

Fig. 3. (a) Control experiment: Saccharine and H₂O consumption of 'naive' (not irradiated) mice after injection of Ringer solution only. (b) Control experiment: Saccharine and H₂O consumption of 'naive' (not irradiated) mice after injection with brain substance from a 'naive' and unirradiated donor.

made with avoidance behaviour of mice to which irradiated saccharine solution was offered.

Should such future investigation be successful, one could perhaps attempt to identify the radiation-affected molecular structures²². Although these thoughts are conjectural, they seem to be part of a logical system in clarifying some very puzzling aspects of memory synthesis and radiation-mechanisms as well²³.

Zusammenfassung. In «naiven» Mäusen werden Verhaltensveränderungen nach Injektion kleiner Mengen von Gehirnmaterial aus Saccharin bevorzugenden und röntgenbestrahlten Mäusen beobachtet. Es trat Vermeidung der Saccharinlösung ein, und zwar ähnlich wie sonst in «trainierten», Saccharin bevorzugenden Tieren nach der Bestrahlung.

W. S. MOOS²⁴, H. LEVAN²⁵,
B. T. MASON²⁶, H. C. MASON²⁶
and D. L. HEBRON²⁵

*International Atomic Energy Agency,
Dosimetry Section, Division of Life Sciences,
A-1010 Wien (Austria), 3 March 1969.*

²² H. HYDEN and P. W. LANGE, Science 159, 1370 (1968).

²³ Experimental work was carried out at the College of Medicine, University of Illinois, Chicago, and at the Research Laboratories, Arkansas State Hospital.

²⁴ Present address: International Atomic Energy Agency, Dosimetry Section, Division of Life Sciences, Kärntnerstrasse 11-13, 1010 Vienna (Austria).

²⁵ University of Illinois, College of Medicine, Department of Radiology, Chicago (Illinois, USA).

²⁶ Arkansas State Hospital, Research Laboratories, Little Rock (Arkansas, USA).

Kinetik der hepatischen Farbstoffaufnahme von Indocyaningrün. Einfluss von Bilirubin und Natriumglykocholat

Untersuchungen über die Kinetik der hepatischen Ausscheidung von Farbstoffen haben die Kenntnisse der Leberphysiologie sehr bereichert. Als Farbstoffe dienten vor allem Bromsulphalein, Bengalrot und Indocyaningrün (ICG). Von diesen weist ICG die geringste extrahepatische Ausscheidung auf¹.

Nachdem ICG von Fox et al.² zur Bestimmung des Herzzeitvolumens in die Kreislaufdiagnostik eingeführt worden war, fand es bald Anwendung zur Bestimmung der Leberdurchblutung nach dem Fickschen Prinzip³ und zur Prüfung der Leberfunktion⁴⁻¹⁰. Als besonderer Vorteil von ICG erwies sich dabei die Möglichkeit, seine Clearance mit Hilfe eines Ohrdensitometers unblutig zu registrieren^{8, 9}.

Zur Leberfunktionsprüfung mittels ICG-Clearance wurden bisher sehr unterschiedliche Dosierungen des ICG angegeben⁴⁻¹⁰. Tierexperimentelle und klinische Studien haben jedoch gezeigt, dass die Empfindlichkeit der ICG-Clearance als Leberfunktionstest von der Farbstoffdosis abhängt. Während nämlich die Clearance kleiner ICG-Dosen (0,5 mg/kg) vor allem von der Leberdurchblutung abhängt und ein relativ unempfindlicher

Parameter der Leberfunktion ist, stellt die Clearance grosser ICG-Dosen (5 mg/kg) einen sehr empfindlichen

¹ C. M. LEEVY, J. BENDER, H. SILVERBERG und J. NAYLOR, Ann. N.Y. Acad. Sci. 177, 161 (1963).

² I. J. FOX, L. G. S. BROOKER, D. W. HESELTINE, H. E. ESSEX und E. H. WOOD, Proc. Mayo Clin. 32, 478 (1957).

³ C. M. LEEVY, C. L. MENDENHALL, W. LESKO und M. M. HOWARD, J. clin. Invest. 47, 1169 (1962).

⁴ H. O. WHEELER, W. I. CRANSTON und J. I. MELTZER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 99, 11 (1958).

⁵ D. B. HUNTON, J. L. BOLLMAN und H. N. HOFFMAN, II., Gastroenterology 39, 713 (1960).

⁶ B. D. WIEGAND, S. G. KETTERER und E. RAPAPORT, Am. J. dig. Dis. 5, 427 (1960).

