensibilität (MONTAGNA 1967).

### **2.1.5 Gefäße der Haut**

Die Gefäßversorgung in der Haut dient nicht nur der Versorgung der Haut sondern auch der Thermoregulation. Das Blutgefäßsystem der Haut besteht aus einem Zu- und Ableitungssystem und aus einem mikrovaskulären Gefäßnetz, das aus zwei horizontalen Plexus besteht (SEPP u. FRITSCH 1998).

LÖFFLER (1966) beschreibt beim Rind drei Gefäßnetze. Das subkutane Gefäßnetz, das sich in der gesamten Hypodermis ausbreitet und das in den basalen Schichten des Coriums liegende kutane Netz bestehen aus jeweils einem arteriellen und einem venösen Netz. Das dritte subpapilläre Gefäßnetz wird als zusammenhängendes Kanalsystem mit arteriellen Zu- und venösen Abflüssen beschrieben. Dem subpapillären Hauptnetz sind die Kapillaren für die Versorgung der Epidermis und in den mittleren Lagen des Coriums die wesentlichen Teile des Gefäßsystems für die Haare und die Schweißdrüsen angeschlossen.

## 2.1.6 Die Haut als Resorptionsorgan

### 2.1.6.1 Barrierefunktion

Die bedeutendste Hautbarriere stellt der nicht vitale Anteil der Epidermis, also das *Stratum corneum* mit dem ihm aufliegenden Oberflächenfilm dar.

Verantwortlich für die Barriere sind die besondere Struktur und die Zusammensetzung des *Stratum corneum*. Das *Stratum corneum* mit dem *Stratum corneum conjunctum* und dem *Stratum corneum disjunctum* stellt keine homogene Barriere dar. Das tiefer liegende *Stratum corneum conjunctum* ist aufgrund seiner kompakten Struktur ein größeres Hindernis (PELLETT *et al.* 1997).

ELIAS (1983) beschreibt die Hornschicht als ein heterogenes Zwei-Komponenten-System (sog. *brick and mortar model*) von abgestorbenen, dehydrierten und proteinreichen Korneozyten, die von in Membrandoppelschichten angeordneten, interzellulären Lipiden umgeben sind. Er vergleicht diese Anordnung mit einer Mauer, bei der die Ziegelsteine von Mörtel oder Kittsubstanz zusammengehalten werden. Dabei versehen die Zellen die Hornschicht mit physikalischer und chemischer Stabilität, während die Interzellulärsubstanz die Penetration von Wasser und gelösten Substanzen verhindert. Insbesondere die interzellulären Lipide sind für die Barriereigenschaften der Hornschicht verantwortlich (NEUBERT *et al.* 2001).

Die Korneozyten enthalten die chemisch und physikalisch widerstandsfähigen Keratine, die sich aus den Keratinfilamenten zusammensetzen. Umgeben und geschützt werden die Hornzellen von einer chemisch äußerst widerstandsfähigen Membran (*cornified envelope*), die durch die Vernetzung des Proteins Involukrin während der terminalen Differenzierung entsteht. Direkt vor dem Stadium der terminalen Differenzierung, an der Grenze zwischen lebender Epidermis und Hornschicht, verschmelzen die Membranen der Odlandkörper mit der Zellmembran, wobei der lamellare Inhalt als Schichten in den Interzellularraum abgegeben wird. Daraus entstehen kontinuierliche Lamellensysteme, die den Interzellularraum des

*Stratum corneum* ausfüllen (LANDMANN 1988; LANDMANN 1991). Es handelt sich bei diesen Substanzen um Lipide, die in Membrandoppelschichten angeordnet sind und die Lamellensysteme darstellen (PROKSCH 1990). Die Zusammensetzung der Lipide ändert sich auf dem Weg vom *Stratum granulosum* zum *Stratum corneum*. Im *Stratum granulosum* findet man vorwiegend polare Lipide, insbesondere Phospholipide, während im *Stratum corneum* fast nur unpolare Lipide auftreten (PROKSCH 1990; SCHAICH u. KORTING 1992). Dabei handelt es sich um Ceramide (Sphingolipide), Cholesterol und freie gesättigte Fettsäuren, die trotz äußerer Einflüsse (UV-Strahlung, atmosphärische Oxidation, pathogene Keime) an der Hautoberfläche stabil bleiben. Phospholipide sind im *Stratum corneum* kaum bzw. gar nicht mehr vorhanden (LAMPE *et al.* 1983; LANDMANN 1988; POTTS *et al.* 1992). Die vorliegenden Fettsäuren besitzen in der Regel mehr als 22 bis 35 Kohlenstoffatome, sind weitgehend gesättigt und ohne Strukturverzweigungen. Damit besitzen sie hohe Schmelzpunkte, die eine relative Temperaturstabilität bedingen. Der hohe Sättigungsgrad macht diese Fettsäuren oxidationsstabil und unempfindlich gegenüber UV-Strahlung (SCHNEIDER *et al.* 1997). Andere polare (Cholesterolsulfat) und unpolare Lipide (Cholesterolester, Triglyceride, Kohlenwasserstoffe) kommen im *Stratum corneum* in geringer Menge vor. Einzig der Cholesterolgehalt ist in allen Schichten der Epidermis mit etwa 20–30% der Gesamtlipide ziemlich konstant (WERTZ *et al.* 1987; PROKSCH 1990).

Ceramide, die etwas mehr als 40 % der Hornschichtlipide ausmachen, spielen eine besondere Rolle für die Wasserbindungsfähigkeit der Hornschicht (GLOOR 1994). Ceramide bestehen aus einer langkettigen Base (Sphingosin oder Phytosphingosin), die über eine Amidbindung mit einer Fettsäure verbunden ist. Sie weisen wie die Phospholipide einen hydrophilen Kopf und zwei hydrophobe Schwanzgruppen auf. So sind sie in der Lage Lipiddoppelschichten zu bilden (LANDMANN 1991). Es lagern sich einerseits die hydrophilen Anteile der polaren Lipide und andererseits die lipophilen Molekülanteile zusammen, so dass sich lipophile mit hydrophilen Schichten abwechseln. Die lipophilen Anteile können sich in einer kristallinen und in einer flüssigkristallinen Zustandsform befinden. Diese Zustandsformen können in Abhängigkeit von der Temperatur ineinander übergehen. Maßgeblich für die

Übergangstemperatur sind die Kettenlänge und der Sättigungsgrad der Alkylreste (FORSLIND 1996).

Es gibt sechs verschiedene Gruppen von Ceramiden. Alle Ceramide lassen sich von Glucosylceramiden ableiten, Fraktionen der Ceramide 2 sowie Ceramide 5 auch von Sphingomyelin (HAMANAKA *et al.* 2002). Bedeutend sind das O-Acyl-Glucosylceramid in den Odlandkörpern und sein Degradationsprodukt, das O-Acyl-Ceramid, in interzellulären Lamellen (LANDMANN 1991; GLOOR 1994). Diese übernehmen die Funktion einer molekularen Verbindung zwischen den aufeinander gestapelten Lipiddoppelschichten, die sich aufgrund ihrer negativ geladenen Kopfgruppen eigentlich abstoßen müssten. Sie verankern sich in zwei benachbarten Doppelschichten. Möglich ist dies, weil die langkettige Fettsäure (ca. C30) eine zusätzliche Fettsäure (meist Linolensäure) trägt und diese langgestreckt in die nächste Schicht hineinragt. Das Vorhandensein dieser verankerten Lipiddoppelschichten allein genügt nicht, die Passage von Wasser zu verhindern. Die Permeation von Wasser durch biologische Membranen beruht auf vorübergehenden Defekten in der Lipiddoppelschicht, die durch rotierende Knicke der ungesättigten Fettsäuren hervorgerufen werden. Im *Stratum corneum* liegen folgende Besonderheiten vor, die den Durchtritt von Wasser und wasserlöslichen Substanzen weitestgehend verhindern:

1. Die hohe Anzahl der Ceramide stabilisiert die hydrophile Zone der Doppelschicht durch laterale Wasserstoffbrückenbindungen.
2. Das steife Sterolskelett von Cholesterin zwingt benachbarte Fettsäuren in eine regelmäßige Anordnung.
3. Die im *Stratum corneum* häufiger auftretenden gesättigten Fettsäuren haben keine rotierenden Knicke und erhöhen deshalb die molekulare Ordnung im Inneren der Doppelschicht.
4. Der zuvor genannte Effekt wird durch eine zunehmende Länge der Ketten verstärkt. Membranphospholipide haben meist ungesättigte Fettsäuren mit 16 bis 18 Kohlenstoffatomen, während die Ceramide im *Stratum corneum* viele ungesättigte Fettsäuren mit 24 bis 28 Kohlenstoffatomen enthalten. Das Innere von Doppelschichten wird dadurch kristalliner (s.o.).

5. Die zum Vergleich zur Körpertemperatur geringere Temperatur an der Hautoberfläche bewirkt, dass sich die Lipide zum Teil in festkristallinem Zustand befinden, wodurch die Barriereeigenschaft erhöht wird (LANDMANN 1988; LANDMANN 1991).

Neben dem vorher beschriebenen Modell von LANDMANN (1988,1991) existieren noch weitere Modelle über den Aufbau der Lipidschicht im *Stratum corneum*. FORSLIND (1994) geht davon aus, dass nebeneinander kristalline und flüssigkristalline Phasen bestehen, die streng voneinander getrennt sind (*domain-mosaic model*). NORLÉN (2001a) beschreibt im Gegensatz dazu eine zusammenhängende lamelläre Gelphase (*single gel-phase model*). Außerdem beschreibt NORLÉN (2001b) im Unterschied zu den von LANDMANN (1988, 1991) beschriebenen Membranfusionen einheitliche Membranen, deren Strukturen sich in unterschiedlichen Faltungen befinden (*membrane folding model*).

Einen Beitrag zur Hautbarriere leisten auch die *Cornified Envelopes*. Die Quervernetzung des Involukrins an der Innenseite der Zellmembran führt zu einer hohen Rigidität der Hornzelle und zu einer chemischen Resistenz gegen Keratolytika (Alkalien, Detergenzien, reduzierende Substanzen) und gegen organische Lösungsmittel (FRITSCH 1998). Die Hornzellen selbst enthalten die gegen viele Chemikalien widerstandsfähigen, in eine proteinhaltige amorphe Matrix eingebetteten Keratinfilamente, die jedoch durch starke Säuren, Basen und andere Keratolytika zerstört werden können. Darüber hinaus verfügen die Zellen über Lipide und wasserlösliche Substanzen, die eine Speicherung von Wasser erlauben und dadurch die Hautfeuchtigkeit wesentlich beeinflussen (MERK u. BICKERS 1992).

Außerdem spielt auch der Wassergehalt in der Hornschicht eine wichtige Rolle für ihre Barrierefunktion. Der Wassergehalt in der Epidermis nimmt von innen nach außen ab. Die Korneozyten der Hornschicht enthalten 15 % Wasser, während in den tiefer liegenden Zellen des *Stratum corneum* noch 40 % Wasser zu finden ist. Der Wassergehalt ist in den Schichten der lebenden Epidermis höher und liegt bei etwas über 70 % in der Basalzellschicht (WARNER *et al.* 1988).

Die intakte Hornschicht stellt mit ihren extrazellulären Lipiden die wichtigste Barriere für den transepidermalen Wasserverlust dar. Unter dem transepidermalen Wasserverlust versteht man die kontinuierliche Wasserabgabe über die Haut aufgrund einer unterschiedlichen Temperatur und Luftfeuchtigkeit sowie der Luftbewegung. Der transepidermale Wasserverlust (*transepidermal water loss*, TEWL) ist definiert als Abgabe von Wasser in mg/cm<sup>2</sup>/h (SCHAICH u. KORTING 1992). Die Permeabilität für Wasser ist mehr als 1000 fach geringer als durch andere Lipidmembranen (POTTS u. FRANCOEUR 1991). Ohne die Lipide des *Stratum corneum* würde der Wasserverlust durch die Haut um das 2500 fache und bei Fehlen der Hornschicht auf das vier millionenfache zunehmen (LANDMANN 1988). Ein Quadratzentimeter Hornhaut lässt bei 30 °C pro Stunde ungefähr 0,3 mg Wasser durch (HEYMANN 1994). Temperaturen über 70 °C bewirken am *Stratum corneum* eine Durchlässigkeit für Wasser, die einer freien Diffusion ähnelt (GOLDEN *et al.* 1987). Der transepidermale Wasserverlust ist der entscheidende Stimulator für die Synthese der Lipide im *Stratum corneum*. Wird die Wasserabgabe gehemmt (Abdecken der Haut), tritt eine Reduktion der Lipidsynthese auf (STÜTTGEN 1990). KALIA *et al.* (2000) konnten in ihren Studien an Humanhaut zeigen, dass die Barriereeffizienz gegenüber dem transepidermalen Wasserverlust trotz unterschiedlicher Hautdicken konstant ist.

Eine Barrierefunktionsstörung geht mit einer Erhöhung des transepidermalen Wasserverlustes einher. Eine artifizielle Schädigung der Barrierefunktion kann sowohl mechanisch (z.B. Tesa-*Stripping*) als auch chemisch durch Herauslösen von Lipiden (z.B. organische Lösungsmittel) erreicht werden. BLANK (1953a,b) führte Untersuchungen über die Wasserdurchlässigkeit der Hornschicht nach Tesa-*Stripping* durch und konnte zeigen, dass vor allem die unterste Schicht des *Stratum corneum* für die Barrierefunktion verantwortlich ist. Auch ein längerer Kontakt der Hornhautoberfläche mit Wasser führt zu einer Störung der Struktur der interzellulären Lipiddoppelschichten (WARNER *et al.* 1999). Die Permeabilität der Hornschicht wird dabei um den Faktor zwei bis fünf erhöht (STÜTTGEN *et al.* 1986). Eine bis zur zehnfachen Erhöhung der Permeabilität ist möglich (HEYMANN 1994). Durch den

Wasserkontakt diffundieren Substanzen aus der Hornschicht in das Wasser, so dass sich die Wasserbindungskapazität der Hornschicht verringert und es zur Austrocknung der Haut kommen kann (GLOOR 1982).

Eine Entfettung der Hornschicht mit Aceton und Äther (1:1) führt zu einem Verschwinden der lamellären Lipidstrukturen und zu einer Abnahme des gebundenen Wassers. Je länger die Exsikkation dauert, desto ausgeprägter ist die Austrocknung der Haut (IMOKAWA u. HATTORI 1985). Am stärksten wird der transepidermale Wasserverlust durch ein Gemisch aus Chloroform und Methanol (1:1) gesteigert (GRICE 1980). Trägt man anschließend Ceramide und Glykolipide auf die Haut, erhöht sich die Wasserbindungsfähigkeit der Hornschicht wieder (IMOKAWA *et al.* 1986). Auch YANG *et al.* (1995) konnten zeigen, dass ein topisch appliziertes Lipidgemisch aus Ceramiden, Cholesterol, Palmitaten und Linoleaten eine beschleunigende Wirkung auf die Reparatur der Hautbarriere hatte, nachdem diese artifiziell chemisch (Aceton, Petroleumäther, Detergenzien) und mechanisch (*tape stripping*) geschädigt worden war.

Eine chronische Störung der Permeabilitätsbarriere mit steigendem TEWL kann durch eine an essentiellen Fettsäuren arme Diät erzielt werden (BURR u. BURR 1929). Die essentielle Fettsäure Linolsäure wird für den Aufbau der O-Acyl-Ceramide und der O-Acyl-Glucosylceramide benötigt (WERTZ *et al.* 1987). Als Begleiterscheinung kommt es zu einer trockenen und schuppigen Erscheinung der Haut und zur epidermalen Hyperproliferation (SCHNEIDER *et al.* 1997).

Bei einer akuten Schädigung der Permeabilitätsbarriere tritt innerhalb von ein bis vier Stunden ein starker Anstieg der Lipidsynthese in der Epidermis ein. Es kommt unter anderem zu einer Zunahme der HMG-Coenzym-A-Reduktase (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym-A-Reduktase). Dieses Enzym ist ein Maß für die Cholesterinsynthese. Bei einer chronischen Störung ist die Lipidsynthese auch in der Dermis erhöht (PROKSCH 1990).

Eine Einschränkung erfährt die Hautbarriere durch die Unterbrechung der Oberfläche durch die Hautanhangsorgane. An diesen Stellen wird das Eindringen exogener Substanzen erleichtert (SCHMIDT 1995). Die Epithelauskleidung der sezernierenden

holo- und ekkrinen Drüsen zeigt ihr eigenes Permeationsverhalten. Die für die Hornschicht charakteristische Barrierefunktion geht in den tieferen Abschnitten der Haarfollikel verloren. Diese Regionen sind damit für die Aufnahme lipophiler Substanzen prädestiniert, während in den oberen Schweißdrüsenabschnitten die Aufnahme wasserlöslicher Stoffe im Vordergrund steht (STÜTTGEN 1990).

Der **Oberflächenfilm** der Haut besteht aus Substanzen der Schweiß- und Talgdrüsen sowie aus Hornhautanteilen. Die wasserlöslichen Stoffe dieses Oberflächenfilms sind überwiegend Ionen, die Wassermoleküle binden und damit zur Feuchthaltung der Hautoberfläche beitragen. Dabei handelt es sich vor allem um Salze organischer Säuren, die aus dem Schweiß stammen. Obwohl diese Salze Feststoffe sind, ist der Oberflächenfilm eine konzentrierte wässrige Lösung dieser Stoffe. Der pH-Wert des Oberflächenfilms liegt meist im schwach sauren Bereich zwischen 5 und 6 und wirkt dadurch mikrobizid. Deshalb spricht man beim Menschen auch von einem Säureschutzmantel der Haut (HEYMANN 1994). Die auf der Haut befindlichen Lipide stammen aus den Talgdrüsen und zum Teil aus der Interzellulärsubstanz der Hornschicht. Zu diesen Lipiden zählen Triglyceride, freie Fettsäuren, Squalen, Wachs- und Cholesterolester (PITMAN u. ROSTAS 1981; SCHAICH u. KORTING 1992; HEYMANN 1994). Cholesterin und Cholesterinester gelangen vorwiegend aus dem Hornfett an die Oberfläche (HEYMANN 1994). Den Sebumlipiden wird eine Bedeutung im Rahmen des Aufbaus der epidermalen Barriere beigemessen. DOWNING u. LINDHOLM (1982) untersuchten die Zusammensetzung der Oberflächenlipide bei Rindern und stellten dabei fest, dass außer bei den Triglyceriden vor allem unverzweigte, geradzahlige und gesättigte Fettsäuren vertreten sind. Sie nahmen an, dass auch die Triglyceride vermehrt von der Hornschicht abgegeben werden. JENKINSON u. LLOYD (1979) fanden beim Rind nur einen unvollständig ausgebildeten Lipidfilm auf der Haut vor. Die vorhandenen Lipide liegen an den Schuppenrändern, so dass die Oberfläche versiegelt ist, aber ein Talgfluss über die Haut nicht möglich ist. MEYER *et al.* (1991) weisen darauf hin, dass der beim Menschen beschriebene Säureschutzmantel bei Haustieren nicht existiert. Bei Untersuchungen des Haut-pH größerer

Haussäugetierarten konnte ein schwach saurer bis deutlich alkalischer pH-Wert von etwa 6,0 bis 9,0 ermittelt werden. Trotzdem stellt die Epidermis der Haussäugetiere eine effektive biologische Barriere dar, da die antimikrobiellen Eigenschaften der Haut den sauren Lipiden bzw. freien Fettsäuren zugeschrieben werden. Von den freien Fettsäuren weiß man, dass sie die bakterielle Sauerstoff- und Aminosäureaufnahme und die Proteinsynthese hemmen und sich auf die Zellteilungsrate auswirken. Auf der Haut befindet sich eine typische, physiologische Mikroflora, die sich dem Oberflächenfilm der Haut angepasst hat und durch ihre Zersetzungsprodukte den Lebensraum mitgestaltet und pathogene Mikroorganismen verdrängt (MEYER *et al.* 1991).

#### **2.1.6.2 Reservoirfunktion**

Das *Stratum corneum* kann mit seiner geringen metabolischen Aktivität als Speicher für eingedrungene körperfremde Stoffe wirken. Ein Reservoir entsteht, wenn die Menge einer auf die Haut applizierten Substanz in den oberen Schichten des *Stratum corneum* erheblich höher ist als in den tieferen Schichten und diese Substanz aufgrund der morphologischen Strukturen zurückgehalten wird. In diesem Fall ist der Abfluss einer Substanz also wesentlich langsamer als ihr Zufluss. Nur kleine Mengen können über einen längeren Zeitraum kontinuierlich dem Konzentrationsgefälle folgend in die tieferen Lagen gelangen (SCHAEFER *et al.* 1982).

Ein Reservoir kann über mehrere Tage existieren. STOUGHTON (1965) konnte noch 16 Tage nach Applikation ein Hydrocortisondepot in der Haut nachweisen. Eine Hautreinigung mit Wasser, Seife oder Alkohol lässt dieses Depot unbeeinflusst.

VICKERS (1963) erbrachte den Beweis für eine Reservoirbildung in der Hornschicht, indem er die Kortikosteroide mit Fluocinolonacetonid und Triamcinolonacetonid auf die Haut applizierte und nach zwei Wochen Behandlungspause durch eine Okklusion den Effekt einer Vasokonstriktion erreichen konnte. Diesen Effekt konnte man weder

mit einer intradermalen Injektion noch mit einem vorherigem Abtragen der obersten Hornschichten (Tesafilmabrissmethode) erreichen, da sich in diesen Fällen kein Hornschichtdepot ausbilden konnte.

Durch das Auftragen tritiummarkierter Substanzen auf exzidierte menschliche Haut und das anschließende Entfernen der Hornschichten mittels Abrisstechnik konnte die Verteilung der Substanzmengen in den einzelnen Hornschichten anhand der gemessenen Radioaktivität ermittelt werden. In der obersten Hornschicht findet man die größte Substanzmenge (ZESCH *et al.* 1973, 1974). Diese nimmt substanzabhängig mit den folgenden Abrissen ab. Von den oberen Lagen (*Stratum corneum disjunctum*) wird um ein Vielfaches mehr Substanz aufgenommen als von den unteren Lagen (*Stratum corneum conjunctum*). Anhand des Verteilungsmodus zeigt sich, dass die Funktion der Hornschicht als Barriere im umgekehrten Verhältnis zu der als Reservoir steht. Die Barrierefunktion nimmt mit zunehmender Tiefe zu, während die Reservoirfunktion abnimmt.

Die Speicherung der Substanzen scheint in den interlamellaren Zwischenräumen zu erfolgen. Diese werden in der Tiefe kleiner, so dass die Möglichkeit einer Depotbildung abnimmt (ZESCH *et al.* 1973).

ROUGIER *et al.* (1983, 1985) wiesen an haarlosen Ratten und DUPUIS *et al.* (1984) an Versuchspersonen und haarlosen Ratten eine Beziehung zwischen der Reservoirfunktion des *Stratum corneum* und der perkutanen Resorption nach. Mit Hilfe radioaktiv markierter Substanzen konnten sie zeigen, dass man mit der nach 30 Minuten gemessenen Wirkstoffkonzentration im *Stratum corneum* eine Vorhersage über die durch die intakte Haut penetrierte Substanzmenge nach 96 Stunden treffen kann.

Letztendlich ist die Reservoirfunktion weniger auf die Bindung an Strukturen des *Stratum corneum* zurückzuführen als vielmehr auf die geringe Löslichkeit vieler topisch applizierter Substanzen in dieser Schicht. Das eingeschränkte Diffusionsvermögen führt zur Anreicherung der Stoffe in den oberen Hornlagen, aus denen eine lösungskontrollierte Diffusion in die tieferen Epidermislagen erfolgt (NEUBERT *et al.* 2001).

### 2.1.6.3 Penetration, Permeation, Resorption

Penetration, Permeation und Resorption sind Begriffe, die Substanzaufnahme durch die Haut beschreiben (Abb. 2). Unter dem Begriff Penetration versteht man das Eindringen in die Hornschicht und die tieferen Schichten der Epidermis. Permeation ist die Wanderung eines Stoffes durch eine oder mehrere Hautschichten hindurch; im engeren Sinne versteht man darunter das Durchdringen der Epidermis, während die Resorption das Durchdringen der Haut mit der Aufnahme in korale Blut- und Lymphgefäße beinhaltet (STÜTTGEN u. SCHAEFER 1974).

Dem Durchwandern der Haut stehen nicht nur als bedeutendste Barriere das *Stratum corneum* mit dem ihm aufliegenden Oberflächenfilm als Widerstand entgegen, sondern auch die vitalen Zellschichten der Epidermis, die Basalmembran, die Grundsubstanz der Dermis sowie die Wände der Blut- und Lymphgefäße (STÜTTGEN 1965, 1972; STÜTTGEN u. SCHAEFER 1974).

Prinzipiell ist das Eindringen in die Epidermis nicht gleichbedeutend mit einer Aufnahme durch den Gesamtorganismus. Da sich die Epidermis permanent von unten nach oben regeneriert, können in seltenen Fällen Substanzen, die langsamer diffundieren als die nach oben gerichtete Zellerneuerung, wieder herausgeschoben werden (ZESCH u. SCHAEFER 1976). Dies betrifft stark lipophile Stoffe und Substanzen mit einem hohen Molekulargewicht (REDDY *et al.* 2000).

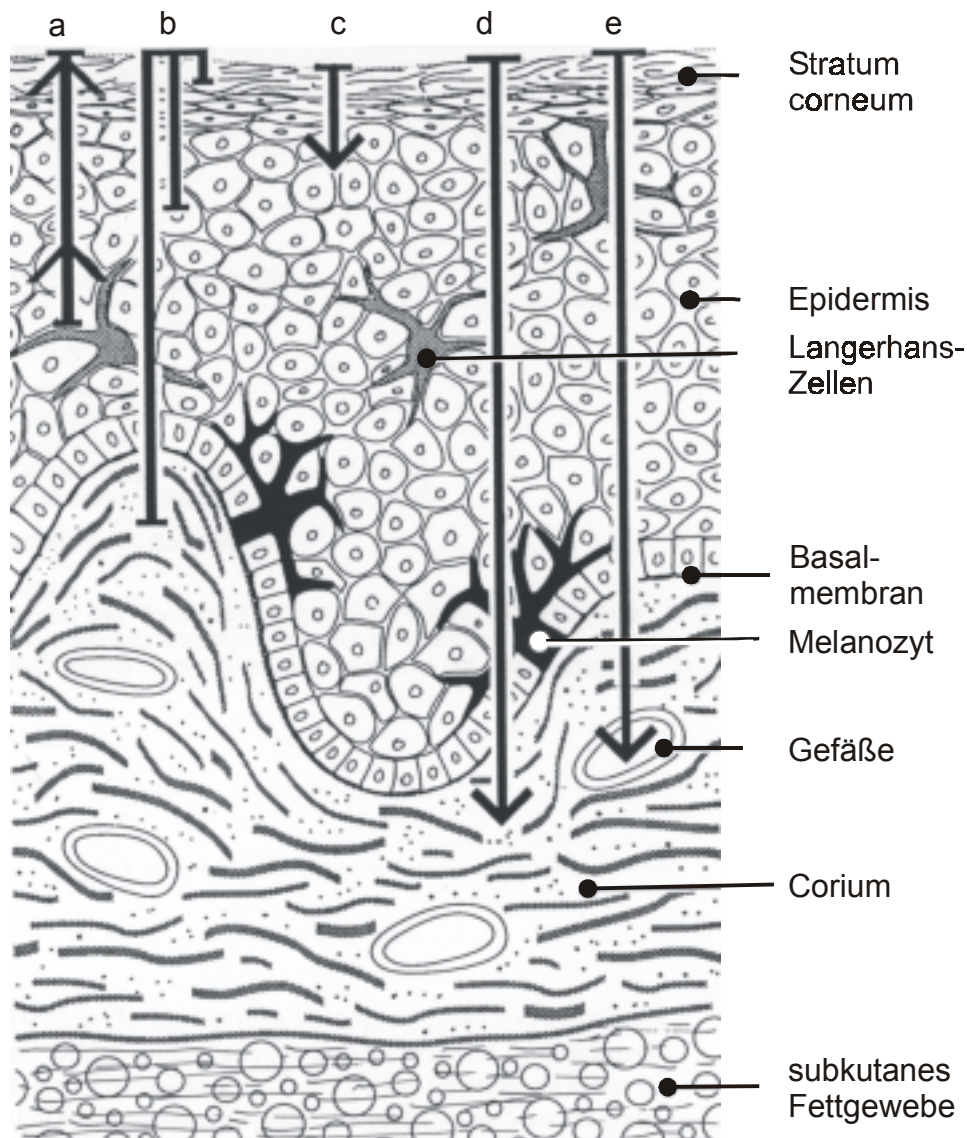


Abb. 2: Darstellung der verschiedenen Stadien der Aufnahme von Substanzen  
a) Adsorption, b) Absorption, c) Penetration, d) Permeation, e) Resorption  
(nach MERK u. BICKERS 1992)

Für die Penetration in die Haut stehen zwei alternative Wege offen (Abb. 3). Es handelt sich um den bedeutsameren transepidermalen Weg und den durch die Anhangsorgane. Der transepidermale Weg, also der Weg durch die in der Regel sehr dünne (10-20  $\mu\text{m}$ ), aber relativ undurchlässige Hornschicht, ist wiederum unterscheidbar in die transzelluläre und interzelluläre Passage. Der Weg über die

Anhangsorgane kann über die Schweißdrüsen oder über die Haarfollikel und Talgdrüsen (*Shunt-Weg*) erfolgen. Diese Adnexe bieten günstige Permeationsbedingungen, aber ihr Anteil an der Hautoberfläche beträgt lediglich 0,1-0,5 % (STÜTTGEN *et al.* 1986; KARZEL u. LIEDTKE 1989). Ihnen wird jedoch eine Bedeutung in der Initialphase der Penetration bzw. für extrem langsame diffundierende Substanzen (z.B. große polare Moleküle) zugesprochen (NEUBERT *et al.* 2001). SCHAEFER u. LADEMANN (2001) betrachten auch Mikroläsionen in der Hornhaut als *Shunt-Weg*.

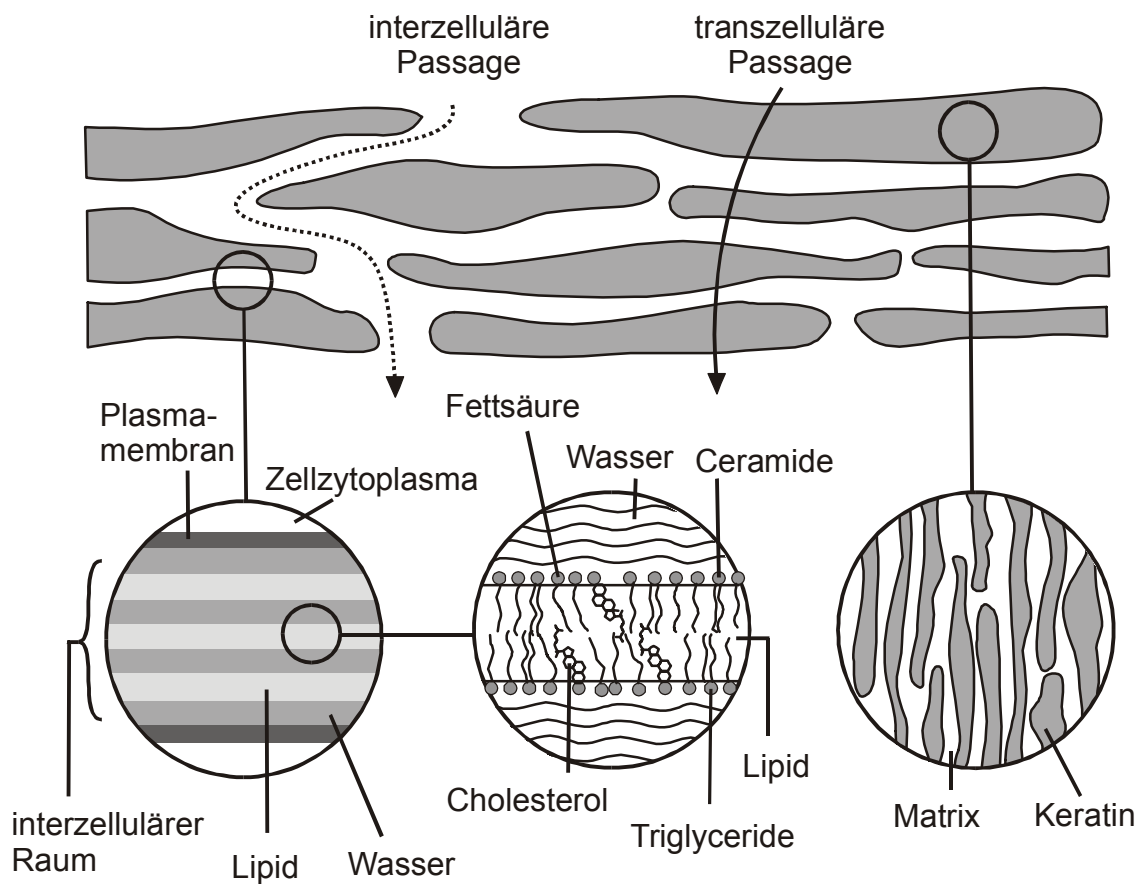


Abb. 3: Transportwege durch das *Stratum corneum* (nach BARRY 1987)

SCHEUPLEIN *et al.* (1969) konnten in ihren Untersuchungen feststellen, dass Steroide den Weg über die Hautanhangsgebilde bevorzugen. ILLEL u. SCHAEFER (1988) messen diesem Weg nach Untersuchungen mit Hydrocortison in den ersten

24 Stunden nach einer Wirkstoffapplikation eine größere Bedeutung bei. Bestätigt wird dies durch *In-vitro*-Studien von HÜBER *et al.* (1994). Sie fanden, dass die Absorption verschiedener Steroide in unveränderter Haut signifikant höher ausfällt als in drüsenloser Haut.

Relativ schnell penetrierende Substanzen bevorzugen den direkten Weg durch die Zellen des *Stratum corneum* (BLANK u. SCHEUPLEIN 1969). Dabei handelt es sich um polare Substanzen. Sie können transzellulär und interzellulär permeieren (NEUBERT *et al.* 2001). SCHEUPLEIN (1965,1976) und BLANK *et al.* (1967) sehen im transzellulären Weg die Hauptroute für polare, niedrigmolekulare Nichtelektrolyte. Inzwischen wird der interzelluläre Weg als dominierende Route für alle penetrierenden Wirkstoffe beschrieben. Gegen den transzellulären Weg sprechen der geringe Wassergehalt der Korneozyten (5-15 %) sowie die Tatsache, dass von den hydrophilen Substanzen dicht gepacktes Keratin und äußerst stabile Zellmembranen alternierend überwunden werden müssen (NEUBERT *et al.* 2001). Die weniger bedeutende transzelluläre Passage führt über die Wechselwirkungen mit den geringen lipophilen Anteilen der Zellen und den Proteinen der Korneozyten. Eine Schwächung der Bindungskräfte und Änderungen der Helixkonformationen sind die Folge. Starke Beeinflussungen können schließlich in Porenbildung resultieren (KALBITZ *et al.* 1996).

Es werden zwei mögliche Wege für polare Substanzen in der Literatur diskutiert (Abb. 4). Entweder gelangen sie über die hydrophilen Regionen der Lipiddoppelschichten (A) oder über Mikroporen (B), die sich ungeordnet zwischen den Lipiddoppelschichten befinden, in und durch das *Stratum corneum* (SZNITOWSKA *et al.* 1998). SZNITOWSKA *et al.* (1998) favorisieren aufgrund ihrer Untersuchungen den Weg durch Mikroporen, während KALBITZ *et al.* (1996) und NEUBERT *et al.* (2001) als „polare Route“ die hydratisierten Kopfgruppen der Lipiddoppelschichten beschreiben.

