

Untersuchungen zum Alkoholkonzentrationsverlauf im vasalen und extravasalen Raum bei Kaninchen nach subcutaner Implantation von Teflonkapseln* **

B. Kühnholz und N. Bilzer

Abteilung Rechtsmedizin I der Universität Kiel,
Hospitalstr. 17–19, D-2300 Kiel, Bundesrepublik Deutschland

Experimental Investigations Concerning the Concentration-Time Course of Ethyl Alcohol Within the Vascular and Extravascular Space of Rabbits After Subcutaneous Implantation of Teflon Capsules

Summary. The availability of the interstitial space for pharmacokinetic research work has been an unfulfilled aspiration until today. As a model s.c. implanted Teflon capsules were proposed. It was thought that the fluid, which is excreted some time after implantation into the cavity of the capsules, is comparable to interstitial fluid as to its physical and chemical properties. This paper deals with the experimental elucidation of the question whether the Teflon model can be of importance to research work on ethyl alcohol. The capsules were implanted under the skin of ten rabbits. After 8–10 days the animals were infused with 0.8 g ethanol per kg body weight, and the capsules punctured at regular intervals. The ethanol content of the punctate water was estimated and compared to the arterial blood-water ethanol concentrations. During the first phase after infusion all Teflon estimates lay below the blood-alcohol concentrations; after 60–90 min the concentration-time curves crossed each other so that the maximum of the Teflon-alcohol concentrations followed that of the arterial blood. Afterwards, the courses were nearly parallel, that of the Teflon fluid above the respective blood levels. This type of behaviour is very similar to experimental results on transcellular fluids, such as vitreous-body and synovial fluid. For ethyl alcohol it is thus very questionable whether the Teflon model reflects the interstitial circumstances to a competent degree.

Key words: Alcohol, pharmacokinetics, interstitial fluid – Pharmacokinetics, interstitial fluid, ethyl alcohol

* Herrn Prof. Dr. Steffen Berg zum 60. Geburtstag gewidmet

** Auszugsweise vorgetragen auf der 59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin in Heidelberg, September 1980

Sonderdruckanfragen an: Dr. B. Kühnholz (Adresse siehe oben)

Zusammenfassung. Die Erschließung des interstitiellen Flüssigkeitsraums für die pharmakokinetische Forschung ist bisher nicht befriedigend gelungen. Ein geeignetes Modell soll die subcutan implantierte Teflonkapsel sein, in deren Hohlraum sich nach dem Einwachsen eine Flüssigkeit absondert, die hinsichtlich ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften der interstitiellen Flüssigkeit entspricht. Zur Überprüfung, ob dieses Modell für die Alkoholforschung von Bedeutung sein kann, wurden zehn Kaninchen jeweils zehn Teflonkapseln unter die Rückenhaut implantiert. Zwei Wochen nach der Implantation wurden die Tiere mit 0,8 g Äthanol/kg Körpergewicht per infusionem bzw. per os belastet. Die Kapseln wurden dann in regelmäßigen Zeitabständen punktiert und die Alkoholkonzentrationen des Punktatwassers mit denen des arteriellen Blutwassers verglichen. Der Alkoholgehalt der Teflonflüssigkeit lag in der ersten Phase grundsätzlich unter der BAK; die Konzentrations-Zeit-Kurven kreuzten sich dann zumeist 60–90 min nach Infusionsbeginn und verliefen danach praktisch parallel zueinander, die der Teflonflüssigkeit über der Blutalkoholkurve. Dieser Verlaufstyp läßt vermuten, daß die Teflonflüssigkeit im Hinblick auf die Pharmakokinetik des Alkohols eher die Verhältnisse von transcellulären Flüssigkeiten, wie Glas-körper- oder Synovialflüssigkeit, widerspiegelt.

