

## **5. Diskussion**

### **5.1 Diskussion der Methode**

#### 5.2.1 Perfusionsaufbau

Der hier präsentierte Aufbau bietet den Vorteil einer ständigen und leichten Zugänglichkeit des Organs. Manipulationen können problemlos durchgeführt werden. Die Einzelkomponenten arbeiten zuverlässig und sind gut zu bedienen. Eine Zerlegung des Aufbaus für die Reinigung und Resterilisation ist schnell und einfach möglich, die Wiederverwertbarkeit vieler Baukomponenten damit gegeben. Die Dialysatoren als Einmalartikel werden nach dem Versuch verworfen. Der Oxygenator wird nach jedem Versuch gründlich durchgespült, jedoch nicht sterilisiert.

Wie oben erwähnt, werden die Schläuche und Steckverbindungen nach jedem Versuch mechanisch gereinigt und danach sterilisiert. Bestimmte Substanzen haben die Fähigkeit, an Polyethylen zu binden und könnten dann nach Sterilisation in einem neuen Versuch austreten und die Versuchsergebnisse verfälschen. Ebenso können Blutparameter durch Aufbaumaterialien beeinflusst werden (GEMMELL, 2001). Die Blutwerte variieren jedoch innerhalb der Versuchsgruppen nach 30 Minuten Perfusion nicht merklich, so dass eine solche Bindung an das Material unwahrscheinlich ist.

In der Kontrollgruppe kommt es zu einem Abfall des Erythrozytengehaltes und des Hämatokrits. Ursache hierfür können die Kalibervariationen im Schlauchsystem sein, welche zu unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten und damit zu Wirbelbildungen führen. Gleichzeitig stellen die dadurch notwendigen Verbindungsstücke für die zellulären Bestandteile des Blutes ein Zerstörungspotential dar. Es handelt sich hier um einen experimentellen Aufbau. Die Herstellung eines einheitlichen, kommerziell produzierbaren Schlauchsystems, wie es in der Humanmedizin bei vergleichbaren Aufbauten verwendet wird, würde die Verbindungsstücke überflüssig machen und könnte Abhilfe schaffen. Ein weiterer Einflussfaktor ist hier sicherlich auch der stetige Blutverlust während des Versuchs aufgrund von Sickerblutungen im Hilusgewebe, sowie im Bereich der abführenden Gefäße. Die Blutbestandteile, wie Erythrozyten, der Hämoglobin- und Hämatokritwert bewegen sich bei allen von uns durchgeführten Versuchen in tolerierbaren Bereichen. Hier ist zu bedenken, dass es sich bei den als Normwert angegebenen Blutparametern um Material handelt, welches bei Tieren mit normalem Kreislauf gewonnen wird. Unser Material wird jedoch aufgrund der Transportfahrt vor der Erstmessung 2,5 Stunden kühl, versetzt mit Heparin, gelagert. Es kann

hierbei zu einer Beeinflussung von Blutparametern, wie zum Beispiel den Blutzellen selbst kommen (BLASZCZYK, 2000; NAGAPRASAD, 1998).

Die verwendeten pulsatilen Schlauchpumpen sind sehr zellschonend. Van der Hoeven et al. weisen in ihrer Studie dieses zellschonende Potential der Pulsypumpen im Vergleich mit anderen Pumpsystemen nach (VAN DER HOEVEN et al., 1998). Der Fluss wird über einen Flussmesser gemessen und dabei computertechnisch über eine Verbindung zu einem Laptop in Zwei-Minuten-Messintervallen erfasst, so dass es möglich ist, den Gesamtfluss abzulesen und bei Bedarf zu ändern. Es wird, angelehnt an die Arbeiten von Schön et al. und Cardoso et al., ein Fluss von 1ml Blut/g Lebergewebe/Minute angestrebt (CARDOSO et al., 1994; SCHÖN et al., 1993). Dieser Fluss wird während des Versuches beibehalten, so dass eine Korrektur des pH – wie Drapanas et al. in ihren Versuchen nachwies - nicht notwendig ist. Diese entnahmen Schweinen die Leber und bildeten zwei Gruppen. In der einen Gruppe wurde die V. portae und die A. hepatica kanüliert, in der zweiten Gruppe nur die V. portae. Die Organe wurden nach Entnahme mit acht bis zehn Litern 10°C kalter RL-Lösung gespült, bevor die Perfusion mit Eigenblut stattfand. Sie stellten hierbei fest, dass nur bei einem Fluss unter 0,5 ml Blut/g Leber/Minute der physiologische pH von der Leber nicht gehalten werden kann, ohne dass wiederholt Bikarbonat oder TRIS-Puffer zugesetzt werden muss (DRAPANAS et al., 1966).

Während des Versuchs wird kein Frischdialysat zugeführt. Dies würde einen zweiten Förderkreislauf mit Frischdialysatreservoir erfordern. Beide Kreisläufe müssten dann bezüglich der Flussgeschwindigkeit angepasst werden. Da eine Veränderung des Aufbaus nicht geplant ist, wird der bisherige Aufbau beibehalten. Dieser Umbau stellt jedoch perspektivisch eine Option dar.