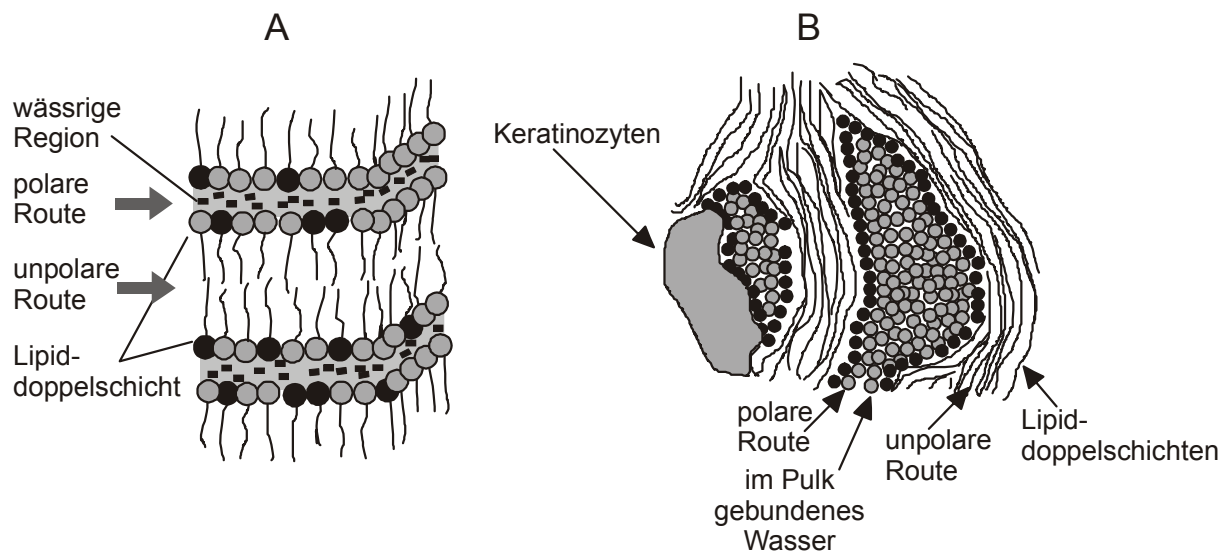


Abb. 4: Mögliche polare und unpolare Wirkstoffwege (modifiziert nach SZNITOWSKA *et al.* 1998)

Für die Penetration durch die Haut sind die chemisch-physikalischen Eigenschaften eines Stoffes von Bedeutung. Eine große Relevanz hat die Molekülgröße. Während NEURAND u. MEYER (1987) ein Molekulargewicht von über 5000 Dalton als limitierende Größe für eine transepidermale Stoffaufnahme ansehen, liegt für KARZEL u. LIEDTKE (1989) die Grenze bereits bei 1000 Dalton. BOS u. MEINARDI (2000) kommen zu dem Ergebnis, dass ein Molekulargewicht von unter 500 Dalton eingehalten werden muss, damit ein Wirkstoff durch die Haut penetrieren kann. Zu berücksichtigen ist, dass höhermolekulare Substanzen in ihrer chemischen Struktur nicht als starre Gerüste aufzufassen sind, sondern die Möglichkeit einer Faltung oder Streckung haben (STÜTTGEN 1974).

Lipophile Pharmaka können über die Haut resorbiert werden, während hydrophile Pharmaka kaum oder gar nicht aufgenommen werden (FICHTL 2001). Lipophile Stoffe wandern durch die mit Lipiden gefüllten Zwischenräume (unpolare Route). Dies gilt wahrscheinlich für alle Substanzen mit einem Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten größer als 10 (KALBITZ *et al.* 1996). Amphiphile Stoffe, die in Ölen und in begrenztem Umfang in Wasser löslich sind, dringen schneller in die Haut ein als echte hydrophobe Substanzen, da sie gleichermaßen die hydrophilen

und lipophilen Barrieren der Epidermis überwinden können (KATZ u. SHAIKH 1965). Reine Fette und Öle können zwar in die Epidermis eindringen, werden aber nicht weitertransportiert, da sie wegen der fehlenden Wasserlöslichkeit nicht in Blut und Lymphe übertreten (NEURAND u. MEYER 1987).

Eine Substanz wird um so besser aus einer Grundlage abgegeben, je schlechter sie in dieser löslich ist. Um günstige Voraussetzungen für ein lipophiles Pharmakon zu schaffen, sollte es je nach erwünschter Resorptionsgeschwindigkeit in einer Fett/Wasser-Emulsion (langsame Resorption) oder in einer Wasser/Fett-Emulsion (schnelle Resorption) vorliegen. Bei hydrophilen Pharmaka sollten umgekehrte Bedingungen herrschen (KURZ *et al.* 1987).

Wasser und polare Stoffe können besser durch die Hornschicht penetrieren, wenn der flüssigkristalline Zustand der lipophilen Anteile in der Lipiddoppelschicht überwiegt. Dieser Zustand wird durch höhere Temperaturen erreicht (CLARYS *et al.* 1996; FORSLIND 1996).

Die Permeationsquote einer Substanz kann regional sehr unterschiedlich sein. Sie ist dort stärker, wo wenige Zellschichten des *Stratum corneum* und viele Drüsen vorliegen (NEURAND u. MEYER 1987). Diese Aussage wird durch CHAMBIN *et al.* (1996) bestätigt, die eine höhere perkutane Absorption von Östradiol durch dünnere Hautschichten beobachteten. Dagegen gehen ELIAS *et al.* (1981) davon aus, dass die Zahl der Zellschichten und die Dicke des *Stratum corneum* keinen entscheidenden Einfluss auf die Hautpermeabilität haben, sondern dass die Lipidkonzentration der bestimmende Faktor ist.

Beim Menschen kennt man beispielsweise die regionalen Unterschiede der Permeation von Hydrocortison durch die Haut. Sie ist groß am Skrotum und wird zusehends geringer an der Stirn, Achselhöhle, Handfläche und Fußsohle (FELDMANN u. MAIBACH 1967; KARZEL u. LIEDTKE 1989). Zum Beispiel ist die Wirkstoffresorption von Hydrocortison im Vergleich zum ventralen Unterarm am Skrotum 42mal höher (FELDMANN u. MAIBACH 1967). Dieser Unterschied korreliert mit der Anzahl der Zellschichten im *Stratum corneum* normaler Haut, die von

verschiedenen Körperregionen ermittelt wurden. Die geringste Anzahl von Zelllagen wurde in der Genitalhaut gefunden. Sie nimmt zu im Gesicht, gefolgt von Nacken, Kopf, Rumpf, Extremitäten, Handflächen und Fußsohlen. Ein Zusammenhang zwischen Geschlecht und Hornhautdicke konnte nicht festgestellt werden (YA-XIAN *et al.* 1999).

Auch das Alter kann unterschiedliche Permeationsraten verursachen. Die neonatale Haut ist viel permeabler gegenüber topisch applizierten Arzneimitteln und besitzt im Vergleich zur Größe des Körpers eine größere Fläche als die Erwachsenenhaut. Mit zunehmender Alterung wird die Haut trockener, der Lipidgehalt verringert und verändert sich, die Durchblutung nimmt ab (MERK u. BICKERS 1992). ROGERS *et al.* (1996) bestätigen in ihren Studien die Abnahme von Lipidgruppen, insbesondere die der Ceramide, im Alter und stellen außerdem fest, dass die Lipidzusammensetzung jahreszeitlichen Schwankungen unterliegt. Insgesamt ist die Lipidmenge im Winter geringer (YOSHIKAWA *et al.* 1994; ROGERS *et al.* 1996). Auch die Größe der Korneozyten variiert in Abhängigkeit von der Körperregion, dem Alter und der Jahreszeit. Mit zunehmendem Alter und im Winter werden Korneozyten größer (PLEWIG *et al.* 1997).

ROSKOS *et al.* (1986) fanden in ihren Studien heraus, dass die Penetration von Benzoesäure und Hydrocortison in „alte“ Haut deutlich geringer ist; konnten diesen Effekt aber nicht für das lipophile Testosteron oder Östradiol erzielen. Dies deutet darauf hin, dass weniger lipophile Substanzen bei älteren Menschen schlechter resorbiert werden.

BARTEK *et al.* (1972) führten *In-vivo*-Untersuchungen zur Hautpermeabilität durch und stellten dabei fest, dass diese mit folgender Reihenfolge der Spezies abnimmt: Kaninchen, Ratte, Schwein und Mensch. Sie schlossen daraus, dass Daten aus Permeabilitätsstudien, die am Schwein durchgeführt worden sind, besser auf den Menschen übertragbar sind als die von Ratte oder Kaninchen. Auch das Meerschweinchen liefert diesbezüglich Ergebnisse, die denen von Studien an Menschen ähneln, während die Resorptionsrate bei den häufig eingesetzten Versuchstieren Maus und Ratte 5-7fach höher ausfielen (PŘÍBORSKÝ u. MÜHLBACHOVÁ 1990). BRONAUGH *et al.* (1982a) kommen in ihrer Studie zu dem

Ergebnis, dass Versuchstiere nach der zu untersuchenden Substanz ausgewählt werden sollten. Sollen Untersuchungen mit der schnell penetrierenden Benzoesäure oder Acetylsalicylsäure durchgeführt werden, haben sich Schwein und Ratte als Tiermodell bewährt. Für langsam penetrierende Substanzen sollte man aufgrund der möglichen Wege durch die Anhangsorgane dicht behaarte Tiere als Hautmodell meiden. Generell eignen sich Affe und Schwein am besten, da die Resultate aus den Permeabilitätsstudien denen der an menschlicher Haut durchgeführten am meisten ähneln (BRONAUGH u. MAIBACH 1985).

#### **2.1.6.4 Metabolisierung**

Wirkstoffe, die direkt auf die Hautoberfläche aufgetragen werden, können bereits während der Resorption einem *First-pass*-Effekt in Form eines Umbaus oder Abbaus unterliegen, bevor sie in den Blutkreislauf entlassen werden. Aber auch oral oder parenteral zugeführte Pharmaka können auf arteriellem Wege in die Hautorgane gelangen und enzymatisch verändert werden (BEHRENDT *et al.* 1989). Dabei gelangen systemisch applizierte Arzneimittel über das koriale Gefäßnetz und durch die darauf folgende Diffusion in die Epidermis. Eine Besonderheit findet man bei dem Antimykotikum Griseofulvin, das über den Schweiß auf die Epidermis ausgeschieden wird und anschließend in das *Stratum corneum* hinein diffundiert. Aufgrund dessen stellt sich die Haut mit ihrer Hornschicht nicht nur als eine passive Barriere sondern, mit den sich in der Epidermis befindlichen Enzym- und Rezeptorsystemen, auch als eine aktive Barriere dar (MERK u. BICKERS 1992). Alle von Untersuchungen der Leber bekannten fremdstoffmetabolisierenden Enzymsysteme lassen sich, wenn auch in geringerer Konzentration, in der Haut nachweisen (KAPPUS 1989; HEYMANN 1994). Dabei findet eine Metabolisierung nicht nur in der Epidermis, sondern auch in den Hautanhangsgebilden wie Talgdrüsen und Haarfollikeln statt (MONTAGNA 1955; MERK u. BICKERS 1992). Der Fremdstoffmetabolismus wird in zwei Phasen eingeteilt. In der ersten Phase beteiligte Enzyme sind z.B. Cytochrom-P450-Isoenzyme, die nahezu alle

Fremdstoffe zu hochreaktiven Zwischenprodukten verstoffwechseln können. Die Enzyme der zweiten Phase koppeln Muttersubstanzen oder Zwischenprodukte an z.B. Glucuronsäure oder Essigsäure, die dann renal ausgeschieden werden können. Die Fähigkeit der Cytochrom-P450-Isoenzyme beinahe jeden Fremdstoff zu verstoffwechseln, resultiert aus ihrer Isoenzymvielfalt und der Möglichkeit, dass viele Fremdstoffe ihrerseits die Neusynthese der sie metabolisierenden Cytochrom-P450-Isoenzyme induzieren (MERK 1990; MERK u. BICKERS 1992).

Die ersten Daten über den Hautmetabolismus von Arzneistoffen betrafen vorwiegend die in der äußerlichen Dermatotherapie eingesetzten Glukokortikosteroide. Bezüglich der Metaboliten, die in der Leber und in der Haut entstehen, kann es qualitative und quantitative Unterschiede geben (BEHRENDT *et al.* 1989). Beispielsweise wird Hydrocortison hauptsächlich zu Cortison oxidiert, als Nebenprodukte können nach Reduktion der C-20-Ketogruppe die entsprechenden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Hydroxyprodukte entstehen, wobei im Gegensatz zur Leber in der Haut mehr  $20\beta$ -Derivate auftreten. Des weiteren kann auch die Doppelbindung am Kohlenstoffatom 4 reduziert werden, dabei bildet die Leber hauptsächlich  $5\beta$ -Derivate, während in der Haut  $5\alpha$ -Derivate entstehen (HSIA u. HAO 1966; GREAVES 1971). Die  $5\alpha$ -Derivate besitzen im Gegensatz zu den  $5\beta$ -Derivaten noch biologische Aktivität (KAPPAS *et al.* 1958).

In anderen Untersuchungen konnte dargestellt werden, dass Benzoylperoxid, das ein wirksames Mittel zur Behandlung der Akne des Menschen ist und auch in der Veterinärmedizin Anwendung findet, bereits in der Haut zu Benzoessäure verstoffwechselt wird (SEUBERT *et al.* 1984; KIETZMANN *et al.* 1990). Benzoylperoxid dringt schnell in die Hornschicht ein und wird innerhalb von acht Stunden vollständig zu Benzoessäure umgesetzt (SEUBERT *et al.* 1984). KIETZMANN *et al.* (1995) konnten zeigen, dass topisch appliziertes Isosorbiddinitrat bereits in der Haut zu Mononitraten metabolisiert wird.

Die Haut liefert mit ihren Enzymen einen wichtigen Beitrag zur Entgiftung des Körpers, indem sie Stoffe wasserlöslich und damit renal ausscheidbar werden lässt. Trotzdem gibt es Beispiele, bei denen durch die Metabolisierung Giftstoffe entstehen

(HEYMANN 1994). So werden Benzopyrene, die selbst nicht kanzerogen sind, dies nach enzymatischer Umwandlung durch Hydrolasen (WESTER u. MAIBACH 1984).

### 2.1.6.5 Transdermales System

Beim transdermalen System (transdermales therapeutisches System, TTS) handelt es sich um eine Pflasterapplikation zur systemischen Therapie, bei der eine gute Resorption und Penetration des Wirkstoffes durch die Haut erreicht werden soll (NEURAND u. MEYER 1987; MERK u. BICKERS 1992). Diese transkutanen Wirkstoffapplikationssysteme, die ein Wirkstoffreservoir und eine seine Freisetzung kontrollierende Membran enthalten, erlauben die Anwendung von Pharmaka durch die Oberfläche der unverletzten Haut in stets gleichbleibender Konzentration und über längere Zeit (LANDMANN 1991). 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). Beispielsweise werden in dieser Form Scopolamin zur Behandlung der Reisekrankheit, Nitroglyzerin zur Prävention von *Angina-pectoris*-Anfällen und Östradiol zur Östrogensubstitution in der Menopause angewendet (STÜTTGEN *et al.* 1986; CHIEN 1988). Nitroglyzerin hat eine Plasmahalbwertszeit nach sublingualer Gabe von wenigen Minuten. Mit der transdermalen Applikationsform wird jedoch ein konstanter Plasmaspiegel über einen Zeitraum von 24 Stunden erreicht (WESTER u. MAIBACH 1984; HADGRAFT 1996). Die Vorteile des transdermalen Systems liegen in der Umgehung gastrointestinaler oder hepatischer *First-past*-Effekte und der Vermeidung von gastrointestinaler Unverträglichkeiten. Ferner können die Dosis und damit Nebenwirkungen reduziert werden. Langzeittherapien ohne Plasmaspiegelschwankungen sind möglich. Dies alles führt letztendlich auch zu einer verbesserten Akzeptanz beim Patienten (KARZEL u. LIEDTKE 1989; BERNER u. JOHN 1994; HADGRAFT 1996).

Nachteilig an diesem Verfahren ist, dass nicht jedes Arzneimittel die Hautbarriere überwinden kann, so dass in solchen Fällen eine Resorption der Wirksubstanz in der Haut nur durch eine Schädigung bzw. Veränderung der Barriere erzielt werden kann. Hilfsmittel dafür sind z.B. Vehikel (Trägersubstanzen für Medikamente) und chemische Permeationenhancer, wie z.B. Dimethylsulfoxid (DMSO) (NEURAND u. MEYER 1987). Auch physikalische Verfahren wie die Iontophorese, Phonophorese oder eine Wärmebehandlung können die Penetration durch das *Stratum corneum* beeinflussen (KALBITZ *et al.* 1996). Eine weitere Möglichkeit ist das Abdecken der Haut mit wasserundurchlässigen Salben oder Folien (Okklusivverbände). Dadurch lässt sich der Wassergehalt der oberen Hautschicht vermehren und die Resorption verbessern (FICHTL 2001). Die erhöhte Feuchtigkeit und Temperatur auf der Hautoberfläche kann die perkutane Resorption pharmakologisch aktiver Substanzen um das fünf- bis zehnfache verstärken (MERK u. BICKERS 1992).

Stoffeigenschaften und Wirkbedingungen, die als günstige Voraussetzungen für eine Applikation eines Pharmakons in Form eines transdermalen therapeutischen Systems gelten, sind eine niedrige Molekülmasse, eine ausreichende Lipid- und Wasserlöslichkeit, eine niedrige Wirkdosis und eine Latenz des Wirkungseintritts (KARZEL u. LIEDTKE 1989).

## **2.2 Pharmakokinetik lokal applizierter Stoffe**

Nach der topischen Applikation eines Arzneimittels besteht initial ein großes Konzentrationsgefälle zwischen dem Vehikel (Salbengrundlage, Lösungsmittel) und dem *Stratum corneum*. Durch passive Diffusion gelangt der Wirkstoff in die Hornschicht, in der sich für viele Stoffe ein Depot ausbildet, aus dem der Wirkstoff in tiefer gelegene Hautschichten diffundiert. Dort ist ein exponentieller Abfall der Wirkstoffkonzentration messbar (KIETZMANN 2002). Prinzipiell handelt es sich im Bereich der Hornschicht um eine langsame und damit die Gesamtgeschwindigkeit bestimmende Diffusion, während die Passage durch die Epidermis und Dermis schnell erfolgt (SCHEUPLEIN 1967; BLANK u. SCHEUPLEIN 1969). Die Diffusion

durch die Hornschicht ist insbesondere für hydrophile Arzneistoffe geschwindigkeitsbestimmend; für sehr lipophile Substanzen gewinnt auch die Diffusion durch die vitalen Schichten an Relevanz (NEUBERT *et al.* 2001).

Für die Penetration von Substanzen in die Haut gelten die allgemein gültigen Gesetze der Diffusion durch Membranen. Auch das Vorhandensein aktiver Transportvorgänge gegen einen Konzentrationsgradienten wird angenommen (HADGRAFT 2001). Aktive Transportvorgänge spielen bei der Aufnahme durch die Haut aber keine wesentliche Rolle (SCHEUPLEIN 1978; SCHAEFER *et al.* 1982; BARRY 1983). Physikalische Grundlage der passiven Diffusion von Substanzen ist die Brown'sche Molekularbewegung. Durch die zufällige, 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, kommt es nach einer zeitlichen Verzögerung (*lag time*) während der Anreicherung der Substanz in der Membran allmählich zu einem Gleichgewichtszustand (*steady state*) des transmembranären Flusses, der solange bestehen bleibt, wie einerseits auf der Membranoberfläche ein genügend großer Pharmakonvorrat gegeben und andererseits ein kontinuierlicher Substanzabstrom (*perfect sink*) gewährleistet ist (STÜTTGEN *et al.* 1986; MERK u. BICKERS 1992). SCHEUPLEIN (1967) und SCHEUPLEIN *et al.* (1969) weisen darauf hin, dass in der Anfangsphase die Diffusion über die *Shunts* erfolgt und im *Steady state* die Diffusion durch die Hornschicht dominiert.

Dieser Substanzfluss wird, basierend auf dem ersten Fick'schen Diffusionsgesetz, durch folgende Gleichung beschrieben:

$$J_s = k_m \frac{D}{d} (c_I - c_{II}) = P \Delta c_s \quad (1)$$

$J_s$  = *Steady-state*-Fluss [Masse/Länge<sup>2</sup>/Zeit]

$k_m$  = Verteilungskoeffizient Membran/Vehikel

$D$  = Diffusionskoeffizient [Länge<sup>2</sup>/Zeit]

$c_I$  = Konzentration an der Oberseite der Membran [Masse/Länge<sup>3</sup>]

$c_{II}$  = Konzentration an der Unterseite der Membran [Masse/Länge<sup>3</sup>]

$P = k_m \times D/d$  [Länge/Zeit] = Permeabilitätskoeffizient

$d$  = Dicke der Membran [Länge]

$\Delta c_s$  = Konzentrationsdifferenz über der Membran im *steady state* [Masse/Länge<sup>3</sup>],

wobei die Membran als isotropes Medium angenommen wird. Mathematisch kann der transepidermale Weg als ein in Serie angeordnetes System von Membranbarrieren aufgefasst werden. Aus der Summe der Einzelwiderstände ergibt sich ein Gesamtwiderstand. In Analogie zum Ohm'schen Gesetz kann durch die Einführung des Diffusionswiderstandes  $R$  (2) zu (3) umgeformt werden (STÜTTGEN *et al.* 1986; MERK u. BICKERS 1992).

$$R = \frac{1}{P} = \frac{d}{k_m D} \left[ \frac{\text{Zeit}}{\text{Länge}} \right] \quad (2)$$

$$J_s = \frac{1}{R} \Delta c_s \quad (3)$$

Die Diffusionskonstante ist eine Größe für den Transport eines Arzneimittels durch das *Stratum corneum*. Sie ist reziproportional zur molekularen Größe der Substanz und zur Viskosität der Zellen. Das *Stratum corneum* ist nach MERK u. BICKERS (1992) extrem viskös, so dass die Diffusionskonstante vieler Substanzen relativ niedrig ist.

Der Permeationskoeffizient ( $P$ ) ist abhängig von der Molekülmasse ( $MW$ ) und dem Verteilungsverhalten einer Substanz. Um das Verteilungsverhalten zu beschreiben, wird der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient ( $K_{Oct}$ ) verwendet (NEUBERT *et al.* 2001). Mit der Molekülmasse und dem Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten sind von BROWN u. ROSSI (1989), FISEROVA-BERGEROVA *et al.* (1990), McKONE u. HOWD (1992), ROBINSON (1993) und GUY u. POTTS (1993) verschiedene Rechenmodelle entwickelt worden, um den Permeationskoeffizienten bestimmen zu können. WILSCHUT *et al.* (1995) haben diese fünf Modelle auf ihre Verlässlichkeit hinsichtlich des errechneten Permeationskoeffizienten geprüft und kommen zu dem Ergebnis, dass das Model von ROBINSON (1993) nach einer Modifikation die zuverlässigsten Ergebnisse liefert. Die folgende Gesamtgleichung zur Berechnung des Permeationskoeffizienten ( $P$ ) für Substanzen aus wässrigen Lösungen basiert auf diesem von WILSCHUT *et al.* (1995) modifizierten Modell.

$$P = \frac{1}{\frac{1}{P_{sc} + P_{ol}} + \frac{1}{P_{aq}}} \left[ \frac{cm}{h} \right] \quad (4)$$

Dabei gelten folgende Einzelgleichungen für die Fraktionen des *Stratum corneum*:

Permeationskoeffizient der Lipidfraktion:

$$\log P_{sc} = -1,326 + 0,6097 \log K_{ow} - 0,1786 \sqrt{MW} \quad (5)$$

Permeationskoeffizient der Proteinfraction:

$$P_{ol} = \frac{0,0001519}{\sqrt{MW}} \quad (6)$$

Permeationskoeffizient der wässrigen Anteile der (epi)dermalen Schichten:

$$P_{aq} = \frac{2,5}{\sqrt{MW}} \quad (7)$$

Deutlich wird anhand der Gleichungen (4 – 7), dass die Diffusionsgeschwindigkeit von Molekülen mit ansteigender Größe abnimmt und lipophilere Moleküle besser permeieren können (GUY u. POTTS 1992a,b; HADGRAFT 2001).

Letztendlich spielen die chemisch-physikalischen Eigenschaften der topisch applizierten Substanz eine Rolle. Es handelt sich dabei um die Wasser- oder Lipidlöslichkeit, die Polarität und die Molekülgröße. Auch die mögliche Metabolisierung und die Grundlage, in der ein Arzneimittel angeboten wird, sind relevant. Dazu addieren sich gewebsspezifische Faktoren, wie Durchblutung, Lymphabfluss, Zellpermeabilität, Weite der Interzellularräume und der Zustand der Hornschicht (STÜTTGEN 1972).

Die Pharmakokinetik im engeren Sinne befasst sich mit dem zeitlichen Verlauf der Konzentration eines Pharmakons im Organismus. Der zeitliche Verlauf wird durch die Vorgänge der Resorption und Elimination bestimmt. Man unterscheidet zwischen einem Prozess 0. Ordnung und einem Prozess 1. Ordnung. Bei einem Prozess 0. Ordnung wird eine konstante Menge einer verabreichten Substanz pro Zeiteinheit resorbiert bzw. eliminiert. Bei einem Prozess 1. Ordnung wird pro Zeiteinheit jeweils ein bestimmter Anteil aufgenommen bzw. ausgeschieden. Dadurch ergibt sich ein exponentieller Kurvenverlauf (FREY 2002). Zur mathematischen Beschreibung dienen Exponentialfunktionen, da zeitliche Verläufe der Arzneimittelkonzentrationen im Organismus zumeist nach einer Kinetik 1. Ordnung ablaufen. Die Exponentialfunktionen lassen sich halblogarithmisch als Gerade darstellen (KIETZMANN u. LÖSCHER 1991).

Der zeitliche Verlauf von Wirkstoffkonzentrationen in Blut, Plasma oder Exkreten lässt sich mit Hilfe sogenannter Kompartiment-Modelle analysieren. Beim offenen **Ein-Kompartiment-Modell** wird der gesamte Körper als Verteilungsraum gesehen. Eine Substanz wird intravenös injiziert, verteilt sich in einem Kompartiment und wird renal eliminiert. Das **Zwei-Kompartiment-Modell** besteht aus dem Plasmaraum (zentrales Kompartiment) und dem theoretischen Verteilungsraum (peripheres Kompartiment). Dieses Modell beschreibt also die Verhältnisse für ein Pharmakon, das sich zunächst im Kreislauf und den gut durchbluteten Organen verteilt und

anschließend in den Extrazellulärraum übertritt und gleichzeitig ausgeschieden wird. Entsprechend gibt es noch Drei- und Mehr-Kompartiment-Modelle, mit denen Elimination sowie Hin- und Rückverteilung zwischen den einzelnen Kompartimenten beschrieben werden können (KUSCHINSKY u. LÜLLMANN 1989).

GUY und HADGRAFT (1984) entwickelten ein Vier-Kompartiment-Modell (Abb. 5) mit den Kompartimenten Hautoberfläche (1), *Stratum corneum* (2), Blut (3) und Urin (4) mit den dazugehörigen Konzentrationen ( $c_{1-4}$ ) und den Volumina ( $V_{1-3}$ ) in den Kompartimenten sowie den Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{1-4}$ ) für die perkutane Resorption. Für die Aufnahme des Wirkstoffs aus dem Vehikel in die Haut und von der Haut in das Blutgefäßsystem wird eine Kinetik 1. Ordnung vorausgesetzt (GUY u. HADGRAFT 1983, 1984). Der Weg eines Wirkstoffmoleküls aus einer galenischen Formulierung 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 u. HADGRAFT 1984). Die Geschwindigkeitskonstanten sind abhängig von der mittleren freien Weglänge und der mittleren Geschwindigkeit der diffundierenden Teilchen. Sie sind im Bereich wasserreicher Hautschichten um etwa eine Zehnerpotenz größer als in der trockenen Hornschicht (STÜTTGEN 1972). Die Diffusion einer topisch applizierten Substanz erfolgt gerichtet vom *Stratum corneum* ins Blutgefäßsystem. Der entgegengesetzte Weg aus den Blutgefäßen in die Hornschicht ist geringer ausgeprägt und stoffabhängig. Die Geschwindigkeitskonstante  $k_3$  wird dann bedeutsamer, wenn die Affinität einer Substanz zum *Stratum corneum* ausgeprägt ist und es zur Ausbildung eines Depots kommt (GUY u. HADGRAFT 1984).

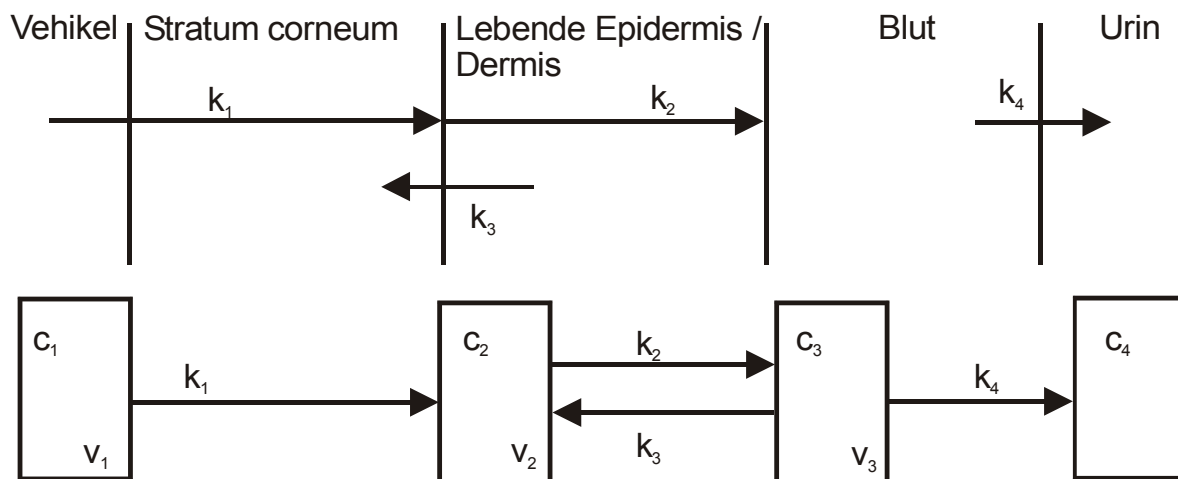


Abb. 5: Kompartimentmodell der perkutanen Absorption (nach GUY u. HADGRAFT 1984),  $c$  = Konzentration im Kompartiment,  $k$  = Geschwindigkeitskonstante,  $V$  = Volumen im Kompartiment

## 2.3 Testsubstanzen

In den Versuchen wurden die Testsubstanzen Benzoesäure, Hydrocortison und Testosteron verwendet.

### 2.3.1 Benzoesäure

Benzoesäure (Abb. 6) gehört in die Stoffklasse der aromatischen Monocarbonsäuren. Sie ist in kaltem Wasser schwer, in Alkohol, Äther, Aceton, Chloroform, Benzol und heißem Wasser leicht löslich. Benzoesäure wird als Konservierungsmittel für Lebensmittel sowie zur Verhütung der Schimmelbildung im Tabak und in Klebstoffen verwendet. Sie kommt in der Natur sowohl in freier als auch in gebundener Form in zahlreichen Pflanzen vor (ANONYMUS 1998, 2001).

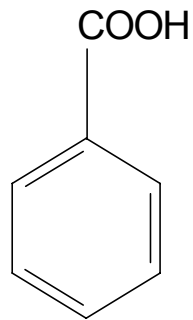


Abb. 6: Strukturformel von Benzoesäure

### 2.3.2 Hydrocortison

Hydrocortison (Abb. 7), auch als Cortisol bezeichnet, ist ein Glukokortikoid, das zu den Nebennierenrindenhormonen gehört (ANONYMUS 1998). Hydrocortison ist bei einer Temperatur von 25 °C in Wasser schlecht löslich. Die Löslichkeit verbessert sich in Ethanol, Methanol, Aceton und Chloroform. Sehr leicht löslich ist Hydrocortison in Dioxan (ANONYMUS 1990).

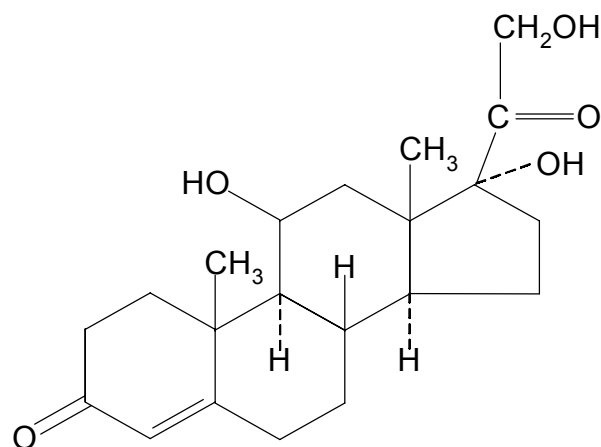


Abb. 7.: Strukturformel von Hydrocortison

### 2.3.3 Testosteron

Testosteron (Abb. 8) ist ein männliches Keimdrüsenhormon. Es ist fast unlöslich in Wasser und wenig löslich in Ether und Pflanzenölen. Leicht löslich ist es in Chloroform, Dioxan, Aceton und Ethanol (FALBE u. REGITZ 1999).

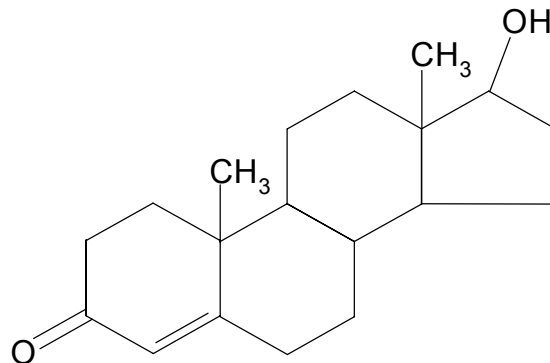


Abb. 8: Strukturformel von Testosteron

### 2.3.4 Benzoesäure, Hydrocortison und Testosteron als Testsubstanzen der transdermalen Penetration

Benzoessäure, Hydrocortison und Testosteron dienen aufgrund ihres unterschiedlichen pharmakokinetischen Verhaltens als Modellsubstanzen in dermalen Resorptionsstudien. Beispielsweise wurden Benzoesäure, Hydrocortison und Testosteron eingesetzt, um die Effektivität der Barrierefunktion von einem rekonstruierten Epidermismodell im Vergleich zur menschlichen Haut zu überprüfen; mit dem Ergebnis, dass das getestete Hautäquivalent durchlässiger ist (REGNIER *et al.* 1993).

WESTER u. MAIBACH (1975,1976) führten nach topischer Applikation von Benzoesäure, Hydrocortison und Testosteron auf die Haut vergleichende *In-vivo*-Studien bei Mensch und Rhesusaffe durch. Es konnte gezeigt werden, dass bei

beiden Spezies eine ähnliche Resorption dieser Substanzen durch die Haut stattfindet (s. Abb. 9).