Schlüsselwörter: Alkohol, Pharmakokinetik, interstitielle Flüssigkeit – Pharmakokinetik, interstitielle Flüssigkeit, Alkohol

Einleitung

Unsere Kenntnisse über die Pharmakokinetik des Äthylalkohols stützen sich fast ausschließlich auf Blut- und Urinuntersuchungen. Rückschlüsse von dem kinetischen Verhalten des Alkohols im Blut – oder gar des Urins – auf den Konzentrationsverlauf am Wirkort, d. h. im Intracellulärraum, erscheinen aufgrund der physiko-chemischen Eigenschaften des Alkohols zwar statthaft, sind aber experimentell wenig belegt. Die Ursache hierfür liegt auf der Hand. Nur wenige extravasale Flüssigkeitsräume des Körpers sind für die Untersuchung von Konzentrationsverläufen zugänglich. Dabei handelt es sich ausschließlich um transcelluläre Flüssigkeiten, wie (neben Urin) Liquor und Synovialflüssigkeit, die ebenso, wie die intravasale Flüssigkeit mit dem Wirkort des Alkohols nur indirekt in Beziehung stehen.

Den Ort seiner Wirkung erreicht der Alkohol – ebenso wie jedes andere Pharmakon – über das Interstitium, einen Flüssigkeitsraum, der normalerweise experimentell für eine Untersuchung nicht zugänglich ist. Da die pharmakologische Wirkung einer Substanz entscheidend von der Substratkonzentration am Wirkort bestimmt wird, wurden in den letzten Jahren von pharmakologischer Seite her zunehmend Untersuchungen zur Konzentration von Pharmaka im Plasma und in einer modellhaft gewonnenen Extracellulärraumflüssigkeit vorgenommen, und zwar erstmalig 1973 von Chisholm und später u. a. von Seiler (1979).

Geschaffen wurde dieser Flüssigkeitsraum im Tierexperiment durch verschiedene Kunststoffimplantate, z. B. Tischtennisbälle aus Celluloid (Guyton



Abb. 1. Drei der nach den Vorstellungen von Seiler entwickelten Teflonkapseln

1963), Lockenwickler aus PVC (Calman et al. 1972), zylindrische Kapseln aus Teflon unterschiedlicher Größe (1,3–15 ml) (Seiler 1979) unter die Haut, in deren Hohlraum sich nach einiger Zeit eine Flüssigkeit ansammelte, die nach eingehenden Untersuchungen des Physiologen Guyton (1963) aufgrund ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften als interstitielle Flüssigkeit eingeordnet wurde.

Bei Untersuchungen des kinetischen Verhaltens verschiedener Pharmaka (Antibiotika und vorwiegend stark eiweißgebundener Pharmaka) zeigte sich in den meisten Zellen eine Diskrepanz zwischen der Kinetik im Plasma und der in dieser experimentell gewonnenen Flüssigkeit. Es erschien uns sinnvoll, im Rahmen unserer Alkoholverteilungsuntersuchungen (Kühnholz und Bilzer 1979a, b, 1981, 1982) die Methodik in der von Seiler modifizierten Form zu übernehmen und bei Kaninchen Alkoholkonzentrationsverläufe in der durch Implantation von Teflonkapseln gewonnenen Flüssigkeit mit der arteriellen Blutalkoholkurve zu vergleichen.

Material und Methodik

Abbildung 1 zeigt drei der von uns verwandten und nach den Vorstellungen von Seiler entwickelten Ringe oder Kapseln aus Teflon. Ihr Volumen beträgt 1,3 ml, ihr innerer Durchmesser sowie ihre Höhe 1,2 cm. Durch Fenestrierung der Seitenwandung ist die freie, für einen Kontakt des Inhalts der Ringe mit dem umgebenden Gewebe zur Verfügung stehende Fläche auf etwa 90% der gesamten Oberfläche ausgedehnt worden. Wie Voruntersuchungen von Seiler zeigten, umgeben sich diese Teflonkapseln nach der Implantation rasch mit einem gut vascularisierten Gewebe, und zwar unter anfänglicher Freilassung eines flüssigkeitsgefüllten Hohlraumes, aus welchem in der 2. postoperativen Woche ca. 0,5–1 ml Flüssigkeit gewonnen werden kann. Diese sogenannte Teflonflüssigkeit unterscheidet sich vom Blutplasma durch einen niedrigeren pH-Wert und einen erheblich erniedrigten Eiweißgehalt (60% des Plasmawertes) und zeigt hiermit ähnliche Eigenschaften wie die interstitielle Flüssigkeit.

