

Aus dem Institut für Arbeitsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchungen zur Resorption von Arbeits- und
Umweltschadstoffen aus Bodenproben im Modell
der isolierten, hämoperfundenen
Schweineextremität**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin
Berlin

von

Johannes Jakob Clemens Godt

aus Hannover

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. D. Groneberg

2. Prof. Dr. med. T. Tschernig

3. Prof. Dr. med. H. Rüden

Datum der Promotion: 23.09.2007

Für meine Familie

Inhaltsübersicht

Inhaltsübersicht

Inhaltsübersicht.....	4
Inhaltsverzeichnis.....	5
Abbildungsverzeichnis.....	8
Tabellenverzeichnis.....	10
Abkürzungsverzeichnis.....	11

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	13
1.1	Einführung	13
1.2	Cadmium als Gefahrstoff für den Menschen.....	13
1.2.1	Verwendung und Vorkommen von Cadmium	13
1.2.2	Aufnahme von Cadmium durch den Menschen.....	14
1.2.2.1	Gastrointestinale und pulmonale Resorption	14
1.2.2.2	Dermale Resorption von Cadmium	15
1.2.3	Toxizität und Metabolismus von Cadmium	16
1.2.4	Arbeitsmedizinische Relevanz	18
1.2.5	Cadmiumbelastung von Böden.....	19
1.3	Die isolierte, hämoperfundierte Schweineextremität als Ersatzmethode für Tierversuche	20
1.3.1	In-vitro-Hautmodelle zur Resorptionsprüfung von Substanzen	22
1.4	Ziel der Arbeit	24
2	MATERIAL UND METHODEN.....	25
2.1	Versuchsorgane und Versuchsgruppeneinteilung.....	25
2.2	Organgewinnung und –vorbereitung	26
2.2.1	Organgewinnung.....	26
2.2.2	Blutgewinnung.....	27
2.3	Versuchsaufbau zur Organperfusion	27
2.4	Herstellung und Applikation der Prüfsubstanzen.....	30
2.4.1	Applikationsweg der Prüfsubstanzen	31
2.5	Versuchsablauf und Perfusionstechnik.....	33
2.5.1	Vorbereitung des Perfusionsaufbaues.....	33
2.5.2	Anschluß der Extremität an das System, Versuchsablauf.....	33
2.5.3	Gabe von Substanzen.....	36
2.6	Probengewinnung und Analytik	36
2.6.1	Klinisch-chemische Analysen	36
2.6.2	Atom-Absorptions-Spektroskopie zur Cadmiumbestimmung	37

2.7	Statistik.....	38
3	ERGEBNISSE.....	39
3.1	Cadmiumresorption	39
3.1.1	Hauptversuche: Cadmiumkonzentration im Blut.....	39
3.1.1.1	Gruppe wet.....	39
3.1.1.2	Gruppe dry.....	40
3.1.1.3	Gruppe gre	41
3.1.1.4	Vergleich der Gruppen untereinander	42
3.1.2	Hauptversuche: Cadmiumkonzentration im Dialysat	43
3.1.2.1	Gruppe wet.....	43
3.1.2.2	Gruppe dry.....	44
3.1.2.3	Gruppe gre	45
3.1.2.4	Vergleich der Gruppen untereinander	46
3.1.3	Gesamtresorptionsmenge zu Versuchsende, Hauptversuche	47
3.1.4	Vorversuche: Cadmiumkonzentration im Blut.....	47
3.1.5	Vorversuche: Cadmiumkonzentration im Dialysat	48
3.2	Hauptversuche: Physiologische Parameter	49
3.2.1	Hämodynamik	49
3.2.1.1	Mittlerer arterieller Perfusionsdruck.....	49
3.2.1.2	Arterieller Perfusionsfluss.....	50
3.2.1.3	Organwiderstand	51
3.2.2	Gewichtszunahme der Extremitäten	52
3.2.3	Bluttemperatur.....	53
3.2.4	Sauerstoffverbrauch.....	54
3.2.5	Arterieller pH-Wert	55
3.2.6	Klinische-Chemische Analysen.....	56
3.2.6.1	Arterieller Hämatokrit.....	56
3.2.6.2	Arteriell freies Hämoglobin	57
3.2.6.3	Arterielle Natriumkonzentration	58
3.2.6.4	Arterielle Kaliumkonzentration.....	59
3.2.6.5	Laktatkonzentration im venösen Blut	60
3.2.6.6	Arterieller Gesamtproteingehalt.....	61
3.2.6.7	Arterielle Albuminkonzentration.....	62
3.2.6.8	Glukoseverbrauch	63
4	DISKUSSION	64
4.1	Einführung	64

