

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Schmoll



**Membranwechselwirkungen des Magen- Darm- Traktes mit essentiellen Phospholipiden
nach Einwirkung ionisierender Strahlung im therapeutischen Bereich**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr.med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität-Halle-Wittenberg
verteidigt am 15.12.2003

von Michael Sudau
geb. am 22.02.1971

in Halle/ Saale

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Hans-Joachim Schmoll
2. Priv.- Doz. Dr. med. Jürgen Barth
3. Priv.- Doz. Dr. med. Ralph Stuttmann

urn:nbn:de:gbv:3-000006458

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006458>]

Ionisierende Bestrahlung im Rahmen einer Strahlentherapie induziert im Bereich des Magen-Darm-Traktes eine Reihe von Symptomen, die sich mit Meteorismus, Tenesmen, Blut- und Schleimabgängen als klinisches Bild einer Strahlenenteritis präsentieren.

Gelingt es, die Nebenwirkungen einer Radiotherapie zu reduzieren, wird dies entscheidend für den Erfolg der Behandlung sein, da dann die vollständigen, für die Tumorthherapie erforderlichen Dosen verabreicht werden können.

Die Aufgabenstellung der Arbeit war der Nachweis eines möglichen radioprotektiven Effekts von Phosphatidylcholin auf die Dünndarmmukosa bei Einwirkung ionisierender Strahlung im therapeutischen Bereich. Zur Untersuchung wurde ein bereits in Voruntersuchungen (36,73) bei Ratten verwendetes Dünndarmperfusionsmodell benutzt, bei dem nach vorangegangener partiell abdomineller Bestrahlung mit 2Gy Enzymaktivitäten ausgewählter Dipeptidasen sowie Bestimmungen des Eiweiß- und Phospholipidgehaltes vorgenommen wurden. Niedrig dosiertes Phosphatidylcholin (25mg/kg KG PPC und 50mg/kg KG) bewirkte im Tierversuch eine Verminderung der strahleninduzierten Membranintegritätsstörung. Höhere Dosierungen von exogen zugeführtem PPC (100mg/kg KG) zeigten keinen protektiven Effekt bei der Einwirkung von ionisierender Strahlung im therapeutischen Bereich auf die Dünndarmschleimhaut.

Neben der DNS-schädigenden Strahlenwirkung wird ein Großteil der Strahleneffekte „indirekt“ durch chemisch aktive Modifikationen der Wassermoleküle verursacht, so dass vermehrt Sauerstoffradikale entstehen. Während Kohlenhydratverbindungen kaum durch Sauerstoffradikale geschädigt werden, treten bei Lipiden große Schädigungen auf. Als Hauptbestandteil von Zellmembranen spielen Lipidverbindungen eine maßgebliche Rolle, so dass als Folge der Peroxidation empfindliche Störungen der Membraneigenschaften hervorgerufen werden. Besonders anfällig für eine Schädigung durch Sauerstoffradikale sind ungesättigte Fettsäuren. Ein möglicher Mechanismus der protektiven Wirkung von Phosphatidylcholin scheint dabei hauptsächlich in einer Verminderung der Lipidperoxidation begründet zu sein.

Sudau, Michael: Membranwechselwirkungen des Magen-Darm-Traktes mit essentiellen Phospholipiden nach Einwirkung ionisierender Strahlung im therapeutischen Bereich. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 48 Seiten, 2003