Abbildung 2 zeigt einen Querschnitt durch eine 10 Tage nach der Implantation postmortal entnommene, von Granulationsgewebe umgebene Kapsel mit einer Schnittebene durch den mittleren Bereich der fenestrierten Seitenanteile. Man erkennt die quer getroffenen Teflonstreben, die – eingebettet in lockeres Gewebe – einen Hohlraum umschließen, der nach unten durch lockeres Granulationsgewebe begrenzt ist.

Das die Teflonkapsel einkleidende und umgebende Gewebe erweist sich histologisch als ein gut vascularisiertes Granulationsgewebe in der fibroplastischen kapillarbildenden Phase (Abb. 3), welches zum Lumen hin deutliche Faserneubildungen aufweist.

Für unsere Untersuchungen wurden männliche, bis zu 3 kg schwere Kaninchen verwendet, welchen in Evipan-Narkose zehn Teflonkapseln unter das Rückenfell implantiert wurden. Hierzu wurde nach Enthaarung der mittleren Rückenpartie und Desinfektion mit Kodan ein kleiner, ca. 3 cm langer Hautschnitt gelegt, von welchem aus in verschiedenen Richtungen die Kapseln zwischen Rückenfell und Muskulatur ca. 10 cm vorgeschoben wurden. Zur Verhinderung einer Infektion wurden die so entstandenen Kanäle mit Totocillin-Lösung ausgespritzt und die Hautwunde mit zwei bis drei Einzelknopfnähten verschlossen. Der Wundheilungsverlauf war in allen Fällen komplikationslos.

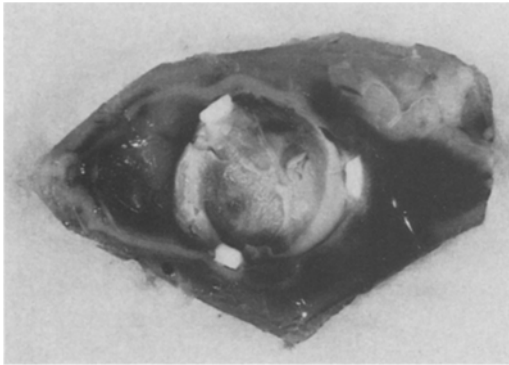


Abb. 2. Querschnitt durch eine 10 Tage nach der Implantation entnommene, von Granulationsgewebe umgebene Teflonkapsel

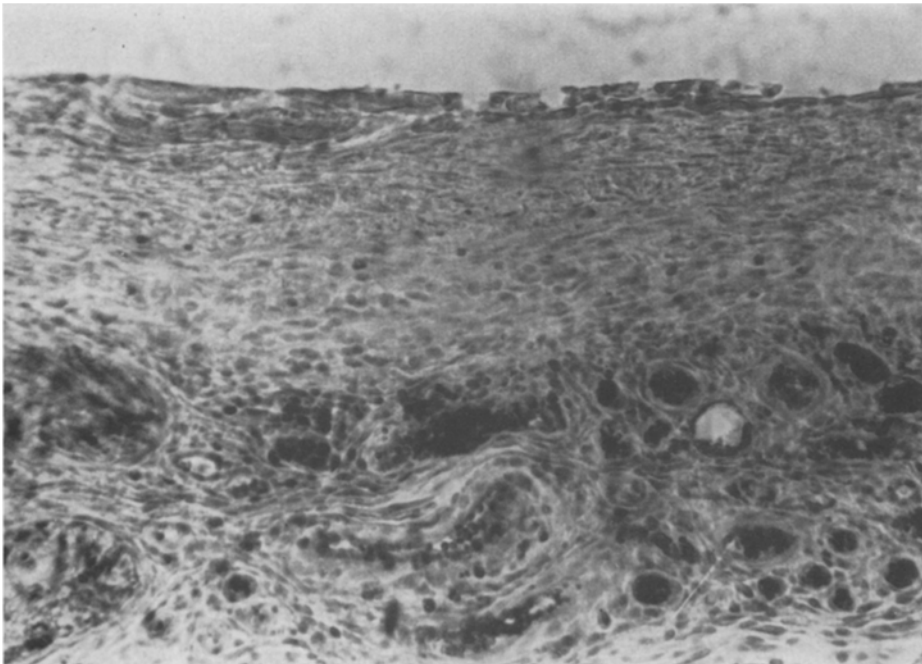


Abb. 3. Histologischer Schnitt aus dem Randbereich der implantierten Teflonkapsel. Gut vascularisiertes Granulationsgewebe in der fibroplastischen, kapillarbildenden Phase. HE-Färbung, $\times 140$