### 5.1.3 Organentnahme

In den vorliegenden Versuchen dauert die warme Ischämie durchschnittlich 18 Minuten. Die kalte Ischämie (Transport vom Schlachthof zum Institut) ca. drei Stunden. In beiden Ischämiezeitpunkten liegen die hier vorgestellten Organe in einem guten Zeitrahmen. Ikeda et al. untersuchten Rattenlebern nach warmer, bzw. kalter Ischämie. Die kalte Ischämie dauerte bei Ikeda vier, bzw. sechs Stunden, die warme Ischämie 30 bis 60 Minuten. Empfängertiere erhielten diese vorbehandelten Organe anschließend als Transplantationsorgan. Eine Überlebenszeit von 100 Tagen wurde als erfolgreich angesehen. Die Tiere, welche die Organe nach 4 stündiger Kaltischämie, bzw. 30 minütiger Warmischämie erhalten hatten, überlebten

diesen Zeitraum problemlos (IKEDA et al., 1992). In diesem gerade genannten Zeitraum wurde das Organ nicht mehr von Blut durchströmt, wodurch die Zellen nur unzureichend mit Substrat versorgt wurden und sich Metabolite vermehrt ansammelten. Warmischämiezeiten von bis zu einer Stunde Dauer werden auch von Adkison et al. als tolerabel eingeschätzt (ADKISON et al., 1986). In den vorliegenden Versuchen kommt es trotz der kurzen Warm- und Kaltischämiezeit unmittelbar nach Beginn der künstlichen Perfusion zu erhöhten Serumentzymwerten von AST und ALT. Die Enzymausgangswerte in der 0. Minute sind bei der Kontroll- und den mit den Schlachtschweinen durchgeführten Diclofenac- und Polidocanolversuchen nahezu gleich. Soll die Organentnahme hier Einfluss genommen haben, so ist dieser in allen drei Gruppen gleich. Ischämie und Perfusion mit der Konservierungslösung führen zu Gewebeschäden, die in der Literatur entsprechend aufgezeigt wurden (BURRA et al., 2001; BELL et al., 1997; CLAVIEN et al., 1992; GERLACH et al., 1997; SCHÖN et al., 1993; WEVERS, 2001; YADAV et al., 1997). Inwieweit in unseren Versuchen solche z. B. histologisch nachweisbaren Schäden (SLC, Leukozytenadhäsion, Plättchenaktivierung) vorliegen wurde in der Arbeit von Wevers erörtert (WEVERS, 2001). Die ersten 30 Perfusionsminuten bringen einen Enzymanstieg von ca. 33% in allen Gruppen mit sich. Die Perfusion führt somit zu einer Gewebeschädigung, die sich in dem oben genannten Anstieg der Enzyme widerspiegelt. Solche Beobachtungen können als so genannter Reperfusionsschaden bezeichnet werden und wurde von Arbeitsgruppen wie Ikeda et al., Bell et al. und Wevers beobachtet (BELL et al., 1997; IKEDA et al., 1992, WEVERS, 2001). Großen Einfluss nimmt hier wohl auch der Stress, dem die Tiere aufgrund des Transportes zum Schlachthof ausgesetzt sind (MARTENS, 1997; WAGNER und POLLEY, 1997; WARRIS, 1998; WENDT et al., 2000). Bei in unserem Institut an zwei Versuchsschweinen (Minipigs) durchgeführten Versuchen mit Diclofenac ergeben sich, wie oben bereits erwähnt, deutlich geringere Enzymwerte, wie auch andere Messparameter, im Vergleich zu den hier gezeigten Ergebnissen bei den Schlachtschweinorganen zum Zeitpunkt Null-Minuten. Das Entnahmeprozedere inklusive Spülung wird unverändert beibehalten. Ausschließlich die Transportzeit des Blutes entfällt hier. Nach Informationen des Labors der Charité beeinflusst ein solcher Transport lediglich die zellulären Blutbestandteile und Elektrolyte, nicht jedoch die organspezifischen Enzyme.

Der in der Literatur genannte Normwert von 68 U/l für zum Beispiel AST (KRAFT und DÜRR, 1999) wird in der vorliegenden Arbeit bei der Kontrollgruppe um das Achtfache überstiegen. Eine Steigerung der Enzymwerte ist jedoch bei einer kalten Konservierung zu

erwarten. Die Zellen werden innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne einem radikalen Temperatursturz und einem extremen Substratmangel (fehlende Blutversorgung) ausgesetzt, wie bereits unter dem Literaturteil „Ischämie und Reperfusionsschäden“ dargestellt wird. Die dadurch herbeigeführte anaerobe Stoffwechsellage führt zu einer zellbelastenden, leichten Laktatazidose. Die Membranpermeabilität wird gestört, wodurch vermehrt Zellenzyme wie AST und ALT austreten. Die Leberzellen sind jedoch in der Lage, diesen Zustand auch nach längerer Zeit noch zu kompensieren. In der Gruppe der Perfusionen, die von uns an Minipigs durchgeführt wurden, ergeben sich für AST und ALT deutlich niedrigere Ausgangswerte. Die Galleproduktion (7,65 ml/h), der arterielle Fluss (1125 ml/Min.) und der Sauerstoffpartialdruck (469,10 mmHg) liegen in der hier vorliegenden Arbeit sowohl in der Gruppe der Minipigs, wie auch der Kontrollgruppe in vergleichbaren Bereichen. Auch andere Versuchsgruppen, wie Hellinger et al. oder Drapanas et al., erreichten ähnliche Versuchsergebnisse. Hellinger et al. untersuchten die Auswirkungen der Konservierungskonzepte der kalten Konservierung in HTK-Lösung und einer normothermen Reperfusion von jeweils drei Stunden, nach vorangegangener ein- oder drei-stündiger warmer Ischämie. Es ergab sich hier für AST  $2,6 \text{ U/g Leber} \pm 0,2 \text{ U/g Leber}$ , bzw.  $0,03 \text{ U/g Leber} \pm 0,01 \text{ U/g Leber}$  für ALT. Das kumulative Gallenvolumen lag insgesamt bei  $14,7 \text{ ml} \pm 2,1 \text{ ml}$ . Es wurde ein arterieller Fluss von  $1150 \text{ ml/Min.} \pm 180 \text{ ml/Min.}$  gemessen. Der Sauerstoffpartialdruck lag bei 550-650 mmHg (HELLINGER et al., 1997). Drapanas et al. untersuchten die Auswirkungen einer unterschiedlichen Kanülierung auf bestimmte Versuchsparameter bei der Reperfusion von Schweinelebern (DRAPANAS et al., 1966). So lag hier die Gallesekretion bei 4,8 ml/h, der Bilirubingehalt bei 0,98 mg/h, der Hämatokrit bei 29,7%, der Kaliumgehalt bei 3,9 mmol/l. Ferner nahm das Lebergewicht im Lauf der Versuche um ca. 19% zu.

