

PORTALE HYPERTENSIE

Een experimenteel model met dimethylnitrosamine

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE
GENEESKUNDE

AAN DE ERASMUS UNIVERSITEIT TE ROTTERDAM

OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS

PROF. DR. J. SPERNA WEILAND

EN VOLGENS BESLUIT VAN HET COLLEGE VAN DEKANEN.

DE OPENBARE VERDEDIGING ZAL PLAATS VINDEN OP

WOENSDAG 26 SEPTEMBER 1979 DES NAMIDDAGS

TE 4.15 UUR

DOOR

ONNO TJALLING TERPSTRA

geboren te 's-Gravenhage

1979

grafische verzorging:

dauids decor alblasserdam

PROMOTORES : DR. D.L. WESTBROEK

J.H.P. WILSON

CO-REFERENTEN : PROF. DR. H. VAN HOUTEN

DR. A.P.R. BLOK

(on)dank(s) Tineke

INHOUD

HOOFDSTUK 1

MOTIVATIE VAN HET ONDERZOEK	9
-----------------------------------	---

HOOFDSTUK 2

LITERATUURONDERZOEK	11
2.1. Portale hypertensie bij de mens	11
2.2. Experimentele portale hypertensie	13
2.3. Dimethylnitrosamine	14
2.3.1. <i>Inleiding</i>	14
2.3.2. <i>Metabolisme</i>	15
2.3.3. <i>Direct toxische werking</i>	17
2.3.4. <i>Carcinogene werking</i>	17
2.4. De hond als proefdier	18

EIGEN ONDERZOEK

HOOFDSTUK 3

MATERIAAL EN METHODEN	21
3.1. Proefdieren, schema van bepalingen en observatieperiode	21
3.2. Doseringsschema van dimethylnitrosamine	22
3.3. Veiligheidsmaatregelen	23

HOOFDSTUK 4

RESULTATEN	25
4.1. Klinische gegevens	25
4.1.1. <i>Klinisch beloop en symptomatologie</i>	25
4.1.2. <i>Complicaties</i>	29
4.1.3. <i>Discussie</i>	30
4.2. Hemodynamische metingen	30
4.2.1. <i>Inleiding</i>	30
4.2.2. <i>Methoden</i>	31

4.2.3.	<i>Resultaten</i>	33
4.2.4.	<i>Discussie</i>	38
4.3.	Pathologisch – anatomisch onderzoek	40
4.3.1.	<i>Inleiding</i>	40
4.3.2.	<i>Methoden</i>	41
4.3.2.1.	<i>Percutane leverbiopsie</i>	41
4.3.2.2.	<i>Obducties</i>	41
4.3.2.3.	<i>Histologische kleuringen</i>	42
4.3.2.4.	<i>Beoordeling van de microscopische preparaten</i>	42
4.3.3.	<i>Resultaten</i>	42
4.3.3.1.	<i>Leverbiopsieën</i>	42
4.3.3.2.	<i>Obducties</i>	42
4.3.3.3.	<i>Histologische veranderingen door dimethylnitrosamine</i>	43
4.3.3.4.	<i>Histologische veranderingen in relatie tot de hoeveelheid toegediende dimethylnitrosamine</i>	46
4.3.4.	<i>Discussie</i>	51
4.4.	Hematologische en biochemische bepalingen	54
4.4.1.	<i>Inleiding</i>	54
4.4.2.	<i>Methoden</i>	55
4.4.3.	<i>Resultaten</i>	56
4.4.4.	<i>Discussie</i>	64
4.5.	Leverfunctieproeven	66
4.5.1.	<i>Inleiding</i>	66
4.5.2.	<i>Methoden</i>	68
4.5.3.	<i>Resultaten</i>	69
4.5.4.	<i>Discussie</i>	76

HOOFDSTUK 5

CONCLUSIES	79
SAMENVATTING	83
SUMMARY	87
VERANTWOORDING	91
LITERATUURLIJST	93
CURRICULUM VITAE	100

MOTIVATIE VAN HET ONDERZOEK

De behandeling van patiënten met een bloeding uit slokdarmvarices ten gevolge van portale hypertensie levert nog steeds geen bevredigende resultaten op (Sherlock 1978). Operaties die de druk in de vena portae verlagen, zoals een portocavale shunt, zijn effectief wanneer het er om gaat een bloeding tot staan te brengen en een recidief bloeding te voorkomen, maar de overleving van geopereerde patiënten is, statistisch gezien, niet beter dan die van patiënten welke medicamenteus worden behandeld (Jackson e.a. 1971, Resnick e.a. 1974, Reuff e.a. 1976). De geopereerde patiënten overlijden dan niet aan een bloeding, zoals de medicamenteus behandelde patiënten, maar aan encephalopathie. Dit complex van neuropsychiatrische afwijkingen bekend als hepatische encephalopathie, komt ook voor bij acute leverinsufficiëntie of chronisch leverlijden. De kans op ernstige encephalopathie neemt echter door het aanleggen van een shunt tussen het portale systeem en de vena cava bij patiënten met levercirrose toe met ongeveer 20% (Sherlock e.a. 1970, Mutchnick e.a. 1974). De boven aangehaalde prospectieve klinische studies zijn voornamelijk uitgevoerd bij Amerikaanse en Franse patiënten met cirrose ten gevolge van alcoholabusus en conclusies uit deze studies zijn niet altijd van toepassing op Nederlandse patiënten. Toch moet het doel van chirurgische therapie bij een ernstige bloeding uit oesophagusvarices zijn: een verlaging van de druk in de varices bij een zo gering mogelijke kans op hepatische encephalopathie. Met de thans beschikbare diagnostische hulpmiddelen is het nog steeds niet mogelijk vóór de operatie uit te maken, welke patiënten een verhoogde kans op postoperatieve encephalopathie hebben. Bovendien is van de meer recente operaties die decompressie van oesophagusvarices geven niet duidelijk hoe de resultaten met betrekking tot het optreden van encephalopathie op langere termijn zullen zijn.

Bij het ontstaan van encephalopathie spelen verschillende factoren een rol. Eén van die factoren is het feit dat afbraakproducten van eiwitten uit de tractus digestivus via verbindingen tussen het portale vaatstelsel en de vena cava in de lichaamscirculatie terechtkomen en de bloedliquorbarrière passeren (Hoyumpa e.a. 1979). Deze "shunts" ontstaan spontaan bij portale hypertensie, maar zijn uiteraard van grotere omvang wanneer chirurgisch een verbinding tussen de vena portae en de vena cava wordt gemaakt. Een tweede belangrijke factor is de achteruitgang in hepatocellulaire functie. Wanneer de portale bloedstroom om de

lever wordt geleid, zoals door het aanleggen van een portocavale shunt gebeurt, kunnen de leverfuncties verslechteren (Resnick e.a. 1969, Lauterburg e.a. 1976). Dit kan het gevolg zijn van een verminderde bloeddorstrooming van de lever (Lieberman en Short 1965) of omdat de lever bepaalde stoffen in het portale bloed, die nodig zijn voor een optimale functie niet in voldoende mate krijgt aangevoerd (Child e.a. 1953, Starzl e.a. 1964, Popper 1974). Over de aard van deze "hepatotrope" factoren zijn de meningen verdeeld (Leffert 1974, Bucher en Swaffield 1975, Starzl e.a. 1976).

Nieuwe chirurgische technieken zijn dan ook gericht op decompressie van de varices in de oesophagus met behoud van de portale bloedstroom door de lever (Inokuchi e.a. 1975, Warren e.a. 1976). Een andere methode waardoor postoperatief minder encephalopathie zou optreden is die, waarbij extra (arteriëel) bloed naar de lever wordt gevoerd ter compensatie van het verlies aan portaal bloed na een portocavale shunt (Maillard e.a. 1974, Adamsons e.a. 1978).

Ofschoon deze technieken op theoretische gronden aantrekkelijk zijn en bij patiënten ook worden toegepast, ontbreken gegevens van experimentele onderzoeken naar de effectiviteit en de eventuele neveneffecten van deze procedures. Eén van de redenen waarom deze nieuwe operaties niet eerst in het laboratorium werden uitgetest, zoals wel vereist is voor nieuwe geneesmiddelen, was het ontbreken van een goed model voor portale hypertensie op basis van afwijkingen in de lever. De resultaten van operaties die werden uitgevoerd bij proefdieren zonder portale hypertensie (Lee e.a. 1974, Adamsons e.a. 1975), zijn van weinig waarde bij de keuze van de juiste behandeling van patiënten met portale hypertensie. Om de problemen van postoperatieve encephalopathie en de waarde van alternatieve operaties te kunnen onderzoeken, is dus een reproduceerbaar model van portale hypertensie op basis van intrahepatische afwijkingen onontbeerlijk.

Het doel van dit onderzoek was na te gaan of er door afwijkingen in de lever te veroorzaken een experimenteel model van portale hypertensie gemaakt kon worden, dat in hemodynamisch, histologisch, biochemisch en farmacologisch opzicht overeenkomt met portale hypertensie door levercirrose bij de mens. Uit het volgende literatuuroverzicht zal duidelijk worden waarom onze voorkeur uitging naar een model van chemisch geïnduceerde cirrose bij de hond door middel van dimethylnitrosamine.

LITERATUURONDERZOEK

2.1. Portale hypertensie bij de mens

Een verhoogde druk in het poortaderstelsel is meestal het gevolg van een toename in de weerstand door de bloedstroom door de vena portae, de lever of de vena hepatica. Er zijn twee vormen van portale hypertensie die waarschijnlijk niet primair veroorzaakt worden door een verhoogde weerstand in de bloedvaten: 1) "idiopathische portale hypertensie", waarbij slechts minimale anatomische veranderingen in de lever worden gevonden en 2) portale hypertensie door arterioveneuze fistel(s) in het splanchnicusstroomgebied (Tisdale e.a. 1959, Boyer e.a. 1967, Van Way e.a. 1971). De andere oorzaken van portale hypertensie zijn, afhankelijk van de plaats van de obstructie ten opzichte van de sinusoiden, in te delen in een presinusoidale, een sinusoidale en een postsinusoidale vorm (Tabel 1). De indeling heeft praktische consequenties. Patiënten met een pre- of postsinusoidale vorm van portale hypertensie hebben namelijk een relatief normale leverfunctie, terwijl bij de sinusoidale vorm vaker leverinsufficiëntie voorkomt (Sherlock 1974). In de westerse wereld is cirrose de meest frequente oorzaak van portale hypertensie; in de ontwikkelingslanden echter, wordt portale hypertensie meestal veroorzaakt door schistosomiasis (WHO 1973).

Door de verhoogde druk in de vena portae treedt er dilatatie van de bloedvaten proximaal van de obstructie op. Een deel van het portale bloed stroomt via zijtakken van de portale vaten naar venen met een lagere druk, die uiteindelijk uitkomen in de vena cava. Dit wordt de "portosystemische collaterale circulatie" genoemd. Bij cirrose is er bovendien nog een intrahepatische collaterale circulatie door anastomosen tussen afferente takjes van de arteria hepatica en de vena portae en efferente takken van de venae hepaticae (Popper 1977). Naarmate de hoeveelheid bloed die de normale weg volgt afneemt, neemt de collaterale circulatie toe. De uiteindelijke druk in het portale vaatstelsel hangt af van de ernst van de obstructie, de weerstand die het bloed in de collaterale circulatie ondervindt en de mate van flow door de arterieën van het splanchnicusgebied (Reynolds 1975).

De veneuze verbindingen tussen het portale vaatstelsel en de vena cava bevinden zich in de submucosa van de oesophagus, de submucosa van het rectum, de voorste buikwand en het pariëtale peritoneum van de achterste buikwand. De collaterale circulatie door de venen in de submucosa van de oesophagus is echter

	idiopathisch
	arterioveneuze fistel(s)
presinusoïdaal	<i>extrahepatisch</i> obstructie v. portae
	<i>intrahepatisch</i> schistosomiasis reticuloendotheliale proliferatie sarcoïdose congenitale leverfibrose primaire biliare cirrose intoxicatie door o.a. arsenicum, vinylchloride, thorotrast
sinusoïdaal	<i>intrahepatisch</i> steatose hepatitis fibrose cirrose
postsinusoïdaal	<i>intrahepatisch</i> veno-occlusive disease
	<i>extrahepatisch</i> obstructie vv. hepaticae decompensatio cordis pericarditis constrictiva

Tabel 1. Oorzaken van portale hypertensie.

klinisch gezien het meest belangrijk, omdat deze de oorzaak kan zijn van ernstige bloedingen.

Een ander gevolg van portale hypertensie is de vorming van ascites. Behalve de verhoogde druk in de sinusoiden zijn hierbij nog een aantal andere factoren van belang zoals hypoalbuminemie, secundair hyperaldosteronisme en stasis in de darmcapillairen (Greenway en Stark 1971, Witte e.a. 1978).

De patiënt met portale hypertensie kan nog een aantal andere symptomen hebben die uitingen zijn van het onderliggende leverlijden, vooral als er sprake is van

leverinsufficiëntie. Eén of meer van de volgende symptomen kunnen aanwezig zijn:

- icterus
- hyperdynamische circulatie (verhoogde cardiac output)
- koorts
- neuropsychiatrische afwijkingen (encefalopathie)
- huid- en endocriene afwijkingen
- stollingsstoornissen

Bij biochemisch onderzoek kunnen patiënten met leverlijden afwijkingen blijken te hebben in het bilirubinegehalte, het metabolisme van eiwitten, koolhydraten en vetten, evenals veranderingen in het serumgehalte aan enzymen zoals alkali-sche fosfatase en de transaminasen (Sherlock 1975).

2.2. Experimentele portale hypertensie

Verschillende onderzoekers hebben geprobeerd portale hypertensie in proefdieren op te wekken door de bloedstroom in de vena portae of venae hepaticae op mechanische wijze te blokkeren (Remillard e.a. 1961, Orloff e.a. 1974, Bengmark e.a. 1976). Obstructie van de bloedstroom in de vena portae leidde bij de rat en de hond echter niet tot een permanent verhoogde portale druk (Witte e.a. 1974). Op deze experimenten zal hier niet nader worden ingegaan, omdat zij geen inzicht geven in de pathofysiologie van patiënten met portale hypertensie door een intrahepatische oorzaak.

Veel interessanter in dit verband zijn de pogingen om een fibrose of cirrose van de lever op te wekken. Door veranderingen in de architectuur van de lever kan immers een blijvende drukverhoging in het poortaderstelsel optreden. Analoog aan de menselijke pathologie werd in deze experimenten getracht door een bepaald agens zoveel beschadiging van leverparenchym te veroorzaken, dat er in de herstelfase voldoende bindweefsel wordt gevormd om portale hypertensie te induceren. Hiertoe werd gebruik gemaakt van diverse hepatotoxische stoffen als tetrachloorkoolstof (McLean e.a. 1969, Baddeley en Fefjar 1969 e.a.), thioacetamide (Thoenes en Bannasch 1962, Boyer e.a. 1971), galactosamine (Lesch e.a. 1969), grote doses ijzer (Lisboa 1971) en dimethylnitrosamine (Madden e.a. 1970, Haney e.a. 1972. Door aan ratten en apen een cholinevrij dieet te geven werd eveneens een histologisch beeld van cirrose verkregen (Gaisford en Zuidema 1965, Rogers en Newborne 1973, Henley e.a. 1974).

Omdat bij de mens alcoholmisbruik een frequente oorzaak is van portale hypertensie, hebben vele onderzoekers geprobeerd levercirrose in proefdieren te induceren door toediening van alcohol. Bij ratten lukte het niet op deze manier voldoende veranderingen in de architectuur van de lever te verkrijgen (Siou en

Delaitre 1972, Häkkinen e.a. 1975) en men meende dat cirrose door alcohol-misbruik alleen aan het species homo sapiens was voorbehouden (Galambos 1972). In 1974 echter toonden Rubin en Lieber aan dat zeer langdurige toediening van grote hoeveelheden alcohol aan bavianen bij enkele van hen cirrose veroorzaakte. Het verschil in reactie op alcohol tussen proefdier en mens weten zij aan de kortere levensduur van het proefdier of een onvoldoende hoeveelheid alcohol in het dieet.

De meeste bovengenoemde methoden om experimenteel portale hypertensie op te wekken hebben echter één of meer nadelen. Soms duurt het enkele jaren voordat cirrose optreedt (ijzer, alcohol), of is de stof waarmee gewerkt wordt te kostbaar (thioacetamide). Een ander bezwaar is dat de histologische afwijkingen reversibel kunnen zijn na staken van het agens (tetrachloorkoolstof, cholinevrij dieet). In enkele modellen ontstaan wel afwijkingen in de leverarchitectuur, maar treedt geen portale hypertensie op (galactosamine). Bovendien kan de stof ook voor andere organen toxisch zijn (tetrachloorkoolstof, thioacetamide).

Een goed model van portale hypertensie op basis van intrahepatische afwijkingen moet voldoen aan de volgende eisen:

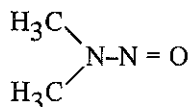
- Overeenkomst met de humane pathologie wat betreft symptomatologie, hemodynamische veranderingen, histologie, biochemie en leverfuncties.
- Stabiliteit van de veranderingen die opgewekt worden in de leverarchitectuur, ook na staken van het agens.
- Het te gebruiken agens moet zo min mogelijk afwijkingen in andere organen dan de lever veroorzaken.
- De gewenste pathologische afwijkingen moeten binnen een redelijke tijd bereikt kunnen worden.

Uit de literatuurgegevens over dimethylnitrosamine kwam naar voren dat met deze stof mogelijk een experimenteel model van portale hypertensie was te maken, dat aan deze eisen zou kunnen voldoen.

2.3. Dimethylnitrosamine

2.3.1. Inleiding

Dimethylnitrosamine (DMNA) is een lichtgele vloeistof (s.g. 1.006, kookpunt 15°C.), oplosbaar in water.



Deze stof werd in de industrie gebruikt als oplosmiddel totdat er enkele ongelukken gebeurden. In een Amerikaanse automobielfabriek liepen twee mannen een vergiftiging met DMNA op, waarna één van hen overleed. Bij obductie werd een cirrotische lever gevonden (Hamilton 1949). Het volgende geval van DMNA-intoxicatie betrof laboranten die in een industrieel researchlaboratorium in Engeland proeven met dit oplosmiddel namen gedurende een periode van tien maanden. Eén laborant overleed aan een bronchopneumonie en ook bij hem werd een levercirrose geconstateerd. De ander werd ziek, maar herstelde toen hij niet langer aan het middel was blootgesteld. (Barnes en Magee 1954). Verdere analyse bracht aan het licht dat het toxische bestanddeel van het oplosmiddel dimethylnitrosamine was.

Magee en Barnes toonden in 1956 de carcinogene werking ervan bij proefdieren aan. Daarna is veel onderzoek verricht naar de vorming en het voorkomen van nitrosoverbindingen in het voedsel en in het milieu (Wolff en Wasserman 1972).

2.3.2. Metabolisme van dimethylnitrosamine

Dimethylnitrosamine kan worden geresorbeerd in het maagdarmkanaal, in de longen en door de intacte huid (Magee en Barnes 1967). De resorptie in de tractus digestives verloopt snel en effectief: 15 minuten na orale toediening van twee milligram DMNA per kilogram lichaamsgewicht aan ratten werd minder dan twee procent van de oorspronkelijke hoeveelheid teruggevonden in het maagdarmkanaal (Diaz Gomez e.a. 1977).

Behalve het feit dat dimethylnitrosamine kan worden afgebroken door darmbacteriën (Rowland en Grasso 1975), vindt omzetting plaats in de lever en mogelijk in geringe mate in de nieren en de longen. Van deze organen heeft de lever de grootste capaciteit om DMNA te metaboliseren (Magee en Farber 1962, Montesano en Magee 1970). Resultaten van experimenten, uitgevoerd bij ratten die vóór de DMNA-toediening een totale hepatectomie ondergingen, bevestigden deze waarnemingen. Zes uur na intraveneuze toediening van 50 mg DMNA per kilogram lichaamsgewicht aan deze dieren kon de totale hoeveelheid onveranderd worden teruggevonden, maar wanneer een nefrectomie werd verricht in plaats van een hepatectomie, was de mate van omzetting onveranderd (Magee 1956). Een toxisch of farmacologisch effect op de nierfunctie is bij de hond niet aangetoond (Levy 1977).

Het is niet waarschijnlijk dat dimethylnitrosamine zelf de actieve stof is, maar één van zijn metabolieten, zoals dit het geval is bij de meeste carcinogenen (Miller 1970, Issenberg 1976). De enzymen die dimethylnitrosamine omzetten, zijn gelokaliseerd in de zogenaamde "microsomale fractie" van de lever (Shank 1975). Dit deel van de hepatocyten, dat wordt verkregen door een leverhomogenaat te ultracentrifugeren, bevat onder andere endoplasmatisch reticulum en riboso-

men. De enzymen die DMNA omzetten, de oxidasen, komen in de hepatocyten rondom de vena centralis in de hoogste concentratie voor.

Dimethylnitrosamine wordt door oxidatieve demethylatie omgezet in het instabiele monomethylnitrosamine en formaldehyde (Heath 1967, Crosby 1976). Monomethylnitrosamine valt uiteen en daarbij wordt een methylcarboniumion gevormd, dat nucleïnezuren beschadigt door in de 7-positie van guanine een methylgroep aan te brengen (Lijinsky e.a. 1968, Wolff en Wasserman 1972). Het is duidelijk dat verandering van guanine in het DNA-molecuul vele consequenties heeft met betrekking tot de celdeling en de eiwitsynthese.

Wanneer dimethylnitrosamine via de tractus digestivus wordt opgenomen, komt het door de vena portae in de lever terecht. Het grootste deel wordt direct gemetaboliseerd. Maar wanneer de concentratie in het portale bloed erg hoog is, vloeit een deel van de DMNA via de venae hepaticae over naar de systematische circulatie, waarna mogelijk enig metabolisme in de longen en nieren plaats vindt evenals excretie in de urine. Na intraveneuze toediening wordt relatief een groter deel van het DMNA in de nieren omgezet dan na orale toediening (Diaz Gomez e.a. 1977).

In verband met de veiligheidsmaatregelen die men moet nemen bij het werken met dimethylnitrosamine is het van belang de excretie van DMNA in de faeces en de urine na te gaan. Zoals eerder vermeld werd, is de resorptie in het maagdarmkanaal na een orale toediening van twee milligram per kg lichaamsgewicht bijna volledig. Bij 50 mg per kg lichaamsgewicht, oraal gegeven, is 24 uur later in de urine of faeces geen DMNA meer aan te tonen. Pas bij een intraveneuze toediening van 500 mg per kg lichaamsgewicht wordt in 24 uur ongeveer 10% onveranderd in de urine uitgescheiden (Magee 1956).

Behalve de schade die dimethylnitrosamine veroorzaakt in de hepatocyten, is er nog een ander mechanisme van levercelbeschadiging door DMNA denkbaar. Grün en Liehr (1977) hebben aangetoond dat een toxische hepatitis fataal verloopt wanneer de functie van de Kupffercellen is verminderd. Endotoxinen, afkomstig van darmbacteriën, worden dan minder door de RES-cellen gefagocyteerd en komen zodoende in contact met hepatocyten, die daardoor beschadigd worden. Na stimulatie van het fagocyterend vermogen van de Kupffercellen had dezelfde vorm van hepatitis een gunstig beloop. Het is mogelijk dat dimethylnitrosamine, evenals andere hepatotoxische stoffen, een directe toxische werking op de Kupffercel heeft en op deze wijze de levercelbeschadiging versterkt.

Afhankelijk van de hoeveelheid dimethylnitrosamine en de duur van de toediening kunnen we twee effecten onderscheiden: enerzijds een direct toxische werking die in de vorm van levercelnecrose optreedt binnen enkele dagen na de toediening en anderzijds een carcinogene werking door langdurige toediening van kleine hoeveelheden.

2.3.3. Direct toxische werking

Onderzoek naar de toxische werking van dimethylnitrosamine heeft aangetoond dat een geringe hoeveelheid DMNA ernstige leverbeschadiging veroorzaakt bij diverse soorten proefdieren. De LD₅₀ bedraagt voor de meeste proefdieren 27-41 mg DMNA per kg lichaamsgewicht (Heath en Magee 1962). Na een éénmalige dosis van 25 mg per kg lichaamsgewicht oraal, subcutaan, intraveneus of intra-peritoneaal toegediend aan de rat, ontstaat binnen 24-48 uur een ernstige levercelnecrose met bloedingen. Bij lichtmicroscopisch onderzoek blijken de hepatocyten in het centrum van de leverkwabjes het meest beschadigd te zijn, terwijl de afwijkingen afnemen in de richting van de periferie. De levers van dieren die de necrose overleven tonen bij later onderzoek tekenen van regeneratie (Khanna en Puri 1966, Crosby 1976). De beschadiging van de parenchymcellen blijkt bij onderzoek met de electronenmicroscopie te bestaan uit fragmentatie van het endoplasmatisch reticulum, waardoor de membranen in kleine vesikels veranderen en de ribosomen los van de membranen komen te liggen. Het cytoplasma wordt oedeematus en er treedt holtevorming op (de Man 1964).

De gevoeligheid voor een tweede toediening DMNA is vanaf 24 uur tot zes dagen na de eerste dosis verlaagd en keert vervolgens weer terug tot het oorspronkelijke niveau (Pound 1975). Een verklaring voor dit fenomeen zou kunnen zijn dat door de eerste dosis dimethylnitrosamine niet alleen hepatocyten zijn beschadigd maar ook Kupffercellen, waardoor de gevoeligheid voor een volgende toxische dosis toeneemt. Door dimethylnitrosamine intermitterend toe te dienen, ontstaat een proces van necrose en regeneratie dat uiteindelijk bij de rat en de hond tot levercirrose kan leiden (Madden e.a. 1970, Haney e.a. 1972, Kreuzer e.a. 1972, Testas e.a. 1978).

2.3.4. Carcinogene werking

Indien ratten een dieet kregen waaraan 0.005% dimethylnitrosamine was toegevoegd, ontstonden bij bijna alle proefdieren na ongeveer acht maanden hepatocellulaire carcinomen met in sommige gevallen metastasen in de longen of intra-peritoneaal (Magee en Barnes 1956). Andere onderzoekers hebben door een gewijzigde dosering toe te passen bij andere rattenstammen primaire maligne tumoren in de longen en de nieren kunnen induceren (Argus en Hoch-Ligeti 1961, Riopelle en Jasmin 1969).

Aangezien dimethylnitrosamine aangrijpt op de nucleïne-zuren, zijn snelde-lende cellen het meest kwetsbaar. Ofschoon herstel van beschadigd DNA in vivo mogelijk is, kan reduplicatie van afwijkend DNA reeds optreden voordat herstel heeft plaats gehad (Farber en Sarma 1974). De schade aan het DNA-mole-cuul, die in principe reversibel is, wordt dan permanent. Omdat carcinogenen zo-

als DMNA ook cytotoxisch zijn, geven zij een impuls tot proliferatie. Farber (1976) postuleert dat de cellen met een afwijkend DNA zich waarschijnlijk sneller delen dan de normale cellen, omdat zij minder gevoelig zijn voor de toxische remming van het carcinogeen op de synthese van nieuw DNA, RNA en eiwitten. Waarschijnlijk beschikken deze cellen niet over de enzymsystemen om DMNA te metaboliseren. Zo zouden hyperplastische noduli ontstaan, die na het staken van het carcinogeen in deze fase zich weer kunnen ombouwen tot een normale celrangschikking. Bij voortzetten van de toediening van het carcinogeen echter, vormt zich een nieuwe populatie hepatocyten met premaligne kenmerken, die ook zonder verdere toediening van carcinogeen overgaat in het hepatocellulaire carcinoom.

De hierboven uiteengezette theorie kan een verklaring zijn voor het feit dat met dimethylnitrosamine zowel hyperplastische noduli als leverceltumoren kunnen worden opgewekt.

Behalve dimethylnitrosamine zijn ruim 100 andere nitrosoverbindingen op hun carcinogene werking onderzocht. Ongeveer 80% van de onderzochte stoffen kan maligne tumoren opwekken, meestal in de lever, de oesophagus of de pharynx (Druckrey e.a. 1967). De kennis over de mate waarin deze stoffen in voedingsmiddelen voorkomen en de vorming ervan in de menselijke tractus digestivus is nog onvolledig (Wogan en Tannenbaum 1975). Wel is aangetoond dat dimethylnitrosamine in lage concentraties aanwezig is in vis en vlees die nitriet als conserveringsmiddel bevatten of gerookt zijn (Crosby en Sawyer 1976). Bovendien kunnen nitriet en nitraat uit voedsel of drinkwater in de maag worden omgezet in nitrosaminen, maar de betekenis hiervan voor het ontstaan van kanker bij de mens is niet duidelijk (Mirvish 1975, Issenberg 1976).

2.4. De hond als proefdier

Conclusies uit biomedische experimenten met proefdieren zijn door verschillen in anatomie en fysiologie niet altijd van toepassing op de humane geneeskunde. Bij de keuze van een proefdier zal men zich laten leiden door de voor- en nadelen van ieder soort proefdier, die deels van praktische deels van wetenschappelijke aard zijn.

Hoewel zeer veel leveronderzoek is en wordt uitgevoerd bij de rat als proefdier, was dit dier minder geschikt voor deze studie omdat een groot aantal bloedmonsters moest worden afgenomen en hemodynamische metingen moesten worden verricht. Bovendien zijn operaties aan de portale bloedvaten door het kleine kaliber minder eenvoudig. Van de grotere proefdieren kwamen de hond en het varken in aanmerking. Voor een experiment dat zich over enkele maanden tot een jaar uitstrekt, vormt de gewichtstoename van varkens een fysiek probleem.

Ook voor dit proefdier geldt dat het afnemen van bloedmonsters een speciale vaardigheid vereist, terwijl voor frequent percutaan biopteren van de lever narcose noodzakelijk is.

Het gebruik van de hond als proefdier heeft vele voordelen. Huisvesting en voeding vereisen geen bijzondere maatregelen en het afnemen van bloedmonsters is goed uitvoerbaar, evenals het uitvoeren van flowstudies en het nemen van leverbiopsieën. Omdat bastaardhonden onderling slecht vergelijkbaar zijn en niet zelden een hepatitis hebben doorgemaakt, zijn voor deze studie uitsluitend beagles uit een proefdierenbedrijf gebruikt.

Een nadeel van de hond als proefdier voor een model van portale hypertensie door leverafwijkingen zou het verschil in anatomie tussen de hondeliver en de lever van de mens kunnen zijn. De hond heeft op de overgang van sinusoiden naar venae centrales sfincters, die de outflow van bloed uit de lever kunnen reguleren (Harding 1955). Deze sfincters treden voornamelijk in werking bij shock of hypoxie (Greenway en Stark 1971). Bij de mens zijn dergelijke sfincters niet aanwezig. Wel zijn er vernauwingen op de overgang van centrale venen naar grotere venen aangetroffen, waardoor toch een soort sfinctermechanisme mogelijk is (Gibson 1959).

