

(1 µg/ml), mepyramine (1 µg/ml) and methysergide (0.5 µg/ml). CJ and RD were used for the identification of B^{6,7} while RSF was used for the detection of PG's¹⁰.

Isometric contractions of test organs were recorded by a Grass polygraph (Model 79 C) using force-displacement transducers (Grass FT. 03). Dentine was stimulated by voltages 5- to 10-fold of sensory threshold measured in conscious animals by square wave pulses of 0.5 msec duration and 10 cps frequency (Grass stimulator, M 58 C). The results were evaluated statistically using Student's *t*-test.

Results. The sensory threshold was determined and found to be 1.9 ± 0.4 (S.E., $n = 5$) volts, in conscious dogs. Superfusion of the effluent of tooth pulp over the assay organs did not induce significant responses. When dentine was electrically stimulated, it produced a biphasic response in RD and a contraction in RSF (Figure 1). B itself, caused a relaxation in RD and a contraction in RSF. PGE₂, however, produced a contractile response in both smooth muscle preparations. When Trasylol was added to the perfusion medium of the tooth pulp at the concentration of 5000 U/ml, the relaxation of RD and contraction of a CJ due to the stimulation of dentine was completely abolished, but the contraction of RD and RSF did not change (Figure 2). Further addition of indomethacin into the perfusion medium at the concentration of 0.5 µg/ml, caused a complete blockade in both assay organs. Neither Trasylol nor indomethacin at the concentrations used caused a change in response of assay organs to B and PGE₂. The estimated amount of B-like material was found to be 2.0 ± 0.3 ng ($n = 5$) within 5 min stimulation of dentine while it was 4.5 ± 1.2 ng ($n = 5$) for PG-like material, as calculated depending on the responses of CJ and RSF to B and PGE₂.

Single i.v. injection of Trasylol at the dose of 10,000 U/kg caused an increase of sensory threshold in conscious dogs. This threshold was found to be raised to 4.0 ± 0.7 (S.E., $n = 5$) volts, in 6 min, and to 5.0 ± 0.5 (S.E., $n = 5$) volts, in 40 min after injection of Trasylol and gradually decreased and reached the control level within 20 min. Both measurements were significantly different compared with the control value ($p < 0.001$).

Intravenous injection of indomethacin at the dose of 2 mg/kg did not significantly change the sensory threshold compared with the control values. However, injection of Trasylol at the same dose to the indomethacin-pretreated (2 mg/kg i.v.) dogs caused a highly significant increase in pain threshold. In this group, the estimated value of threshold voltage measured 10 min after injection of Trasylol was found to be 8.7 ± 0.3 (S.E., $n = 5$) volts, a value which is significantly higher than that of obtained after injection of Trasylol alone ($p < 0.001$).

Discussion. The stimulation of dentine in conscious dogs induces a pain reaction^{6,11,12}, as well as a release of B- and PG-like material from the tooth pulp, according to the present results. It seems likely that the release of B- and PG-like material from the pulp due to the stimulation of dentine have an important role on the production of tooth pain, since both local hormones are known to be

most potent pain-producers. Inhibition of B-sensitive assay organs, by the addition of Trasylol into the perfusion medium, indicates the possible activation of tissue kallikrein system due to the stimulation of dentine¹³. Again, inhibition of PG-sensitive assay organ by indomethacin indicates the release of PG-like material from tooth pulp.

In conscious dogs, Trasylol, but not indomethacin, significantly increases the sensory threshold induced by the stimulation of dentine. If the release of PG's is directly involved in the mediation of dental pain, then an increase in pain threshold due to the stimulation of dentine can be expected after indomethacin pretreatment. This is not the case according to the results of the present investigation. However, injection of indomethacin together with Trasylol caused a significant rise in sensory threshold compared with that of Trasylol alone. According to these findings, it seems unlikely that PG's directly act by stimulating sensory nerve endings. It perhaps sensitizes the nerve endings to B. Such a mechanism has been shown in man⁸ and verified in dog spleen¹⁴. On the other hand, B causes the release of PG-like material from dog kidney¹⁵ and dog spleen¹⁴ and indomethacin can effectively reduce this release. It is still unknown whether or not B can cause the release of PG's in tooth pulp. The elaboration of B-like material from the tooth pulp due to electrical stimulation has recently been described by INOKI et al.¹⁶ which further supports the present results.