Inhaltsverzeichnis

		Seite:
1	Einleitung	6
2	Material und Methoden	9
2.1	Essentielle Phospholipide	9
2.2	Versuchstiere	9
2.3	Untersuchungsgruppen	9
2.4	Durchführung der Bestrahlung	10
2.5	Durchführung der Dünndarmperfusion	10
2.6	Analytik der Enzymaktivitäten und der Phospholipid- und Eiweißkonzentrationen	11
2.6.1	Alaninaminopeptidase	11
2.6.2	Dipeptidylpeptidase IV	11
2.6.3	γ - Glutamyltranspeptidase	11
2.6.4	Glycin-D-Leucin-Dipeptidase	12
2.6.5	Leucinaminopeptidase	12
2.6.6	Phospholipidgehalt	12
2.6.7	Proteingehalt	12
2.7	Statistische Auswertung	12
3	Ergebnisse	13
3.1	Ergebnisse der Kontrollen	14
3.1.1	Enzymaktivitäten	14
3.1.2	Gesamteiweiß- und Phospholipidgehalt	16
3.2	Perorale Verabreichung von PPC und Bestrahlung mit 2 Gy	17
3.2.1	Aktivitäten der Enzyme	17
3.2.2	Verhalten der Gesamteiweißkonzentrationen	20
3.2.3	Verhalten der Phospholipide	21
4	Diskussion	22
4.1	Low Dose- Bestrahlung mit 2 Gy	22
4.2	Behandlung mit Phosphatidylcholin	24
4.3	Dünndarmperfusion als Methode	26

4.4	Interpretation der Ergebnisse	27
5	Zusammenfassung	30
6	Literaturverzeichnis	31
7	Thesen	41
	Tabellenanhang (TA)	42

Abkürzungsverzeichnis

AAP	Alaninaminopeptidase N
Aqua d.	Aqua destillata
DPP IV	Dipeptidylpeptidase IV
EPL	essentielle Phospholipide
GDL	Glycyl-D-Leucin-Dipeptidase
γ -GT	γ -Glutamyltranspeptidase
KG	Körpergewicht
LAP	Leucinaminopeptidase
LPC	Lysophosphatidylcholin
PL	Phospholipidkonzentration
PPC	Phosphatidylcholin
TP	totale Proteinkonzentration

1 Einleitung und Problemstellung

Beim Aufbau von Biomembranen kann beim Säugetier von einer ausgerichteten Doppelschicht aus Lipidmolekülen sowie darin verankerten Membranproteinen ausgegangen werden, deren Verbindung und Zusammenhalt in erster Linie durch hydrophobe Wechselwirkungen begründet sind (81). Die elementaren Bausteine einer solchen Biomembran stellen dabei die Phospholipide dar. Auf Grund ihrer durch Esterbindungen hydrophilen sowie durch Veresterungen mit Fettsäuren hydrophoben Eigenschaften zählt man die Phospholipide zu den amphiphilen Molekülen. Dabei ist die entstehende sogenannte „Bilayer“-Form der Membranarchitektur so ausgerichtet, dass die hydrophoben Anteile jeweils an den Außenseiten der Membran zu finden sind und die hydrophilen Bestandteile nach innen gerichtet sind. Die enthaltenen Membranproteine sind dabei über einen Glykosyl-Phosphoinositol-Anteil N-terminal oder über hydrophobe Aminosäuresequenzen mit den Phospholipiden verbunden (57) und erfüllen durch Stofftransport, Signalerkennung und Signaltransfer essentielle Aufgaben für die Zelle (58,64). Die amphipolare Umgebung der Phospholipide ist für die Aufrechterhaltung der Proteinfunktion von wesentlicher Bedeutung. Eine Veränderung der Membranzusammensetzung geht daher auch mit einer Funktionseinschränkung der enthaltenen Membranproteine einher, was unter anderem für die Alanin-Aminopeptidase (AAP), die Na/K-ATPase, die Ca-ATPase, die Dipeptidylpeptidase (DPP IV) und die renale Dehydropeptidase I beschrieben werden konnte (52, 51, 45).

In Korrelation zur Temperatur können sich die Phospholipide in flüssig-kristallinem bis gelartigen Zustand befinden, so dass innerhalb der Membranen Bewegungsfreiheiten in mehreren Ebenen aufzufinden sind (25). Die so begründete Fluidität der Lipiddoppelschicht wurde erstmals von SINGER und NICOLSON 1972 in dem von ihnen beschriebenen „fluid-mosaic-model“ beschrieben. Dabei spielt die äußere Lipidschicht eine Schlüsselrolle in der Organisation der Zell-Plasmamembran als ein Mosaik aus geordneten Mikrodomänen, die mit Sphingolipiden und Cholesterol angereichert sind (62). Die funktionelle Einheit von Membranproteinen und deren engerer Umgebung, der Phospholipiddoppelschicht, ist für die Zelle von lebenswichtiger Bedeutung. Die Einwirkung externer Einflüsse auf die Membran (z.B. thermische Veränderungen, Einwirkung ionisierender Strahlung und Noxen) bewirken über Fluktuationsveränderungen und Bildung von „microscopic holes“ in der Membran teils erhebliche Permeabilitätsveränderungen (32).