Een tweede nadeel is het feit dat de hond in geval van portale hypertensie geen oesophagusvarices krijgt (Talwar e.a. 1968). Het splanchnicusstroomgebied bij mens en dier bestaat uit een complex van elastische vaten. Hemodynamische wetten die gelden in een star buizenstelsel zijn hierop niet van toepassing, zodat drukverhoging in één deel van het portale vaatbed zich niet in dezelfde mate hoeft voort te zetten in een ander deel (Malt 1976). De collaterale flow tussen zijtakken van de vena portae en de vena cava is onder andere afhankelijk van de drukgradiënt. Bij de hond wordt, in tegenstelling tot de mens, verhoging van de druk in de vena portae in mindere mate voortgezet in het compartiment dat gevormd wordt door de vena gastrica sinistra (Waddell e.a. 1972). Daardoor is de flow door collateralen vanuit dit gebied minder bij de hond met portale hypertensie dan bij vergelijkbare portale hypertensie bij de mens; oesophagusvarices worden niet gevormd en het portale bloed zal gedeeltelijk via andere collateralen naar de systemische circulatie terugvloeien. Alleen als de druk in de oesophagusvenen extreem hoog gemaakt wordt, bijvoorbeeld door de arteria lienalis te anastomiseren met de vena lienalis met onderbinden van de vena lienalis bij de inmonding in de vena portae, treden ook bij de hond oesophagusvarices in de submucosa op (Tamiya en Thal 1960).

EIGEN ONDERZOEK

HOOFDSTUK 3

MATERIAAL EN METHODEN

3.1. Proefdieren, schema van bepalingen en observatieperiode

Proefdieren. Bij deze studie werden 30 gezonde beagles gebruikt (19 mannelijke en 11 vrouwelijke), die afkomstig waren van het Centraal Proefdierenbedrijf T.N.O. te Austerlitz. De gemiddelde leeftijd was bij de aanvang van het onderzoek 16 ± 0.5 maanden en het gewicht bedroeg 12.4 ± 0.3 kg (gemiddelde \pm 'standard error'). De dieren werden gehuisvest in hokken met een constante temperatuur, vochtigheidsgraad en dag/nachtritme.

Het voedsel bestond uit Canex[®] hondevoer (Hope Farms, Woerden), dat voor 25% uit eiwitten bestaat. Bij verminderde eetlust werd Pelsifood[®] (Trouw Veevoeder Fabrieken, Putten) gegeven, hetgeen 33% eiwitten bevat en beter door de honden werd geaccepteerd. Dagelijks werden water- en voedselopname gemeten en de honden werden éénmaal per week gewogen.

Schema van bepalingen. Eén week na aankomst van de honden in het laboratorium werd de cardiac output en de wiggedruk in een levervene gemeten (zie 4.2.). In de daaropvolgende week onderging ieder proefdier een laparotomie, waarbij de lever werd verkleefd met het diafragma en de laterale buikwand door middel van steriele talk. Tijdens deze laparotomie werd een naaldbiopsie van de lever genomen om preëxistent leverlijden uit te sluiten. Als essentiële onderdeel van dit onderzoek werd verder bij ieder proefdier wekelijks een percutane leverbiopsie genomen om de mate van levercelnecrose te vervolgen, totdat er in histologisch opzicht een stationaire toestand was bereikt. Soms echter was deze procedure gecontraïndiceerd (zie 4.3.). Hematologisch en biochemisch onderzoek van bloed en serum vond plaats in de eerste week na aankomst in het laboratorium, dat wil zeggen, vóór de eerste dosis dimethylnitrosamine en vervolgens éénmaal per week (zie 4.4.). Eveneens vóór de toediening van DMNA en daarna iedere drie tot vier weken werden de klaringen van antipyrine, propranolol en indocyaninegroen bepaald (zie 4.5.).

Bij metingen waarvoor narcose noodzakelijk was, werd de anesthesie ingeleid door intraveneuze toediening van fentanyl en droperidol. Na intra-tracheale intubatie werd de narcose voortgezet met een mengsel van N₂O en zuurstof met behulp van een Bennet respirator, zo nodig aangevuld met tubocurare en Pavulon[®].

Door de slechte conditie van sommige proefdieren tijdens de duur van het experiment konden niet alle metingen en bepalingen volgens schema plaatsvinden. Bovendien mislukten enkele metingen door technische problemen.

Observatieperiode. Het doel van deze studie was het bereiken van een toestand van "stabiele portale hypertensie". Onder "stabiel" werd verstaan dat er bij histologisch onderzoek van de leverbiopsieën geen tekenen van actief levercelverval meer te zien waren en dat de leverenzymen in het serum gedurende minimaal drie weken stationair bleven. Wanneer aan deze voorwaarden was voldaan, werd opnieuw hemodynamisch en histologisch onderzoek verricht, waarna de observatieperiode van het onderzoek voor deze dissertatie werd beëindigd.

Uit een proefstudie met zes honden, die voorafging aan dit onderzoek, was gebleken dat portale hypertensie opgewekt met dimethylnitrosamine, minstens een jaar na de laatste toediening van DMNA nog aanwezig was. Het leek daarom niet zinvol de observatieperiode te verlengen en experimenten waarin nieuwe operaties voor decompressie van portale hypertensie werden bestudeerd uit te stellen.

Alle resultaten van bepalingen in deze studie worden vermeld als gemiddelde \pm 'standaard error' (S.E.). Bij de statistische bewerking werd gebruik gemaakt van de Mann-Whitney U-toets voor ongepaarde groepen (Mann en Whitney 1947), de Wilcoxon "signed rank" toets voor gepaarde groepen (Siegel 1956) en de Pearson product-moment correlatiecoëfficiënt om correlaties aan te tonen. Deze toetsen werden uitgevoerd met een onbetrouwbaarheidsdrempel $\alpha = 0.05$.

3.2. Doseringsschema van dimethylnitrosamine

De dimethylnitrosamine werd geleverd door Eastman Kodak Comp. (Rochester, New York). De vloeistof werd in het donker opgeslagen bij een temperatuur van 4° C. DMNA werd voor intraveneuze toediening verdund met 5% glucosewater tot een oplossing die twee milligram per milliliter bevatte. Voor orale toediening werden gelatinecapsules gevuld met suiker, waaraan de juiste hoeveelheid DMNA werd toegevoegd.

De eerste dosis DMNA werd drie weken na aankomst in het laboratorium gegeven. Alle honden kregen gedurende drie weken twee milligram DMNA per kg lichaamsgewicht intraveneus toegediend op twee opeenvolgende dagen per week. Daarna werd het schema aangepast aan de individuele gevoeligheid van ieder proefdier voor de toxische werking van dimethylnitrosamine. Zo mogelijk werd tweemaal per week de standaarddosis gegeven. Redenen om van het schema af te wijken en één of meer toedieningen over te slaan waren één of meer van de volgende waarnemingen:

- necrose van meer dan 50% van de hepatocyten in de microscopische coupe van een leverbiopt
- een voedselopname van minder dan 100 g per dag gedurende de twee dagen voorafgaande aan de nieuw te geven dosis
- een stijging van de leverenzymen in het serum van meer dan 100% in het verloop van één week
- apathisch gedrag van het proefdier.

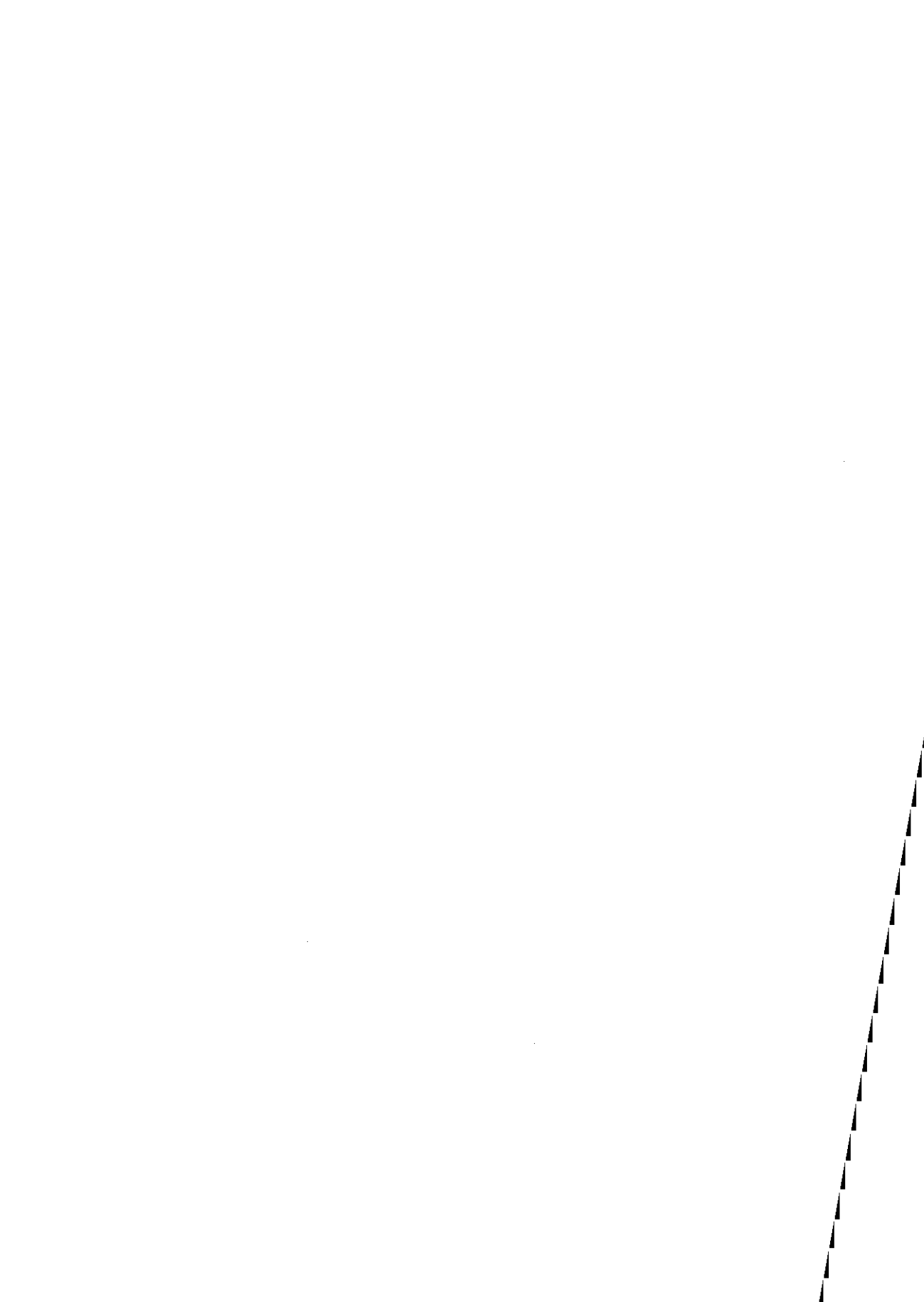
Wanneer een leverbiopsie gecontraïndiceerd was, waren de andere parameters beslissend voor het te volgen doseringsschema.

Toen bleek dat met intraveneuze toediening van totaal 24 ± 1 mg DMNA per kg lichaamsgewicht, gegeven in ongeveer 15 weken, de vereiste fibrosering en regeneratie over het algemeen niet in voldoende mate aanwezig was, werd op orale toediening per gelatinecapsules overgegaan. Eveneens in een dosering van 2 mg per kg lichaamsgewicht werd nu één- of tweemaal per week DMNA oraal gegeven, afhankelijk van de eerdergenoemde parameters, totdat de gewenste mate van necrose en fibrosering optrad.

3.3. Veiligheidsmaatregelen

Omdat dimethylnitrosamine een zeer toxische stof is die op velerlei manieren kan worden geresorbeerd, werd grote voorzichtigheid in acht genomen bij de bereiding en toediening van de doses. De bereiding van de oplossingen vond plaats in een zuurkast en bij de toediening werd steeds gebruik gemaakt van handschoenen en laboratoriumjassen.

Hoewel op grond van de literatuurgegevens de uitscheiding van DMNA in de urine en de faeces van de proefdieren nihil of zeer klein was, werd ieder contact met excreta tot 24 uur na de toediening vermeden. In deze periode werden geen bloedmonsters afgenomen of onderzoeken verricht.



RESULTATEN

4.1. Klinische gegevens

4.1.1. Klinisch beloop en symptomatologie

Op grond van het klinisch beloop konden de proefdieren in enkele groepen worden verdeeld (Tabel 2):

1. Honden met *acute leverinsufficiëntie*: ofschoon het in vele gevallen mogelijk bleek de dosering van DMNA aan te passen aan de gevoeligheid van het proefdier voor de hepatotoxische werking van DMNA door frequent leverbiopsieën te nemen, ontstond bij vijf honden een massale levercelnecrose. Acute leverinsufficiëntie was het gevolg en de dieren overleden comateus en ernstig icterisch, vijf tot negen weken na de eerste dosis DMNA. Toch was de totale hoeveelheid dimethylnitrosamine, die uitsluitend intraveneus aan deze honden was toegediend, veel lager dan de hoeveelheid die aan langer levende proefdieren was gegeven ($p < 0.01$).
2. Honden die overleden aan *complicaties*: vijf proefdieren overleden aan de gevolgen van het percutaan bioteren van de lever, terwijl één hond overleed ten gevolge van de toxische werking van DMNA op het slijmvlies van het maag-darmkanaal.
3. Honden met *chronische leverinsufficiëntie*: behalve de proefdieren die aan een zeer uitgebreide levernecrose overleden, was er een groep van zes honden die in de loop van drie tot vier maanden geleidelijk slechter werd wat betreft de leverfuncties. De eetlust nam af; er trad ascites op en icterus. De motoriek werd atactisch, de dieren werden suf en overleden in coma. Deze groep met chronische leverinsufficiëntie bleek bij histologisch onderzoek van de naaldbiopsen en het obductiemateriaal wel ernstige afwijkingen in de lever te hebben, maar geen massale levercelnecrose (zie 4.3.3.).
4. Honden met *stabiele portale hypertensie*: deze elf dieren bevonden zich ongeveer zeven maanden na de eerste dosis DMNA in een stabiele toestand: de voedselopname was redelijk, de hoeveelheid ascites leek niet toe te nemen en de bepalingen van de enzymen in het serum bleven stationair. Hoewel er in het leverbiopsaat een abnormale architectuur te zien was met uitgezette portale vaten, waren er weinig aanwijzingen voor actief levercelverval. De portale hypertensie werd door directe en indirecte meting aangetoond (zie 4.2.).

5. Honden die "resistent" waren tegen de toxische werking van DMNA: bij twee honden werd, ondanks grote hoeveelheden dimethylnitrosamine onvoldoende necrose en fibrose veroorzaakt, waardoor portale hypertensie uitbleef. Ook biochemisch hebben deze twee honden weinig tekenen van levercelnecrose doorgemaakt. Bij hemodynamisch onderzoek was de druk in het portale systeem dan ook normaal.

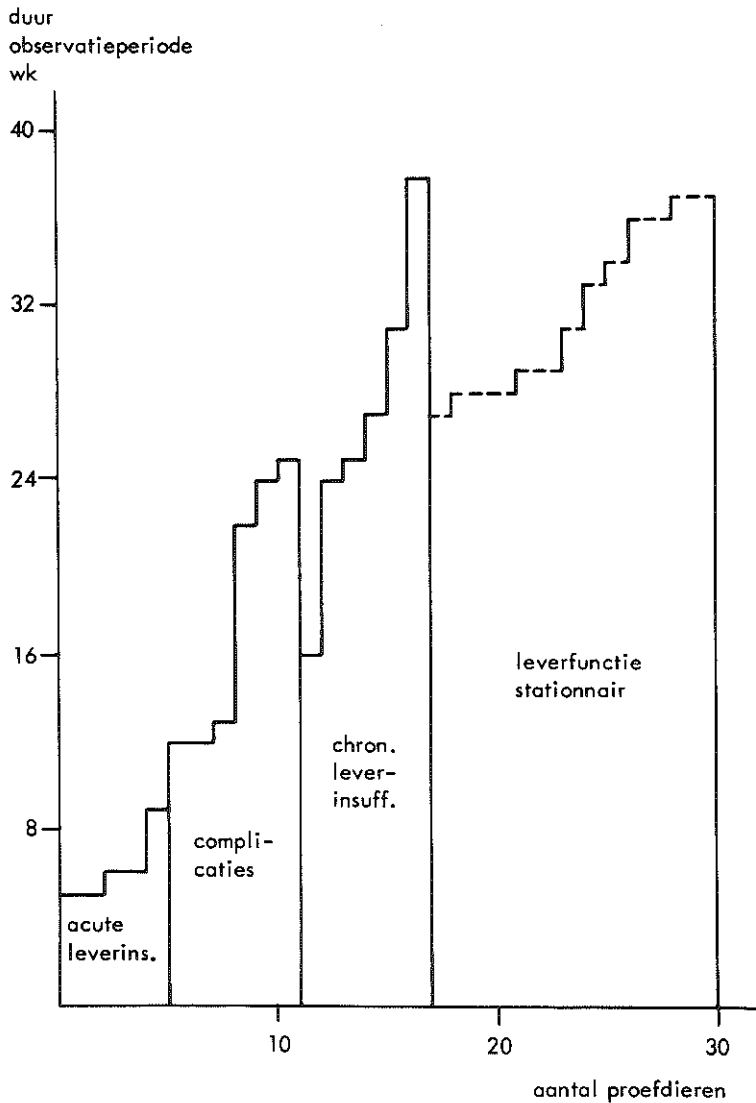
groep	n	duur obser- vatieperiode (wk)	totale hoef. DMNA (mg per kg L.G.)	
			i.v.	oraal
acute lever- insufficiëntie	5	6 ± 1	16.8 ± 0.8	--
complicaties	6	18 ± 3	26.4 ± 2.4	8.3 ± 3.8
chronische lever- insufficiëntie	6	27 ± 3	26.0 ± 1.6	5.7 ± 1.5
stabiele portale hypertensie	11	31 ± 1	23.1 ± 2.2	16.9 ± 2.0
resistente proefdieren	2	30 ± 1	24.0 ± 1.0	25.5 ± 1.0

Tabel 2. De verschillende groepen proefdieren, duur van de observatieperiode en hoeveelheid toegediende dimethylnitrosamine (gemiddelde ± S.E.).

De observatieperiode van de proefdieren in de laatste twee groepen werd na 31 ± 1 weken afgesloten met hemodynamische metingen bij laparotomie, gevolgd door een shuntoperatie. De overlevingsduur of duur van de observatieperiode per proefdier is weergegeven in Figuur 1.

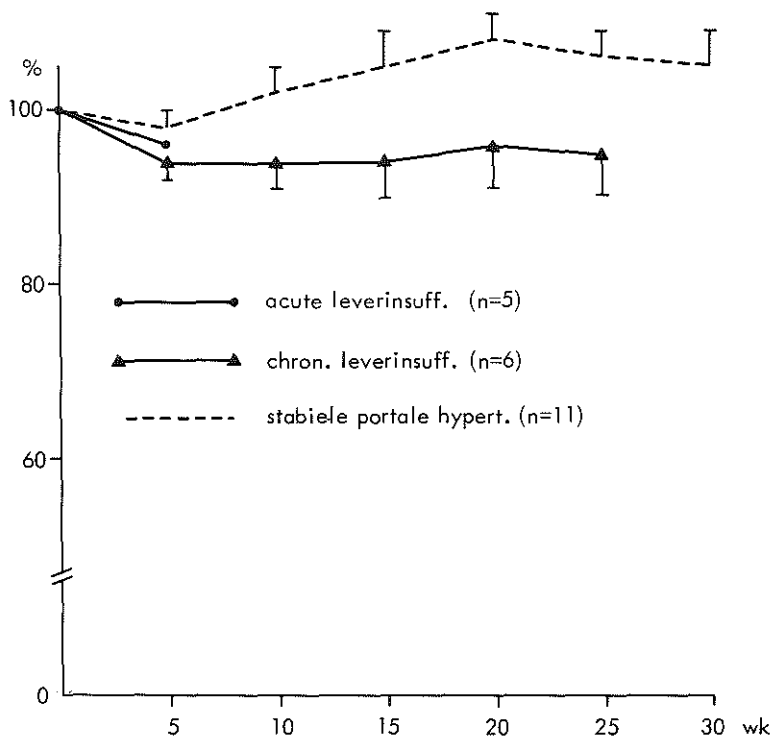
Symptomen

In de eerste vijf weken van de behandeling nam het *gewicht* van alle proefdieren af met 2-10%. Daarna nam het gewicht van de honden die later een stabiele portale hypertensie hadden weer toe tot ongeveer 5% boven het oorspronkelijke gewicht, terwijl de dieren met chronische leverinsufficiëntie onder het



Figuur 1. Overlevingsduur of observatieperiode per proefdier.

begin-gewicht bleven (Fig. 2). Het verschil tussen beide groepen was echter niet statistisch significant. Anorexie trad op zowel na orale als na intraveneuze toediening van DMNA, zodat een lokale werking op het maagslijmvlies niet de reden van de verminderde eetlust kon zijn. Hoewel er geen metingen van de spiermassa werden verricht, was vooral bij de honden met chronische leverinsufficiëntie de atrofie van de musculatuur opvallend. Het verlies aan spiermassa werd echter ge-



Figuur 2. Lichaamsgewicht van de proefdieren.

compenseerd door de vorming van *ascitesvocht*, hetgeen bij bijna alle honden plaatsvond. Veranderingen in het gewicht gaven daardoor geen goede informatie over de voedingstoestand van de proefdieren in dit experiment.

Om vast te stellen of ascites aanwezig was, werd de buik van iedere hond enkele malen per week door palpatie onderzocht. Bij progressieve toename van de hoeveelheid vocht werd tweemaal daags 12.5 milligram spironolacton (Aldactone A[®]) oraal gegeven. Slechts tweemaal werd paracentese verricht, omdat de extreem grote hoeveelheid ascitesvocht het dier kennelijk veel last bezorgde. Bij 20 van de 25 honden die langer leefden dan twee maanden na de eerste dosis DMNA was ascitesvocht voor het eerst bij lichamelijk onderzoek aantoonbaar in de achtste tot elfde week. De totale hoeveelheid dimethylnitrosamine die tot die periode was toegediend, bedroeg 14-20 mg per kilogram lichaamsgewicht.

Icterus kwam bij bijna alle honden voor (28/30), maar het tijdstip waarop voor het eerst gele sclerae te zien waren varieerde sterk. Bij honden met snel verslechterende leverfuncties trad icterus na vijf tot acht weken op en na een totale hoeveelheid DMNA van 12 tot 18 mg per kg lichaamsgewicht. Honden met een

minder snelle achteruitgang in leverfuncties werden pas icterisch na de twaalfde tot de achttiende week en hadden dan een totale hoeveelheid van 22 tot 32 mg per kilogram lichaamsgewicht gekregen. Wanneer de intraveneuze toediening van DMNA werd gestaakt en de dieren de fase van acute hepatitis overleefden, trad meestal een verbetering van de icterus op, totdat tijdens orale toediening van DMNA opnieuw icterus ontstond die nu echter van blijvende aard was. Slechts twee honden werden in het geheel niet icterisch, ofschoon bij hen biochemisch wel een lichte hyperbilirubinemie kon worden vastgesteld.

Encephalopathie. De meeste honden vertoonden tijdens het verloop van dit onderzoek in meer of mindere mate afwijkingen van het normale gedragspatroon. De opvallendste gedragsstoornissen werden gezien bij honden met ernstige leverinsufficiëntie. Als deze leverinsufficiëntie zich vrij acuut voordeed werd de hond apathisch en reageerde niet meer op lichte pijnprikkels, waarna hij binnen enkele dagen comateus werd en overleed. Anders was het verloop bij een geleidelijke achteruitgang in leverfuncties. Dan manifesteerde de encephalopathie zich door spontane aanvallen van agitatie en een licht gestoorde motoriek. Het volgende stadium werd gekenmerkt door ataxie en een toegenomen speekselsecretie. Wanneer de leverfuncties dan niet verbeterden, trad er een daling van het bewustzijn op, die in de loop van enkele weken ernstiger werd. Soms werd in dit stadium een terugkeer naar de normale toestand van bewustzijn gezien, maar wanneer de vocht- en voedselopname onvoldoende was raakte het dier in coma en overleed of moest worden opgeofferd.

4.1.2. Complicaties

Zes proefdieren overleden aan de gevolgen van de leverbiopsieën of van de directe werking van dimethylnitrosamine op het slijmvlies van het maagdarmlkanaal. Twee van deze dieren kregen namelijk in aansluiting op een percutaan genomen leverbiopsie een ernstige intra-abdominale bloeding, waaraan beiden korte tijd later overleden. Bij de ene hond werd een gat in een levervene, vlak bij de inmonding in de vena cava gevonden, terwijl bij de andere hond een bloeding uit het leverkapsel de oorzaak van overlijden was. Deze zou waarschijnlijk niet lethaal zijn verlopen als er een normaal stollingsmechanisme aanwezig was geweest. Er bestond echter een thrombopenie ($54 \times 10^9/l$), zodat biopteren gecontraïndiceerd was. Dit gegeven werd helaas pas bekend nadat de biopsie was genomen.

Een andere complicatie met dodelijke afloop was een ernstige hemobilie na leverpunctie bij een hond met een licht verlengde thrombotest (25 seconden, normaal 18 seconden). Twee andere proefdieren overleden doordat tijdens het biopteren van de lever de galblaas werd geperforeerd, waarna een gallige peritonitis ontstond.

Slechts één hond overleed aan een bloeding in de tractus digestivus die niet

in verband stond met een punctie van de lever. Bij deze hond trad twee dagen na een orale toediening van twee milligram dimethylnitrosamine per kilogram lichaamsgewicht een uitgebreide melaena op, die bij obductie bleek te berusten op bloedingen uit multipole ulcera in het duodenum en jejunum. De totale hoeveelheid DMNA die dit dier had gekregen verschilde niet van de hoeveelheid die toegediend was aan de langer levende honden.

4.1.3. Discussie

Het is niet verwonderlijk dat een aanzienlijk aantal proefdieren in het verloop van de studie is overleden. Wanneer men probeert portale hypertensie in proefdieren op te wekken door een toxische hepatitis te induceren, moet men rekening houden met het feit dat verschillende gradaties van leverinsufficiëntie optreden, uiteenlopend van passagère hepatitis tot gedecompenseerde cirrose. Deze situatie is geheel vergelijkbaar met de humane pathologie. Enkele dieren, die het stadium van acute hepatitis overleefden, overleden maanden later in coma aan een chronische leverinsufficiëntie. Zelfs honden die aan het einde van de observatieperiode betrekkelijk stabiele leverfuncties hadden bleven zeer kwetsbaar voor allerlei invloeden, zoals veranderingen in dieet, hypotensie, narcose etc.

De variatie in gevoeligheid voor de toxische werking van dimethylnitrosamine, die ook optrad in een vrij homogene groep proefdieren zoals de gebruikte beagles, kan worden verklaard uit de veelheid van factoren die de hoeveelheid necrose en de mate van regeneratie bepalen.

De ernst van de levercelbeschadiging zal afhangen van:

- de snelheid van omzetten van DMNA in actieve metabolieten
- de inactivatie van deze metabolieten door de hepatocyt
- de regeneratiecapaciteit van de lever
- de functionele capaciteit van de Kupffercellen als bescherming tegen endotoxinen.

De twee honden die min of meer resistent waren voor de hepatotoxische werking van dimethylnitrosamine vormen een interessant probleem. Eén verklaring zou kunnen zijn dat ze niet voldoende enzymen hadden om alle DMNA om te zetten in actieve metabolieten. Een andere mogelijkheid is dat de eerste toedieningen van DMNA een blijvende beschadiging van de enzymen veroorzaakten, die nodig zijn voor het metaboliseren van dimethylnitrosamine.

4.2. Hemodynamische metingen

4.2.1. Inleiding

Om aan te tonen dat portale hypertensie aanwezig was, werd de druk direct

in de vena portae gemeten. Door middel van meting van de wiggedruk in een levervene kon de plaats van de drukverhoging gelokaliseerd worden. Bovendien werd de flow in de vena portae en de arteria hepatica gemeten om na te gaan hoe de bloeddoorstroming van de lever veranderde door toediening van dimethylnitrosamine. De aanwezigheid van een toegenomen collaterale flow tussen de vena portae en de vena cava werd bepaald met de ammoniakbelastingtest. Omdat patiënten met levercirrose een verhoogde cardiac output kunnen hebben, werd bij de honden met portale hypertensie eveneens de cardiac output gemeten.

4.2.2. Methoden

Bij alle proefdieren werd de wiggedruk in een levervene en de cardiac output bepaald vóór de eerste DMNA-toediening. Contrôle-waarden voor de flow door de vena portae en de arteria hepatica, de druk in de vena portae en de ammoniakbelastingtest, werden verkregen door metingen bij gezonde beagles van vergelijkbare leeftijd en gewicht. Deze laatste metingen werden niet bij die honden verricht die later met dimethylnitrosamine werden behandeld om adhesies rondom bloedvaten in de leverhilus te vermijden. Latere operaties voor decompressie van de portale hypertensie zouden hierdoor worden bemoeilijkt.

De hemodynamische metingen werden herhaald wanneer het proefdier in een stabiele toestand verkeerde. Dat hield in dat na het staken van de DMNA de leverenzymen gedurende drie tot vier weken stationair bleven en bij histologisch onderzoek van de leverbiopsieën geen of weinig tekenen van actief levercelverval meer werden gezien. Bovendien moest de conditie van het proefdier zodanig zijn, dat het de narcose kon doorstaan. Dit was het geval bij 13 proefdieren, 26-36 weken na de eerste dosis en zes tot zeven weken na de laatste DMNA-toediening.

Wiggedrukmeting in een vena hepatica

Bij het proefdier werd onder narcose via een huidincisie in de lies de vena femoralis vrijgeprepareerd. Dit bloedvat werd gepuncteerd en een angiografiecatheter (cobracatheter nr. 3, Cordis) werd onder doorlichting opgevoerd in de vena cava inferior. Daarna werd de catheter zover mogelijk in een vena hepatica opgevoerd. De wiggepositie werd gecontroleerd door een kleine hoeveelheid contrastvloeistof in te spuiten. Wanneer de contrastvloeistof stagneerde en niet wegliep door de gecatheteriseerde vene werd de positie van de catheter geaccepteerd (Foto 1). De druk werd gemeten met een transducer (type AE 840, AME) en na versterking (Hewlett Packard 8805 B) geregistreerd door een meerkanalige schrijver (Elema, Siemens). Daarna werd de catheter enkele centimeters teruggetrokken totdat hij vrij in de levervene lag en de druk werd opnieuw gemeten. Het verschil tussen beide waarden werd de gecorrigeerde wiggedruk genoemd. Deze procedure werd herhaald waarna het gemiddelde van de twee waarden werd berekend.

