

4 DISKUSSION

4.1 Einführung

Fragestellungen zur dermalen Resorption von Substanzen sind in vielen Bereichen, zum Beispiel Arbeitsmedizin, Pharmakologie, Toxikologie und Umweltmedizin Gegenstand medizinischer Forschung. Ebenso haben sich in den letzten Jahren Möglichkeiten für Studien an isolierten perfundierten Organen entwickelt (Grosse-Siestrup, Unger et al., 2002). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche haben das Modell der isolierten, hämoperfundierten Schweineextremität an Resorptionsuntersuchungen von Arbeits- und Umweltschadstoffen aus Bodenproben adaptiert. Anhand der Beispielsubstanz Cadmium wurde in 7 Vorversuchen mit verschiedenen Dosen sowie 8 Versuchen ohne Cadmiumapplikation der Aufbau einer Toxic Release Chamber an der Extremität durchgeführt. In den Hauptversuchen wurden 13 Extremitäten mit je 10mg Cadmium auf 100g Sand in 3 Applikationsformen über 210 Minuten perfundiert. Dabei wurde die Cadmiumkonzentration in Blut und Dialysat und Vitalitätsparameter der perfundierten Extremitäten gemessen.

4.2 Diskussion der Methodik

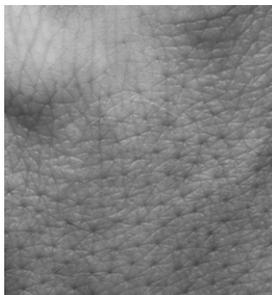
Zur Überprüfung der dermalen Resorption von Substanzen können verschiedene Modelle eingesetzt werden. Dabei liegt von der Prüfung am Lebenden in Tierversuchen bis hin zu Zellkulturen eine Reihe von Methoden vor, die in Tabelle 1 der Einleitung aufgeführt sind. Aus ethischen Gründen verbieten sich Testungen von Giftstoffen an lebenden Menschen, ebenso sind Tierexperimente für Untersuchungen von toxischen Substanzen teilweise nur schwer vertretbar. Diese Voraussetzungen spielen auch bei der Diskussion um die Durchführung der REACH-Richtlinien eine wichtige Rolle (EU-Kommission, 2003). Eine Perfusion der isolierten Extremität schließt dabei systemische Wirkungen aus, wie etwa Metabolisierung durch Leber und Niere. Durch verschiedene Faktoren (z. B. Organentnahmeprozess, Stoffwechsellage und mehr) wird jedoch eine gewisse Komplexität des Versuches erreicht. Den Hautpräparaten (z.B. in Diffusionszellen) und Zellkulturen ist der Nachteil gemeinsam, dass jeweils keine fortlaufende Perfusion der Haut und der anschließenden Gewebe erfolgt. Dies führt –bei allen Vorteilen der Methoden- zu einer Reduktion auf artifizielle, im lebenden Organismus nicht vorhandene

Diskussion

Bedingungen (siehe Abbildung 29). Die übrigen existierenden Perfusionsmodelle der Euter-, Hautlappen- und Schweineohrperfusion sind der Extremitätenperfusion in einigen Aspekten als gleichwertig, in anderen als nachteilig gegenüber zu stellen. So hat z.B. das isoliert perfundierte Schweineohr (de Lange et al., 1992) keine geschlossene Perfusion im Kreislauf, sondern braucht bei langen Versuchszeiten sehr hohe Blutmengen zur fortlaufenden Perfusion.

Methoden für Resorptionsprüfungen

Probanden, Tierversuche



Vorteile:
-Goldstandard
-Relevanz

Nachteile:
-Ethische Grenzen
-Komplexität

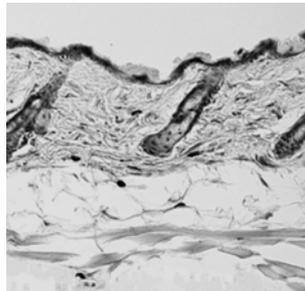
Organperfusionen



Vorteile:
-Organfunktion
-Perfusion

Nachteil:
-Komplexität

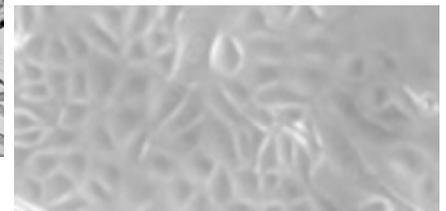
Hautpräparate/ Diffusionszellen



Vorteile:
-einfache Durchführung
-gute Verfügbarkeit

Nachteil:
-keine Perfusion

Zellkulturen, zB. Keratinozyten



Vorteile:
-einfache Durchführung
-gute Verfügbarkeit

Nachteile:
-keine Perfusion
-nicht alle Hautschichten
vorhanden

Abbildung 29: Methoden zur Prüfung der dermalen Resorption von Substanzen.