4.2	Diskussion der Methodik	64
4.2.1	Spezies.....	65
4.2.2	Perfusat.....	66
4.2.3	Organgewinnung.....	67
4.2.4	Ischämie und Reperfusion, Ödembildung.....	67
4.2.5	Vitalitätsparameter	68
4.3	Cadmiumresorption	71
5	ZUSAMMENFASSUNG	77
6	LITERATURVERZEICHNIS	79
7	LEBENS LAUF	90
8	DANKSAGUNG	91
9	ANHANG	92

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Passage von Substanzen durch die Haut	21
Abbildung 2: Skizze des Perfusionsaufbaus	28
Abbildung 3: Versuchsaufbau.....	30
Abbildung 4: Versuchsaufbau mit Toxic release chamber (Applikation dry).....	32
Abbildung 5: Box and Whisker-Plot	38
Abbildung 6: Cadmiumkonzentration im venösen Blut (CdV) in [$\mu\text{g/l}$], Gruppe wet.	39
Abbildung 7: Cadmiumkonzentration im venösen Blut (CdV) in [$\mu\text{g/l}$], Gruppe dry.....	40
Abbildung 8: Cadmiumkonzentration im venösen Blut (CdV) in [$\mu\text{g/l}$], Gruppe gre.....	41
Abbildung 9: Cadmiumkonzentration im venösen Blut (CdV) in [$\mu\text{g/l}$], Hauptversuche	42
Abbildung 10: Cadmiumkonzentration im Dialysat (CdD) in [$\mu\text{g/l}$], Gruppe wet.....	43
Abbildung 11: Cadmiumkonzentration im Dialysat (CdD) in [$\mu\text{g/l}$], Gruppe dry	44
Abbildung 12: Cadmiumkonzentration im Dialysat (CdD) in [$\mu\text{g/l}$], Gruppe gre	45
Abbildung 13: Cadmiumkonzentration im Dialysat (CdD) in [$\mu\text{g/l}$], Hauptversuche.	46
Abbildung 14: Mittlerer Arterieller Perfusionsdruck in mmHg, Hauptversuche	49
Abbildung 15: Arterieller Perfusionsfluss in ml/min, Hauptversuche	50
Abbildung 16: Organwiderstand in mmHg x min/ml, Hauptversuche.....	51
Abbildung 17: Gewicht der Extremitäten vor / nach Perfusion in kg, Hauptversuche ..	52
Abbildung 18: Bluttemperatur, arteriell in $^{\circ}\text{C}$, Hauptversuche	53
Abbildung 19: Sauerstoffverbrauch der Extremitäten, Hauptversuche	54
Abbildung 20: Arterieller pH-Wert, Hauptversuche	55
Abbildung 21: Arterieller Hämatokritwert in %, Hauptversuche	56
Abbildung 22: Freies Hämoglobin, arterielles Blut in mg/dl, Hauptversuche	57
Abbildung 23: Arterieller Natriumgehalt in mmol/l, Hauptversuche	58
Abbildung 24: Arterieller Kaliumgehalt in mmol/l, Hauptversuche	59
Abbildung 25: Laktatkonzentration im venösen Blut in mg/dl, Hauptversuche.	60

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 26: Arterielle Gesamtproteingehalt in g/dl, Hauptversuche.....	61
Abbildung 27: Arterieller Albumingehalt in g/dl, Hauptversuche.....	62
Abbildung 28: Glukoseverbrauch der Extremitäten in $\mu\text{g}/\text{min}/100\text{g}$, Hauptversuche ...	63
Abbildung 29: Methoden zur Prüfung der dermalen Resorption von Substanzen.	65

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In-vitro-Modelle zur perkutanen Resorption	23
Tabelle 2: Vorversuche, Versuchsanordnungen	25
Tabelle 3: Hauptversuche, Versuchsanordnungen	26
Tabelle 4: Zusammensetzung der Dialysatflüssigkeit	28
Tabelle 5: Grenzwerte der Einstellungen der Perfusionsapparatur	29
Tabelle 6: Vitalitätsparameter der Extremitätenperfusionen.....	35
Tabelle 7: Gesamtresorptionsmengen bei Versuchsende, Hauptversuche	47
Tabelle 8: Vorversuche, Cadmiumkonzentrationen im Blut in [$\mu\text{g/l}$]	47
Tabelle 9: Vorversuche mit purem Cadmium, Cadmiumkonz. im Blut in [mg/l]	48
Tabelle 10: Vorversuche, Cadmiumkonzentrationen im Dialysat in [$\mu\text{g/l}$].....	48
Tabelle 11: Vorversuche mit purem Cadmium, Cadmiumkonz. im Dialysat in [mg/l]...	48
Tabelle 12: Gewichtszunahme der Extremitäten.....	52