⁷ J. CAESAR, S. SHALDON, L. CHIANDUSSI, L. GUEVARA und S. SHERLOCK, Clin. Sci. 21, 43 (1961).

⁸ C. M. LEEVY, F. SMITH, J. LONGUEVILLE, G. PAUMGARTNER und M. HOWARD, J. Am. med. Ass. 200, 236 (1967).

⁹ G. PAUMGARTNER, J. LONGUEVILLE und C. M. LEEVY, Wiener Z. inn. Med. 48, 227 (1967).

¹⁰ D. EHRKE, J. JANECKI, A. SEIFERT und H. BALZER, Acta hepatosplenol. 15, 102 (1968).

Leberfunktionstest dar^{8, 9, 11}. Es ist daher nicht möglich, Untersuchungsergebnisse, die mit verschiedenen Farbstoffdosen gewonnen wurden, zu vergleichen.

Injiziert man steigende Dosen von ICG, so nimmt die Eliminationsgeschwindigkeit dieses Farbstoffes in nicht-linearer Weise zu und nähert sich asymptotisch einem Maximum¹². Aus früheren Untersuchungen ging hervor, dass diese Beziehung zwischen initialer Eliminationsgeschwindigkeit und verabreicherter Dosis der Michaelis-Menten-Gesetzmässigkeit gehorcht^{13, 14}. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, aus mehreren submaximalen Eliminationsgeschwindigkeiten die maximale initiale Eliminationsgeschwindigkeit (v_{max}) und die Michaelis-Konstante (K_m) dieses Transportsystems zu berechnen und damit genauer definierte Parameter der Farbstoffelimination zu erhalten.

In bisherigen Untersuchungen wurden v_{max} und K_m aus mehreren initialen Eliminationsgeschwindigkeiten berechnet, die aus der initialen fraktionellen Clearance und der injizierten Farbstoffdosis gewonnen wurden^{13, 14}. In den vorliegenden Untersuchungen wurde nun eine Methode entwickelt, die es gestattet, die Aufnahme («uptake») von ICG durch die Leber bei der Ratte für verschiedene Dosen direkt zu messen und daraus die Parameter v_{max} und K_m für die Farbstoffaufnahme zu berechnen.

Ähnlich wie in der Enzymchemie können v_{max} und K_m dazu dienen, die Hemmwirkung verschiedener Substanzen auf die Farbstoffelimination exakt zu definieren und quantitativ zu erfassen. Die genaue Kenntnis derartiger Hemmvorgänge hat mit der zunehmenden Verwendung von ICG zur Leberfunktionstestung an Bedeutung gewonnen. Darüber hinaus trägt sie zum Verständnis der an der Ausscheidung organischer Anionen in die Galle beteiligten Mechanismen bei. In den vorliegenden Untersuchungen wurde daher der Einfluss von Bilirubin und Natriumglykocholat auf die ICG-Aufnahme durch die Leber studiert.

Methodik. Die Untersuchungen wurden an männlichen Wistar-Ratten in Nembutalnarkose (5 mg Nembutal pro 100 g Körpergewicht i.p.) durchgeführt. 29 Tieren mit einem durchschnittlichen Gewicht von 250 g wurden 4 verschiedene Dosen von ICG¹⁵ (0,25, 0,5, 1,0 und 2,5 mg ICG pro 100 g Körpergewicht) in einem konstanten Volumen von 0,2 ml pro 100 g Körpergewicht innerhalb von 10 sec in die Penisvene injiziert. 10 Tiere dieser Gruppe erhielten 30 sec vor Beginn der ICG-Injektion 2 mg Bilirubin¹⁶ pro 100 g Körpergewicht (als 0,4%ige Lösung in 0,1 molarer Natriumkarbonatlösung) i.v. injiziert. Die Kontrolltiere erhielten statt der Bilirubinlösung dieselbe Menge 0,1 molarer Natriumkarbonatlösung.

Einer zweiten Gruppe von 19 Tieren mit einem durchschnittlichen Gewicht von 320 g wurden in gleicher Weise 2 ICG-Dosen (0,25 und 2,5 mg ICG pro 100 g Körpergewicht) injiziert. 10 Tiere dieser Gruppe erhielten 30 sec vor Beginn der ICG-Injektion 1,9 mg Natrium-glykocholat¹⁷ pro 100 g Körpergewicht als 0,95%ige Lösung in physiologischer Kochsalzlösung. Die übrigen Tiere dienten als Kontrolle und erhielten dieselbe Menge physiologischer Kochsalzlösung.