4.2.1 Spezies

Schweine als Spendertiere haben gegenüber anderen Spezies zwei entscheidende Vorteile: Zum einen sind große Zahlen von Organen aus Schlachthöfen verfügbar, zum anderen sind die physiologischen und pathophysiologischen Verhältnisse menschlichen Organen ähnlicher als bei kleineren Versuchstieren, zum Beispiel

Diskussion

Ratten (Grosse-Siestrup, Fehrenberg et al., 2002). Die Haut des Schweines weist Parallelitäten zur menschlichen Haut auf und kann daher als Vergleichsmodell dienen.

Insbesondere Aufbau, funktionelle Aspekte wie Zellerneuerung und die Permeation von Substanzen zeigen Ähnlichkeiten zum Menschen. Auch die Architektur des Blutgefäßsystems ist weitgehend gleich. Unterschiede zwischen beiden Spezies bestehen im immunologischen Bereich (z.B. höhere Anzahl von Langerhans-Zellen beim Schwein) sowie in der wesentlich fettreicheren Subcutis des Schweines. Auch ist der pH-Wert der Schweinehaut mit 6 bis 7 deutlich alkalischer als bei menschlicher Haut (pH=5). Dies hat hauptsächlich Gründe in der unterschiedlichen Zusammensetzung und Steuerung der Schweißdrüsentypen (Meyer, 1996). Bartek et al. zeigten 1972, dass Schweinehaut in den meisten Resorptionstests (Testosteron, Kortison) den beim Menschen gefundenen Resorptionswerten am nächsten liegt, während Ratten und Kaninchen sich – auch in der Struktur der Haut - wesentlich deutlicher vom Menschen unterscheiden (Bartek et al., 1972).

4.2.2 Perfusat

Eine zentrale Fragestellung für eine möglichst realitätsnahe Organperfusion ist die Wahl der Perfusionslösung. Blut als Perfusionsmedium ist zellfreien Perfusionslösungen in vielen Punkten überlegen: Zellfreie Lösungen, z.B. Fluorkarbon, können mangels Hämoglobin den Sauerstoffbedarf der Organe nur in Hypothermie und bei hohen Perfusionsraten decken. Grund hierfür ist einmal die zunehmende Löslichkeit von Sauerstoff bei geringen Temperaturen, zum anderen der geringere Sauerstoffbedarf des perfundierten Organs in Hypothermie. Die Nachteile der Hämoperfusion (Gerinnungsgefahr, Besiedlung mit Mikroorganismen, Zellschaden durch Pumpen) lassen sich durch Gabe von Antikoagulantien, Antibiose und verbesserte Perfusionsbedingungen dagegen in Grenzen halten. Ein Vergleich im Nierenperfusions-Modell zwischen Tyrodelösung und autologem Blut zeigte eine signifikant bessere Sauerstoffversorgung, bessere Funktionsparameter (Kreatininclearance) und Resorptionsleistungen (Glukose, Natrium) in der Gruppe der hämoperfundierten Organe (Hochel et al., 2003). Somit kommt eine Hämoperfusion der Organe unter physiologischen Gesichtspunkten In-vivo-Versuchsmethoden am nächsten (Groneberg, 2002). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde allen Erfordernissen einer erfolgreichen Hämoperfusion durch Heparin- und

Diskussion

Antibiotikagabe sowie fortlaufende Kontrolle der Vitalitätsparameter Rechnung getragen.

4.2.3 Organgewinnung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Extremitäten von Tieren der Tierexperimentellen Einrichtung direkt im OP entnommen und die Perfusionen sofort anschließend an gleicher Stelle durchgeführt. Dies hat gegenüber der Organgewinnung von Schlachttieren den Vorteil einer sehr kurzen Ischämiezeit durch die Vermeidung von Transportwegen. Damit erübrigt sich auch eine Lagerung der Organe während des Transports. Demgegenüber steht natürlich bei Schlachttierorganen die Reduktion der Zahl benötigter Labortiere (Grosse-Siestrup, Unger et al., 2002).