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atom-Absorptions-Spektroskopie
ALS	Amyotrophische Lateralsklerose
ARDS	Acute respiratory distress syndrom
AGW	Arbeitsplatzgrenzwert
BAT	Biologischer Arbeitsstofftoleranzwert
BBodSchV	Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung
°C	Grad Celsius
Cd	Cadmium
CdCl ₂	Cadmiumchlorid
CdV	Cadmiumkonzentration im venösen Blut
CdD	Cadmiumkonzentration im Dialysat
DCT	Divalent-Cation Transporter
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid (Äthylendiamintetraessigsäure)
HKL	Hohlkathodenlampe
HBM	Humanbiomonitoring
IARC	International Agency for Research on Cancer
I.E.	Internationale Einheiten
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
MAP	Mittlerer arterieller Perfusionsdruck
MT	Metallothionein
ppb	Parts per billion
PVC	Polyvinylchlorid
R	Organwiderstand
RBP	Retinol-Bindendes Protein

Abkürzungsverzeichnis

REACH	Registrierung, Evaluierung und Autorisierung von Chemikalien
TRK	Technische Richtkonzentration
TRGS	Technische Regeln für Gefahrstoffe
TTS	Transdermales therapeutisches System
STIFF	Stiffness-Index

Zusammenfassung

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der Humanmedizin spielen Arbeits- und Umweltschadstoffe bei der Pathogenese vieler Krankheitsbilder eine wichtige Rolle. In-vitro-Modelle zur Untersuchung der Resorption von toxischen Substanzen unter Verzicht auf Tierversuche sind in diesem Zusammenhang nicht zuletzt aus ethischen Gründen von besonderem Interesse. Dabei erweist sich das Modell der isolierten, hämoperfunden Schweineextremität als ein experimentelles System, in dem Resorptionsprüfungen unter Ausschaltung von Metabolisierung durch andere Organe oder Umverteilung im Organismus durchgeführt werden können. Im Gegensatz zu anderen Hautmodellen wie Zellkulturen oder Diffusionszellen findet eine kontinuierliche Perfusion des Gewebes statt. In der vorliegenden Arbeit wurde am Beispiel von Cadmium die Resorption aus Bodenbestandteilen unter Verwendung von Cadmiumchlorid (CdCl_2) und Aquariumsand geprüft. Cadmium hat durch seine Verwendung in vielen Produkten, zum Beispiel Batterien, eine große Bedeutung als Umweltschadstoff. Es ist durch Industrieabwässer und Düngemittel auch in Deutschland in einigen Gebieten in hoher Konzentration im Boden vorhanden. Als toxische Substanz schädigt Cadmium beim Menschen unter anderem Lunge, Niere und Knochen. Über seine dermale Resorption stehen bislang nur wenige Untersuchungen zur Verfügung.

Die Extremitäten wurden in der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité-Universitätsmedizin Berlin von Schweinen der deutschen Landrasse-Hybriden nach Tötung durch Entbluten entnommen und anschließend über eine Versuchslänge von 210 Minuten perfundiert. Kontaktzeiten dieser Länge entstehen zum Beispiel beim Spielen von Kindern in kontaminierten Gebieten. 8 Vorversuche wurden ohne Cadmiumapplikation durchgeführt. Alle Versuche mit Cadmium wurden unter umfangreichen Sicherheitsmaßnahmen durchgeführt. Es wurde eine Applikationskammer entwickelt und in 7 Vorversuchen mit verschiedenen Dosierungen zwischen 1 und 100mg Cadmium/100g Sand sowie 1g purem Cadmium erprobt. Die Hauptversuche wurden mit Cadmium in einer Konzentration von 10mg/100g Sand in verschiedenen Applikationsformen durchgeführt. Es wurden drei Gruppen gebildet: Sand und Cadmium (dry, n=5), feuchter Sand und Cadmium (wet, n=5) sowie Sand, Creme und Cadmium (gre, n=3). Aus Blut und Dialysat wurden über den Versuchsverlauf Proben entnommen und der Cadmiumgehalt mittels Atom-Absorptionsspektroskopie bestimmt. Parallel dazu wurden Vitalitätsparameter der