Genau 3 min nach ICG-Injektion wurde die Leber mit wenigen Scherenschlägen innerhalb von 5 sec entfernt und gleichzeitig eine Blutprobe aus dem aus der Vena cava ausströmenden Blut entnommen.

Bei einer weiteren Gruppe von 20 Ratten wurde die Arteria carotis freigelegt und kanüliert. 60, 120 und 180 sec nach der Farbstoffinjektion wurde je eine arterielle Blutprobe entnommen und die Leber gleichzeitig

mit der letzten Blutprobe entfernt. Zur Bestimmung des Blutgehaltes der Leber erhielten diese Tiere vor der ICG-Injektion Jod-131-markiertes Albumin i.v. injiziert. Aus der Radioaktivität des Blutes 3 min nach der Injektion und der Aktivität des Leberhomogenates der zum selben Zeitpunkt entfernten Leber wurde der Blutgehalt der Leber berechnet. Es ergab sich hiebei ein mittlerer Blutgehalt der Leber von 18 ml Blut pro 100 g Lebergewicht. Dieser Wert stimmt mit dem von LEWIS et al.¹⁸ ermittelten Wert überein und wurde in den weiteren Berechnungen des ICG-Gehaltes des Leberparenchys zur Korrektur für den Blutgehalt der Leber verwendet.

An 4 Tieren (durchschnittliches Gewicht 400 g) wurde nach Eröffnung der Bauchhöhle der Ductus choledochus freigelegt, kanüliert, die Gallenflüssigkeit in 1minütigen Sammelperioden aufgefangen und die nach Injektion von 1 mg ICG/100 g Körpergewicht ausgeschiedene ICG-Menge gemessen. Es wurde dabei gleichzeitig das pro Minute sezernierte Gallevolumen und die Strömungsgeschwindigkeit der Galle in der Kaniile bestimmt, so dass aus der Erscheinungszeit des Farbstoffes an der Kanülen spitze das erste Auftreten von ICG im proximalen Ductus choledochus ermittelt werden konnte.

Zur Bestimmung der ICG-Konzentration im Blut wurden die Blutproben mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, zentrifugiert und die ICG-Konzentration im Überstand bei 800 nm am Perkin-Elmer-UV-VIS-Spektrophotometer gemessen. Die zur Verdünnung dienende Kochsalzlösung enthielt zur Stabilisierung des ICG 0,5 ml 20%iges Humanalbumin pro 100 ml.

Zur Bestimmung der ICG-Konzentration im Lebergewebe wurde die Leber gewogen und nach Zugabe des 10-fachen Volumens an destilliertem Wasser mit dem Ultraturax bei 24 000 Umdrehungen pro min homogenisiert. 1 ml des Homogenates wurde mit 4 ml Aceton extrahiert und bei 4000 Umdrehungen pro min zentrifugiert. Die ICG-Konzentration wurde wiederum im Überstand bei 800 nm spektrophotometrisch gemessen. Für alle Bestimmungen aus dem Lebergewebe wurden Doppelproben durchgeführt. In getrennten Versuchen wurde die Wiedergewinnung von ICG aus dem Leberhomogenat geprüft und zu diesem Zweck einem in gleicher Weise bereiteten Leberhomogenat bekannte Mengen von ICG zugesetzt. Nach Extraktion dieser Homogenate wurden 95–105% der zugesetzten ICG-Mengen wiedergefunden.

Die ICG-Aufnahme in die Leber (v) wurde aus den Farbstoffkonzentrationen des Leberhomogenates (c_1) und des Blutes (c_B) 3 min nach Farbstoffinjektion sowie dem

¹¹ G. PAUMGARTNER, J. LONGUEVILLE und C. M. LEEVY, Aerospace Med. 38, 248 (1967).

¹² D. B. HUNTON, J. L. BOLLMAN und H. N. HOFFMAN, II., J. clin. Invest. 40, 1648 (1961).

¹³ G. PAUMGARTNER, J. LONGUEVILLE, R. KRAINER und C. M. LEEVY, Gastroenterology 54, 163 (1968).

¹⁴ G. PAUMGARTNER, V. SCHEIBER, J. LONGUEVILLE und C. M. LEEVY, in *Computer in der Medizin* (Ed. K. FELLINGER; Brüder Hollinek, Wien 1968).

¹⁵ Cardiogreen der Fa. Hynson, Westcott und Dunning, Lot 333.