4.2.4 Ischämie und Reperfusion, Ödembildung

Ein wichtiger Gesichtspunkt bei Organperfusionen ist die Ischämiezeit, also der Zeitraum, in der keine Durchblutung des Organs stattfindet. Auch in der Transplantationsmedizin ist dies eine wichtige Fragestellung. Die Ischämiezeit gliedert sich in folgende zwei Teile: Zum einen die warme Ischämiezeit, die den Abschnitt vom Tod des Tieres durch Entbluten bis zur Kanülierung und Spülung der Extremität umfaßt. Es schließt sich die kalte Ischämiezeit an, die von der Spülung bis zum Anschluss an den Perfusionskreislauf dauert. In allen Organperfusions-Studien wird die Dauer der Ischämie so gering wie möglich gehalten. Nach Ischämie und Reperfusion schädigen insbesondere im Rahmen der Reperfusion entstandene freie O₂-Radikale das Gewebe (Bosco und Schweizer, 1988). Ferner sind starke Ödembildung und eine Zunahme des peripheren Widerstandes Zeichen eines Ischämieschadens. Muskelgewebe in Ruhe und Haut (inklusive subkutanes Fettgewebe) haben eine Ischämietoleranz von mehreren Stunden (Hjortdal et al., 1992). Dies liegt insbesondere an dem in Ruhe niedrigen Energiebedarf. Bei Herz, Niere und Leber ist die Ischämietoleranzzeit hingegen erheblich kürzer. Durch Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr ist in Ischämie eine Aktivierung des anaeroben Stoffwechsels notwendig. Die Energie wird durch Glykolyse bereitgestellt und hängt bei den einzelnen Organen von Glykogenspeicher und glykolytischer Kapazität ab.

Diskussion

In den durchgeführten Versuchen lag die Gewichtszunahme als Maß für die Ödembildung in den Organen jeweils im Referenzbereich von unter 10% gegenüber dem Ausgangsgewicht vor Perfusion. Auch der Organwiderstand lag im Referenzbereich von 0,4-2 mmHg x min/ml. Somit konnte die Schädigung durch Ischämie in Grenzen gehalten werden. Durch die Messung von Albumin und Gesamtprotein wurden wichtige Blutbestandteile zur Aufrechterhaltung des onkotischen Druckes erfasst. Eine Hypoproteinämie kann durch verminderten onkotischen Druck die Ödematisierung verstärken. In allen Gruppen lagen die arterielle Gesamtprotein- und Albuminkonzentratione überwiegend im physiologischen Bereich. Zu Versuchsende wurden vermehrt Werte gering unterhalb der Untergrenze gemessen. In zukünftigen Experimenten könnte eine Albuminsubstitution erwogen werden.

4.2.5 Vitalitätsparameter

Die hämodynamische Situation der Versuche war durch fast ausschließlich im Referenzbereich liegende Werte des mittleren arteriellen Perfusionsdruckes gekennzeichnet bei Perfusionsflusswerten zwischen 50 und 190 ml/min. Der Perfusionsfluss wurde mittels Rollenpumpeneinstellung jeweils den Versuchsbedingungen angepasst, um einen im physiologischen Bereich liegenden Perfusionsdruck zu halten. Dadurch ergaben sich niedrigere Flusswerte in der Gruppe gre, bei höheren Druck- und Organwiderstandswerten als in den anderen beiden Gruppen.

Die Charakterisierung der Stoffwechsellage der Extremität ist durch verschiedene Parameter, die alle 30 Minuten gemessen wurden, gegeben. Der Sauerstoffverbrauch dient dabei als wichtigster Parameter für die Vitalität des Gewebes. Er wurde nach Formel 1 im Anhang berechnet. In allen Versuchen lag der O₂-Verbrauch im Versuchsverlauf zwischen 0,05 und 0,3 ml/min x 100g Organgewicht, nur zu Versuchsende lagen in den Gruppen dry und gre geringfügig höhere Werte vor. Der Normbereich für den Sauerstoffverbrauch von Muskelgewebe in Ruhe liegt bei 0,3-0,5 ml/min x 100g (Schmidt, 2004). Der Grund für die unter dem Normwert für Muskulatur liegenden Verbrauchswerte ist vor allem darin zu sehen, dass die Extremität ja nicht nur aus reiner Muskulatur besteht, sondern zu einem Großteil auch Knochen-, Sehnen- und Hautanteile enthält, die einen wesentlich geringeren Sauerstoffbedarf haben.