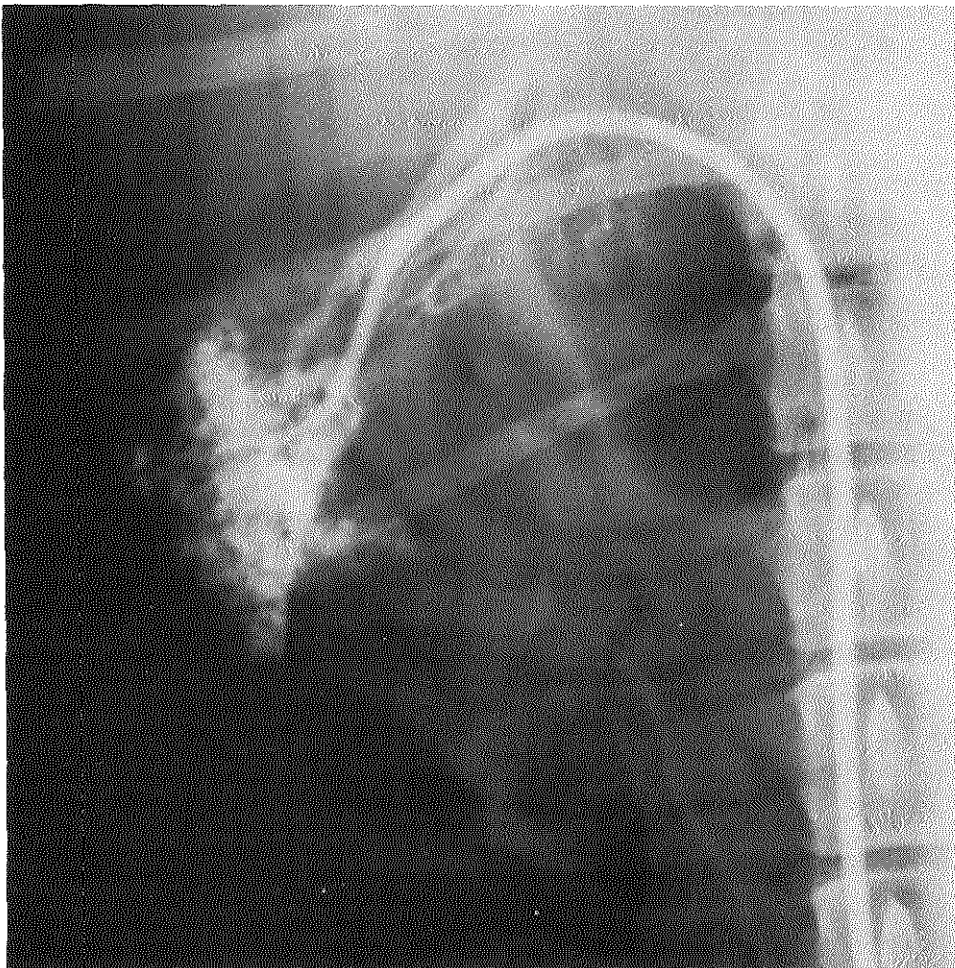


Foto 1. De catheter in de vena hepatica ligt in wiggepositie bij een proefdier met portale hypertensie.

Meting van de cardiac output

Onder narcose werd via een punctie in de vena femoralis een Swan-Ganz[®] thermodilutiecatheter (93A-118-7F, Edwards Laboratories, Inc., Santa Ana, Cal.) onder doorlichting opgevoerd. Na passage door het rechter atrium en ventrikel werd het uiteinde van de catheter in een tak van de arteria pulmonalis gelegd. Met contrastmateriaal werd de ligging van de catheter geverifieerd. De cardiac output werd bepaald door aan het einde van een expiratie vijf millimeter van een 5% glucose-oplossing van 1° Celcius in te spuiten door een zijdelingse opening in de catheter, die 30 centimeter van de punt verwijderd was. De lichaamstemperatuur

werd continu gemeten door middel van een thermometer in de oesophagus. Bij de berekening werd gebruik gemaakt van een cardiac output-computer (type 9510, Edwards Laboratories, Inc.). Deze meting werd vijfmaal uitgevoerd en het gemiddelde van de vijf waarden werd berekend.

Drukmeting in de vena portae

Tijdens laparotomie werd de vena portae gepuncteerd en door middel van een transducer (type AE 840, AME) werd de druk gemeten. Dat gebeurde op dezelfde manier in de vena cava inferior. Het verschil tussen beide waarden leverde de portale druk op. Deze metingen werden in duplo uitgevoerd en vervolgens werd het gemiddelde berekend.

Flowmeting van vena portae en arteria hepatica

Eveneens tijdens laparotomie werd de flow in de vena portae electromagnetisch gemeten door middel van een perivasculaire electrode (Transflow 600, Skalar, Delft). De apparatuur werd geïjkt door het vat tijdelijk af te klemmen met vaatklemmen. De flow in de arteria hepatica werd gemeten door een electrode om de arteria hepatica te plaatsen, distaal van de afsplitsing van de arteria gastroduodenalis. Ook nu werden de metingen in duplo uitgevoerd en het gemiddelde berekend.

Ammoniakbelastingtest

Bij het nuchtere proefdier werd door een maagsonde 0.1 gram ammoniumchloride (NH_4Cl) per kilogram lichaamsgewicht toegediend. Door een grote voorpootsvene te punteren werden bloedmonsters afgenomen vlak voor de NH_4Cl -toediening en 30, 60, 120 en 180 minuten erna. Vijf milliliter bloed werd op elk van deze tijdstippen opgevangen in een buisje, gekoeld met ijs, waarna het bloedmonster direct werd gecentrifugeerd. Het ammoniakgehalte werd bepaald volgens de enzymatische methode (Da Fonseca-Wollheim 1973).

4.2.3. Resultaten

In Tabel 3 staan de belangrijkste hemodynamische gegevens vermeld. Twee van de 13 honden die alle hemodynamische metingen ondergingen na het beëindigen van de DMNA-toediening, hadden een normale wiggedruk in de vena hepatica (resp. 3.5 en 3 mm Hg). Dit was niet verwonderlijk aangezien de biopsieën van de lever bij deze twee proefdieren weinig veranderingen lieten zien, ondanks een grote hoeveelheid dimethylnitrosamine. Ook de direkt gemeten druk in de vena portae was bij deze honden normaal (resp. 8 en 5 mm Hg). Bij de verdere hemodynamische en biochemische bepalingen zijn deze twee proefdieren buiten beschouwing gelaten, omdat er geen sprake was van portale hypertensie. De overige

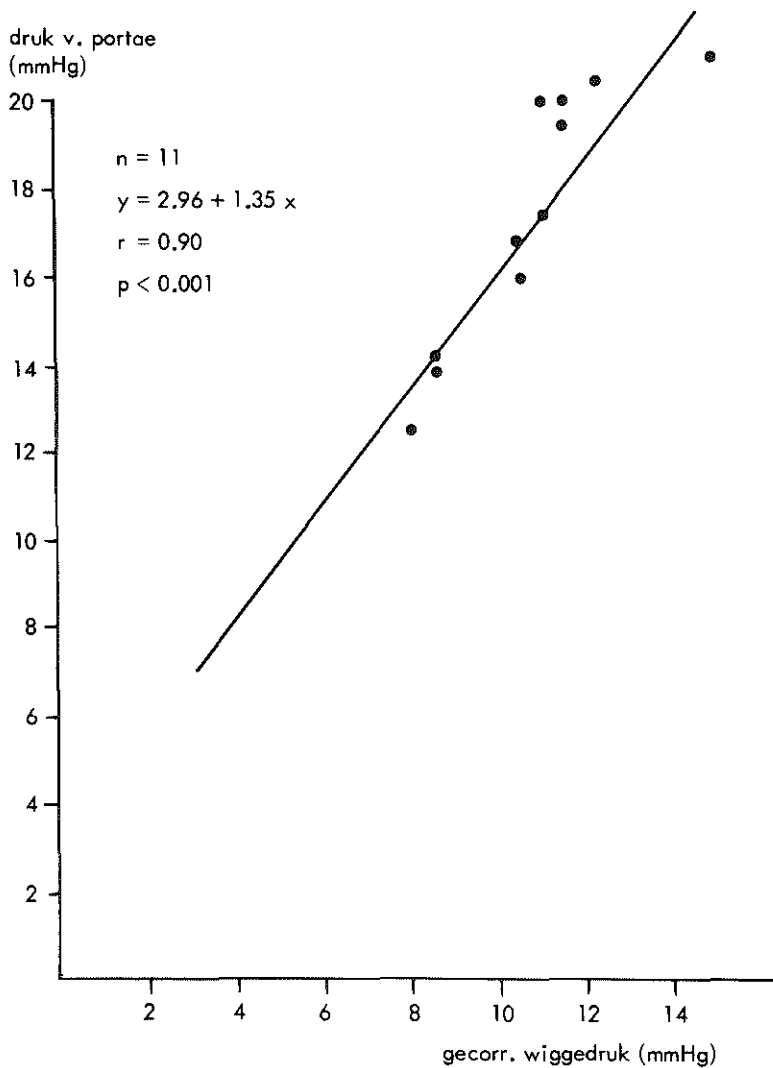
	n	vóór DMNA	n	na DMNA	% verandering t.o.v. waarden vóór DMNA
gecorr. wiggedruk v. hepatica (mm Hg)	11	3.1 ± 0.3	11	10.9 ± 0.6	252 % ↑ p < 0.001
direkte druk v. portae (mm Hg)	10	6.6 ± 0.8	11	17.3 ± 0.9	162 % ↑ p < 0.001
cardiac output (ml/min. kg)	10	163 ± 16	10	205 ± 17	26 % ↑ p < 0.05
flow v. portae (ml/min. kg)	8	23.9 ± 1.0	10	13.6 ± 1.2	43 % ↓ p < 0.001
flow a. hepatica (ml/min. kg)	8	8.4 ± 0.9	10	9.7 ± 1.4	15 % ↑ n.s.
totale lever- doorstroming (ml/min. kg)	8	32.2 ± 1.8	10	23.2 ± 1.3	28 % ↓ p < 0.01

Tabel 3. Hemodynamische veranderingen in de groep proefdieren met stabiele portale hypertensie (gem. ± S.E.).

elf proefdieren vertoonden ten opzichte van de uitgangswaarde een duidelijke verhoging van de wiggedruk in een levervene, hetgeen bij direkte meting van de druk in de vena portae werd bevestigd. Er bestond een goede correlatie tussen de druk in de vena portae en de wiggedrukmeting (Fig. 3).

Bij laparotomie werd bij tien van de elf proefdieren met portale hypertensie ½ - 1 liter ascites aangetroffen. De lymfvaten in het mesenterium en in de hilus waren uitgezet en er was duidelijke stuwung in de portale vaten, zoals bleek uit de toegenomen veneuze collateralen in het mesenterium, rond de maag en retroperitoneaal (Foto 2). De lever was kleiner dan normaal, had een vaste consistentie en een fijnkorrelig oppervlak. De milt was bij de helft van de honden met portale hypertensie vergroot.

De meting van de cardiac output bij tien honden met portale hypertensie gaf een enigszins wisselend beeld te zien (Fig. 4). Bij twee van hen werd een af-



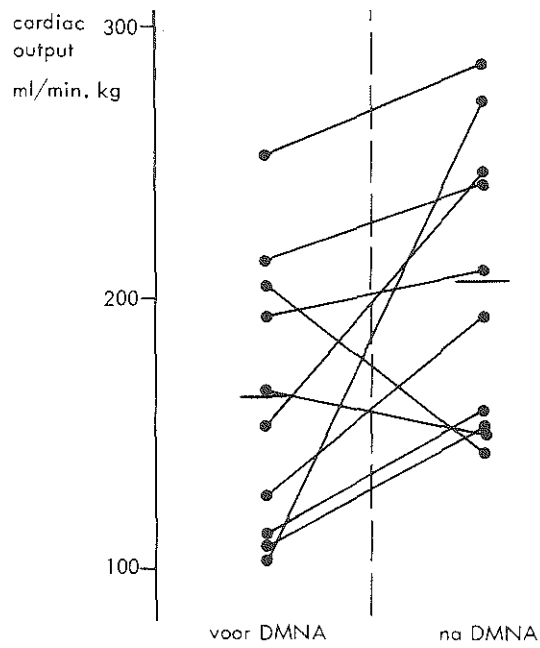
Figuur 3. De regressielijn en de correlatiecoëfficiënt van de gecorrigeerde wiggedruk in een levervene en de druk in de vena portae.

name van respectievelijk 11 en 30% ten opzichte van de waarde vóór de toediening van DMNA gemeten, maar bij de overige acht proefdieren was de cardiac output toegenomen met gemiddeld 47%.

De flow in de vena portae was bij tien proefdieren met portale hypertensie gemiddeld 43% lager dan bij acht normale honden, terwijl de flow in de arteria



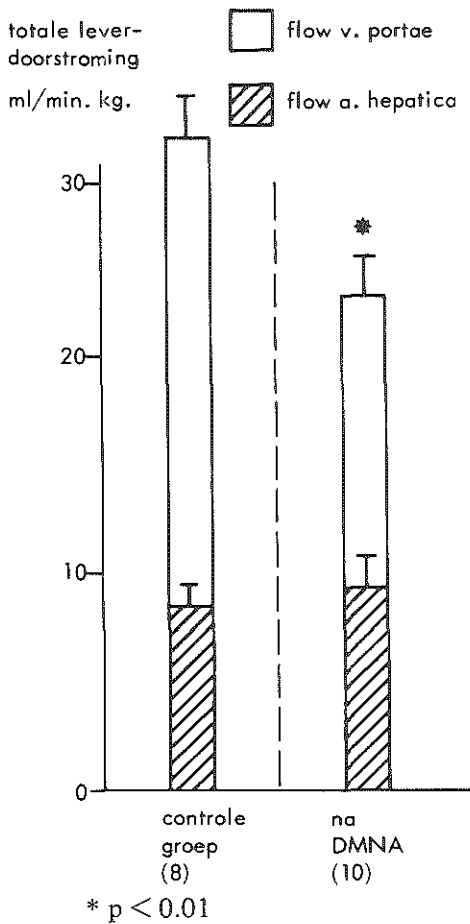
Foto 2. Collaterale veneuze circulatie retroperitoneaal bij een proefdier met portale hypertensie.



Figuur 4. Meting van de cardiac output vóór en na DMNA-toediening.

hepatica niet was veranderd (Fig. 5). Hierdoor was de totale leverdoorstroming bij de honden met portale hypertensie 28% minder dan bij de honden uit de controlegroep. Wel was relatief gezien het aandeel van de arteria hepatica in de totale leverdoorstroming belangrijker geworden: 42% bij de honden met portale hypertensie ten opzichte van 26% in de controlegroep ($p < 0.01$).

De ammoniakbelastingtest met bepalingen in het veneuze bloed was bij de honden met portale hypertensie gestoord (Tabel 4). De spiegel in het veneuze bloed was reeds verhoogd vóór de toediening van NH_4Cl , maar dit verschil, vergeleken met de uitkomsten in een groep van vijf normale honden, werd na de toediening hiervan nog groter. In de controlegroep was het ammoniakgehalte 60 minuten na de toediening van NH_4Cl weer tot de beginwaarde gedaald, maar bij de

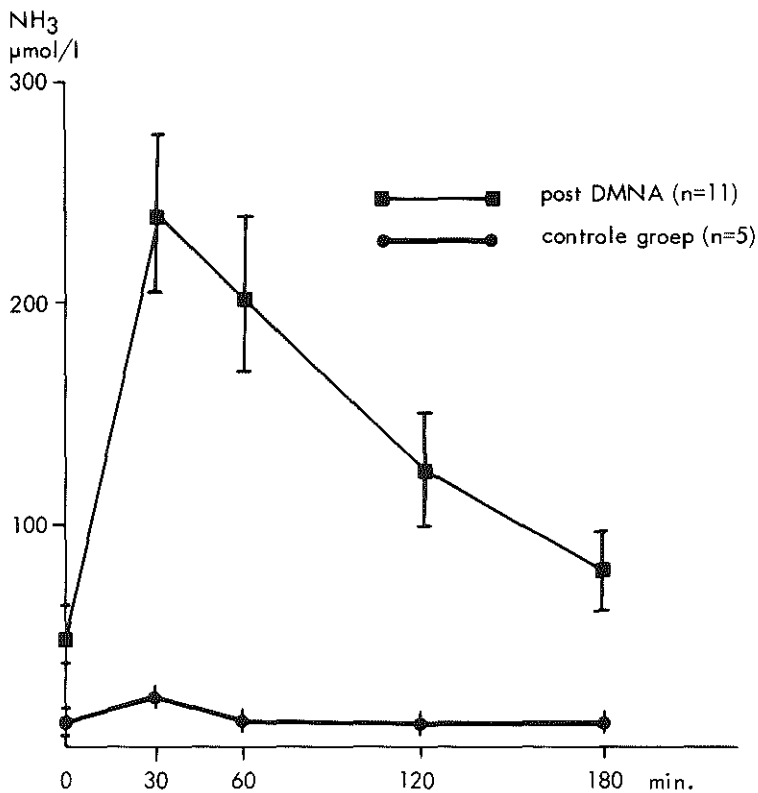


Figuur 5. Flowmeting van de arteria hepatica en de vena portae (gem. \pm S.E.).

	normale honden (n = 5)	honden met portale hypertensie (n = 11)
NH_3 ($\mu\text{mol/l}$)		
0 min.	12.8 \pm 0.6	54.3 \pm 12.3
30 min.	21.4 \pm 0.9	240.5 \pm 35.7
60 min.	11.4 \pm 0.6	202.6 \pm 37.5
120 min.	10.6 \pm 1.1	125.6 \pm 26.0
180 min.	10.2 \pm 1.4	80.3 \pm 19.1

Tabel 4. Ammoniakbelastingtest (gem. \pm S.E.).

honden met portale hypertensie werd de uitgangswaarde pas na 180 minuten of later bereikt (Fig. 6).



Figuur 6. Ammoniakbelastingtest bij de honden met stabiele portale hypertensie (gem. \pm S.E.).

4.2.4. Discussie

Om portale hypertensie aan te tonen kan men gebruik maken van directe of indirecte meetmethoden. In dit experiment werd gebruik gemaakt van een indirecte methode zoals de wiggedrukmeting in een levervene en van een directe methode, namelijk drukmeting in de vena portae bij laparotomie.

De druk welke geregistreerd wordt aan het einde van een catheter die in wiggepositie in een levervene ligt, is een goede maat voor de druk in de sinusoiden. De gecorrigeerde wiggedruk bedraagt bij gezonde mensen 0-4 mm Hg (Bynum 1973). Met wiggedrukmeting kan een onderscheid gemaakt worden tussen portale hypertensie door een presinusoidale oorzaak en portale hypertensie op basis van

sinusoïdale pathologie. Bij cirrose is de wiggedruk verhoogd, terwijl deze bij portale hypertensie door bijvoorbeeld schistosomiasis of thrombose van de vena portae (presinusoïdaal) normaal is (Viallet e.a. 1970, Sherlock 1975). De verhoogde wiggedruk bij de proefdieren met portale hypertensie wijst erop dat de veranderingen door dimethylnitrosamine plaats vonden op het niveau van de sinusoïden. De twee proefdieren met geringe histologische afwijkingen hadden geen verhoogde wiggedruk en evenmin een verhoogde druk bij directe meting in de vena portae. Hoewel het waarschijnlijk is dat sommige van de honden die overleden aan chronische leverinsufficiëntie eveneens portale hypertensie hadden, werden bij deze dieren geen hemodynamische metingen verricht, omdat de lichamelijke toestand te slecht was. Slechts bij één hond uit deze groep werd de wiggedruk gemeten: die bedroeg 8.5 mm Hg en was dus verhoogd.

Uit een vóóronderzoek bij zes honden was gebleken, dat portale hypertensie, opgewekt door toediening van dimethylnitrosamine, minstens één jaar na de laatste dosis nog aanwezig was. Het is daarom aannemelijk dat de portale hypertensie die in dit experiment werd geconstateerd bij 11 van de 13 honden die biochemisch en histologisch in een "rustige" fase verkeerden, zes tot zeven weken na de laatste DMNA-dosis, geen tijdelijk verschijnsel is.

De goede correlatie tussen de portale druk en de wiggedruk, aangetoond in dit experiment, is in overeenstemming met de bevindingen bij patiënten met cirrose (Reynolds e.a. 1970).

Electromagnetische flowmeting bij de proefdieren met portale hypertensie toonde aan dat de portale flow bijna de helft was van die bij normale honden. Aangezien uit wiggedrukmetingen bleek dat de druk in de sinusoïden verhoogd was, volgt hieruit dat in het DMNA-model de weerstand voor de portale flow verhoogd was op sinusoïdaal niveau. Deze waarnemingen komen overeen met studies bij patiënten met levercirrose (Preisig e.a. 1972). Compensatie voor een verminderde portale flow door toename van de flow in de arteria hepatica werd in dit experiment niet gevonden. Dit staat in tegenstelling tot resultaten van experimenten bij ratten met portale hypertensie, waarbij wel een toename in arteriële flow bij afname van de portale flow werd gemeten (Thiel 1977). Ook de mens beschikt over een compensatiemechanisme van de arteria hepatica, waardoor de totale leverdoorstroming constant blijft bij veranderingen in de portale flow (Burchell e.a. 1976). Het is echter niet waarschijnlijk dat dit mechanisme ook bij een grote vermindering van de portale flow nog effectief is (Lautt 1977).

Patiënten met levercirrose hebben vaak een verhoogde cardiac output door een complex van factoren. Behalve een toegenomen circulerend volume en een verlaagde arteriële zuurstofspanning is een verminderde perifere weerstand van belang (Martini e.a. 1972). Bij de meeste proefdieren met portale hypertensie door DMNA werd eveneens een toename van de cardiac output vastgesteld.

Eén van de gevolgen van portale hypertensie is de vorming van veneuze colla-

teralen tussen het portale vaatbed en het stroomgebied van de vena cava. De orale ammoniakbelastingtest is een goede methode om deze collaterale circulatie aan te tonen (Conn 1973, Meyer e.a. 1978). Omdat ammoniak behalve in de lever, ook in de spieren, de hersenen en de nieren kan worden omgezet, verdient het de voorkeur de ammoniakspiegels in het arteriële bloed te bepalen (Gips 1968). In dit experiment werd echter om praktische redenen afgezien van herhaaldelijke arteriepuncties en werden de bepalingen in veneus bloed uitgevoerd. Ook in deze uitvoering van ammoniakbelastingtest werd bij alle honden met portale hypertensie een sterke stijging van het ammoniakgehalte in het bloed gevonden, die 30 minuten na de toediening van NH_4Cl maximaal was. Dit wijst op een uitgebreide portosystemische collaterale circulatie.

Uit de resultaten van de metingen die in dit hoofdstuk zijn beschreven blijkt duidelijk, dat de portale hypertensie door DMNA bij de hond geïnduceerd, in hemodynamisch opzicht belangrijke overeenkomsten vertoont met portale hypertensie door levercirrose bij de mens.

4.3. Pathologisch-anatomisch onderzoek

4.3.1. Inleiding

Alleen door histologisch onderzoek van de lever kan de diagnose "portale hypertensie op basis van intrahepatische afwijkingen" worden bevestigd. Hoewel mondiaal gezien schistosomiasis de meest voorkomende oorzaak van portale hypertensie is (Popper 1977), heeft de chirurg in de westerse wereld het meest te maken met portale hypertensie ten gevolge van cirrose. Er bestaat echter veel verwarring over de definitie en de indeling van de verschillende vormen van cirrose omdat in de terminologie pathogenese, morfologie en etiologie door elkaar gebruikt worden. Cirrose kan het best gedefinieerd worden naar morfologische criteria, maar er is geen enkele definitie die niet een nadere toelichting vereist (Anthony e.a. 1978).

Er zijn weinig publikaties over de histologische veranderingen die in de lever ontstaan wanneer dimethylnitrosamine vele malen achtereen met korte tussenpozen wordt toegediend. De meeste auteurs beschrijven de levercelnecrose die optreedt door één- of tweemaal een grote hoeveelheid DMNA te geven of de maligne tumoren die ontstaan door maandenlange toediening van kleinere doses (Druckrey e.a. 1967, Crosby en Sawyer 1976). Madden e.a. (1970) gaven een summier overzicht van de histologische veranderingen door intermitterende orale toediening van dimethylnitrosamine, waardoor bij enkele honden het beeld van een cirrose ontstond.

De overeenkomst met de humane pathologie is één van de eisen waaraan een experimenteel model van portale hypertensie moet voldoen. In de volgende para-

grafen worden de macroscopische en microscopische bevindingen bij de honden die met dimethylnitrosamine werden behandeld, beschreven.

4.3.2. Methoden

4.3.2.1. Percutane leverbiopsie

Om de hoeveelheid dimethylnitrosamine aan te passen aan de individuele gevoeligheid van het proefdier werd gebruik gemaakt van frequente percutane biopsieën van de lever. Bij alle proefdieren werd twee weken vóór de eerste DMNA-toediening de lever verkleefd met het diafragma en de laterale buikwand om de kans op bloedingen na de puncties te verminderen. Dit gebeurde door bij een laparotomie steriele talk achter te laten tussen de lever en de buikwand, cq. het diafragma.

In principe werd wekelijks een percutane leverbiopsie genomen te beginnen in de derde week van de DMNA-toediening, dus wanneer het proefdier al viermaal 2 mg DMNA per kg lichaamsgewicht had gekregen.

Een contraindicatie voor een leverbiopsie was een Thrombotest[®] langer dan 25 seconden (normaal 18 seconden) of een trombocytenaantal dat lager was dan $100 \times 10^9/l$.

De biopten werden percutaan genomen door de negende intercostaalruimte rechts in de axillairlijn. Na infiltratie van de huid en subcutane weefsels met een 1 %-oplossing van lidocaïne, kon met een Tru-cut[®] biopsienaald (Travenol Laboratories inc., Deerfield Ill.) een pijpje leverweefsel worden verkregen. Ruim de helft van de biopsieën werd verricht na sedatie van het proefdier met een intramusculaire injectie met xylazaïne (Rompun[®]) in een dosering van 2 mg per kg lichaamsgewicht, gecombineerd met 0.5 mg atropine.

De definitieve histologische diagnose werd aan het eind van het experiment of bij obductie bevestigd door onderzoek van een wigexcisie uit de rechter- en linker leverkwab.

4.3.2.2. Obducties

Bij alle proefdieren, die tijdens dit onderzoek overleden, werd obductie verricht. Hierbij werd vooral gelet op de volgende punten:

- icterische slijmvliezen
- hoeveelheid ascitesvocht
- veneuze collateralen
- grootte, oppervlak en consistentie van de lever
- gewicht van de lever

Bij alle proefdieren werd een ruime wigexcisie uit de rechter- en de linkerle-
verkwab genomen. Tevens werd bij enkele dieren een deel van de milt en het
sternum verwijderd voor histologisch onderzoek.

4.3.2.3 *Histologische kleuringen*

Onmiddellijk na het nemen van een biopsie werd het verkregen weefsel in een gebufferde 10% formaline-oplossing gelegd. Na fixatie van het specimen werden paraffinecoupes vervaardigd waarop de volgende kleuringen werden toegepast:

- haematoxyline, azofloxine en saffraankleuring (HAS-kleuring)
- reticulinekleuring volgens Gomori
- periodic-acid-Schiffkleuring (PAS-kleuring)
- PAS-kleuring na voorbehandeling met diastase
- ijzerkleuring volgens Perl
- elastinekleuring volgens Gieson-Lawson

4.3.2.4. *Beoordeling van de microscopische preparaten*

De coupes van de lever werden beoordeeld naar de volgende kenmerken:

- de mate van actief levercelverval
- de mate van degeneratieve afwijkingen
- de omvang van de mesenchymale reactie
- de hoeveelheid fibrose
- de breedte van de portale vaten.

De afwijkingen werden semikwantitatief geklassificeerd als gering, matig of ernstig. Alleen de mate van actief levercelverval werd iets nauwkeuriger omschreven. Wanneer minder dan 25% van de hepatocyten in de coupe necrotisch was, werd de hoeveelheid actief levercelverval bepaald als graad 1. In graad 2 was 25-50% van de hepatocyten necrotisch en in graad 3, 50-75% van de hepatocyten. Wanneer 75-100% van de levercellen necrotisch was, werd dit gedefinieerd als graad 4. Tevens werden de coupes onderzocht op de aanwezigheid van regeneratienoduli en verstoring van de architectuur van de lever.

4.3.3. *Resultaten*

4.3.3.1. *Leverbiopsieën*

In totaal werden 214 percutane leverbiopsieën genomen, hetgeen neerkomt op gemiddeld 7.1 biopsieën per proefdier (met een spreiding van 1-14). De mortaliteit ten gevolge van de percutane leverbiopsie in dit experiment was 2.3%, want als direct gevolg van deze procedure overleden vijf proefdieren (zie 4.1.2.).

4.3.3.2. *Obducties*

De bevindingen bij de proefdieren die overleden aan complicaties van de leverbiopsieën zijn reeds genoemd in 4.1.2. Van de honden die overleden ten ge-

volge van acute of chronische leverinsufficiëntie staan de belangrijkste macroscopische bevindingen vermeld in Tabel 5.

	acute lever- insufficiëntie (n = 5)		chronische lever- insufficiëntie (n = 6)	
slijmvliezen	icterisch	(5/5)	icterisch	(6/6)
ascites	minimaal	(4/5)	1-2 liter	(5/6)
veneuze collateralen	afwezig	(4/5)	aanwezig	(5/6)
levergrootte	vergroot	(4/5)	verkleind	(6/6)
oppervlak lever	glad	(5/5)	gegranuleerd	(6/6)
consistentie lever	week	(5/5)	vast	(5/6)
gewicht lever (g.)	394 ± 23.8		201 ± 29.8*	
gewicht lever (% van lichaamsgewicht)	3.5 ± 0.2		2.1 ± 0.3*	

* t.o.v. proefdieren met acute leverinsufficiëntie: $p < 0.01$.

Tabel 5. Macroscopische bevindingen bij obductie van de proefdieren met acute of chronische leverinsufficiëntie.

4.3.3.3. Histologische veranderingen door dimethylnitrosamine

In verband met de per proefdier verschillende reacties op dimethylnitrosamine bleek aanvankelijk een samenvatting van de histologische resultaten een vrij moeilijk onderdeel van dit onderzoek. Gedurende een bepaald tijdsverloop kan men wel een aantal histologische stadia van leverafwijkingen onderscheiden, maar een scherpe begrenzing van de ene fase ten opzichte van de andere is vaak moeilijk te maken; de stadia lopen in elkaar over. Wanneer men ter wille van de duidelijkheid toch een chronologische indeling maakt, zijn er de volgende stadia te zien:

I. Lobulaire hepatitis (acute hepatitis)

- a) beginfase
- b) actieve fase
- c) vroege herstelfase (lobulaire hepatitis van langere duur)
- d) late herstelfase

II. Restverschijnselen

- a) postnecrotische fibrose
- b) cirrose

Ia. Beginfase van lobulaire hepatitis

De eerste tekenen van levercelbeschadiging zijn degeneratieve veranderingen

in de hepatocyten rond de vena centralis. Deze degeneratie kan op twee manieren tot uiting komen. Er kan een hydropische zwelling van de cellen optreden ("ballooning"), waarbij de cellen twee- tot driemaal in omvang toenemen. Het cytoplasma is fijnkorrelig, bleek, bijna homogeen en de kern is vergroot met één of meer duidelijke nucleoli. In de portale velden zijn minimale veranderingen te zien.