Der Zeitpunkt 30. Minute (nach Start der Perfusion) kommt den „physiologischen“ Randbedingungen einer Blutabnahme näher, weil das Perfusionssystem den Körperkreislauf des lebenden Organismus simuliert.

#### 5.1.4 Ischämie und Reperfusion

Die Auswirkungen durch die vorangegangene Warm-, bzw. Kaltischämie am Schlachthof und die anschließende Reperfusion im Institut sollen nun diskutiert werden.

Das Blut zur Nullwertbestimmung (0. Minute) wird aus dem Blutreservoir vor Perfusionsbeginn entnommen. Eine Beeinflussung durch Reperfusion kann hier also noch

nicht stattgefunden haben und somit nicht festgestellt werden. Für diesen Zweck eignet sich der Vergleich zwischen den Entnahmezeitpunkten 0. Minute und 30. Minute nach Perfusionsbeginn. In diesem Zeitraum kommt es in den hier vorgestellten Versuchsgruppen zu einem Anstieg der Serumenzymwerte AST und ALT und des Sauerstoffpartialdruckes. Der pH und der Laktatgehalt fallen in diesem Zeitraum ab. Die Betrachtung der Elektrolyte ergibt einen Anstieg von Kalium und einen Abfall von Kalzium. Der in der Literatur nachgewiesene Zellschaden kann anhand der deutlich ansteigenden Enzymwerte auch in unseren Versuchen gesehen werden. Dies führt zu einer Veränderung der Elektrolytverhältnisse. Intrazellulär steigen Kalium und Kalzium an. Dies bedeutet einen Abfall dieser Elektrolyte im Serum und einen erneuten Anstieg innerhalb der ersten Perfusionsminuten, wenn eine Verbesserung dieser Imbalancen eintritt. Dies ist in unseren Versuchen gut zu sehen. Die durch die Ischämie bedingte Hypoxie des Gewebes bessert sich ebenfalls während der Perfusion. Clavien et al., Gerlach et al., Bell et al. und Ikeda et al. berichteten in ihren Studien von einer Schädigung des Zytoskeletts aufgrund von Ischämie und Reperfusion mit Beeinträchtigung der SLC und der Zellmembranen im Allgemeinen (BELL et al., 1997; CLAVIEN et al., 1992; GERLACH et al., 1997; IKEDA et al., 1992). Auch die Elektrolytimbalanz und die Veränderung des Zellmilieus wurden hier erwähnt.

Oben genannte Parameter können auch durch die gewählte Konservierungslösung beeinflusst worden sein. Indiz dafür sind auch hier wieder die deutlich erhöhten Enzymwerte. Die Euro-Collins Lösung ist jedoch sehr kostengünstig und innerhalb geringer Konservierungszeiten – unter sechs Stunden – der UW-Lösung nahezu gleichwertig, wie Steffen et al. bei ihren Versuchen feststellten. Nach einer Stunde Konservierungszeit wurde der AST-Wert in der UW-Gruppe von der EU-Gruppe um das Fünffache überstiegen (STEFFEN et al., 1990). Die hohen Ausgangswerte für AST könnten also auch hier ihren Ursprung haben.

Vor Perfusionsbeginn werden die Organe mit 37°C warmer Ringer-Laktat-Lösung gespült, um die Konservierungslösung aus dem Organ zu schwemmen. Gleichzeitig werden die Zellen so wieder auf ein physiologisches Temperaturniveau gebracht, und der Zellstoffwechsel nimmt seine Tätigkeit wieder auf. Nach 30 Minuten Spülung im Versuch liegen die Werte für pH, Laktat, Kalium, Kalzium und den Sauerstoffpartialdruck wieder im Normbereich. Hier scheint die normotherme (37°C) Spülung mit RL-Lösung vor Beginn der Eigenblutperfusion eine deutliche Minimierung der Organschäden zu bewirken. Diese positive Eigenschaft der normothermen RL-Spülung wurde auch von Rentsch et al. beobachtet. Diese Gruppe verglich die Auswirkungen der kalten (4°C) und warmen (37°C) RL-Spülung auf Rattenlebern kurz

vor der Reperfusion. Es zeigte sich bei der normothermen Spülung eine deutlich geringere Adhärenz weißer Blutkörperchen in den Sinusoiden, die Kupfferzellaktivität war deutlich geringer und die Galleproduktion in dieser Gruppe deutlich besser als in der kalt gespülten Gruppe (RENTSCH et al., 1996).