Diskussion

Ein stattgehabter Glukoseverbrauch ist ein weiterer Nachweis für die Vitalität von perfundierten Organen (de Lange et al., 1992). In den durchgeführten Perfusionen wurde jeweils 120 Minuten nach Versuchsbeginn 20ml einer 5%igen Glukoselösung in das Dialysat sowie 0,8 I.E. Insulin intra-arteriell gegeben. Die Berechnung des Glukoseverbrauches erfolgte nach der im Anhang aufgeführten Formel 2. Ein Verbrauch größer als 250 $\mu\text{g}/\text{min}/100\text{g}$ Organgewicht gilt dabei als tolerable Untergrenze (de Lange et al., 1992). Diese wurde bis auf wenige Ausnahmen, zum Beispiel in der Gruppe dry in der 150. Minute, klar überschritten. Bemerkenswert ist ein Anstieg der Verbrauchswerte nach der 120. Minute in allen Gruppen, insbesondere aber in den Gruppen dry und gre. Hier lagen in der 210. Versuchsminute Medianwerte von 1204 $\mu\text{g}/\text{min}/100\text{g}$ (dry) bzw. 1122 $\mu\text{g}/\text{min}/100\text{g}$ (gre) vor. Dies ist sicherlich zum Teil durch die Gabe von Insulin und Glukose in der 120. Minute zu erklären. Der dagegen in der Gruppe wet nur sehr verhaltene Anstieg (Medianwert 640 $\mu\text{g}/\text{min}/100\text{g}$ in der 210. Minute) ist bemerkenswert. Ein Zusammenhang zwischen der höheren Cadmiumresorption in dieser Gruppe und niedrigeren Glukoseverbrauchswerten in dieser kurzen Zeit ist jedoch unwahrscheinlich; eine Interaktion zwischen dem Schwermetall und der Glukoseaufnahme ist in der Literatur nicht beschrieben.

Der pH-Wert des arteriellen Blutes lag weitestgehend zwischen 7,3 und 7,5. Ausnahmen waren in der Gruppe gre zu Versuchsbeginn im stärker alkalischen, und in der gleichen Gruppe in Minute 30 und 90 im sauren Bereich festzustellen. Gegenüber früheren Extremitätenperfusionen mit reiner Sauerstoffbegasung ist dies ein wesentlich geringerer Schwankungsbereich (Nogueira et al., 1999). Durch zusätzliche Kohlendioxid-Begasung und Gabe von Bicarbonat bei Bedarf ist in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Perfusionen eine wesentlich genauere Kontrolle des pH-Wertes möglich geworden. Auch der nur moderate Anstieg des Laktatgehaltes im arteriellen Blut spricht für eine ausgeglichene Stoffwechsellage ohne extreme Azidose der perfundierten Extremitäten.

Die arterielle Bluttemperatur bewegte sich in fast allen Gruppen zwischen 36 und 39° C. Nur in der Gruppe dry waren in der 1. Versuchshälfte vereinzelt Werte unter 36° C zu verzeichnen, in dieser Gruppe waren auch die größten Schwankungen vorhanden. In der Gruppe wet lagen die Werte über die gesamte Versuchslänge geringfügig höher als in den anderen beiden Gruppen. Diese Diskrepanzen sind

Diskussion

kritisch zu sehen. Hier könnte in zukünftigen Perfusionen eine Optimierung der Erwärmung des Blutes notwendig sein, um die Temperatur noch konstanter zu halten.