Daarnaast komt een andere vorm van degeneratie voor waarbij de cellen ineen schrompelen en het cytoplasma sterk eosinofiel wordt, de zogenaamde eosinofiele degeneratie. Als de degeneratie voortschrijdt verliezen de cellen hun normale plaats in het leverbalkje en komen dan als ronde, zeer eosinofiele structuren in de sinusoiden te liggen. Deze necrotische cellen worden "councilmanbodies" genoemd, omdat Councilman (1890) deze structuren voor het eerst heeft beschreven bij patiënten die aan gele koorts leden. In dit stadium van levercelbeschadiging is enige proliferatie van Kupffercellen te zien, die na fagocytose een enigszins gezwollen cytoplasma hebben (beginnende mesenchymale reactie).

Ib. Actieve fase van lobulaire hepatitis

In dit stadium ziet men het beeld van een volledig ontwikkelde lobulaire hepatitis. Rondom de gebieden met necrotische hepatocyten bevinden zich sterk gezwollen leverparenchymcellen. In de portale velden wordt een infiltraat zichtbaar dat voornamelijk uit rondkernige leucocyten bestaat. Uitgebreide bloedingen kunnen optreden in de necrotische haarden.

Naast de verschijnselen van necrose is een duidelijke mesenchymale reactie waar te nemen: centrilobulair bevatten de sinusoiden Kupffercellen en macrofagen, solitair of in groepjes, die hier en daar omgeven zijn door segmentkernige en rondkernige leucocyten. Het cytoplasma van de macrofagen bevat ijzerpigment en celdébris, het zogenaamde 'ceroid-pigment'. Dit restant van gefagocyteerde cellen kleurt geel-bruin en is in de PAS-kleuring na behandeling met diastase duidelijk zichtbaar. Vaak is er ook stasis van gal in de canaliculi te zien met vorming van galthrombi.

Ic. Vroege herstelfase

Deze fase wordt gekenmerkt door een indrukwekkende mesenchymale reactie die in kwantitatief opzicht uitgebreider is dan de necrose. De mesenchymale reactie is gerelateerd aan de hoeveelheid te gronde gegane hepatocyten. Macrofagen die met ceroid-pigment zijn beladen bevinden zich nu niet meer uitsluitend op de plaatsen van eerder opgetreden necrose, herkenbaar aan de collaps van het reticuline-skelet, maar komen ook verspreid voor in de gehele lobulus en in de portale velden. De portale gebieden zijn licht vergroot door een toename van jong collageen bindweefsel dat uitstraalt tot in het omliggende leverparenchym. Ook intralobulair is er enige toename van collageen bindweefsel. De bindweefsel-

vorming is eveneens afhankelijk van de ernst van de doorgemaakte necrose.

De hepatocyten liggen in platen met een dikte van twee tot drie cellagen die niet regelmatig gerangschikt zijn.

Id. Late herstelfase

In dit stadium worden nog enkele degenererende hepatocyten gezien. Tekenen van levercelnecrose, zoals het voorkomen van councilmanbodies, zijn nauwelijks aanwezig. De gebieden van celcollaps bevatten nog maar weinig macrofagen; deze zijn nu hoofdzakelijk periportaal te vinden.

Iia. Postnecrotische fibrose

Wat overblijft van de necrotische haarden zijn enkele lagen reticulinevezels, die dicht op elkaar liggen ten gevolge van collaps van het bindweefsel skelet. In die gebieden groeien fibroblasten, die voor een toename van bindweefsel zorgen. In de portale velden is de hoeveelheid collageen bindweefsel nu duidelijk toegenomen. Jong bindweefsel breidt zich stervormig uit in het omringende leverparenchym en door contact met uitlopers uit ander portale driehoekjes ontstaan dunne portoportale septa. De vena portaetakken in het preparaat zijn verwijd en de architectuur van de lever is verstoord.

Iib. Cirrose

Het begin van cirrose wordt gekenmerkt door de vorming van regeneratienoduli, die ontstaan doordat groepen van regenererende hepatocyten worden begrensd door portoportale septa. Sommige septa zijn zeer dun en zijn over een lange afstand in de coupe te vervolgen. Een aansluiting bij bindweefseluitlopers uit een gebied rond de vena centralis of vena portae is niet altijd zichtbaar. De regeneratieactiviteit komt tot uiting in een verstoring van uniformiteit van de hepatocyten en de vorming van celplaten die uit meer dan één cellaag zijn opgebouwd. De regeneratienoduli zijn van wisselende grootte. Rondom deze noduli treedt compressie van de hepatocyten op, terwijl in het bindweefsel tussen de noduli proliferatie van galgangen voorkomt.

Verspreid in het leverparenchym komen groepjes Kupffercellen voor, die een grote hoeveelheid hemosiderinepigment bevatten. Opvallend is dat deze groepjes Kupffercellen ontbreken in de regeneratienoduli, hetgeen goed zichtbaar is in de coupes na kleuren op ijzer.

In dit stadium van de leverbeschadiging zijn de takken van de vena portae sterk uitgezet.

De hier beschreven histologische afwijkingen zijn in chronologische volgorde te zien. In de volgende paragraaf wordt beschreven hoe de afwijkingen optreden in relatie tot de hoeveelheid dimethylnitrosamine.

4.3.3.4. *Histologische veranderingen in relatie tot de hoeveelheid toegediende dimethylnitrosamine*

De mate van levercelbeschadiging hangt, behalve van de totale hoeveelheid toegediende DMNA, ook af van de wijze van toediening, het interval tussen de doses en de individuele gevoeligheid van het proefdier.

Bij de meeste proefdieren werd een beginnende hepatitis geconstateerd nadat gedurende drie weken op twee opeenvolgende dagen per week twee milligram DMNA per kilogram lichaamsgewicht intraveneus werd toegediend, dat wil zeggen in totaal 12 mg DMNA per kg L.G. (Tabel 6). Ongeveer 10% van de hepatocyten in de histologische coupe was dan necrotisch (graad 1). Centrilobulair werden necrotische hepatocyten gezien, in groepjes of solitair. De overige hepatocyten ondergingen in geringe mate degeneratieve afwijkingen (Foto 3).

Na in totaal 16 mg DMNA per kg L.G. intraveneus werd een ernstige acute hepatitis gezien, waarbij in de biopten van de meeste proefdieren 25-50% van de hepatocyten necrotisch was (graad 2). Tevens kwamen uitgebreide degeneratieve afwijkingen voor tezamen met een geringe mesenchymale reactie (Foto 4). Een enkele maal werden haarden van necrotische hepatocyten gezien, die guirlandevormig in het leverparenchym doorliepen, zodat het beeld van confluerende necrose ontstond. Voor vijf proefdieren was een hoeveelheid van 16-20 mg DMNA per kg L.G. al te veel: er trad een massale levercelnecrose op (90-100% van de hepatocyten) die irreversibel bleek te zijn (Foto 5).

Wanneer in het biopt ongeveer 50% van de hepatocyten necrotisch was, werd de toediening van DMNA gestaakt. Zes tot acht weken na de laatste DMNA-toediening (totale dosis 24 ± 5 mg DMNA per kg L.G. i.v.), was bij 75% van de proefdieren die op dat moment nog in leven waren een geringe tot matige post-necrotische fibrose aanwezig. In een enkel geval waren de takjes van de vena portae licht verwijd.

Omdat met intraveneuze toediening alléén geen stabiele portale hypertensie met voldoende fibrose en regeneratienoduli verkregen kon worden, werd overgegaan op orale toediening van dimethylnitrosamine. Na orale toediening trad opnieuw een acute hepatitis op, gevolgd door een sterke mesenchymale reactie en een toename van bindweefsel. Opvallend was dat bij orale toediening minder DMNA nodig was om dezelfde mate van levercelnecrose op te wekken dan bij intraveneuze toediening. Levercelnecrose graad 2 trad op bij tweederde van de proefdieren na intraveneuze toediening van 16.8 ± 0.8 mg DMNA per kg L.G., terwijl deze hoeveelheid necrose door orale toediening van 9.5 ± 1.1 mg DMNA per kg L.G. werd bereikt bij 11 van de 13 proefdieren.

Bij histologisch onderzoek van het obductiemateriaal van de honden met chronische leverinsufficiëntie werd een matige tot uitgebreide fibrose aangetroffen, waarbij in de helft van de gevallen sprake was van portoportale septavorming

graad van levercelnecrose	na 12 mg DMNA per kg LG	na 16 mg DMNA per kg LG
géén	5	2
1	19	3
2	2	20
3	3	1
4	<u>1</u>	<u>4</u>
	30	30

Tabel 6. Aantal proefdieren met levercelnecrose na intraveneuze toediening van dimethylnitrosamine.

en ontstaan van regeneratienoduli. De portale takjes waren licht tot matig verwijd. Verder waren er lichte degeneratieve afwijkingen met geringe tekenen van actief levercelverval te zien. De mesenchymale reactie was sterk: vele macrofagen, beladen met ijzerpigment, lagen verspreid in de lobuli en in de portale driehoekjes. Ook werd er bij vier van de zes honden uit deze groep een intrahepatische cholestase gezien. De architectuur van de lever was bij deze groep proefdieren in principe nog intact (Foto 6). In de coupes die volgens de PAS-kleuring behandeld waren, was de glycogeen-depletie opvallend.

Voor de beoordeling van de groep honden met portale hypertensie werden de excisiebipten onderzocht, die genomen waren tijdens de laparotomie aan het einde van de observatieperiode. De architectuur van de lever was bij negen van de elf proefdieren in ernstige mate verstoord. Door portoportale septa en regeneratienoduli was de normale afwisseling van portale driehoekjes en centrale gebieden niet meer aanwezig. De vena portaetakken waren bij alle honden uit deze groep sterk verwijd en er was een uitgebreide fibrose (Foto 7). Cholestase was meestal niet zo duidelijk als bij de groep met chronische leverinsufficiëntie, evenmin de glycogeen-depletie. Rondom de regeneratienoduli was het aangrenzende leverparenchym gecompriëerd. Hier en daar was proliferatie van galductuli in de regeneratienoduli te zien. Councilmanbodies als uiting van actieve levercelnecrose waren niet meer aanwezig. Het is moeilijk deze afwijkingen te klassificeren als "uitgebreide fibrose met regeneratienoduli" of als "vroeg cirrose", omdat er een geleidelijke overgang van de ene toestand in de andere is.

Bij twee proefdieren ontstond ook na langdurige toediening van DMNA geen levercelverval van betekenis en uitgebreide bindweefselvorming bleef uit. De takken van de vena portae waren ook niet wijder dan normaal.

Maligne tumoren werden in deze studie niet gezien. Eénmaal werd een leverceladenoom gevonden met een doorsnede van 1½ cm. Bij microscopisch onderzoek ontbraken maligne kenmerken zoals celatypie en angioinvasieve groei. De tu-

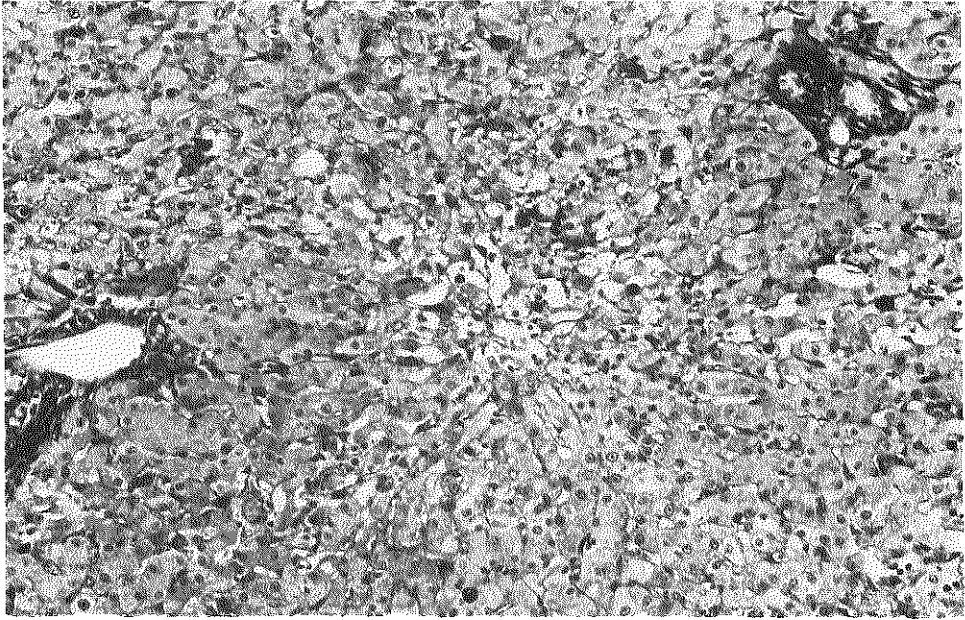


Foto 3. Centrilobulaire levercelnecrose (graad 1) met geringe degeneratieve afwijkingen. x 150, PAS-kleuring na voorbehandeling met diastase.

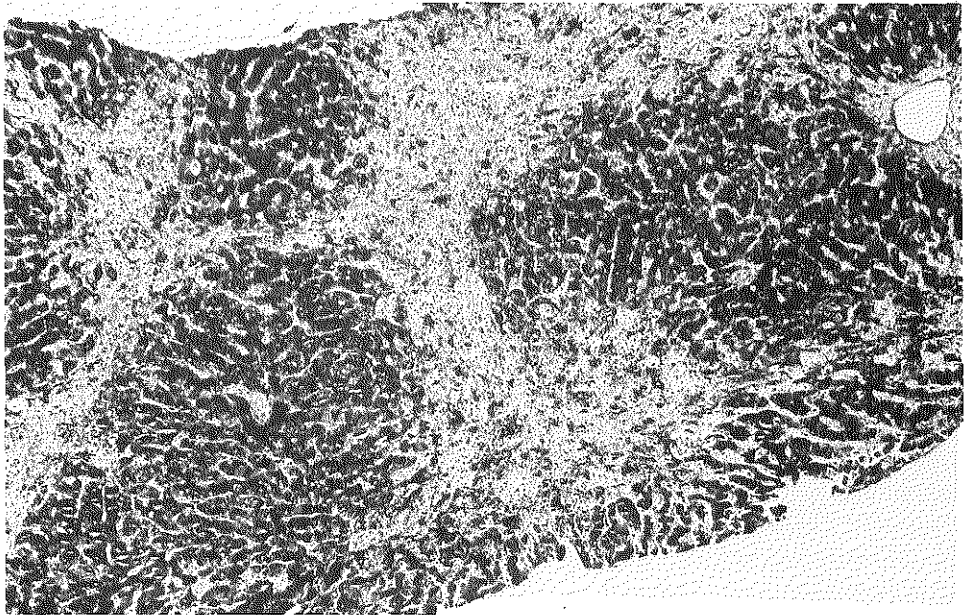


Foto 4. Ernstige confluërende levercelnecrose ("bridging necrosis", graad 2 à 3). x 60, PAS-kleuring.

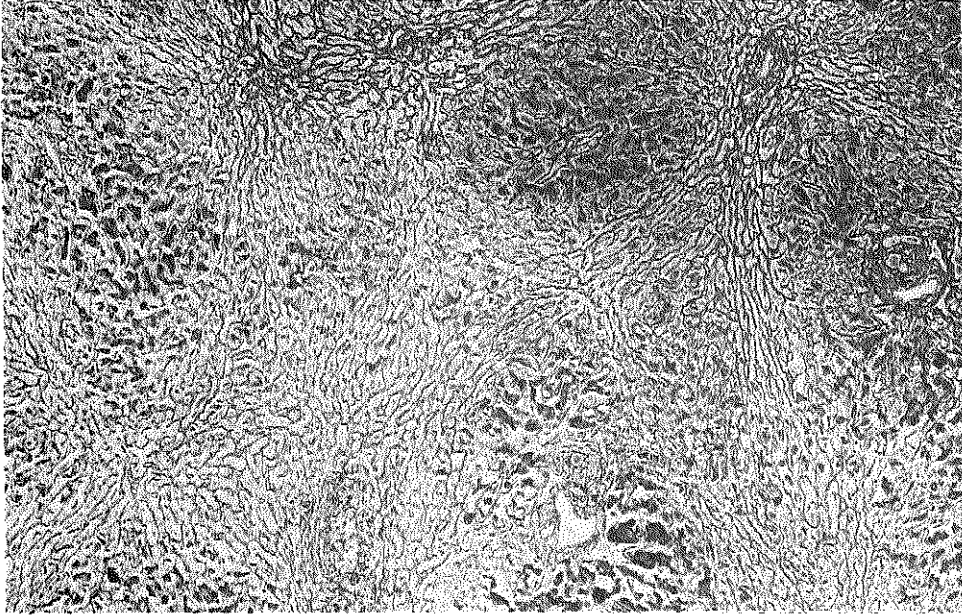


Foto 5. Leverbiopsie van een proefdier met acute leverinsufficiëntie. Zeer uitgebreide levercelnecrose met collaps van het reticulineskelet; plaatselijk zijn nog resten van (degenererend) leverparenchym aanwezig. x 60, reticulinekleuring.

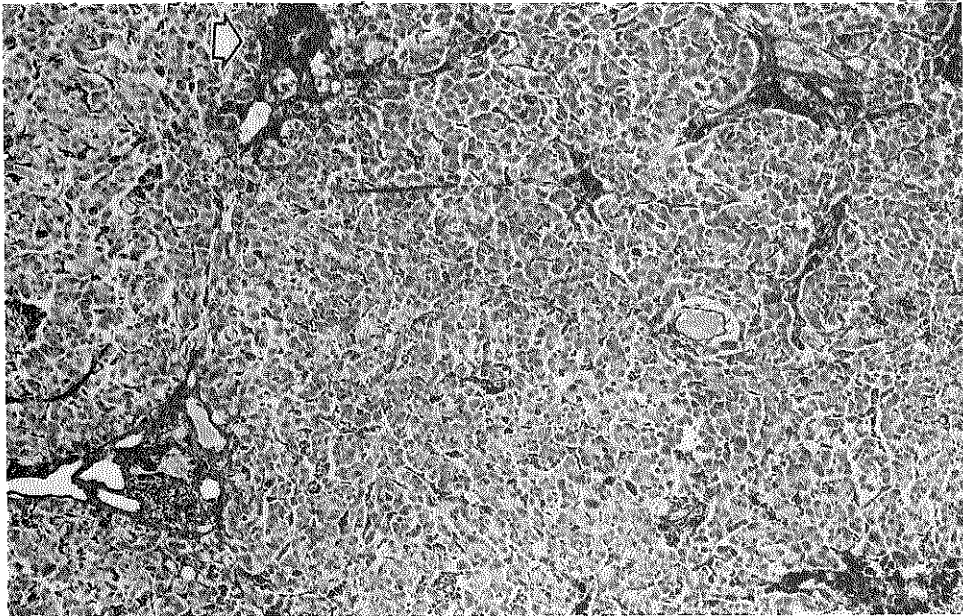


Foto 6. Leverbiopsie van een proefdier met chronische leverinsufficiëntie. De architectuur van de lever is in principe intact. In de portale velden zijn grote groepen macrofagen, beladen met ceroid- en hemosiderinepigment aanwezig (zie pijl). x 60, PAS-kleuring na voorbehandeling met diastase.

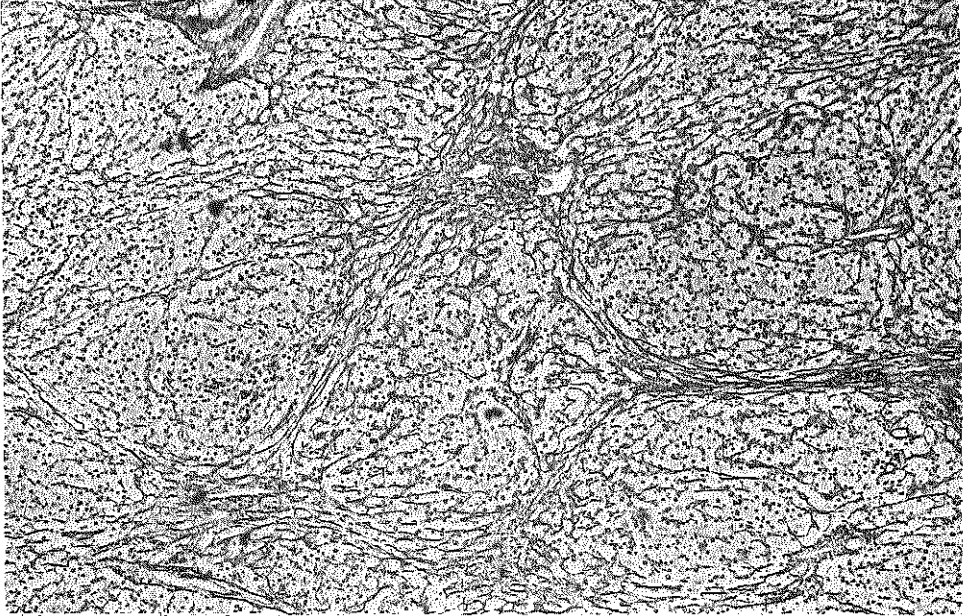


Foto 7a. Leverbiopsie van een proefdier met stabiele portale hypertensie. Er zijn portoportale fibreuze septa en de vorming van regeneratienoduli. x 60, reticulinekleuring.

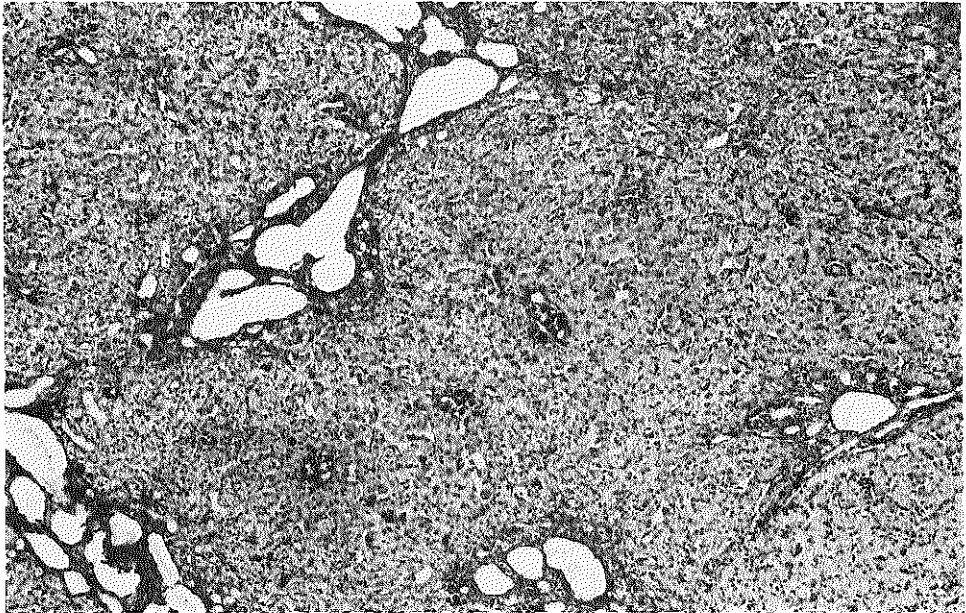


Foto 7b. Leverbiopsie van een proefdier met stabiele portale hypertensie. De takken van de vena portae zijn sterk verwijd. x 60, PAS-kleuring na voorbehandeling met diastase.

mor bestond uit onregelmatig gerangschikte platen hepatocyten, soms drie of vier cellagen dik, omgeven door een bindweefselkapsel. Tussen de hepatocyten was sporadisch nieuwvorming van galductuli te zien.

Bij microscopisch onderzoek van de milt en het beenmerg van het sternum van enkele proefdieren werden weinig afwijkingen gezien. Wel vertoonde de milt enige tekenen van stuwning. Het beenmerg werd onderzocht om aplasie als oorzaak van de anemie die bij sommige proefdieren werd vastgesteld, uit te sluiten. Deze afwijking werd echter niet gevonden.

4.3.4. Discussie

De mortaliteit na percutane leverbiopsieën bij de mens is 0.03% (Lindner 1971). De relatief hoge mortaliteit ten gevolge van de leverbiopsieën in dit experiment kan verklaard worden op grond van de volgende factoren. In de eerste plaats werden de biopten aanvankelijk alleen onder plaatselijke verdoving genomen. Ofschoon de procedure daardoor niet pijnlijk was, was het proefdier tijdens het nemen van de biopsie onrustig en had meestal een tachypneu. Bij enkele proefdieren ontstonden waarschijnlijk door bewegen van de biopsienaald, ernstige bloedingen. In de tweede helft van de studie werd daarom het proefdier bovendien gesedeerd, zodat ernstige beschadiging van de lever door bewegen van de biopsienaald niet meer voorkwam. Nadat sedativa werden gegeven, is een lethale complicatie nog maar éénmaal voorgekomen, in tegenstelling tot de vier complicaties met dodelijke afloop in de periode daarvoor.

Een tweede oorzaak voor de hogere mortaliteit na leverbiopsieën bij de hond is een gevolg van de anatomie van de hondelever. De kwabben van de lever zijn plat en worden dikker ter plaatse van de hilus. Om een voldoende hoeveelheid weefsel te verkrijgen moet de punctie in het algemeen vrij centraal in de leverhilus worden uitgevoerd en daardoor is de kans op aanprikken van de galblaas of een bloedvat groter.

Om een eventuele bloeding uit de biopsieplaats te tamponneren met de aangrenzende weefsels werd de lever verkleefd met de laterale buikwand en het diafragma. Het is niet duidelijk of het aantal complicaties door deze voorzorgsmaatregel is verminderd.

Voor de beoordeling van de mate van levercelnecrose voldoet een naaldbiopsie uitstekend, aangezien het gaat om een diffuse parenchymaandoening. Alleen de diagnose "massale necrose" is per definitie moeilijk op een enkel specimen te stellen. Slechts coupes uit verschillende delen van de lever, genomen tijdens obductie, kunnen de diagnose zoals die gesteld werd na onderzoek van het naaldbiopt en het klinisch beloop van het proefdier bevestigen. Het is mogelijk dat bij twee proefdieren teveel dimethylnitrosamine werd toegediend omdat het naaldbiopt een matige hoeveelheid necrose liet zien, die waarschijnlijk niet representatief was voor de toestand in de rest van de lever.

Juist bij cirrose, bestaande uit grote regeneratienoduli en dunne septa, is de kans groot dat de "sampling error" van naaldbiopsieën tot een verkeerde diagnose leidt (Scheuer 1972). In deze studie werd de definitieve histologische diagnose steeds bepaald op excisiebiopten, verkregen tijdens laparotomie of obductie. Een onderzoek naar de correlatie tussen de diagnoses, gesteld naar aanleiding van de biopsie per naald en die van het excisiebiopt werd niet verricht. Een dergelijk onderzoek is alleen waardevol als op dezelfde tijd een biopsie via beide methoden zou worden verkregen, hetgeen in dit experiment niet is gebeurd.

Hoewel het percutaan biopteren van de lever in dit experiment een zekere mortaliteit veroorzaakte en hoewel rekening moet worden gehouden met de "sampling error" van het verkregen specimen, lijkt deze methode toch onontbeerlijk voor het bepalen van de juiste hoeveelheid dimethylnitrosamine voor het verkrijgen van de gewenste mate van necrose. Het verdient echter aanbeveling de puncties te verrichten na sedatie van het proefdier en bij een goede stollingsstatus. Wanneer bij tweemaal punteren geen goed leverweefsel wordt verkregen, is het beter de procedure te staken.

De macroscopische bevindingen bij obductie bevestigden de klinische diagnose: bij de honden met acute leverinsufficiëntie was de lever vergroot en zachter van consistentie dan normaal, terwijl het oppervlak er glad uitzag. Ascites kwam in deze groep bijna niet voor. De dieren met chronische leverinsufficiëntie daarentegen hadden één tot twee liter ascitesvocht en een kleine, vaste lever met een gegranuleerd oppervlak. Bovendien waren de collaterale venen tussen het portaalstelsel en de systemische circulatie duidelijk zichtbaar. Het macroscopisch beeld van de lever bij de dieren met chronische leverinsufficiëntie leek veel op dat van de dieren met portale hypertensie, zoals bij laparotomie werd gezien (zie 4.2.3.).

De histologische veranderingen die optreden na toediening van dimethylnitrosamine worden het eerst rond de vena centralis gevonden. Ook bij verdere uitbreiding van de leverbeschadiging zijn de centrilobulaire gebieden het ernstigst aangedaan. Zoals reeds eerder vermeld is, bevatten de hepatocyten rond de vena centralis de hoogste concentratie aan oxidatieve enzymen, waardoor actieve metaboliëten van DMNA op deze plaatsen in hoge concentraties ontstaan. Bovendien is de oxygenatie van de centrilobulaire gebieden slechter dan van de portale gebieden, zodat deze gebieden meer gevoelig zijn voor toxische stoffen (Rapport 1973). Pas in een later stadium ontstaan afwijkingen in de periportale gebieden.

De necrotische hepatocyten waren verspreid in alle lobuli te vinden of bevonden zich in haarden in enkele lobuli. In het algemeen gaf de haardvormige necrose meer aanleiding tot de formatie van brede septa dan de solitair voorkomende necrotische hepatocyten. Hierbij konden na staken van de DMNA-toediening soms weinig definitieve afwijkingen geconstateerd worden. De confluërende ne-

crose die enkele malen werd waargenomen, had een slechte prognose: fatale leverinsufficiëntie of cirrose was meestal het gevolg. Ditzelfde verschijnsel is bekend in de humane pathologie, beschreven bij acute virale hepatitis (Boyer & Klatskin 1970).

De acute leverbeschadiging die door dimethylnitrosamine wordt opgewekt heeft vele kenmerken gemeen met de meeste vormen van acute hepatitis bij de mens. Met name is er overeenkomst bij de vorming van "passieve" septa, porto-centraal zowel als portoportaal, die ontstaan door collaps van reticulinevezels, waarna er secundair fibroblasten ingroeien. Een kenmerk dat DMNA-hepatitis gemeen heeft met alcoholische hepatitis is de formatie van fibrose langs de randen van de levercelplaten. Hoewel er overeenkomsten zijn tussen de veranderingen opgewekt door DMNA en die welke zich voordoen bij virale hepatitis bij de mens (lichaampjes van Councilman, "ballooning" degeneratie, ceroid pigment), zijn er ook duidelijke verschillen. Bij acute virale hepatitis bestaat er een periportaal infiltraat, voornamelijk bestaande uit mononucleaire cellen, welke in het algemeen ontbreken bij DMNA-hepatitis. Cholestasis wordt ook gezien bij de hepatitis veroorzaakt door DMNA, maar deze is minder uitgesproken dan bij virale hepatitis.

Opvallend in de latere stadia van het DMNA-model is de extreme ophoping van hemosiderinepigment, die gezien wordt in macrofagen. De macrofagen liggen in groepjes, periportaal en intralobulair. De grote hoeveelheid ijzerhoudend pigment kan het gevolg zijn van een ernstige bloedafbraak. In overeenstemming daarmee is de anemie die bij de meeste proefdieren werd vastgesteld. De regeneratienoduli bevatten zeer weinig macrofagen met hemosiderinepigment, zodat het waarschijnlijk is dat deze gevormd zijn in een latere fase. Een andere mogelijkheid is dat de regeneratienoduli niet toegankelijk zijn voor macrofagen wanneer deze het pigment hebben opgenomen.