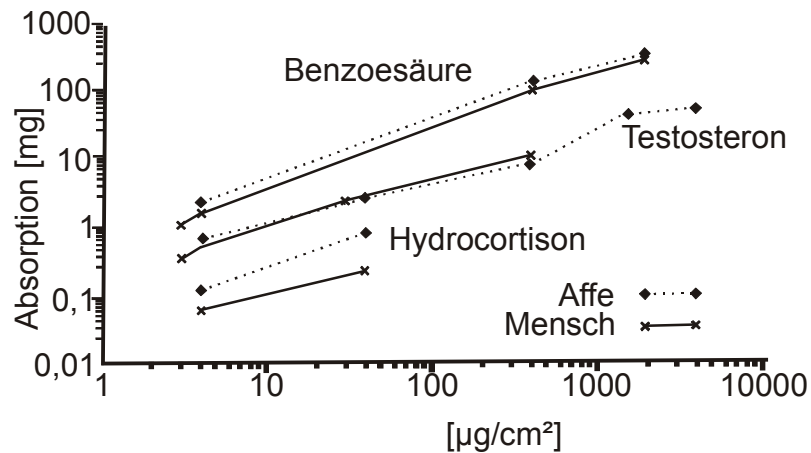


Abb. 9: Vergleich der perkutanen Absorption nach topischer Applikation von ansteigenden Dosen von Benzooesäure, Hydrocortison und Testosteron bei Resusaffe und Mensch (nach WESTER u. MAIBACH 1976)

GUY u. HADGRAFT (1984) haben Bezug nehmend zu ihrem Vier-Kompartiment-Modell (Abb. 5) die Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{1-4}$ ) für Benzooesäure, Hydrocortison und Testosteron bestimmt (Tab. 14). Geschwindigkeitskonstanten sind für jeden Stoff charakteristisch und bedingen zum Teil erhebliche Unterschiede in ihrem pharmakokinetischen Verhalten. Dies wird insbesondere bei den hier genannten Modellsubstanzen deutlich. Benzooesäure penetriert schnell in und durch die Haut. Dies führt zu einer kurzen Plasmahalbwertszeit und zu einer hohen Ausscheidungsrate. Testosteron dringt relativ langsam in die Hornschicht ein und flutet langsam ab. Hydrocortison tritt noch langsamer aus der Grundlage in die Hornschicht über und flutet insgesamt langsamer ab. Es kommt zu einer ausgeprägten Reservoirbildung in der Hornschicht (GUY u. HADGRAFT 1984). Daraus ergeben sich für die drei Substanzen unterschiedliche Verteilungsprofile im Plasma (Abb. 10).

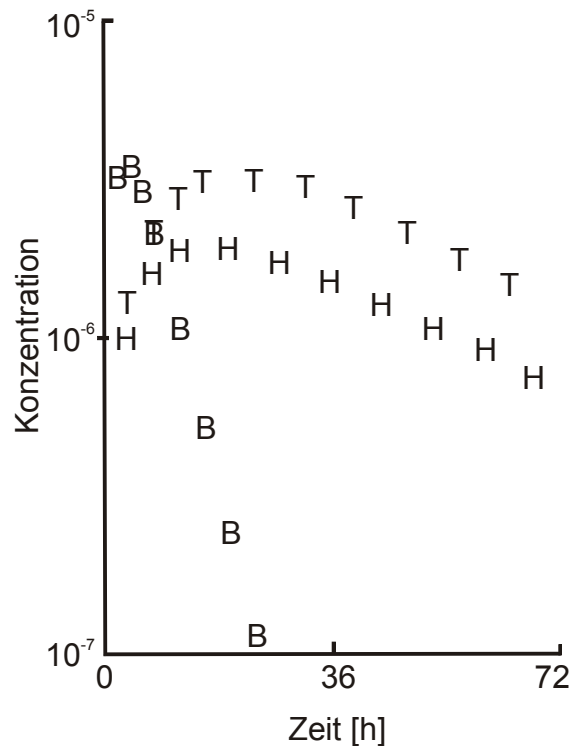


Abb. 10: Schematische Verteilungsprofile im Plasma als Zeitfunktion für Testosteron (T), Hydrocortison (H) und Benzoessäure (B) ( nach GUY u. HADGRAFT 1984)

## 2.4 Das isoliert perfundierte Rindereuter

Bei dem isoliert perfundierten Rindereuter handelt es sich um ein *In-vitro*-Modell, das sich für die Untersuchung der dermalen Resorption von topisch applizierten Substanzen eignet und sich dabei als Ersatzmethode für Tierversuche bewährt hat (NEUBERT *et al.* 2001). Die Milchdrüse der Kuh fällt als Nebenprodukt der Schlachtung an; sie bietet eine große Applikationsfläche auf der Haut und am isolierten Organ sind die für die Perfusion nötigen arteriellen und venösen Gefäße gut zugänglich.

### 2.4.1 Anatomie des Rindereuters

Die Milchdrüse, eine modifizierte Schweißdrüse, erreicht im Anschluss an die Geburt des Kalbes ihre volle Größe und Funktion. Das Euter des Rindes stellt einen großen, halbkugeligen und inguinal gelegenen Drüsenkörper dar, der aus vier Mammarkomplexen mit je einer Zitze zusammengesetzt ist. Form und Größe der Rindermilchdrüse können sehr variabel sein (HABERMEHL 1996). Das mediane Aufhängeband teilt das Euter in zwei Hälften. Die Hohlraumsysteme und die Drüsenbezirke der Viertel bilden jeweils eine selbständige Einheit (WENDT *et al.* 1994). Der Hautüberzug ist dünn, leicht auf der Unterlage verschieblich und nur spärlich mit dünnen Haaren besetzt (HABERMEHL 1996).

An den Zitzen läßt sich die Haut nicht von ihrer Unterlage abheben, sie stellt einen Bestandteil der Zitzenwand dar. Das Euter ist durch Bänder und Lamellen straff mit der ventralen Bauchwand verbunden. Ein Drüseneuter fühlt sich im gefüllten Zustand fest, aber nicht hart an; nach dem Ausmelken ist es weich und schlaff und seine Haut längsgefaltet (HABERMEHL 1996).

### 2.4.2 Blutgefäßversorgung, Lymphsystem, Innervation

Die arterielle Vaskularisation (Abb. 11) des Rindereuters wird vorwiegend durch die *A. pudenda externa* sichergestellt; zusätzlich werden geringe kaudale Anteile von Ästen der *A. pudenda interna* und kraniale Anteile von der *A. epigastrica caudalis* versorgt (Wendt *et al.* 1994). Die *A. pudenda externa* tritt als stärkstes Gefäß an das Euter. Nach dem Durchtritt durch den Leistenspalt verläuft sie in einer S-förmigen Schleife zur Euterbasis, entläßt den *Ramus basalis caudalis* zur Versorgung der Euterlymphknoten (wobei letzterer alternativ auch später von der *A. mammaria caudalis* abgegeben werden kann) und tritt senkrecht oberhalb der Schenkelzitze unter Aufteilung in die *A. mammaria cranialis* und die *A. mammaria caudalis* in das Parenchym ein. Die *A. mammaria cranialis* zieht nach kranioventral und versorgt den

kranio-lateralen Teil des Schenkelviertels und den lateralen Teil des Bauchviertels. Sie gibt mehrere Aa. laterales sinus cranialis und *caudalis* ab, aus denen eine *A. papillaris* für die Bauchzitze und gelegentlich eine für die Schenkelzitze hervorgeht. Die *A. mammaria caudalis* versorgt das Drüsengewebe des Schenkelviertels; aus ihren Verzweigungen geht eine *A. papillaris* für die Schenkelzitze hervor, wenn dies nicht bereits durch die *A. mammaria cranialis* geschehen ist. Das dritte bedeutende Eutergefäß ist die *A. mammaria media*, die sich in den *Ramus cranialis* und *Ramus caudalis* teilt und die medialen Bereiche des Bauch- bzw. Schenkelviertels versorgt. Der Ursprung der *A. mammaria media* ist individuell unterschiedlich; er kann die *A. mammaria cranialis*, die *A. mammaria caudalis* oder der Teilungswinkel der zuletzt genannten sein. Ferner bietet das Gefäßnetz arterio-arterielle Anastomosen zwischen Gefäßen derselben Seite und Querverbindungen zwischen den Euterhälften (LE ROUX u. WILKENS 1959).

Bei der Milchdrüse des Rindes sind verschiedene Blutabflußwege (Abb. 11) ausgebildet. Ausgehend von der Zitzenspitze, verlaufen untereinander verbundene Venen (*Plexus venosus papillae mammae*) zum an der Zitzenbasis gelegenen Fürstenbergschen Venenring. Von hier aus ziehen oberflächliche und tiefe Venen zur Euterbasis (KOCH u. BERG 1993) und treten in die vordere und hintere Euterve (V. *mammaria cranialis* und *caudalis*) ein. Diese sind durch Queranastomosen mit den Gefäßen der Gegenseite verbunden und bilden den *Circulus venosus mammae*. Aus ihm wird das Blut nach kranial durch die Milchader (V. *epigastria cranialis superficialis*) abgeführt und nach kaudal durch die durch den Leistenspalt tretende V. *pudenda externa* (HABERMEHL 1996).

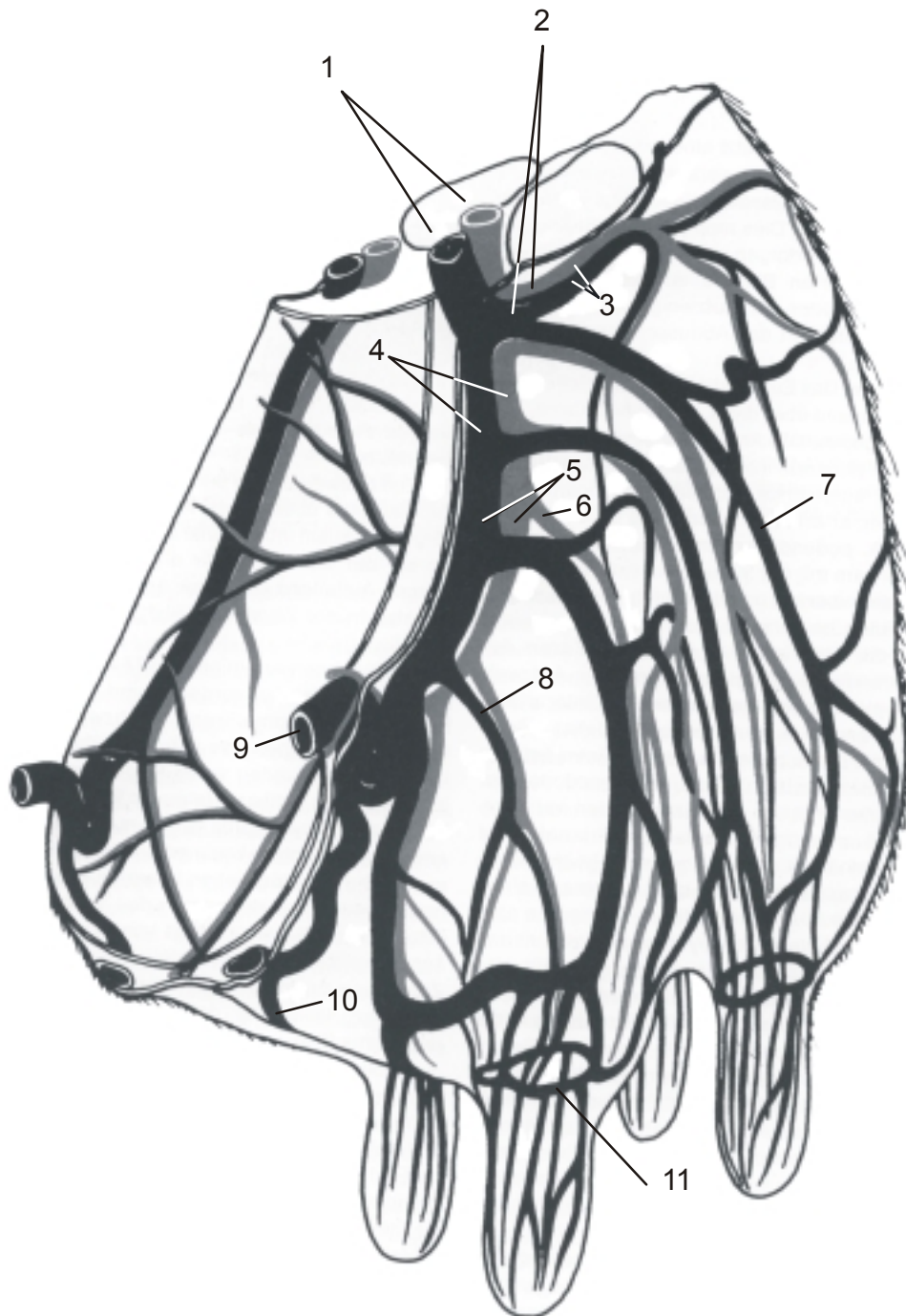


Abb. 11: Blutgefäßversorgung des Rindereuters (nach WENDT *et al.* 1994)

1 A. u. V. pudenda externa; 2 A. u. V. mammaria caudalis; 3 Ramus basalis caudalis; 4 A. u. V. mammaria cranialis; 5 Ramus basalis cranialis; 6 A. mammaria media; 7 V. lateralis superficialis caudalis; 8 V. lateralis profunda cranialis; 9 V. epigastrica cranialis superficialis; 10 V. superficialis med.; 11 Fürstenbergscher Venenring

Bei den Lymphgefäßen unterscheidet man unmittelbar unter der Haut liegende oberflächliche und aus dem Parenchym hervortretende tiefe Gefäße. Sie verlaufen von der Zitzenbasis, wo sie sich mit Zitzenlymphgefäßen vereinigen, zur Euterbasis und dringen als afferente Lymphgefäße in die Euterlymphknoten ein (WENDT *et al.* 1994). Die Euterlymphknoten (*Nll. mammarii*) gehören zum *Lymphocentrum inguinale superficiale* und liegen weit kaudal im Zwischenschenkelspalt, wo sie unter Anheben des Euters von hinten tastbar sind (HABERMEHL 1996). Größe und Anzahl der *Nll. mammarii* zeigen eine große individuelle Schwankung (HAMPL 1967).

Die sensible Innervation wird vorwiegend durch den *N. genitofemoralis* gewährleistet. Er innerviert die Haut, das Drüsengewebe und die Zitzen, ausgenommen die hintersten Abschnitte der Schenkelviertel. Die Haut der Bauchviertel und der vorderen Abschnitte der Euterbasis werden durch den *N. iliohypogastricus* und den *N. ilioinguinalis* sensibel versorgt. Die Innervation der Haut an der Hinterfläche der Schenkelviertel übernimmt der *N. pudendus*. Eine vegetative Innervation erfolgt über sympathische Fasern des *Ganglion mesentericum caudale*, die die Korbzellen, Gefäße und glatten Muskelfasern versorgen. Parasympathische Fasern konnten nicht nachgewiesen werden (HABERMEHL 1996).

### **2.4.3 Untersuchungen an isoliert perfundierten Rindereutern**

Bereits Ende der 30er Jahre wurden erste Untersuchungen an isoliert perfundierten Rindereutern von PETERSEN *et al.* (1931, 1941) durchgeführt, um die Physiologie der Milchbildung zu erfassen. Perfundiert wurde mit heparinisiertem Vollblut im geschlossenen Kreislauf bei einem Druck von 120 mmHg unter Einsatz eines künstlichen Herzens und einer künstlichen Lunge über durchschnittlich 360 Minuten. PEETERS u. MASSART (1947, 1952a,b), PEETERS *et al.* (1953) und TINDAL (1957) benutzten eine ähnlich aufgebaute Perfusionsapparatur, bei der jedoch beide Euterhälften getrennt voneinander perfundiert wurden.

BRÄUNIG (1979) teilt Euter in zwei Hälften und perfundiert eine Hälfte, um die Passage von Sulfonamiden über die Blut-Euter-Schranke zu untersuchen. Dabei

wurde ein offenes Perfusionssystem mit einer Erythrozyten-Tyrode-Suspension benutzt.

In den 90er Jahren wurde das isoliert perfundierte Rindereuter erstmals als Hautmodell eingesetzt, um die transdermale Penetration und Resorption verschiedener Wirkstoffe zu erforschen (ARENS 1991; KIETZMANN *et al.* 1993, KIETZMANN *et al.* 1995). Perfundiert wurde mit einer Tyrodelösung in einem offenen System. ARENS (1991) etablierte das Modell und stellte in ihrer Arbeit den Einfluss verschiedener galenischer Formulierungen auf die Resorption von Benzoylperoxid, Dexamethason und Etofenamat dar. Auch KIETZMANN u. BLUME (1997) nutzten das Modell aus, um Resorptionsunterschiede eines dermal applizierten Glukokortikoids zu untersuchen. Desweiteren sollte festgestellt werden, ob Propylenglykol am Rindereuter penetrationsfördernd wirkt und ob vorab verabreichtes Aceton durch Hautschädigung die dermale Resorption beeinflusst. MAASS (1993) entwickelte für das isoliert perfundierte Rindereuter Parameter (Glukoseverbrauch, Laktatproduktion, Laktatdehydrogenase-Aktivität, Hauttemperatur, Hautfaltendicke) anhand derer festgestellt werden kann, ob ein Euter während des Versuchszeitraumes vital ist. Ferner applizierte sie auf die Euterhaut Substanzen mit bekannten hautreizenden Eigenschaften. Es sollte herausgefunden werden, ob das isoliert perfundierte Rindereuter auch ein geeignetes Modell zur Prüfung der Hauttoxizität ist und sich als Alternative zum gesetzlich vorgeschriebenen Draize-Test anbietet. Stark reizende Substanzen (Salzsäure, Ameisensäure, Natronlauge) lassen Effekte erkennen. Schwach reizende Substanzen können am isoliert perfundierten Rindereuter nicht identifiziert werden (MAASS 1993).

ARENS (1991) und KIETZMANN *et al.* (1993) konnten zeigen, dass eine *In-vitro*-Metabolisierung von Benzoylperoxid und Isosorbiddinitrat in der Haut stattfindet. Damit hat das Modell des isoliert perfundierten Rindereuters das Ergebnis *in vivo* durchgeführter Untersuchungen beim Menschen und *in vitro* vorgenommener Studien an exzidierte Hundehaut bestätigt, daß Benzoylperoxid in der Haut beinahe vollständig zu Benzoessäure metabolisiert wird (SEUBERT *et al.* 1984, KIETZMANN *et al.* 1990). Nachdem KIETZMANN u. LÖSCHER (1993) das isoliert perfundierte

Rindereuter als weiteres *In-vitro*-Modell für Prüfungen zur dermalen Penetration und Resorption vorgestellt hatten, wurden durch LUDEWIG *et al.* (1996) histologisch-histochemische Untersuchungen zum Bau der Euterhaut des Rindes unter Berücksichtigung der Veränderungen durch die Perfusion im Rahmen des Eutermodells durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass der Bau der Euterhaut des Rindes dem allgemeinen Aufbau der äußeren menschlichen Haut entspricht. Die Struktur der Epidermis bleibt bei der Perfusion der Milchdrüse erhalten. Aufgrund verschiedener Studien mit Kosmetika und Dermatika weisen PITTERMANN *et al.* (1995) und FÖRSTER *et al.* (1999) nach, dass das Eutermodell bezüglich der Untersuchung der Hautpenetration und -resorption sowie bei Irritationseffekten einen hohen Vorhersagewert für den Einsatz am Menschen hat.

EHINGER (1998) nutzt das isoliert perfundierte Rindereuter als pharmakokinetisches Modell, indem er die Verteilung von intrazisternal verabreichten Antibiotika im Drüsengewebe und deren Übertritt ins Perfusat untersucht. Der Vergleich der *In-vitro*-Ergebnisse mit den Daten aus *In-vivo*-Versuchen zeigt, daß nur beschränkt absolute Aussagen zu Konzentrationen im Drüsengewebe gemacht werden können. Das Eutermodell eignet sich jedoch, um z.B. eine Vorauswahl für *in vivo* zu testende Formulierungen zu treffen (EHINGER u. KIETZMANN 2001).

GROß (2000) testete am isoliert perfundierten Euter erfolgreich biotechnologisch gewonnene Enzyme, die bei einer Wildtierimmobilisation eine Resorptionsbeschleunigung des Anästhetikums nach intramuskulärer Applikation bewirken sollen. Es handelte sich dabei um Neuentwicklungen, die noch nicht am Tier eingesetzt worden waren und zuerst am isoliert perfundierten Rindereuter getestet werden sollten.

Weiter wurde geprüft, ob sich das isoliert perfundierte Rindereuter als ein *In-vitro*-Entzündungsmodell eignet und eine Alternative oder zumindest eine Ergänzung zu *In-vivo*-Entzündungsmodellen (Mäuseohr) darstellt. Dabei wurde zuerst auf die Euterhaut Arachidonsäure verbracht, um das Verhalten von Entzündungsparametern zu beobachten (Eicosanoidsynthese, Hyperämie, Ödem) und anschließend mit steroidal und nichtsteroidal Antiphlogistika behandelt (BÄUMER u. KIETZMANN

2000, 2001). OPAS *et al.* (1985) konnten einen Anstieg der Prostaglandin E<sub>2</sub>-Konzentration nach Arachidonsäureapplikation am Mäuseohr feststellen. Die Versuche von BÄUMER u. KIETZMANN (2000, 2001) zeigten, dass sich das isoliert perfundierte Rindereuter gleichermaßen wie das durch Arachidonsäure entzündete Mäuseohr für Studien von Wirkstoffen eignet, die die Eicosanoidsynthese in der Haut beeinflussen. BÄUMER (1999) benutzt erstmals die Mikrodialyse am isoliert perfundierten Rindereuter.

## 2.5 Mikrodialyse

Die Mikrodialyse (Abb. 12) wird bereits seit über zwei Jahrzehnten zur Messung neurochemischer Abläufe (z.B. im Gehirn) genutzt. Daneben findet dieses Verfahren auch eine Anwendung in der Dermatologie. ANDERSON *et al.* (1991) führten als Erste eine Mikrodialyse an der Haut nach topischer Applikation von Ethanol durch. Die kutane Mikrodialyse ist eine minimal-invasive und *in vivo* einsetzbare Methode, mit der eine kontinuierliche Messung von Gewebespiegeln freier, ungebundener Substanz in der Haut möglich ist. Basierend auf dem Prinzip der Dialyse wird eine semipermeable Membran in die Haut eingebracht, über die Substanzen durch freie Diffusion aufgrund eines Konzentrationsgefälles zwischen interstitiellem Raum der Dermis und der Dialyseflüssigkeit gewonnen werden. Die semipermeable Membran ist in unterschiedlichen Längen verfügbar, die Perfusatflussrate liegt üblicherweise zwischen 1 und 5 µl/min. Durch den zusätzlichen Einsatz der Mikrodialyse kann man genauere Informationen über die Verteilung eines Wirkstoffes und die Pharmakokinetik im Gewebe erhalten, als dies mit der alleinigen Bestimmung mittels Plasmakonzentrationen möglich ist (KOVAR *et al.* 1997, GOTTLÖB *et al.* 2002). Um die Menge der diffundierten Substanz zu beschreiben, spricht man von relativer oder absoluter Wiederfindung. Die relative Wiederfindung ist das Verhältnis der Konzentration einer Substanz im Dialysat zu ihrer Konzentration im Interstitium. Die absolute Wiederfindung kann als die Menge einer Substanz angegeben werden, die pro Zeiteinheit im Dialysat vorgefunden wird (UNGERSTEDT 1991). Verschiedene

Faktoren wie z.B. Beschaffenheit der Dialysemembran, Perfusionsrate und -medium, Substanzeigenschaften und Temperatur haben Einfluss auf die Wiederfindung. Generell geht man davon aus, dass die Wiederfindung niemals 100 % erreichen kann. Aufgrund dessen sind einige Verfahren (*no-net-flux method*, *flow rate method*, *reference method*, *in vitro recovery*) entwickelt worden, um die exakte Gewebekonzentration aus der Wiederfindung abzuleiten. Für viele Fragestellungen reicht jedoch eine semiquantitative Messung von Substanzen aus, da oft nur die relative Konzentrationsänderung einer Substanz von Interesse ist (GROTH 1996).

Die kutane Mikrodialyse wird nicht nur eingesetzt, um Gewebespiegel endogener Substanzen ohne (PETERSEN *et al.* 1992; KROGSTAD *et al.* 1996) bzw. mit vorausgehendem Stimulus (ANDERSON *et al.* 1992, PETERSEN 1997) zu bestimmen, sondern auch um exogene Wirkstoffe, die topisch auf die Haut (HEGEMANN *et al.* 1995) oder sogar systemisch (PETERSEN 1999) verabreicht worden sind, intradermal nachzuweisen und deren Pharmakokinetik zu beschreiben. BENFELDT u. SERUP (1999) und BENFELDT *et al.* (1999) prüften mit Hilfe der Mikrodialyse die Penetration von Salizylsäure durch gesunde bzw. in verschiedenen Graden geschädigte Haut von Mensch und Ratte. Dabei konnte festgestellt werden, dass die perkutane Penetration der Salizylsäure mit dem Grad der Störung der Hautbarriere zunimmt.

Ein erstmaliger Einsatz der Mikrodialyse am isoliert perfundierten Rindereuter erfolgte zur Messung des Eicosanoidspiegels nach dermalen Applikation von Arachidonsäure. Der Mikrodialyseschlauch wurde intrakutan installiert, die Flussrate betrug 5 µl/min und als Perfusionsflüssigkeit diente ein Phosphatpuffer (Dulbecco's phosphate-buffered saline, Sigma Deisenhofen). Es konnte 60 Minuten nach Arachidonsäuregabe ein hochsignifikanter Anstieg von Prostaglandin E<sub>2</sub> im Mikrodialysat gemessen werden (BÄUMER u. KIETZMANN 2000).

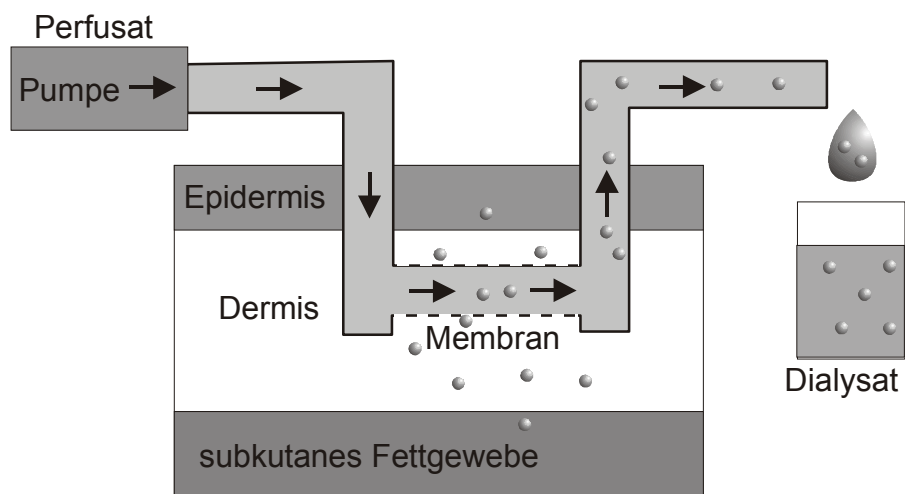


Abb.12: Prinzip der kutanen Mikrodialyse: Mittels einer Hochpräzisionspumpe wird über den zuführenden Schenkel des Katheters physiologische Kochsalzlösung durch die Membran gespült (Perfusat). Über eine semipermeable Membran können Substanzen durch freie Diffusion aufgrund eines Konzentrationsgefälles zwischen interstitiellem Raum der Dermis und der physiologischen Kochsalzlösung gewonnen werden. Die abtransportierte Flüssigkeit (Dialysat) wird gesammelt und analysiert (nach GOTTLOB *et al.* 2002).

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Das Modell des isoliert perfundierten Rindereuters**

##### **3.1.1 Versuchsmaterial**

Für die Versuche wurden ausschließlich Euter von geschlachteten Deutschen Schwarzbunten Kühen verwendet, die sich in Laktation befanden. Die Euter waren von mittlerer Größe und hatten ein Gewicht von 10 bis 16 kg. Es wurden nur solche Euter ausgewählt, deren Haut und Drüsengewebe weitgehend unbeschädigt waren und die nach Palpation und grobsinnlicher Untersuchung der Milch keine Mastitis aufwiesen. Das Absetzen der Euter von den Tierkörpern erfolgte circa fünf Minuten nach dem Ausbluten der Kühe. Direkt danach wurden die Euterhälften im Schlachthof über die *Arteria pudenda externa* mit Tyrodelösung (siehe 3.1.2.2) gespült bis das aus den Venen austretende Perfusat klar und frei von Blutkoagula war. Anschließend wurden in jede Euterhälfte 300 ml heparinisierte Tyrodelösung instilliert. Für den Transport der präparierten Euter ins Institut und bis zum Perfusionsbeginn wurden ungefähr 60 Minuten benötigt.

##### **3.1.2 Versuchsaufbau**

###### **3.1.2.1 Perfusionsapparatur**

Nach der Ankunft im Institut wurde das Euter sofort mit der Tyrodelösung perfundiert und anschließend fixiert. Die Perfusionsapparatur ist in Abbildung 13 schematisch dargestellt. Nähere Angaben über Geräte, Lösungen und Reagenzien sind im Abschnitt 3.6 aufgeführt. Das Perfusionsmedium befand sich in zwei Glasbehältern ([1], 15l und 20l), das während des Versuches über einen Zerstäuber [3] feinperlig

und dosiert mit Carbogen ([2], 95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) begast wurde. Aus der unteren Öffnung der Glasbehälter lief die Nährlösung über Silikonschläuche durch ein erwärmtes Wasserbad [4], das die Nährlösung auf 39 °C einstellte. Im Wasserbad waren jeweils zwei Glasspiralen zwischengeschaltet. Die Silikonschläuche wurden durch eine Peristaltik-Schlauchpumpe [5] geführt. Letztere sorgte für einen Flüssigkeitsausstoß von etwa 125 ml/min und Euterhälfte. Anschließend wurden die Silikonschläuche in das Lumen der jeweiligen *Arteria pudenda externa* geschoben und mittels eines Fadens fixiert. Das Euter wurde in einem Metallgestell [6] aufgehängt, indem die Euterhaut mittels Bändern an einem höhenverstellbaren Rahmen befestigt wurde. Das Euter hing dadurch in einer natürlichen Position. Um eine Probenentnahme des Perfusates zu realisieren, wurden die Eutervenen analog zur *A. pudenda externa* mit Silikonschläuchen kanüliert.

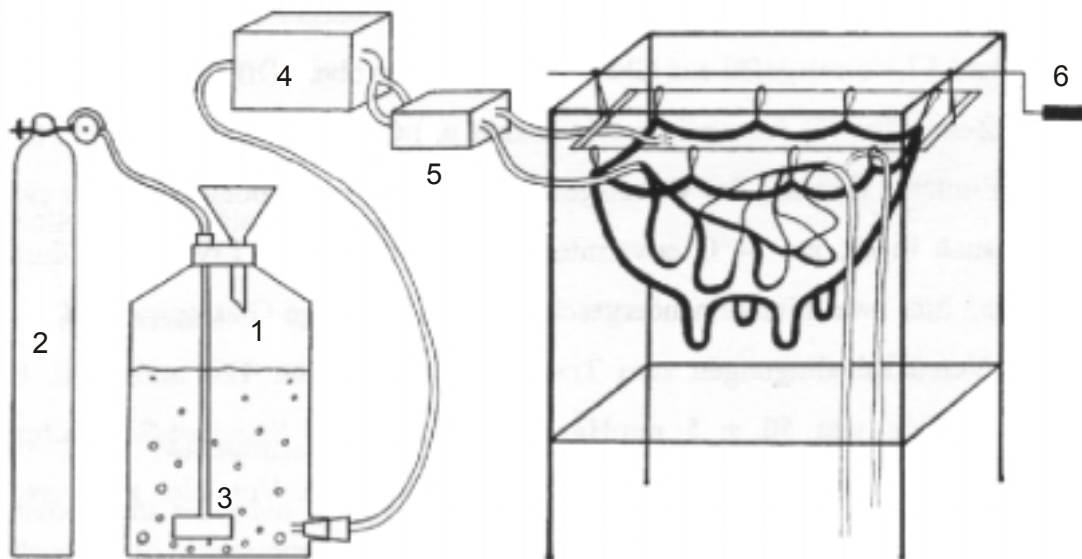


Abb. 13: Schematische Darstellung der Perfusionsapparatur für das isoliert perfundierte Rindereuter (nach EHINGER 1998)

1 Tyrode-Reservoir

3 Zerstäuber

5 Pumpe

2 Gasflasche

4 Wasserbad

6 Metallgestell

### 3.1.2.2 Perfusionsmedium

Als Perfusionsmedium diente eine für jeden Versuch frisch angesetzte Tyrode-Lösung, deren Zusammensetzung weitgehend dem Ionengehalt des Blutserums entsprach (136,8 mmol/l NaCl, 2,7 mmol/l KCl, 1,8 mmol/l  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,05 mmol/l  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,416 mmol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 11,9 mmol/l  $\text{NaHCO}_3$  und 5,5 mmol/l D(+)-Glukose  $\times 1\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Darmstadt)). Dieser Tyrode-Lösung wurden 0,2 mg Trockensubstanz Lezithin pro Liter Tyrode zugesetzt, um die Resorption lipophiler Substanzen zu fördern (BEUSCHER 1998).

### 3.2 Verwendete Testsubstanzen

Benzoessäure, Hydrocortison und Testosteron standen als Reinsubstanzen zur Verfügung und wurden vor Versuchsbeginn in Lösung gebracht (Tab. 1). In Anlehnung an FELDMANN u. MAIBACH (1969, 1970, 1974) wurden 400  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  der jeweiligen Testsubstanz auf die Haut appliziert.

Tab. 1: Testsubstanzen für die topische Applikation auf die Euterhaut

Testsubstanz	Menge	Lösungsmittel	Applikationsvolumen
Benzoessäure	40 mg	Aceton	2 ml/100 $\text{cm}^2$
Hydrocortison	40 mg	abs. Alkohol	2 ml/100 $\text{cm}^2$
Testosteron	40 mg	Aceton	2 ml/100 $\text{cm}^2$

### 3.3 Versuchsablauf

Es wurden beide Euterhälften zur Versuchsdurchführung genutzt. Auf eine Hälfte wurde auf eine Fläche von 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut die jeweilige Testsubstanz appliziert. An dieser Hälfte erfolgte später die Entnahme von Perfusat-, Haut- und Tesafilmabrissproben. An der zweiten Euterhälfte wurde die Mikrodialysetechnik angewendet.

Das Euter wurde vor Applikation der Testsubstanz mindestens 30 Minuten mit der Tyrodelösung perfundiert, um eine Erhöhung der Euterhauttemperatur zu erreichen und um das Gefäßsystem von Blutresten zu befreien. In dieser Äquilibrationsphase wurden die Haare im Bereich der Versuchsfelder durch Rasur entfernt. Anschließend wurde im Bereich der Euterbasis ein 10 x 10 cm großes Areal auf der Haut einer Euterhälfte markiert. Direkt vor Versuchsbeginn wurden von der entsprechenden Euterhälfte eine Perfusatsprobe als Leerwert sowie Vitalitätsproben (s. 3.4, Glukose und Laktat) von beiden Seiten aus den kanülierten Venen entnommen. Ferner wurde die mittlere Euterhauttemperatur bestimmt. Die Bestimmung der Vitalitätsparameter wurde alle zwei Stunden wiederholt. Die gelöste Testsubstanz wurde auf das 100 cm<sup>2</sup> große Feld mit einem Spatel gleichmäßig aufgetragen. Die Versuchsdauer betrug vier Stunden. Perfusatsproben mit einem Volumen von einem Milliliter wurden in der ersten Stunde viertelstündlich und anschließend halbstündlich genommen. Ferner erfolgte direkt neben dem Versuchsfeld die Entnahme einer Hautprobe (1,5 cm x 1,5 cm) als Leerprobe vor Versuchsbeginn. Nach 60, 120 und 240 Minuten wurden Hautproben aus dem Versuchsfeld entnommen. Tesafilmabrissproben zum Abtragen einzelner Hornschichtzelllagen wurden am Ende des Versuches gewonnen, in dem zehn 11 cm lange Streifen, numeriert von eins bis zehn, vertikal auf das mit der Testsubstanz behandelte Areal geklebt wurden. Dabei wurde der erste Streifen aufgeklebt, abgezogen und als in sich geschlossener Kreis eingetütet. Die folgenden Streifen wurden nacheinander immer an der gleichen Stelle aufgeklebt, um nächst tiefere Schichten des *Stratum corneum* zu gewinnen und wie der erste weiter verarbeitet.