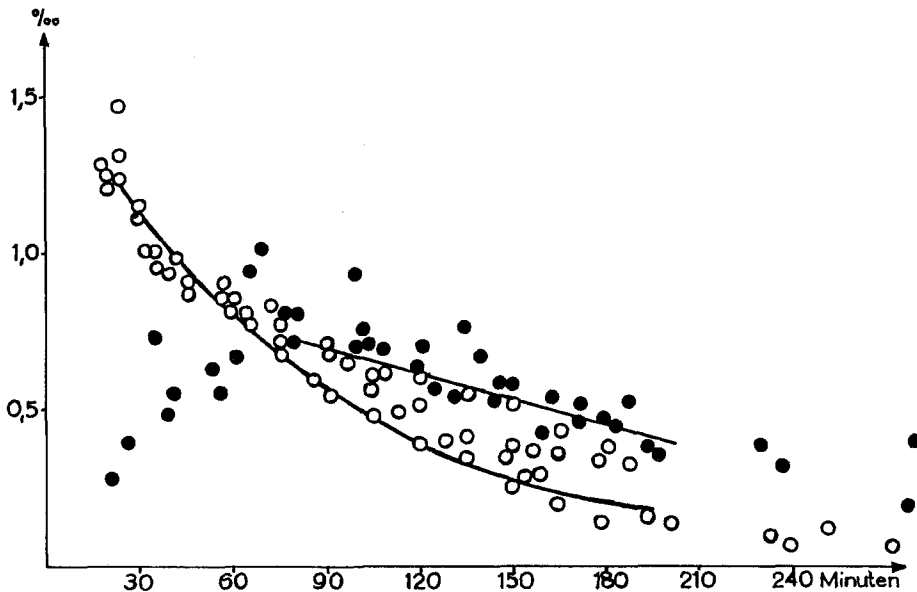


Abb. 4. Alkoholkonzentrationsverläufe im arteriellen Blut (O) und in der Teflonflüssigkeit (●) nach intravenöser Alkoholbelastung (0,8 g/kg). Zusammenfassung der Meßwerte von sechs Tieren über einen Zeitraum von 3 h (vier Tiere) bzw. 4,5 h (zwei Tiere)

Zwischen dem 8. und 10. postoperativen Tag fand die eigentliche Versuchsdurchführung statt. Das jeweilige Tier wurde in einem speziell angefertigten Käfig, welcher nur den Kopf freiließ, fixiert und mit 1 ml Thalamonal sediert. Für die Punktion der Gefäße verwandten wir Venoflex-Katheter der Firma Braun-Melsungen mit einem Durchmesser von 0,8 bis 1,1 mm. Die Alkoholbelastung betrug 0,8 g/kg Körpergewicht. Dieser Alkohol wurde bei zwei Tieren oral über eine Magensonde gegeben, bei den übrigen acht Tieren i.v. mit einer Infusionsgeschwindigkeit von 1 ml/min in Form einer 10%igen, mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Alkohollösung. Die Infusionszeit betrug somit je nach Gewicht des Tieres 20–30 min. Nach Beginn der Alkoholbelastung wurde in regelmäßigen Abständen 1–2 ml Blut aus der Arterie des anderen Ohres entnommen. Nach Infusionsende wurden die Teflonkapseln in etwa halbstündigem Abstand punktiert. Das Blut wurde gleich nach der Entnahme heparinisiert und später als Vollblut untersucht. Die Alkoholbestimmung von Blut und Teflonflüssigkeit wurde gaschromatographisch und nach dem Widmark-Verfahren durchgeführt und nach einer anschließenden Wassergehaltsbestimmung in üblicher Weise auf einen einheitlichen Wassergehalt bezogen.