### 5.1.5 Organlagerung

Die Lagerung des Organs im Versuchsaufbau bietet den Vorteil der einfachen Manipulation, wirft jedoch auch diskussionswürdige Probleme auf. Aufgrund der konstruktiven Gegebenheiten des vorgestellten Aufbaus kommt es bei der Lagerung des Organs zunächst zu Kompressionen im abführenden Gefäßbereich. Dies ist dadurch bedingt, dass das Organ mit dem Eigengewicht auf dem Austrittsbereich der abführenden Gefäße liegt. Dieser Stau zeigt sich in einem steigenden venösen Druck, welcher den Normwert um das Doppelte übersteigt. Daraufhin wurde der Kanülierungsschlauch perforiert und tief in die V. cava caud. eingeführt. Dies verhindert eine Kompression der Vene durch das Eigengewicht des Organs weitgehend und führt zu einer deutlichen Reduktion des venösen Druckes. Zusätzliche Entlastung für die Gefäße könnten „stents“ bieten, wie sie Neuhaus und Blumhardt verwendeten (NEUHAUS und BLUMHARDT, 1993). „Stents“ sind spiralig gewundene Metalldrahröhrchen, welche das Gefäßlumen auch bei Gegendruck von außen offen halten. Diese sind von kurzer Länge und stellen daher für das Gewebe einen nur geringen Reiz dar. Auch die Lagerung könnte verbessert werden. In einer wassergefluteten Kammer, wie Neuhaus und Blumhardt sie entwickelten, befindet sich das Organ in einer wassergefluteten Niederdruckkammer (NEUHAUS und BLUMHARDT, 1993). Diese neutralisierte die Kompressionskraft des Lebergewichtes auf die Lebergefäße. Vorteilhaft ist bei diesem Aufbau auch die auf 37°C angewärmte Umgebung des Organs. In dem von uns verwendeten Aufbau liegt das Organ einer 37°C warmen Unterlage auf. Um ein Austrocknen zu vermeiden ist es dabei notwendig, das Organ während des Versuches mit feucht-warmen Gazestreifen abzudecken. Besonders die Randbezirke erweisen sich dafür bei Vorversuchen als anfällig.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 Polidocanol

Polidocanol wirkt sich besonders auf die Leberenzyme, die Galleproduktion, die Blutzellanteile und das Lebergewicht aus.

Die schädigende Wirkung von Polidocanol ist in den hier vorgestellten Versuchen anhand der klinisch-chemischen und hämatologischen Parameter gut sichtbar. So steigen die Enzyme **AST und ALT** nach Gabe von Polidocanol im Zeitraum 30. bis 60. Minute deutlich an (AST

von 847 U/l auf 1519 U/l und ALT von 65 U/l auf 122 U/l). Dieser Anstieg ist für ALT in der 60. Minute auch statistisch mit einem  $p_{60} = 0,04$  signifikant. Der ALT-Anstieg liegt somit in der Polidocanolgruppe im gleichen Zeitraum nahezu doppelt so hoch wie in der Kontrollgruppe. Ursache dafür ist die Schädigung der Integrität der Plasmamembran und damit das Versagen als permeable Barriere. Dies führt zu einer sehr stark herabgesetzten Funktions- und Lebensfähigkeit der Zelle. Die Enzyme AST und ALT sind ein empfindlicher Parameter zur Beurteilung der Integrität der Plasmamembran. Eine massive Liberation dieser Enzyme kennzeichnet ein Versagen der Barrierenfunktion (DAVILA et al., 1992). Ein Enzymanstieg dieses Ausmaßes wurde auch von Kroker et al. bei der Perfusion isolierter Rattenlebern nach Gabe von Polidocanol festgestellt (KROKER et al., 1990). Auch Cyrus wies in ihrer Arbeit bei der Perfusion von isolierten Rattenlebern diese extreme Wirkung von Polidocanol auf die Enzyme AST und ALT nach (CYRUS, 1995).

Besonders auffällig ist in unseren Versuchen die rapide **Abnahme des Galleflusses** nach Zugabe von Polidocanol. Dieser cholestatische Effekt ist besonders innerhalb der ersten 30 Minuten klar zu erkennen. Betrachtet man den Gesamtverlauf, so steigt der Gallefluss in der Kontrollgruppe kontinuierlich um bis zu 21%. Diese Entwicklung spiegelt eine produktive Leberfunktion wider. In der Polidocanolgruppe hingegen kommt es zu einem rapiden Abfall des Galleflusses um 89% (von  $5,40 \text{ ml/h} \pm 0,06 \text{ ml/h}$  in der 30. Minute auf einen Wert von  $0,60 \text{ ml/h} \pm 0,06 \text{ ml/h}$  in der 60. Minute). Auch Cyrus stellte in ihrer Arbeit unmittelbar nach Polidocanolgabe einen starken Rückgang der Galleproduktion fest (CYRUS, 1995). Die Galleproduktion kann, nach Fischer et al., gut als Vitalitätsparameter herangezogen werden (FISCHER und WUSTROW, 1977). Auch hier ist die Ursache wahrscheinlich eine Störung in der Zellfunktion nach dem Kontakt mit dem Detergenz (CYRUS, 1995). Hierbei werden sowohl die Gallensäuren vermindert sezerniert, als auch geringer konzentriert (TEO und VORE, 1992). Der Rückgang der Galleproduktion kann auf Störungen des gallensäureabhängigen- und unabhängigen Gallenflusses zurückzuführen sein. Die oben genannte Detergenzwirkung zerstört die Leberzellstruktur und macht damit eine einwandfreie Produktion von Galle unmöglich. Die in der Membran ebenfalls lokalisierte  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, welche am Gallefluss beteiligt ist, könnte Schaden genommen und damit zum Sistieren des Galleflusses beigetragen haben.

Erythrozyten, Hämatokrit- und Hämoglobingehalt erfahren durch Polidocanolgabe einen deutlichen Abfall. Die **Erythrozyten** werden sowohl durch das Entnahmeprozedere, als auch

aufgrund des Polidocanoleinflusses - membranschädigende Eigenschaften von Polidocanol - in Mitleidenschaft gezogen. Die Verminderung der Erythrozytenzahl ist statistisch signifikant auf die Wirkung von Polidocanol zurückzuführen. Die Schädigung der Erythrozyten wurde auch von Stroncek et al. beobachtet. Diese Gruppe untersuchte die Auswirkungen verschiedener Sklerosierungsmittel, darunter auch Polidocanol, auf Blutzellanteile und die Blutplättchen. Diese Substanzen bewirkten eine sofortige Aggregation von Granulozyten und eine massive LDH-Liberation, sowie eine deutliche Aktivierung der Blutplättchen. Bei Erythrozyten kommt es zu einer massiven Hämolyse. Endothelzellen in Kultur zeigten nach Kontrakt mit diesen Substanzen zytotoxische Zerstörungsanzeichen (STRONCEK et al., 1985).