Ofschoon een zuivere vergelijking tussen het effect van intraveneuze en orale toediening van dimethylnitrosamine niet mogelijk is in dit model (aangezien de proefdieren door de intraveneuze toediening reeds een zekere leverbeschadiging hadden), zijn er duidelijke aanwijzingen dat orale toediening effectiever is. Dit is ook gebleken uit een proefstudie met oraal toegediende DMNA, die door Van Vroonhoven in het Laboratorium voor Chirurgie werd uitgevoerd. Waarschijnlijk is de hogere concentratie aan DMNA in het afferente bloed naar de lever na orale toediening daaraan debet.

De histologische diagnose "cirrose van de lever" omvat een wijd scala van begrippen en classificaties. Om een standaardnomenclatuur in te voeren heeft de International Association for the Study of the Liver in 1976 een definitie en een aantal criteria aanbevolen, die waarschijnlijk algemeen zullen worden aanvaard (Leevy e.a. 1976). De definitie luidt als volgt: "cirrhosis is the result of abnormal reconstruction of the preexisting lobular architecture". De twee histologische criteria die het beste met de functionele aspecten van deze ziekte overeenkomen zijn

parenchymale noduli en septa die portale velden verbinden met pericentrale gebieden. De noduli moeten omgeven zijn door bindweefsel en kunnen zelf een normale opbouw hebben. Meestal echter zijn er tekenen van regeneratie, zoals platen hepatocyten die twee of meer cellagen dik zijn, waardoor de lobulaire architectuur verstoord is. In de noduli kan proliferatie van galductuli voorkomen. Septa kunnen ontstaan, zoals reeds gezegd is, uit collaps van het reticuline netwerk ("passieve" septa) of door vorming van nieuwe bindweefselvezels ("actieve" septa). Door de bindweefselvorming en/of compressie van het leverparenchym treden veranderingen in de microcirculatie van de lever op en een verslechterde voeding van de hepatocyten (Popper 1977).

Bij toepassing van bovenstaande criteria op het DMNA-model kan bij een aantal proefdieren de histologische diagnose "vroeg cirrose" gesteld worden. Soms is de architectuur van grote delen van de lever echter nog redelijk intact, zodat in die gevallen "postnecrotische fibrose met regeneratienoduli" een betere omschrijving lijkt. Ook bij deze proefdieren zijn de vena portaetakjes in de histologische preparaten sterk uitgezet, hetgeen overeenkomt met het klinische beeld van portale hypertensie, ascites en leverfunctiestoornissen. Bij de helft van de proefdieren met stabiele portale hypertensie werd het beeld van een "incomplete septale cirrose" gezien (Gall 1960, Popper 1977). Hierbij zijn geen brede septa aanwezig die portale driehoekjes met centrale gebieden verbinden, maar wel uiterst dunne septa die over grote afstand door het leverparenchym lopen. In de humane pathologie kan de "incomplete septale cirrose" aanleiding geven tot een ernstige portale hypertensie. Ditzelfde verschijnsel is ook in het DMNA-model waargenomen.

4.4. Hematologische en biochemische bepalingen

4.4.1. Inleiding

Vóór, tijdens en na de behandeling met dimethylnitrosamine werden diverse bepalingen in bloed en serum van de proefdieren verricht om een aantal redenen. In een voorstudie was namelijk gebleken dat het serumgehalte van glutamaatpyruvaattransaminase (GPT) en alkalische fosfatase (AF) enkele dagen na de toediening van DMNA verhoogd was, parallel aan het optreden van levercelnecrose. In verband hiermee werden in deze studie beiden enzymen frequent bepaald. In combinatie met de leverbiopsie en het klinisch beloop kon de dosering van DMNA dan aangepast worden aan de individuele gevoeligheid van het proefdier. Bilirubine, glutamaatoxaalacetaattransaminase (GOT), gammaglutamyltranspeptidase (γ GT) en het eiwitspectrum werden eveneens regelmatig bepaald

om de mate van leverbeschadiging te kunnen vervolgen. Bovendien was het daarvoor mogelijk deze biochemische bepalingen te vergelijken met meer kwantitatieve leverfunctieproeven zoals die in paragraaf 4.5. worden beschreven. Tevens werd nagegaan hoe het hemoglobinegehalte en het aantal leucocyten en thrombocyten in het bloed tijdens dit experiment veranderden. Het aantal thrombocyten en de bepaling van een aantal stollingsfactoren in het bloed door middel van de thromboplastinetijd gaven een indruk van de stollingsstatus, hetgeen voor het biopteren van de lever belangrijk was.

Bij patiënten met chronische leverinsufficiëntie en encephalopathie is een specifieke verandering van het patroon van aminozuren in het plasma aangetoond. Deze bestaat uit een afname in concentratie van de aminozuren met een vertakte keten, namelijk van valine (VAL), leucine (LEU) en isoleucine (ILEU) en een hogere concentratie van de aromatische aminozuren phenylalanine (PHE), tyrosine (TYR) en in mindere mate tryptofaan (TRYP) (Iber e.a. 1957, Iob e.a. 1966, Fischer e.a. 1974). Fischer en Baldessarini (1971) stelden de theorie op dat vele uitingen van leverinsufficiëntie, met name het hepatisch coma, het gevolg zouden zijn van de aanwezigheid van 'valse' neurotransmitters die de normale neurotransmitters dopamine en noradrenaline in het zenuwstelsel vervangen of verdringen. Verhoogde concentraties van tyrosine en phenylalanine zouden de produktie van 'valse' neurotransmitters zoals octopamine, phenylethanolamine en glutamine bevorderen, terwijl uit tryptofaan serotonine gevormd kan worden. Serotonine heeft eveneens een remmende werking op de prikkeloverdracht in het centrale zenuwstelsel (Biebuyck e.a. 1975). De concentratie van de aromatische aminozuren in het hersenweefsel is niet alleen afhankelijk van hun concentratie in het plasma, maar ook van de concentratie van de vertakte aminozuren in het plasma. Omdat vertakte en aromatische aminozuren een gemeenschappelijk transportmechanisme over de bloed-hersenbarrière hebben, is er competitie tussen deze groepen aminozuren wat betreft de opname door de hersenen (Fernstrom en Wurtman 1972).

Om na te gaan of de verhouding van de genoemde aminozuren in het plasma ook veranderde na de toediening van dimethylnitrosamine, werd bij enkele honden in diverse stadia van leverbeschadiging de ratio tussen de aminozuren met een vertakte keten en de aromatische aminozuren bepaald.

4.4.2. Methoden

Bij de bepalingen werd gebruik gemaakt van analysemethoden en reagentia die ontwikkeld zijn voor de humane geneeskunde. De eerste bepalingen werden bij alle proefdieren uitgevoerd vóór de eerste dosis dimethylnitrosamine. Daarna werden de bepalingen wekelijks verricht met uitzondering van het eitwitspectrum, dat om de drie weken werd bepaald. Bovendien werd van ieder proefdier

wekelijks vijf millimeter plasma ingevroren en bewaard bij -20° C. voor latere analyse. In enkele van deze plasmamonsters werden de aminozuren bepaald. De volgende bepalingen werden routinematig verricht: hemoglobinegehalte, leucocyten- en thrombocytenaantal, natrium, kalium en kreatinine. Voor de bepaling van de thromboplastinetijd werd de Thrombotest ®(Nyegaard en Co., Oslo) gebruikt. Als parameters van de leverfunctie werden bepaald: het bilirubinegehalte, het gehalte aan alkalische fosfatase (Bessey e.a. 1946), GOT en GPT (volgens de methode beschreven door de Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie 1970, 1972) en γ GT (Szasz e.a. 1974). Door middel van elektroforese op cellulose-acetaat werd het eiwitspectrum geanalyseerd. Kwantitatieve analyse van de aminozuren vond plaats door middel van gaschromatografie (Adams 1974). Het tyrosinegehalte werd gemeten volgens de methode van Wong (1964) en tryptofaan volgens de methode van Denkla en Dewey, gemodificeerd door Bloxam en Warren (1974). De ratio tussen de aminozuren met vertakte ketens en de aromatische aminozuren werd daarna berekend, met en zonder tryptofaan:

$$\frac{\text{valine} + \text{leucine} + \text{isoleucine}}{\text{phenylalanine} + \text{tyrosine} (+ \text{tryptofaan})} \quad \frac{\text{VAL} + \text{LEU} + \text{ILEU}}{\text{PHE} + \text{TYR} (+ \text{TRYP})}$$

4.4.3. Resultaten

Bij het vermelden van de resultaten zijn de twee proefdieren, die aan het einde van de observatieperiode weinig histologische afwijkingen en een normale portale druk hadden buiten beschouwing gelaten, omdat er ook biochemisch weinig veranderingen gevonden werden. Ook de groep honden, die overleed aan de complicaties van de leverbiopsieën wordt hier niet besproken.

Hematologische bepalingen

Een overzicht van de waarden aan het einde van de observatieperiode staat vermeld in Tabel 7. Opvallend is de ernstige *anemie* bij de honden met chronische leverinsufficiëntie. Hoewel enkele honden, die portale hypertensie hadden tijdens de observatieperiode wel een daling van het hemoglobinegehalte doormaakten, trad bij hen geen blijvende *anemie* op. De *leucocytose* die gezien werd bij de proefdieren met chronische leverinsufficiëntie, vooral in de laatste zes weken voor overlijden, kwam in mindere mate ook voor bij de honden uit de groep met portale hypertensie. Bij hen steeg het leucocytenaantal echter zelden boven de $15 \times 10^9/l$ en de verhoging was niet permanent. Een *thrombocytopenie* kwam in alle groepen voor, waarbij soms het thrombocytenaantal tot $40 \times 10^9/l$ daalde, om daarna geleidelijk weer iets te stijgen.

n	groep	Hb (mmol/l)	Leuco's (x 10 ⁹ /l)	Thrombo's (x 10 ⁹ /l)	Thrombotest [®] (sec.)	aantal weken na de eerste dosis DMNA
30	proefdieren vóór DMNA	8.3 ± 0.2	9.3 ± 0.4	404 ± 15	18 ± 1	
5	acute lever- insufficiëntie	8.0 ± 0.8	6.8 ± 1.3	109 ± 25**	33 ± 5**	6 ± 1
6	chron. lever- insufficiëntie	4.2 ± 0.6**	19.3 ± 1.5**	136 ± 40 *	29 ± 3**	27 ± 3
		p < 0.001	p < 0.001	n.s.	p < 0.01	
11	stabiele portale hypertensie	7.9 ± 0.5	9.9 ± 0.9	208 ± 20**	20 ± 1	31 ± 1

* p < 0.01 }
 ** p < 0.001 } t.o.v. de waarden vóór DMNA

Tabel 7. Hematologische bepalingen per groep proefdieren aan het einde van de observatieperiode (gem. ± S.E.).

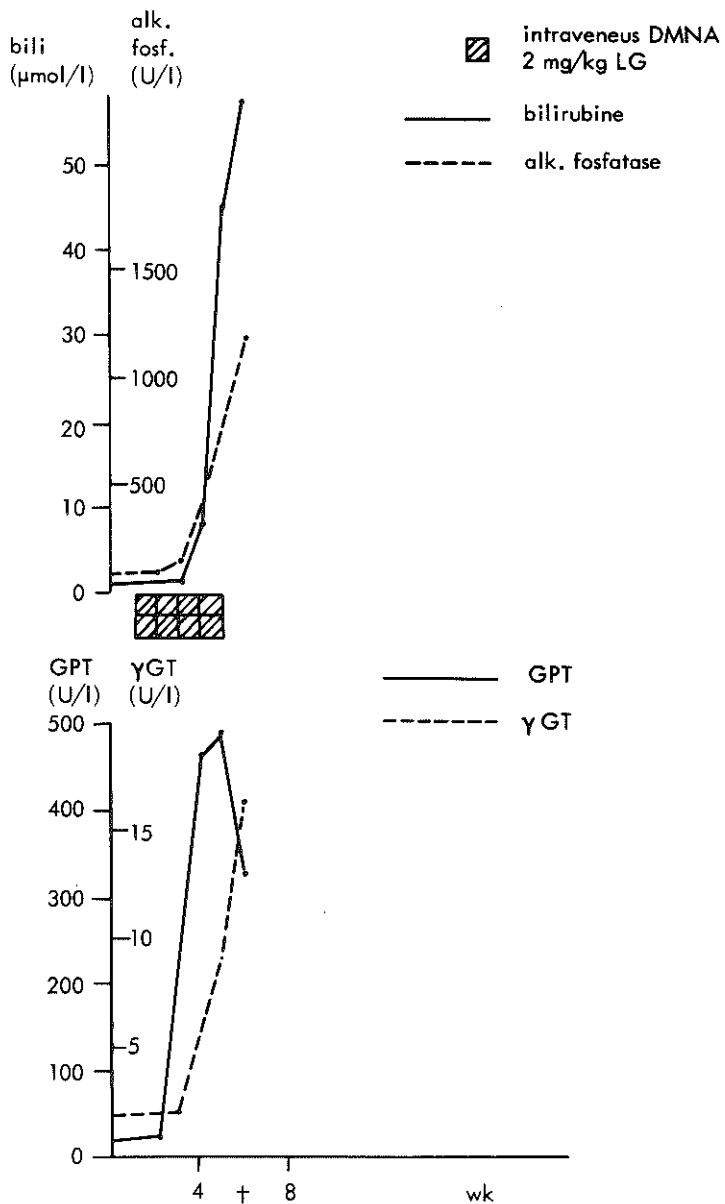
Bij bijna alle proefdieren trad vier tot vijf weken na het begin van de DMNA-toedieningen een *verlengde thromboplastinetijd* op, maar in de groep van de honden met acute leverinsufficiëntie was deze test ernstiger gestoord. De honden in de groep met portale hypertensie kwamen over het algemeen in een stabiele fase terecht, terwijl de proefdieren in de groep met chronische leverinsufficiëntie na ongeveer 20 weken een geleidelijke verlenging van de Thrombotest[®] kregen, die niet verbeterde.

Biochemische bepalingen

Bij géén van de honden werden gedurende de observatieperiode belangrijke veranderingen in het serumgehalte aan *natrium*, *kalium* en *creatinine* waargenomen. Geheel anders was dit bij het serumgehalte aan *bilirubine* en *leverenzymen*. Bij deze bepalingen waren grote schommelingen te zien, waarschijnlijk afhankelijk van de mate van levercelnecrose en het functioneren van de nog intacte hepatocyten. Omdat een uniform toedieningsschema van DMNA niet mogelijk was door de individuele gevoeligheid van het proefdier (zie paragraaf 3.2.), verliep ook de mate waarin leverbeschadiging optrad bij de proefdieren in één groep niet synchroon. Bovendien is hier sprake van enzymen met een korte halfwaardetijd van uren tot enkele dagen, zodat het weinig zinvol is groepsgemiddelden gedurende de actieve fase te vermelden. Ter illustratie wordt in Figuur 7 het verloop van de verschillende enzymen grafisch weergegeven bij een proefdier uit de groep met acute leverinsufficiëntie, dat vrij snel na de toediening van DMNA overleed ten gevolge van een massale levercelnecrose. De spiegels van bilirubine en leverenzymen gingen vlak voor de dood sterk omhoog. Figuur 8 toont het verloop van bilirubine en enzymen bij een proefdier uit de groep met chronische leverinsufficiëntie. De necrose die opgewekt werd door DMNA uitte zich in stijgingen van alle enzymen, waarna in de herstelfase een daling in het gehalte aan alkalische fosfatase, bilirubine, GPT en γ GT optrad. Een volgende dosis van intraveneus toegediende dimethylnitrosamine gaf opnieuw een stijging van de verschillende enzymen te zien, maar nu in mindere mate. Nadat enkele malen DMNA oraal was gegeven, bleven de concentraties van de verschillende enzymen verhoogd tot aan het overlijden van het proefdier, met uitzondering van GPT en GOT. Een voorbeeld van het verloop van de enzymspiegels in het serum bij een proefdier uit de groep met portale hypertensie is beschreven in Figuur 9. Ook hier ontstond weer een sterke reactie op dimethylnitrosamine, zowel na intraveneuze als na orale toediening.

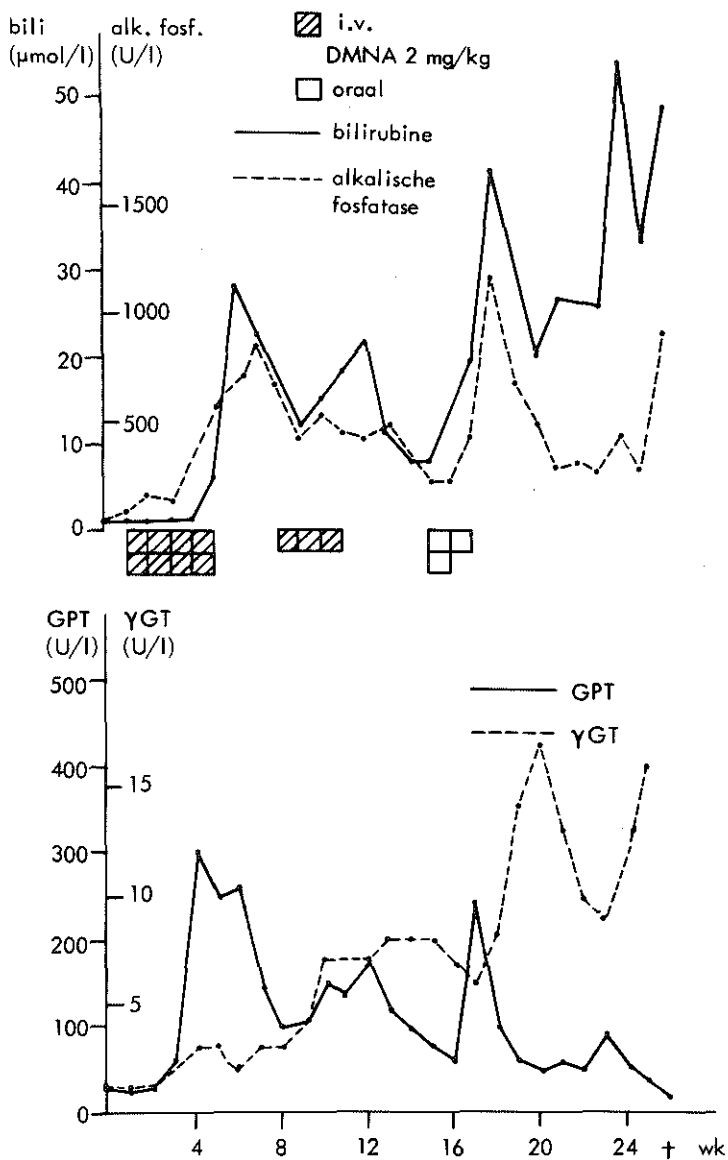
De spiegels van GOT veranderden gelijktijdig met maar in mindere mate dan die van GPT, zodat kleine fluctuaties beter door bepaling van het GPT-gehalte konden worden waargenomen.

Zowel bij de proefdieren in de groep met chronische leverinsufficiëntie als bij de dieren in de groep met portale hypertensie zijn in de curves twee (soms



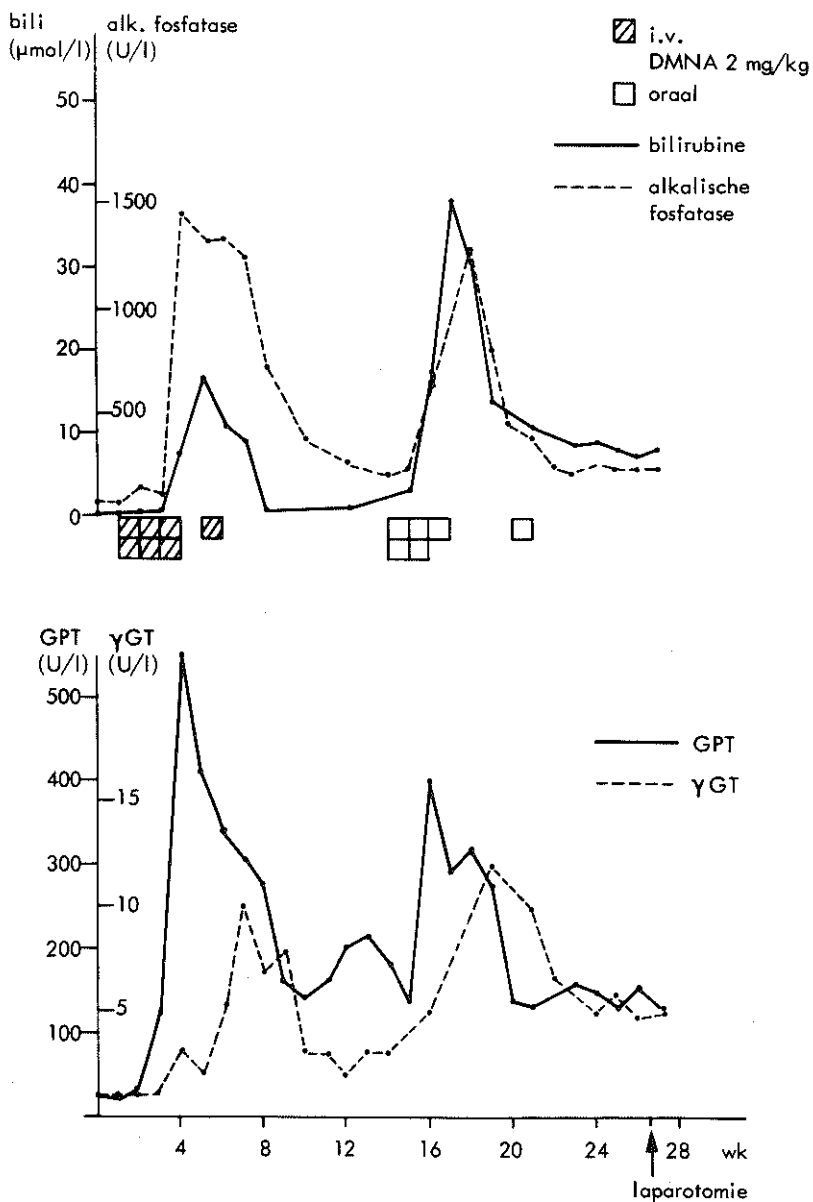
Figuur 7. Leverenzymen bij een proefdier met acute leverinsufficiëntie.

drie) toppen van de meeste enzymen te zien. Om na te gaan of aan de hand van de stijgingen van de enzymen het verdere beloop voor de proefdieren was te voorspellen, werd voor ieder proefdier uit beide groepen het gemiddelde van de twee



Figuur 8. Leverenzymen bij een proefdier met chronische leverinsufficiëntie.

hoogste waarden van elk enzym berekend. Er werd geen verschil gevonden voor de GPT-waarden, maar in de groep met chronische leverinsufficiëntie was de stijging van bilirubine, alkalische fosfatase en γGT groter dan in de groep proefdieren die uiteindelijk portale hypertensie kreeg ($p < 0.01$ voor elk der parameters).



Figuur 9. Leverenzymen bij een proefdier met stabiele portale hypertensie.

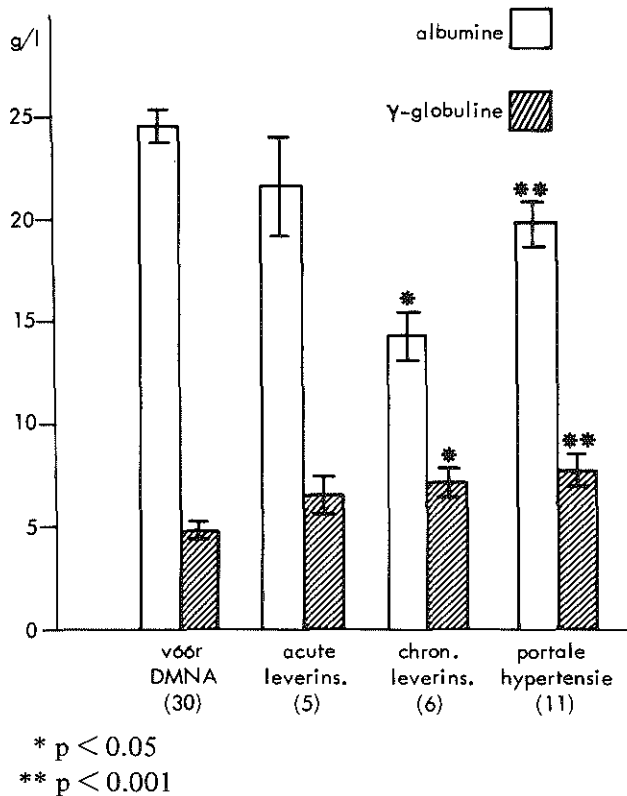
In Tabel 8 staan de gemiddelde waarden voor bilirubine en leverenzymen zoals die per groep gemeten werden aan het einde van de observatieperiode. De honden die in acute leverinsufficiëntie overleden vertoonden de grootste stijging van bilirubine en enzymen, maar ook in de groep met chronische leverinsufficiëntie

n	groep	bili. ($\mu\text{mol/l}$)	alk.fosf. (U/l)	GPT (U/l)	γ -GT (U/l)	aantal weken na de eerste dosis DMNA
30	proefdieren vóór DMNA	< 1.5	83 \pm 5	27 \pm 1	1.4 \pm 0.1	
5	acute lever- insufficiëntie	45.8 \pm 9.6	1024 \pm 291	351 \pm 76	8.0 \pm 3.1	6 \pm 1
6	chron. lever- insufficiëntie	27.5 \pm 5.9	294 \pm 46	87 \pm 13	8.2 \pm 2.1	27 \pm 3
11	stabiele portale hypertensie	p < 0.05 5.9 \pm 0.9	n.s. 225 \pm 37	n.s. 107 \pm 14	p < 0.05 4.3 \pm 0.5	31 \pm 1

Tabel 8. Biochemische bepalingen per groep proefdieren aan het einde van de observatieperiode (gem. \pm S.E.)

waren alle enzymen verhoogd ten opzichte van de waarden gemeten vóór de toediening van DMNA. De proefdieren die een stabiele portale hypertensie hadden onderscheidden zich van de honden met chronische leverinsufficiëntie door een lager gehalte aan bilirubine en γ GT; er was echter geen verschil in het gehalte aan alkalische fosfatase en GPT.

De veranderingen in het eiwitspectrum, met name het gehalte aan albumine en γ -globuline zoals die aan het einde van de observatieperiode gemeten werden, zijn grafisch weergegeven in Figuur 10. Het laagste albuminegehalte werd aangetroffen bij de proefdieren met chronische leverinsufficiëntie. Daarentegen werden in de groep honden met portale hypertensie de hoogste waarden voor γ -globuline gevonden. De honden die overleden ten gevolge van acute leverinsufficiëntie hadden geen duidelijke veranderingen in het gehalte aan albumine en γ -globuline.



Figuur 10. Albumine en γ -globuline (gem. \pm S.E.).

Zoals Tabel 9 laat zien, is de ratio tussen de aminozuren met vertakte ketens en de aromatische aminozuren bij proefdieren met een gestoorde leverfunctie lager dan deze was bij enkele proefdieren vóór de toediening van DMNA

($p < 0.01$). Wanneer tryptophaan buiten beschouwing werd gelaten bleken de verschillen tussen de honden met een normale leverfunctie en de honden met gestoorde leverfuncties nog groter.

diagnose	$\frac{\text{VAL} + \text{LEU} + \text{ILEU}}{\text{PHEN} + \text{TYR}}$	$\frac{\text{VAL} + \text{LEU} + \text{ILEU}}{\text{PHEN} + \text{TYR} + \text{TRYP}}$
normaal proefdier	6.4	3.1
”	4.6	2.3
”	5.6	2.6
”	<u>5.8</u>	<u>3.4</u>
	5.6 ± 0.2	2.8 ± 0.2
acute hepatitis	2.7	2.2
fibrose	1.4	1.2
cirrose	2.1	1.5
”	2.9	1.7
”	<u>1.7</u>	<u>1.3</u>
	$2.2 \pm 0.1^*$	$1.6 \pm 0.1^*$

* t.o.v. normale proefdieren: $p < 0.01$.

Tabel 9. Verhouding van aminozuren met vertakte ketens en aromatische aminozuren (met en zonder tryptophaan) bij normale proefdieren en proefdieren met leverafwijkingen door DMNA (gem. \pm S.E.).

4.4.4. Discussie

Eén van de mogelijke oorzaken voor de geconstateerde anemie is intra-abdominaal bloedverlies na een leverbiopsie. Dit lijkt daarom aannemelijk omdat enkele malen na een biopsie behalve een dalend hemoglobinegehalte tevens een stijging van het bilirubinegehalte werd waargenomen, waarschijnlijk door bloedafbraak. Hemolyse door infectie of hypersplenisme kan eveneens een bijdrage hebben geleverd tot de anemie. Ook door slechte voedselopname, het duidelijkst in de groep met chronische leverinsufficiëntie, kan anemie worden veroorzaakt. Experimenteel is aangetoond dat sequestratie van erythrocyten in de lever tijdens levercelnecrose eveneens tot anemie kan leiden (Miller e.a. 1977). Ook in het DMNA-model werden bij histologisch onderzoek van de leverbiopten vaak sinusoiden gezien, die extreem gevuld waren met erythrocyten. Beenmergremming als oorzaak van anemie leek niet erg waarschijnlijk, omdat bij microscopisch onderzoek van het beenmerg van enkele anemische proefdieren geen aplasie werd gevonden.

Leucocytose, zoals aangetroffen bij de dieren met chronische leverinsufficiëntie, kan het gevolg zijn van sepsis of endotoxinemie. Een focus, zoals pneumonie of abces, werd bij obductie niet aangetroffen. Helaas zijn in dit onderzoek geen bloedkweken of endotoxinenbepalingen uitgevoerd. De verhoging van γ -globuline in het serum kan er echter op wijzen dat bacteriën of hun producten in het perifere bloed terecht kwamen. De mogelijkheid hiertoe ontstaat door een verminderde functie van de Kupffercellen (na beschadiging door DMNA?) en/of door veneuze collateralen tussen het portale vaatstelsel en de systemische circulatie (Prytz e.a. 1974, Liehr e.a. 1975, Tarao e.a. 1977). De thrombocytopenie, die bij patiënten met cirrose kan voorkomen, was ook aanwezig bij de proefdieren in deze studie. Dit verschijnsel zou, behalve door een versterkte afbraak in de milt, ook verklaard kunnen worden door endotoxinemie (Nolan 1975).

Een gevoelige test om één van de synthesefuncties van de lever te meten is de prothrombinetijd (Biggs en Macfarlane 1962). In dit experiment werd gebruik gemaakt van de Thrombotest[®], een commercieel bereide oplossing van thromboplastine, die gevoelig is voor de factoren II, VII, IX en X, welke allen door de lever worden gesynthetiseerd. Deze test was het meest verlengd bij de dieren die ten gevolge van een massale levercelnecrose overleden. Het gehalte aan albumine, een andere stof die in de lever wordt gesynthetiseerd, was in deze groep honden echter niet verlaagd. Waarschijnlijk was de overlevingsduur van deze honden te kort (zes weken) om een verandering in het albuminegehalte aan te tonen. De laagste concentratie van albumine werd gevonden in de groep honden met chronische leverinsufficiëntie. Hiermee in overeenstemming is het feit dat de proefdieren uit die groep de grootste hoeveelheid ascites hadden.