An der anderen Euterhälfte wurde zusätzlich die Mikrodialysetechnik angewendet. Auch hier wurden die Haare im Bereich der Euterbasis auf einer Fläche von etwa 4 cm x 4 cm entfernt. In diesem Bereich wurde eine Kanüle mit einem Außendurchmesser von 0,6 mm intrakutan über eine Strecke von 2 cm gesetzt. Durch diese Kanüle wurde der Mikrodialyseschlauch geschoben. Die Kanüle wurde vorsichtig entfernt. Die von PETERSEN (1998) hergestellten Mikrodialyseschläuche hatten einen äußeren Durchmesser von 216 µm, eine Membrandicke von 8 µm, einen „cut off“ von 2000 Dalton Molekulargewicht und einen stabilisierenden Führungsdraht. Der Dialyseschlauch war mit einem Nylonschlauch verklebt, der über einen Adapter mit einer 1 ml Spritze verbunden wurde. Die Spritze war in einer Mikrodialysepumpe eingespannt. Die gepufferte, isotonische und mit Lezithin (0,2 µg/ml) angereicherte Perfusionsflüssigkeit wurde durch die Pumpe mit einem konstanten Fluß von 5 µl/min ausgestoßen. Das in den ersten 20 Minuten aufgefangene Dialysat dient als Leerwert. Danach wurden 20 µl von den in absolutem Alkohol bzw. Aceton gelösten Testsubstanzen (0,4 mg) entnommen und auf die Haut oberhalb des Mikrodialyseschlauches aufgetragen, sodass eine Fläche von 2 cm<sup>2</sup> genutzt wurde. Das Dialysat wurde alle 20 Minuten in Fraktionen aufgefangen. Die Versuchsdauer betrug drei Stunden. Das Mikrodialysat der ersten zwanzig Minuten wurde verworfen, um eine Kalibrationsphase einzuhalten.

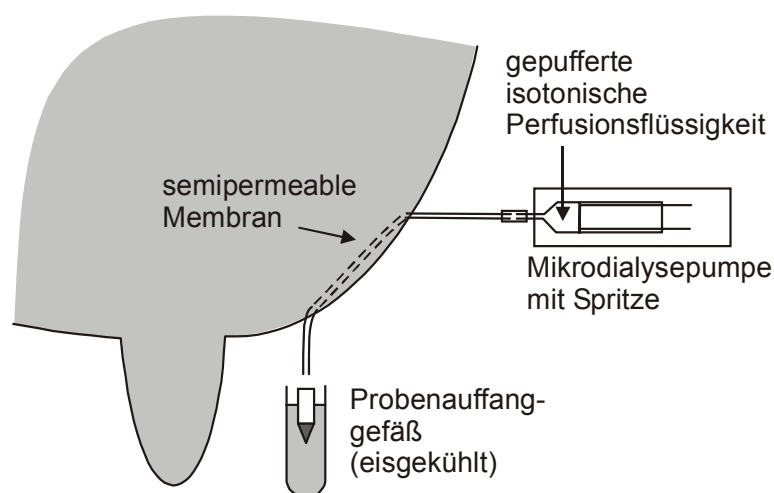


Abb.14: Schematische Darstellung der intrakutanen Mikrodialysetechnik (nach BÄUMER 1999)

### **3.4 Vitalität des isoliert perfundierten Rindereuters**

Um die Vitalität des isoliert perfundierten Rindereuters festzustellen, wurden folgende Parameter ausgewählt, die von MAASS (1993) beschrieben wurden.

#### **3.4.1 Glukoseverbrauch**

Der Glukoseverbrauch ist ein sensibler Parameter zur Erkennung einer mangelnden Stoffwechselaktivität und sollte während der Perfusion nicht unter 0,6 g/h fallen (MAASS 1993). In den für diese Arbeit relevanten Versuchen wurde dieses Kriterium erfüllt. Zur Bestimmung des Glukoseverbrauches wurde der Glukosegehalt in der Tyrode und im Perfusat nach der Methode von TRINDER (1969) photometrisch bestimmt. Die Differenz dieser gemessenen Werte ergibt nach Multiplikation mit dem stündlichen Perfusionsfluss den stündlichen Glukoseverbrauch. Der Glukoseverbrauch wurde in Anlehnung an MAASS (1993) dreimal im Abstand von zwei Stunden bestimmt.

#### **3.4.2 Laktatproduktion**

Die Laktatproduktion ist ein Indiz für unerwünschte anaerobe Stoffwechselvorgänge und sollte nach dem Anschluss des Euters an begaste Tyrodelösung fallen. Der Laktatgehalt in den Perfusatproben wurde zeitgleich mit dem Glukoseverbrauch nach einer von NOLL (1974) modifizierten Methode bestimmt. Damit wurde nach Multiplikation mit dem stündlichen Perfusionsvolumen die stündliche Laktatproduktion ermittelt (s. auch MAASS 1993).

### **3.4.3 Hauttemperatur**

Die Hauttemperatur wurde an der verwendeten Euterseite mit Hilfe eines Oberflächenthermometers in Anlehnung an STERL (1998) an sechs verschiedenen Stellen zu Beginn des Versuches, nach zwei und nach vier Stunden gemessen. Es wurden nur Euterversuche in die Studie einbezogen, deren durchschnittliche Hauttemperatur nach einer Äquilibrierungszeit von einer Stunde mehr als 29 °C aufwies, um eine ausreichende Perfusion der Haut zu gewährleisten.

### **3.5 Bestimmungsmethoden der Testsubstanzen**

Sämtliche Proben wurden bis zur Messung bei –20 °C gelagert. Der Nachweis von Benzoesäure und deren Konzentrationsermittlung wurde mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt. Die Bestimmung der Konzentration von Hydrocortison und Testosteron erfolgte mit enzymgebundenen Immunadsorptionstests (ELISA).

#### **3.5.1 Bestimmung von Benzoesäure mittels HPLC**

##### Reagenzien und Lösungen für die HPLC

- Acetonitril: LAB-SCAN, Dublin, Irland
- Kaliumdihydrogenphosphat: Merck, Darmstadt
- Phosphorsäure 85%: Merck, Darmstadt
- Eluent: Acetonitril: 0,05M H<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub>-Puffer (300 ml:110 ml), pH-Wert: 3,0
- Benzoesäure: Sigma, Steinheim

### HPLC-Anlage

- Vorsäule: LiChrospher® 100 RP 18e, 5 µm, 4 x 4 mm, Merck, Darmstadt
- Trennsäule: LiChrospher® 100 RP 18e, 5µm, 250 x 4 mm, Merck, Darmstadt
- Säulenofen: Spark SpH99, Niederlande
- Autosampller: Gilson Model 231, Abimed mit Dilutor 401, Langenfeld
- Pumpe: System Gold 116, Beckman, München
- UV-Detektor: Modell 2050, Varian, Darmstadt
- Software: 32 Karat Gold, Beckman, München

### HPLC-Bedingungen

- Flußrate: 1 ml/min
- Detektion: UV 230 nm
- Injektionsmenge: 100 µl

Die Messungen fanden bei Raumtemperatur statt. Alle Benzoessäureproben wurden fünf Minuten bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert. Allen Proben wurde 8,5 %ige Phosphorsäure zugesetzt, um den pH-Wert auf 3,0 abzusenken. Das zugefügte Volumen wurde über Titration ermittelt. Für jede Probenart wurde eine Stammlösung (1 mg Benzoessäure/ml Tyrode bzw. PBS-Puffer) angesetzt, aus der Verdünnungen für die Kalibrationsreihe hergestellt wurden. Der Stammlösung wurde 1N NaOH zugegeben, damit sich die Benzoessäure besser in Tyrode bzw. PBS-Puffer lösen ließ. Die Konzentrationen der Kalibrationsreihe wurden bei der Verdünnung jeweils halbiert und bewegten sich zwischen 20.000 ng/ml und 1,2 ng/ml. Aus den ermittelten Peakflächen der Standards wurde mittels linearer Regression (Excel 7.0) die Funktion der Kalibrationskurve errechnet. Dabei ergab sich folgende Gleichung (x ist die Benzoessäuremenge in ng/ml und y die gemessene Extinktion):

$$x = (y - 10233) / 569,75$$

Die Eichkurve verlief linear (r = 0,9996).

### **3.5.2 Prinzip des Enzymimmunoassays**

Das Prinzip der benutzten Enzymimmunoassays (ELISA) basiert auf der kompetitiven Bindung. Es handelt sich um Mikrotiterplatten, die mit Antikörpern beschichtet sind. Um die limitierten Bindungsstellen der Antikörper konkurrieren Probe und enzymmarkiertes Antigen. Nach einer Inkubationsphase wird durch Waschen nicht gebundenes enzymmarkiertes Antigen entfernt. Anschließend wird eine Substratlösung hinzugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional zur Antigenkonzentration in den Standards und den Proben. Die Extinktion wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm im Mikrotiterplatten-Reader gemessen. Bei jedem Messansatz wurde eine Standardreihe mitgeführt, aus der die Bindungsraten der Hormone ermittelt wurden. Diese Bindungsraten (%-Bindung) dienten als Kalibrationskurve, die nach Probittransformation erstellt wurde. Die Extinktionen der Proben wurden auf diese Eichkurven bezogen. Die Konzentrationen der Standardreihen reichten pro Messansatz von 0,2 ng bis 16 ng (Testosteron) und von 2 ng bis 80 ng (Cortisol Saliva ELISA) bzw. 20 ng bis 800 ng (Cortisol ELISA).

### **3.5.3 Aufarbeitung und Untersuchung der Perfusatproben**

Die Perfusatproben aus den Versuchen mit Benzoesäure wurden über die HPLC-Anlage chromatographisch ausgewertet, nachdem 5 µl 8,5 %ige Phosphorsäure zu jeder Probe zugefügt wurden.

Die Perfusatproben, in denen sich Hydrocortison und Testosteron befanden, wurden direkt mit dem entsprechenden ELISA gemessen.

### 3.5.4 Tesafilmabrissproben

Die Aufarbeitung der Tesafilmabrissproben erfolgte, indem von jeder Probe ein 1,5 cm x 1 cm großer Streifen abgeschnitten wurde. Dabei wurde darauf geachtet, dass dieser Tesafilmbereich nicht in sich verklebt war. Der herausgeschnittene Bereich wurde nun in ein mit 2 ml Ethylacetat gefülltes Probengefäß gegeben und eine Minute geschüttelt. Nach fünf Minuten wurde das Tesafilm mit einer Pinzette entfernt und das Ethylacetat unter Stickstoffbegasung (40 °C) verdampft. 1 ml PBS-Puffer wurden in das Reagenzglas gegeben und geschüttelt. Hydrocortison und Testosteron wurden mittels ELISA, Benzoessäure mit der HPLC nachgewiesen. Den Benzoessäureproben wurden 3,2 µl 8,5 %ige Phosphorsäure zur pH-Wert-Absenkung zugegeben.

### 3.5.5 Hautproben

Aus den Hautproben wurde ein 12 mm x 12 mm großes Areal herausgeschnitten. Anschließend wurde ein etwas größeres Stück aus einer Korkplatte geschnitten, auf die einige Tropfen eines Einbettmediums aufgetragen wurden. Darauf wurde die Hautprobe gelegt und mit einem Deckglas flach gedrückt. Das Einbettmedium diente zum Ausgleich von auftretender Unebenheiten in der Hautprobendicke. So präpariert, wurde die Hautprobe mittels Gefriermikrotom geschnitten. Die Schichtdicke betrug 20 µm. Es wurde eine Leerprobe (Zeitpunkt: 0 min) erstellt, die wie die folgenden Hautproben behandelt wurde. Diese Hautproben (Zeitpunkte: 60 min, 120 min, 240 min) wurden neunmal geschnitten, wobei immer drei aufeinanderfolgende Schnitte zu einer Probe zusammengefaßt worden sind. Die Schnitte wurden direkt nach dem Schneiden in ein mit 1 ml PBS-Puffer gefülltes Probengefäß gegeben. Die weitere Aufarbeitung der Proben erfolgte durch eine Homogenisierung im Eisbad mit einem Ultra Turrax® über 90 Sekunden bei 20.000 U/min.

800 µl des Homogenates der **Hydrocortison-** bzw. der **Testosteronproben** wurden in 3 ml Ethylacetat verbracht, 10 min im Überkopfschüttler durchmischt und anschließend 10 min bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert. 2,5 ml des Überstandes wurden in ein Reagenzglas gegeben und bei 40 °C unter Stickstoff zur Trockne eingedampft. 100 µl PBS-Puffer wurden hinzugegeben. Die Auswertung wurde mit dem jeweiligen ELISA durchgeführt.

Bei der Aufarbeitung der **Benzoessäure-Schnitte** wurden 800 µl des Homogenates in 2 ml Diethylether verbracht und durch eine Zugabe von 0,5 ml 0,5 N HCl wurde eine Absenkung des pH-Wertes erreicht. Die Proben wurden 10 min im Überkopfschüttler durchmischt, 10 min bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert und anschließend bei –80 °C 20 min eingefroren. Direkt im Anschluß wurde die nicht gefrorene organische Phase in ein zweites Glasreagenzglas gegossen und bei 40 °C zur Trockne eingedampft. Die wässrige Phase wurde dann wieder zu 2 ml Diethylether gegeben. Der geschilderte Arbeitsgang fand insgesamt dreimal statt. Die zur Trockne eingedampfte organische Phase wurde mit 1 ml Eluent aufgefüllt, geschüttelt und zentrifugiert. Der Überstand der Proben wurde in der HPLC-Anlage chromatographiert.

### **3.5.6 Mikrodialysat**

Die Mikrodialysatproben, in denen sich Testosteron und Hydrocortison befanden, konnten ohne weitere Aufarbeitung mit den ELISAs gemessen werden.

Das Volumen der Benzoessäureproben wurde bestimmt, um dann jede Probe mit Eluent auf 300 µl aufzufüllen. Anschließend wurden 2 µl 8,5 %ige Phosphorsäure zugegeben. Es folgte die Messung mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie.

### 3.6 Geräte, Lösungen, Reagenzien

Geräte für die Versuche am Euter:

- Thermostatbad: Mod. W 12, Medingen, Dresden
- Peristaltik-Schlauchpumpe: Mod. 7553-75, Cole-Parmer, Chicago, USA
- Thermometer (HI 93530) mit
- Oberflächensensor (HI 766B2): Hanna Instruments, Kehl am Rhein
- Schermaschine: Type 1849, Moser, Unterkirchnach
- Waage: Sartorius 1219 MP, Göttingen
- Waage: SBA 53, Scaltec-Instruments, Heiligenstadt
- Feinwaage: Sartorius 2002 MP1, Göttingen

Mikrodialyse:

- Spritzenpumpe: Mod. Infusion 540100, Technical & Scientific Equipment GmbH, Bad Homburg
- 1 ml Einmalspritze: Omnifix®, Braun AG, Melsungen
- Mikrodialyseschlauch: K.J. Petersen, Department of Dermatology; Bispjerg Hospital, Copenhagen, Dänemark

Geräte zur Analyse:

- Spektralphotometer: DM 4, Zeiss, Oberkochen
- *Microplate Reader*: MRX, Dynatech Deutschland GmbH, Denkendorf
- Homogenisator: Ultra Turrax®, Janke und Kunkel, Staufen
- Kühlzentrifuge: Centrifuge 5403, Eppendorf, Hamburg
- Überkopfschüttler: Reax 2, Heidolph, Kelheim
- Rundschüttler: Reax top, Heidolph, Kelheim
- Schüttler: Orbital Shaker SO3, Stuart Scientific, Großbritannien
- Heizblock: TCS-Metallblock-Thermostat, Labor Technik Barkey, Bielefeld
- Gefriermikrotom: 1325 CM, Leica, Nußloch

#### Reagenzien und Lösungen für die Versuche am Euter

- Benzoesäure: Sigma, Steinheim
- Hydrocortison: Sigma, Steinheim
- Testosteron: Sigma, Steinheim
- Aceton, pro analysi: Merck, Darmstadt
- Ethanol, absolut, reinst: Mallinckrodt Baker, B.V., Deventer, Niederlande
- L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin (L- $\alpha$ -Lezithin), Type X-E: Sigma, Steinheim
- tesa®, BDF Beiersdorf AG, Hamburg

Mikrodialyse: Perfusionsflüssigkeit: Dulbecco's phosphate buffered saline, D-5780, Sigma, Steinheim und D-8662, Sigma, Teufkirchen

#### Reagenzien und Lösungen für die Analytik

##### - PBS-Puffer:

NaCl<sub>2</sub>: 8,0 g

KCl: 0,2 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1,15 g

Ad 1 Liter aqua bidest., pH 7,4

- Einbettmedium für Gefrierschnitte: Tissue Freezing Medium®, Leica Instruments GmbH, Nussloch

#### Testsätze für die Vitalitätsmessungen

- Glukose: Nr.66391, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Laktat: Nr.149993, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

#### ELISA

- Cortisol: IBL, Hamburg
- Cortisol-Speichel (Saliva): IBL, Hamburg
- Testosteron: IBL, Hamburg

### **3.7 Berechnung der resorbierten Wirkstoffmenge**

Aus den gemessenen Konzentrationen im Perfusat wird die resorbierte Menge unter Berücksichtigung des Perfusatflusses berechnet und im Ergebnisteil kumulativ als Median dargestellt. Die anhand der Eichreihe errechneten Konzentrationen der Haut und der Tesafilmabrissproben werden auf die Konzentrationen pro cm<sup>2</sup> Fläche umgerechnet. Die aufgenommene Wirkstoffmenge im Mikrodialysat wird unter Einbeziehung der Flussrate aus der in den Mikrodialysatfraktionen gemessenen Konzentrationen berechnet und kumulativ als Median im Ergebnisteil dargestellt.

### **3.8 Statistische Auswertung**

Die Ergebnisse werden mit Median, 1. und 3. Quartil sowie Minimum und Maximum angegeben. Der Vergleich der gemessenen Wirkstoffmengen erfolgte mit Hilfe des nicht parametrischen Rangsummen-Tests für nicht verbundene Stichproben nach MANN und WHITNEY (1947) (U-Test), da aufgrund der geringen Versuchsanzahl (meist  $n = 6$ ) eine Prüfung auf eine Normalverteilung der Werte nicht möglich ist. Die Anzahl der Messwerte ( $n$ ) bezieht sich immer auf identisch behandelte Euterhälften. Die graphische Darstellung findet auch in Form von Median-Boxen statt (Abb.15). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm SigmaStat für Windows (Version 1.0 © 1992 - 1994, Jandel Corporation); für die Bearbeitung der Medianboxen wurde PlotIt® für Windows verwendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,1 % galt als hochsignifikant, eine von 1 % als signifikant und eine von 5 % als schwach signifikant.

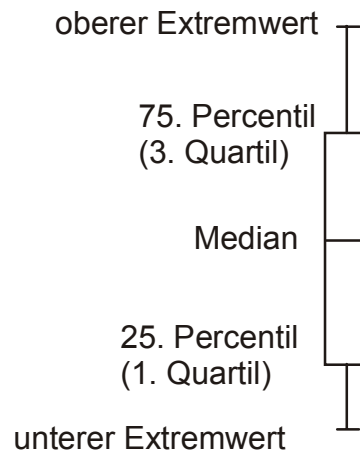


Abb. 15: Darstellung einer Medianbox

## **4 Untersuchungsergebnisse**

### **4.1 Benzoessäure**

Nachfolgend werden die Untersuchungsergebnisse nach topischer Applikation von 40 mg Benzoessäure auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut dargestellt. Ergebnisse liegen von Perfusatproben, Hautproben und Tesafilmabrissproben vor. Es wurden acht Versuche durchgeführt. Die Einzelergebnisse sind in den Anhangstabellen 1, 4 und 7 aufgeführt.

#### **4.1.1 Benzoessäurekonzentration im Perfusat**

Aus den im Perfusionszeitraum gemessenen Benzoessäurekonzentrationen im Perfusat werden die resorbierten Mengen von Benzoessäure errechnet (s. Anhangstabelle 1). Tabelle 2 stellt die insgesamt resorbierte Menge an Benzoessäure als Median, 1. und 3. Quartil sowie Minimum und Maximum dar. Eine kumulative Darstellung des Resorptionsverlaufes zeigt Abbildung 16.

Über den Perfusionszeitraum von vier Stunden gelangen 1,48 mg Benzoessäure ins Perfusat (Tab. 2, Abb.16). Dies entspricht 3,7 % der applizierten Dosis.

Tab. 2: Resorbierte Menge an Benzoesäure über den Perfusionszeitraum von 240 Minuten nach Applikation von 40 mg Benzoesäure auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter. Angabe von Median, 1. und 3. Quartil sowie Minimum und Maximum aus acht Einzelversuchen; NWG = Nachweisgrenze.

Zeit [min]	Benzoesäure im Perfusat [mg]				
	<b>Median</b>	1. Quartil	3. Quartil	Minimum	Maximum
15	<b>0,06</b>	0,03	0,20	< NWG	2,23
30	<b>0,17</b>	0,06	0,35	0,04	2,26
45	<b>0,26</b>	0,12	0,52	0,07	2,38
60	<b>0,36</b>	0,13	0,72	0,08	2,53
90	<b>0,52</b>	0,20	0,98	0,09	3,05
120	<b>0,68</b>	0,24	1,12	0,11	3,26
150	<b>0,77</b>	0,38	1,71	0,16	3,59
180	<b>0,79</b>	0,56	2,25	0,19	4,23
210	<b>0,87</b>	0,64	2,43	0,27	5,56
240	<b>0,87</b>	0,72	2,64	0,31	6,62

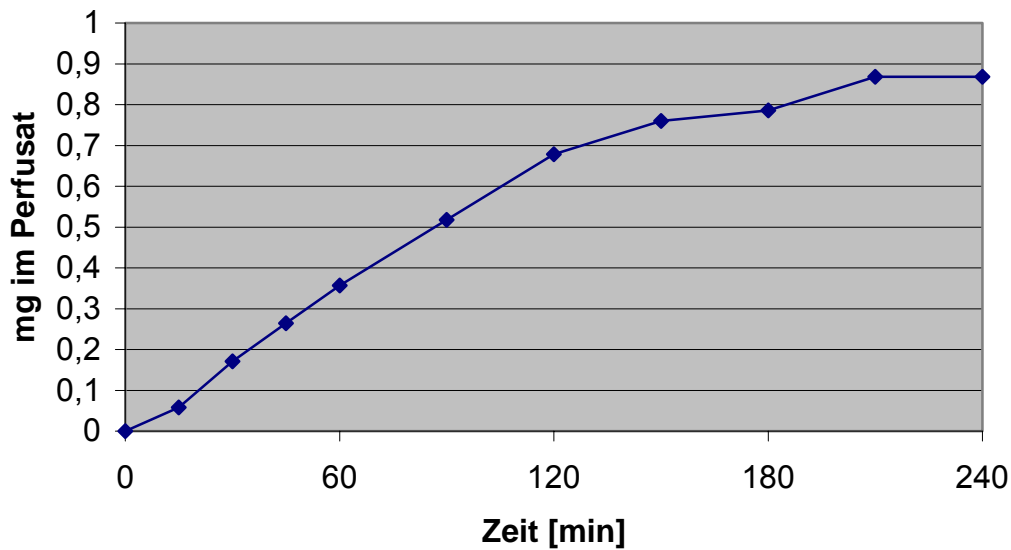


Abb. 16: Kumulative Darstellung der resorbierten Benzoesäuremenge im Perfusionszeitraum von 240 Minuten nach topischer Applikation von 40 mg Benzoesäure auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter. Angabe der Medianwerte (Tab. 2) aus acht Einzelversuchen. (Vergleichende Darstellung und Statistik s. Abb. 28)

#### 4.1.2 Benzoesäurekonzentration in den Hautproben

Aus den in Anhangstabelle 7 aufgeführten Benzoesäurekonzentrationen der Hautproben wurden Median, 1. und 3. Quartil, Minimum und Maximum errechnet und in Tabelle 3 und Abb.17 dargestellt. Nach 60 Minuten befinden sich im gesamten Hautstück 3,21 µg Benzoesäure pro cm<sup>2</sup>. Dies entspricht 0,8 % der ursprünglich applizierten Dosis. Nach 120 Minuten sind es 0,92 µg/cm<sup>2</sup> (0,2 %) und nach 240 Minuten 0,86 µg/cm<sup>2</sup> (0,2 %).

Tab. 3: Benzoesäurekonzentration in der Haut von isoliert perfundierten Rindereutern nach topischer Applikation von 40 mg Benzoesäure auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut. Angabe von Median, 1. und 3. Quartil sowie Minimum und Maximum aus acht Einzelversuchen; NWG = Nachweisgrenze.

Zeit [min]	Haut- schicht [µm]	Benzoesäurekonzentration in der Haut [µg/cm <sup>2</sup> ]				
		<b>Median</b>	1. Quartil	3.Quartil	Minimum	Maximum
60	0-60	<b>0,86</b>	0,13	2,67	0,03	12,70
	61-120	<b>0,58</b>	0,19	1,99	0,08	10,69
	121-180	<b>1,77</b>	0,13	3,08	0,01	6,07
120	0-60	<b>0,16</b>	0,06	2,20	0,02	4,27
	61-120	<b>0,33</b>	0,16	2,66	0,10	5,33
	121-180	<b>0,43</b>	0,10	3,62	< NWG	5,92
240	0-60	<b>0,32</b>	0,05	2,22	0,05	4,20
	61-120	<b>0,12</b>	0,05	2,39	< NWG	3,39
	121-180	<b>0,42</b>	0,17	0,86	0,04	10,23

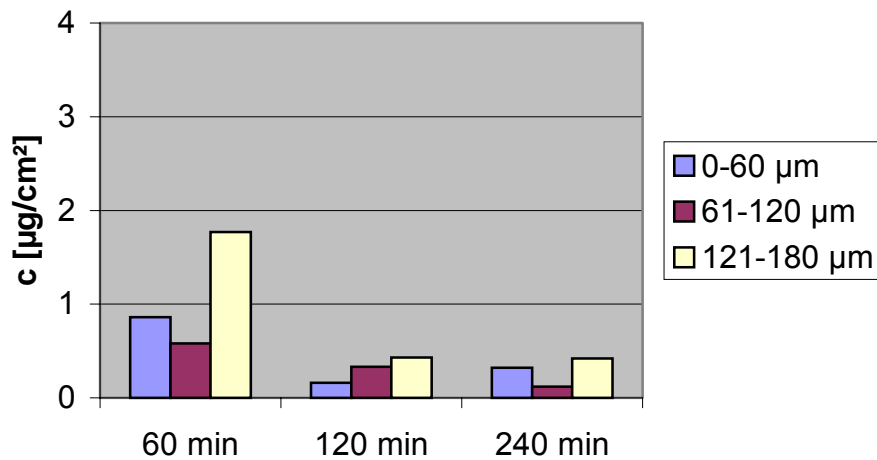


Abb. 17: Benzoessäurekonzentration in der Haut nach topischer Applikation von 40 mg Benzoessäure auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter. Medianwerte (Tab. 3) aus acht Einzelversuchen. (Vergleichende Darstellung und Statistik s. Abb. 29-31)

#### 4.1.3 Benzoessäurekonzentration in der Hornschicht

Aus den in Anhangstabelle 4 aufgeführten Benzoessäurekonzentrationen der Tesafilmabrissproben wurden Median, 1. und 3. Quartil, Minimum und Maximum errechnet und in Tabelle 4 und Abbildung 18 dargestellt. Nach vier Stunden beträgt die Summe der Benzoessäurekonzentrationen aller zehn Tesafilmabrisse 24,64  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Dies entspricht 6,16 % der applizierten Dosis.

Tab. 4: Benzoesäurekonzentration in der Hornschicht 240 min nach topischer Applikation von 40 mg Benzoesäure auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter. Angabe von Median, 1. und 3. Quartil sowie Minimum und Maximum aus acht Einzelversuchen.

Abriss	Benzoesäurekonzentration in den Tesafilmabrissen [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]				
	<b>Median</b>	1. Quartil	3. Quartil	Minimum	Maximum
1	<b>6,83</b>	4,97	9,71	1,43	11,05
2	<b>1,72</b>	0,86	4,00	0,49	7,13
3	<b>3,96</b>	2,57	6,38	0,71	10,06
4	<b>1,87</b>	0,87	3,59	0,07	6,24
5	<b>4,06</b>	2,05	5,21	0,00	8,32
6	<b>1,40</b>	0,83	2,87	0,12	7,37
7	<b>2,13</b>	0,81	3,73	0,08	7,00
8	<b>1,00</b>	0,59	1,45	0,28	7,69
9	<b>0,85</b>	0,24	1,07	0,15	3,14
10	<b>0,82</b>	0,26	2,40	0,13	3,49

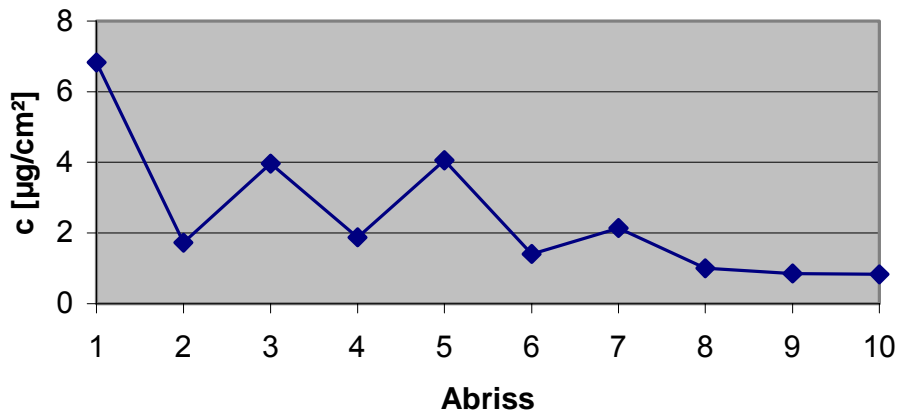


Abb. 18: Benzoesäurekonzentration in der Hornschicht 240 min nach topischer Applikation von 40 mg Benzoesäure auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter. Medianwerte (Tab. 4) aus acht Einzelversuchen. (Vergleichende Darstellung und Statistik s. Abb. 32)

## 4.2 Hydrocortison

Nachfolgend werden die Untersuchungsergebnisse nach topischer Applikation von 40 mg Hydrocortison auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut dargestellt. Ergebnisse liegen aus Perfusatproben, Hautproben und Tesafilmabrissproben vor. Es wurden sieben Versuche durchgeführt. Die Einzelergebnisse sind in den Anhangstabellen 2, 5 und 8 aufgeführt.

### 4.2.1 Hydrocortisonkonzentration im Perfusat

Aus den im Perfusionszeitraum gemessenen Hydrocortisonkonzentrationen im Perfusat werden die resorbierten Mengen von Hydrocortison errechnet (s. Anhangstabelle 2). Tabelle 5 stellt die insgesamt resorbierte Menge an Hydrocortison

als Median, 1. und 3. Quartil sowie Minimum und Maximum dar. Eine kumulative Darstellung des Resorptionsverlaufes zeigt Abbildung 19.

Über den Perfusionszeitraum von vier Stunden gelangen 0,25 mg Hydrocortison ins Perfusat (Tab. 5, Abb.19). Dies entspricht 0,61 % der applizierten Dosis.

Tab. 5: Resorbierte Menge an Hydrocortison über den Perfusionszeitraum von 240 Minuten nach Applikation von 40 mg Hydrocortison auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter. Angabe von Median, 1. und 3. Quartil sowie Minimum und Maximum aus sieben Einzelversuchen; NWG = Nachweisgrenze.

Zeit [min]	Hydrocortisonkonzentration im Perfusat [mg]				
	<b>Median</b>	1. Quartil	3. Quartil	Minimum	Maximum
15	<b>0,01</b>	< 0,01	0,01	< NWG	0,24
30	<b>0,02</b>	0,01	0,03	< NWG	0,39
45	<b>0,03</b>	0,01	0,27	< NWG	0,52
60	<b>0,12</b>	0,02	0,35	< NWG	0,54
90	<b>0,13</b>	0,03	0,33	< NWG	0,55
120	<b>0,17</b>	0,04	0,34	0,02	0,56
150	<b>0,18</b>	0,05	0,35	0,03	0,57
180	<b>0,18</b>	0,06	0,35	0,03	2,62
210	<b>0,19</b>	0,07	0,36	0,03	2,63
240	<b>0,25</b>	0,14	0,40	0,08	3,02

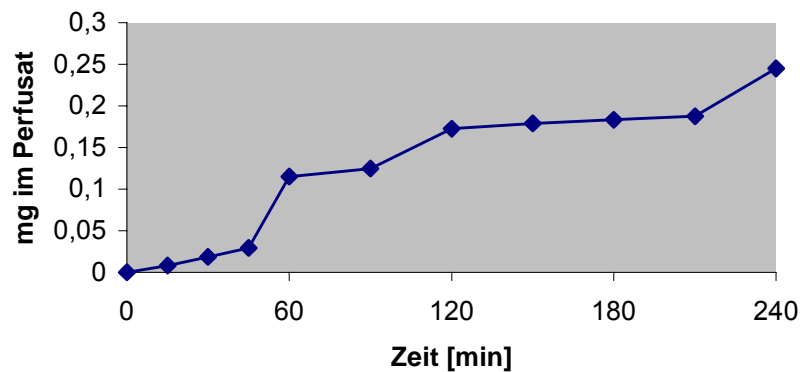


Abb. 19: Kumulative Darstellung der resorbierten Hydrocortisonmenge im Perfusionszeitraum von 240 Minuten nach topischer Applikation von 40 mg Hydrocortison auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter. Angabe der Medianwerte (Tab. 5) aus sieben Einzelversuchen. (Vergleichende Darstellung und Statistik s. Abb. 28)

#### 4.2.2 Hydrocortisonkonzentration in den Hautproben

Aus den in Anhangstabelle 8 aufgeführten Hydrocortisonkonzentrationen der Hautproben wurden Median, 1. und 3. Quartil, Minimum und Maximum errechnet und in Tabelle 6 und Abbildung 20 dargestellt. Nach 60 Minuten befinden sich im gesamten Hautstück 8,52 µg Hydrocortison pro cm<sup>2</sup>. Dies entspricht 2,1 % der ursprünglich applizierten Dosis. Nach 120 Minuten sind es 6,51 µg/cm<sup>2</sup> (1,6 %) und nach 240 Minuten 7,73 µg (1,9 %).

Tab. 6: Hydrocortisonkonzentration in der Haut von isoliert perfundierten Rindereutern nach topischer Applikation von 40 mg Hydrocortison 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut. Angabe von Median, 1. und 3. Quartil sowie Minimum und Maximum aus sieben Einzelversuchen.