Die Zerstörung von Erythrozyten führt natürlich auch zu einer Veränderung des **Hämatokritwertes**. Zusätzlich sind hier jedoch auch noch viele andere Einflüsse zu nennen, wie Stauungen im Organ, Wirbelbildungen in den Polyethylenschläuchen und in den Luftfallen, sowie die Entnahme der zahlreichen Blutproben während des Versuchs. Der Abfall des Hämatokrits liegt in der Polidocanolgruppe im Zeitraum 30. bis 60. Minute bei insgesamt 37%, in der Kontrollgruppe im selben Zeitraum jedoch nur bei 13%. Ein statistisch signifikanter Einfluss durch Polidocanol auf den Hämatokrit ist mit einem  $p_{90} = 0,01$  nachweisbar.

Auch der **Hämoglobinwert** fällt deutlich ab. Prozentual auf die gesamte Perfusionsdauer gesehen fällt der Hämoglobinwert in der Kontrollgruppe um 33%, in der Polidocanolgruppe jedoch um 45%. Obwohl eine signifikante Auswirkung von Polidocanol auf den Hämoglobinwert nicht nachgewiesen werden kann, bestätigt dies auch wieder die schädigende Wirkung von Polidocanol auf die Erythrozyten (SOEHRING und FRAHM, 1952).

Deutlich wird die Schädigung der Membranen durch die Ausbildung eines interstitiellen Ödems und eine passive Stauung anhand der **Gewichtszunahme** von bis zu 24% nach Gabe von Polidocanol (von 2434 g auf 3440 g) (CYRUS, 1995; WEVERS, 2001). Der Einfluss von Polidocanol auf das Organgewicht erweist sich dabei als statistisch signifikant mit einem  $p = 0,001$ . Verglichen werden hier die Gewichtsunterschiede zwischen Kontroll- und Polidocanolgruppe vor Versuchsbeginn und nach Versuchsende. Bei der Kontrollgruppe kommt es zwar auch zu einer Zunahme des Organgewichtes, hier aber nur um 8%. Bei der Kontrollgruppe ist diese Zunahme wohl auf die unphysiologischen Bedingungen der

Organlagerung zurückzuführen, wie sie bei der Perfusion mit dem verwendeten Aufbau nicht vermeidbar sind.

Die Hepatozyten schwellen an und engen dadurch die Gefäßlumina ein. Gleichzeitig kommt es durch die vermehrte Gefäßfüllung zu einer Vergrößerung der endothelialen Fenestrationen. So kann vermehrt Blutflüssigkeit in die Zellen eindringen, bis es schließlich zur Zerruptur kommt. Te Koppele et al. wiesen dies bei der Perfusion von Rattenlebern mit kolloidaler Kohlensäure nach (TE KOPPELE et al., 1991).

Die Detergenzwirkung von Polidocanol führt auch zu einem deutlichen Anstieg des **Gesamtproteins**. Die Zellen gehen aufgrund der ungünstigen biochemischen Stoffwechselsituation zu Grunde und es kommt zu einer vermehrten Abgabe von Protein ins Blut. Polidocanol löst aufgrund seiner Detergenzwirkung Lipide aus der Phospholipiddoppelschicht der Membranen, wie Nishihata et al. bei Untersuchungen zu Adjuvantzusätzen nachwies (NISHIHATA et al., 1985).

Der **arterielle Druck** fällt unter Polidocanoleinfluss von 67 mmHg auf 57 mmHg deutlich ab. Der Abfall des arteriellen Druckes ist in der Kontrollgruppe nur halb so gross. Der Abfall des arteriellen Druckes ist auf eine polidocanolbedingte Schädigung des Endothels zurückzuführen, welcher Interferenzen mit Lipiden in der Zellmembran zugrunde liegen. Dies wies Goldmann bei einem Vergleich verschiedener sklerosierender Agenzien nach (GOLDMAN, 1991).

Desweiteren kommt es auch zu deutlichen Veränderungen des Elektrolytgehaltes unter Polidocanolgabe. So steigen die Werte für **Kalium** an. In dieser Hinsicht wiesen Strubelt et al. nach, dass Kalium als Parameter zur Beurteilung der Zellvitalität verwendet werden kann (STRUBELT et al., 1986). So kann die Polidocanol-induzierte Schädigung der Zellmembranen ein Funktionieren der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase unmöglich machen und eine Elektrolytimbalance bewirken (CLAVIEN et al., 1992; HASSELGREN, 1987). Der hohe Null-Minuten-Wert für Kalium in der Kontrollgruppe ( $5,30 \text{ mmol/l} \pm 1,50 \text{ mmol/l}$ ) zeigt, dass die Blutzellen durch das Entnahmeprozedere belastet werden. Darüber hinaus kann die Schädigung der Blut- und Parenchymzellen auch durch das Perfusionsprozedere erklärt werden (Varianz der Perfusionsschläuche, steigender Perfusionsdruck usw.). Ursächlich kann hier ein Sauerstoffmangel angenommen werden, da das gewonnene Blut aufgrund des

Transportes vom Schlachthof zum Labor erst nach ca. drei Stunden wieder mit Sauerstoff angereichert werden konnte.