Die im Rahmen therapeutischer Bestrahlung als Nebeneffekt auftretende Strahlenenteritis stellt als Symptomkomplex die Folge der Membranaffektionen nach Einwirkung ionisierender Strahlung dar. Häufig ergeben sich aus diesen Bestrahlungsnebenwirkungen, verbunden mit einer Reduktion der Patient compliance, Einschränkungen für das weitere Behandlungsregime (39).

Als quantitativer und qualitativer Ausdruck einer gestörten Membranintegrität und damit Permeabilitätserhöhung lassen sich im Dünndarmhomogenat nach Einwirkung ionisierender Bestrahlung deutliche Aktivitätsänderungen lysosomaler und membrangebundener Peptidasen nachweisen (18,14,19). Zur Untersuchung der Membranveränderungen nach lokal einwirkender Röntgenstrahlung, wurde in dieser Arbeit ein von BOSSMANN et al. 1984 etabliertes Verfahren eines Dünndarmperfusionmodells gewählt, bei dem erstmals durch in vivo Perfusion proximaler Dünndarmanteile von Ratten mit Ethanol sowie Tetrachlorkohlenstoff Aktivitätsänderungen verschiedener Peptidasen als Folge einer Membranintegritätsstörung gezeigt werden konnten (23). Dieses Verfahren wurde in vorausgegangenen tierexperimentellen Studien bereits verwendet, um nach Einwirkung einer partiellen abdominalen „low dose“- Bestrahlung von 2,0 Gy Bestimmungen der Eiweiß- und Phospholipidkonzentrationen sowie der Enzymaktivitätsänderungen vorzunehmen (36). Dabei konnten als Ausdruck eines Membranschadens, insbesondere für die lysosomal, also intrazellulär vorkommende Leucinaminopeptidase (LAP), signifikante Aktivitätserhöhungen im Perfusat nachgewiesen werden.

Um die Begleitreaktionen therapeutischer Bestrahlung zu minimieren, ist es daher von großem Interesse, die Destabilisierung der Membran zu reduzieren und sich anschließende Reparaturvorgänge zu beschleunigen.

In Erweiterung der Fragestellung der vorherigen Untersuchungen wurde ein möglicher radioprotektiver Effekt von Phosphatidylcholin (PPC) untersucht. Im Vorfeld einer auf das Abdomen begrenzten Bestrahlung, sollte eine dreiwöchige orale Verabreichung des Medikaments präventiv eine Stabilisierung der Membran bewirken.

Behandlungserfolge durch therapeutisches Verabreichen von essentiellen Phospholipiden konnten in der Vergangenheit bereits bei der Behandlung von chronischen und akuten Leberparenchymschädigungen und supportiv bei der Regeneration von Dünndarmmukosa nachgewiesen werden (56, 61, 66, 44, 30, 3). Eine perorale Vorbehandlung mit dem „Membranbaustein“ Phospholipid könnte daher, durch vorherige Stabilisation der Membranzusammensetzung, eine Reduzierung des intestinalen Schadensmusters der Strahlenwirkung herbeiführen. Die Interaktionen von essentiellen Phospholipiden mit den

Membranbereichen des Bürstensaums der proximalen Dünndarmabschnitte bei Ratten und deren mögliche protektive Wirkung auf eine nachfolgende Einwirkung ionisierender Strahlung ist Gegenstand dieser Arbeit.