¹⁶ Kristallisiertes Bilirubin der Fa. Hartman und Leddon, Philadelphia (Pa., USA).

¹⁷ Natriumglykocholat Grade A der Fa. Calbiochem (dünnenschicht-chromatographisch gereinigt).

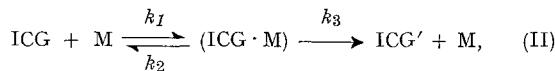
¹⁸ A. E. LEWIS, R. D. GOODMAN und E. A. SCHUCK, J. Lab. clin. Med. 39, 704 (1952).

mittleren Blutgehalt der Leber von 18% nach folgender Formel berechnet:

$$v = \frac{c_L - (c_B \cdot 0,18)}{3 \cdot 0,82} \quad (\text{I})$$

v bezeichnet die Menge von ICG in mg, die pro 100 g Lebergewebe und pro min aus dem Blut in die Leber aufgenommen wurden.

Es wurde folgende Reaktion zwischen ICG und einem «carrier» beziehungsweise einem Rezeptor der Leberzelle (M) postuliert,



wobei ICG' den in die Leberzelle transportierten Farbstoff darstellt.

Um die Michaelis-Menten-Gleichung¹⁹ auf das vorliegende Datenmaterial anzuwenden, wurde in der Originalgleichung für die Reaktionsgeschwindigkeit die initiale ICG-Aufnahme in die Leber (v) und für die Substratkonzentration die ICG-Dosis (D) eingesetzt:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot D}{K_m + D} \quad (\text{III})$$

Es wurde dabei angenommen, dass bei Dosierung des Farbstoffes pro Einheit Körpergewicht die initiale ICG-Konzentration im Blut der Dosis direkt proportional ist. Diese Annahme wurde in den Versuchen, bei denen gleichzeitig arterielle Blutproben abgenommen wurden, überprüft und als gerechtfertigt befunden.

Um die Anwendbarkeit von (III) auf unser Datenmaterial zu prüfen und die maximale initiale Farbstoffaufnahme (v_{\max}) und die Michaelis-Konstante (K_m) aus den gegebenen Beobachtungen (D, v) zu berechnen, wurden Regressionsanalysen durchgeführt. Dabei wurden die vorgegebenen Werte D als unabhängige Variable und v als zufällige normalverteilte Veränderliche mit dem Erwartungswert

$$E(v/D) = \frac{v_{\max} \cdot D}{K_m + D} \quad (\text{IV})$$

und der Streuung

$$\text{Var}(v/D) = \sigma^2 \quad (\text{V})$$

angesehen.

Zur graphischen Darstellung der Regression wurde die Methode von LINEWEAVER und BURK²⁰ verwendet, bei welcher die Michaelis-Menten-Gleichung in folgende lineare Funktion transformiert wird:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \frac{1}{D} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (\text{VI})$$

Zur mathematischen Lösung des Regressionsproblems wurde das neuere Verfahren von BARBER et al.²¹ angewandt, wobei eine rekursiv zu berechnende Folge von linearen Regressionen mit K_o als Näherungswert von K_m abgeleitet wurde:

$$\ln \frac{1}{v} = \ln \frac{1}{v_{\max}} + \ln \left(1 + \frac{K_o}{D} \right) + \frac{K_m - K_o}{D + K_o} \quad (\text{VII})$$

Die Durchrechnung dieser iterativ zu durchlaufenden Regression wurde mit Hilfe eines Computerprogrammes durchgeführt¹⁴. Der Berechnung der Konfidenzintervalle wurde eine Vertrauenswahrscheinlichkeit von 95% zugrunde gelegt. Die Anwendbarkeit der Michaelis-Menten-

Gleichung auf das vorliegende Datenmaterial wurde mittels eines F-Testes geprüft¹⁴.

Ergebnisse. Sowohl bei den normalen Kontrolltieren wie auch bei den Tieren, welche Bilirubin erhielten, stieg die Farbstoffaufnahme durch die Leber mit Erhöhung der injizierten Farbstoffdosis in nicht linearer Weise an und strebte asymptotisch einem maximalen Wert zu (Figur 1). Die Mittelwerte der ICG-Aufnahme in die Leber für die einzelnen Dosen sind für die normale Kontrollgruppe und für die Tiere, welche Bilirubin erhielten, in der Tabelle I wiedergegeben.