Zeit [min]	Haut- schicht [µm]	Hydrocortisonkonzentration in der Haut [µg/cm <sup>2</sup> ]				
		<b>Median</b>	1. Quartil	3. Quartil	Minimum	Maximum
60	0-60	<b>3,38</b>	1,04	5,13	0,08	11,46
	61-120	<b>3,36</b>	1,34	6,81	0,07	7,75
	121-180	<b>1,78</b>	0,54	4,16	0,09	8,35
120	0-60	<b>2,06</b>	0,95	2,36	0,56	5,00
	61-120	<b>2,89</b>	1,78	5,77	0,43	6,99
	121-180	<b>1,56</b>	1,09	2,37	0,67	9,52
240	0-60	<b>1,87</b>	1,69	3,25	0,22	7,88
	61-120	<b>2,76</b>	1,70	3,04	0,66	8,53
	121-180	<b>3,10</b>	1,09	4,01	0,74	4,67

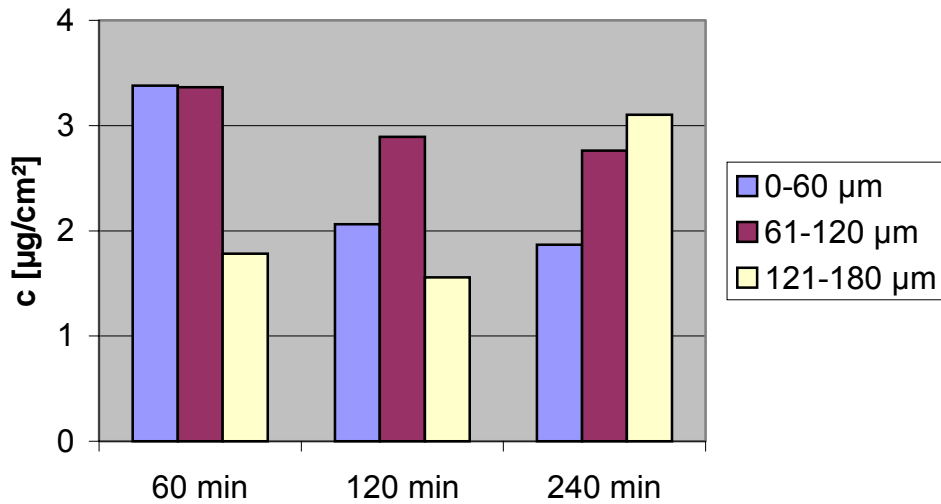


Abb. 20: Hydrocortisonkonzentration in der Haut nach topischer Applikation von 40 mg Hydrocortison auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter. Medianwerte (Tab. 6) aus sieben Einzelversuchen. (Vergleichende Darstellung und Statistik s. Abb. 29-31)

#### 4.2.3 Hydrocortisonkonzentration in der Hornschicht

Aus den in Anhangstabelle 4 aufgeführten Hydrocortisonkonzentrationen der Tesafilmabrissproben wurden Median, 1. und 3. Quartil, Minimum und Maximum errechnet und in Tabelle 7 und Abbildung 21 dargestellt. Nach vier Stunden beträgt die Summe der Hydrocortisonkonzentrationen aller zehn Tesafilmabrisse 45,33 µg/cm<sup>2</sup>. Dies entspricht 11,33 % der applizierten Dosis.

Tab. 7: Hydrocortisonkonzentration in der Hornschicht 240 min nach topischer Applikation von 40 mg Hydrocortison auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter. Angabe von Median, 1. und 3. Quartil sowie Minimum und Maximum aus sieben Einzelversuchen.

Abriss	Hydrocortisonkonzentration in den Tesafilmabrissen [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]				
	Median	1. Quartil	3. Quartil	Minimum	Maximum
1	<b>23,79</b>	2,97	25,68	1,97	29,05
2	<b>5,34</b>	4,86	16,76	4,22	24,11
3	<b>4,10</b>	2,30	5,79	0,47	9,43
4	<b>2,93</b>	1,06	5,19	0,95	7,43
5	<b>1,04</b>	0,81	2,43	0,58	6,73
6	<b>1,22</b>	1,13	3,56	0,49	7,97
7	<b>3,85</b>	1,90	5,26	1,09	7,88
8	<b>1,16</b>	0,97	2,75	0,47	3,67
9	<b>1,02</b>	0,62	2,27	0,31	4,55
10	<b>0,88</b>	0,48	1,32	0,27	2,29

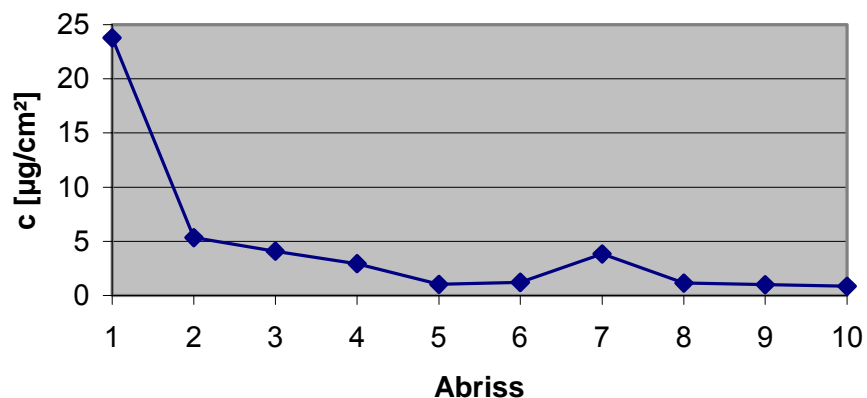


Abb. 21: Hydrocortisonkonzentration in der Hornschicht 240 min nach topischer Applikation von 40 mg Hydrocortison auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter. Medianwerte (Tab. 7) aus sieben Einzelversuchen. (Vergleichende Darstellung und Statistik s. Abb. 32)

### **4.3 Testosteron**

Nachfolgend werden die Untersuchungsergebnisse nach topischer Applikation von 40 mg Testosteron auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut dargestellt. Ergebnisse liegen aus Perfusatproben, Hautproben und Tesafilmabrissproben vor. Es wurden zehn Versuche durchgeführt. Die Einzelergebnisse sind in den Anhangstabellen 3, 6 und 9 aufgeführt.

#### **4.3.1 Testosteronkonzentration im Perfusat**

Aus den im Perfusionszeitraum gemessenen Testosteronkonzentrationen im Perfusat werden die resorbierten Mengen von Testosteron errechnet (s. Anhangstabelle 3). Tabelle 8 stellt die insgesamt resorbierte Menge an Testosteron als Median, 1. und 3. Quartil sowie Minimum und Maximum dar. Eine kumulative Darstellung des Resorptionsverlaufes zeigt Abbildung 22.

Über den Perfusionszeitraum von vier Stunden gelangen 0,02 mg Testosteron ins Perfusat (Tab. 8, Abb. 22). Dies entspricht 0,1 % der applizierten Dosis.

Tab. 8: Resorbierte Menge an Testosteron über den Perfusionszeitraum von 240 Minuten nach Applikation von 40 mg Testosteron auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter. Angabe von Median, 1. und 3. Quartil sowie Minimum und Maximum aus 10 Einzelversuchen; NWG = Nachweisgrenze.

Zeit [min]	Testosteronkonzentration im Perfusat [mg]				
	Median	1. Quartil	3. Quartil	Minimum	Maximum
15	<b>&lt; 0,01</b>	< 0,01	< 0,01	< NWG	< 0,01
30	<b>&lt; 0,01</b>	< 0,01	0,03	< NWG	0,08
45	<b>0,01</b>	< 0,01	0,03	< 0,01	0,08
60	<b>0,02</b>	< 0,01	0,05	< 0,01	0,08
90	<b>0,02</b>	0,01	0,05	< 0,01	0,08
120	<b>0,02</b>	0,01	0,05	0,01	0,17
150	<b>0,02</b>	0,01	0,05	0,01	0,17
180	<b>0,02</b>	0,02	0,05	0,01	0,17
210	<b>0,02</b>	0,02	0,05	0,01	0,17
240	<b>0,02</b>	0,02	0,10	0,01	0,18

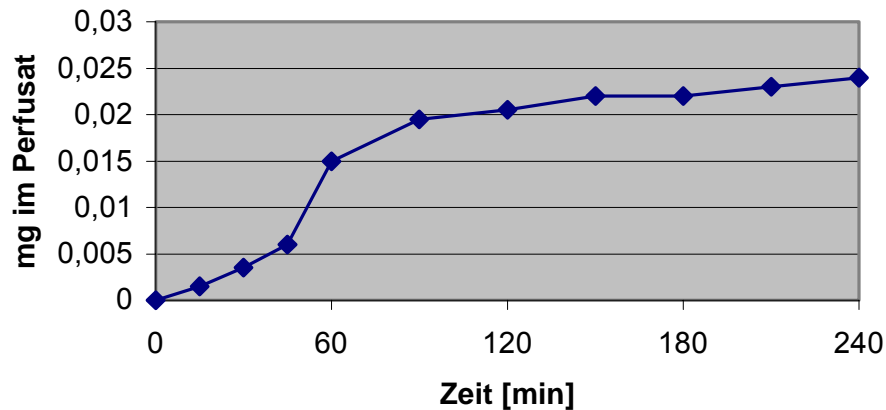


Abb. 22: Kumulative Darstellung der resorbierten Testosteronmenge im Perfusionszeitraum von 240 Minuten nach topischer Applikation von 40 mg Testosteron auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter. Angabe der Medianwerte (Tab. 8) aus zehn Einzelversuchen. (Vergleichende Darstellung und Statistik s. Abb. 28)

#### 4.3.2 Testosteronkonzentration in den Hautproben

Aus den in Anhangstabelle 9 aufgeführten Testosteronkonzentrationen der Hautproben wurden Median, 1. und 3. Quartil, Minimum und Maximum errechnet und in Tabelle 9 und Abbildung 23 dargestellt. Nach 60 Minuten befinden sich im gesamten Hautstück 5,76 µg Testosteron pro cm<sup>2</sup>. Dies entspricht 1,4 % der applizierten Dosis. Nach 120 Minuten sind es 5,14 µg/cm<sup>2</sup> (1,3 %) und nach 240 Minuten 5,33 µg (1,3 %).

Tab. 9: Testosteronkonzentration in der Haut von isoliert perfundierten Rindereutern nach topischer Applikation von 40 mg Testosteron auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut. Angabe von Median, 1. und 3. Quartil sowie Minimum und Maximum aus zehn Einzelversuchen.

Zeit [min]	Haut- schicht [µm]	Testosteron in der Haut [µg/cm <sup>2</sup> ]				
		<b>Median</b>	1. Quartil	3. Quartil	Minimum	Maximum
60	0-60	<b>1,61</b>	1,13	3,28	0,65	4,46
	61-120	<b>2,46</b>	1,34	2,71	0,80	8,04
	121-180	<b>1,69</b>	1,25	2,29	0,62	4,44
120	0-60	<b>1,89</b>	0,91	2,84	0,71	3,35
	61-120	<b>1,47</b>	1,11	1,89	0,55	4,88
	121-180	<b>1,78</b>	1,42	2,91	0,87	5,59
240	0-60	<b>1,24</b>	0,97	2,67	0,04	4,06
	61-120	<b>1,90</b>	1,68	3,28	1,07	6,02
	121-180	<b>2,19</b>	1,00	3,30	0,31	3,83

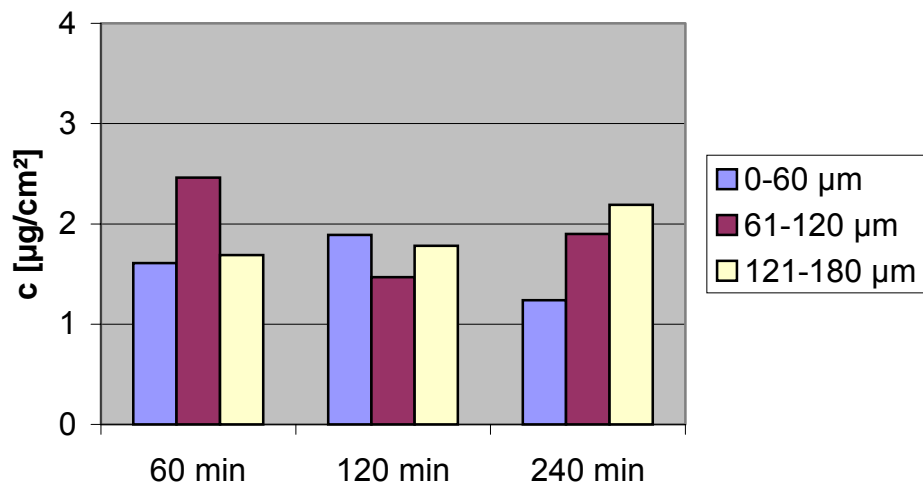


Abb. 23: Testosteronkonzentration in der Haut nach topischer Applikation von 40 mg Testosteron auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter. Medianwerte (Tab. 9) aus zehn Einzelversuchen. (Vergleichende Darstellung und Statistik s. Abb. 29-31)

#### 4.3.3 Testosteronkonzentration in der Hornschicht

Aus den in Anhangstabelle 6 aufgeführten Testosteronkonzentrationen der Tesafilmabrissproben wurden Median, 1. und 3. Quartil, Minimum und Maximum errechnet und in Tabelle 10 und Abb. 24 dargestellt. Nach 4 Stunden beträgt die Summe der Testosteronkonzentrationen aller zehn Tesafilmabrisse 19,71  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Dies entspricht 4,93 % der applizierten Dosis.

Tab. 10: Testosteronkonzentration in der Hornschicht 240 min nach topischer Applikation von 40 mg Testosteron auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter. Angabe von Median, 1. und 3. Quartil sowie Minimum und Maximum aus zehn Einzelversuchen.

Abriss	Testosteronkonzentration in den Tesafilmabrissen [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]				
	<b>Median</b>	1. Quartil	3. Quartil	Minimum	Maximum
1	<b>3,44</b>	1,58	5,44	0,53	9,17
2	<b>2,31</b>	1,55	5,13	0,83	10,53
3	<b>2,10</b>	1,06	3,72	0,73	4,50
4	<b>2,06</b>	1,06	3,35	0,74	6,48
5	<b>2,14</b>	1,66	3,51	1,17	4,58
6	<b>2,48</b>	2,25	3,29	1,28	4,33
7	<b>1,75</b>	1,46	2,29	0,87	7,80
8	<b>1,07</b>	0,82	1,30	0,47	3,27
9	<b>0,98</b>	0,82	1,19	0,19	2,23
10	<b>1,38</b>	0,95	1,85	0,49	2,72

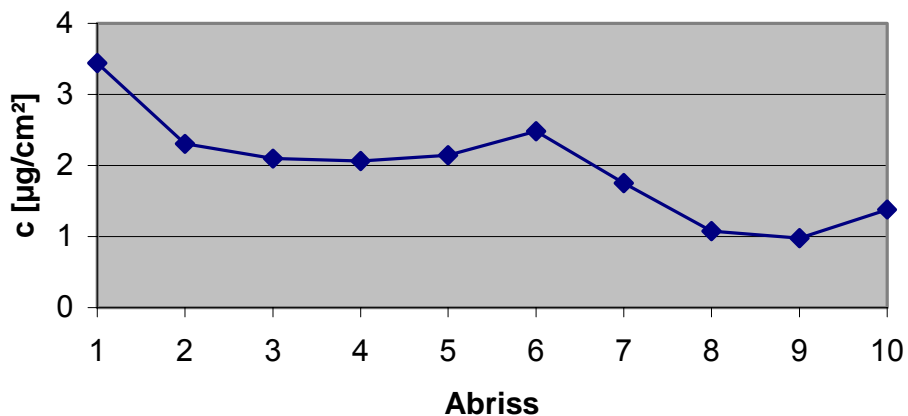


Abb. 24: Testosteronkonzentration in der Hornschicht 240 min nach topischer Applikation von 40 mg Testosteron auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter. Medianwerte ( Tab. 10) aus zehn Einzelversuchen. (Vergleichende Darstellung und Statistik s. Abb. 32)

#### 4.4 Mikrodialyse

##### 4.4.1 Benzooesäurekonzentration im Mikrodialysat

Die Einzelergebnisse aus sechs Einzelversuchen sind in Anhangstabelle 10 dargestellt. Tabelle 11 stellt die insgesamt aufgenommene Menge an Benzooesäure als Median, 1. und 3. Quartil sowie Minimum und Maximum dar. Eine kumulative Darstellung des Resorptionsverlaufes unter Verwendung des Medians zeigt Abbildung 25.

Über einen Mikrodialysezeitraum von drei Stunden gelangen 3,7 µg Benzooesäure ins Mikrodialysat (Tab. 2, Abb. 25). Dies entspricht 0,93 % der applizierten Dosis.

Tab. 11: Insgesamt aufgenommene Menge an Benzoesäure im Mikrodialysat über den Zeitraum von 180 Minuten nach topischer Applikation von 400 µg Benzoesäure auf die Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter.

Zeit [min]	Benzoesäureaufnahme in das Mikrodialysat [ng]				
	<b>Median</b>	1. Quartil	3. Quartil	Minimum	Maximum
40	<b>442,78</b>	275,55	504,53	177,51	875,32
60	<b>776,55</b>	450,19	1014,52	246,45	1239,70
80	<b>1168,53</b>	665,53	1603,80	303,66	1867,10
100	<b>1613,25</b>	917,28	2207,83	366,25	2858,40
120	<b>2100,60</b>	1218,83	2878,58	420,89	3726,70
140	<b>2684,10</b>	1460,80	3620,38	478,39	4885,50
160	<b>3182,20</b>	1662,23	4402,70	532,00	5986,50
180	<b>3702,40</b>	1915,33	5129,18	599,64	7081,10

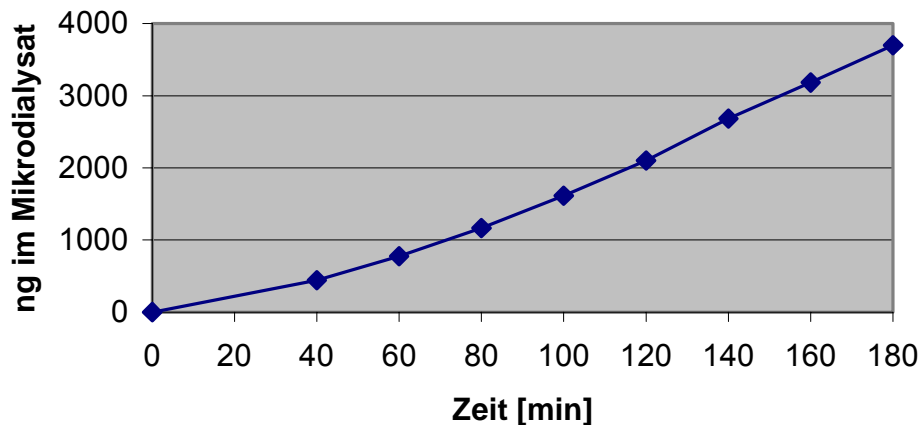


Abb. 25: Kumulative Darstellung der aufgenommenen Benzoesäuremenge im Mikrodialysat nach topischer Applikation von 400 µg Benzoesäure auf die Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter. Angabe der Medianwerte (Tab. 11) aus sechs Versuchen. (Vergleichende Darstellung und Statistik s. Abb. 33)

#### 4.4.2 Hydrocortisonkonzentration im Mikrodialysat

Die Einzelergebnisse aus fünf Einzelversuchen sind in Anhangstabelle 11 dargestellt. Tabelle 12 stellt die insgesamt aufgenommene Menge an Hydrocortison als Median, 1. und 3. Quartil sowie Minimum und Maximum dar. Eine kumulative Darstellung des Resorptionsverlaufes unter Verwendung des Medians zeigt Abbildung 26.

Über einen Mikrodialysezeitraum von drei Stunden gelangen 0,75 µg Hydrocortison ins Mikrodialysat (Tab. 2, Abb. 26). Dies entspricht 0,19 % der ursprünglich applizierten Dosis.

Tab. 12: Insgesamt aufgenommene Menge an Hydrocortison im Mikrodialysat über den Zeitraum von 180 Minuten nach topischer Applikation von 400 µg Hydrocortison auf die Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter.

Zeit [min]	Hydrocortisonaufnahme in das Mikrodialysat [ng]				
	<b>Median</b>	1. Quartil	3. Quartil	Minimum	Maximum
40	<b>169,79</b>	32,47	225,10	14,56	450,40
60	<b>219,42</b>	41,23	303,17	19,78	637,60
80	<b>261,86</b>	47,02	360,56	24,77	740,95
100	<b>409,48</b>	50,89	1077,70	32,69	1258,40
120	<b>452,40</b>	53,57	1170,40	35,39	1295,20
140	<b>683,92</b>	55,33	1219,90	37,47	1325,10
160	<b>723,87</b>	58,24	1257,50	38,35	1346,40
180	<b>750,85</b>	60,27	1282,50	40,69	1372,40

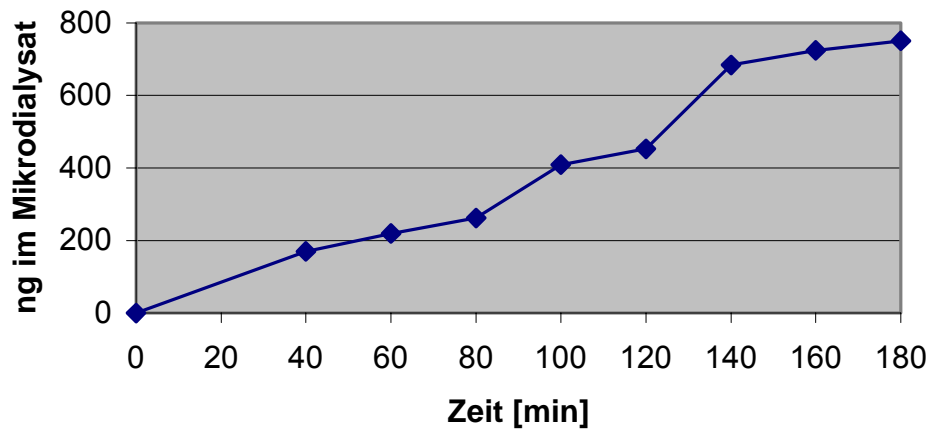


Abb. 26: Kumulative Darstellung der aufgenommenen Hydrocortisonmenge im Mikrodialysat nach topischer Applikation von 400 µg Hydrocortison auf die Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter. Angabe der Medianwerte (Tab. 12) aus fünf Versuchen. (Vergleichende Darstellung und Statistik s. Abb. 33)

#### 4.4.3 Testosteronkonzentration im Mikrodialysat

Die Einzelergebnisse aus sieben Einzelversuchen sind in Anhangstabelle 12 dargestellt. Tabelle 13 stellt die insgesamt aufgenommene Menge an Testosteron als Median, 1. und 3. Quartil sowie Minimum und Maximum dar. Eine kumulative Darstellung des Resorptionsverlaufes unter Verwendung des Medians zeigt Abbildung 27.

Über den gesamten Mikrodialysezeitraum von drei Stunden gelangen 15,66 ng Testosteron ins Mikrodialysat (Tab. 2, Abb. 27). Dies entspricht 0,004 % der applizierten Dosis.

Tab. 13: Insgesamt aufgenommene Menge an Testosteron im Mikrodialysat über den Zeitraum von 180 Minuten nach topischer Applikation von 400 µg Testosteron auf die Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter.

Zeit [min]	Testosteronaufnahme in das Mikrodialysat [ng]				
	Median	1. Quartil	3. Quartil	Minimum	Maximum
40	2,50	1,68	28,60	0,66	50,00
60	3,75	3,09	35,55	1,14	68,35
80	4,94	4,38	44,08	1,93	83,60
100	7,16	5,70	49,30	2,93	95,50
120	9,23	7,00	56,72	4,18	108,70
140	11,74	8,25	63,10	5,66	113,60
160	13,61	9,20	66,18	8,80	117,60
180	15,66	10,92	74,03	10,60	121,70

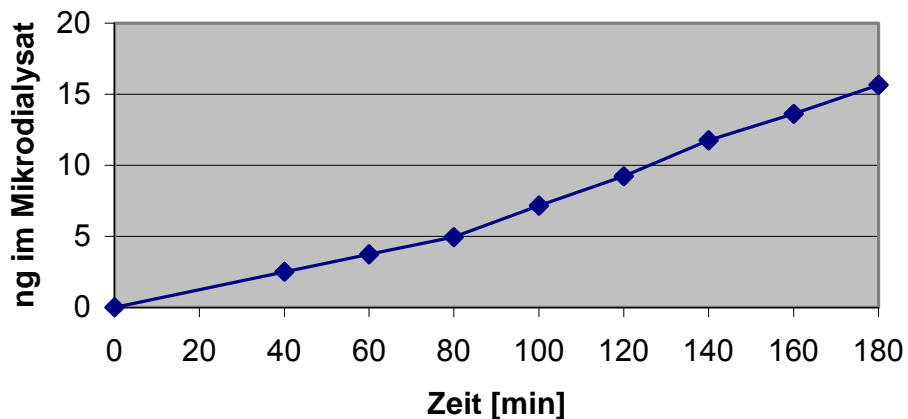


Abb. 27: Kumulative Darstellung der aufgenommenen Testosteronmenge im Mikrodialysat nach topischer Applikation von 400 µg Testosteron auf die Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter. Angabe der Medianwerte (Tab. 13) aus sieben Versuchen. (Vergleichende Darstellung und Statistik s. Abb. 33)

## 4.5 Vergleichende Darstellung der Versuchsergebnisse

### 4.5.1 Perfusatproben

Die kumulativ errechneten Gesamtkonzentrationen von Benzoesäure, Hydrocortison und Testosteron, die nach 240 Minuten im Perfusat gefunden wurden, wurden mittels U-Test verglichen. Dabei zeigt sich zwischen Benzoesäure und Hydrocortison ein schwach signifikanter ( $p=0,0205$ ), zwischen Benzoesäure und Testosteron ein hoch signifikanter ( $p<0,001$ ) und zwischen Hydrocortison und Testosteron ein signifikanter ( $p=0,0054$ ) Unterschied. Abbildung 28 stellt die insgesamt resorbierte Menge der Substanzen im Perfusat nach 240 Minuten in Form von Medianboxen vergleichend dar.

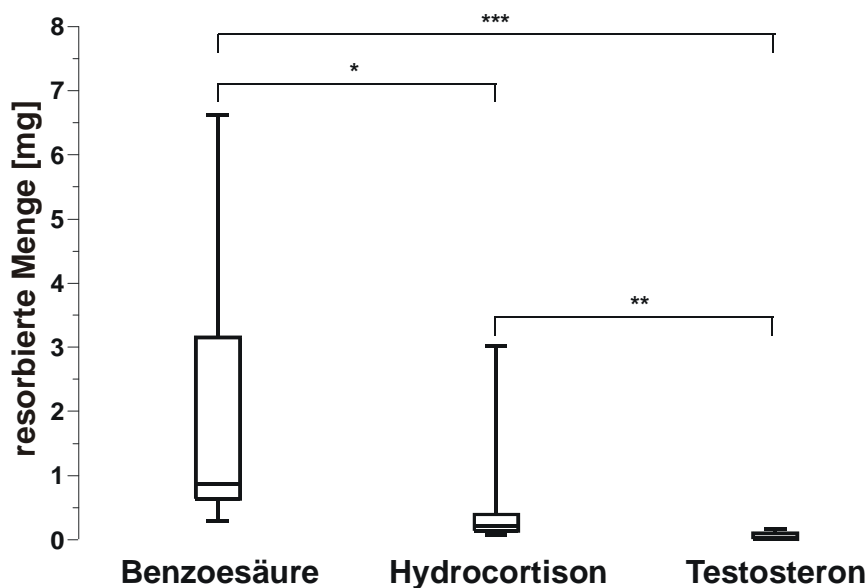


Abb. 28: Vergleich der binnen vier Stunden resorbierten Menge von Benzoesäure, Hydrocortison und Testosteron im Perfusat 240 min nach topischer Applikation von 40 mg der verwendeten Versuchssubstanzen auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter; \* = schwach signifikant, \*\* = signifikant, \*\*\* = hoch signifikant (U-Test).

#### 4.5.2 Hautproben

Die Summen der Konzentrationen aller Schnitte eines Probenentnahmezeitpunktes von Benzoesäure, Hydrocortison und Testosteron wurden mittels U-Test verglichen. Es zeigt sich zwischen den Substanzen nach 60, 120 und 240 Minuten kein signifikanter Unterschied (Abb. 29 - 31)

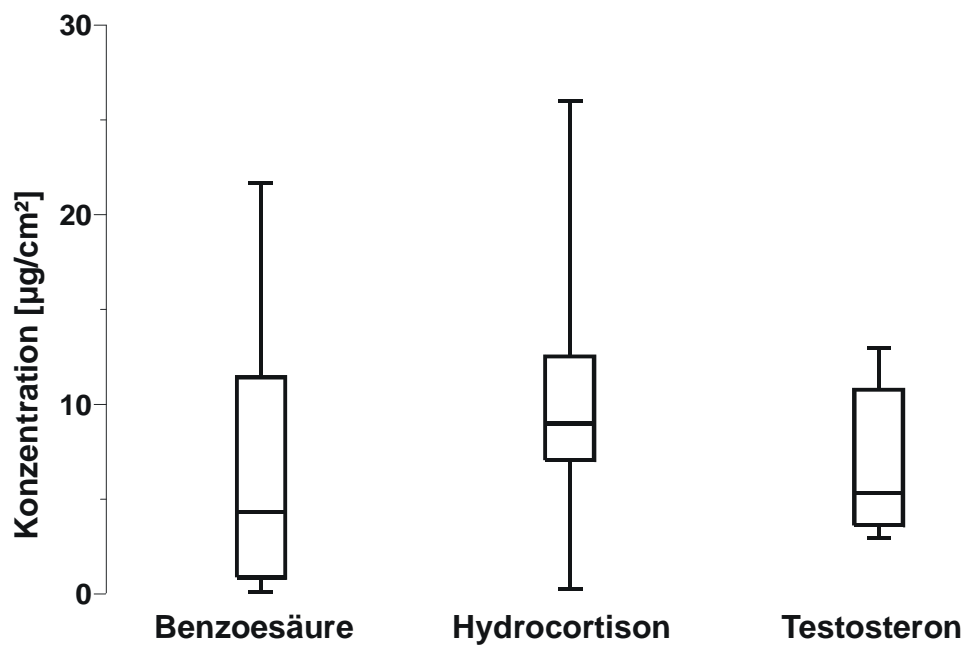


Abb. 29: Vergleich der Hautkonzentrationen von Benzoesäure, Hydrocortison und Testosteron 60 Minuten nach topischer Applikation von 40 mg der jeweiligen Substanz auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter.

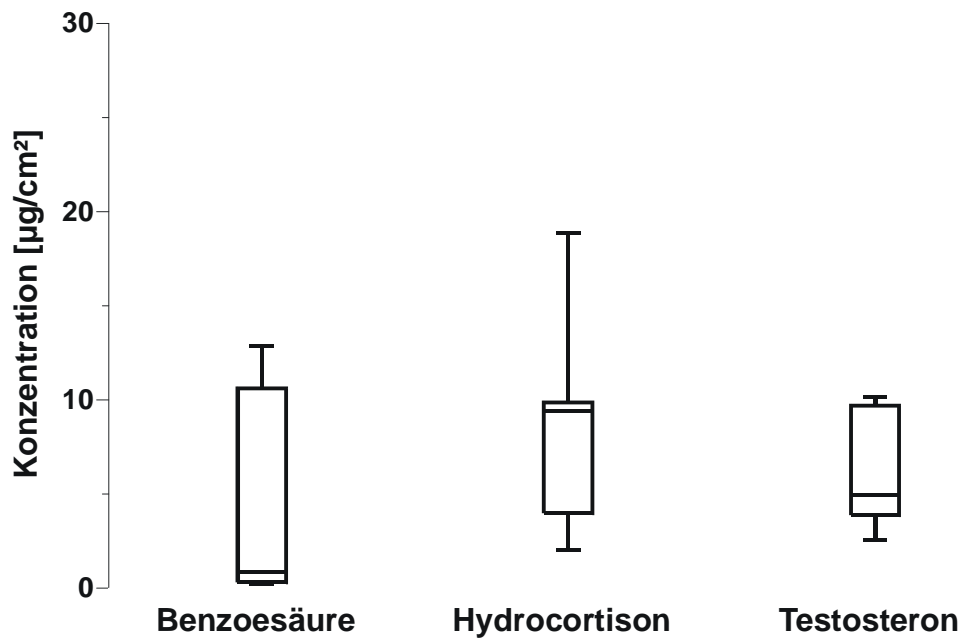


Abb. 30: Vergleich der Hautkonzentrationen von Benzooesäure, Hydrocortison und Testosteron 120 Minuten nach topischer Applikation von 40 mg der jeweiligen Substanz auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter.

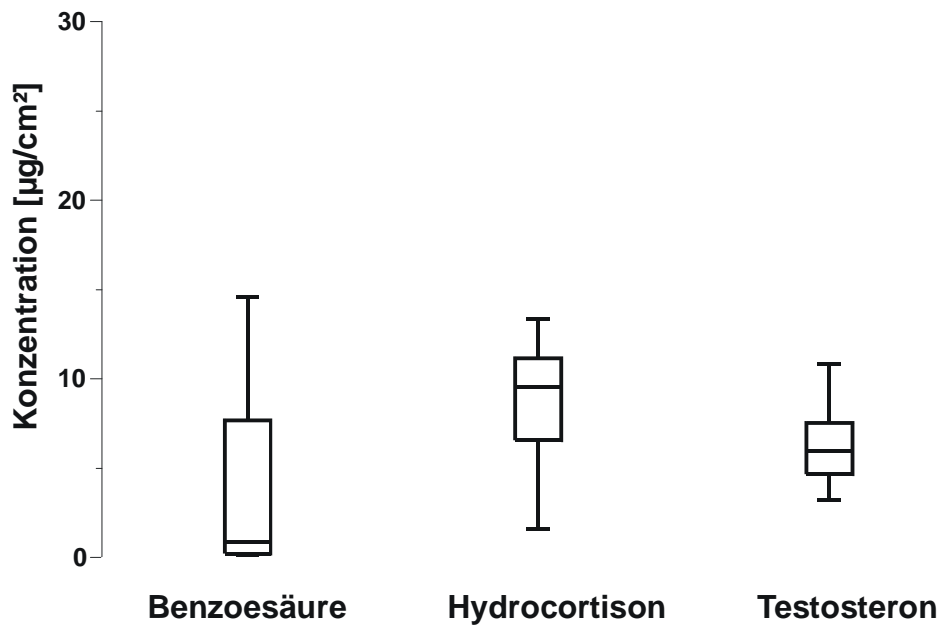


Abb. 31: Vergleich der Hautkonzentrationen von Benzoessäure, Hydrocortison und Testosteron 240 Minuten nach topischer Applikation von 40 mg der jeweiligen Substanz auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter.

#### 4.5.3 Tesafilmabrissproben

Die Summen der Konzentrationen aller zehn Tesafilmabrissproben von Benzoessäure, Hydrocortison und Testosteron wurden mittels U-Test verglichen. Dabei zeigt ein Vergleich der Versuchsgruppen Benzoessäure und Hydrocortison keinen signifikanten, Benzoessäure und Testosteron keinen signifikanten und Hydrocortison und Testosteron einen schwach signifikanten ( $p=0,0454$ ) Unterschied (Abb. 32).

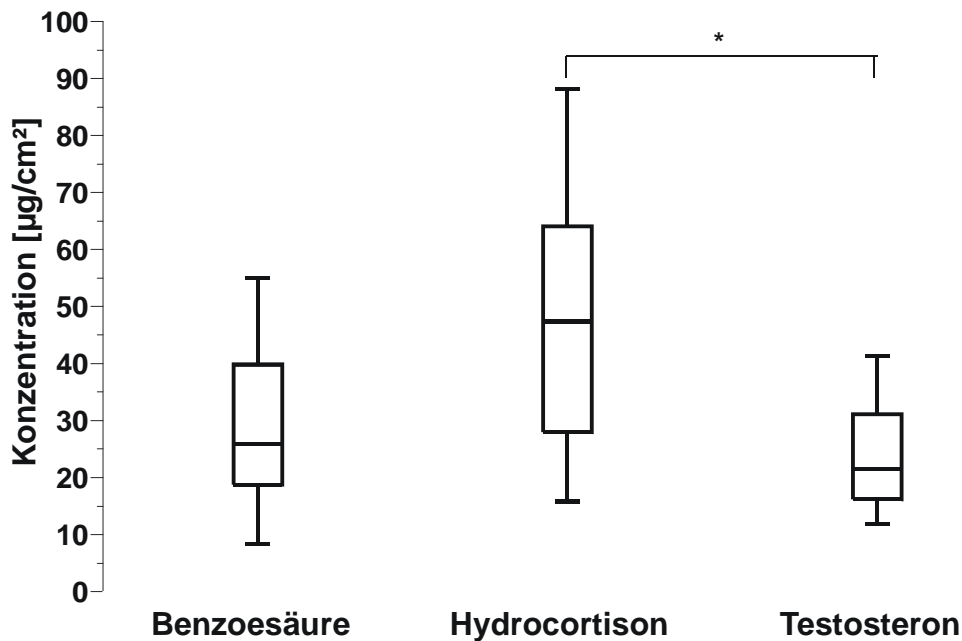


Abb. 32: Vergleich der Gesamtkonzentrationen der zehn Tesafilmabrisssproben von Benzoessäure, Hydrocortison und Testosteron vier Stunden nach topischer Applikation von 40 mg der verwendeten Versuchssubstanzen auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter (\* = schwach signifikant).

