

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Untersuchungen in Zusammenarbeit mit P. Wevers (WEVERS, 2001) war der Aufbau einer Leberperfusionsapparatur und die Fragestellung nach einem Einsatz des Modells in der Testung neuer Substanzen bezüglich deren hepatischer Wirkungen. Als Prüfsubstanzen dienten zwei verschiedene Substanzen: Es wurde als Xenobiotikum mit hauptsächlich toxischer Wirkung Polidocanol und als Xenobiotikum mit hauptsächlich leberstoffwechselverändernder Wirkung Diclofenac getestet.

Die Lebern wurden von kommerziellen Schlachtschweinen gewonnen. Die Entnahme erfolgte auf dem Schlachthof und dauerte durchschnittlich $18,08 \pm 7,35$ Minuten (auch als Warmischämie bezeichnet). Anschließend wurden die Organe direkt nach der Entnahme über einen Zeitraum von ca. 41 ± 9 Minuten mit 5 Litern $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ kalter Euro-Collins-Lösung kälteperfundiert. Anschließend erfolgte der Transport in das Labor (Dauer ca. $170,23 \pm 15,40$ Minuten, auch als Kälteischämie bezeichnet) die autologe Reperfusion. Es wurden drei Gruppen gebildet. Zur Gewinnung von Standardwerten wurden $n=6$ Kontrollen ohne Medikamente über 180 Minuten perfundiert, danach folgten $n=6$ Versuche mit Polidocanol mit einer Versuchsdauer von 90 Minuten und $n=6$ Versuche mit Diclofenac und einer Versuchsdauer von 180 Minuten, sowie zwei weitere Versuche mit Versuchsschweinen im OP des Institutes. Die Perfusionsdauer wurde unterschiedlich festgelegt, da Polidocanol histologische Schäden verursachte, die eine längere Perfusion nicht sinnvoll machten (WEVERS, 2001).

Polidocanol wurde in einer Konzentration von $8,3 \times 10^{-6}$ mol appliziert. Besondere Aufmerksamkeit wurde den Veränderungen der Blutparameter bezüglich des Zeitraums 30 bis 60 Minuten nach Substanzgabe gewidmet:

Es kam zu einem massiven Anstieg der Enzyme AST (61%) und ALT (50%) während des oben genannten Zeitraums. Ursache hierfür ist die Schädigung der Integrität der Plasmamembran und damit ihr Versagen als permeable Barriere. Somit kam es auch zu einem deutlichen Abfall von Hämatokrit (36%) und Erythrozytenzahl (22%), welche ebenfalls auf die genannten Membranveränderungen zurückgeführt werden können.

Besonders deutlich war auch eine Cholestase 30 Minuten nach Polidocanolgabe, welche sich in einem Abfall des Galleflusses um 89% zeigte. Auch hier kann der Verlust der Permeabilitätseigenschaften der Zellmembran als Erklärung herangezogen werden, die auch eine Schädigung der Na^+/K^+ -ATPase mit sich bringt. Ein Anstieg von Albumin (21%) und Proteinen (25%) muss hier ebenfalls erwähnt und auf gleiche Ursachen zurückgeführt werden.

Die deutliche Zunahme des Lebergewichtes (24%) wird durch ein interstitielles Ödem und eine passive Stauung verursacht. Dadurch kam es auch zu einem Anstieg des arteriellen Druckes um 16%.

Diclofenac wurde mit einer Konzentration von $2,36 \times 10^{-4}$ mol in der 60. Minute appliziert und führte im Versuchsverlauf zu folgenden Veränderungen bei den ausgewählten Laborparametern:

Die durch Diclofenac verursachten Hauptveränderungen beziehen sich auf eine Veränderung des Säure-Basen-Gleichgewichtes. Es kam zu einem deutlichen Anstieg von Laktat (41%) aufgrund der Hemmung der Glukoneogenese und einer Steigerung von Glykogenolyse und Glykolyse. Bedingt durch die Laktatazidose kam es zu einem Abfall des pH (5%), des Bikarbonats (33%) und Base Excess (70%).

Die Veränderungen im Stoffwechsel zeigten sich auch in einem Absinken des Sauerstoffpartialdruckes (32%) und einem Anstieg des Glukosegehaltes im arteriellen Blut (14%) aufgrund gesteigerter Glykolyse.

Zusammenfassend führte Polidocanol zu einer verminderten Vitalität und Funktion des Organs. So kam es unter Polidocanol-Gabe zu einem deutlichen Anstieg von AST und ALT, sowie zu einem deutlichen Abfall des Erythrozytengehalts, Hämatokrits und der Galleproduktion.

Diclofenac dagegen beeinflusste wesentliche Stoffwechselwege der Zelle, wie zum Beispiel die Atmungskette oder die oxidative Phosphorylierung. Es kam hier im wesentlichen zu Veränderungen im Säure-Basen-Haushalt: Laktat stieg stark an, pH, Bikarbonatgehalt und der Base Excess fielen deutlich ab. Zusätzlich nahm der Gesamtproteingehalt deutlich zu.