Die Prüfung des Datenmaterials mittels des F-Testes ergab mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% keinen Einwand gegen die Anwendung der Michaelis-

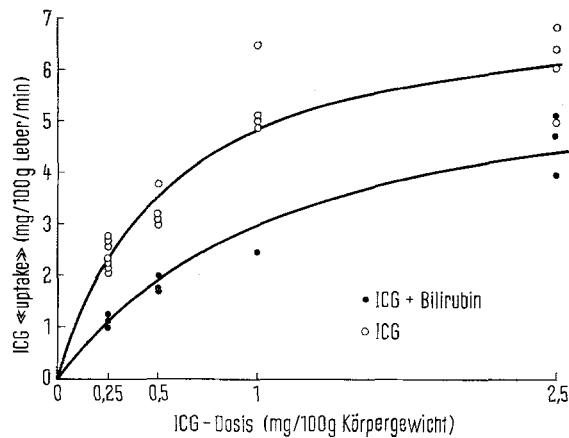


Fig. 1. Beziehung zwischen ICG-Dosis und ICG-«uptake». ○—○, alleinige Injektion von ICG; ●—●, 30 sec vor der ICG-Injektion wurde eine konstante Dosis von 2 mg Bilirubin/100 g Körpergewicht injiziert. Die Kurven stellen die vom Computer mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung ermittelten Funktionen dar.

Tabelle I. ICG-Aufnahme in die Leber bei Verabreichung verschiedener Farbstoffdosen bei normalen Wistar-Ratten und nach Injektion von 2 mg Bilirubin pro 100 g Körpergewicht

	ICG-Dosis (mg/100 g)	Anzahl der Tiere	Initiale ICG-Aufnahme ^a (mg/100 g Leber/min)
Kontrolltiere	0,25	7	2,40 ± 0,25
Nach Injektion von Bilirubin	0,25	3	1,15 ± 0,10
Kontrolltiere	0,50	4	3,18 ± 0,47
Nach Injektion von Bilirubin	0,50	3	1,82 ± 0,15
Kontrolltiere	1,00	4	5,42 ± 0,72
Nach Injektion von Bilirubin	1,00	1	2,51
Kontrolltiere	2,50	4	6,09 ± 0,62
Nach Injektion von Bilirubin	2,50	3	4,63 ± 0,57

^a Mittelwerte ± 1 S.D.

¹⁹ L. MICHAELIS und M. L. MENTEN, Biochem. Z. 49, 333 (1913).

²⁰ H. LINEWEAVER und R. BURK, J. Am. chem. Soc. 56, 658 (1934).

²¹ H. E. BARBER, B. L. WELCH und D. MACKAY, Biochem. J. 103, 251 (1967).

Menton-Gleichung auf diese Beziehung. Bei Darstellung der Daten entsprechend der linearen Regression nach LINEWEAVER und BURK (Figur 2) betrug der Korrelationskoeffizient für die Kontrollgruppe 0,96 und für die Ratten, welche vor ICG-Injektion Bilirubin erhalten hatten, 0,98.

Unter Bilirubin zeigte sich eine signifikante Veränderung der ICG-Aufnahme, die bei kleinen ICG-Dosen am stärksten ausgeprägt war und mit steigender ICG-Dosis abnahm. Die mittels Computer nach der Methode von BARBER²¹ berechnete maximale initiale Farbstoffaufnahme in die Leber betrug bei den normalen Kontrolltieren 7,65 (6,06–9,65)²² mg/100 g Leber pro min und bei den Tieren, welche Bilirubin erhalten hatten, 6,73 (4,93–9,19)²². Der Unterschied von v_{max} zwischen beiden Gruppen war nicht signifikant.

Die Michaelis-Konstante betrug bei den Kontrolltieren 0,56 (0,31–0,81)²² und bei den Tieren, welche Bilirubin erhalten hatten, 1,29 (0,68–1,90)²². Der Unterschied von K_m zwischen beiden Gruppen war statistisch signifikant.

Die Injektion einer der Bilirubininjektion äquimolaren Dosis von Natriumglykocholat führte weder bei kleinen noch bei grossen ICG-Dosen zu einer signifikanten Änderung der initialen ICG-Aufnahme durch die Leber (Tabelle II).

Die Bestimmung der ICG-Ausscheidung in der Galle ergab, dass bereits von der 2. min an messbare Farbstoffkonzentrationen im proximalen Ductus choledochus erscheinen. Innerhalb der ersten 3 min wurde aber nicht mehr als 0,01% der injizierten Farbstoffdosis in den Ductus choledochus ausgeschieden. Dies entsprach annähernd 0,07% der 3 min nach Farbstoffinjektion in der Leber enthaltenen Farbstoffmenge. Die während der ersten 10 min ausgeschiedene ICG-Menge betrug weniger als 1% der injizierten Dosis (Figur 3).