Zusammenfassung. Mit In-vivo-Versuchen wurde an Hundezähnen gezeigt, dass auch in der Zahnpulpa durch elektrische Reizung des Dentins Bradykinin und Prostaglandin freigesetzt werden, wodurch auch in der Zahnpulpa die wahrscheinlichen peripheren Mediatoren für den Zahnschmerz ermittelt wurden.

M.N. TÜRKER and R.K. TÜRKER¹⁷

Department of Oral Surgery, Dental Faculty,
Department of Pharmacology, Medical Faculty,
Ankara University, Sıbbiye, Ankara (Turkey),
28 November 1973.

¹⁰ F. COCEANI and L. S. WOLFE, Can. J. Physiol. Pharmac. 44, 933 (1966).

¹¹ J. E. HENG and E. F. DOMINO, Psychopharmacologia 1, 433 (1960).

¹² J. CHEYMOL, R. MONTAGNE, J. DALTRON and J. DUTEIL, Therapie 14, 350 (1959).

¹³ R. VOGEL and E. WERLE, Handbook of experimental Pharmacology (Eds. E. G. ERDÖS and A. F. WILDE, Springer Verlag, New York 1970), vol. 25, p. 213.

¹⁴ S. H. FERREIRA, S. MONCADA and J. R. VANE, Br. J. Pharmac. 49, 86 (1973).

¹⁵ J. C. McGIFF, N. A. TERRAGNO, K. U. MALIK and A. J. LONIGRO, Circulation Res. 31, 36 (1972).

¹⁶ R. INOKI, T. TOYODA and I. YAMAMOTO, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac. 279, 387 (1973).

¹⁷ We are grateful to Dr. J. E. PIKE (UpJohn) for PGE₂, to Sandoz for BRS 640 and to Bayer for Trasylol. We thank to Mr. R. SARIHÜSEYİNOĞLU and Mr. M. KABAÇAM for their technical assistance.

Zur Eindringtiefe dermal applizierter Wirkstoffe

Die kutane Applikation von Lösungen und Salben zur Therapie von Muskel-, Sehnen- und Gelenksaffektionen wird häufig angewendet und zeigt auch nicht selten Erfolg. Verschiedene Lösungsmittel werden benutzt, um

die Penetration durch die Haut und die Permeation in tiefe Gewebsschichten zu erleichtern. Wir haben kürzlich den Einfluss von DMSO auf das Eindringen von Phenylbutazon und Flumethason in die Tarsalgelenksflüssigkeit

untersucht und gefunden, dass von beiden Wirkstoffen weniger als 1% in die Synovialflüssigkeit gelangte¹. Während das Durchdringen der Oberhaut intensiv studiert worden ist, haben unseres Wissens nur wenige Autoren bis jetzt den Weg von Wirkstoffen nach der Penetration der Epidermis weiterverfolgt: MEYER² konnte histologisch im Fluoreszenzmikroskop ein Eindringen von Tetracyclin bis in die Muskulatur feststellen. LEIDL und BIERGERT³ fanden nach Applikation von mehreren Millionen Einheiten Penicillin auf die Skrotalhaut von Stieren in der Tunica albuginea bis zu 200 IE/g und im Hoden bis 4 IE/g. WALSER⁴ stellte nach Auftragen von 3–6 Mio. IE Penicillin auf die Euterhaut in Blutplasma und Milch weniger als 1 IE/ml fest. In der vorliegenden Arbeit wurde nach Applikation eines Tritium-markierten Steroids durch Radioaktivitätsmessung im darunterliegenden Gewebe die Eindringtiefe des Präparates bestimmt.

Methodik. 200 μCi ^3H -Flumethason⁵ (0,166 mg) wurden zusammen mit 0,56 mg inaktivem Flumethason in 1 ml 90% DMSO gelöst und auf ein Areal von 6×8 cm der geschorenen Haut in der Kruppegegend einer 9jährigen Freiburger Stute von 545 kg Körpergewicht aufgetragen. Nach 50 min war die Lösung eingetrocknet. 120 min nach der Applikation wurde das Tier getötet. Ein Block von $20 \times 20 \times 5$ cm mit dem behandelten und darunterliegenden Gewebe im Zentrum wurde herausgeschnitten und eingefroren.