In Vorversuchen wird ebenfalls eine hohe Empfindlichkeit des Schweineblutes gegenüber Polidocanol festgestellt. Dabei werden Versuche mit einer Polidocanolkonzentration von 20 mg einer 0,5%igen Lösung gemacht, wie sie auch Cyrus anwandte (CYRUS, 1995), welche eine massive Erythrozytenzerstörung zur Folge hatten. Eine Bestimmung vieler Parameter im Labor wird so aufgrund von Hämolyse unmöglich gemacht. Gleichzeitig zeigen sich bei der hohen Polidocanolkonzentration deutliche Zeichen für ein Organversagen bei der Bestimmung von Blutparametern im Blutgasanalysegerät. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Schröder und Olesch berichtet, die deutliche tierartliche Unterschiede bei der Polidocanolakzeptanz feststellen konnten (SCHRÖDER und OLESCH, 1990). Der Polidocanolgehalt wurde daraufhin auf 5 mg einer 0,5%igen Lösung verringert.

### 5.2.2 Diclofenac

Besonders auffällig ist der Diclofenaceinfluss im Bereich von Laktat, pH, Bikarbonat und Base Excess.

Der statistisch signifikante **Laktatanstieg** von 5,01 mmol/l in der 60. Minute auf 9,76 mmol/l in der 90. Minute in der Diclofenacgruppe ist besonders auffällig. In der Kontrollgruppe kommt es nicht zu einer Änderung des Laktatgehaltes. Zu einem Anstieg des Laktats kommt es durch Hemmung der Glukoneogenese (PETRESCU und TARBA, 1996). Zusätzlich kommt es zu einer Steigerung der Glykogenolyse und Glykolyse. Die oxidative Phosphorylierung wird entkoppelt (MASUBUCHI et al., 1999; PETRESCU und TARBA, 1996; WHITEHOUSE, 1964). Allein die Hemmung der Glukoneogenese führt zu einem vermehrten Anfall von Laktat im Zellinneren (KARLSON und KOOLMAN, 1994). Diese Beobachtung machten auch Petrescu und Tarba bei isoliert perfundierten Rattenlebern, sowie Whitehouse in-vitro, mit isolierten Rattenmitochondrien (PETRESCU und TARBA, 1996; WHITEHOUSE, 1964).

Der **pH** und **Bikarbonat** sinken als Folge der Laktatazidose ab. Nach Gabe von Diclofenac sinkt der pH um 3%, in der Kontrollgruppe nur um 1%. Ursache für das Absinken des Bikarbonats von 14,44 mmol/l auf 15,74 mmol/l ist auch die metabolische Azidose. Nach Gabe von Diclofenac kommt es hier zu einem statistisch signifikanten Abfall von 21% ( $p_{90} = 0,04$ ,  $p_{120} = 0,04$ ). Im Gegensatz zur Kontrolle mit einem Abfall des **Base Excess** um 24%,

kommt es nach Gabe von Diclofenac zu einer Reduktion von 70%. Dieser statistisch signifikante ( $p_{90} = 0,002$ ,  $p_{120} = 0,004$ ) Abfall kann auch hier mit der azidotischen Stoffwechsellage begründet werden.

Betrachtet man die beiden gemessenen **Enzyme** unter Diclofenaceinfluss, so fällt auf, dass diese sich verglichen mit der Kontrollgruppe kaum verändern. Dieser Anstieg kann daher auf eine Diclofenac-unabhängige lange Kälteischämie zurückgeführt werden. Zwei Versuche mit Lebern von Laborschweinen (Minipigs) mit deutlich reduzierter Kälteischämiezeit (nur 20-30 Minuten Spülzeit, Transport vom Schlachthof zum Labor entfiel) und Diclofenacgabe weisen deutlich geringere Werte für AST und ALT auf. Ein milder Transaminasenanstieg wurde auch von Bhogaraju beim Menschen nach chronischer Einnahme von Diclofenac beobachtet (BHOGARAJU et al., 1999). Inwieweit in den vorliegenden Studien der Anstieg der Enzyme auf die Diclofenacwirkung zurückgeführt werden kann, ist aufgrund der kurzen Versuchsdauer (drei Stunden) fraglich, da keine „chronische“ Einnahmesituation nachgestellt wird.

Unter Diclofenaceinfluss kommt es zu einem Anstieg des **Gesamtproteins** und **Kreatinins**. Die Ursache für den Anstieg des Gesamtproteins unter Diclofenacgabe könnte in der Laktatazidose-bedingten Schädigung der Zellen liegen. Das zur Gruppe der NSAID gehörende Diclofenac ist als monocarboxyle Säure mit ein bis zwei aromatischen Ringen relativ hydrophob. Somit kann die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung zu einer freieren Flotation von Wasserstoffionen führen. Zusätzlich wird dieser Effekt noch durch die weiter oben genannten toxischen Metabolite forciert. Im Vergleich mit den Werten der Kontrollgruppe zeigt sich ein wesentlich geringerer Anstieg des Proteingehaltes. Verglichen mit einem in-vivo Normwert (JAKSCH und GLAWISCHNIG, 1999) von 5-8 g/dl liegen alle Diclofenacwerte darunter. Diese Hypoproteinämie im Serum ist grundsätzlich als Hinweis auf eine Hepatopathie zu werten (JAKSCH und GLAWISCHNIG, 1999). Dabei bedingt die Leberzellschädigung eine verminderte Syntheserate von Serumproteinen. Der statistisch signifikante Anstieg von **Kreatinin** ist auf die allgemeine Azidose, zurückzuführen.

Die Veränderung der Stoffwechsellage kann in den Diclofenacversuchen auch gut anhand der Veränderung des **Glukose**gehaltes im arteriellen Blut und dem Gehalt von **Kalzium** nachvollzogen werden. Dabei kommt es zwischen der 60. und der 90. Minute zu einem tendenziellen Anstieg des Glukosegehaltes von 14%, während die Zunahme in der Kontrollgruppe nur bei 9% liegt.