Ergebnisse

Abbildung 4 stellt eine Zusammenfassung der Konzentrationsverläufe im arteriellen Blut (BAK) und in der Teflonflüssigkeit (TAK) nach intravenöser Alkoholbelastung bei sechs Tieren dar. Bei vier Tieren erstreckt sich der Untersuchungszeitraum über 3 h, bei zwei Tieren über 4,5 h. Die durchgezogenen Linien bezeichnen Kurvenverläufe, welche mit Hilfe der Meßpunkte errechnet wurden. Nach Anwendung des Anpassungstestes für den Verlauf der BAK nach Infusionsende ergab sich innerhalb eines Vertrauensbereiches von 95% ein exponentieller Kurvenverlauf nach der Gleichung: $y(t) = e^{-0,007561 \cdot x + 0,34669}$

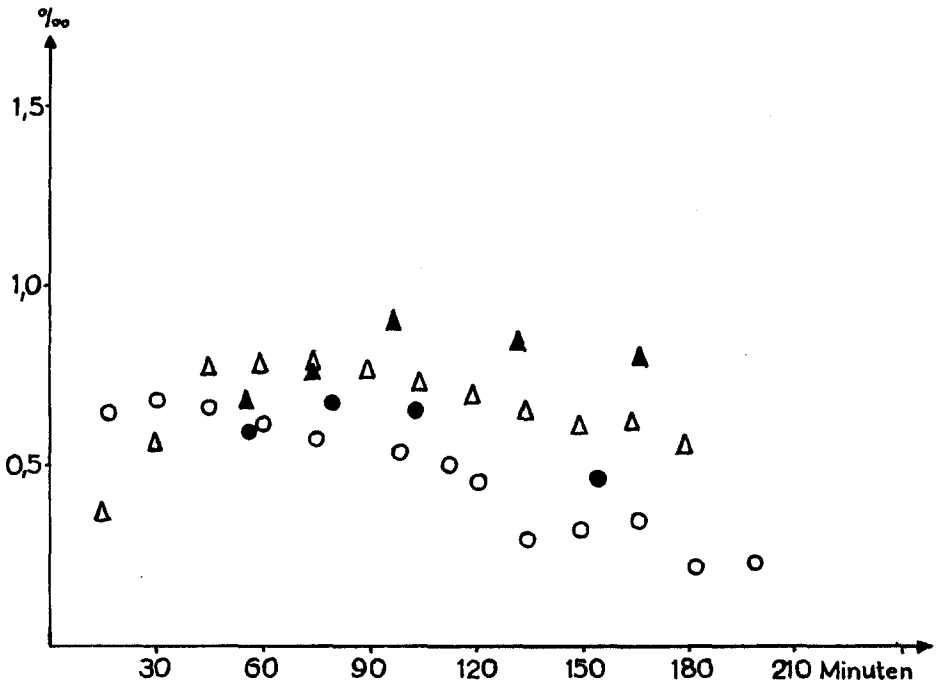


Abb. 5. Alkoholkonzentrationsverläufe im arteriellen Blut (○ Δ) und in der Teflonflüssigkeit (● ▲) nach oraler Alkoholbelastung (0,8 g/kg)