Diskussion. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die Formulierung von MICHAELIS und MENTEN¹⁹ zur Beschreibung der Kinetik enzymatischer Prozesse auch

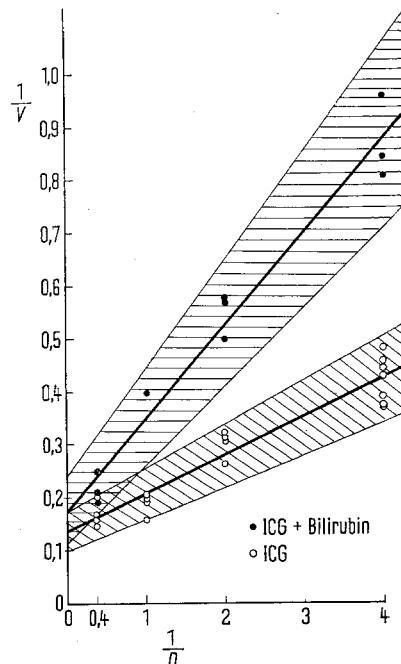


Fig. 2. Darstellung der Daten nach der Methode von LINEWEAVER und BURK²⁰ mit den durch Regressionsanalyse ermittelten Regressionsgeraden. Der Bereich zwischen den Konfidenzgrenzen für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ist schraffiert.

auf die Kinetik der ICG-Aufnahme in die Leber anwendbar ist. Die Michaelis-Menten-Gleichung wurde bisher nur vereinzelt für in vivo-Systeme angewendet. IIO und WAGNER²³ konnten zeigen, dass die Beziehung zwischen der initialen Eliminationsgeschwindigkeit von mikroaggregiertem Albumin und der verabreichten Albumindosis der Michaelis-Menten-Gesetzmässigkeit gehorcht. GORESKY^{24, 25} sowie BEGON und BENHAMOU²⁶ konnten ähnliche Verhältnisse für die hepatische Aufnahme beziehungsweise die biliäre Ausscheidung von BSP nachweisen.

Um die Kinetik des Transportes von Farbstoff vom Blut in die Leberzelle («uptake») möglichst selektiv und unabhängig von der Farbstoffausscheidung in die Galle zu erfassen, ist es erforderlich, zur Messung einen Zeitpunkt zu wählen, bei dem die Farbstoffausscheidung in die Galle noch nicht ins Gewicht fällt. Diese Forderung ist bei Untersuchungen der Blut-clearance von Farbstoffen aus theoretischen und praktischen Gründen schwer zu er-

Tabelle II. ICG-Aufnahme in die Leber bei normalen Wistar-Ratten und nach Injektion von 1,9 mg Natriumglykocholat pro 100 g Körpergewicht

	ICG-Dosis (mg/100 g)	Anzahl der Tiere	Initiale ICG-Aufnahme* (mg/100 g Leber/min)
Kontrolltiere	0,25	5	2,51 ± 0,28
Nach Injektion von Na-Glykocholat	0,25	5	2,38 ± 0,23
Kontrolltiere	2,50	4	5,15 ± 0,48
Nach Injektion von Na-Glykocholat	2,50	5	5,01 ± 0,45

a Mittelwerte ± 1 S.D.

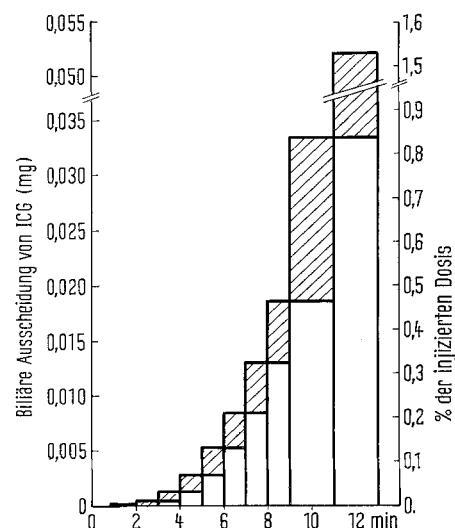


Fig. 3. Biliäre Ausscheidung von ICG nach Injektion von 1 mg ICG pro 100 g Körpergewicht bei der Ratte (Mittelwerte aus 4 Versuchen; durchschnittliches Gewicht der Ratten 400 g). Die Zeitangaben beziehen sich auf die Farbstoffausscheidung in den proximalen Ductus choledochus.