Das Hautmuskelstück trennten wir in Haut und Muskelanteil, um Kontaminationen der untern Schichten mit der sich eventuell noch auf der Haut befindlichen radioaktiven Substanz zu vermeiden. Wir stanzen an den auf der Abbildung angegebenen Stellen je 15 zylindrische Stücke mit einem Durchmesser von 10 mm aus den ge-

frorenen Gewebestücken. Die Haut- und Muskelstücke teilten wir in je zwei Teile auf: Das oberste Hautstück war etwa 2 mm hoch und erreichte teilweise den Papillarkörper. Das zweite war etwa 8 mm hoch und umfasste den grösseren Teil des Papillarkörpers, das Corium und die Subcutis. Das dritte Stück enthielt die Faszien- und obere Muskelschicht (ca. 8 mm) und das vierte von 8 mm Höhe umfasste die tiefere Muskelschicht. Die einzelnen Gewebestückchen wurden im evakuierten Exsikkator über festem Kaliumhydroxid getrocknet. Das Gewicht eines Hautstückes der obersten Schicht von 1 cm Durchmesser betrug etwa 90 mg. Aliquote mit 10–50 mg Gewicht wurden auf Filterpapiere eingewogen und im Sauerstoffkolben verbrannt: Bei unserer Modifikation der Methode von KALBERER und RUTSCHMANN⁶ wird der Glasstopfen mit der zu verbrennenden Probe nicht wie in der Originalvorschrift angegeben erst nach Zünden des Filterpapiers in den Kolben eingesetzt, sondern das Filterpapier wird am angeschwärzten Docht nach Einsetzen in den mit Sauerstoff gefüllten Kolben mit einer fokussierenden Kinoprojektionslampe angezündet. Statt der Platinhalter werden Netzchen, die wir uns selbst aus einem Drahtgitter aus V-4 A Stahl mit einem Durch-

¹ G. UELTSCHI und CH. SCHLATTER, Arch. exp. Vet. Med. 28, 101 (1974).

² F. MEYER, Seifen, Öle, Fette, Wachse 93, 350 (1967).

³ W. LEIDL und W. BIERGERT, J. Reprod. Fert. 15, 177 (1968).

⁴ K. WALSER, Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 79, 241 (1966).

⁵ Freundlicherweise von Dr. W. JÖCHLE, Syntex Corp., Palo Alto, Kalifornien, überlassen.

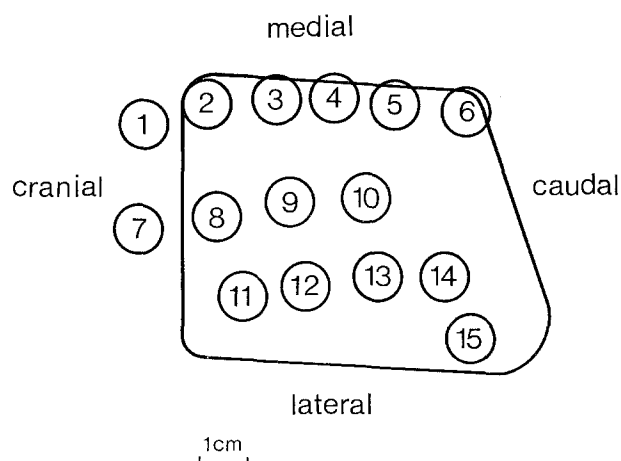
⁶ F. KALBERER und J. RUTSCHMANN, Helv. chim. Acta 44, 1956 (1961).

Radioaktivitätsgehalte der Gewebeproben.