Die Hämolyse infolge von Zellschädigung durch die Rollenpumpentätigkeit ist bei allen extrakorporalen Perfusionsmodellen ein zu beachtender Faktor. Der Grad der Hämolyse lässt sich mit den Parametern freies Hämoglobin sowie den Elektrolyten Kalium und Natrium, die bei Zerstörung der Erythrozyten freiwerden, darstellen (van der Hoeven et al., 1998). In den Hauptversuchen lag der Gehalt an freiem Hämoglobin im arteriellen Blut bei Medianwerten von maximal 40,5 mg/dl (Gruppe wet), über die gesamte Versuchslänge war ein Anstieg zu verzeichnen auf bis zu 80 mg/dl in der Gruppe gre bei Versuchsende. Diese Werte liegen unter denen früherer Perfusionsversuche (Nogueira et al., 1999). Die Kaliumkonzentration stieg über den Versuchsverlauf in allen Gruppen kontinuierlich an. In der Gruppe dry waren die höchsten Werte zu verzeichnen, jedoch blieben die Werte bis auf wenige Ausnahmen innerhalb des physiologischen Bereiches von bis zu 6,7 mmol/l (Kaneko, 1980). Auch der Natriumgehalt im arteriellen Blut blieb innerhalb der physiologischen Grenzen, und zwar in allen Gruppen. Bei Rollenpumpenbenutzung ist eine gewisse Hämolyse unvermeidbar, sie konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit gering gehalten werden. Der Hämatokritwert war Schwankungen unterworfen und bewegte sich zwischen Werten von 20% bis 40%. Bei Organperfusionen mit Vollblut ist für die Fließeigenschaften des Blutes eine Dilution auf Werte unterhalb des physiologischen Bereiches notwendig (Dittrich et al., 2000). Für die Nierenperfusion wurde dabei ein Zielwert von 18-21% als optimaler Bereich für die Organfunktion angegeben (Dittrich et al., 2000). Nach Klövekorn liegt das Optimum der Hämodilution bei 25-30% zur myokardialen Sauerstoffversorgung bei Herzoperationen. Bei Werten unter 20% wird eine lokale Myokardischämie angenommen (Klovekorn, 1990). Die Schwankungen sind durch mehrere Ursachen erklärbar: Flüssigkeitsverschiebungen zwischen den Kompartimenten Blutkreislauf und Dialysatkreislauf, die durch die Steuerungseinheit oder manuelle Nachregelung stattfanden, sind ein Grund. Hämolyse kann den Hämatokrit erniedrigen, Ödematisierung des Gewebes kann dem Perfusat Flüssigkeit entziehen.

Diskussion

4.3 Cadmiumresorption

In den durchgeführten Versuchen wurde festgestellt, dass jeweils nur eine geringe Menge Cadmium in die Kompartimente Blut und Dialysat resorbiert wurde. Insbesondere in den Gruppen dry (Cadmium und Sand) sowie gre (Cadmium, Sand und Creme) war kein deutlicher Anstieg in Blut und Dialysat zu verzeichnen. Lediglich in den Versuchen der Gruppe wet (Cadmium, Sand und Wasser) stieg der Blut-Cadmiumgehalt um mehr als das Fünffache der Ausgangskonzentration und damit signifikant an. Im Dialysat war auch in dieser Gruppe kein signifikanter Anstieg zu verzeichnen. Bei Versuchsende betrug die prozentual in beide Kompartimente resorbierte Menge 0,0073% (Gruppe dry), 0,0085% (Gruppe gre) und 0,0469% (Gruppe wet). Die Vorversuche boten ein ähnliches Bild, nur in den 2 Versuchen mit Applikation von purem Cadmium wurde ein deutlicher Anstieg nachgewiesen.

Aufgrund der Komplexität, Versuchsdauer und Materialaufwendung der Organperfusionen ist die Anzahl der durchgeführten Versuche mit $n=5$ (bzw. $n=3$ in der Gruppe gre) klein. Daher muss jeder Schluss vorsichtig erfolgen, es bietet sich jedoch ein Vergleich mit einigen anderen Arbeiten an.

In der Literatur finden sich folgende vergleichbare Untersuchungen: In der Arbeit von Lansdown und Sampson wurden eine 1%, 0,1% und 0,01%ige Cadmiumchlorid-Lösung (in Aqua dest.) über 10 Tage auf der Haut von männlichen Wistar-Ratten appliziert (Lansdown und Sampson, 1996). Hierzu wurde ein 2 x 2cm großes Areal am Rücken gewählt. Einer Kontrollgruppe wurde reines Aqua dest. appliziert. Ein Tag nach Ende der Applikationen wurden die Tiere getötet. In der Gruppe mit 1%iger Cadmiumchloridlösung betrug der Cadmiumgehalt der Leber 526 ± 261 ng/g und der Nieren 216 ± 98 ng/g gegenüber jeweils weniger als 5ng/g in der Kontrollgruppe. Die Organe der mit 0,1%iger CdCl_2 – Lösung behandelten Tiere zeigten ebenfalls erhöhte Cadmiumwerte von 61 ± 14 ng/g (Leber) bzw. $28\pm 0,4$ ng/g (Niere). Die Blut-Cadmiumkonzentration betrug $11,65\pm 4,75$ µg/l in der 1%-Gruppe und $1,55\pm 0,88$ µg/l in der 0,1%-Gruppe. In der 0,01%-Gruppe lag der Blut-Cadmiumgehalt durchweg unter 0,5µg/l. Die Haut selbst enthielt in der Gruppe der höchsten applizierten Cadmiumkonzentration $6,019\pm 1,4$ ng/g Cadmium. Somit wurde bei wesentlich längerer Exposition klar eine Resorption über den dermalen Weg nachgewiesen. Ein gewisser Anteil des Cadmiums blieb jedoch auch in der Haut zurück. Die Untersuchungen wurden auch unter dem Gesichtspunkt einer möglichen Cadmium-

Diskussion

Belastung der Umgebung von Labortieren, zum Beispiel Sägemehl in den Käfigen, durchgeführt.