#### 4.5.4 Mikrodialyseproben

Verglichen wurden die kumulativ errechneten Gesamtkonzentrationen von Benzoessäure, Hydrocortison und Testosteron, die nach 180 Minuten im Mikrodialysat gefunden wurden. Im U-Test zeigt ein Vergleich der Versuchsgruppen Benzoessäure und Hydrocortison einen schwach signifikanten ( $p=0,0303$ ), Benzoessäure und Testosteron einen signifikanten ( $p=0,00117$ ) und Hydrocortison und Testosteron keinen signifikanten Unterschied. Abbildung 33 stellt die insgesamt aufgenommene Menge der Versuchssubstanzen im Mikrodialysat nach 180 Minuten in Form von Medianboxen vergleichend dar.

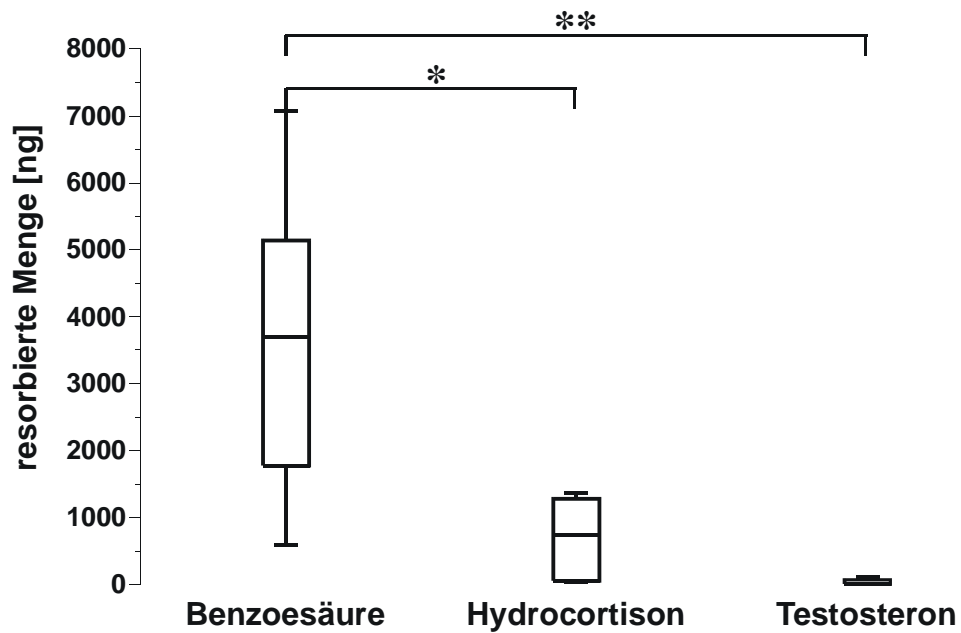


Abb. 33: Vergleich der binnen drei Stunden aufgenommene Menge von Benzoessäure, Hydrocortison und Testosteron im Mikrodialysat nach topischer Applikation von 400 µg Versuchssubstanz auf die Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter; (\* = schwach signifikant, \*\* = signifikant).

## 5 Diskussion

Bezugnehmend auf ihr Vier-Kompartiment-Modell (Abb. 34) haben GUY u. HADGRAFT (1984) Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{1-4}$ ) für Benzoessäure, Hydrocortison und Testosteron bestimmt (Tab. 14). Diese Geschwindigkeitskonstanten basieren auf *In-vivo*-Untersuchungen am Menschen über einen Versuchszeitraum von 72 Stunden. Die Kenntnis der Geschwindigkeitskonstanten eines Wirkstoffs erlaubt eine Abschätzung seines pharmakokinetischen Verhaltens in Bezug auf die Penetration, Permeation und Resorption. Das Kompartimentmodell und die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten von GUY u. HADGRAFT (1984) dienen als Diskussionsgrundlage für die vorliegenden Ergebnisse, die in den Untersuchungen am isoliert perfundierten Rindereuter gewonnen wurden.

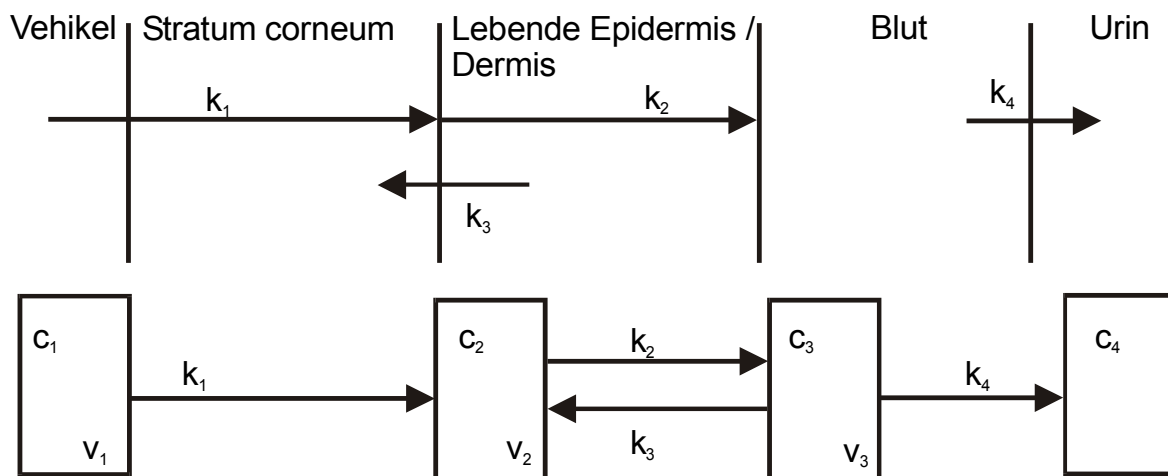


Abb. 34: Kompartimentmodell der perkutanen Absorption (nach GUY u. HADGRAFT 1984), (Abb. 5 entsprechend)

Die Geschwindigkeitskonstante  $k_1$  beschreibt den Wirkstoffeintritt in das *Stratum corneum*. Nach GUY u. HADGRAFT (1984) (Tab.14) penetriert Benzoessäure ( $k_1 = 0,184$ ) deutlich schneller als Testosteron ( $k_1 = 0,058$ ) und Hydrocortison ( $k_1 = 0,022$ ) in das *Stratum corneum*. Hydrocortison braucht mit einer Halbwertszeit von 31,5

Stunden im Vergleich zu Benzoesäure und Testosteron sehr lange, um in die Hornschicht zu gelangen. Die Halbwertszeit ( $t_{50}$ ) errechnet sich aus  $k$  über  $t_{50} = \ln 2/k$ .

Tab. 14: Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  bis  $k_4$  (1/h) sowie Halbwertszeiten  $t_{50}$  (h) für Benzoesäure, Hydrocortison und Testosteron (nach GUY u. HADGRAFT 1984)

Substanz	$k_1$	$t_{50}$	$k_2$	$t_{50}$	$k_3$	$t_{50}$	$k_4$	$t_{50}$
Benzoessäure	0,184	3,8	2,88	0,2	0,014	49,5	0,592	1,2
Hydrocortison	0,022	31,5	1,44	0,5	0,180	3,9	0,158	4,4
Testosteron	0,058	12,0	1,44	0,5	2,7	0,3	0,104	6,7

Aufgrund der nachgewiesenen Wirkstoffmengen in den Tesafilmabrissproben (Summe von zehn Abrissen) befinden sich in der Hornschicht der Euterhaut 24,64  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Benzoesäure (6,16 % der applizierten Dosis), 45,33  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Hydrocortison (11,33 %) und 19,71  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Testosteron (4,93 %). Ein signifikanter Unterschied, der auf den 1. Abriss zurückzuführen ist, besteht zwischen Hydrocortison und Testosteron. Dieser signifikante Unterschied entfällt, wenn nur Abriss 2 bis 10 in der statistischen Auswertung berücksichtigt werden.

Aus Abbildung 35 ist ersichtlich, dass insbesondere Hydrocortison in oberflächlichen Schichten bzw. auf der Haut verbleibt und langsamer in die Hornschicht eindringt als Benzoesäure und Testosteron. Der erste Tesafilmabriss allein enthält 23,79  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (5,9 %) Hydrocortison, 6,83  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (1,7 %) Benzoesäure und 3,44  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (0,8 %) Testosteron. Vernachlässigt man den ersten Tesafilmabriss, ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen von Benzoesäure, Hydrocortison und Testosteron festzustellen. Die Substanzen wurden in gelöster Form (in Aceton bzw. absolutem Alkohol) auf die Euterhaut aufgetragen. Die Lösung stellt das erste Kompartiment (Vehikel) dar. Eine Abhängigkeit der Wirkstofffreigabe von der Grundlage wie sie bei galenischen Formulierungen wie z.B. Salben, Cremes oder Gelen auftritt, besteht für Benzoesäure, Hydrocortison und Testosteron in dieser Versuchsdurchführung nicht. Die Wirkstoffpenetration von Benzoesäure,

Hydrocortison und Testosteron ins *Stratum corneum* erfolgt unter vergleichbaren Bedingungen.

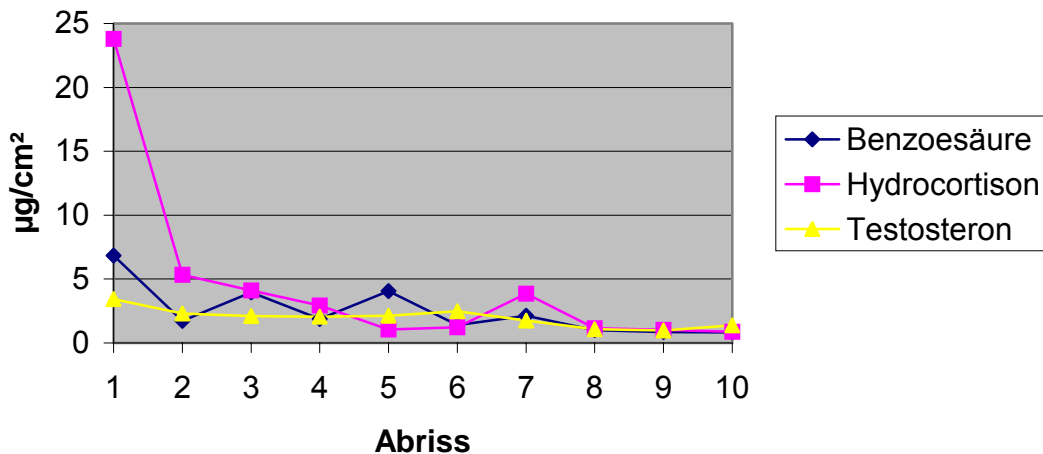


Abb. 35: Konzentrationen von Benzoessäure, Hydrocortison und Testosteron in den Tesafilmaabrissen im Vergleich, unter Verwendung der Mediane, nach topischer Applikation von 40 mg Substanz auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter.

Die von GUY u. HADGRAFT (1984) berechnete Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  (Abb. 34) beschreibt den Durchtritt durch den lebenden wässrigen Anteil der Epidermis und die anschließende Aufnahme des Wirkstoffes in die Gefäße der Dermis. In der menschlichen Haut ist die Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  von Benzoessäure ( $k_2 = 2,88$ ) nach den *In-vivo*-Untersuchungen von GUY u. HADGRAFT (1984) größer als die von Hydrocortison ( $k_2 = 1,44$ ) und Testosteron ( $k_2 = 1,44$ ). In eigenen Untersuchungen gibt es im lebenden Anteil der Epidermis und Dermis der Euterhaut nach 60, 120 und 240 Minuten keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Konzentrationen von Benzoessäure, Hydrocortison und Testosteron (Abb. 36). Nach 60 min befinden sich im gesamten Hautstück (bis 180 µm Tiefe) 3,21 µg Benzoessäure pro cm<sup>2</sup>. Dies entspricht 0,8 % der applizierten Dosis. Nach 120 min

sind es  $0,92 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (0,2 %) und nach 240 min  $0,86 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (0,2 %). Damit ist für Benzoesäure tendenziell eine mit der Zeit abnehmende Konzentration in der Haut festzustellen. Die Testosteronkonzentration in der Haut variiert zu den Entnahmezeitpunkten zwischen  $5,14$  und  $5,76 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (1,3-1,4 %), die von Hydrocortison zwischen  $6,5$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  und  $8,53 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (1,6-2,1 %). Der lebende Anteil der Epidermis und die Dermis stellen für alle drei Wirkstoffe im Vergleich zur Hornschicht offensichtlich keine die Resorptionsgeschwindigkeit bestimmende Barriere dar.

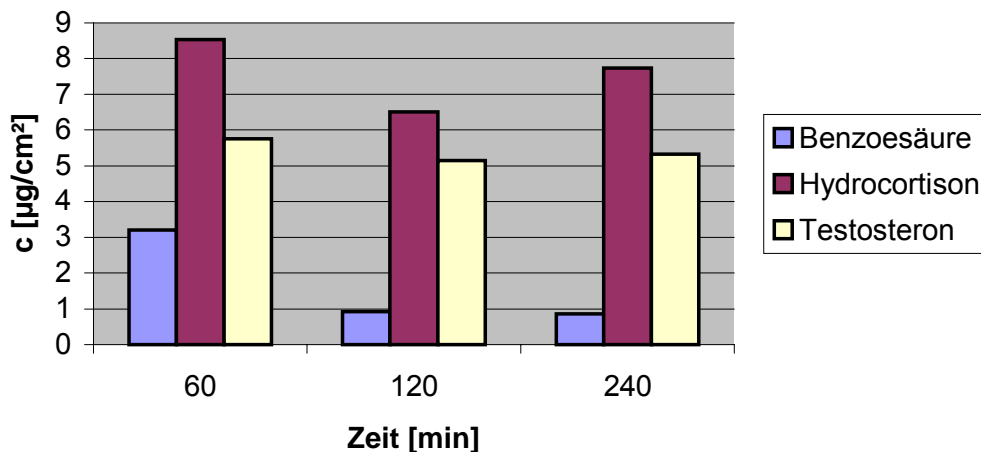


Abb. 36: Vergleichende Darstellung der Gesamtkonzentration von Benzoesäure, Hydrocortison und Testosteron in der Hautprobe (0-180  $\mu\text{m}$ ) zu verschiedenen Zeitpunkten; Angabe der Mediane nach topischer Applikation von 40 mg Substanz auf  $100 \text{ cm}^2$  Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter.

Die von GUY u. HADGRAFT (1984) 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* haben und ein Reservoir in der Hornschicht ausbilden. Die von GUY u. HADGRAFT (1984) berechnete Geschwindigkeitskonstante  $k_4$  beschreibt die Elimination eines Wirkstoffs

aus dem Organismus, also den Übertritt vom 3. Kompartiment (Blut) ins 4. Kompartiment (Urin) und wird beim isoliert perfundierten Rindereuter nicht erfasst.

Wie  $k_3$  ausweist, hat nach GUY u. HADGRAFT (1984) Testosteron ein hohes Maß an Rückdiffusion in das *Stratum corneum*, gefolgt von Hydrocortison und Benzoessäure. Demnach flutet Benzoessäure schnell aus der Haut in das Blut ab, da eine Rückdiffusion in die Hornschicht kaum stattfindet. Aufgrund seiner Polarität kann Hydrocortison relativ schnell durch die Dermis permeieren, wenn das Hornschichtdepot „aufgefüllt“ ist und in den Blutkreislauf gelangen. Eine Rückdiffusion findet statt, aber deutlich weniger ausgeprägt als beim lipophileren Testosteron. Es resultiert für Testosteron eine insgesamt langsame Abflutung in das Gefäßsystem. Für Benzoessäure, Hydrocortison und Testosteron ergeben sich die in Abbildung 37 dargestellten Verteilungsprofile in der menschlichen Haut *in vivo*.

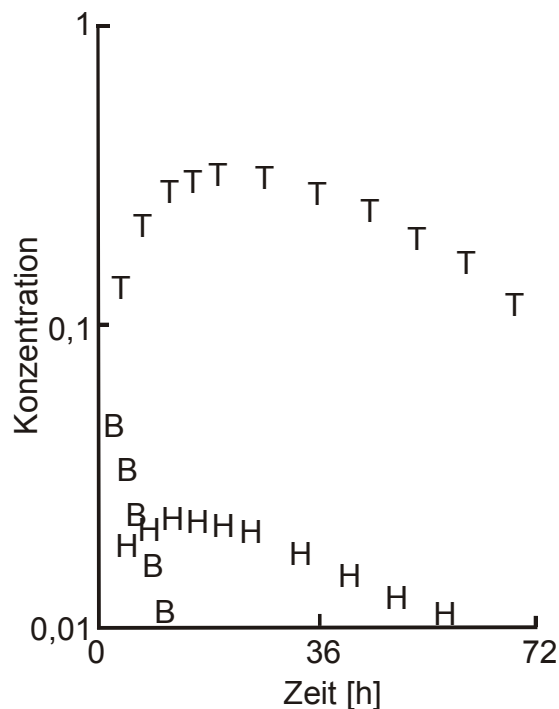


Abb. 37: Schematische Verteilungsprofile in der menschlichen Haut *in vivo* als Zeitfunktion für Testosteron (T), Benzoessäure (B) und Hydrocortison (H) (nach GUY u. HADGRAFT 1984)

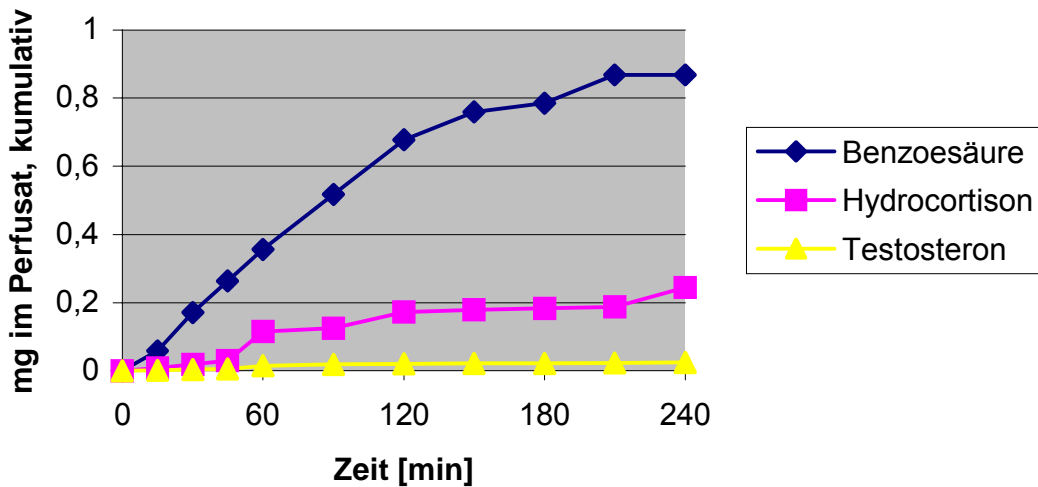


Abb. 38: Kumulative Darstellung der resorbierten Menge von Benzooesäure, Hydrocortison und Testosteron im Perfusat; Angabe der Mediane nach topischer Applikation von 40 mg Substanz auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter.

Wie aus der vergleichenden Darstellung (Abb. 38) ersichtlich wird, gelangt im Vergleich zu Hydrocortison und Testosteron signifikant mehr Benzooesäure ins Perfusat. Während 0,87 mg Benzooesäure, das entspricht 2,2 % der applizierten Dosis, über den Versuchszeitraum von vier Stunden resorbiert wurden, sind es bei Hydrocortison 0,25 mg (0,6%) und bei Testosteron 0,02 mg (0,1 %). Die Perfusatproben und auch die Mikrodialysatproben erlauben eine Aussage über die Geschwindigkeit, mit der eine Substanz durch die Haut permeiert. Danach permeiert Benzooesäure in den eigenen Untersuchungen gemäß Abbildung 38 und Abbildung 40 schneller als Hydrocortison und Testosteron durch die Haut. Die Konzentrationen in der Hornschicht sowie im lebenden Anteil der Epidermis und der Dermis können nur momentane Zustände beschreiben. Betrachtet man die prozentuale Wiederfindung von Benzooesäure, Hydrocortison und Testosteron, die man mit Hilfe der Perfusatproben, Hautproben (240 min) und Tesafimabrissproben erhält, so

lassen sich am Versuchsende nach vier Stunden insgesamt 8,6 % Benzoesäure, 13,8 % Hydrocortison und 6,3 % Testosteron nachweisen. Aufgrund der Ergebnisse von STOUGHTON (1976) (s. Seite 102) ist die Angabe von resorbierten Mengen in Prozent jedoch problematisch.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zeigen, dass Benzoesäure am isoliert perfundierten Rindereuter vergleichsweise rasch durch die Haut permeiert und kein Depot in der Haut ausbildet. Nach 60 min ist die höchste Benzoesäurekonzentration in der Haut vorhanden; zu den folgenden Zeitpunkten ist sie bereits geringer. Untersuchungen mit Benzoylperoxid, welches bereits in der Haut zu Benzoesäure metabolisiert wird, bestätigen diese Resultate (SEUBERT *et al.* 1984; ARENS 1991, BLUME *et al.* 1998). Aufgrund des schnellen Durchtritts durch das *Stratum corneum* ist die Benzoesäuremenge, die im Perfusat gefunden wurde, im Vergleich zu Hydrocortison und Testosteron am größten, während die Konzentration in den Hautproben und in den Tesafilmabrissproben mit den Konzentrationen von Testosteron und Hydrocortison vergleichbar ist.

HUNZIKER *et al.* (1978) zeigten, dass topisch auf die Haut angewandte Benzoesäure nach acht Stunden schon zu 75 % penetriert und nach 24 Stunden keine Benzoesäure mehr nachweisbar ist. Auch Untersuchungen an anderen *In-Vitro*-Modellen (z. B. Diffusionszellen, isoliert perfundiertes Schweineohr, isoliert perfundierte Schweinehautlappen) bestätigen die rasche Penetration und Permeation von Benzoesäure (BRONAUGH *et al.* 1982a,b; CARVER *et al.* 1989; ELLIOT *et al.* 1997). FRANZ (1975) entwickelte eine Diffusionszelle, die sogenannte „Franz-Zelle“, mit der er Penetrationsstudien an Humanhaut durchführte. Auch dabei wird Benzoesäure als schnell permeierende Substanz eingestuft (FRANZ 1975, 1978).

NATHAN *et al.* (1990) und MacPHERSON *et al.* (1996) haben Untersuchungen mit Benzoesäure an Diffusionszellen unter Einsatz von haarloser Meerschweinchenhaut durchgeführt. NATHAN *et al.* (1990) stellen fest, dass die perkutane Resorption von Benzoesäure hauptsächlich in den ersten 24 Stunden nach Applikation stattfindet. MacPHERSON *et al.* (1996) applizierten 12, 40 sowie 120 µg Benzoesäure pro

Quadratcentimeter auf die Haut und fanden nach 24 Stunden Resorptionsraten von 22,71 %, 23,19 % und 55,94 %. FELDMANN u. MAIBACH (1970) führten *In-vivo*-Studien beim Menschen mit 21 verschiedenen organischen Substanzen durch. 4 µg/cm<sup>2</sup> dieser Substanzen wurden auf die Haut des Unterarms appliziert. Nach Messungen in den ersten zwölf Stunden nach Applikation von Benzoesäure gelangen 3 % der verabreichten Dosis pro Stunde in den Urin, d.h. nach vier Stunden sind es 12 %. Dieser prozentuale Anteil ist deutlich größer als der ermittelte Wert aus eigenen Untersuchungen. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse ist jedoch aufgrund der unterschiedlichen Versuchsdurchführung (u.a. *in vitro* bzw. *in vivo*) nicht möglich. Dennoch zeigen beide Studien, dass eine hohe Resorptionsrate von Benzoesäure besteht.

WESTER u. MAIBACH (1975, 1976, 1985) verglichen die Resorption von Benzoesäure, Hydrocortison und Testosteron beim Rhesusaffen über einen Zeitraum von fünf Tagen unter Bezug auf Angaben von FELDMANN u. MAIBACH (1969, 1970). Unter Einsatz ansteigender Dosierungen bestätigen sie, dass Benzoesäure am schnellsten resorbiert wird, gefolgt von Testosteron und Hydrocortison (Abb. 9). Diese Aussage wird auch von REGNIER *et al.* (1993) nach Studien an rekonstruierter humaner Epidermis getroffen.

Die hier dargestellten Versuche am isoliert perfundierten Rindereuter zeigen deutlich, dass Hydrocortison während des Zeitraumes von vier Stunden nur unvollständig ins *Stratum corneum* penetriert. Der Hauptanteil von Hydrocortison befindet sich noch in den oberen Lagen des *Stratum corneum* bzw. auf der Hautoberfläche. Nur wenig wurde resorbiert und konnte ins Perfusat gelangen. Aus dem sich noch anfüllenden Depot, erfolgt je nach Affinität zum *Stratum corneum* die Wirkstofffreigabe. Aus Abbildung 20 ist die Tendenz zu erkennen, dass die Hydrocortisonmenge nach 60 min in einer Tiefe von 0-60 µm im Vergleich zu den folgenden Hautschichten (61-120, 121-180 µm) am größten ist. Nach 240 min verschiebt sich die höchste Konzentration in Richtung der Hauttiefe von 121-180 µm. Die langsame Penetration von Hydrocortison ins *Stratum corneum* deckt sich mit den Angaben von GUY u. HADGRAFT (1984), die eine Halbwertszeit von 31,5 Stunden für das Eindringen in

die Hornschicht ermittelten. FELDMANN u. MAIBACH (1965) führten eine Studie mit topisch appliziertem Hydrocortison beim Menschen durch, in der sie über den Zeitraum von zehn Tagen, die Hydrocortisonkonzentration im Urin bestimmten. Sie konnten insgesamt 0,46 % der ursprünglich verabreichten Dosis in zehn Tagen nachweisen. Innerhalb der ersten zwölf Stunden waren es 0,044 %. Dies ist deutlich weniger als die Menge, die nach vier Stunden im Perfusat (0,61 %) zu finden war. Da es sich beim Urin und beim Perfusat um zwei unterschiedliche Kompartimente handelt, ist ein direkter Vergleich nicht möglich. Grundsätzlich bestätigen aber diese Ergebnisse die langsame Resorption von Hydrocortison. In einer anderen Studie von FELDMANN u. MAIBACH (1969) wurden 4 µg/cm<sup>2</sup> Hydrocortison auf den ventralen Unterarm beim Menschen aufgetragen. Anschließend wurde die Hydrocortisonkonzentration im Urin über fünf Tage gemessen. Nach fünf Tagen wurden insgesamt 1,87 % der verabreichten Dosis nachgewiesen. In den ersten zwölf Stunden ermittelten sie eine Absorptionsrate von 0,005 % pro Stunde, daraus resultiert eine Absorption von 0,02 % der applizierten Dosis nach vier Stunden.

Untersuchungen von BONSMANN u. ROHDEWALD (1996) an menschlicher Haut *in vitro* zeigen, dass die Lipophilie von Glukokortikoiden positiv mit der Gewebsbindung korreliert. Es kommt zu einem Depoteffekt und zu einer länger andauernden Wirkstofffreigabe bzw. Penetration aus dem Reservoir. Die Ergebnisse aus den Versuchen am isoliert perfundierten Rindereuter zeigen, dass sich nach vier Stunden im Perfusat signifikant mehr Hydrocortison (0,25 mg) als Testosteron (0,02 mg) befindet. Dieses Ergebnis stimmt nicht mit denen aus *In-vivo*-Studien (FELDMANN u. MAIBACH 1969; WESTER u. MAIBACH 1975) überein. Die Resorptionsrate von lipophilen Steroiden, wie z.B. Testosteron, ist im Vergleich zu den eher weniger lipophilen Steroiden, wie Hydrocortison, bei *In-vivo*- und *In-Vitro*-Untersuchungen höher. Die Versuchsdauer dieser Studien beträgt jedoch fünf Tage im Gegensatz zu den vier Stunden andauernden Versuchen am isoliert perfundierten Rindereuter. Ferner handelt es sich im Gegensatz zu den *In-vivo*-Untersuchungen beim isoliert perfundierten Rindereuter um ein offenes System.

Es ist bekannt, dass in der Initialphase der Penetration der *Shunt*-Weg über die Hautanhangsorgane für extrem langsam diffundierende Substanzen relevant ist

(NEUBERT *et al.* 2001). SCHEUPLEIN (1972) konnte dies auch für Hydrocortison zeigen. Auch ILLEL u. SCHAEFER (1988) stellen fest, dass der *Shunt*-Weg für Hydrocortison insbesondere in den ersten 24 Stunden der perkutanen Resorption von höherer Bedeutung ist. Aufgrund dieser Beobachtungen kann angenommen werden, dass sich bei einer längeren Versuchsdauer am isoliert perfundierten Rindereuter, die Resorptionsrate zugunsten von Testosteron verschieben würde. Die Versuchsdauer am isoliert perfundierten Rindereuter ist jedoch zeitlich aufgrund einer Vitalitätsminderung begrenzt (KIETZMANN *et al.* 1995). Allerdings stellen HUEBER *et al.* (1993, 1994) in *In-Vitro*-Studien fest, dass auch Testosteron über die Hautanhangsorgane in die Haut penetriert. Desweiteren wurde eine Beziehung zwischen der Absorptionsrate eines der in dieser Studie eingesetzten Steroids und seines Vehikels festgestellt (HUEBER *et al.* 1993).

WESTER u. NOONAN (1980) weisen darauf hin, dass sich bei ansteigender applizierter Dosis einer Substanz die prozentuale Applikationsrate verändern kann, und auch die Applikationsfläche auf der Haut entscheidend ist. Beim isoliert perfundierten Rindereuter wurde eine relativ große Applikationsfläche von 100 cm<sup>2</sup> genutzt. Diese Fläche vergrößert sich im Gegensatz zu Diffusionzellen, da die applizierte Substanz zu den Seiten diffundieren kann (KIETZMANN *et al.* 1995). STOUGHTON (1976) führte *In-vitro*-Untersuchungen mit markiertem Hydrocortison durch, die zeigen, dass bei steigender Wirkstoffkonzentration im Externum der prozentuale Anteil des permeierenden Wirkstoffes abnimmt. Während bei einer 4 %igen Konzentration von Hydrocortison im Vehikel (Dimethylacetamid) 0,7 % Hydrocortison nach 7 Stunden durch die Haut penetrieren, sind es bei einer 0,015 %igen Konzentration 9,1 %.

Die Testosteronmenge im Perfusat (0,023 mg) ist nach vier Stunden signifikant niedriger als die von Benzoesäure und Hydrocortison. In den Hautproben nimmt Testosteron bezüglich der Menge eine mittlere Position ein, signifikante Unterschiede zu den Konzentrationen von Benzoesäure und Hydrocortison bestehen nicht. In den Tesafilmabrissproben ist die Gesamtkonzentration aller zehn Abrisse von

Testosteron am geringsten. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Testosteron aufgrund seiner Lipophilie zügig in tiefere Schichten der Epidermis gelangen kann. Das *Stratum corneum* wird von Testosteron mit der gleichen Geschwindigkeit wie Hydrocortison verlassen (GUY u. HADGRAFT 1984). Da Testosteron im Gegensatz zu Benzoesäure und Hydrocortison eine stark ausgeprägte Rückverteilung in die Hornschicht hat, flutet es *in vivo* insgesamt weniger ab.

FELDMANN u. MAIBACH (1969) haben in ihrer Untersuchung nicht nur Hydrocortison sondern auch Testosteron eingesetzt. Testosteron wurde wie Hydrocortison in einer Konzentration von 4 µg/cm<sup>2</sup> auf den ventralen Vorderarm beim Menschen appliziert. Nach fünf Tagen wurden 13,24 % der topisch aufgetragenen Menge im Urin nachgewiesen. In den ersten zwölf Stunden betrug die Absorptionsrate 0,147 % pro Stunde. Daraus resultiert eine Absorptionsmenge von 0,588 % Testosteron nach vier Stunden. HUEBER *et al.* (1994) ermittelten in *In-vitro*-Studien an menschlicher Haut für Testosteron nach acht Stunden eine Absorptionsrate von 1,33 % und für Hydrocortison eine Absorptionsrate von 0,012 %. BARTEK *et al.* (1972) führten eine Studie bei Mensch, Ratte, Kaninchen sowie Miniaturschwein durch, um die perkutane Absorption verschiedener Wirkstoffe, u.a. Testosteron, zu vergleichen. Die Testosteronpenetration war durch die Haut des Kaninchens (69,6 %) am höchsten, gefolgt von Ratten-, Schweine- und Menschenhaut (47,4 %, 29,4 %, 13,2 %). Diese Studie zeigt, dass es bezüglich der Resorption von Substanzen durch die Haut Speziesunterschiede gibt. Für einen Vergleich der Resorptions- bzw. Penetrationsraten sind genaue Informationen über die Versuchsbedingungen notwendig, da die Wirkstoffpenetration in Abhängigkeit von Versuchsmodell, Spezies und Hautlokalisation erheblich variiert.

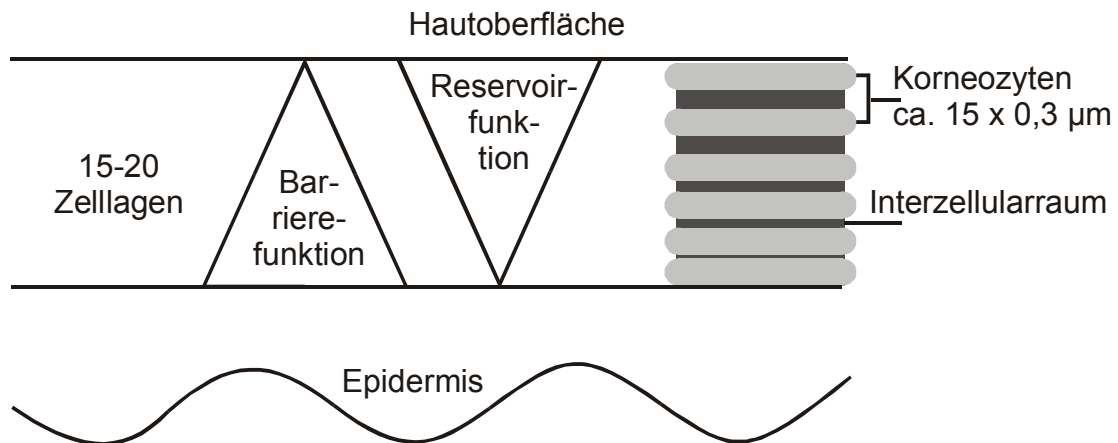


Abb. 39: Struktur und Funktion der menschlichen Hornschicht (nach NEUBERT *et al.* 2001)

Bei der vergleichenden Darstellung der Konzentrationen von Benzoesäure, Hydrocortison und Testosteron in den Tesafilmabrissproben (Abb.35) fällt auf, dass in den ersten sieben Abrissen tendenziell höhere Wirkstoffmengen vorliegen als in den darauffolgenden. Das *Stratum corneum* unterteilt sich in das an der Oberfläche liegende und aufgelockerte *Stratum corneum disjunctum* und in das tiefer liegende kompakte *Stratum corneum conjunctum* (LIEBICH 1999). Das *Stratum corneum disjunctum* spielt eine größere Rolle bezüglich der Reservoirfunktion und das *Stratum corneum conjunctum* bezüglich der Barrierefunktion der Haut (Abb. 39) (PELLETT *et al.* 1997; NEUBERT *et al.* 2001). Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann geschlossen werden, dass die Hornhautlamellen der Euterhaut auf den ersten sieben Tesafilmabrissen dem *Stratum corneum disjunctum* entsprechen. Alle folgenden Tesafilmabrissproben enthalten Anteile des *Stratum corneum conjunctum*. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen ZESCH *et al.* (1973). Nach Auftragen tritiummarkierter Salbe auf exzidierte menschliche Haut und nach einer Einwirkungszeit von 100 min wurden von der Haut Tesafilmabrissproben entnommen. Die gemessene Aktivität pro Milligramm anhaftendem Gewebe nahm vom 1. bis 7. Abriss steil ab und blieb ab dem 9. Abriss konstant. Auch in einer Darstellung von BLANK (1953b) wird gezeigt, dass der transepidermale

Wasserverlust (s. Seite 14) nach dem 8. Tesafilmabriss steil zunimmt. Anhand der Tesafilmabrissproben ist gut zu erkennen, dass keine homogene Sättigung der Hornschicht nach einmaliger epikutaner Applikation eintritt, sondern dass sich Konzentrierungen in bestimmten Hautschichten im Zuge der Permeation und Anreicherung einstellen (STÜTTGEN 1972).