Entsprechend vorangegangener Arbeiten mit dem Dünndarmperfusionsmodell (22,23,36) basierte der Versuchsaufbau erneut auf einer pumpengetriebenen in vivo Jejunumperfusion bei Ratten über einen Zeitraum von 150 Minuten. Untersucht wurde dabei ein proximales Dünndarmsegment von in therapeutischen Dosen bestrahlten, gleichaltrigen, weiblichen Wistar-Ratten, nachdem diese zuvor drei Wochen mit essentiellen Phospholipiden gefüttert wurden. Als Perfusionsmedium wurde Ringerlösung verwendet, aus welcher nach 30, 60, 120 und 150 Minuten Probeentnahmen zur Bestimmung der Aktivitäten der Peptidhydrolasen AAP, DPP IV, γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GT), Glycyl-D-Leucin-Dipeptidase (GDL), LAP, sowie des Gesamtproteingehaltes (TP) und Phospholipidgehaltes (PL) entnommen wurden.

Die erhobenen Untersuchungen sollten Erkenntnisse erbringen, ob durch die exogene perorale Zufuhr von Phospholipiden, die den körpereigenen durch einen höheren Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren überlegen sind, die Möglichkeit einer protektiven, prophylaktischen Behandlung enteraler Strahlenreaktionen besteht.

Ähnliche präventive Effekte konnten bereits für mehrere Substanzen nachgewiesen werden. So konnten z.B. RIEHL et al. 2000 einen radioprotektiven Effekt durch die Gabe von Lipopolysacchariden 24 Stunden vor Bestrahlung nachweisen (75). Als möglicher Mechanismus wurde dabei eine durch Prostaglandin getriggerte Induktion einer Schleimhautprotektion vermutet, da nach Gabe eines Cyclooxygenaseantagonisten ein deutlich geringeres Benefit für das Dünndarmepithel nach Bestrahlung zu erkennen war.

Neben der grundsätzlichen Frage nach einem zytoprotektiven Effekt von PPC sollte als ein weiterer Aspekt dieser Arbeit eine mögliche Dosisabhängigkeit der PPC- Wirkung untersucht werden, so dass von uns der „low dose“- Bereich untersucht wurde. Es wurde zu diesem Zweck je einer Versuchstiergruppe 25 mg/kg Körpergewicht (KG), 50 mg/kg KG und 100 mg/kg KG peroral verabreicht.

2 Material und Methoden

2.1 Essentielle Phospholipide

Es handelte sich bei dem untersuchten Präparat um EPL (essentielle Phospholipide) der Firma RHÔNE-POULENCE RORER, das sich zu 96% aus PPC, zu 3% aus Lysophosphaditylcholin (LPC) und ungesättigten Fettsäuren (Palmitinsäure rel. 13,0%, Stearinsäure rel. 4,0%, Ölsäure rel. 10,0%, Linolsäure rel. 67,0%, Linolensäure rel. 6%) zusammensetzt. Individuell für das Körpergewicht der Versuchstiere berechnet, wurden 100 mg/kg KG, 50 mg/kg KG, beziehungsweise 25 mg/kg KG EPL gemäß der Herstellungsvorschrift für EPL unter der Anwesenheit von Stickstoff gelöst. Je ein ml der Substanz wurde den Versuchstieren mittels einer Knopfkanüle peroral appliziert.

2.2 Versuchstiere

Als Untersuchungstiere wurden 36 weibliche Wistar-Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 220-250 g verwendet. Die Tiere besaßen zum Zeitpunkt der Untersuchung ein Alter von 10-12 Wochen. Zur Haltung wurden Spezialkäfige aus Polycarbonat mit einer Größe von 37,5 cm x 21,5 cm x 15,0 cm benutzt, in welchen je drei Tiere untergebracht waren. Die Ernährung erfolgte mittels Fütterung von Standard Diät- Pellets (Altromin- GmbH) sowie Flüssigkeitszufuhr in Form von Leitungswasser mit separaten Trinkflaschen ad libitum, welche an der Käfigaußenseite angebracht waren.