In der Arbeit von Wester et al. aus dem Jahre 1991 wurde die Cadmiumresorption durch Hautpräparate menschlicher Haut in Glas-Diffusionszellen in verschiedenen Versuchen untersucht (Wester et al., 1992). Diese Arbeit bietet einige wesentliche Vergleichspunkte, auch wenn sie bei deutlich niedrigeren Dosierungen durchgeführt wurde. In den Experimenten wurden Hautschnitte von 500µm Schichtdicke verwendet. Radioaktiv markiertes Cadmium wurde in Cadmium-Boden-Mischungen von 13ppb (entspricht ca. 1,3µg/100g) und in einer Cadmium-Wasser-Lösung von 116ppb (ca. 11,6µg/100g) Konzentration zubereitet. Es gab 2 Dosierungen der Sand- bzw. Wassermenge pro Hautfläche, wobei die Zahl der Hautpräparate jeweils n=3 betrug. Über 16 Stunden wurden Böden bzw. Wasserlösungen auf den Hautpräparaten belassen, dabei wurden diese mit Humanplasma bei einer Flussrate von 3ml pro Stunde umspült. Aus dem Wasser wurden durch die Haut 0,1±0,04% (bei 2,5µl/cm²) bis zu 0,6±0,6% (bei 5µl/cm²) der applizierten Dosis in das Plasma resorbiert. Auch der Verbleib in der Haut wurde mittels Szintillationszählung des radioaktiv markierten Cadmiums geprüft, es konnte ein bis zu 12,7% großer Anteil der applizierten Dosis Cadmium in der Haut gemessen werden.

In zwei Versuchsanordnungen wurde eine kurze Expositionszeit der Haut zu Wasser mit einem Cadmiumgehalt von 116ppb, wie sie z.B. beim Schwimmen auftreten kann, simuliert. Dabei wurde die Cadmiumkonzentration in Haut und Plasmaflüssigkeit gemessen. In der ersten Anordnung konnten nach 30 Minuten in der Haut 2,3±3,3% der applizierten Dosis nachgewiesen werden, wohingegen kein Cadmium im Plasma nachweisbar war. Die zweite Versuchsanordnung simuliert ein Verbleiben der während der Expositionszeit resorbierten Dosis in der Haut, indem die Hautpräparate über weitere 48 Stunden in der Diffusionszelle verblieben, diesmal jedoch ohne weitere Cadmium-Wasser-Applikation. Nach diesen 48 Stunden wurde der Versuch beendet und in der Haut eine prozentual resorbierte Dosis von 2,7±2,2% gemessen. Interessanterweise beinhaltete das Plasma nun 0,6±0,8%, woraus eine teilweise Resorption des in der Haut nach 30-minütiger Expositionszeit verbliebenen Anteils innerhalb der nächsten 2 Tage in das Plasma nachgewiesen werden konnte.

Die Resorption von den Bodenproben durch die Haut erstreckte sich von 0,02±0,02% (jeweils prozentual der applizierten Dosis) bei einer Bodenmenge von 0,02g/cm² bis

Diskussion

zu $0,07 \pm 0,03\%$ bei $0,04 \text{g/cm}^2$ Boden. Die Haut enthielt in dieser Versuchsanordnung nur bis zu $0,13 \pm 0,5\%$. Ein Versuch mit steigender Dosis Cadmium (von 6,5 auf 65 ppb) auf gleich bleibender Bodenmenge (20mg Boden/cm^2 Hautoberfläche) zeigte einen Anstieg des Haut-Cadmiumgehaltes, jedoch eine konstant bleibende Cadmiumresorptionsmenge in das Plasma.

Bei einem letzten Versuch mit verschiedenen Bodenmengen bei gleich bleibender Cadmiumkonzentration im Boden (13ppb) sank der Cadmiumgehalt der Haut bei sinkender Bodenmenge pro Quadratzentimeter Hautoberfläche. Auch hier blieb der in das Plasma diffundierte Anteil konstant.