Er zijn tenminste twee oorzaken aan te wijzen waarom alle proefdieren gedurende korte of langere tijd een verhoogd bilirubinegehalte hadden. Naast een verminderde conjugatie en verminderde uitscheiding door de lever die het meest gestoord was in de acute fase van hepatitis, speelde een toegenomen afbraak van bloed ook een rol, zoals enkele malen na een leverpunctie werd geconstateerd. Omdat deze twee mechanismen van stijging van het bilirubinegehalte door elkaar liepen, was de bepaling van bilirubine in dit model geen goede maat voor de leverfunctie in de periode dat frequent leverbiopsieën werden verricht. Een betere manier om de mate van leverbeschadiging tijdens de DMNA toedieningen te volgen, was het bepalen van de spiegels van alkalische fosfatase, GPT en γ GT. De snelle reactie op de toediening van DMNA en de korte halfwaardetijd van deze enzymen (Bär en Ohlendorf 1970) was daarom vooral nuttig om het tijdstip van toediening van de volgende dosis DMNA vast te stellen.

De hematologische bevindingen bij de proefdieren in dit model (anemie, leucocytose, thrombocytopenie) komen overeen met de waarnemingen bij patiënten met chronisch leverlijden (Sherlock 1975). Er zijn echter wel enige ver-

schillen in de concentraties van de leverenzymen bij patiënten met levercirrose en bij de proefdieren uit deze studie. Bij patiënten met levercirrose is de concentratie van GOT in het algemeen gelijk aan of hoger dan die van GPT (GOT/GPT is 1.0 – 1.5). De proefdieren met een stabiele portale hypertensie hadden eveneens een dergelijke GOT/GPT ratio (1.3), maar de absolute waarde van beide enzymen was bij deze proefdieren ongeveer tweemaal hoger dan bij patiënten het geval is. Dit verschil in concentraties berust waarschijnlijk op het verschil in species. De GOT/GPT ratio bij de groep dieren met acute leverinsufficiëntie was lager, namelijk 0.4. Dit gegeven is in overeenstemming met de bevindingen bij patiënten met een toxische hepatitis, evenals de stijging van het gehalte aan alkalische fosfatase en γ GT (Schmidt 1978).

De verhouding tussen de aminozuren met vertakte ketens en de aromatische aminozuren was na de toediening van DMNA verlaagd. De theorie van Soeters en Fischer (1976) dat hepatische encephalopathie het gevolg is van veranderingen in de concentraties van deze aminozuren, kon recent door Morgan e.a. (1978) bij patiënten met chronisch leverlijden niet worden bevestigd. Verder onderzoek van plasmamonsters van proefdieren uit onze studie zal kunnen uitmaken of er in dit experimenteel model een verband bestaat tussen hepatische encephalopathie en veranderingen in concentraties van bepaalde aminozuren, dan wel dat deze veranderingen het gevolg zijn van een verminderde leverfunctie, gepaard gaande met katabolie. In dat geval kan een verstoorde aminozurenratio wel een voorwaarde zijn voor de vorming van 'valse' neurotransmitters zonder dat er een direct oorzakelijk verband hoeft te bestaan tussen verschuivingen in het aminozurenpatroon en hepatisch coma.

4.5. Leverfunctieproeven

4.5.1. Inleiding

Vele farmaca worden door de lever opgenomen en gemetaboliseerd. Een gestoorde functie van de lever kan dus tot gevolg hebben dat de verwijdering van een geneesmiddel uit het bloed langzamer verloopt, met andere woorden, dat de klaring van die stof verminderd is. De klaring van een farmacon, dat uitsluitend of voornamelijk door de lever wordt geëlimineerd is afhankelijk van de volgende factoren:

- de activiteit van de enzymen die het farmacon kunnen metaboliseren
- de bloeddorstrooming (flow) van de lever
- de opnamecapaciteit van de hepatocyten
- de mate van binding van het farmacon aan bloedbestanddelen, meestal eiwitten
- de uitscheiding in de gal

Patiënten met een ziekte van de lever hebben dus meestal een verminderde klaring voor verschillende geneesmiddelen (Orlandi en Jezequel 1972). Omgekeerd kan de klaring van een bepaald farmacon een maat zijn voor één of meer functies van de lever (Branch e.a. 1973).

In dit model is de klaring van drie farmaca vóór, tijdens en na de toediening van dimethylnitrosamine onderzocht. *Antipyrine* werd gekozen omdat deze stof bijna uitsluitend door de lever wordt omgezet, weinig toxisch is en nauwelijks aan plasma-eiwitten is gebonden (Brodie en Axelrod 1950). Veranderingen in de concentratie van plasma-eiwitten hebben dus weinig invloed op het transport en de opname van antipyrine. De klaring van antipyrine is afhankelijk van de omzetting in de lever door microsomaal cytochroom P-450, maar is weinig afhankelijk van de bloedflow door de lever (Vesell e.a. 1973, Huffman e.a. 1974, de Mello en Lambotte 1978).

Om een ander aspect van de leverfuncties te onderzoeken werd als tweede farmacon *propranolol* genomen. Propranolol wordt tijdens één passage door de lever vrijwel volledig uit het bloed verwijderd, eveneens door oxydatie door cytochroom P-450 (Shand e.a. 1971). De klaring van dit geneesmiddel is voornamelijk afhankelijk van de hoeveelheid bloed die per tijdseenheid door de lever stroomt omdat de intrinsieke klaring van de lever voor deze stof zo groot is dat deze de leverdoorbloeding in normale toestand verre overtreft (Wilkinson en Shand 1975). De klaring van propranolol is daarom een maat voor de bloedflow door de lever (Evans e.a. 1973, Weiss e.a. 1978).

Indocyaninegroen is een kleurstof, die uitsluitend door de lever uit het bloed wordt opgenomen, maar die in tegenstelling tot de beide andere farmaca niet wordt omgezet. Het wordt in onveranderde vorm uitgescheiden in de gal en er is geen enterohepatische circulatie van betekenis (Cherrick e.a. 1960, Leevy e.a. 1967). Wanneer indocyaninegroen in lage doseringen wordt gegeven, wordt de klaring eveneens bepaald door de doorbloeding van de lever maar bij hogere doseringen is de klaring voornamelijk afhankelijk van de opnamecapaciteit van de hepatocyten, dat wil zeggen van het transportmechanisme door de celmembranen (Paumgartner e.a. 1970).

In dit gedeelte van de studie werd onderzocht of de klaring van antipyrine, propranolol en indocyaninegroen veranderde door de toediening van dimethylnitrosamine. Er werd gezocht naar een correlatie tussen de klaring van deze farmaca en de veranderingen in de biochemische bepalingen die beschreven zijn in paragraaf 4.4. Tevens werd onderzocht of er verschillen in klaring waren tussen de proefdieren die aan het begin van het onderzoek overleden ten gevolge van acute leverinsufficiëntie en de dieren die langer overleefden. Het verband tussen de klaring van propranolol en de bloedflow door de lever werd onderzocht bij de proef-

dieren die in een stabiele fase verkeerden met verschijnselen van portale hypertensie.

4.5.2. Methoden

Antipyrieklaring

Bij het nuchtere proefdier werd 50 mg antipyriene per kilogram lichaamsgewicht intraveneus ingespoten. Vlak vóór en 1, 1½, 2, 3 en 4 uur na de toediening van antipyriene werd twee milliliter veneus bloed in buisjes met enkele druppels heparine afgenomen. Het serum werd afgedraaid en bewaard bij een temperatuur van -20° C., tot analyse van de monsters. Het gehalte aan antipyriene in het serum werd in duplo bepaald volgens de gaschromatografische methode, beschreven door Prescott e.a. (1973). Deze test werd bij alle proefdieren één week voor de eerste dosis DMNA uitgevoerd en drie weken na de eerste dosis. De test werd vervolgens om de drie weken herhaald waarbij de tijdstippen van bloedafname veranderd werden in verband met de toenemende halfwaardetijd van antipyriene in het plasma. Bloedmonsters werden dan afgenomen na 1, 3, 5, 7 en 24 uur.

Propranololklaring

Propranolol (Inderal[®]) werd langzaam intraveneus toegediend in een dosering van één mg per kilogram lichaamsgewicht. Twee ml veneus bloed werd afgenomen in buisjes met enkele druppels heparine op de volgende tijdstippen: vlak vóór de toediening van propranolol en 30 minuten, 2 uur, 3½ uur en 5 uur na de toediening. Het bloed werd ingevroren bij -20° C. tot het moment van analyse. De concentraties van propranolol werden fluorimetrisch gemeten volgens Shand e.a. (1970). Deze klaring werd bij alle proefdieren bepaald vóór de eerste dosis dimethylnitrosamine en vervolgens om de drie weken, tot het einde van de observatieperiode.

Klaring van indocyaninegroen

Na de intraveneuze toediening van 5 mg indocyaninegroen (Cardiogreen[®], Hynson, Westcott & Dunning, Inc., Baltimore, Md) per kilogram lichaamsgewicht werden veneuze bloedmonsters van twee millimeter opgevangen in buisjes met heparine op de tijdstippen: 0, 5, 7, 10 en 15 minuten. Na centrifugeren van de bloedmonsters werden deze tot analyse bewaard bij -20° C. Het gehalte aan indocyaninegroen werd gemeten in een spectrofotometer bij een golflengte van 792 nm. Bij eventuele verdunning werd het eiwitgehalte konstant gehouden (door albumine toe te voegen) om spectrumverschuivingen te voorkomen. Evenals bij de vorige twee testen werd deze klaring bij de proefdieren eerst bepaald

voordat met DMNA werd begonnen. Na de eerste dosis DMNA werd de test iedere vier weken uitgevoerd.

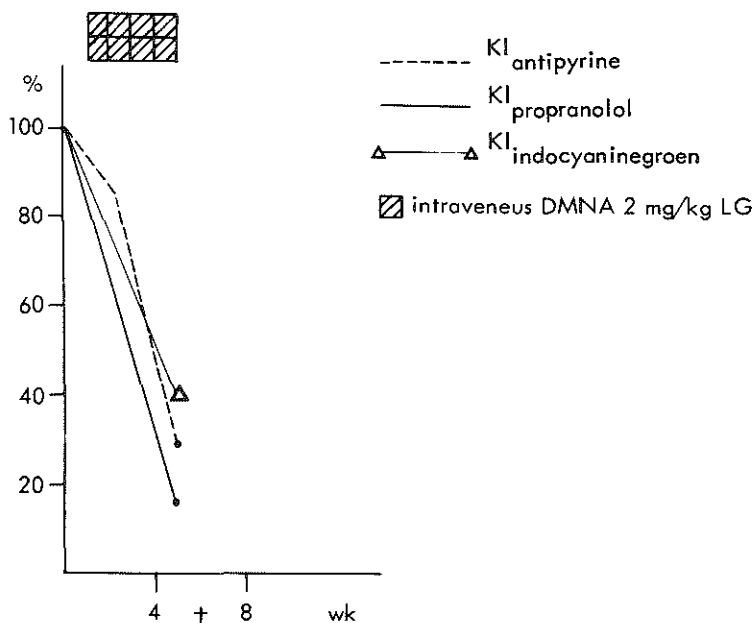
Berekening van de klaring

Ter controle werden de gemeten concentraties uitgezet op semilogaritmisch papier. De logaritme van de plasmaconcentraties daalde lineair in het gemeten tijdvak. Met behulp van regressieanalyse op de natuurlijke logaritme van de concentraties werd de hellingsconstante (k) en de concentratie ten tijde $t = 0$ (C_0 in mg/ml) berekend. De klaring Kl (ml/min) werd berekend met behulp van de formule $Kl = \frac{D}{C_0} \times k$, waarin D de toegediende hoeveelheid is (mg/kg lichaamsgewicht). De C_0 verdelingsruimte V_d (ml/kg) is gelijk aan $\frac{D}{C_0}$. Bij het berekenen van deze klaringen werd uitgegaan van een één-compartiment-systeem (Dvorchik en Vesell 1978).

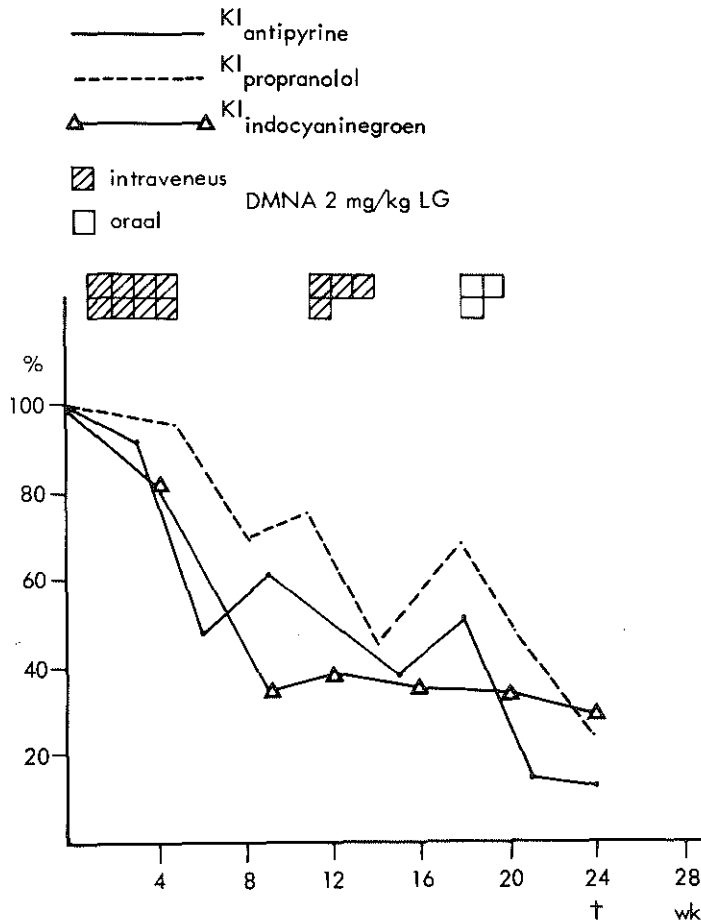
4.5.3. Resultaten

Door het toedienen van de farmaca deden zich geen ernstige complicaties voor. Wel werd enkele malen na het injiceren van propranolol een bradycardie waargenomen.

De klaringen van antipyrine, propranolol en indocyaninegroen veranderden allen door de toediening van dimethylnitrosamine, echter niet in dezelfde mate. In de Figuren 11 t/m 13 is te zien hoe de klaringen bij een proefdier uit elke



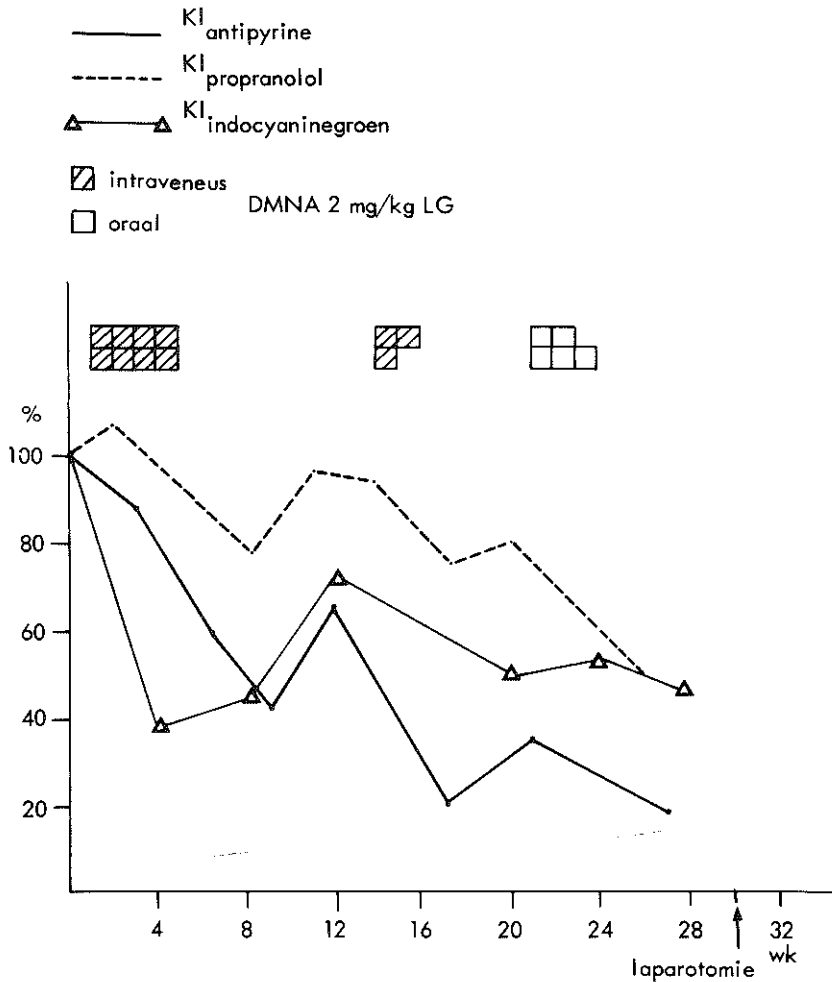
Figuur 11. Klaringen bij een proefdier met acute leverinsufficiëntie.



Figuur 12. Klaringen bij een proefdier met chronische leverinsufficiëntie.

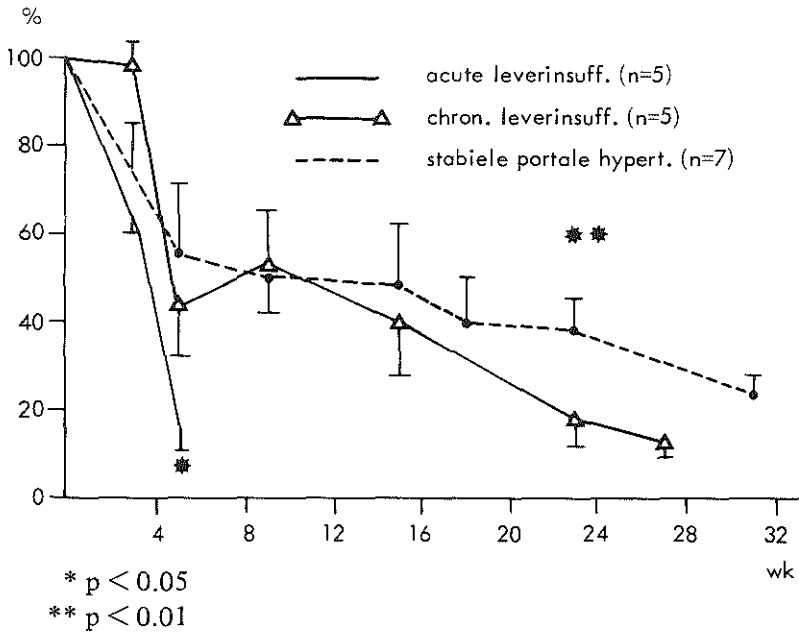
groep, weergegeven als percentage van de beginwaarde, in de loop van het experiment veranderden. Behalve bij de proefdieren met acute leverinsufficiëntie trad na het staken van de DMNA-toedieningen een (gedeeltelijk) herstel op.

In de eerste acht weken van de studie verminderden de klaringen van antipyrine en die van indocyaninegroen bij de honden die niet aan acute leverinsufficiëntie overleden met $58 \pm 4\%$ resp. $52 \pm 5\%$, ten opzichte van de beginwaarde vóór de toediening van DMNA. In dezelfde periode nam de klaring van propranol slechts af met $33 \pm 6\%$ ($p < 0.01$ t.o.v. de klaring van antipyrine, $p < 0.05$ t.o.v. de klaring van indocyaninegroen). De klaring van indocyaninegroen bleef daarna betrekkelijk stationair, terwijl de klaring van propranol nog iets verder afnam maar minder dan de klaring van antipyrine, die daalde tot ongeveer 20% van de

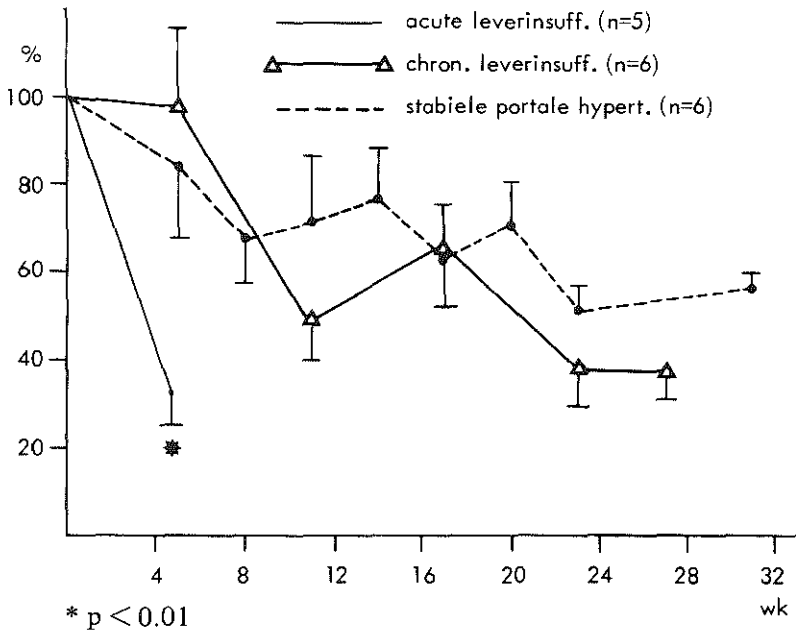


Figuur 13. Klaringen bij een proefdier met stabiele portale hypertensie.

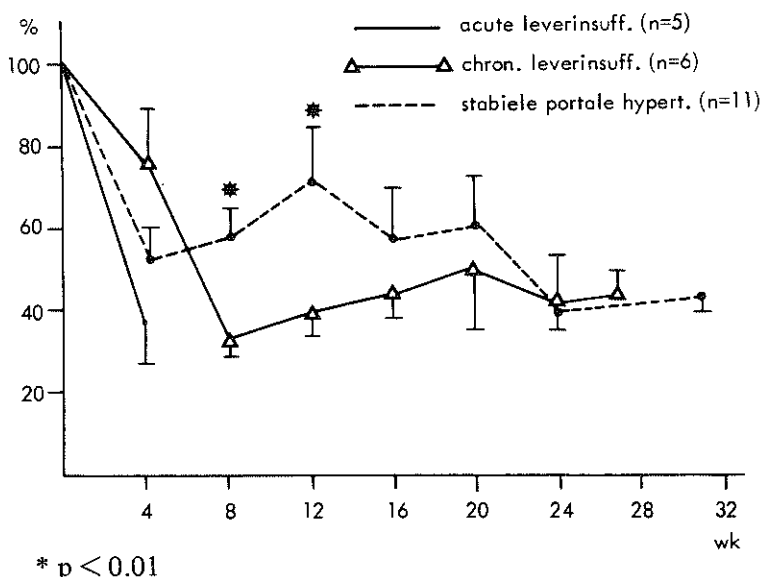
beginwaarde. Dit wordt geïllustreerd in de Figuren 14 t/m 16 waarin de gemiddelden per groep zijn weergegeven. Er waren weinig verschillen tussen de honden met chronische leverinsufficiëntie en die met portale hypertensie; weliswaar was de klaring van indocyaninegroen halverwege de observatieperiode lager bij de proefdieren bij welke later portale hypertensie werd geconstateerd, maar duidelijke verschillen in de klaring van antipyrine en propranolol tussen deze twee groepen honden waren niet aanwezig, behalve aan het einde van de observatieperiode. De proefdieren die kort na de toediening van DMNA overleden hadden vijf weken na de eerste dosis DMNA een lagere klaring van antipyrine en propranolol dan de langer levende honden maar dit verschil was niet aanwezig bij de klaring van indocyaninegroen.



Figuur 14. Klaring van antipyrine (gem. \pm S.E.).



Figuur 15. Klaring van propranolol (gem. \pm S.E.).



Figuur 16. Klaring van indocyaninegroen (gem. \pm S.E.).

Tabel 10 vermeldt de waarden die in elke groep gevonden werden aan het einde van de observatieperiode. Alle waarden waren lager dan de beginwaarden. Bovendien waren de klaringen van antipyrine en propranolol lager in de groep met chronische leverinsufficiëntie dan in de groep met stabiele portale hypertensie.

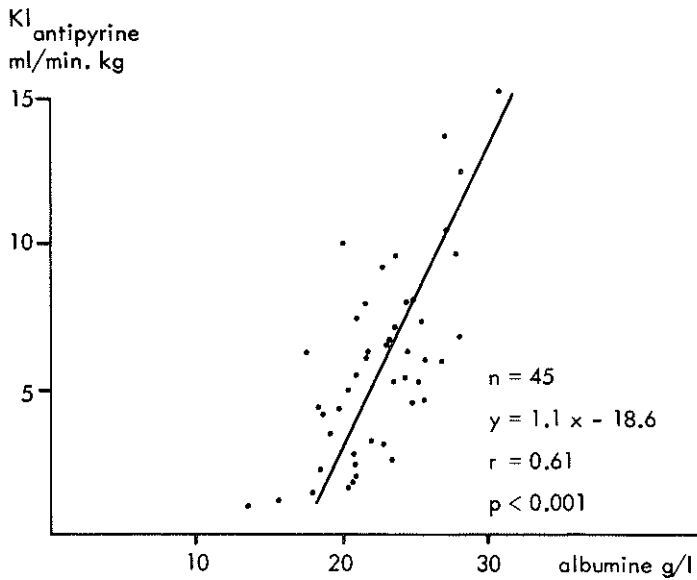
Vóór de toediening van dimethylnitrosamine werd een goede correlatie gevonden tussen de klaringen van indocyaninegroen en die van antipyrine ($n = 13$, $r = 0.79$, $p < 0.001$); eveneens bestond er een verband tussen de klaring van indocyaninegroen en die van propranolol ($n = 15$, $r = 0.56$, $p < 0.05$). Dergelijke correlaties ontbraken echter tijdens en na de toediening van DMNA.

De klaring van antipyrine werd vergeleken met verschillende biochemische parameters. Er bestond een correlatie met de logaritmische waarde van het gehalte aan alkalische fosfatase ($n = 23$, $r = 0.73$, $p < 0.001$) en het gehalte aan GPT ($n = 25$, $r = 0.67$, $p < 0.01$) tijdens en na de DMNA-toediening. Er werd eveneens een correlatie aangetoond tussen de klaring van antipyrine en de Thrombotest[®] ($n = 48$, $r = 0.65$, $p < 0.001$), en tussen de antipyrine-klaring en het albuminegehalte in het serum ($p < 0.001$, zie Fig. 17).

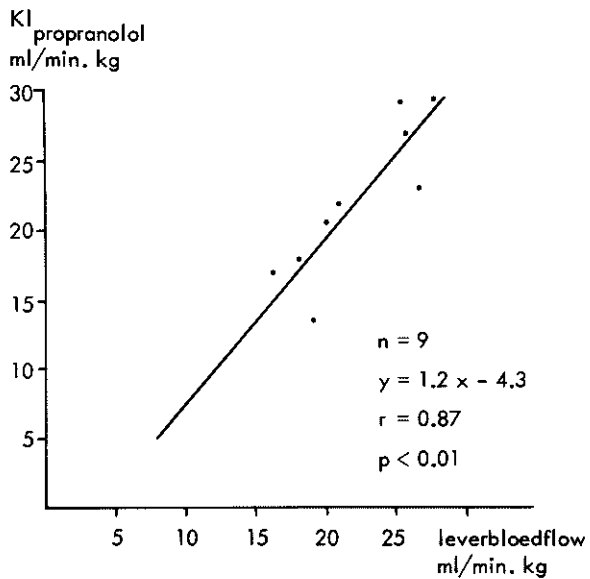
Bij proefdieren met stabiele portale hypertensie werd een goede correlatie tussen de klaring van propranolol en de leverbloedflow gevonden ($n = 9$, $p < 0.01$, zie Fig. 18). Dit verband tussen leverdoorstroming en klaring was niet aanwezig bij antipyrine en indocyaninegroen.

groep	(ml/min. kg)						aantal wk na eerste DMNA
	Kl _{antipyrine} n		Kl _{propranolol} n		Kl _{indocyaneïne} n		
proefdieren vóór DMNA	17	8.6 ± 0.5	20	43.9 ± 4.2	19	3.16 ± 0.22	
acute lever- insufficiëntie	5	1.6 ± 0.3	5	9.1 ± 0.6	5	1.25 ± 0.18	6 ± 1
chron. lever- insufficiëntie	5	1.1 ± 0.1	6	15.8 ± 2.3	6	1.57 ± 0.19	27 ± 3
portale hyper- tensie	7	2.3 ± 0.4	6	24.6 ± 2.3	11	1.54 ± 0.13	31 ± 1

Tabel 10. Klaringen per groep proefdieren aan het einde van de observatieperiode (gem. ± S.E.).



Figuur 17. De regressielijn en de correlatiecoëfficiënt van het albuminegehalte en de klaring van antipyrine bij verschillende stadia van levercelbeschadiging.



Figuur 18. De regressielijn en de correlatiecoëfficiënt van de leverbloedflow en de klaring van propranolol bij honden met stabiele portale hypertensie.

Tenslotte werd de verdelingsruimte van antipyrine berekend bij de proefdieren vóór de toediening van dimethylnitrosamine en in verschillende stadia van leverbeschadiging. Bij normale proefdieren bedroeg de verdelingsruimte 660 ± 26 ml/kg ($n = 22$) en deze veranderde door toediening van DMNA niet veel, zolang er geen ascites aanwezig was. Bij negen honden met een verminderde klaring van antipyrine maar zonder ascites, was de verdelingsruimte van antipyrine 677 ± 18 ml/kg. Wanneer duidelijk ascitesvocht aanwezig was, bleek de verdelingsruimte toegenomen te zijn tot 823 ± 35 ml/kg ($n = 14$, $p < 0.001$).

4.5.4. Discussie

Bij normale honden werd in deze studie een klaring van propranolol gevonden die ongeveer 24% hoger was dan de totale leverdoorstroming. Waarschijnlijk werd deze fout veroorzaakt doordat bij de berekening van de klaring gebruik werd gemaakt van een één-compartimentsformule, terwijl de werkelijke eliminatie waarschijnlijk in twee compartimenten verloopt. Omdat de klaring van propranolol hoger of gelijk was aan de leverbloedflow, is dus de leverdoorstroming de beperkende factor bij de eliminatie van propranolol en niet de intrinsieke klaring van de lever, dit in tegenstelling tot de eliminatie van antipyrine en indocyaninegroen. De klaring van deze twee stoffen bij gezonde honden bedroeg resp. 27% en 10% van de leverbloedflow. Het is duidelijk dat de intrinsieke klaring van de lever voor deze stoffen de eliminatie bepaalt en niet de bloedflow, tenzij deze sterk afneemt.