Eine Hemmung der ATPase durch einen verminderten Wasserstoffionengradienten kann zu einer reduzierten Produktion von ATP führen und somit zu einem Energiedefizit. Die Zelle muss nun nach Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung unter anaeroben Bedingungen Energie aus der Glykolyse ziehen (KOOLMANN und RÖHM, 1998). Die Glukoneogenese wird jedoch durch Diclofenac gehemmt (PETRESCU und TARBA, 1996). Glukose kann also nur noch über die Glykogenolyse und Glykolyse im Zytoplasma gewonnen werden. Dies führt zu einem vermehrten Anfall von Laktat und Pyruvat – siehe entsprechende Abschnitte der Diskussion (KARLSON und KOOLMAN, 1994). Der veränderte Energiehaushalt hat ein Absinken des **Sauerstoffpartialdruckes** im Blut zur Folge - wie in den Diclofenacversuchen gut zu sehen - da von den Zellen vermehrt Sauerstoff benötigt wird. So sinkt nach Diclofenacgabe in der 60. Minute der  $pO_2$  also bis zur 90. Minute um 32%, während der  $pO_2$  in der Kontrollgruppe im gleichen Zeitraum um 9% steigt. Als signifikant erweist sich der Einfluss von Diclofenac auf den Sauerstoffgehalt jedoch nicht.

### 5.2.3 Dialysat

Deutlich werden die unterschiedlichen Wirkungen der untersuchten Substanzen auch in einigen **Dialysat**parametern. So vermindern sich **Glukose-** und **Harnstoff**werte unter Polidocanoleinfluss im Rahmen einer langsam fortschreitenden Leberinsuffizienz: Unter Polidocanoleinfluss wird in dieser Hinsicht deutlich weniger Glukose verstoffwechselt und wesentlich weniger Harnstoff produziert als in der Kontroll- und der Diclofenacgruppe.

Ebenfalls gibt es in der Diclofenacgruppe deutliche Veränderungen von **pH** und **Bikarbonat**werten.

### 5.2.4 Arzneimittelprüfung

Die Arzneimittelprüfung dient der Analyse von Unschädlichkeit und Wirksamkeit eines Arzneimittels. Es sollen diesbezüglich die Pharmakodynamik und –kinetik, sowie die Ausscheidung der Substanz und die damit verbundenen Risiken, wie Toxizität, Teratogenität und Onkogenität abgeklärt werden.

Der hier vorgestellte Aufbau ermöglicht vielfältige Untersuchungsvarianten. Die Reaktion des Organs auf das Medikament, der Organstoffwechsel oder die Reaktion einzelner Organkompartimente, bzw. die Verstoffwechslung in bestimmten Organarealen können untersucht werden. Diese Untersuchungen können darüber hinaus durch in-vitro Tests an Zellkulturen erweitert und vertieft werden. Die hier vorgestellten Ergebnisse unterstreichen

die Nutzungsmöglichkeit isoliert perfundierter Organe als Ersatzmethode zum Tierversuch. Die durchgeführten Versuche zeigen deutlich, dass die unterschiedlichen Auswirkungen vermehrt toxisch wirkender und vermehrt stoffwechselbeeinflussender Substanzen gut voneinander abgrenzbar sind. Die gemessenen Parameter liegen im Rahmen der von der Literatur vorgegebenen Richtwerte. So erreichen wir in unseren Kontrollversuchen eine Galleproduktion von 7,65 ml/h, einen Kaliumgehalt von 5,0 mmol/l, einen Bilirubingehalt von 0,28 mg/h und einen Hämatokritwert von 28%. Das Organgewicht nimmt in den Kontrollversuchen um 8% zu. Diese Ergebnisse liegen im Bereich früherer Studien:

So untersuchten Drapanas et al. und Abouna et al. die Auswirkungen von Konservierung, Spülung und Perfusion an isolierten Schweinelebern. Dabei erreichte Abouna eine Galleproduktion von bis zu 18,3 ml/h und wies einen Kaliumgehalt von ca. 5,6 mmol/l nach (ABOUNA, 1968). Demgegenüber erreichten Drapanas et al. eine Galleproduktion von 4,8 ml/h, einen Kaliumgehalt von ca. 3,9 mmol/l, einen Bilirubingehalt von 0,98 mg/h und einen Hämatokrit von 29,7%. Die Gewichtszunahme des Organs lag hier bei ca. 19% (DRAPANAS et al., 1966).

Bei der Betrachtung von Polidocanol als Versuchssubstanz steht die toxische Wirkung im Vordergrund. Die schnell abnehmende Vitalität der Zellen ist an einer deutlichen Wertminderung von AST und ALT sichtbar, wie sie auch von Cyrus und Kroker et al. gezeigt wurde (CYRUS, 1995; KROKER et al., 1990). Unter Diclofenaceinfluss kommt es zu einer Steigerung der Enzyme, jedoch in deutlich geringerem Umfang. Der massive Einbruch in der Galleproduktion (CYRUS, 1995) ist unter Polidocanol sehr gut nachweisbar. Diclofenac dagegen weist eine vergleichbare Produktivität wie die Kontrollgruppe auf. Ebenfalls deutlicher fällt unter Polidocanoleinfluss der Schaden an den Erythrozyten, sowie die Steigerung der Hämolyse, welche auch von Thies et al. beschrieben wurde, aus (THIES et al., 1982).

Diclofenac dagegen zeigt seine Hauptwirkung in der Beeinflussung des Lebermetabolismus: Der hier beschriebene Anstieg von Laktat, verbunden mit einem Abfall von Bikarbonat ist in Übereinstimmung mit der gängigen Lehrmeinung (KARLSON und KOOLMAN, 1994, SILBERNAGEL und DESPOPULOS, 2001).