Die Bindungskapazität von Cadmium zu Boden und Haut wurde ebenfalls überprüft. Hierzu wurde der Bindungskoeffizient (Konzentration von CdCl_2 in $1000 \text{mg Stratum corneum}$ bzw. Boden dividiert durch die Konzentration von CdCl_2 in 1000mg Wasser) bestimmt. Dabei wurde eine wesentlich höhere Affinität von Cadmiumchlorid zu Bodenbestandteilen als zu humanem Stratum corneum festgestellt. Der Bindungskoeffizient betrug für Stratum corneum $3,61 \times 10$, für Boden $1,03 \times 10^5$. Diese Ergebnisse entsprachen den vorher ausgeführten Resorptionsprüfungen.

Schon eingangs wurde die Arbeit von Skog und Wahlberg (Skog und Wahlberg, 1964) erwähnt. Sie bestand in Versuchen an Meerschweinchen mit verschiedenen radioaktiv markierten Metallen. Diese wurden über eine Dauer von 5 Stunden auf dem Rücken der Tiere platziert. Für die Resorption von Cadmiumchlorid ergab sich eine Rate von 1,8% der applizierten Dosis.

In der Versuchsreihe von James et al. (James et al., 2004) über die Cadmiumaufnahme bei Kröten im Winterschlaf wurde über eine Expositionszeit von 172 Tagen die Auswirkung von cadmiumhaltigem Boden auf die Tiere geprüft. Die Böden enthielten bis zu $120 \mu\text{g Cadmium/ 1 g Boden}$ in ansteigenden Konzentrationen (16,30,59 und $120 \mu\text{g}$). Es wurde ein Gesamt-Cadmiumkörpergehalt nach Töten der Tiere von bis zu $2,198 \pm 0,19 \mu\text{g/g Körpergewicht}$ ($120 \mu\text{g}$ -Gruppe) festgestellt. In den übrigen Versuchsgruppen lagen die Werte zwischen $0,503 \pm 0,132 \mu\text{g/g}$ ($16 \mu\text{g}$ -Gruppe) und $2,037 \pm 0,484 \mu\text{g/g}$ ($59 \mu\text{g}$ -Gruppe).

Im Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit muss berücksichtigt werden, das sowohl das In-vitro-Modell als auch die Applikationszeit sich von den in der Literatur vorhandenen Daten unterscheiden. Der Ansatz des für einen Zeitraum

Diskussion

von 1-3 Stunden in Kontakt mit cadmiumhaltigem Boden kommenden Individuums, sei es bei der Arbeit, beim Spielen etc., spielte in den übrigen Untersuchungen nicht die Hauptrolle. Bis auf die Arbeit von Skog und Wahlberg (Skog und Wahlberg, 1964) mit 5 Stunden und einzelne Versuche von Wester et al. (Wester et al., 1992) war die Kontaktzeit zwischen Haut und Schadstoff deutlich länger. Ein Cadmium-Boden-Gemisch wurde nur in zwei anderen Studien (Wester et al. und James et al.) zur Resorptionsprüfung verwendet.

Die zentrale Beobachtung der vorliegenden Arbeit ist, dass jeweils nur ein sehr geringer Anteil der applizierten Dosis in Blut und Dialysat nachweisbar war, jedoch in der Gruppe (wet) Sand und Wasser eine Resorption stattgefunden hat. Dies entspricht weitestgehend den Erkenntnissen der bisher zu dem Thema präsenten Literatur. Lansdown hat nicht nur mit seinen Versuchen an Labortieren (Lansdown und Sampson, 1996) sondern auch in zwei weiteren Veröffentlichungen bestätigt, dass nach heutiger Erkenntnis klare Evidenz für eine Cadmiumresorption auf dem perkutanen Wege besteht (Lansdown, 1995). Das Ergebnis der Versuche mit Kröten bestätigt diese Hypothese (James et al., 2004), ist jedoch aufgrund der im Vergleich extrem langen Kontaktzeit von 172 Tagen und der grundverschiedenen Versuchsbedingungen (Unterschiede der Haut von Amphibien und Schweinen) nur bedingt vergleichbar.