Entnahmeort	Radioaktivitätsgehalt (dpm/mg Trockengewebe $\pm$ 1 s)			
	Oberste Hautschicht	Schicht mit Papillarkörper, Corium und Subcutis	Faszien- und obere Muskelschicht	Untere Muskelschicht
1	177,26 $\pm$ 7,11	16,16 $\pm$ 6,30	9,03 $\pm$ 6,03	3,26 $\pm$ 4,77
1				0,18 $\pm$ 12,93
2	129,33 $\pm$ 12,79	4,47 $\pm$ 6,06	72,83 $\pm$ 5,28	1,31 $\pm$ 7,32
2			12,50 $\pm$ 15,84	
2			7,85 $\pm$ 13,57	
3	419,04 $\pm$ 7,59	2,82 $\pm$ 4,25	11,54 $\pm$ 8,28	0,95 $\pm$ 4,76
4	519,69 $\pm$ 79,69	22,62 $\pm$ 5,48	19,38 $\pm$ 5,13	1,87 $\pm$ 5,05
4			2,15 $\pm$ 16,06	–0,71 $\pm$ 16,54
5	812,84 $\pm$ 41,63	42,86 $\pm$ 4,43	9,95 $\pm$ 5,76	1,90 $\pm$ 6,03
6	52,50 $\pm$ 4,25	4,28 $\pm$ 5,10	31,20 $\pm$ 6,91	1,04 $\pm$ 5,62
6			0,71 $\pm$ 13,34	
7	23,51 $\pm$ 5,70	14,75 $\pm$ 7,57	3,78 $\pm$ 6,08	0,53 $\pm$ 4,56
7	35,62 $\pm$ 13,15		1,39 $\pm$ 14,35	
8	3425,87 $\pm$ 33,46	20,21 $\pm$ 5,74	24,68 $\pm$ 8,97	1,31 $\pm$ 4,23
8	4327,19 $\pm$ 142,45	47,46 $\pm$ 18,30	2,15 $\pm$ 12,86	1,06 $\pm$ 15,55
9	4041,38 $\pm$ 77,33	64,28 $\pm$ 10,02	2,93 $\pm$ 8,05	1,23 $\pm$ 4,91
9	3404,48 $\pm$ 119,29	49,52 $\pm$ 22,78	1,57 $\pm$ 13,23	
10	5986,58 $\pm$ 90,48	22,91 $\pm$ 8,64	0,77 $\pm$ 5,85	5,72 $\pm$ 7,68
10	5327,94 $\pm$ 40,87	64,79 $\pm$ 16,03	–3,96 $\pm$ 15,55	
11	1323,29 $\pm$ 14,39	73,47 $\pm$ 10,46	4,80 $\pm$ 4,97	1,49 $\pm$ 4,85
11	2067,40 $\pm$ 87,34	41,58 $\pm$ 14,98	1,39 $\pm$ 13,44	
12	7401,75 $\pm$ 33,10	191,18 $\pm$ 15,96	2,76 $\pm$ 5,77	0,42 $\pm$ 4,82
12	6213,42 $\pm$ 106,77			
13	3687,81 $\pm$ 59,76	96,65 $\pm$ 16,14	3,15 $\pm$ 5,01	1,64 $\pm$ 5,18
13	5748,08 $\pm$ 198,09			–1,85 $\pm$ 14,57
14	7277,79 $\pm$ 147,94	25,58 $\pm$ 9,23	6,06 $\pm$ 4,41	0,24 $\pm$ 4,97
14	8209,51 $\pm$ 104,42	44,53 $\pm$ 14,06		
15	21000,63 $\pm$ 258,77	143,76 $\pm$ 13,57	5,08 $\pm$ 6,27	0,60 $\pm$ 4,28
15	28074,00 $\pm$ 167,80	185,02 $\pm$ 23,48		

messer von rund 0,3 mm gefertigten, in den Glasstopfen lediglich eingehängt und nicht eingeschmolzen. Das Absorptionsmedium (6 ml Methanol) wird erst nach abgelaufener Verbrennung durch ein Septum im Schraubverschluss des Stopfens eingespritzt. Nach Schütteln des Kolbens werden nach etwa 15 min 5 ml der Absorptionsflüssigkeit in ein Zählgläschen zu 10 ml Szintillationslösung (7 g Butyl-PBD/l Toluol purum) pipettiert. Diese Modifikation erlaubt ein rascheres und ungefährlicheres Arbeiten. Die Proben wurden in einem Beckman-LS-150-Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer mit externer Standardisierung zur Ausbeutebestimmung gezählt.

Probenentnahmenstellen



Resultate und Diskussion. Die Messwerte der verbrannten Gewebstückchen nach Abzug des Blindwertes sind in der Tabelle zusammengestellt. Die Doppelbestimmungen wurden nicht gleichzeitig durchgeführt. Die Werte von inaktiven Vergleichsproben lagen zwischen 70 und 90 cpm. Die angeführten Standardabweichungen widerspiegeln lediglich die Unsicherheiten, die sich aus dem radioaktiven Zerfall, der Instabilität des Zählgerätes und dem wechselnden Einfluss der kosmischen Strahlung ergaben. Nicht erfasst wurden Kontaminationen mit Fremdaktivitäten, Chemilumineszenzerscheinungen oder Fehler bei der Probenvorbereitung.