2.3 Untersuchungsgruppen

Die Versuchstiere wurden in 6 Gruppen unterteilt: Gruppe A (Kontrollgruppe) erhielt 21 Tage morgens 9.30 Uhr lediglich 1,0 ml Aqua destillata (Aqua d.) peroral. Die Zufuhr erfolgte durch eine aktive Applikation mittels einer Knopfkanüle. Gruppe C wurde in gleicher Weise wie die Gruppe A mit Aqua d. vorbehandelt, jedoch am 22. Tag bestrahlt (2 Gy partiell). Die Gruppe B diente der Untersuchung der Eigeneffekte des PPC. Die Versuchstiere erhielten 100 mg/kg KG PPC ohne anschließend am 22. Tag bestrahlt zu werden. Den Gruppen D, E und F wurden Dosen von 25 mg, 50 mg und 100 mg/kg KG PPC-K (Rhône-Poulenc Rorer GmbH) verabreicht sowie am 22. Tag auf das Abdomen begrenzt mit 2 Gy bestrahlt.

Gruppe (N=6) Procedere	A	B	C	D	E	F
<u>Perorale</u>						
<u>Applikation:</u>						
Zeitraum (d)	21	21	21	21	21	21
Substanz	Aqua d.	PPC	Aqua d.	PPC	PPC	PPC
Dosis(mg/kg KG)	-	100	-	25	50	100
<u>Bestrahlung:</u>	nein	nein				
Zeitpunkt	-	-	22. Tag	22. Tag	22. Tag	22. Tag
Dosis (Gy)	-	-	2	2	2	2

Tab. 1 Darstellung der Untersuchungsgruppen

2.4 Durchführung der Bestrahlung

Die Tiere der Gruppen C bis F wurden einer Dosis von 2,0 Gy, die auch therapeutisch als Fraktionsdosis verwendet wird, ausgesetzt. Dabei wurde eine Perspex™-Plexiglas-Röhre (Polymethyl Methacrylat) verwendet, ein Material, das auf Grund der guten Strahlenpermeabilität häufig zur Messungen von Strahlenexpositionen verwendet wird (43)), welche beidseitig luftdurchlässig verschlossen werden konnte (Wanddicke: 2 mm, Länge: 15 cm, innerer Durchmesser: 4,5 cm). Der Bestrahlungsmittelpunkt befand sich dabei median des Abdomens (Feldgröße von 6 cm x 4 cm; Feld- Fokus- Abstand: 40 cm; 2,02 Gy/min; 200 kV; 20 mA; Apparat: Philips® RT 250). Die Bestrahlung erfolgte entsprechend der circadianen Tagesrhythmik der Versuchstiere stets gegen 8.30 Uhr.

2.5 Durchführung der Dünndarmperfusion

Am 23. Tag nach Beginn der ersten p.o. Gaben erfolgte zunächst die Narkotisierung der Untersuchungstiere durch eine intraperitoneale Injektion von Urethan (70mg/ 100g KG). In einer unter anderem von BOSSMANN 1984 etablierten Untersuchungsmethode wurde anschließend die Präparation eines 20 cm langen Dünndarmsegmentes durchgeführt. Nach Lagerung des Untersuchungstieres auf einem beheizten Operationstisch für Kleintiere erfolgte

zunächst die mediane Eröffnung des Bauchraumes. Orientierend an den anatomischen Strukturen Magen und Pars descendens duodeni wurde kurz unterhalb, möglichst unter Erhalt der Gefäßversorgung, ein 20 cm langes Dünndarmsegment präpariert an dessen Enden ein Infusionsschlauchsystem angeschlossen wurde.

In Verbindung mit einer Peristaltikpumpe (Modell Bromma Schweden) wurde der entstandene Kreislauf mit 17 ml Ringerlösung (9,50 g NaCl; 0,1 g KCl; 0,2 g CaCl₂; 0,15 g NaHCO₃; 1,0 g Glukose ad 1000,0 ml Aqua d.) aufgefüllt und mit einer Flussrate von 0,7ml/min perfundiert. Während der in vivo Perfusion erfolgte je nach 30, 60, 120 und 150 min eine Probeentnahme von 1,5 ml. Zur Volumensubstitution wurde dem Perfusionskreislauf die adäquate Menge an Ringerlösung ausgleichend zugeführt. Der dabei auftretende Verdünnungseffekt wurde durch Berechnung eines Verdünnungsfaktors entsprechend den Ermittlungen bereits vorangegangener Untersuchungen mit dem Perfusionsmodell berücksichtigt (22, 23,24,73).