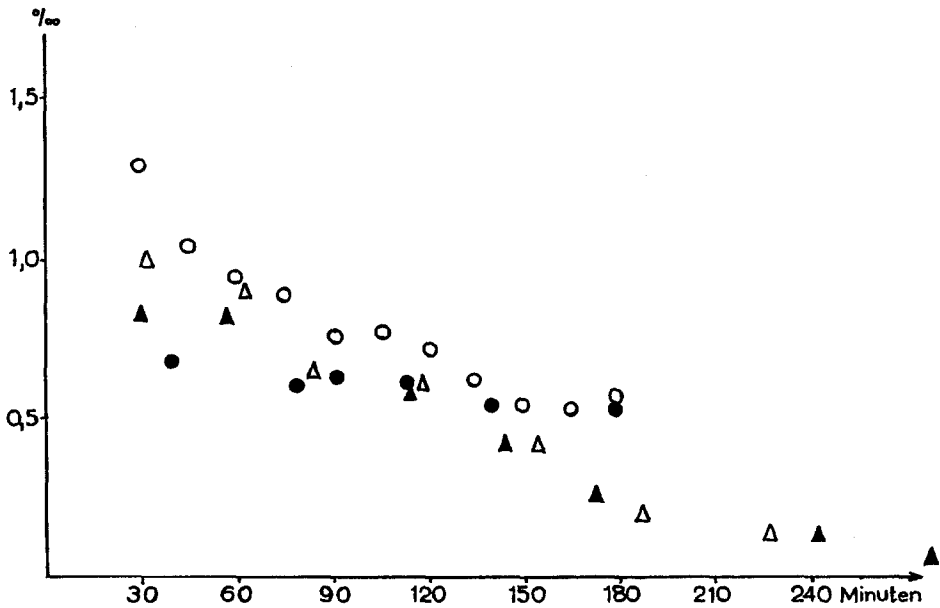


Abb. 6. Alkoholkonzentrationsverläufe im arteriellen Blut (○ Δ) und in der Teflonflüssigkeit (● ▲) nach intravenöser Belastung (0,8 g/kg) bei zwei Tieren

Der Abfall der TAK erfolgte dagegen in demselben Vertrauensbereich geradlinig nach der Formel: $y = 0,922 - 0,0026 x$. Unabhängig von der mathematischen Zuordnung der Kurvenverläufe erkennt man, daß die Konzentrationskurve der TAK gegenüber der arteriellen BAK deutlich verzögert ansteigt, die Blutalkoholkurve 60–90 min nach dem Infusionsbeginn kreuzt und dann optisch deutlich über der Blutalkoholkurve verläuft. Auch bei dem Vergleich der statistisch errechneten Regressionsgeraden der TAK mit dem exponentiellen Abfall der BAK ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen.

Dasselbe Bild ergab sich nach oraler Alkoholbelastung. Abbildung 5 stellt die Einzelergebnisse der beiden untersuchten Tiere dar, wobei auf eine mathematische Angleichung der Meßwerte wegen der geringen Anzahl verzichtet wurde. Abgesehen davon, daß hier der Abfall der BAK optisch ebenfalls geradlinig und nicht exponentiell zu verlaufen scheint, bestehen im Kurvenverhalten keine Unterschiede zu den intravenös belasteten Tieren. Auch hier kommt es 60 bzw. 75 min nach Beginn der oralen Alkoholbelastung zum Konzentrationsausgleich zwischen Blut und Teflonflüssigkeit. Später liegen die Teflonalkoholkonzentrationen deutlich über den dazugehörigen Blutalkoholkonzentrationen.

Nur zwei der insgesamt zehn Tiere zeigten ein abweichendes Verhalten (Abb. 6). Bei diesen Tieren lagen die Teflonalkoholkonzentrationen noch 120 min nach Infusionsbeginn deutlich unter den entsprechenden Blutalkoholwerten und überschritten diese auch später nicht.

Diskussion

Die Interpretation der Versuchsergebnisse ist entscheidend von der Frage abhängig, ob der durch die Implantation von Teflonkapseln künstlich geschaffene Flüssigkeitsraum physiologisch mit dem Interstitium gleichgesetzt werden kann oder ob es sich hierbei um einen transcellularen Flüssigkeitsraum handelt, der ebenso wie z. B. der Glaskörper mit dem Wirkort des Alkohols – dem Cellulärraum – nur indirekt in Beziehung steht.

Hinsichtlich seiner physikalischen und chemischen Eigenschaften entspricht die Teflonflüssigkeit nach den Untersuchungen von Guyton (1963) der interstitiellen Flüssigkeit. Eine weitere Zuordnungsmöglichkeit bietet sich durch den Vergleich des pharmakokinetischen Verhaltens des Alkohols in diesem Flüssigkeitsraum mit anderen natürlich vorgegebenen Flüssigkeitsräumen des Körpers an.

Wie einleitend erwähnt, sind Alkoholkonzentrationsverläufe in anderen Körperflüssigkeiten als Blut und Urin kaum durchgeführt worden. Audrický (1965/66) berichtete über die Alkoholkonzentrationsbestimmung in der Kniegelenkssynovialflüssigkeit lebender Menschen. Der Autor belastete 16 Patienten vor einer Meniscusoperation mit 0,7 g Äthanol/kg Körpergewicht und entnahm während der Operation gleichzeitig mit einer Blutprobe aus der V. cubitalis Synovialflüssigkeit. Der Beginn der oralen Alkoholbelastung wurde so gelegt, daß die Entnahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (30 min bis 5 h) nach dem ca. 7-minütigen Konsum vorgenommen werden konnten. Die Alkoholkonzentrationen wurden auf einen einheitlichen Wassergehalt bezogen. Die Untersuchung ergab, daß die Alkoholkonzentration der Synovialflüssigkeit gegenüber