²² Konfidenzintervalle für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%.

²³ M. IIO und H. N. WAGNER JR., J. clin. Invest. 42, 417 (1963).

²⁴ C. A. GORESKY, Am. J. Physiol. 207, 13 (1964).

²⁵ C. A. GORESKY, Can. med. Ass. J. 92, 851 (1965).

²⁶ F. BEGON und J. P. BENHAMOU, Clinica chim. Acta 18, 227 (1967).

füllen. Die Bestimmung der Farbstoffaufnahme durch das Lebergewebe kann hingegen bereits vorgenommen werden, wenn die Farbstoffausscheidung in die Galle gerade erst beginnt. Wie unsere Versuche gezeigt haben, erscheinen messbare Farbstoffmengen in der Galle des proximalen Ductus choledochus bereits 2 min nach Farbstoffinjektion. Die innerhalb der ersten 3 min in den Ductus choledochus ausgeschiedene ICG-Menge beträgt aber weniger als 0,01% der verabreichten Dosis. Dies entspricht annähernd 0,07% der zum Zeitpunkt der Entnahme der Leber im Leberparenchym befindlichen Farbstoffmenge. Daraus geht hervor, dass die ICG-Ausscheidung in die Galle bei dieser Versuchsanordnung vernachlässigt werden kann. Als weiterer Vorteil der direkten Bestimmung der Farbstoffaufnahme in die Leber gegenüber den Clearancemethoden kommt hinzu, dass eine extrahepatische Farbstoffausscheidung nicht in die Messung eingeht.

Auf Grund der Feststellung, dass die initiale Farbstoffaufnahme in die Leber («uptake») eine Funktion der verabreichten Dosis ist, welche der Michaelis-Menten-Kinetik gehorcht, kann ein einfacher Diffusionsvorgang ausgeschlossen werden. Vielmehr scheint es zu einer Bindung des Farbstoffes an ein Trägermolekül («carrier») oder einen «Rezeptor» der Leberzelle zu kommen, ähnlich wie bei Enzymreaktionen Substrat-Enzymkomplexe entstehen²⁷. Die Transportgeschwindigkeit durch die Leberzellmembran würde dann der Anzahl dieser ICG-Carrierkomplexe proportional sein. Ob es sich dabei um einen aktiven Transportmechanismus oder «facilitated transfer» handelt, kann auf Grund der vorliegenden Daten nicht entschieden werden.

Mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung ist es möglich, aus mehreren submaximalen Werten die maximale Farbstoffaufnahme (v_{max}) zu berechnen. Gleichzeitig erhält man dabei auch die Michaelis-Konstante, welche die Farbstoffdosis angibt, bei welcher der Farbstoff von den Leberzellen gerade mit der Hälfte der maximalen Leistung ($v_{max}/2$) aufgenommen wird. Sie ist ein Parameter für die Affinität des Transportsystems zum Farbstoff.

Die Kenntnis von v_{max} ist von Bedeutung, wenn die Fähigkeit der Leber zur Farbstoffaufnahme geprüft werden soll, ohne dass die Grösse der Leberdurchblutung in die Bestimmung eingeht. Bei kleinen Farbstoffkonzentrationen im Blut (kleinen ICG-Dosen) ist die Farbstoffaufnahme in die Leber nämlich durch die Leberdurchblutung limitiert. Mit zunehmender Farbstoffkonzentration (große ICG-Dosen) nimmt der Einfluss der Leberdurchblutung jedoch ab, bis schliesslich bei theoretisch unendlich hoher Dosis (das heisst bei v_{max}) nur die Fähigkeit der Leberzellen zur Farbstoffextraktion erfasst wird. Geringfügige Störungen der Leberfunktion sind aus diesem Grunde und wegen der beachtlichen funktionellen Reserve der Leber durch Bestimmung von v_{max} oder durch Verwendung hoher ICG-Dosen besser erkennbar⁸.