Tijdens en na de leverbeschadiging door dimethylnitrosamine waren de klaringen van de drie substanties verlaagd, zij het niet in dezelfde mate. Een correlatie tussen de klaringen van deze stoffen in verschillende stadia van leverbeschadiging, zoals door Branch e.a. (1976) werd vastgesteld bij patiënten met leverlijden, kon in ons onderzoek niet worden bevestigd, hoewel gebruik werd gemaakt van een hogere dosering indocyaninegroen. Een dergelijke correlatie was wel aanwezig bij gezonde proefdieren.

De klaring van antipyrine was gerelateerd aan de mate van celnecrose die bij biochemische bepalingen tot uiting kwam in een verhoogd gehalte aan alkalische fosfatase en GPT. Tevens bestond er een correlatie tussen de antipyrineklaring en de concentratie van substanties die door de lever worden gesynthetiseerd zoals albumine en enkele stollingsfactoren. Deze correlatie werd ook gevonden bij patiënten met chronisch leverlijden (Andreasen e.a. 1974, Miguët e.a. 1978).

Een correlatie tussen de klaring van propranolol en de bloedflow door de lever bij honden in een stabiele fase van chronisch leverlijden komt overeen met de bevindingen van Evans e.a. (1973). De discrepantie tussen de klaring van antipyrine en die van propranolol tijdens de eerste maanden van de DMNA-toediening kan verklaard worden uit het verlies van functionele celmassa die optreedt ten gevolge van dimethylnitrosamine, terwijl de bloeddoorstroming pas later af-

neemt wanneer de anatomie van de lever verandert door fibrose en compressie van regenererende hepatocyten. De hoeveelheid functionerende hepatocyten is bepalend voor de klaring van antipyrine, terwijl de bloeddorstrooming van de lever de propranololklaring bepaalt, tenzij de lever dermate ernstig beschadigd is dat de intrinsieke klaring van de lever voor propranolol minder wordt dan de bloedflow. Het is aannemelijk dat de bloedflow door de lever toeneemt bij een acute ontsteking van dit orgaan, zoals plaats vond bij de proefdieren met acute leverinsufficiëntie. Wanneer dan toch de klaring van propranolol sterk afnam, moet daaruit geconcludeerd worden dat bij deze proefdieren de intrinsieke klaring van de lever voor propranolol ernstig was verminderd. Waarschijnlijk was het enzym cytochroom P-450 bij deze honden door dimethylnitrosamine in een vroeg stadium al beschadigd.

Bij de honden met een minder ernstige levercelnecrose (de groep proefdieren met chronische leverinsufficiëntie en die met stabiele portale hypertensie) werd in vele gevallen een toename van de klaring van propranolol gevonden in de eerste weken van de hepatitisfase. Dit wijst op een toename in leverbloedflow.

Antipyrine verdeelt zich na toediening over de verschillende weefsels in verhouding tot het gehalte ervan aan water. Het werd daarom ook gebruikt om de totale hoeveelheid water in het lichaam te meten (Vesell e.a. 1973). Bij chronisch leverlijden kan de totale hoeveelheid lichaamswater toenemen door de retentie van vocht en de vorming van ascites. In deze studie werd een duidelijk verschil gevonden in het verdelingsvolume van antipyrine tussen de honden met ascites en die zonder ascites, onafhankelijk van de mate waarin de klaring van deze stof was veranderd.

Studies over de farmacokinetiek van geneesmiddelen bij patiënten met chronisch leverlijden worden bemoeilijkt door verschillen in de etiologie en de ernst van het leverlijden. Een constante en preciese correlatie tussen de eliminatie van een bepaald geneesmiddel en een routine levertest ontbreekt (Branch en Shand 1976). Op grond van de gegevens uit dit experiment lijkt de klaring van antipyrine een redelijke maat te zijn voor de metabole capaciteit van de lever. Propranolol geeft waarschijnlijk meer informatie over de doorbloeding van de lever, terwijl de klaring van indocyaninegroen een maat is voor het intact zijn van de plasmamembraan.

Het DMNA-model biedt de mogelijkheid bij verschillende gradaties van leverbeschadiging de kinetiek van farmaca en de samenhang met eenvoudiger biochemische bepalingen van leverfuncties te onderzoeken.

CONCLUSIES

Door dimethylnitrosamine (DMNA) aan beagles toe te dienen op geleide van het histologische beeld van frequente leverbiopsieën, werd een portale hypertensie geïnduceerd op basis van intrahepatische afwijkingen. Deze portale hypertensie lijkt in vele opzichten op de portale hypertensie die optreedt bij patiënten met levercirrose. Klinisch hadden de honden ascites en spieratrofie als uiting van portale drukverhoging en een veranderd stikstofmetabolisme; ze waren icterisch en hadden gestoorde leverfuncties, zoals die ook voorkomen bij chronisch leverlijden bij de mens. Neuropsychiatrische afwijkingen, variërend van geringe gedragsafwijkingen tot hepatisch coma, waren eveneens waarneembaar bij de proefdieren, die met DMNA waren behandeld.

Het DMNA-model van experimentele portale hypertensie bij de hond is te verkiezen boven modellen welke uitsluitend gericht zijn op het induceren van portale hypertensie door het toepassen van mechanische obstructie (Talwar e.a. 1968, Orloff e.a. 1974). Met hepatotoxische stoffen als thioacetamide en tetrachloorkoolstof (CCl_4) kan weliswaar cirrose worden opgewekt, maar de toxische werking van het agens op hersenen, nieren en longen is groot, zodat een groot aantal proefdieren daaraan overlijdt (McLean e.a. 1969, Boyer e.a. 1971). Om een lagere dosis tetrachloorkoolstof te kunnen geven zodat de schadelijke werking op andere organen dan de lever verminderde, combineerden Baddeley en Fefjar (1969) de toediening van CCl_4 aan de hond met constrictie van de *venae hepaticae*. Het nadeel is echter dat als gevolg hiervan de hemodynamische verhoudingen worden veranderd, waardoor de situatie niet meer vergelijkbaar is met het chronisch leverlijden bij de mens. Uit onze experimenten is gebleken dat de toxiciteit van dimethylnitrosamine op andere organen dan de lever gering is, hetgeen in overeenstemming is met gegevens uit de literatuur (Magee 1956, Khanna en Puri 1966). De veranderingen die door DMNA worden veroorzaakt zijn permanent, hetgeen niet het geval is bij de fibrotische veranderingen die optreden door aan proefdieren een dieet, deficiënt aan choline, te geven (Takada e.a. 1967).

Voor onze studie bleek de hond een geschikt proefdier te zijn. Hoewel vaak wordt gewezen op het belang van outflowsfincters bij de hond en het ontbreken van deze structuren bij de mens, zijn deze sfincters pas van belang bij shock en ernstige hypoxie (Greenway en Stark 1971). Bovendien heeft de mens wel een

fysiologisch sfinctermechanisme in de lever dat de outflow van bloed reguleert (Knisely e.a. 1957, Gibson e.a. 1959).

Histologisch waren de leverbeschadigingen door dimethylnitrosamine gekenmerkt door een centrilobulaire necrose, waarna in de meeste gevallen een herstelfase optrad. De architectuur van de lever raakte verstoord door de vorming van fibreuze septa en van regeneratielobuli. Eén van de bevindingen in deze studie is het feit dat de mate van portale hypertensie en de ernst van de leverbeschadiging niet altijd tot uiting komen in de microscopische preparaten van de leverbiopsieën. Terwijl sommige honden een ernstige portale hypertensie hadden met een uitgebreide collaterale circulatie en gestoorde leverfuncties, evenals andere stigmata van chronisch leverlijden zoals ascites, spieratrofie en icterus, werd bij histologisch onderzoek van de lever de diagnose "incomplete septale cirrose" of "septale fibrose met regeneratienoduli" gesteld. In deze gevallen waren de waarnemingen van de patholoog-anatoom niet in overeenstemming met het klinische beeld: de morfologie van de klassieke cirrose ontbrak hoewel die op klinische gronden wel verwacht werd. Deze discrepantie tussen kliniek en pathologie treedt ook op in de humane geneeskunde, waardoor een verkeerd beleid ten aanzien van prognose en behandeling kan ontstaan. Het therapeutisch handelen bij deze patiënten met portale hypertensie moet dan ook onzes inziens meer bepaald worden door het klinische beeld dan door de uitspraken van de patholoog-anatoom, die bij microscopisch onderzoek van de levers van deze patiënten geconfronteerd wordt met weinig imposante afwijkingen.

Het is duidelijk dat frequente percutane leverbiopsieën een essentieel onderdeel vormden van het beschreven DMNA-model. Alleen op deze wijze was het mogelijk de hoeveelheid necrose nauwlettend te volgen en de dosering van dimethylnitrosamine aan te passen. Door de lever te verkleven met het diafragma en de buikwand werd getracht het aantal complicaties van percutaan bioteren van de lever zo gering mogelijk te houden. Sedatie van het proefdier was een belangrijke factor om ernstige complicaties te voorkomen.

Aanvankelijk werd DMNA alleen intraveneus gegeven, omdat deze wijze van toediening een aantal praktische voordelen heeft: de stof is veiliger te hanteren en de hoeveelheid die door het proefdier wordt opgenomen is nauwkeuriger te bepalen dan dit het geval is bij orale toediening. Bovendien wordt een directe prikkelende werking van dimethylnitrosamine op het slijmvlies van het maagdarmkanaal vermeden. Toen echter bleek dat door intraveneuze toediening alleen niet zoveel necrose kon worden geïnduceerd dat voldoende fibrose ontstond om portale hypertensie te verkrijgen, werd de wijze van toediening veranderd. Orale toediening, zoals door Madden e.a. (1970) werd beschreven, bleek effectiever te zijn.

Het model van portale hypertensie door dimethylnitrosamine werd aanvankelijk ontwikkeld om nieuwe chirurgische technieken te onderzoeken, maar in de loop van het onderzoek bleek dat de mogelijkheden van het DMNA-model veel

uitgebreider zijn. Door dimethylnitrosamine ontstond een heel scala van leveraandoeningen, variërend van acute massale levernecrose tot chronisch leverlijden met alle complicaties daarvan, zoals portale hypertensie, ascites en coma. De meeste veranderingen in de lever en de gevolgen daarvan voor het hele organisme konden in chronologische volgorde bestudeerd worden door gebruik te maken van histologische, biochemische en hemodynamische technieken.

Uit het onderzoek naar de klaring van drie farmaca tijdens diverse stadia van levercelbeschadiging is gebleken dat verschillende functies van de lever niet alle op hetzelfde tijdstip in dezelfde mate zijn gestoord. Tijdens de eerste fasen van DMNA-hepatitis zijn vooral de microsomale oxidatieve enzymen aangedaan, terwijl pas in een latere fase, wanneer necrose en regeneratie naast elkaar aanwezig zijn, de (micro)circulatie in de lever verandert. Dit gegeven heeft consequenties voor het voorschrijven van geneesmiddelen aan patiënten die in een bepaalde fase van leverbeschadiging verkeren. Geneesmiddelen met een lage intrinsieke klaring door de lever zullen al in een vroeg stadium van levercelbeschadiging in mindere mate door de lever worden geëlimineerd dan geneesmiddelen bij welke de klaring afhankelijk is van de leverbloedflow. Bij deze groep geneesmiddelen is de eliminatie pas in een later stadium verminderd.

Het DMNA-model zoals in dit proefschrift beschreven, leent zich goed voor verdere studie over de pathofysiologie en de therapie van chronisch leverlijden. Ten aanzien van de pathofysiologie kan dit experimenteel model gebruikt worden bij onderzoek naar: a. de relatie tussen hepatocellulaire beschadiging en de vorming van bindweefsel (Popper 1977); b. de overgang van hyperplastische noduli van regenererende hepatocyten naar haarden van autonome groei, met andere woorden: de overgang van hyperplasie naar neoplasie (Farber 1976); c. de betekenis van veranderingen in de aminozurensamenstelling in het plasma en de vorming van 'valse' neurotransmitters voor het ontstaan van hepatisch coma (Hoyumpa e.a. 1979); d. de oorzaak en de gevolgen van endotoxinemie bij chronisch leverlijden (Nolan 1975).

Wat betreft de therapie van chronisch leverlijden is verder onderzoek met het DMNA-model mogelijk naar: a. de farmacokinetiek van geneesmiddelen bij diverse stadia van levercelbeschadiging; b. de effectiviteit van geneesmiddelen om fibrose tegen te gaan of "op te lossen" (Rojkind en Dunn 1979); c. het effect van nieuwe chirurgische technieken ter decompressie van portale hypertensie op het ontstaan van hepatische encephalopathie (Maillard e.a. 1974, Adamsons e.a. 1978).

Resultaten van onderzoek, uitgevoerd bij proefdieren met een gezonde lever (Restrepo en Warren 1962, Condon 1971, Orloff e.a. 1974, Adamsons e.a. 1975, Smith e.a. 1978) zijn onzes inziens van betrekkelijk weinig waarde voor de behandeling van patiënten met chronisch leverlijden en portale hypertensie. Zolang er geen experimentele modellen van alcoholische of virale leverziekten be-

schikbaar zijn, is het hier beschreven model van leverbeschadiging door dimethylnitrosamine zeer goed bruikbaar om in het laboratorium de verschillende aspecten van chronisch leverlijden en portale hypertensie te onderzoeken.

SAMENVATTING

Het doel van het onderzoek zoals beschreven in dit proefschrift, was de ontwikkeling van een experimenteel model van portale hypertensie door intermitterende toediening van de hepatotoxische stof dimethylnitrosamine (DMNA). Met dit model kunnen in het laboratorium nieuwe behandelingsmethoden voor portale hypertensie bij de mens getoetst worden op hun effectiviteit. Tevens kunnen de metabole gevolgen van een porto-systemische shunt zoals encephalopathie bestudeerd worden. Resultaten van experimenten bij proefdieren met een normale lever verschaffen slechts weinig nieuwe en relevante gegevens voor de behandeling van patiënten met bloedende varices in de oesophagus ten gevolge van een chronische leverziekte (Hoofdstuk 1).

In Hoofdstuk 2 worden de pathofysiologie en de symptomen van portale hypertensie bij de mens beschreven. Een aantal eisen waaraan een ideaal experimenteel model van portale hypertensie zou moeten voldoen, worden genoemd. De meeste experimentele modellen die in de literatuur zijn vermeld hebben echter één of meer tekortkomingen. Maar door gebruik te maken van dimethylnitrosamine kan men intrahepatische afwijkingen induceren, die veel op levercirrose bij de mens lijken. Door intermitterende toediening van deze krachtige hepatotoxische (en carcinogene) stof wordt een proces van necrose en regeneratie op gang gebracht dat uiteindelijk tot uitgebreide fibrose en cirrose kan leiden. Voor ons onderzoek werd als proefdier de hond gebruikt, hoewel de lever van de hond outflowsfincters bevat die ontbreken bij de mens. Dit verschil in anatomie was voor onze experimenten echter van weinig belang.

De opzet en de werkwijze van het onderzoek worden besproken in Hoofdstuk 3. Dertig beagles kregen wekelijks twee mg DMNA per kg lichaamsgewicht op twee opéénvolgende dagen per week via een intraveneuze injectie. Door middel van frequent genomen percutane leverbiopsieën en biochemische bepalingen werd de dosering van DMNA aangepast aan de ontstane hoeveelheid necrose, die per proefdier aanzienlijk kon verschillen. Behalve bepalingen van leverenzymen en enkele hematologische bepalingen werd ook de klaring van antipyrine, propranolol en indocyaninegroen op regelmatige tijdstippen gemeten.

De studie werd afgesloten toen de langstlevende honden een stabiele portale hypertensie hadden bereikt. Hieronder werd verstaan dat er in de histologische coupes van de leverbiopsieën geen tekenen van actief levercelverval meer werden

gezien en de leverenzymen gedurende een aantal weken stationair bleven. Bij de proefdieren met portale hypertensie werden opnieuw hemodynamische metingen verricht, die werden vergeleken met de waarden vóór de DMNA-toediening. Omdat dimethylnitrosamine, wanneer dit intraveneus werd toegediend, niet tot voldoende necrose en fibrose leidde, werd bij een deel van de proefdieren overgegaan op orale toediening die effectiever bleek te zijn.

De resultaten van de experimenten staan vermeld in Hoofdstuk 4. Op grond van het klinische beloop konden de proefdieren in enkele groepen worden verdeeld:

- 1) honden die na 5-9 weken overleden aan de gevolgen van een acute leverinsufficiëntie (n = 5)
- 2) honden die na 5-6 maanden in coma overleden ten gevolge van een chronische leverinsufficiëntie (n = 6)
- 3) honden die na \pm 7 maanden een stabiele portale hypertensie ontwikkelden (n = 11).

Vijf honden overleden aan complicaties van de percutaan genomen leverbiopsieën en één hond stierf ten gevolge van een bloeding uit ulcera in het maagdarmlkanaal. Bij twee honden veroorzaakte dimethylnitrosamine geen enkele afwijking van betekenis; deze honden waren kennelijk resistent voor de hepatotoxische werking ervan. De meeste honden ontwikkelden ascites, icterus, spieratrofie en in meer of mindere mate verschijnselen van encephalopathie tijdens de duur van het experiment.

In paragraaf 4.2 worden de resultaten van de hemodynamische metingen en de orale ammoniakbelastingtest besproken. De honden met portale hypertensie hadden een wiggedruk in een levervene die 252% hoger was dan de beginwaarde en een toename in de portale druk van 162%. De cardiac output nam toe met 26% terwijl de totale leverbloedflow was afgenomen met 28%, voornamelijk door een vermindering in de bloedflow door de vena portae. Er werd een goede correlatie gevonden tussen de hepatische wiggedruk en de direkt gemeten druk in de vena portae. Bij laparotomie, welke ongeveer 30 weken na de eerste dosis DMNA plaatsvond, bleken de proefdieren met portale hypertensie ascites te hebben, evenals uitgezette lymfvaten. De lever was kleiner dan normaal, vast van consistentie en had een fijngegranuleerd oppervlak. Opvallend waren de uitgezette collateralen tussen het portale vaatstelsel en het stroomgebied van de vena cava. Deze toegenomen collaterale circulatie kwam ook tot uiting in de ammoniakbelastingtest.

Bij histologisch onderzoek van de leverbiopsieën (paragraaf 4.3.) werd na drie weken van DMNA-toediening een centrilobulaire necrose van de hepatocyten gezien bij bijna alle proefdieren. Hoewel de dosering van DMNA meestal kon worden aangepast dankzij de frequent genomen leverbiopsieën en de biochemische bepalingen, overleden toch nog vijf proefdieren tengevolge van een massale lever-

necrose na slechts een totale hoeveelheid van 16 mg DMNA per kg lichaamsgewicht. Wanneer de honden herstelden van de acute levercelnecrose werden portoportale en portocentrale septa gevormd waarbij regeneratienoduli ontstonden. De architectuur van de lever was verstoord en de takjes van de vena portae in de levercoupes waren verwijd.

In paragraaf 4.4. worden de resultaten van de hematologische en biochemische bepalingen vermeld. De meeste honden werden anemisch en kregen een leucocytose en een thrombopenie. Vooral de honden met acute leverinsufficiëntie hadden sterk verhoogde waarden van het bilirubine en de leverenzymen in het serum. Het albuminegehalte in het bloed was het laagst bij de honden met een chronische leverinsufficiëntie, terwijl de honden met portale hypertensie de hoogste waarden van γ -globuline hadden. Wanneer de lever beschadigd raakte door de toxische werking van DMNA, veranderden de concentraties van de verschillende aminozuren in het plasma. Het gehalte aan aminozuren met vertakte ketens werd minder, maar het gehalte aan aromatische aminozuren nam toe.

Tijdens verschillende stadia van leverbeschadiging door DMNA werd de klaring van antipyrine, propranolol en indocyaninegroen bepaald (paragraaf 4.5.). In de eerste twee maanden van de toediening van DMNA namen de klaring van antipyrine en die van indocyaninegroen meer af dan die van propranolol. Aangezien de klaring van propranolol grotendeels bepaald wordt door de leverdoorstroming en de eliminatie van antipyrine afhankelijk is van de activiteit van oxideerende microsomale enzymen, werd hieruit geconcludeerd dat DMNA de enzymssystemen in de lever al in een vroeg stadium beschadigde. Pas toen er veranderingen in de (micro) circulatie van de lever optraden, nam ook de klaring van propranolol aanzienlijk af. De honden die overleden aan een massale levercelnecrose hadden een lagere klaring van antipyrine en propranolol dan de langer levende dieren. Een onderlinge correlatie tussen de klaringen van de drie genoemde stoffen werd alleen bij proefdieren met een normale leverfunctie aangetoond. Wel bestond er een verband tussen de klaring van antipyrine en de serumconcentraties van alkalische fosfatase, GPT en albumine.

In Hoofdstuk 5 worden de conclusies die uit dit onderzoek zijn te maken, besproken. De belangrijkste conclusie is dat door intermitterende toediening van dimethylnitrosamine aan de hond intrahepatische afwijkingen ontstaan, die tot een stabiele portale hypertensie kunnen leiden, welke in velerlei opzichten vergelijkbaar is met de portale hypertensie welke bij de mens ontstaat door chronisch leverlijden. Frequente leverbiopsieën zijn onontbeerlijk om de dosering van DMNA aan te passen aan de individuele gevoeligheid van elk proefdier, hoewel deze procedure niet zonder complicaties is. Behalve portale hypertensie veroorzaakt dimethylnitrosamine een heel scala van leverziekten, variërend van acute massale levercelnecrose tot chronische leverinsufficiëntie met ernstige encephalopathie.

Zolang er geen experimentele modellen van alcoholische of virale leverziekten beschikbaar zijn, is het hier beschreven model van leverbeschadiging door dimethylnitrosamine zeer goed bruikbaar om in het laboratorium verschillende aspecten van chronisch leverlijden en portale hypertensie te bestuderen. Voorts lijkt dit model meer geschikt om de verschillende chirurgische behandelingsmethoden van portale hypertensie te evalueren dan een model waarbij gebruik gemaakt wordt van proefdieren met een gezonde lever zoals tot op heden gebruikelijk was.

SUMMARY

The purpose of the study, reported in this thesis, was to create an experimental model of portal hypertension by intermittent administration of the hepatotoxin dimethylnitrosamine (DMNA). In this experimental reproduction of human hepatic disease new therapeutic approaches to the problem of decompressing portal hypertension with avoidance of encephalopathy can be investigated. Results of experiments performed in animals with healthy livers have little to offer for a better knowledge how to treat patients with bleeding oesophageal varices caused by chronic liver disease (chapter 1).

In chapter 2 the pathophysiology and symptomatology of portal hypertension in man are described in order to outline the requirements of an ideal experimental model of portal hypertension. The majority of experimental models mentioned in the literature show one or more deficiencies. Dimethylnitrosamine, however, causes intrahepatic lesions that resemble human cirrhosis closely. By intermittent administration of this potent hepatotoxin (and carcinogen) a process of necrosis and repair is started that eventually leads to extensive fibrosis and cirrhosis.

In our study dogs were used although the dog liver is different from the human liver because it contains outflow sphincters that do not have their counterparts in man. As these sphincters function in hypoxia or shock only, this difference in anatomy does not seem to be important. Another difference is that dogs do not develop oesophageal varices except under very unusual experimental conditions.

Materials and methods are discussed in chapter 3. Thirty beagles received 2 mg DMNA per kg body weight on two consecutive days weekly by intravenous injection. Percutaneous liver biopsies were frequently taken to monitor the amount of necrosis. Estimations of serum levels of hepatic enzymes (alkaline phosphatase, γ GT, GOT, GPT) were performed weekly. When more than 50% of the hepatocytes as seen in the liver biopsies were necrotic or a sharp rise in liver enzymes occurred together with clinical signs of toxicity, one or more doses of DMNA were omitted. To detect clotting disorders thrombocytes and thromboplastine time were measured. Before and after the administration of DMNA haemodynamic studies were performed in the dogs with portal hypertension. In all dogs the clearance of antipyrine, propranolol and indocyanine green was estimated every 3-4 weeks. Because dimethylnitrosamine when given intravenously

did not cause enough necrosis and fibrosis to induce portal hypertension the way of administration was changed to the oral route.

The study was finished when portal hypertension occurred without histological signs of active liver cell necrosis and more or less stable levels of liver enzymes. This goal was reached about 30 weeks after the first dose of DMNA and 6-7 weeks after the last administration. Great care was used in the handling of dimethylnitrosamine because of the toxicity of this substance and the many ways it can be absorbed by the body.

Results of the experiments are given in chapter 4. The animals could be divided in three groups according to the clinical course:

- 1) dogs that died after 5-9 weeks in acute liver failure (n = 5).
- 2) dogs that suffered from chronic liver insufficiency and died in coma after 5-6 months (n = 6).
- 3) dogs that developed portal hypertension with stable histological and biochemical abnormalities (n = 11).

Five dogs died of complications of the liver biopsies and one dog died after bleeding from gastrointestinal ulcers. Dimethylnitrosamine did not cause significant liver necrosis in two dogs and it was concluded that these two animals were resistant to the toxicity of the drug.

Clinically most dogs suffered from jaundice, ascites, muscle atrophy and encephalopathy during the course of DMNA-administration.

In paragraph 4.2. the results of the haemodynamic recordings and the ammonia tolerance test are discussed in greater detail. The dogs with portal hypertension had a 252% rise in wedged hepatic vein pressure and an increase of 162% in portal vein pressure compared with control values. The cardiac output increased with 26% and the total hepatic blood flow was diminished with 28%, largely due to the reduction in portal blood flow (43%). Wedged hepatic vein pressure correlated well with the portal vein pressure. At laparotomy the dogs with portal hypertension were found to have ascites, enlarged lymph vessels, a small, firm liver with a granular surface and a well-developed collateral circulation between the portal system and the systemic circulation. The increased collateral circulation was also demonstrated by the elevated levels of ammonia in the ammonia tolerance test.

Histological examination of the liverbiopsies (paragraph 4.3.) revealed centrilobular necrosis of hepatocytes in nearly all dogs after three weeks of DMNA-treatment.

Although the dose of DMNA could be adjusted to the individual sensitivity of most dogs by liver biopsy and biochemical examination, five dogs died of massive liver necrosis after a total amount of 16 mg DMNA per kg body weight. In the repair phase portoportal and portocentral septa were formed and nodules of

regenerating hepatocytes developed. The liver architecture was disturbed and the lumen of the portal vein branches became wider.

In 4.4. the results of haematological and biochemical determinations are described. Anaemia, leucocytosis and thrombopenia were seen in the majority of dogs. Bilirubin and liver enzymes were markedly elevated in the dogs with acute liver failure. The content of albumin was lower in the dogs with chronic liver insufficiency than in the dogs with portal hypertension. However, serum γ -globulin was higher in dogs with portal hypertension, most likely because of the presence of endotoxaemia. The ratio between branched chain amino acids and aromatic amino acids was lowered in the dogs with impaired liver tests compared with values before the DMNA-administration.

At various stages of liver damage by DMNA the clearance of antipyrine, propranolol and indocyanine green was estimated (parapgraph 4.5). In the first two months of DMNA administration the clearance of antipyrine and indocyanine green decreased with $\pm 54\%$, while clearance of propranolol was lowered by only 33%. As the clearance of propranolol was proportional to the liver blood flow and the elimination of antipyrine is dependent upon the intrinsic clearance of the liver, it was concluded that DMNA affects the microsomal oxidative enzymes in an early stage. Later on changes in the (micro) circulation take place when the liver architecture is disturbed. The dogs that died of massive liver cell necrosis had a significant lower clearance rate of antipyrine and propranolol than the longer living dogs. The correlation between the clearance of the three drugs, found in healthy animals, was lost when the liver function was impaired. However, the clearance of antipyrine was related to the serum concentrations of alkaline phosphatase, GPT and albumen.

From our data we conclude that intermittent administration of dimethylnitrosamine causes hepatic lesions in the dog that lead to portal hypertension, which resembles human disease in many ways. Frequent percutaneous liver biopsies although hazardous, proved to be necessary for adjusting the dosage of dimethylnitrosamine. Some of the dogs with stable portal hypertension had at microscopical examination of the liver histological features that did not meet the classic criteria of cirrhosis: the septa were thin and did not always connect portal areas with central veins but ended sometimes in the liver lobule. The diagnosis "incomplete septal cirrhosis" or "septal fibrosis with regenerating nodules" was made. These hepatic changes may be associated with severe portal hypertension as has been observed in patients too. Besides portal hypertension, DMNA caused a whole range of liver disorders from acute massive liver necrosis to chronic disease with serious encephalopathy.

Until reproducible models of experimental viral or alcoholic liver disease are available the DMNA model as described in this thesis seems very useful for

the study of various problems concerning pathophysiology and therapy, medical as well as surgical, of chronic liver disease and portal hypertension.

VERANTWOORDING

Mijn belangstelling voor de problematiek van portale hypertensie werd gewekt tijdens het verblijf in Suriname, waar schistosomiasis (bilharzia) frequent voorkomt. Vaak betreft het jonge landbouwers die niet zelden voor ernstige bloedingen uit slokdarmvarices moeten worden behandeld. Na terugkeer in Nederland werd het onderzoek naar de chirurgische behandelingsmethoden van portale hypertensie gestimuleerd door Dr. Th. J.M.V. van Vroonhoven, die actief was betrokken bij een groot deel van de experimenten. Bij de opzet en de uitvoering van de experimenten waren de adviezen van Dr. J.H.P. Wilson en Dr. D.L. Westbroek onontbeerlijk. Dr. A.P.R. Blok en F.J.W. ten Kate ben ik veel dank verschuldigd voor alle tijd en energie die zij besteed hebben aan het meebeoordelen van de honderden leverbiopsieën.

Wijlen Professor Dr. H. Muller en Professor Dr. H. van Houten ben ik erkentelijk voor hun zienswijze dat een opleiding tot chirurg meer moet inhouden dan uitsluitend het leren hanteren van een aantal operatieve technieken. Deze visie brengt met zich mee dat experimenteel of klinisch onderzoek in de Rotterdamse chirurgische kliniek zeer wordt aangemoedigd. Dank aan mijn collega-assistenten die bereid waren tijdens de uren die ik in het laboratorium doorbracht een gedeelte van mijn werk over te nemen.

De experimenten werden uitgevoerd in het Laboratorium voor Chirurgie van de Erasmus Universiteit te Rotterdam. Van de vele medewerkers van het Laboratorium die betrokken waren bij dit onderzoek heeft vooral E.C.C. Collij veel werk verzet om alle proeven in de juiste volgorde te laten verlopen en de anesthesie bij de proefdieren te verzorgen in samenwerking met J. Poortman, E. Ridderhof en A. Kok. Mevr. J. Dortland-de Kam en Mej. M.J. Lagerman assisteerden bij de operaties. De verzorging van de proefdieren was in goede handen bij J. Kasbergen, R.C. Spruit, P. Kreeft, R. Naessens en J. van Dongen. R.W.J. Meyer bewerkte de histologische preparaten. Een zeer groot aantal hematologische en biochemische bepalingen werd snel en accuraat verricht door W.P. van Schalkwijk. Dankzij de hulp van J.F. Fassotte en Mevr. B. Fassotte-van Leeuwen konden de hemodynamische metingen en röntgenfoto's worden uitgevoerd.