der BAK verzögert anstieg, 120 min nach dem Alkoholkonsum die bereits wieder abfallende Blutalkoholkurve erreichte und nach Erreichen eines gegenüber der BAK deutlich verzögerten Gipfelwertes parallel und oberhalb der Blutalkoholkurve abfiel. Der Alkoholkonzentrationsverlauf in der Synovialflüssigkeit ist somit nach dieser Untersuchung im wesentlichen derselbe wie in der Teflonflüssigkeit, abgesehen von dem einzigen Unterschied, daß der Konzentrationsausgleich zwischen Teflonflüssigkeit und Blut offensichtlich schneller erreicht wird, als der zwischen Synovialflüssigkeit und Blut, was aus morphologischer Sicht durchaus verständlich erscheint.

Die Ergebnisse von Gostomzyk et al. (1969) am Liquor cerebrospinalis sind mit den unseren nicht vergleichbar, da nicht auf den Wassergehalt abgestellt wurde. Immerhin deutet sich ein im Prinzip ähnlicher Verlauf an mit wesentlich rascherem Konzentrationsausgleich. Die Versuche von Sachs (1960), den „Gewebssaftalkohol“ im von der Grundfläche einer Cantharidenblase abgesogenen Saft zu bestimmen, waren nach eigenem Eingeständnis mit methodischen Fehlern behaftet und können daher ebenfalls nicht zum Vergleich herangezogen werden.

Wir selbst haben im Rahmen einer Untersuchung zur Alkoholverteilung in Körperorganen und -flüssigkeiten (Kühnholz und Bilzer 1981b) den Verlauf der Alkoholkonzentration der Glaskörperflüssigkeit mit der des arteriellen Bluts

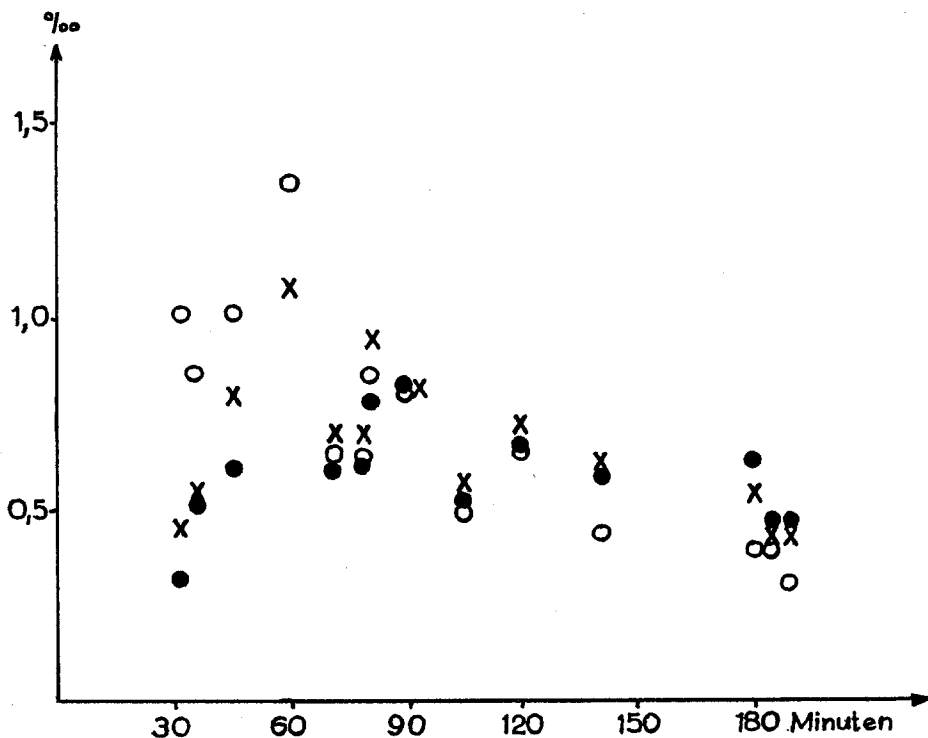


Abb. 7. Postmortale Alkoholkonzentrationen im arteriellen Blut (○), in der Teflonflüssigkeit (●) und in der Glaskörperflüssigkeit (X) bei 14 Tieren, die zu verschiedenen Zeiten nach dem Ende einer intravenösen Alkoholbelastung (0,8 g/kg) getötet wurden

verglichen. Die Versuchsdurchführung war im Prinzip die gleiche, nur mit dem Unterschied, daß wir die Tiere zu unterschiedlichen Zeiten nach dem Infusionsbeginn töteten und verschiedene Körperflüssigkeiten und Organe – wie stets unter Berücksichtigung ihres Wassergehaltes – auf ihren Alkoholgehalt hin untersuchten