Die im Blut der Schweine vor Versuchsbeginn gemessenen Ausgangswerte von Cadmium liegen bis auf 2 Versuche unter $1 \mu\text{g/l}$. Nur in 2 Vorversuchen lagen Werte von 3,2 bzw. 1,65 $\mu\text{g/l}$ vor. Eine alimentäre höhere Cadmiumaufnahme erscheint unwahrscheinlich, da alle Tiere die gleiche Nahrung erhalten hatten. Bis auf diese Ausnahmen lag der Blut-Cadmiumgehalt der Tiere also unter dem Referenzwert von $1 \mu\text{g/l}$ für Menschen. Für den Verbleib der applizierten Menge Cadmiumchlorid lassen sich insbesondere die Ergebnisse von Wester et al. zur Diskussion heranziehen, bekräftigen doch seine Untersuchungen zur Bindungskapazität von Cadmium zu Boden die Vermutung, dass ein Großteil der applizierten Dosis auch nach 210 Minuten Versuchszeit noch in dem Cadmium-Sand-Gemisch verblieben ist. Dass nur in der Gruppe wet (Cadmium, Sand und Wasser) ein signifikanter Anstieg der Blut-Cadmiumkonzentration nachweisbar war, lässt eine verstärkte Mobilisierung des Cadmiums aufgrund von Lösung in Wasser und einer vermehrten Penetration der Haut möglich erscheinen. In den von Wester et al. durchgeführten Experimenten

Diskussion

lag vor allem der in der Haut verbliebene Anteil bei Applikation von Cadmium-Wasser-Lösung gegenüber dem Cadmium-Boden-Gemisch um ein Vielfaches höher (12,7% gegenüber 0,7%). So mag in der Gruppe wet nicht nur ein höherer Cadmiumgehalt im Blut nachgewiesen worden sein, es ist auch eine größere in der Haut verbliebene Menge Cadmium nicht auszuschließen. Dies müsste in weiteren Experimenten mithilfe einer Analyse von Hautbestandteilen untersucht werden. Nach Wester et al. ist es aufgrund der dreidimensionalen Struktur der Bodenbestandteile möglich, dass Schadstoffpartikel wie Cadmium bei In-vitro-Versuchen gar nicht in Kontakt mit der Haut kommen. So sei ein stärkerer Hautkontakt bei In-vivo-Situationen wie spielenden Kindern wahrscheinlich, zum Beispiel auch durch beschädigte Hautareale oder Graben im Sand (Wester et al., 1992). Auch kann über die im Muskel verbleibende Menge mit den durchgeführten Messungen allein keine Aussage getroffen werden. Die Meßmethode der Atom-Absorptions-Spektroskopie ist allgemein für Fragestellungen dieser Art anerkannt.

Ein direktes Übertreten von Cadmium aus der Applikationskammer in den Perfusatkreislauf ist in den Hauptversuchen nicht vorgekommen. Zum einen waren mehrere Abdichtungsmaßnahmen angewandt worden, zum anderen sprechen die nur sehr geringen Anstiege gegenüber der Blut-Ausgangskonzentration dagegen. In den Vorversuchen mit purem Cadmium ist eine direkte Kontamination von Blutbestandteilen über den venösen Abfluss anzunehmen, liegen doch hier die gemessenen Konzentrationen bis zu 37,5 mg/l hoch. Auffallend ist an den gemessenen Werten, daß in keiner Gruppe im Dialysat ein signifikanter Anstieg der Cadmiumkonzentration nachgewiesen wurde. Die Werte blieben hier durchweg unter 1 µg/l, auch in der Gruppe wet, in der ja im Blut eine bis zu 10fache Steigerung des Ausgangswertes nachweisbar war. Das in den Blutkreislauf gelangte Cadmium kann aufgrund seiner Molekülgröße von 112.41 Dalton leicht das Dialysemembran (durchlässig für Moleküle bis 5000 Dalton) passieren und damit in den Dialysatkreislauf gelangen. In wässriger Lösung liegt es als Hexaaqua-Komplex $[\text{Cd}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ vor, dieser hat dann eine Molekülmasse von 220.50 Dalton. Das Ion selbst, Cadmiumchlorid (CdCl_2), ist leicht wasserlöslich und zerfällt in die komplexen Cadmium(II)-Kationen und Chlorid-Anionen Cl^- , die eine Masse von 35.45 Dalton haben. Auch in den Vorversuchen blieb der Dialysat-Cadmiumgehalt jeweils sehr gering.

Diskussion

Zusammenfassend lässt sich also eine Resorption nennenswerten Ausmaßes von Cadmium nur in der Gruppe wet (Cadmium, Sand und Wasser) nachweisen. Die Messwerte sind natürlich als Momentaufnahmen zum jeweiligen Messzeitpunkt zu sehen, legen jedoch den Schluss nahe, dass Cadmium im vorliegenden Modell nur in Anwesenheit von Wasser in einem höherem Maße in das Blut resorbiert wird, während dies mit trockenem Sand bzw. Sand und Creme nicht der Fall ist. Das Modell der isolierten, hämoperfundierte Schweineextremität hat sich als geeignet für Resorptionsuntersuchungen aus Bodenproben erwiesen.