Auf das 40 cm² grosse Applikationsfeld waren 200 µCi ³H-Flumethason aufgetropft worden. In einem ausgestanzten Hautstück von 1 cm Durchmesser waren also ursprünglich durchschnittlich ca. 4 µCi ³H-Flumethason vorhanden. Dies sind bei einem durchschnittlichen Trockengewicht der Stücke von 90 mg ca. 97 000 dpm/mg Epidermis. Die mittlere gefundene Aktivität der Epidermisproben betrug nur noch 5000 dpm/mg. 92 000 dpm, also ca. 95%, hatten die Epidermis innert 2 h demnach bereits passiert. Da die tieferen Schichten praktisch keine Aktivitäten enthielten, wurde somit die radioaktive Substanz sogleich durch den Blutstrom in den Unterhautgefässen abtransportiert. Es ist also offenbar nicht möglich, durch dermale Applikation von Flumethason im Gewebe unterhalb des Coriums wesentliche Wirkstoffkonzentrationen zu erreichen. Wenn Flumethason als sehr schlecht wasserlösliche, apolare und lipophile Substanz vom Blut quantitativ abtransportiert wird, ist dasselbe Verhalten auch von der Grosszahl der übrigen pharmakologisch aktiven Substanzen mit zumeist polarer Natur zu erwarten. Die klinischen Erfolge bei der perkutanen Behandlung von Gelenks- und Muskelaaffektionen des Pferdes beruhen deshalb nicht auf einer Anreicherung der Wirkstoffe unterhalb der Applikationsstelle, sondern viel eher auf einer reflektorischen Änderung der Zirkulationsverhältnisse im geschädigten Gewebe, ausgelöst durch die Reizung der Rezeptoren im behandelten Hautstück (kutiviszerele Reflexe in den entsprechenden Headschen Zonen).

Summary. Two h after the application of 200 µCi ³H-Flumethasone (0.73 mg) to the shaved skin of a horse, only 5% of the substance could be found on or in the treated epidermis. The deeper tissues contained practically no radioactivity. Therefore, dermal application does not appear to be an effective means of treating these tissues.

CH. SCHLATTER⁷ und G. UELTSCHI

*Isotopenlaboratorium des Gerichtlich-Medizinischen
Institutes und Chirurgische Tierklinik
der Universität Bern,
CH-3012 Bern (Schweiz),
13. März 1974.*

⁷ Jetzige Adresse: Institut für Veterinär-Physiologie der Universität Zürich, Winterthurerstrasse 260, CH-8057 Zürich (Schweiz).

Retention of Matrix Density in Adrenergic Vesicles After Extensive Norepinephrine Depletion

Two types of vesicles which contain norepinephrine (NE) are found in adrenergic nerves. Large dense core vesicles (LDV) are always present both in the axons and terminals, while small dense core vesicles (SDV) generally predominate in the terminals. However, the distribution of the two vesicle types varies greatly not only in different species but also at various loci in the same species. It is not known to what degree each type contributes in the release of NE and other substances upon nerve stimulation. The bovine splenic nerve contains a relatively high proportion of LDV in the terminal varicosities, where they are estimated to occur in a 50-50 distribution with SDV¹, which makes it tempting to infer a direct role for these vesicles in transmitter release.

There have been many attempts to correlate the vesicle NE content and/or other matrix components with the electron density after various treatments (see reviews²⁻⁴).

Initial glutaraldehyde fixation followed by osmium tetroxide preserves essentially all NE in isolated LDV from splenic nerve throughout fixation and dehydration procedures prior to embedment for electron microscopy, as demonstrated by radioactive tracer retention studies⁵. The study of several different fixation and staining

¹ J. P. TRANZER, in *Frontiers in Catecholamine Research* (Eds. E. USDIN and S. SNYDER; Pergamon Press, New York 1973), p. 453.

² F. E. BLOOM, *Int. Rev. Neurobiol.* 13, 27 (1970).

³ F. E. BLOOM, in *Catecholamines* (Eds. H. BLASCHKO and E. MUSCHOLL; Springer-Verlag, Berlin 1971), vol. 33, p. 46.

⁴ J. P. TRANZER, H. THOENEN, R. L. SNIPES and J. G. RICHARDS, *Progr. Brain Res.* 31, 33 (1969).

⁵ Å. THURESON-KLEIN, R. L. KLEIN and S. S. YEN, *J. Ultrastruct. Res.* 43, 18 (1973).