Nach Gewinnung der letzten Probeentnahme nach 150 min erfolgte die Tötung der Tiere durch Verabreichung einer Überdosis Urethan intraperitoneal.

2.6 Analytik der Enzymaktivitäten und der Phospholipid- und Eiweißkonzentrationen

Analog zur Auswahl und den Bestimmungsmethoden der vorherigen Untersuchungen mit dem benutzten Dünndarmperfusionsmodell erfolgte die Ermittlung der Enzymaktivitäten sowie der Phospholipid- und Eiweißkonzentrationen:

2.6.1 Alaninaminopeptidase (EC 3.4.11.2)

Die Bestimmung erfolgte mit einem Kit von Fluidchemie nach der Methode von FARR et al. (33).

2.6.2 Dipeptidylpeptidase IV (EC 3.4.14.5)

Zur Bestimmung wurde die Methode von KÜLLERTZ 1988 angewandt (50).

2.6.3 γ -Glutamyltranspeptidase (EC 2.3.2.2)

Die γ -GT-Aktivitätsbestimmung erfolgte durch den Bio- Test GGTP (Lachema, Chemapol AG Prag).

2.6.4 Glycin-D-Leucin-Dipeptidase (EC 3.4.13.11)

Die Bestimmung wurde zunächst mit Hilfe einer Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Im Anschluss erfolgte eine Densitometrie.

2.6.5 Leucinaminopeptidase (EC 3.4.11.1)

Die Aktivitäten der LAP wurden mit Hilfe des Fermognost™ LAP-Testkits ermittelt, bei dem das Substrat Leucinhydrazid in Anwesenheit von LAP in Dimethylaminobenzaldehyd umgewandelt wird.

2.6.6 Phospholipidgehalt

Die Ermittlung des Phospholipidgehaltes erfolgte nach BARTLETT (9).

2.6.7 Proteingehalt

Zur Bestimmung des Eiweißgehaltes wurde die Methode nach LOWRY et al. (1951), modifiziert nach GLÄSER und KLEINE (40) verwendet.

2.7 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte computergestützt (Excel Version 7.0). Es wurde eine einfache Varianzanalyse zur Beurteilung der Perfusionsergebnisse angewandt. Nach Bestimmung der Mittelwerte sowie der entsprechenden Standardabweichungen erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-Testes (SPSS Version 8.0) die Signifikanzprüfung mit einer zu Grunde liegenden Irrtumswahrscheinlichkeit von $p=0,05$ (5%). Eine statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

Nach Strahlenexposition im Rahmen therapeutischer Bestrahlungen sind oftmals enteritische Symptome und Malabsorptionszustände als Ausdruck eines Membranschadens der Dünndarmmukosa auffällig, die eine wesentliche Limitierung der Intensität und der Dauer der Radiotherapie darstellen (72). Als ursächlich für die funktionellen Störungen an der Darmschleimhaut, mit schweren Alterationen der Enterozyten selbst, wird eine Beeinflussung der Integrität der Membranstruktur nach ionisierender Strahlung angesehen (36). Diese findet ihren Ausdruck zunächst in einer Zunahme der Membranfluidität (47,20), die mit ausgeprägten, dosisabhängigen Permeabilitätsstörungen einhergeht (59,68) und sich schließlich in einer vermehrten Apoptoserate der Enterozyten widerspiegelt (74).

Es wurde untersucht, ob eine primärpräventive, perorale Gabe von essentiellen Phospholipiden über einen Zeitraum von drei Wochen strahleninduzierte Membranschäden kompensieren kann. In vorangegangenen Publikationen konnte gezeigt werden, dass der Applikation von PPC als physiologischem Membranbaustein ein membranprotektiver Effekt nach Einwirkung von unterschiedlichen Noxen zuzuschreiben ist (8,2,66,3,5).

Es wurden insgesamt drei Dosierungen von PPC (25 mg/kg KG, 50 mg/kg KG und 100 mg/kg KG) auf ihre membranprotektive Wirkung untersucht. Dazu wurden die entsprechenden Versuchstiergruppen (D,E,F) über einen Zeitraum von 21 Tagen aktiv mittels einer Knopfkanüle mit PPC gefüttert. Am 22. Tag erfolgten eine partielle 2 Gy-Bestrahlung des Abdomens und 20 Stunden danach anschließend, nach Dünndarmperfusion eines definierten Jejunumabschnittes, die Bestimmungen ausgewählter Enzymaktivitäten sowie des Phospholipid- und Proteingehaltes.