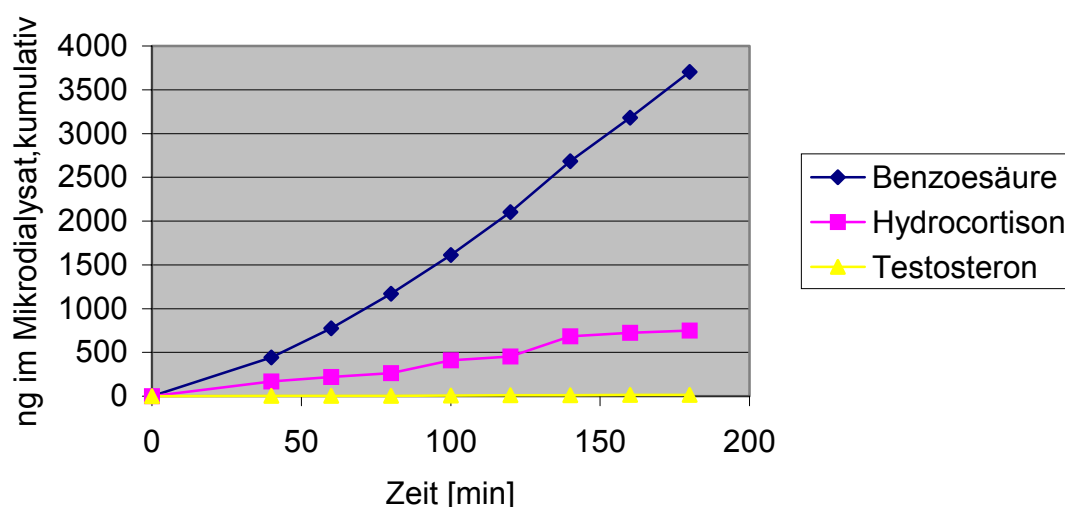


Abb. 40: Kumulative Darstellung der resorbierten Menge von Benzoessäure, Hydrocortison und Testosteron im Mikrodialysat nach drei Stunden; Angabe der Mediane nach topischer Applikation von 0,4 mg Substanz auf die Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter.

Im Mikrodialysat (Abb. 40) ist nach drei Stunden signifikant mehr Benzoessäure (3702,4 ng) enthalten als Hydrocortison (750,85 ng) und Testosteron (15,66 ng). Ein signifikanter Unterschied zwischen der Hydrocortison- und Testosteronmenge besteht nicht, obwohl Testosteron tendenziell weniger im Mikrodialysat vorhanden ist als Hydrocortison. Es zeigt sich, dass die Gewebespiegel der freien, ungebundenen Versuchssubstanzen mit der Mikrodialysetechnik am isoliert perfundierten Rindereuter messbar sind und dass, wie im Perfusat, die nachgewiesene Benzoessäuremenge im Mikrodialysat, gefolgt von Hydrocortison und Testosteron, am

größten ist. Dadurch erfolgt eine Absicherung der Ergebnisse, die die Perfusatproben liefern.

Obwohl Analogien zur Aufnahme der Testsubstanzen ins Perfusat bestehen, stellt die Mikrodialysetechnik am isoliert perfundierten Rindereuter lediglich eine Zusatzmethode dar, solange die Resorption ins Perfusat unproblematisch verläuft und es um Fragestellungen geht, die sich auf Gewebespiegel von exogenen Wirkstoffen, die topisch auf die Haut appliziert wurden, beziehen. Das Mikrodialysat bietet gegenüber dem Perfusat keinen Vorteil.

Sinnvoll ist der Einsatz der Mikrodialysetechnik am isoliert perfundierten Rindereuter, um Gewebespiegel endogener Substanzen zu bestimmen oder systemisch verabreichte Substanzen intradermal nachzuweisen (BÄUMER 1999). Nicht jede beliebige Substanz kann mit der Mikrodialysetechnik gemessen werden. Lipophile Substanzen, Substanzen mit großem Molekulargewicht oder hoher Proteinbindung sind nur begrenzt für den Nachweis mittels Mikrodialysetechnik geeignet (MÜLLER et al. 1995; CROSS *et al.* 1996; BENFELDT u. SERUP 1999). Insbesondere Testosteron ist sehr lipophil und kann nur mit 15,66 ng über den Versuchszeitraum von drei Stunden nachgewiesen werden. Dabei liegt das Problem nicht nur in der Perfusionsflüssigkeit (hier Phosphatpuffer), in die lipophile Substanzen nicht diffundieren. Es finden auch Interaktionen von lipophilen Substanzen mit der Dialysemembran in Form einer Adsorption statt (GROTH 1996). Die Problematik des Nachweises lipophiler Substanzen kann möglicherweise durch den Einsatz einer lipophilen Perfusionsflüssigkeit aufgehoben werden (GOTTLOB *et al.* 2002).

Die Versuchsergebnisse zeigen, dass das isoliert perfundierte Rindereuter für *In-vitro*-Studien zur Erfassung von Resorptionsunterschieden geeignet ist.

## 6 Zusammenfassung

Elisabeth Schaper

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

In der vorliegenden Arbeit sind mit Hilfe des isoliert perfundierten Rindereuters als *In-vitro*-Modell die transdermale Penetration, Permeation und Resorption der Substanzen Benzoesäure, Hydrocortison und Testosteron untersucht worden.

Die Euter für die Untersuchungen stammten von gesunden laktierenden Schlachtkühen und wurden mit erwärmter, begaster Tyrodelösung perfundiert. Es wurden jeweils 40 mg der Substanzen auf eine Euterhautfläche von 100 cm<sup>2</sup> aufgebracht. Die Versuchsdauer betrug vier Stunden. Es wurden Perfusatproben, Hautproben und Tesafilmabrissproben entnommen. Zusätzlich wurde die Mikrodialysetechnik über einen Zeitraum von drei Stunden angewendet. Der Hydrocortison- und Testosteronnachweis wurde, nach entsprechender Probenaufarbeitung, mittels Enzymimmunoassay durchgeführt. Der Benzoesäurenachweis erfolgte mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie.

In der hier durchgeführten Arbeit konnten signifikante Unterschiede zwischen der Resorption von Benzoesäure, Hydrocortison und Testosteron ermittelt werden. Im Perfusat wurde über den Versuchszeitraum am meisten Benzoesäure, gefolgt von Hydrocortison und Testosteron, nachgewiesen. In gleicher Reihenfolge stellen sich die Substanzmengen als ungebundene Gewebespiegel, die mittels Mikrodialysetechnik bestimmt worden sind, dar. Nach Auswertung der Hautproben konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen von Benzoesäure, Hydrocortison und Testosteron zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten (60, 120 und 240 min) festgestellt werden. In den

Tesafilmabrissproben, insbesondere am ersten Abriss, befinden sich die größten Konzentrationen an Hydrocortison, gefolgt von Benzoesäure und Testosteron. Der Unterschied zwischen der Gesamtkonzentration aller Abrisse (Medianwert) von Hydrocortison und Testosteron ist signifikant.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann gefolgert werden, dass Benzoesäure schnell in das *Stratum corneum* penetriert, schnell aus diesem abflutet und in das Gefäßsystem resorbiert wird. Hydrocortison diffundiert nur langsam ins *Stratum corneum* und bildet dort ein Depot aus. Testosteron penetriert schnell in die Hornschicht hinein, flutet aber insgesamt langsam aus dieser ab, da es aufgrund seiner Lipophilie eine hohe Affinität zur Hornschicht hat.

Anhand der Konzentrationsverläufe der eingesetzten Substanzen in den Tesafilmabrissproben kann postuliert werden, dass sich an den ersten sieben Tesafilmabrissen Hornschichtlamellen des *Stratum corneum disjunctum* befinden und dass der Wechsel zum *Stratum corneum conjunctum* mit dem achten Tesafilmabriss beginnt.

Die Versuchsergebnisse zeigen, dass das isoliert perfundierte Rindereuter für *In-vitro*-Studien zur Erfassung von Resorptionsunterschieden topisch applizierter Substanzen geeignet ist.

## 7 Summary

Elisabeth Schaper

Studies on percutaneous absorption of benzoic acid, hydrocortisone and testosterone in the isolated perfused bovine udder.

In the presented study the isolated perfused bovine udder was used as an *in vitro* model. Using this model, the transdermal penetration, permeation and resorption of benzoic acid, hydrocortisone and testosterone were tested.

Mammary glands from healthy slaughtered cows were perfused with warmed and gassed tyrode solution. 40 mg of each substance were applied on a skin area of 100 cm<sup>2</sup>. The time of experimentation was four hours.

Perfusate samples, skin biopsies and tesa® strip samples were taken. In addition, the microdialysis technique was used for a period of three hours. The detection of hydrocortisone and testosterone was performed with an enzyme linked immunosorbent assay. Benzoic acid was detected by high pressure liquid chromatography.

In the presented study significant differences between the resorption of benzoic acid, hydrocortisone and testosterone could be proved. During the time of experimentation the amount of benzoic acid found in the perfusate was highest, followed by hydrocortisone and testosterone. In the same order the amounts of the three substances appeared in the extracellular fluid of the dermis, determined by microdialysis technique. No significant differences in the concentrations of benzoic acid, hydrocortisone and testosterone were observed in skin biopsies taken after 60, 120 and 240 minutes. In the tesa® strip samples, especially the first one, a high concentration of hydrocortisone and smaller amounts of benzoic acid and testosterone could be found. The difference in the overall concentration of hydrocortisone and testosterone of the tesa® strip samples is significant.

From the results of this work it can be deduced, that benzoic acid is penetrating the *stratum corneum* fast. But as fast it is leaving the *stratum corneum* into the blood-vessel system. Hydrocortisone is penetrating slower into the *stratum corneum*, where it is building a depot. Testosterone is penetrating the *stratum corneum* fast and is leaving it slow. This effect is based on the lipophilicity of testosterone, which causes a strong affinity to the *stratum corneum*.

Concerning to the concentration gradients, it is obvious that the first 7 tesa® strip samples carry parts of the *stratum corneum disjunctum*. The following stripes carry the first parts of the *stratum corneum conjunctum*.

The experimental results prove that the isolated perfused bovine udder is a suitable *in vitro* model for the measurement of resorption differences of topical drugs.

## 8 Literaturverzeichnis

ANONYMUS (1990)

Pharmazeutische Stoffliste.

Arzneibüro der Bundesvereinigung deutscher Apothekerverbände (Hrsg.)

8. Aufl., Werbe- und Vertriebsgesellschaft Deutscher Apotheker m.b.H., Frankfurt am Main

ANONYMUS (1998)

Lexikon der Chemie, Band 1.

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

ANONYMUS (2001)

The Merck Index.

13. Aufl., Merck & Co., INC. Whitehouse Station, NJ, USA

ANDERSON, C., T. ANDERSSON u. R.G.G. ANDERSSON (1992)

In vivo microdialysis estimation of histamine in human skin.

Skin Pharmacol. 5, 177-183

ANDERSON, C., T. ANDERSSON, u. M. MOLANDER (1991)

Ethanol absorption across human skin measured by in vivo microdialysis technique.

Acta Derm. Venerol. 71, 389-393

ARENS, D. (1991)

Untersuchung der dermalen Penetration am isoliert perfundierten Rindereuter.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

BÄUMER, W. (1999)

Untersuchungen zur Beeinflussung des Entzündungsgeschehens in der Haut isoliert perfundierter Rindereuter.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

BÄUMER, W. u. M. KIETZMANN (2000)

The isolated perfused bovine udder as a model of dermal eicosanoid release.

ATLA 28, 643-649

BÄUMER, W. u. M. KIETZMANN (2001)

Effects of steroidal and non-steroidal antiphlogistic drugs on eicosanoid synthesis in irritated skin: studies with the isolated perfused bovine udder.

J. Pharm. Pharmacol. 53, 743-747

BANKS, W.J. (1993)

Applied Veterinary Histology.

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

BARRY, B.W. (1983)

Dermatological formulations.

Dekker, New York, Basel

BARRY, B.W. (1987)

Mode of action of penetration enhancers in human skin.

J. Control. Rel. 6, 85-97

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

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

J. Invest. Dermatol. 58, 114-123

BEHRENDT, H., H.C. KORTING u. O. BRAUN-FALCO (1989)

Zum Metabolismus von Pharmaka in der Haut.

Hautarzt 40, 8-13

BENFELDT, E. u. J. SERUP (1999)

Effect of barrier perturbation on cutaneous penetration of salicylic acid in hairless rats: in vivo pharmacokinetics using microdialysis and non-invasive quantification of barrier function.

Arch. Dermatol. Res. 291, 517-526

BENFELDT, E., J. SERUP u. T. MENNÉ (1999)

Effect of barrier perturbation on cutaneous salicylic acid penetration in human skin: in vivo pharmacokinetics using microdialysis and non-invasive quantification of barrier function.

Br. J. Dermatol. 140, 739-748

BERNER, B. u. V.A. JOHN (1994)

Pharmacokinetic characterisation of transdermal delivery systems.

Clin. Pharmacokinet. 26, 121-134

BEUSCHER, N. (1998)

persönliche Mitteilung

BLANK, I.H. (1953a)

Factors which influence the water content of the stratum corneum.

J. Invest. Dermatol. 18, 433-440

BLANK, I.H. (1953b)

Further observations on factors which influence the water content of the stratum corneum.

J. Invest. Dermatol. 21, 259-269

BLANK, I.H. u. R.J. SCHEUPLEIN (1969)

Transport into and within the skin.

Br. J. Derm. 81, Suppl. 4, 4-10

BLANK, I.H., R.J. SCHEUPLEIN u. D.J. MacFARLANE (1967)

Mechanism of percutaneous absorption.

III. The effect of temperature on the transport of non-electrolytes across the skin.

J. Invest. Dermatol. 49, 582-589

BLUME, B., M. KIETZMANN, M. MÖDER, P. KRÄNKE u. M. WAHREN (1998)

Application of deuterated benzoyl peroxide in an in vitro model of percutaneous absorption and dermal metabolism of chemical substances.

in: HEYS, .R. u. D.G. MELILLO (Hrsg.): Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds.

John Wiley & Sons Ltd

BONSMANN, U. u. P. ROHDEWALD (1996)

Bindung von Glukokortikoiden an menschlicher Haut in vitro.

Ztsch. Hautkr. 17, 23-27

BOS, J.D. u. M.M. MEINARDI (2000)

The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs.

Exp. Dermatol. 9, 165-169

BRÄUNIG, J. (1979)

Versuche mit Sulfadimidin am isolierten Euter.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

BRONAUGH, R.L. u. H.I. MAIBACH (1985)

In vitro models for human percutaneous absorption.

in: MAIBACH, H.I. u. N.J. LOWE (Hrsg.): Models in dermatology.

Verlag Karger, Basel, Vol. 2, 178-188

BRONAUGH, R.L., R.F. STEWART u. E.R. CONGDON (1982a)

Methods for in vitro percutaneous absorption studies.

II. Animal models for human skin.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 62, 481-488

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

Methods for in vitro percutaneous absorption studies.

I. Comparison with in vivo results.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 62, 474-480

BROWN, S.L. u. J.E. ROSSI (1989)

A simple method for estimating dermal absorption of chemicals in water.

Chemosphere 19, 1989-2001

BURR, G.O. u. M.M. BURR (1929)

A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet.

J. Biol. Chem. 82, 345-367

CARVER, M.P., P.L. WILLIAMS u. J.E. RIVIERE (1989)

The isolated perfused porcine skin flap. III. Percutaneous absorption pharmacokinetics of organophosphates, steroids, benzoic acid, and caffeine.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 97, 324-337

CHAMBIN, O., F. HUEBER u. E. TEILLAUD (1996)

Influence of skin thickness on estradiol percutaneous absorption.

in: BRAIN, K.R., J. HADGRAFT, V.J. JAMES u. K.A. WALTERS (Hrsg.): Prediction of percutaneous penetration, STS Publishing, Cardiff, Vol. 4B, 275-277

CHIEN, Y.W. (1988)

Advances in transdermal systemic drug delivery.

Drugs of the future 13, 343-362

CLARYS, P., B. GABARD u. A.O. BAREL (1996)

The effect of the temperature on the in vivo percutaneous penetration process.

in: BRAIN, K.R., J. HADGRAFT, V.J. JAMES u. K.A. WALTERS (Hrsg.): Prediction of percutaneous penetration, STS Publishing, Cardiff, Vol. 4B, 278-281

CROSS, S., Z. WU u. M.S. ROBERTS (1996)

The effect of protein binding on the deep tissue penetration and efflux of dermally applied salicylic acid, lidocaine and diazepam in the perfused rat hindlimb.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 277, 366-374

DOWNING, D.T. u. J.S. LINDHOLM (1982)

Skin surface lipids of the cow.

Comp. Biochem. Physiol. 73B, 327-330

DUPUIS, D., A. ROUGIER, R. ROGUET, C. LOTTE u. G. KALOPISSIS (1984)

In vivo relationship between horny layer reservoir effect and percutaneous absorption in human and rat.

J. Invest. Dermatol. 82, 353-356

ECKERT, R. L. (1992)

The structure and function of skin.

in: MUKHTAR, H. (Hrsg.): Pharmacology of the skin.

CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, S. 3-12

EHINGER, A.M. (1998)

Gewebsverteilung von Antibiotika – Untersuchungen am isoliert perfundierten Rindereuter.

Leipzig, Univ., Veterinärmed. Fak., Diss.

EHINGER, A.M. u. M. KIETZMANN (2001)

Untersuchung der Gewebeverteilung von Antibiotika im Euter – Vergleich der In-vivo-Situation zum isoliert perfundierten Rindereuter.

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 108, 195-200

ELIAS, P.M. (1983)

Epidermal lipids, barrier function, and desquamation.

J. Invest. Dermatol. 84, 44s-49s

ELIAS, P.M., E.R. COOPER, A. KORC u. B.E. BROWN (1981)

Percutaneous transport in relation to stratum corneum structure and lipid composition.

J. Invest. Dermatol. 76, 297-301

ELLIOT, G.R., J. DE LANGE u. P.L.B. BRUIJNZEEL (1997)

The with blood perfused pig ear: an in vitro animal saving model for measuring rates of percutaneous permeation.

in: BRAIN, K.R., J. HADGRAFT, V.J. JAMES u. K.A. WALTERS (Hrsg.):

Perspectives in Percutaneous Penetration, STS Publishing, Cardiff, Vol. 5a, 59

FALBE, J. u. REGITZ, M. (1999)

Römpp Lexikon.

10. Aufl., Verlag Thieme, Stuttgart, New York

FELDMANN, R.J. u. H.I. MAIBACH (1965)

Penetration of <sup>14</sup>C hydrocortisone through normal skin.

Arch. Dermatol. 91, 661-666

FELDMANN, R.J. u. H.I. MAIBACH (1967)

Regional variation in percutaneous penetration of <sup>14</sup>C-Cortisol in man.

J. Invest. Dermatol. 48, 181-183

FELDMANN, R.J. u. H.I. MAIBACH (1969)

Percutaneous penetration of steroids in man.

J. Invest. Dermatol. 52, 89-94

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

Absorption of some organic compounds through the skin in man.

J. Invest. Dermatol. 54, 399-404

FELDMANN, R.J. u. H.I. MAIBACH (1974)

Percutaneous penetration of some pesticides and herbicides in man.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 28, 126-132

FICHTL, B. (2001)

Wirkungen des Organismus auf Pharmaka: Allgemeine Pharmakokinetik.

in: FORTH, W., D. HENSCHLER, W. RUMMEL, U. FÖRSTERMANN u. K. STARKE  
(Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.

8. Aufl., Verlag Urban & Fischer, München, Jena, 26-39

FISEROVA-BERGEROVA, V., J.T. PIERCE u. P.O. DROZ (1990)

Dermal absorption potential of industrial chemicals: criteria for skin notation.

Am. J. Ind. Med. 17, 617-635

FÖRSTER, TH., W. PITTERMANN, M. SCHMITT u. M. KIETZMANN (1999)

Skin penetration properties of cosmetic formulations using a perfused bovine udder model.

J. Cosmet. Sci. 50, 147-157

FORSLIND, B. (1994)

A domain mosaic model of the skin barrier.

Acta Derm. Venereol. (Stockh.) 74, 1-6

FORSLIND, B. (1996)

New barrier models critically compared.

Turk J. Dermatopathol. 5, 35-43

FRANZ, T.J. (1975)

Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data.

J. Invest. Dermatol. 64, 190-195

FRANZ, T.J. (1978)

The finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption in man.

Curr. Probl. Dermatol. 7, 58-68

FREY, H.-H. (2002)

Allgemeine Pharmakologie.

in: FREY, H.-H. u. W. LÖSCHER (Hrsg.): Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin.

2. Aufl., Verlag Enke, Stuttgart, 1-32

FRITSCH, P. (1998)

Dermatologie und Venerologie, Lehrbuch und Atlas.

Verlag Springer, Berlin, 3-41

GLOOR, M. (1982)

Pharmakologie dermatologischer Externa.

Verlag Springer, Berlin, Heidelberg, 33-59

GLOOR, M. (1994)

Hornschichtbarriere und ihre Modulation.

Ztsch. Hautkr. 69, 656-661

GOLDEN, G.M., D.B. GUZEK, A.H. KENNEDY, J.E. McKIE u. R.O. POTTS (1987)

Stratum corneum lipid phase transitions and water barrier properties.

Biochemistry 26, 2382-2388

GOTTLOB, A., C. ABELS, M. LANDTHALER u. R.-M. SZEIMIES (2002)

Die kutane Mikrodialyse. Anwendung in der Dermatologie.

Hautarzt 53, 174-178

GREAVES, M.S. (1971)

The in vivo catabolism of cortisol by human skin.

J. Invest. Dermatol. 57, 100-107

GRICE, K.A. (1980)

Transepidermal water loss.

in: JARRETT, A. (Hrsg.): The physiology and pathophysiology of the skin.

Academic Press, London, New York, Vol. 6, 2116-2146

GROß, C.A.G. (2000)

Vergleichende Untersuchung zur enzymatischen Resorptionsbeschleunigung von subkutan appliziertem Xylaxin und Ketamin am isoliert perfundierten Rindereuter.  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

GROTH, L. (1996)

Cutaneous microdialysis – methodology and validation.  
Acta. Derm. Venereol. 197 Suppl., 1-61

GUY, R.H. u. J. HADGRAFT (1983)

Physiochemical interpretation of the pharmacokinetics of percutaneous absorption.  
J. Pharmacokin. Biopharm. 11, 189-203

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

Prediction of drug disposition kinetics in skin and plasma following topical administration.  
J. Pharm. Sci. 73, 883-887

GUY, R.H. u. R.O. POTTS (1992a)

Structure-permeability relationships in percutaneous penetration.  
J. Pharm. Sci. 81, 603-4

GUY, R.H. u. R.O. POTTS (1992b)

Predicting skin permeability.  
Pharm. Res. 9, 663-669

GUY, R.H. u. R.O. POTTS (1993)

Penetration of industrial chemicals across the skin: a predictive model.  
Am. J. Ind. Med. 23, 711-719

HABERMEHL, K.-H. (1996)

Haut und Hautorgane.

In: NICKEL, R., A. SCHUMMER u. E. SEIFERLE (Hrsg.)

Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Bd. 3,

Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane, S. 443-466

3. Aufl., Parey Buchverlag Berlin

HADGRAFT, J. (1996)

Advances in transdermal drug delivery.

Practitioner 240, 656-658

HADGRAFT, J. (2001)

Skin, the final frontier.

Int. J. Pharm. 224, 1-18

HAMANAKA, S., M. HARA, H. NISHIO, F. OTSUKA, A. SUZUKI u. Y. UCHIDA  
(2002)

Human epidermal glucosylceramides are major precursors of stratum corneum  
ceramides.

J. Invest. Dermatol. 119, 416-423

HAMPL, A. (1967)

Die Lymphknoten der Rindermilchdrüse.

Anat. Anz. 121, 38-54

HEGEMANN, L., C. FORSTINGER, B. PARTSCH, I. LAGLER, S. KROTZ u. K.  
WOLFF (1995)

Microdialysis in cutaneous pharmacology: Kinetic analysis of transdermally delivered  
nicotine.

J. Invest. Dermatol. 104, 839-843

HEYMANN, E. (1994)

Haut, Haar und Kosmetik.

Verlag Hirzel, Stuttgart

HIERNICKEL, H. (1985)

An improved method for in vitro perfusion on human skin.

Brit. J. Derm. 112, 299-305

HSIA, S.L. u. Y.L. HAO (1966)

Metabolic transformations of cortisol-4-(<sup>14</sup>C) in human skin.

Biochemistry 5, 1469-1474

HUEBER, F., H. SCHAEFER u. J. WEPIERRE (1993)

Effect of vehicle on transdermal and transfollicular absorption of four steroids of different lipophilicity.

in: BRAIN, K.R., J. HADGRAFT, V.J. JAMES u. K.A. WALTERS (Hrsg.): Prediction of Percutaneous Penetration, Vol. 3B, STS Publishing, Cardiff, S. 264-271

HUEBER, F., H. SCHAEFER u. J. WEPIERRE (1994)

Role of transepidermal and transfollicular routes in percutaneous absorption of steroids: in vitro studies on human skin.

Skin Pharmacol. 7, 237-244

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

Animal model of percutaneous penetration: Comparison between Mexican hairless dogs and man.

Dermatologica 156, 79-88

ILLEL, B. u. H. SCHAEFER (1988)

Transfollicular Percutaneous Absorption. Skin model for quantitative studies.

Acta Derm. Venereol. 68, 427-430

IMOKOWA, G. u. M. HATTORI (1985)

A possible function of structural lipids in the water holding properties of the stratum corneum.

J. Invest. Derm. 84, 282-284

IMOKOWA, G., S. AKASAKI, M. HATTORI u. N. YOSHIZUKA (1986)

Selective recovery of deranged water-holding properties by stratum corneum lipids.

J. Invest. Dermatol. 87, 758-761

JANEWAY, C.A. u. P. TRAVERS (1995)

Immunologie.

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 295

JENKINSON, D.M. u. D.H. LLOYD (1979)

The topography of the skin surface of cattle and sheep.

Br. Vet. J. 135, 376-379

KALBITZ, J., R. NEUBERT u. W. WOHLRAB (1996)

Modulation der Wirkstoffpenetration in die Haut.

Pharmazie 51, 619-637

KALIA, Y.N., I. ALBERTI, N. SEKKAT, C. CURDY, A. NAIK u. R.H. GUY (2000)

Normalization of stratum corneum barrier function and transepidermal water loss in vivo.

Pharm. Res. 17, 1148-1150

KAPPAS, A., L. HELLMAN, D.K. FUKUSHIMA u. T.F. GALLAGHER (1958)

The thermogenic effect and metabolic fate of etiocholanolone in man.

J. Clin. Endocrinol. 18, 1043-1055

KAPPUS, H. (1989)

Drug metabolism in the skin.

in: GREAVES, M.W. u. S. SHUSTER (Hrsg.): Pharmacology of the skin.

Handb. Exp. Pharm. 87/2, Verlag Springer, Berlin, 123-163

KARZEL, K. u. R.K. LIEDTKE (1989)

Mechanismen transkutaner Resorption. Pharmakologische und biochemische Aspekte.

Arzneim.-Forsch./Drug Res. 39, 1487-1491

KATZ, M. u. Z.I. SHAIKH (1965)

Percutaneous corticosteroid absorption correlated to partition coefficient.

J. Pharm. Sci. 54, 591-594

KIETZMANN, M. (2002)

Pharmakologie der Haut.

in: FREY, H.-H. u. W. LÖSCHER (Hrsg.): Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin.

2. Aufl., Verlag Enke, Stuttgart, 345-352

KIETZMANN, M., B. BIGLER, C. von TSCHARNER, H.-H. HEITMANN u. T. MÜLLER (1990)

Untersuchungen zur Verträglichkeit, Wirkung und Metabolisierung von Benzoylperoxid beim Hund.

Kleintierpraxis 35, 31-34

KIETZMANN, M. u. B. BLUME (1997)

Percutaneous absorption of betamethasone from different formulations using the isolated perfused bovine udder.

In vitro Tox. 10, 11-15

KIETZMANN, M. u. W. LÖSCHER (1991)

Bedeutung pharmakokinetischer Parameter für eine effektive Arzneimitteltherapie bei Haus- und Nutztieren.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 104, 365-369

KIETZMANN, M. u. W. LÖSCHER (1993)

Die Verwendung von Schlachttierorganen zur Prüfung von Arzneimitteln: Eignung des Rindereuters zur Untersuchung von hautwirksamen Stoffen.

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 100, 54-57

KIETZMANN, M., W. LÖSCHER, D. ARENS, P. MAASS u. 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

KIETZMANN, M., B. WENZEL, W. LÖSCHER, D. LUBACH, B.W. MÜLLER u. H. BLUME (1995)

Absorption of isosorbide dinitrate after administration as spray, ointment and microemulsion patch. An in-vitro study using the isolated perfused bovine udder.

J. Pharm. Pharmacol. 47, 22-25

KOCH, T. u. R. BERG (1993)

Lehrbuch der Veterinäranatomie. Bd.III,

5. Aufl., Verlag Fischer, Jena, Stuttgart, S. 555-599

KOVAR, A., A. NOLTING u. H. DERENDORF (1997)

Mikrodialyse zur Bestimmung freier Arzneistoffe in Geweben.

Pharm. Unserer Zeit 26, 17-23

KROGSTAD, A.L., P.-A. JANSSON, P. GISSLÉN u. P. LÖNNROTH (1996)  
Microdialysis methodology for the measurement of dermal interstitial fluid in humans.  
Br. J. Dermatol. 134, 1005-1012

KURZ, H., H.-G. NEUMANN, P. WOLLENBERG, W. FORTH, D. HENSCHLER u. W. RUMMEL (1987)

Allgemeine Pharmakologie.

in: FORTH, W., D. HENSCHLER u. W. RUMMEL (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.

Wissenschaftsverlag Mannheim, Wien, Zürich, 1-97

KUSCHINSKY, G. u. H. LÜLLMANN (1989)

Pharmakologie und Toxikologie.

12. Aufl., Verlag Thieme, Stuttgart, New York, 1-64

LAMPE, M.A., A.L. BURLINGAME, J. WHITNEY, M.L. WILLIAMS, B.E. BROWN, E. ROITMAN u. P.M. ELIAS (1983)

Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations.

J. Lipid Res. 24, 120-130

LANDMANN, L. (1988)

The epidermal permeability barrier.

Anat. Embryol. 178, 1-13

LANDMANN, L. (1991)

Die Permeabilitätsbarriere der Haut.

Pharmazie in unserer Zeit 20, 155-163

LEONHARDT, H. (1990)

Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen.

8. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 343-361

LE ROUX, J.M.W. u. H. WILKENS (1959)

Beitrag zur Blutgefäßversorgung des Euters der Kuh.

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 66, 429-435

LIEBICH, H.-G. (1999)

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

3. Aufl., Verlag Schattauer, Stuttgart, New York, 303-324

LÖFFLER, K. (1966)

Zur Blutgefäßversorgung der Haut des Rindes.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 79, 365-367

LUDEWIG, T., G. MICHEL u. G. GUTTE (1996)

Histologisch-histochemische Untersuchungen zum Bau der Euterhaut des Rindes unter besonderer Berücksichtigung der Veränderungen durch die Perfusion im Rahmen des Eutermodells

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 103, 501-505

MAASS, P. (1993)

Isoliert perfundiertes Rindereuter – Ein Modell zur Prüfung der Hautverträglichkeit?

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

MacPHERSON, S.E., C.N. BARTON u. R.L. BRONAUGH (1996)

Use of in vitro skin penetration data and a physiologically based model to predict in vivo blood levels of benzoic acid.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 149, 436-443

MANN, H.B. u. D.R. WHITNEY (1947)

On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other.

Ann. Math. Statist. 18, 50-60

McKONE, T.E. u. R.A. HOWD (1992)

Estimating dermal uptake of non-ionic organic chemicals from water and soil:

I. Unified fugacity-based models for risk assessments.

Risk Anal. 12, 543-557

MERK, H.F. (1990)

Pharmakogenetische Aspekte kutaner Arzneimittelreaktionen.

Hautkrankh. 65, 217-230

MERK, H.F. u. D.R. BICKERS (1992)

Dermatopharmakologie und Dermatotherapie.

Blackwell Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, 1-20

MEYER, K. (1997)

Untersuchung der perkutanen Penetration von Hydrokortison an Diffusionszellen und am isoliert perfundierten Rindereuter.

Leipzig, Univ., Veterinärmed. Fak., Diss.

MEYER, W., K. NEURAND u. T. BARTELS (1991)

Der „Säureschutzmantel“ der Haut unserer Haustiere.

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 98, 167-170

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

Zur Bedeutung der apokrinen Hautdrüsen der allgemeinen Körperdecke bei verschiedenen Haussäugetierarten.

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 85, 194-197

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

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

Tierärztl. Prax. 6, 153-162

MONTAGNA, W. (1955)

Histology and cytochemistry of human skin. The distribution of non-specific esterases.

J. Biophysic. and Biochem. Cytol. 1, 13-16

MONTAGNA, W. (1967)

Comparative anatomy and physiology of the skin.

Arch. Dermatol. 96, 357-363

MÜLLER, M., R. SCHMID, O. WAGNER, B. v. OSTEN, H. SHAYGANFAR u. H.G. EICHLER (1995)

In vivo characterization of transdermal drug transport by microdialysis.

J. Control Release 37, 49-57

MULLER, G.H., R.W. KIRK u. D.W. SCOTT (1993)

Kleintierdermatologie.

Verlag Fischer, Stuttgart, Jena, 1-42

NATHAN, D., A. SAKR, J.L. LICHTIN u. R.L. BRONAUGH (1990)

In vitro skin absorption and metabolism of benzoic acid, *p*-aminobenzoic acid and benzocaine in the hairless guinea pig.

Pharm. Res. 7, 1147-1151

NEUBERT, R., W. WOHLRAB u. W. MARSCH (2001)

Dermatopharmazie. Vehikel – Wirkstoffe – Pharmakologie.

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

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

Die Säugerhaut – Barriere oder Eintrittspforte ?