Wie Abb. 7 zeigt, ähnelt der Verlauf der Glaskörperalkoholkonzentration dem der Teflonflüssigkeit, wobei der Konzentrationsausgleich annähernd zur gleichen Zeit eintritt, wie in der Teflonkapsel. Die Organwasseralkoholkonzentrationen können hingegen die arterielle BAK innerhalb der 1. Stunde nach Infusionsende zwar erreichen; sie liegen aber in den folgenden 2 h deutlich unterhalb derselben.

Die Versuchsergebnisse lassen in Übereinstimmung mit der Literatur den Schluß zu, daß die Teflonflüssigkeit – bezogen auf die Pharmakokinetik des Alkohols – mit transcellulären Flüssigkeiten, wie Glaskörperflüssigkeit oder Synovialflüssigkeit zu vergleichen ist und Alkoholkonzentrationsverläufe in dieser Flüssigkeit – leider – keine Rückschlüsse auf den Konzentrationsverlauf in der interstitiellen oder gar intracellulären Flüssigkeit zulassen.

Danksagung. Wir danken Frau Ruth Schipper, Oldenburg, für die Finanzierung der Versuche, Frl. Sabine Piorreck für die technische Assistenz und den Angehörigen des Pharmakologischen Instituts der Universität Kiel für die technische Beratung sowie das Anfertigen der Tierkäfige und Teflonkapseln.

Literatur

- Audrický I (1965/66) Über die Alkoholkonzentrationsbestimmung in der Kniegelenks-synovialflüssigkeit lebender Menschen. Blutalkohol 3 : 503–511
- Calnan JS, Ford PM, Holt PJL, Pflug JJ (1972) Implanted tissue cages – a study in rabbits. Br J Plast Surg 25 : 164–174
- Chisholm GD, Waterworth PM, Calnan JS, Carrod LP (1973) Concentration of antibacterial agents in interstitial tissue fluid. Br Med J 1 : 569–573
- Gostomzyk JG, Anst A, Müller P (1969) Gleichzeitige kontinuierliche Bestimmung von Alkohol in Liquor und Venenblut im Tierversuch. Klin Wochenschr 47 : 493–495
- Guyton AC (1963) A concept of negative interstitial pressure, based on pressures in implanted perforated capsules. Circ Res 12 : 399–414
- Kühnholz B, Bilzer N (1979a) Tierexperimentelle Untersuchungen zur Verteilung von Äthylalkohol in einzelnen Organen unter Berücksichtigung des jeweiligen Wassergehaltes. Blutalkohol 16 : 473–481
- Kühnholz B, Bilzer N (1979b) Äthanol- und Wassergehaltsbestimmungen an Organen und Körperflüssigkeiten von Leichen. Blutalkohol 16 : 481–492
- Kühnholz B, Bilzer N (1981) Weitere Erfahrungen mit postmortalen Äthanol- und Wassergehaltsbestimmungen an Organen und Körperflüssigkeiten von Leichen. Blutalkohol 18 : 120–130
- Kühnholz B, Bilzer N (1982) Ethanol distribution after intravenous administration. A study on rabbits. Proc XIIth Congr Int Acad Forensic Soc Med, Wien, pp 227–232
- Sachs V (1960) Vergleichende Untersuchungen zwischen Serum- und Gewebssaftalkohol. Dtsch Z Gerichtl Med 50 : 246–253
- Seiler KU (1979) Untersuchungen zum kinetischen Verhalten verschiedener Pharmaka im vasalen, im interstitiellen und im cellulären Raum von Kaninchen. Habilitationsschrift, Universität Kiel

Eingegangen am 6. November 1981