Zusammenfassung

Perfusionen gemessen, um Stoffwechsellage und Hämodynamik der perfundierten Präparate zu charakterisieren. Die Ergebnisse zeigten gegenüber dem Ausgangswert vor Versuchsbeginn in der Gruppe wet nach 210 Minuten einen signifikanten Anstieg des Cadmiumgehaltes im Blut ($0,28 \pm 0,18$ vs. $5,3 \pm 6,72$ $\mu\text{g/l}$), in den Gruppen dry ($0,34 \pm 0,08$ vs. $0,21 \pm 0,15$ $\mu\text{g/l}$) und gre ($0,28 \pm 0,15$ vs. $0,43 \pm 0,25$ $\mu\text{g/l}$) war dies nicht der Fall. Im Dialysat wurde in keiner der Gruppen ein signifikanter Anstieg festgestellt. Die Vorversuche boten ein ähnliches Bild. Eine adäquate hämodynamische und metabolische Situation der perfundierten Präparate war jeweils gewährleistet.

Insgesamt erweist sich das Modell als zu Überprüfung von toxischen Substanzen aus Bodenproben als geeignet. Zukünftige Studien können mittels Analyse von Muskel- und Hautbiopsien weitere Kompartimente mit einbeziehen und machen somit weitere Resorptionsprüfungen möglich, ohne auf Tierversuche zurückgreifen zu müssen.

Lebenslauf

7 LEBENSLAUF

Der Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version der Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Danksagung

8 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. David Groneberg danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und seine intensive und freundschaftliche Betreuung während der gesamten Zeit.

Herrn PD. Dr. med. vet. Christian Grosse-Siestrup danke ich ebenso für die umfangreiche Unterstützung, Organisation und unschätzbare wertvolle Hilfe in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow-Klinikum. Durch seine umfangreichen Tätigkeiten für den Tierschutz, die im Jahr 2006 mit dem Bundesverdienstkreuz ausgezeichnet wurden, sind die vorliegenden Studien initiiert worden.

Herrn Karsten Wienecke danke ich ganz herzlich für die fachlichen Ratschläge und technischen Hilfestellungen im Bereich der Analytik.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der tierexperimentellen Einrichtung, insbesondere Herrn Dr. med. vet. Michael Meißler, Frau Vildan Oyanik und Frau Tamara Baskaeva danke ich dafür, dass sie mich stets umfangreich und geduldig unterstützt haben.

Herrn Dipl.-Ing. Volker Unger danke ich für die zahlreichen Ratschläge zu statistischen Fragestellungen.

Frau Dr. med. Eva Peters, Charité-Universitätsmedizin Berlin und Herrn Trygve Bull-Njaa, Aker Sykehus, Oslo gilt mein Dank für die freundliche Überlassung von Bildmaterial für die Diskussion.

Hilde-Kristin Reed, Vera Esche, Ira Maschmann, Franziska Scheidig, Benjamin Oelkers, June Lystad und Ferdinande Addicks gebührt ebenfalls Dank für ihre Hilfe und Ratschläge.

Abschließend möchte ich meinen Eltern Christiane und Hans-Peter sowie meinen Brüdern Christian und Matthias Godt für Ihre Unterstützung während des Studiums und der Anfertigung dieser Arbeit danken. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

Anhang

9 ANHANG

Formeln:

1. Sauerstoffverbrauch in $\mu\text{mol}/\text{min} \times 100\text{g}$ Organgewicht:

$$\begin{aligned} & ((1,34 \times 10000 \times (\text{art.Hb} \times \text{art.O}_2\text{-Sättigung} - \text{art.Hb} \times \text{ven.O}_2\text{-Sättigung})) + \\ & (0,024 \times 760 \times (\text{art.pO}_2 - \text{ven.pO}_2))) \times \text{Blutfluss} \times 1000/22,4 \times \text{Extremitätengewicht} \end{aligned}$$

Umrechnung von $\mu\text{mol}/\text{min} \times 100\text{g}$ Organgewicht auf $\text{ml}/\text{min} \times 100\text{g}$ Organgewicht mittels der allgemeinen Gasgleichung, V_m (molares Volumen) von Sauerstoff bei 37 Grad Celsius: 25,4.

2. Glukoseverbrauch in $\mu\text{g}/\text{min}/100\text{g}$ Organgewicht:

$$(\text{Gluc}_{\text{art}} - \text{Gluc}_{\text{ven}}) \times \text{Blutfluss} / \text{Extremitätengewicht}$$

Anhang

Erklärung

Ich, Johannes Jakob Clemens Godt, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Untersuchungen zur Resorption von Arbeits- und Umweltschadstoffen aus Bodenproben im Modell der isolierten, hämoperfundierten Schweineextremität“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Johannes Jakob Clemens Godt