Dr. J. Noordhoek en Mevr. E.M. Savenije-Chapel van de afdeling Farmacologie bepaalden de klaringen van antipyrine en propranolol, terwijl in het Laboratorium van de afdeling Inwendige Geneeskunde II onder leiding van Dr. J.W.O.

van den Berg de klaringen van indocyaneegroen en de aminozurenanalyse werden verricht. Vragen over de statistische bewerking van de gegevens werden bereidwillig beantwoord door Ir. P.I.M. Schmitz van de afdeling Biostatistiek. Mevr. G.M. Faverey-Overkamp en Mej. W.M. van Gelder verzorgden het typewerk; de grafieken werden getekend door de Audiovisuele Dienst (hoofd: A.C. Gisolf, arts). De uiteindelijke vormgeving van dit proefschrift kwam tot stand dankzij de deskundigheid van E.J.W. Davids.

Last but not least dank ik Tineke voor haar inspanning om van een vaag verhaal, doorspekt met vakjargon, een helder betoog proberen te maken; Ditta, Tessa en Valeska dank ik voor hun enthousiasme voor alles wat met het proefschrift heeft te maken.

LITERATUURLIJST

- ADAMS, R.F. (1974): Determination of amino acid profiles in biological samples by gas chromatography. *J. of Chromatography* 95: 189-212.
- ADAMSONS, R.J., ARIF, S., BABICH, A. e.a. (1975): Arterialization of the liver in combination with a portacaval shunt in the dog. *SGO* 140 : 594-600.
- ADAMSONS, R.J., BUTT, K., IYER, S., e.a. (1978): Portacaval shunt with arterialization of the portal vein by means of a low flow arteriovenous fistula. *SGO* 146 : 869-876.
- ANDREASEN, P.B., RANEK, L., STATLAND, B.E. e.a. (1974): Clearance of antipyrine. Dependence of quantitative liver function. *Eur. J. Clin. Invest.* 4 : 129-134.
- ANTHONY, P.P., ISHAK, K.G., NAYAK, N.C. e.a. (1978): The morphology of cirrhosis. *J. Clin. Pathol.* 31 : 395-414.
- ARGUS, M.F. en HOCH-LIGETI, C. (1961): Comparative study of the carcinogenic activity of nitrosamines. *J. Natl. Cancer Inst.* 27 : 695-701.
- BADDELEY, R.M. en FEFJAR, J. (1969): A composite canine model of cirrhosis. *Ann. Surg.* 169 : 603-609.
- BAR, U. en OHLENDORF, S. (1970): Studies of enzyme elimination. I. The half-lives of some enzymes in man. *Klin. Wschr.* 48 : 776-780.
- BARNES, J.M. en MAGEE, P.N. (1954): Some toxic properties of dimethylnitrosamine. *Br. J. Ind. Med.* 11 : 167-174.
- BENGMARK, S., BORJESSON, B. en OLIN, T. (1976): Transposition of the spleen in rats with portal hypertension. *Br. J. Surg.* 63 : 268-271.
- BESSEY, O.A., LOWRY, O.H. en BROCK, M.J. (1946): A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* 164 : 321-329.
- BIEBUYCK, J., FUNOVICS, J., DEDRICK, D.F. e.a. (1975): Neurochemistry of hepatic coma. Alterations in putative neurotransmitter amino acids, in Williams R. en Murray-Lyon I.M. (eds.): *Artificial Liver Support*. London, Pitman Medical, p. 51-60.
- BIGGS, R. en MACFARLANE, R.G. (1962): *Human blood coagulation and its disorders*. Oxford, Blackwell, Scientific Publications, 3rd ed.
- BLOXAM, D.L. en WARREN, W.H. (1974): Error in the determination of tryptophan by the method of Denkla en Dewey. *Analyt. Biochem.* 60 : 621-625.
- BOYER, J.L., GUPTA, K.P.S., BISWAS, S.K. e.a. (1967): Idiopathic portal hypertension. *Ann. Intern. Med.* 66 : 41-68.
- BOYER, J.L. en KLATSKIN, G. (1970): Pattern of necrosis in acute viral hepatitis. Prognostic value of bridging (Subacute hepatic necrosis). *N. Eng. J. Med.* 20 : 1063-1071.
- BOYER, J.F., FORNARIS, M. en DONNET, V. (1971): Cirrhoses expérimentales induites par le thioacétamide chez le chien. *C.R. Soc. Biol.* 165 : 631-635.
- BRANCH, R. A., HERBERT, C.M. en READ, A.E. (1973): Determinants of serum antipyrine half-lives in patients with liver disease. *Gut* 14 : 569-573.
- BRANCH, R.A., JAMES, J.A. en READ, A.E. (1976): The clearance of antipyrine and indocyanine green in normal subjects and in patients with chronic liver disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* 20 : 81-88.
- BRODIE, B.B. en AXELROD, J. (1950): The fate of antipyrine in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 98 : 97-104.

- BUCHER, N.L.R. en SWAFFIELD, M.N. (1975): Regulation of hepatic regeneration in rats by synergistic action of insulin and glucagon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 : 1157-1160.
- BURCHELL, A.R., MORENO, A.H., PANKE, W.F. e.a. (1976): Hepatic artery flow improvement after portacaval shunt. *Ann. Surg.* 184 : 289-302.
- BYNUM, T.E., HANLEY, H.G. en COLE, J.S. (1973): Wedged hepatic vein pressure (WHVP) in normal human subjects. *Gastroenterology* 64 : 177.
- CHERRICK, G.R., STEIN, S.W., LEEVY, C.M. e.a. (1960): Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay and hepatic extraction. *J. Clin. Invest.* 39 : 592-600.
- CHILD, C.G., BARR, D.P., HOLSWADE, G.R. e.a. (1953): Liver regeneration following portacaval transposition in dogs. *Ann. Surg.* 138 : 600-608.
- CONDON, R.E. (1971): Effect of dietary protein on symptoms and survival in dogs with an Eck fistula. *Am. J. Surg.* 121 : 107-113.
- CONN, H.O. (1973): Ammonia tolerance in assessing the patency of portacaval anastomoses. *Arch. Intern. Med.* 131 : 221-226.
- CROSBY, N.T. (1976): Nitrosamines in foodstuffs. *Residue Rev.* 64 : 77-135.
- CROSBY, N.T. en SAWYER, R. (1976): N-Nitrosamines: a review of chemical and biological properties and their estimation in foodstuffs. *Adv. Food Res.* 22 : 1-71.
- COUNCILMAN, W.T. (1890): Report on etiology and prevention of yellow fever. *U.S. Marine Hosp. Serv. Public Hlth. Bull.* 2 : 151.
- DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE CHEMIE (1970): *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 8 : 658.
- DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE CHEMIE (1972): *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 10 : 281.
- DIAZ GOMEZ, M., SWANN, P.F. en MAGEE, P.N. (1977): The absorption and metabolism in rats of small oral doses of dimethylnitrosamine. *Biochem. J.* 164 : 497-500.
- DRUCKREY, H., PREUSSMAN, R., IVANKOVIC, S. e.a. (1967): Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-nitroso-Verbindungen an BD-Ratten. *Z. Krebsforsch.* 69 : 103-201.
- DVORCHIK, B.H. en VESELL, E.A. (1978): Significance of error associated with use of the one-compartment formula to calculate clearance of thirty-eight drugs. *Clin. Pharmacol. Ther.* 23 : 617-623.
- EVANS, G.H., NIES, A.S. en SHAND, D.G. (1973): The disposition of propranolol, III: Decreased half-life and volume of distribution as a result of plasma binding in man, monkey, dog and rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 186 : 114-122.
- FARBER, E. (1976): On the pathogenesis of experimental hepatocellular carcinoma, in Okuda K. en Peters R.L. (eds.): *Hepatocellular Carcinoma*. New York, Wiley and sons, p. 3-22.
- FARBER, E. en SARMA, D.S.R. (1974): DNA damage and repair during carcinogenesis, in Mehlman M. en Hanson R. (eds.): *Control Processes in Neoplasia*. New York, Academic Press, p. 173-185.
- FERNSTROM, J.D. en WURTMAN, R.J. (1972): Brain serotonin content: Physiological regulation by plasma neutral amino acids. *Science* 178 : 414-416.
- FISCHER, J.E. en BALDESSARINI, R.J. (1971): False neurotransmitters and hepatic failure. *Lancet* 2 : 75-79.
- FISCHER, J.E., YOSHIMURA, N., AGUIRRE, A. e.a. (1974): Plasma amino acids in patients with hepatic encephalopathy: Effect of amino acid infusions. *Am. J. Surg.* 127 : 40-47.
- FONSECA-WOLLHEIM, F. DA (1973): Bedeutung von Wasserstoffionenkonzentration und ADP-Zusatz bei der Ammoniakbestimmung mit Glutamatdehydrogenase. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 11 : 421-425.
- GAISFORD, W.D. en ZUIDEMA, G.D. (1965): Nutritional Laennec's cirrhosis in the Macaca mulatta monkey. *J. Surg. Res.* 5 : 220-235.
- GALAMBOS, J.T. (1972): Alcoholic hepatitis: its therapy and prognosis, in Popper H. en Schaffner F. (eds.): *Progress in Liver Diseases*, vol. IV. New York, Grune & Stratton, p. 567-588.
- GALL, E.A. (1960): Posthepatic, postnecrotic and nutritional cirrhosis. *Am. J. Pathol.* 36 : 241-259.
- GIBSON, J.B. (1959): The hepatic veins in man and their sphincter mechanisms. *J. Anat.* 93 : 368-379.
- GIPS, C.H. (1968): Diagnostische ammoniakproeven. Proefschrift Rijksuniversiteit Groningen.

- GREENWAY, C.V. en STARK, R.D. (1971): Hepatic vascular bed. *Physiol. Rev.* 51 : 23-65.
- GRUN, M. en LIEHR, H. (1977): Biological significance of altered von Kupffer cell function in experimental liver disease, in Wisse, E. en Knook, D.L. (eds.): *Kupffer cells and other Liver sinusoidal cells.* Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press, p. 437-446.
- HAKKINEN, H.M., FRANSNILA, K. en KULONEN, E. (1975): Effect of long-term administration of ethanol to the rat: Lipids, collagen and other proteins, and Mallory bodies in the liver. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 35 : 753-765.
- HAMILTON, A. en HARDY, H.L. (1949): *Industrial Toxicology.* 2nd ed. New York, Paul B. Hoeber, Inc.
- HANEY, A., PEACOCK, E.E. en MADDEN, J.W. (1972): Liver regeneration and hepatic collagen deposition in rats with dimethylnitrosamine-induced cirrhosis. *Ann. Surg.* 175 : 863-869.
- HARDING, F. (1955): Studies of the various throttle valve mechanisms of the liver. *Anat. Rec.* 121 : 305-306.
- HEATH, D.F. (1967): Variations of microsomal oxidase activity in male rats as shown by rates of dimethylnitrosamine metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 16 : 1517-1521.
- HEATH, D.F. en MAGEE, P.N. (1962): Toxic properties of dialkylnitrosamines and some related compounds. *Br. J. Ind. Med.* 19 : 276-282.
- HENLEY, K.S., LAUGHREY, E.G. en CLANCY, P.E. (1974): Gluconeogenesis in the cirrhotic liver of the rat. The effect of oleate or ethanol. *J. Lab. Clin. Med.* 83 : 175-188.
- HOYUMPA, A.M., DESMOND, P.V., AVANT, G.R. e.a. (1979): Hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 76 : 184-195.
- HUFFMAN, D.H., SHOEMAN, D.W. en AZARNOFF, D.L. (1974): Correlation of the plasma elimination of antipyrine and the appearance of 4-hydroxyantipyrine in the urine of man. *Biochem. Pharmacol.* 23 : 197-201.
- IBER, F.L., ROSEN, H., LEVENSON, S.M. e.a. (1957): The plasma amino acids in patients with liver failure. *J. Lab. Clin. Med.* 50 : 417-425.
- INOKUCHI, K., KOBAYASHI, M., OGAWA, Y. e.a. (1975): Results of left gastric vena caval shunt for esophageal varices: Analysis of one hundred clinical cases. *Surgery* 78 : 628-636.
- IOB, V., COON, W.W. en SLOAN, M. (1966): Altered clearance of free amino acids from plasma of patients with cirrhosis of the liver. *J. Surg. Res.* 6 : 233-239.
- ISSENBERG, P. (1976): Nitrite, nitrosamines and cancer. *Fed. Proc.* 35 : 1322-1326.
- JACKSON, F.C., PERRIN, E.B., FELIX, W.R. e.a. (1971): A clinical investigation of the portacaval shunt. V Survival analysis of the therapeutic operation. *Ann. Surg.* 174 : 672-701.
- KHANNA, S.D. en PURI, D. (1966): The hepatotoxic effects of dimethylnitrosamine in the rat. *J. Pathol. Bacteriol.* 91 : 605-608.
- KNISELY, M.H., HARDING, F. en DEBACKER, H. (1957): Hepatic sphincters. *Science* 125 : 1023-1026.
- KREUZER, W., SCHUELLER, E.F. en SCHENK, W.G. (1972): Hemodynamic studies of cirrhosis in the dog. *SGO* 135 : 89-93.
- LAUTERBURG, B.H., SAUTTER, V., PREISIG, R. e.a. (1976): Hepatic functional deterioration after portacaval shunt in the rat. *Gastroenterology* 71 : 221-227.
- LAUTT, W.W. (1977): Hepatic vasculature: a conceptual review. *Gastroenterology* 73 : 1163-1169.
- LEE, S., CHANDLER, J.G., BROELSCH, C.E. e.a. (1974): Portal-systemic anastomosis in the rat. *J. Surg. Res.* 17 : 53-73.
- LEEVEY, C.M., SMITH, F., LONGUEVILLE, J. e.a. (1967): Indocyanine green clearance as a test for hepatic function. *JAMA* 200 : 148-152.
- LEEVEY, C.M., POPPER, H. en SHERLOCK, S. (1976): *Diseases of the Liver and Biliary Tract: Standardization of nomenclature, diagnostic criteria and diagnostic methodology.* Fogarty International Center Proceedings nr. 22. Washington D.C., U.S. Government Printing Office.
- LEFFERT, H.L. (1974): Growth control of differentiated fetal rat hepatocytes in primary monolayer culture. VII Hormonal control of DNA synthesis and its possible significance to the problem of liver regeneration. *J. Cell Biol.* 62 : 792-801.

- LESCH, R., REUTTER, W., KEPPLER, D. e.a. (1969): Erzeugung einer Leberzirrhose durch Galactosamin. *Naturwissenschaften* 56 : 377.
- LEVY, M. (1977): Sodium retention and ascites formation in dogs with experimental portal cirrhosis. *Am. J. Physiol.* 233 : 572-585.
- LIEBERMAN, I. en SHORT, J. (1965): Hepatic blood supply and control of deoxyribonucleic acid synthesis. *Am. J. Physiol.* 208 : 896-902.
- LIEHR, H., GRUN, M., BRUNSWIG, D. e.a. (1974): Endotoxemia and liver cirrhosis, treatment with polymyxin B. *Lancet* 2 : 883-885.
- LIJINSKY, W., LOO, J. en ROSS, A.E., (1968): Mechanism of alkylation of nucleic acids by nitrosodimethylamine. *Nature* 218 : 1174-1175.
- LINDNER, H. (1971): Das Risiko der perkutanen Leberbiopsie. *Med. Klin.* 66 : 924-925.
- LISBOA, P.E. (1971): Experimental hepatic cirrhosis in dogs caused by chronic massive iron overload. *Gut* 12 : 363-368.
- MADDEN, J.W., GERTMAN, P.M. en PEACOCK, E.E. (1970): Dimethylnitrosamine-induced hepatic cirrhosis: A new canine model of an ancient human disease. *Surgery* 68 : 260-268.
- MAGEE, P.N. (1956): Toxic liver injury. The metabolism of dimethylnitrosamine. *Biochem. J.* 64 : 676-682.
- MAGEE, P.N. en BARNES, J.M. (1956): The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *Br. J. Canc.* 10 : 114-122.
- MAGEE, P.N. en FARBER, E. (1962): Toxic liver injury and carcinogenesis. Methylation of rat-liver nucleic acids by dimethylnitrosamine in vivo. *Biochem. J.* 83 : 114-124.
- MAGEE, P.N. en BARNES, J.M. (1967): Carcinogenic nitroso compounds. *Adv. Cancer Res.* 10 : 163-246.
- MAILLARD, J.N., RUEFF, B., PRANDI, D. e.a. (1974): Hepatic arterialization and portacaval shunt in hepatic cirrhosis. *Arch. Surg.* 108 : 315-320.
- MALT, R.A. (1976): Portasystemic venous shunts. *N. Eng. J. Med.* 295 : 24-29.
- MAN, J.C.H. DE (1964): Effect of cortisone on the fine structure, glycogen content, and glucose-6-phosphatase activity of hepatic cells in fasted and dimethylnitrosamine treated rats. *Cancer Res.* 24 : 1347-1350.
- MANN, H.B. en WHITNEY, D.R. (1947): On a test of whether one or two random variables is stochastically larger than the other. *Ann. Math. Statistics* 18 : 50-60.
- MARTINI, G.A., BALTZER, G. en ARNDT, H. (1972): Some aspects of circulatory disturbances in cirrhosis of the liver, in Popper H. en Schaffner F. (eds.): *Progress in Liver Diseases* vol. IV. New York, Grune & Stratton p. 231-250.
- MCLEAN, E.K., MCLEAN, A.E.M. en SUTTON, P.M. (1969): Instant cirrhosis. An improved method for producing cirrhosis of the liver in rats by simultaneous administration of carbon tetrachloride and phenobarbitone. *Br. J. Exp. Path.* 50 : 502-506.
- MELLO, M. DE en LAMBOTTE, L. (1978): Antipyrine clearance and liver blood flow. *Eur. Surg. Res.* 10, Suppl. 1 : 87.
- MEYER, D.J., STROMBECK, D.R., STONE, E.A. e.a. (1978): Ammonia tolerance test in clinically normal dogs and in dogs with portosystemic shunts. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173 : 377-379.
- MIGUET, J.P., ALLEMAND, H., JOANNE, C. e.a. (1978): La clairance de l'antipyrine: un test pour apprécier la fonction hépatique d'oxydation des médicaments. *Nouv. Presse Méd.* 7 : 4209-4211.
- MILLER, J.A. (1970): Carcinogenesis by chemicals: an overview. *Cancer Res.* 30 : 559-576.
- MILLER, D.J., PICKANICK, G.G., FISHERSTRAND, C. e.a. (1977): Experimental liver necrosis. Hepatic erythrocyte sequestration as a cause of acute anemia. *Dig. Dis.* 22 : 1055-1059.
- MIRVISH, S.S. (1975): Formation of N-Nitroso compounds: Chemistry, kinetics and in vivo occurrence. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 31 : 325-315.
- MONTESANO, R. en MAGEE, P.N. (1970): Metabolism of dimethylnitrosamine by human liver slices in vitro. *Nature* 228 : 173-174.
- MORGAN, M.Y., MILSOM, J.P. en SHERLOCK, S. (1978): Plasma ratio of valine, leucine and isoleucine to phenylalanine and tyrosine in liver disease. *Gut* 19 : 1068-1073.

- MUTCHNICK, M.G., LERNER, E. en CONN, H.O. (1974): Portal-systemic encephalopathy and portacaval anastomosis: a prospective, controlled investigation. *Gastroenterology* 66 : 1005-1019.
- NOLAN, J.P. (1975): The role of endotoxin in liver injury. *Gastroenterology* 69 : 1346-1356.
- ORLANDI, F. en JEZEQUEL, A.M. (1972): *Liver and Drugs*. London-New York, Academic Press.
- ORLOFF, M.J., CHANDLER, J.G. en CHARTERS, A.C. (1974): Comparison of end to side and side to side portacaval shunts in dogs and human subjects with cirrhosis and portal hypertension. *Am. J. Surg.* 128 : 195-201.
- PAUMGARTNER, G., PROBST, P., KRAINES, R. e.a. (1970): Kinetics of indocyanine green removal from the blood. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 170 : 134-147.
- POPPER, H. (1974): Implications of portal hepatotrophic factors in hepatology. *Gastroenterology* 66 : 1227-1233.
- POPPER, H. (1977): Pathologic aspects of cirrhosis. *Am. J. Pathol.* 87 : 228-258.
- POUND, A.W. (1975): The effect of a dose of dimethylnitrosamine on the toxicity of a subsequent dose and on the toxicity of carbon tetrachloride in mice. *Br. J. Exp. Path.* 56 : 271-275.
- PREISIG, R., BIRCHER, J. en PAUMGARTNER, G. (1972): Physiologic and pathophysiologic aspects of the hepatic hemodynamics, in Popper H. en Schaffner F. (eds.): *Progress in Liver Diseases*, vol IV. New York, Grune & Stratton, p. 201-216.
- PRESCOTT, L.F., ADJEPOŃ-YAMOAH, K.K. en ROBERTS, E. (1973): Rapid gasliquid chromatographic estimation of antipyrine in plasma. *J. Pharm. Pharmacol.* 25 : 205-207.
- PRYTZ, H., BJORNEBOE, M., JOHANSEN, T.S. e.a. (1974): The influence of portosystemic shuntoperation on immunoglobulins and Escherichia coli antibodies in patients with cirrhosis of the liver. *Acta Med. Scand.* 196 : 109-112.
- RAPPAPORT, A.M. (1973): The microcirculatory hepatic unit. *Microvasc. Res.* 6 : 212-228.
- REMILLARD, F.A., CONEN, P.E. en WALKER, G.R. (1961): Production of portal hypertension in dogs by a new method. *SGO* 112 : 543-550.
- RESNICK, R.H., CHALMERS, T.C., ISHIHARA, A.M. e.a. (1969): A controlled study of the prophylactic portacaval shunt. *Ann. Intern. Med.* 70 : 675-688.
- RESNICK, R.H., IBER, F.L., ISHIHARA, A.M. e.a. (1974): A controlled study of the therapeutic portacaval shunt. *Gastroenterology* 67 : 843-857.
- RESTREPO, J.E. en WARREN, W.D. (1962): Total liver blood flow after portacaval shunts, hepatic artery ligation and 70 per cent hepatectomy. *Ann. Surg.* 156 : 719-726.
- REYNOLDS, T.B. (1975): Portal hypertension, in Schiff L. (ed.): *Diseases of the Liver*, 4th edition. Philadelphia-Toronto, J.B. Lippincott Comp. p. 330-367.
- REYNOLDS, T.B., ITO, S. en IWATSUKI, S. (1970): Measurement of portal pressure and its clinical application. *Am. J. Med.* 49 : 649-657.
- RIOPELLE, J.L. en JASMIN, G. (1969): Nature, classification and nomenclature of kidney tumors induced in the rat by dimethylnitrosamine. *J. Natl. Cancer Inst.* 42 : 643-662.
- ROGERS, A.E. en NEWBERNE, P.M. (1973): Animal model: Fatty liver and cirrhosis in lipotrope-deficient male rats. *Am. J. Pathol.* 73 : 817-820.
- ROJKIND, M. en DUNN, M.A. (1979): Hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 76 : 849-863.
- ROWLAND, I.R. en GRASSO, P. (1975): Degradation of N-nitrosamines by intestinal bacteria. *Appl. Microbiol.* 29 : 7-12.
- RUBIN, E. en LIEBER, C.S. (1974): Fatty liver, alcoholic hepatitis and cirrhosis produced by alcohol in primates. *N. Eng. J. Med.* 290 : 128-135.
- RUEFF, B., PRANDI, D., DEGOS, F. e.a. (1976): A controlled study of therapeutic portacaval shunt in alcoholic cirrhosis. *Lancet* 1 : 655-659.
- SCHENKER, S., BREEN, K.J. en HOYUMPA, A.M. (1974): Hepatic encephalopathy: current status. *Gastroenterology* 66 : 121-151.
- SCHEUER, P.J. (1972): *Liver Biopsy Interpretation*. London, Baillière & Tindall 2nd edition.

- SCHMIDT, E. (1978): Strategy and evaluation of enzyme determinations in serum in diseases of the liver and the biliary system, in Demers L.M. en Shaw L.M. (eds.): Evaluation of Liver Function. Baltimore-Munich, Urban & Schwarzenberg p. 79-101.
- SHAND, D.G., NUCKOLLS, E.M. en OATES, J.A. (1970): Plasma propranolol levels in adults with observations in four children. *Clin. Pharmacol. Ther.* 11 : 112-120.
- SHAND, D.G., EVANS, G.H. en NIES, A.S. (1971): The almost complete extraction of propranolol during intravenous administration in the dog. *Life Sci.* 10 : 1417-1421.
- SHANK, R.C. (1975): Toxicology of N-Nitroso compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 31 : 361-368.
- SHERLOCK, S. (1974): Classification and functional aspects of portal hypertension. *Am. J. Surg.* 127 : 121-128.
- SHERLOCK, S. (1975): Diseases of the Liver and the Biliary System, 5th edition. Oxford-Edinburgh, Blackwell Scientific Publications.
- SHERLOCK, S. (1978): Portal circulation and portal hypertension. *Gut* 19 : 70-83.
- SHERLOCK, S., HOURIGAN, K. en GEORGE, P. (1970): Medical complications of shunt surgery for portal hypertension. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 170 : 392-404.
- SIEGEL, S. (1956): Nonparametric Statistics for the behavioral Sciences. New York-London, McGraw-Hill Book Comp., Inc.
- SIOU, G. en DELAITRE, D. (1972): La cirrhose hépatique expérimentale. *Arch. Mal. Prof.* 33 : 11-176.
- SMITH, A.R., ROSSI-FANELLI, F., ZIPARO, V. e.a. (1978): Alterations in plasma and CSF amino acids, amines and metabolites in hepatic coma. *Ann. Surg.* 187 : 343-350.
- SOETERS, P.B. en FISCHER, J.E. (1976): Insulin, glucagon, amino acid imbalance and hepatic encephalopathy. *Lancet* 2 : 880-882.
- STARZL, T.E., MARCHIORO, T.L., ROWLANDS, D.T. e.a. (1964): Immuno-suppression after experimental and clinical homotransplantation of the liver. *Ann. Surg.* 160 : 411-439.
- STARZL, T.E., WATANABE, K., PORTER, K.A. e.a. (1976): Effects of insulin, glucagon and insulin/glucagon infusions on liver morphology and cell division after complete portacaval shunt in dogs. *Lancet* 1 : 821-825.
- SZASZ, G., WEIMANN, G., PERSIJN, J.P. e.a. (1974): New substrates for measuring γ -glutamyl transpeptidase activity. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 12 : 228.
- TALWAR, J.H., GRIFFEN, W.O. en EISEMAN, B. (1968): Experimental portal hypertension in dogs. *Surgery* 64 : 429-432.
- TAMIYA, T. en THAL, A.P. (1960): Esophageal varices produced experimentally in the dog. *SGO* 111 : 147-154.
- TARAO, K., SO, K., MOROI, T. e.a. (1977): Detection of endotoxin in plasma and ascitic fluid of patients with cirrhosis: its clinical significance. *Gastroenterology* 73 : 539-542.
- TESTAS, P., BENICHO, J., PERRIN, N., e.a. (1978): Comparative study of two models for experimental cirrhosis in the dog. *Eur. Surg. Res.* 10 : 146-152.
- THIEL, H. (1977): Häodynamische Untersuchungen zur Leberdurchblutung unter besonderer Berücksichtigung der Arteria hepatica. *Fortschr. Med.* 27 : 1741-1744.
- THOENES, W. en BANNASCH, P. (1962): Elektronen- und lichtmikroskopische Untersuchungen am Cytoplasma der Leberzellen nach akuter und chronischer Thiocetamid-Vergiftung. *Virchows Arch. Pathol. Anat.* 335 : 556-583.
- TISDALE, W.A., KLATSKIN, G. en GLENN, W.W.L. (1959): Portal hypertension and bleeding esophageal varices: their occurrence in the absence of both intrahepatic and extrahepatic obstruction of the portal vein. *N. Eng. J. Med.* 261 : 209-218.
- VAN WAY, C.W., CRANE, J.M., RIDDELL, D.H. e.a. (1971): Arteriovenous fistula in the portal circulation. *Surgery* 70 : 876-890.
- VESELL, E.S., LEE, C.J., PASSANANTI, G.T. e.a. (1973): Relationship between plasma antipyrine half-lives and hepatic microsomal drug metabolism in dogs. *Pharmacology* 10 : 317-328.
- VIALLET, A., LEGARE, A. en LAVOIE, P. (1970): Hepatic and umbilicoportal catheterization in portal hypertension. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 170 : 177-192.

- WADDEL, W.G., BOUCHARD, A.G., WELLINGTON, J.L. e.a. (1972): Functional relations of the proximal components of the portal system. *J. Surg. Res.* 12 : 281-289.
- WARREN, W.D., ZEPPA, R. en FOMON, J.J. (1976): Selective trans-splenic decompression of gastroesophageal varices by distal splenorenal shunt. *Ann. Surg.* 166 : 437-455.
- WEISS, Y.A., SAFAR, M.E., LEHNER, J.P. e.a. (1978): (+)- Propranolol clearance, an estimation of hepatic blood flow in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 5 : 457-460.
- WILKINSON, G.R. en SHAND, D.G. (1975): A physiological approach to hepatic drug clearance. *Clin. Pharmacol. Ther.* 18 : 377-390.
- WITTE, C.L., WITTE, M.H., BAIR, G. e.a. (1974): Experimental study of hyperdynamic vs. stagnant mesenteric blood flow in portal hypertension. *Ann. Surg.* 179 : 304-310.
- WITTE, C.L., WITTE, M.H. en DUMONT, A.E. (1978): The portal triad in hepatic cirrhosis. *SGO* 146 : 965-974.
- WOGAN, G.N. en TANNENBAUM, S.R. (1975): Environmental N-nitroso compounds: implications for public health. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 31 : 375-383.
- WOLFF, I.A. en WASSERMAN, A.E. (1972): Nitrates, nitrites, and nitrosamines. *Science* 177 : 15-19.
- WONG, P.W.K., O'FLYNN, M.E. en INOUE, T. (1964): Micromethods for measuring phenylalanine and tyrosine in serum. *Clin. Chem.* 10 : 1098-1104.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1973): Schistosomiasis control. Technical Report Series, no. 515.

CURRICULUM VITAE

De schrijver van dit proefschrift werd in 1944 geboren te 's-Gravenhage, alwaar hij in 1962 het diploma Gymnasium β behaalde. In hetzelfde jaar begon hij zijn medische studie aan de Rijksuniversiteit te Leiden. In 1969 werd het artsexamen afgelegd. Van maart 1970 tot maart 1973 was hij werkzaam als arts-assistent op de chirurgische afdeling van het Academisch Ziekenhuis te Paramaribo (hoofd: Professor Dr. H. Kaulesar Sukul). In juli 1973 begon hij de opleiding tot chirurg in het Academisch Ziekenhuis "Dijkzigt" te Rotterdam onder leiding van wijlen Professor Dr. H. Muller en Professor Dr. H. van Houten. In het kader van deze opleiding werkte hij van september 1976 tot september 1977 als Research Fellow in het Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School te Boston (USA) onder leiding van Dr. R.A. Malt en Dr. N.L.R. Bucher.