Die Vergleichbarkeit mit früher publizierten Studien wurde in der Diskussion aufgezeigt. Zusammenfassend ist eine Prüfung von Arzneimitteln mit dem vorliegenden Aufbau sehr gut möglich. Letztlich bietet das Modell aufgrund seines möglichen Einsatzes als Alternative zum Tierversuch eine bedeutende zukünftige Option in der Kurzzeitarzneimittelprüfung. Es kann damit zu einer wesentlichen Reduktion von Tierversuchen im Sinne des „Replacement“ des 3R Konzepts nach Russel und Burch beitragen (RUSSEL und BURCH, 1959).

7. Summary

The isolated autologue hemoperfused pig liver: effects of Polidocanol and Diclofenac

The aim of the present studies was to establish a new model of isolated perfused porcine livers and to investigate whether this model can be used to test hepatic effects of pharmacological substances. As model drugs, two substances were administered: first, Polidocanol, a toxic substance influencing the stability of membranes and second, Diclofenac, a metabolically active substance. Polidocanol reduces the vitality of cells and has a negative impact on the integrity of membranes.

The organs were harvested from commercial slaughterhouse-pigs. The dissection was performed at the slaughterhouse 18.08 ± 7.35 minutes and was directly followed by cold perfusion with 5 l Euro-Collins solution, which normally took 41 ± 9 minutes. After transportation to the laboratory (duration $170, 23 \pm 15,40$ minutes), the autologous hemoperfusion was carried out in three different groups. First, 6 control organs were perfused for 180 min without adding any substances in order to obtain standard parameters. Afterwards, 6 organs were perfused for 90 min with the addition of Polidocanol (30 minutes running before adding the substance) and 6 organs with Diclofenac treatment (60 minutes running before adding the substances) for 180 min. The duration of perfusion was chosen differently, as Polidocanol is a very aggressive substance and destroys the organ within a short period of time. Diclofenac is a pharmaceutical product with a more metabolic effect and therefore was chosen to last for a longer period of time. Both substances were added as bolus and different samples for laboratory examination were taken every 30 minutes.

Polidocanol was given in a concentration of 8.3×10^{-6} mol. The attention was directed to the time period between 30 to 60 minutes after adding the substance and the resulting effects of the blood parameters. The following changes in blood parameters were observed:

There was a marked increase of AST (61%) and ALT (50%) within the described period of time caused by a damage of the membrane integrity and the resulting collapse of permeability. The cellular components like haematocrit decreased by 39% and the number of erythrocytes by 22%. The reason for this is the mentioned impairment of cell-surface and the technical construction of the experimental set-up.

A cholestasis 30 minutes after application of Polidocanol with a decrease of the bile flow (89%) was particularly striking. An explanation can be given by taking into consideration the

damage of the membrane integrity and its negative impact on the Na^+/K^+ -ATPase. Furthermore there was an increase of albumin (21%) and proteins (25%) which can be ascribed to the cell damage.

The marked increase of liver weight (24%) is attributable to an interstitial oedema and a passive stasis. Due to these facts the arterial pressure decreased by 16%.

Diclofenac was given in a concentration of 2.36×10^{-4} mol. It caused the following changes 30 to 60 minutes after addition:

The main changes were observed on the acid-base equilibrium. Expressing in a distinct increase of lactate with 41% caused by an inhibition of gluconeogenesis and an enhancement of glycogenolysis and glycolysis. Furthermore there was a marked decrease of pH by 5%, bicarbonate by 33% and base excess by 70%, all caused by the lactate acidosis. Albumin and the proteins increased by 38% and 40%, both in consequence of the above mentioned acidosis.

The changes in metabolism became obvious even with a decrease of oxygen pressure of 32% and an increase of glucose (14%) caused by the intensification of glycolysis.

Summarising these data, it can be concluded that Polidocanol lowers the vitality and function of the perfused livers. This is primarily based on the shift in parameters such as AST, ALT, potassium or the cholestasis. Also, the damage of cellular membranes is obvious, as shown by the decreasing haematocrit caused by haemolysis. In addition, the protein levels increase and bilirubin and creatinine values decrease.

The changes induced by Diclofenac are different. Here, a lactate acidosis with decreasing values for pH, HCO_3 and BE was found, which led to a hepatic cell damage as illustrated by increasing values for AST, ALT and potassium. Furthermore, an increase of protein levels, albumin, creatinine and bilirubin was found, which indicates a decrease of hepatic metabolism.

In summary, the presently established model of isolated, autologously perfused porcine slaughterhouse livers seems to be of great value for future use in the field of xenobiotic substance testing. The different effects of Polidocanol, a toxic substance and Diclofenac, a metabolism-influencing substance, were clearly demonstrated and future studies may use this model as a basis to replace animal experiments according to the 3R concept of Russel and Burch (RUSSEL und BURCH, 1959).

Schlagwörter:

pig; liver; perfusion, diclofenac, polidocanol, isolated organ

Keywords:

pig; liver; perfusion, diclofenac, polidocanol, isolated organ