Die Parameter v_{max} und K_m zeigen unter dem Einfluss von Hemmsubstanzen Veränderungen, von denen auf die Art der Hemmung geschlossen werden kann. Die Tatsache, dass sich das v_{max} für ICG unter Bilirubin nicht signifikant ändert, K_m jedoch eine signifikante Zunahme zeigt, spricht für eine kompetitive Hemmung²⁸ und lässt vermuten, dass ICG und Bilirubin denselben Transportmechanismus für den «uptake» in die Leberzelle benützen. Dieses Untersuchungsergebnis steht im Einklang mit den Beobachtungen von HUNTON et al.¹², welche die Hemmung der ICG-Clearance durch Bilirubin am Hund studierten und denen von PAUMGARTNER und LEEVY²⁹, welche den Einfluss einer konstanten Bilirubininfusion auf die ICG-Clearance an der Ratte und am Menschen

untersuchten. Die Änderung von K_m beim kompetitiven Hemmungstyp bedeutet, dass die Konzentration des Farbstoffes (ICG) erhöht werden muss, um in Gegenwart des Inhibitors einen gewissen Bruchteil ($v_{max}/2$) der maximalen Farbstoffaufnahme zu erzielen. Sie kann dazu dienen, das Ausmass einer kompetitiven Hemmung quantitativ zu erfassen.

Von besonderem Interesse ist die Beobachtung, dass nach Injektion einer Menge von Natriumglykocholat, die der in den Bilirubin-Hemmversuchen verwendeten Bilirubindosis äquimolar war, weder für grosse noch für kleine ICG-Dosen eine signifikante Hemmung der Farbstoffaufnahme nachgewiesen werden konnte. Dies spricht dafür, dass das Transportsystem, über welches ICG in die Leberzelle aufgenommen wird, eine wesentlich geringere Affinität für Glykocholsäure besitzt als für Bilirubin, und lässt vermuten, dass die Gallensäuren über einen anderen Mechanismus ausgeschieden werden als Bilirubin. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass in der Klinik eine Störung der Bilirubinausscheidung, das Dubin-Johnson-Syndrom, bekannt ist, bei der Gallensäuren normal ausgeschieden werden³⁰ und die Konzentration der Gallensäuren im Blut nicht erhöht ist^{31,32}.

Summary. Kinetics of hepatic uptake of indocyanine green, a dye which is used for evaluation of liver function, were studied in the rat. The results indicate that the relationship between ICG-dose and initial hepatic dye uptake obeys Michaelis-Menten kinetics suggesting an interaction of the dye with a carrier or fixed site in the liver cell. Thus it was possible to calculate maximum ICG-uptake (v_{max}) and the Michaelis constant (K_m) of this transport system from several submaximal values. v_{max} was 7.65 (6.06–9.65)²² mg per 100 g liver/min and K_m 0.56 (0.31–0.81)²². Under the influence of substances which inhibit the elimination of dyes by the liver the parameters v_{max} and K_m showed changes which allowed characterization of the type of inhibition. While sodium glycocholate had no influence on maximum hepatic ICG-uptake and the Michaelis constant bilirubin caused a significant increase of K_m to 1.29 (0.68–1.90)²² without significantly changing v_{max} . These data suggest that bilirubin interferes with hepatic uptake of indocyanine green by competitive inhibition and that uptake of bile acids is dependent on a different mechanism.

G. PAUMGARTNER³³, J. HUBER³⁴
und G. GRABNER³⁵

*II. Medizinische Universitätsklinik Wien,
1090 Wien (Österreich), 27. Mai 1969*

²⁷ W. WILBRANDT und T. ROSENBERG, Pharmac. Rev. 13, 109 (1961).
²⁸ D. RIGGS, *The Mathematical Approach to Physiological Problems* (The Williams & Wilkins Co., Baltimore 1963), p. 280.

²⁹ G. PAUMGARTNER und C. M. LEEVY, in *Ikerus* (Ed. K. BECK; F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart 1968), p. 419.

³⁰ I. M. ARIAS, in *Ikerus* (Ed. K. BECK; F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart 1968), p. 65.

³¹ G. PAUMGARTNER, G. GRABNER, H. BRUNNER und K. HAUTH, Wiener Z. inn. Med. 50, 171 (1969).

³² Herrn Dr. V. SCHEIBER vom Rechenzentrum der Medizinischen Fakultät Wien sind wir für mathematische Beratung und die Durchführung der statistischen Analysen zu grossem Dank verpflichtet.

³³ Dr. G. PAUMGARTNER, II. Med. Univ. Klinik, Garnisongasse 13, 1090 Wien (Österreich).

³⁴ Dr. J. HUBER, Kantonsspital, 8200 Schaffhausen (Schweiz).

³⁵ Prof. Dr. G. GRABNER, II. Med. Univ. Klinik, Garnisongasse 13, 1090 Wien (Österreich).