EFFEM-Forschung Kleintiernahrung, Report Nr. 24

NOLL, F. (1974)

Bestimmung mit LDH, GPT und NAD.

in: BERGMAYER, H.U. (Hrsg.): Methoden der enzymatischen Analyse. Bd.2, 3. Aufl.

Verlag Chemie, Weinheim, S. 1521-1523

NORLÉN, L. (2001a)

Skin barrier structure and function: The single gel-phase model.

J. Invest. Dermatol. 117, 830-836

NORLÉN, L. (2001b)

Skin barrier formation: The membrane folding model.

J. Invest. Dermatol. 117, 823-829

ODLAND, G.F. (1983)

Structure of the skin.

in: Goldsmith, L.A. (Hrsg.): Biochemistry and physiology of the skin.

Oxford University Press, New York, Oxford, Bd.1, S. 3-63

OPAS, E.E., R.J. BONNEY u. J.L. HUMES (1985)

Prostaglandin and leukotriene synthesis in mouse ears inflamed by arachidonic acid.

J. Invest. Dermatol. 84, 253-256

PEETERS, G.J. u. L. MASSART (1947)

La perfusion de la glande mammaire isolée.

Arch. Internat. Pharmacodyn. Thér. 74, 83-89

PEETERS, G.J. u. L. MASSART (1952a)

Fat synthesis in the perfused lactating cow's udder.

Arch. Internat. Pharmacodyn. Thér. 91, 388-398

PEETERS, G.J. u. L. MASSART (1952b)

Respiratory quotient of the isolated mammary gland.

Nature 169, 627-628

PEETERS, G.J., R. COUSSENS u. G. SIERENS (1953)

On the influence of insulin and glycerol on the metabolism of the perfused isolated cow's mammary gland.

Arch. Internat. Pharmacodyn. Thér. 93, 385-399

PELLETT, M.A., A.C. WATKINSON, K.R. BRAIN u. J. HADGRAFT (1997)

Correlation of permeability and morphology of the distal and proximal regions of the stratum corneum.

in: BRAIN, K.R., J. HADGRAFT, V.J. JAMES u. K.A. WALTERS (Hrsg.):  
Perspectives in Percutaneous Penetration, STS Publishing, Cardiff, Vol. 5a, 32

PETERSEN, L.J. (1997)

Quantitative measurement of extracellular histamine concentrations in intact human skin in vivo by the microdialysis technique: methodological aspects.

Allergy 52, 547-555

PETERSEN, L.J. (1998)

Measurement of histamine release in intact human skin by microdialysis technique.  
Kopenhagen, Universität, Diss.

PETERSEN, L.J. (1999)

Interstitial lactate levels in human skin at rest and during an oral glucose load: a microdialysis study.

Clin. Physiol. 19, 246-250

PETERSEN, L.J., J.K. KRISTENSEN u. J. BÜLOW (1992)

Microdialysis of the interstitial water space in human skin in vivo: quantitative measurement of cutaneous glucose concentration.

J. Invest. Dermatol. 99, 357-360

PETERSEN, W.E., J.C. SHAW u. M.B. VISSCHNER (1939)

Perfusion of the excised mammary gland as a method of studying milk secretion.

J. Dairy Sci. 22, 439-440

PETERSEN, W.E., J.C. SHAW u. M.B. VISSCHNER (1941)

A technique for perfusing excised bovine mammary glands.

J. Dairy Sci. 24, 139-146

PITMAN, I.H. u. S.J. ROSTAS (1981)

Topical drug delivery to cattle and sheep.

J. Pharm. Sci. 70, 1181-1193

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

Das isoliert perfundierte Rindereuter (Bovine Udder Skin – BUS Modell): Ein integriertes in vitro Modell zur Untersuchung von Hautpenetration und –irritation.

Altex 12, 196-200

PLEWIG, G., T. JANSEN u. N.Y. SCHÜRER (1997)

Das Stratum corneum.

Hautarzt 48, 510-521

POTTS, R.O. u. M.L. FRANCOEUR (1991)

The influence of stratum corneum morphology on water permeability.

J. Invest. Dermatol. 94, 495-499

POTTS, R.O., D.B. BOMMANNAN u. R.H. GUY (1992)

Percutaneous absorption.

in: MUKTHAR, H. (Hrsg.): Pharmacology of the skin.

CRC Press, Boca Raton, S. 13-27

PŘÍBORSKÝ, J. u. E. MÜHLBACHOVÁ (1990)

Evaluation of in-vitro percutaneous absorption across human skin and in animal models.

J. Pharm. Pharmacol. 42, 468-472

PROKSCH, E. (1990)

Die Epidermis als metabolisch aktives Gewebe: Regelung der Lipidsynthese durch die Barrierefunktion.

Ztsch. Hautkr. 65, 296-300

REDDY, M.B., R.H. GUY u. A.L. BUNGE (2000)

Does epidermal turnover reduce percutaneous penetration?

Pharm. Res. 17, 1414-1419

REGNIER, M., D. CARON, U. REICHERT u. H. SCHAEFER (1993)

Barrier function of human skin and human reconstructed epidermis.

J. Pharm. Sci. 82, 404-407

ROBINSON, P.J. (1993)

A composite model for predicting dermal penetration in vivo. Human and environmental safety division.

The Proctor & Gamble Company, Cincinnati

zit. nach WILSCHUT, A., W.F. ten BERGE, P.J. ROBINSON u. T.E. McKONE (1995)

Estimating skin permeation. The validation of five mathematical skin permeation models.

Chemosphere 30, 1275-1296

ROGERS, J., C. HARDING, A. MAYO, J. BANKS u. A. RAWLINGS (1996)

Stratum corneum lipids: the effect of ageing and the seasons.

Arch. Dermatol. Res. 288, 765-770

ROSKOS, K.V., R.H. GUY u. H.I. MAIBACH (1986)

Percutaneous absorption in the aged.

Dermatol. Clin. 4, 455-465

ROUGIER, A., D. DIDIER, C. LOTTE u. R. ROGUET (1985)

The measurement of the stratum corneum reservoir. A predictive method for in vivo percutaneous absorption studies: Influence of application time.

J. Invest. Dermatol. 84, 66-68

ROUGIER, A., D. DIDIER, C. LOTTE, R. ROGUET u. H. SCHAEFER (1983)

In vivo correlation between stratum corneum reservoir function and percutaneous absorption.

J. Invest. Dermatol. 81, 275-278

SCHAEFER, H. u. J. LADEMANN (2001)

The role of follicular penetration.

Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol. 14 (Suppl. 1), 23-27

SCHAEFER, H., A. ZESCH u. G. STÜTTGEN (1982)

Skin permeability.

Verlag Springer, Berlin, Heidelberg

SCHAICH, B. u. H.C. KORTING (1992)

Einfluß von Kosmetika und Dermatika auf die Hautlipide.

Hautarzt 43, 403-408

SCHEUPLEIN, R.J. (1965)

Mechanism of percutaneous adsorption.

I. Routes of penetration and the influence of solubility.

J. Invest. Dermatol. 45, 334-346

SCHEUPLEIN, R.J. (1967)

Mechanism of percutaneous absorption. II. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration.

J. Invest. Dermatol. 48, 79-88

SCHEUPLEIN, R.J. (1972)

Properties of the skin as a membrane.

in: MONTAGNA, W., R.B. STOUGHTON u. E.J. VAN SCOTT (Hrsg.):

Pharmacology of the skin.

Alleton Century Crofts – Educational Division, Meredith Corp., New York, S.125-152

SCHEUPLEIN, R.J. (1976)

Permeability of the skin : A review of major concepts and some new developments.

J. Invest. Dermatol. 67, 627-676

SCHEUPLEIN, R.J. (1978)

The skin as a barrier.

in: JARRETT, A. (Hrsg.): The physiology and pathophysiology of the skin. Vol.5,  
Academic Press, London, New York

SCHEUPLEIN, R.J., I.H. BLANK, G.J. BRAUNER u. D.J. MacFarlane (1969)

Percutaneous absorption of steroids.

J. Invest. Dermatol. 52, 63-70

SCHMIDT, G. (1995)

Dermatika.

in: ESTLER, C.-J. (Hrsg.): Pharmakologie und Toxikologie.  
4. Aufl., Verlag Schattauer, Erlangen, S. 624-631

SCHNEIDER, I.-M., W. WOHLRAB u. R. NEUBERT (1997)

Fettsäuren und Epidermis.

Hautarzt 48, 303-310

SCHWARZ, R., W. MEYER u. K. NEURAND (1981)

Die gesunde Haut von Hund und Katze.

Kleintierpraxis 26, 395-402

SEPP, N. u. P. FRITSCH (1998)

Gefäße der Haut.

in: FRITSCH, P. (Hrsg.): Dermatologie und Venerologie, Lehrbuch und Atlas.  
Verlag Springer, Berlin, 33-36

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

Untersuchung zur Penetration von Benzoylperoxid in die Haut.

Hautarzt 35, 455-458

SMOLLE, J. (1998)

Grundlagen der Dermatologie.

in: HENZ, B.M., H. KERL, T. ROSENBAACH u. W. STERRY (Hrsg.)

Dermatologie und Venerologie.

2. Aufl., Verlag de Gruyter, Berlin, New York, 1-16

STERL, F. (1998)

Untersuchung haut- und schleimhautirritierender Eigenschaften von Testsubstanzen am isoliert perfundierten Rindereuter.

Leipzig, Univ., Veterinärmed. Fak., Diss.

STOUGHTON, R.B. (1965)

Dimethylsulfoxide (DMSO) induction of a steroid reservoir in human skin.

Arch. Dermatol. 91, 657-660

STOUGHTON, R.B. (1976)

Penetration of drugs through the skin.

Dermatologica 152, Suppl. 1, 27-36

STÜTTGEN, G. (1965)

Die normale und pathologische Physiologie der Haut.

Verlag Fischer, Stuttgart

STÜTTGEN, G. (1972)

Die Haut als Resorptionsorgan in pharmakokinetischer Sicht.

Arzneim.-Forsch./Drug Res. 22, 324-329

STÜTTGEN, G. (1990)

Die biologische Funktion des Stratum corneum. Pharmakokinetische Bedingungen für die topische Applikation.

in: RIETBROCK, N. (Hrsg.): Die Haut als Transportorgan für Arzneistoffe.

Verlag Steinkopff, Darmstadt, 1-14

STÜTTGEN, G. u. H. SCHAEFER (1974)

Funktionelle Dermatologie. Grundlagen der Morphokinetik, Pathophysiologie, Pharmakoanalyse und Therapie von Dermatosen.

Verlag Springer, Berlin, Heidelberg, 353-376

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

Die lokale und transkutane Pharmakotherapie. Pharmakokinetische Grundlagen und klinische Bewertung.

Hautarzt 37, 65-76

SZINITOWSKA, M., S. JANICKI u. A.C. WILLIAMS (1998)

Intracellular or intercellular localization of the polar pathway of penetration across stratum corneum.

J. Pharm. Sci. 87, 1109-1114

TINDAL, J.S. (1957)

Blood flow in the isolated perfused bovine udder.

Amer. J. Physiol. 191, 287-292

TRAUTWEIN, G. (1991)

Haut.

in: SCHULZ, L.-C. (Hrsg.): Pathologie der Haut. Teil 1, Organveränderungen,

1. Aufl., Verlag Fischer Jena, 825-872

TRINDER, P., (1969)

Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor.

Ann. Clin. Biochem. 6, 24-27

UNGERSTEDT, U. (1991)

Microdialysis – principles and applications for studies in animals and man.

J. Intern. Med. 230, 365-373

VICKERS, C.F.H. (1963)

Existence of reservoir in the stratum corneum.

Arch. Derm. 88, 20-23

WARNER, R.R., M.C. MYERS u. D.A. TAYLOR (1988)

Electron probe analysis of human skin: determination of the water concentration profile.

J. Invest. Dermat. 90, 218-224

WARNER, R.R., Y.L. BOISSY, N.A. LILLY, M.J. SPEARS, K. McKILLOP, J.L. MARSHALL u. K.J. STONE (1999)

Water disrupts stratum corneum lipid lamellae: damage is similar to surfactants.

J. Invest. Dermatol. 113, 960-966

WENDT, K., H. BOSTEDT, H. MIELKE u. H.-W. FUCHS (1994)

Euter- und Gesäugekrankheiten.

Verlag Fischer, Jena, Stuttgart, 17-62

WERTZ, P.W., D.C. SWARTZENDRUBER, W. ABRAHAM, K.C. MADISON u. D.T. DOWNING (1987)

Essential fatty acids and epidermal integrity.

Arch. Dermatol. 123, 1381-1384

WESTER, R.C. u. H.I. MAIBACH (1975)

Percutaneous absorption in the rhesus monkey compared to man.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 32, 394-398

WESTER, R.C. u. H.I. MAIBACH (1976)

Relationship of topical dose and percutaneous absorption in rhesus monkey and man.

J. Invest. Dermatol. 67, 518-520

WESTER, R.C. u. H.I. MAIBACH (1984)

Advances in percutaneous absorption.

in: DRILL, V.A. u. P. LAZAR (Hrsg.): Cutaneous toxicity.

Raven Press, New York, 29-40

WESTER, R.C. u. H.I. MAIBACH (1985)

Animal models for percutaneous absorption.

in: MAIBACH, H.I. u. N.J. LOWE (Hrsg.): Models in Dermatology, vol. 2, 159-169

Verlag Karger, Basel

WESTER, R.C. u. P.K. NOONAN (1980)

Relevance of animal models for percutaneous absorption.

Int. J. Pharm. 7, 99-110

WILSCHUT, A., W.F. ten BERGE, P.J. ROBINSON u. T.E. McKONE (1995)

Estimating skin permeation. The validation of five mathematical skin permeation models.

Chemosphere 30, 1275-1296

YANG, L., M. MAO-QIANG, M. TALJEBINI, P.M. ELIAS u. K.R. FEINGOLD (1995)

Topical stratum corneum lipids accelerate barrier repair after tape stripping, solvent treatment and some but not all types of detergent treatment.

Br. J. Dermatol. 133, 679-685

YA-XIAN, Z., T. SUETAKE u. H. TAGAMI (1999)

Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin – relationship to the anatomical location on the body, age, sex, and physical parameters.

Arch. Dermatol. Res. 291, 555-559

YOSHIKAWA, N., G. IMOKOWA, K. AKIMOTO, K. JIN, Y. HIGAKI u. M. KAWASHIMA (1994)

Regional analysis of ceramides within the stratum corneum in relation to seasonal changes.

Dermatology 188, 207-214

ZESCH, A., W.-D. HOFFMANN u. H. SCHAEFER (1974)

Verteilung eines radiomarkierten Pharmakons in der menschlichen Hornschicht aus vier Salbengrundlagen.

Pharmazie 29, 198-203

ZESCH, A. u. H. SCHAEFER (1976)

Penetration, Permeation und Resorption von Heparin. In-vivo-Untersuchungen an der menschlichen Haut.

Arzneim.-Forsch./Drug Res. 26, 1365-1368

ZESCH, A., H. SCHAEFER u. W. HOFFMANN (1973)

Barriere- und Reservoirfunktion der einzelnen Hornschichtlagen der menschlichen Haut für lokal aufgetragene Arzneimittel.

Arch. Dermatol. Forsch. 246, 103-107

## 9 Anhang

**Anhangstabelle 1: Benzoessäurekonzentration im Perfusat [ng/ml] nach topischer Applikation von 40 mg Benzoessäure auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter. Die Nachweisgrenze lag bei 5 ng/ml. Ferner kumulative Darstellung der resorbierten Benzoessäuremenge in mg über den Perfusionszeitraum von 4 Stunden. Der Wert ergibt sich aus der Formel:  $c_{\text{kum}} = c \times \text{Flussrate} \times \Delta t$ .**

Zeit [min]	Euter 1		Euter 2		Euter 3		Euter 4	
	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.
15	24,17	0,045	83,44	0,156	1275,59	2,229	6,7	0,014
30	68,31	0,173	18,19	0,191	50,2	2,264	16	0,049
45	131,14	0,419	36,65	0,259	65,7	2,379	11,1	0,073
60	138,15	0,678	55,25	0,363	85,11	2,528	< 5	0,073
90	158,01	1,271	49,5	0,548	149,29	3,05	< 5	0,073
120	128,64	1,753	64,98	0,792	58,94	3,256	5,61	0,097
150	336,89	3,017	127,97	1,272	94,7	3,589	9,88	0,139
180	322,76	4,227	121,07	1,726	61,82	3,803	7,94	0,173
210	355,2	5,559	51,64	1,92	47,92	3,97	18,04	0,250
240	281,9	6,616	57,97	2,137	56,03	4,166	8,94	0,289
Perfusatfluss [ml/min]	125		125		116,5		143	

Zeit [min]	Euter 5		Euter 6		Euter 7		Euter 8	
	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.
15	33,35	0,071	152,4	0,323	17,79	0,036	< 5	0
30	45,56	0,169	239,26	0,831	11,87	0,060	18,19	0,036
45	46,37	0,269	< 5	0,831	9,96	0,080	49,41	0,137
60	37,94	0,350	< 5	0,831	7,61	0,095	< 5	0,137
90	31,97	0,487	12,43	0,884	13,94	0,152	18,48	0,212
120	18,04	0,565	6,24	0,911	13,5	0,206	10,37	0,254
150	10,45	0,609	< 5	0,911	47,53	0,399	15,08	0,315
180	11,7	0,660	< 5	0,911	53,43	0,615	14,97	0,376
210	11,97	0,711	< 5	0,911	51,81	0,825	12,61	0,428
240	19,76	0,796	< 5	0,911	< 5	0,825	13,1	0,481
Perfusatfluss [ml/min]	143		141,5		135		135,5	

**Anhangstabelle 2: Hydrokortisonkonzentration im Perfusat [ng/ml] nach topischer Applikation von 40 mg Hydrokortison auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter. Die Nachweisgrenze lag bei 0,5 ng/ml. Ferner kumulative Darstellung der resorbierten Hydrokortisonmenge in mg über den Perfusionszeitraum von 4 Stunden. Der Wert ergibt sich aus der Formel:  $C_{\text{kum}} = c \times \text{Flussrate} \times \Delta t$ .**

Zeit [min]	Euter 9		Euter 10		Euter 11		Euter 12		Euter 13		Euter 14		Euter 15	
	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.
15	4,88	0,012	< 0,5	0	3,23	0,006	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.
30	4,05	0,023	1,66	0,003	0,62	0,007	134,72	0,235	5,54	0,01	2,65	0,005	< 0,5	0
45	1,5	0,027	< 0,5	0,003	< 0,5	0,007	87,79	0,389	10,26	0,028	4,16	0,014	< 0,5	0
60	3,35	0,035	83,57	0,146	< 0,5	0,007	72,31	0,515	2,64	0,032	240,11	0,502	< 0,5	0
90	2,67	0,049	4,28	0,161	< 0,5	0,007	11,85	0,536	29,72	0,084	< 0,5	0,502	< 0,5	0
120	1,61	0,057	< 0,5	0,161	5,89	0,007	2,96	0,546	1,21	0,088	< 0,5	0,502	< 0,5	0
150	< 0,5	0,057	< 0,5	0,161	1,48	0,027	4,76	0,563	27,37	0,184	< 0,5	0,502	4,28	0,015
180	2,25	0,068	< 0,5	0,161	< 0,5	0,032	2,31	0,571	3,83	0,197	< 0,5	0,502	7,43	0,041
210	2,31	0,08	< 0,5	0,161	< 0,5	0,032	587,21	2,623	2,08	0,205	< 0,5	0,502	3,06	0,052
240	2,0	0,09	8,95	0,192	69,0	0,269	1,08	2,627	2,64	0,214	1,32	0,507	2,0	0,059
Perfusatfluss [ml/min]	170		114,5		114,5		116,5		116,5		135,5		117,5	

**Anhangstabelle 3: Testosteronkonzentration im Perfusat [ng/ml] nach topischer Applikation von 40 mg Testosteron auf 100 cm<sup>2</sup> Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter. Die Nachweisgrenze lag bei 0,04 ng/ml. Ferner kumulative Darstellung der resorbierten Testosteronmenge in mg über den Perfusionszeitraum von 4 Stunden. Der Wert ergibt sich aus der Formel:  $c_{\text{kum}} = c \times \text{Flussrate} \times \Delta t$ .**

Zeit [min]	Euter 16		Euter 17		Euter 18		Euter 19		Euter 20	
	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.
15	0,37	0,0006	1,38	0,003	1,96	0,004	0,66	0,001	1,76	0,004
30	0,21	0,001	34,38	0,075	15,47	0,036	19,49	0,041	0,77	0,005
45	0,17	0,0013	0,58	0,076	0,32	0,037	0,15	0,041	1,11	0,009
60	1,7	0,0043	0,72	0,078	0,21	0,037	4,69	0,051	3,0	0,015
90	0,18	0,0049	0,52	0,08	0,2	0,038	0,16	0,052	0,64	0,017
120	0,22	0,0057	21,93	0,172	0,33	0,04	0,1	0,052	0,66	0,018
150	0,29	0,0067	0,56	0,174	0,6	0,042	0,1	0,052	0,83	0,02
180	1,86	0,0132	<0,04	0,174	0,16	0,043	0,05	0,052	0,92	0,02
210	0,16	0,0138	0,07	0,174	0,33	0,044	0,19	0,053	1,52	0,021
240	0,13	0,014	0,63	0,177	6,75	0,073	17,52	0,124	1,76	0,004
Perfusatfluss [ml/min]	116,5		139,5		139,5		135,5		135,5	

Zeit [min]	Euter 21		Euter 22		Euter 23		Euter 24		Euter 25	
	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.
15	1,97	0,004	0,23	0,0005	0,2	0,0004	0,94	0,002	0,46	0,0008
30	0,67	0,006	0,16	0,0008	0,16	0,0004	0,45	0,002	0,25	0,001
45	1,89	0,01	0,54	0,002	0,04	0,0006	0,19	0,003	0,34	0,002
60	2,29	0,015	0,44	0,003	0,08	0,002	37,99	0,07	0,36	0,002
90	0,5	0,017	4,6	0,022	0,69	0,005	0,37	0,071	0,27	0,003
120	0,25	0,018	0,24	0,023	0,29	0,006	4,74	0,088	0,48	0,005
150	0,41	0,02	0,04	0,024	0,21	0,009	0,32	0,089	0,42	0,007
180	0,12	0,02	0,15	0,024	0,71	0,01	0,84	0,092	0,12	0,007
210	0,12	0,021	0,25	0,025	0,23	0,011	0,72	0,094	0,28	0,008
240	1,97	0,004	0,23	0,0005	0,2	0,0004	2,15	0,102	0,32	0,009
Perfusatfluss [ml/min]	143		141,5		119		117,5		116	

**Anhangstabelle 4: Benzooesäurekonzentration in Tesafilmabrissproben [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ] nach topischer Applikation von 40 mg Benzooesäure auf 100  $\text{cm}^2$  Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter.**

Abriss	Euter 1	Euter 2	Euter 3	Euter 4	Euter 5	Euter 6	Euter 7	Euter 8
1	6,78	10,11	9,58	1,43	5,98	6,89	1,93	11,05
2	3,9	0,99	0,95	0,57	0,49	4,3	2,45	7,13
3	7,46	1,03	3,08	0,71	4,3	10,06	6,01	3,63
4	2,21	0,25	1,07	0,07	6,24	3,57	1,53	3,63
5	2,41	0,04	3,08	0,99	5,59	8,32	5,03	5,09
6	1,89	0,23	1,03	1,48	0,12	7,37	1,32	5,79
7	0,97	0,08	3,52	0,33	7	2,22	2,05	4,34
8	0,29	0,28	1,38	0,79	1,22	1,67	0,69	7,69
9	0,72	0,15	0,17	1,05	0,26	0,98	1,1	3,14
10	0,73	0,26	0,24	0,91	0,13	2,88	2,24	3,49

**Anhangstabelle 5: Hydrokortisonkonzentration in Tesafilmabrissproben [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ] nach topischer Applikation von 40 mg Hydrocortison auf 100  $\text{cm}^2$  Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter.**

Abriss	Euter 9	Euter 10	Euter 11	Euter 12	Euter 13	Euter 14	Euter 15
1	3,38	27,41	2,56	1,97	23,95	23,79	29,05
2	4,39	4,22	5,34	5,34	24,11	18,32	15,2
3	0,47	3,49	1,11	5,41	6,16	4,1	9,43
4	1,01	2,93	0,95	3,14	1,1	7,43	7,23
5	0,69	3,09	1,77	0,93	0,58	1,04	6,73
6	1,22	1,05	1,21	2,83	0,49	4,29	7,97
7	6,62	2,02	1,79	7,88	1,09	3,91	3,84
8	0,93	1,16	0,47	3,67	1,01	3,62	1,87
9	3	0,52	0,31	1,54	1,02	0,72	4,49
10	0,35	1,53	0,27	1,12	0,88	0,61	2,29

**Anhangstabelle 6: Testosteronkonzentration in Tesafilmaabrissproben [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ] nach topischer Applikation von 40 mg Testosteron auf 100  $\text{cm}^2$  Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter.**

Abriss	Euter 16	Euter 17	Euter 18	Euter 19	Euter 20	Euter 21	Euter 22	Euter 23	Euter 24	Euter 25
1	3,47	0,53	1,29	1,65	1,55	3,91	9,17	6,27	3,42	5,95
2	1,83	1,43	0,83	2,79	1,51	1,65	10,53	5,53	6,74	3,95
3	1,36	1,27	1,01	2,83	0,98	0,73	3,79	3,51	4,5	3,83
4	6,48	0,85	0,74	0,95	2,83	1,49	1,41	3,53	2,63	3,97
5	3,95	1,17	1,99	1,56	2,3	1,57	1,92	3,57	4,58	3,33
6	3,68	3,22	2,33	2,25	1,83	2,63	1,28	2,25	4,33	3,31
7	2,41	1,64	0,87	2,89	1,93	1,67	1,07	1,4	7,8	1,83
8	0,47	1,01	1,14	0,81	1,57	0,83	0,59	1,16	3,27	1,35
9	0,95	1,01	1,24	0,81	2,23	0,42	1,02	0,19	2,09	0,82
10	0,53	1,07	0,49	1,51	0,91	1,25	1,67	2,06	1,91	2,72

**Anhangstabelle 7: Benzoesäurekonzentration in den Hautproben [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ] nach topischer Applikation von 40 mg Benzoesäure auf 100  $\text{cm}^2$  Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter. Die Nachweisgrenze lag bei 10 ng.**

Zeit [min]	Hautschicht [ $\mu\text{m}$ ]	Euter 1	Euter 2	Euter 3	Euter 4	Euter 5	Euter 6	Euter 7	Euter 8
60	0-60	5,60	0,03	0,44	0,16	0,06	1,27	1,70	12,70
	61-120	0,79	0,08	10,69	0,23	0,09	0,36	1,68	2,93
	121-180	2,44	0,15	2,90	1,10	0,01	0,04	3,63	6,07
120	0-60	4,27	0,06	0,24	0,05	0,09	0,02	2,28	2,17
	61-120	3,77	0,10	0,18	0,35	0,11	0,31	2,29	5,33
	121-180	4,83	0,12	0,56	0,30	0,05	< NWG	5,92	3,22
240	0-60	3,38	0,12	0,52	0,05	0,05	0,05	4,20	1,84
	61-120	2,35	0,05	0,20	< NWG	0,05	0,04	3,39	2,51
	121-180	1,46	0,24	0,66	0,20	0,11	0,04	0,60	10,23

**Anhangstabelle 8: Hydrokortisonkonzentration in den Hautproben [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ] nach topischer Applikation von 40 mg Hydrocortison auf 100  $\text{cm}^2$  Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter.**

Zeit [min]	Hautschicht [ $\mu\text{m}$ ]	Euter 9	Euter 10	Euter 11	Euter 12	Euter 13	Euter 14	Euter 15
60	0-60	4,37	3,38	0,08	1,98	5,90	11,46	0,10
	61-120	1,36	7,75	0,07	7,45	1,32	6,16	3,36
	121-180	0,79	4,20	0,09	0,29	1,78	8,35	4,12
120	0-60	0,67	5,00	0,56	1,23	2,06	2,37	2,34
	61-120	2,89	2,62	0,44	0,93	6,53	6,99	5,00
	121-180	0,67	2,34	1,00	1,56	1,18	9,52	2,39
240	0-60	1,64	7,88	0,22	1,74	3,68	2,82	1,87
	61-120	1,04	2,36	0,66	8,53	2,76	2,94	3,13
	121-180	1,24	3,10	0,74	0,95	4,67	3,77	4,24

**Anhangstabelle 9: Testosteronkonzentration in den Hautproben [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ] nach topischer Applikation von 40 mg Testosteron auf 100  $\text{cm}^2$  Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter.**

Zeit [min]	Hautschicht [ $\mu\text{m}$ ]	Euter 16	Euter 17	Euter 18	Euter 19	Euter 20
60	0-60	2,63	4,46	1,46	1,70	1,02
	61-120	8,04	2,44	0,90	0,80	1,02
	121-180	2,33	4,44	1,26	0,62	0,94
120	0-60	0,71	0,79	0,82	1,43	1,19
	61-120	1,67	0,55	1,50	1,09	1,44
	121-180	1,74	1,22	1,56	0,87	1,81
240	0-60	1,15	1,08	0,46	0,94	1,81
	61-120	1,91	1,24	1,65	1,92	1,07
	121-180	1,61	3,83	3,70	0,80	0,31

Zeit [min]	Hautschicht [ $\mu\text{m}$ ]	Euter 21	Euter 22	Euter 23	Euter 24	Euter 25
60	0-60	1,53	3,74	3,50	0,65	0,92
	61-120	2,62	3,44	2,75	2,49	2,28
	121-180	1,31	3,58	2,17	2,06	1,24
120	0-60	2,57	3,35	2,99	2,93	2,35
	61-120	1,96	4,88	3,44	1,17	1,06
	121-180	5,59	1,85	3,26	1,38	4,77
240	0-60	2,96	4,06	0,04	3,07	1,32
	61-120	1,79	4,39	6,02	3,73	1,88
	121-180	2,00	2,39	3,58	0,76	2,46

**Anhangstabelle 10: Benzoessäurekonzentration [ng/ml] im Mikrodialysat** nach topischer Applikation von 0,4 mg Benzoessäure auf die Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter. Ferner kumulative Darstellung der im Mikrodialysat befindlichen Benzoessäuremenge in ng. Dieser Wert ergibt sich aus der Formel:  $c_{\text{kum.}} = c \text{ [ng/ml]} \times \text{Flussrate} \times \Delta t$ . Die Flussrate beträgt 0,3 ml/h.

Zeit [min]	Euter 26		Euter 27		Euter 28		Euter 29		Euter 30		Euter 31	
	Konz.	kum.	Konz.	kum.	Konz.	kum.	Konz.	kum.	Konz.	kum.	Konz.	kum.
40	2392,3	478,46	1158,5	231,7	4376,6	875,32	887,55	177,51	2035,5	407,1	2566,1	513,22
60	3974,9	875,96	1428,4	374,54	3644,1	1239,7	689,41	246,45	2700,4	677,14	5474,7	1060,7
80	5010,9	1377,0	1928,1	567,35	4396,7	1679,4	572,1	303,66	2829,1	960,05	8064,4	1867,1
100	6116,0	1988,6	2430,6	810,41	6014,9	2280,9	625,92	366,25	2778,5	1237,9	9912,9	2858,4
120	6957,5	2684,4	3090,9	1119,5	6623,7	2943,3	546,36	420,89	2789,0	1516,8	8682,5	3726,7
140	8999,2	3584,3	2336,4	1353,1	6891,8	3632,4	574,98	478,39	2671,0	1783,9	11588	4885,5
160	8381,9	4422,5	1894,7	1542,6	7108,5	4343,3	536,17	532,0	2371,7	2021,1	11010	5986,5
180	7193,4	5141,8	2399,4	1782,6	7479,7	5091,3	676,4	599,64	2923,9	2313,5	10946	7081,1

**Anhangstabelle 11: Hydrokortisonkonzentration [ng/ml] im Mikrodialysat** nach topischer Applikation von 0,4 mg Hydrocortison auf die Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter. Ferner kumulative Darstellung der im Mikrodialysat befindlichen Benzoessäuremenge in ng. Dieser Wert ergibt sich aus der Formel:  $c_{\text{kum.}} = c \text{ [ng/ml]} \times \text{Flussrate} \times \Delta t$ . Die Flussrate beträgt 0,3 ml/h.

Zeit [min]	Euter 32		Euter 33		Euter 34		Euter 35		Euter 36	
	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.	Konz.	kumul.
40	162,34	32,468	1125,5	225,1	2252	450,4	848,96	169,79	72,82	14,564
60	87,57	41,225	780,71	303,17	1872	637,6	496,32	219,42	52,14	19,778
80	57,95	47,02	573,87	360,56	1033,5	740,95	424,43	261,86	49,93	24,771
100	38,79	50,899	489,2	409,48	3367,5	1077,7	734,68	1258,4	79,14	32,685
120	26,68	53,567	429,2	452,4	927	1170,4	368,32	1295,2	27,04	35,389
140	17,63	55,33	231,52	683,92	495	1219,9	299,08	1325,1	20,81	37,47
160	29,05	58,235	399,48	723,87	375,5	1257,5	213,02	1346,4	8,83	38,353
180	20,35	60,27	269,75	750,85	250,5	1282,5	259,65	1372,4	23,39	40,692

**Anhangstabelle 12: Testosteronkonzentration [ng/ml] im Mikrodialysat** nach topischer Applikation von 0,4 mg Testosteron auf die Euterhaut am isoliert perfundierten Rindereuter. Ferner kumulative Darstellung der im Mikrodialysat befindlichen Benzoesäuremenge in ng. Dieser Wert ergibt sich aus der Formel:  $c_{\text{kum.}} = c \text{ [ng/ml]} \times \text{Flussrate} \times \Delta t$ . Die Flussrate beträgt 0,3 ml/h.

Zeit [min]	Euter 37		Euter 38		Euter 39		Euter 40		Euter 41		Euter 42		Euter 43	
	Konz	kum.	Konz	kum.	Konz	kum.	Konz	kum.	Konz	kum.	Konz	kum.	Konz	kum.
40	12,5	2,5	109	21,8	250	50	3,3	0,66	8,5	1,7	124	35,4	8,3	1,66
60	12,5	3,75	69	28,7	183,5	68,35	4,83	1,143	12,5	2,95	70	42,4	15,6	3,22
80	9	4,65	116	40,3	152,5	83,6	7,91	1,934	11,5	4,1	54,5	47,85	17,2	4,94
100	15,5	6,2	50	45,3	119	95,5	9,98	2,932	11	5,2	54,5	53,3	22,2	7,16
120	10	7,2	112,5	56,33	132	108,7	12,49	4,181	16	6,8	38	57,1	20,7	9,23
140	12,5	8,45	90,5	65,6	49	113,6	14,77	5,658	12,5	8,05	35	60,6	25,1	11,74
160	10,5	9,5	31,5	68,75	40	117,6	32,5	8,908	7,5	8,8	30	63,6	18,7	13,61
180	12,5	10,75	55,5	74,3	41	121,7	21,86	11,09	18	10,6	101,5	73,75	20,5	15,66

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. Kietzmann danke ich sehr herzlich für die Überlassung dieses Themas sowie für die stets freundliche Betreuung und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Meinen herzlichen Dank möchte ich auch allen Mitarbeitern, insbesondere Frau Inna Pahl und Herrn Dr. Frank Niedorf, im Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Hochschule Hannover aussprechen für die freundliche Unterstützung bei der Arbeit im Labor.

Dr. Michael Braun danke ich für die gute Zusammenarbeit im Schlachthof und im Euterlabor.

Für die Überlassung der Rindereuter möchte ich mich beim Schlachthof Gleidingen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Schwiegereltern, Friedrich und Lieselotte Schaper, für die regelmäßige Betreuung meiner Kinder. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.