Eine mögliche hepatotoxische Wirkung kann auch bei Diclofenacgabe angenommen werden. Zu diesem Schluss kamen Bhogaraju et al. und Watkins. Sie wiesen in der Leber durch das

Cytochrom P-450-System gebildete Metaboliten mit einer lebertoxischen Tendenz nach (BHOGARAJU et al., 1999; WATKINS, 1992). Dabei sind die Hauptmetaboliten 4'-OHDic, 5-OHDic und 3'-OHDic, welche zu einer Hepatitis beim Menschen führen können. Histologisch stellen sich die Schäden als akute, zonale bis punktuelle Nekrosen, bzw. Granulome dar (BHOGARAJU et al., 1999; SCHMITZ et al., 1992). Weiter untersucht wurden diese Metaboliten von Bort et al. mit Hilfe von Zelllinien, wobei sowohl menschliche Hepatozyten aus Biopatmaterial, als auch humane genetisch veränderte Leberepithelzellen, die nun single-human CYP produzieren konnten, verwendet wurden. Diese Versuche zeigten, dass die oben erwähnten toxischen Metabolite an Leberproteine binden können. Bort ging in seinen Versuchen davon aus, dass die Toxizität hauptsächlich durch eine allergische Reaktion des Körpers getragen wird, die zu einem niedrigeren Hydroxylierungsstoffwechsel führt (BORT et al., 1999). Weitere Untersuchungen über die Toxizität von Diclofenac wurden unter anderem von Ramakrishna und Viswanath, sowie Iverson gemacht (IVERSON et al., 1990; RAMAKRISHNA und VISWANATH, 1994). Beide humanmedizinische Fallstudien zeigten eine indirekt toxische Wirkung Diclofenacs.

Insgesamt zeigen die mit dem hier etablierten Aufbau erzielten Ergebnisse, dass eine Nutzung für die Arzneimittelprüfung möglich ist und Vorteile insbesondere gegenüber Zellkulturen gegeben sind. So zeigten Nussler et al. bereits früher die Mängel von Zellkulturen auf. Dabei neigten Hepatozyten in Kulturform schnell zur Degeneration und verloren damit ihre Zellfunktion (NUSSLER et al., 1991). Zellsysteme in Form von Kulturen können jedoch wichtige Zusatzinformationen liefern, bzw. zur Aufklärung gezielter Fragestellungen herangezogen werden. Es können mit Hilfe von Zellkulturen allerdings keine Untersuchungen zu Phase II Metaboliten durchgeführt werden. Xenobiotika werden in zwei Phasen (I und II) metabolisiert. In der Phase I entstehen durch Oxidation des Xenobiotikums Metaboliten; diese können weiterhin aktiv oder ohne medikamentelle Funktion sein. Diesen Schritt katalysieren die Cytochrome P450 (MOREL et al., 1997).

Mit dem vorliegenden Aufbau können alle organspezifischen Phasen der Verstoffwechslung eines Xenobiotikums untersucht werden. Zudem können mehrere Substanzen in das System gegeben und die Wechselwirkungen der Substanzen untereinander studiert werden. Die Stoffwechselleistung des Organs kann letztlich mit entsprechenden Substanzen überprüft, gesteigert oder gehemmt und so ihre Auswirkung auf den Abbau einer Substanz untersucht werden.

In dem vorgestellten Aufbau kommt es unter Diclofenaceinfluss zu einem deutlichen Anstieg von **Albumin** im Versuchsverlauf. Auch in der Kontrollgruppe ist eine gute Albuminsekretion messbar. Nussler et al. stellten fest, dass die Sekretion von Albumin ein Zeichen für einen stoffwechselaktiven Zustand des Hepatozyten ist (NUSSLER et al., 2001). In Zellkulturen nimmt dieser Parameter wie oben angesprochen deutlich ab. Ursache ist hier wohl die artifizielle Anpassung der Zellen an das Kultivierungsprozedere (NUSSLER et al., 1991). Auch wenn inzwischen so genannte Sandwichkulturen die Überlebenszeit von Zellkulturen deutlich verbessert haben, kann eine optimale, dreidimensionale Anordnung von Hepatozyten nur unzureichend in-vitro nachgeahmt werden. Die Entwicklung von Bioreaktoren, in denen die Zellen dreidimensional angeordnet werden, konnte diese Nachteile ebenfalls nicht völlig beseitigen (DÖHMER, 2000). Der für die vorliegende Arbeit verwendete Aufbau belässt die Hepatozyten in ihrem normalen organarchitektonischen Umfeld. Ein deutlicher Nachteil von Zellkulturen im Gegensatz zur Organperfusion ist der Mangel an frischen Nährstoffen sowie der Abtransport von Stoffwechselprodukten (GONZALES, 1997; MOREL et al., 1997; NUSSLER et al., 2001). Hohlfaserbioreaktoren haben diesen Mangel in weiten Grenzen ausräumen können (WOLF, 1975). Der für diese Arbeit verwendete Aufbau macht ebenfalls eine kontinuierliche Versorgung mit Nährstoffen möglich und garantiert so eine optimale Zellversorgung. Dabei kann die nutritive Versorgung dem jeweiligen Stoffwechsel der Zellen angepasst und so eine maximale Syntheserate der Zellen über einen langen Zeitraum gewährleistet werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass der Aufbau zur Testung von Medikamenten genutzt werden kann. Die Auswirkungen zweier sehr unterschiedlich agierender Substanzen sind gut voneinander abgrenzbar. Es können Untersuchungen im Bereich Phase I und II der Xenobiotikaverstoffwechslung gemacht werden. Obwohl die Organe von Schlachtschweinen sehr unkontrollierbare Grundvoraussetzungen bieten, werden hier bei den verschiedenen Versuchsgruppen deutliche Unterschiede in der Veränderung der betrachteten Parameter aufgezeigt. Diese Einflüsse sind in den Versuchen jeweils reproduzierbar. Ein weiterer wesentlicher Vorteil des Modells liegt in der praxisnahen Alternative zum Tierversuch, wobei zusätzlich deutliche Vorteile gegenüber der Zellkulturtechnik bestehen.