Die Kontrollgruppe (C) wurde in ähnlicher Weise behandelt. Statt PPC erhielten die Tiere dieser Versuchsgruppe allerdings lediglich Aqua d. Weiterhin wurde einer Gruppe (A) 21 Tage Aqua d. verabreicht ohne eine nachfolgende Bestrahlung anzuschließen, um die Beeinflussung der Prozedur der Fütterung und des Operationsverfahrens selbst zu untersuchen. Der Eigeneffekt des PPC wurde in einer anderen Versuchstiergruppe (B) kontrolliert, indem 3 Wochen PPC in einer Dosis von 100 mg/kg KG verabreicht und keine Bestrahlung durchgeführt wurde.

3.1 Ergebnisse der Kontrollgruppen

3.1.1 Enzymaktivitäten

Die Enzymaktivitäten der AAP, DPP IV, GDL und γ -GT der Kontrollgruppen A und B zeigten nur geringgradige, nicht signifikante Unterschiede in den durchgeführten Aktivitätsbestimmungen (Abb. 1-4).

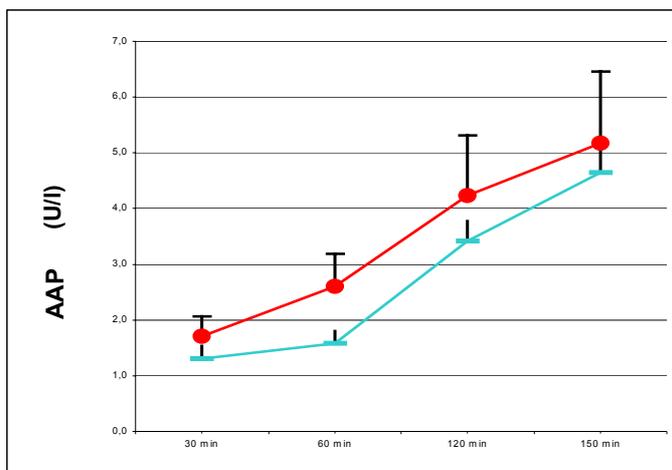


Abb.1

Abb.1 AAP- Aktivitäten der Gruppen A und B (n=6). Die einzelnen Markierungen stellen die Mittelwerte der Datenreihen dar, an denen die mittlere Standardabweichung abgetragen wurde (\pm SE).

—●— PPC 100 (B)
—■— Aqua d. (A)

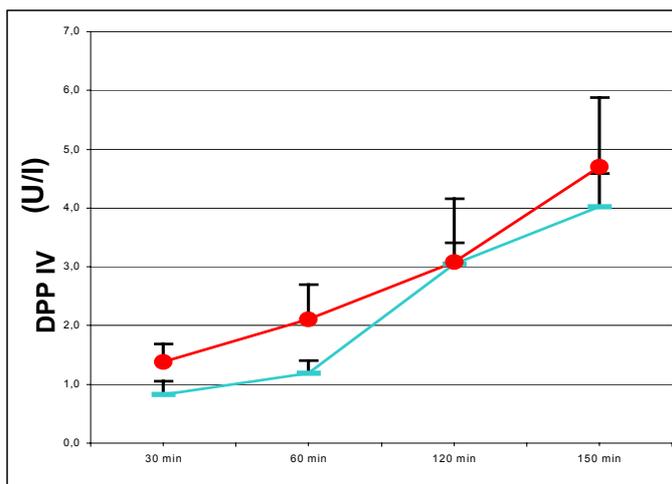


Abb.2

Abb. 2 DPP IV-Aktivitäten der Gruppen A und B (n=6). Die einzelnen Markierungen stellen die Mittelwerte der Datenreihen dar, an denen die mittlere Standardabweichung abgetragen wurde (\pm SE).

—●— PPC 100 (B)
—■— Aqua d. (A)

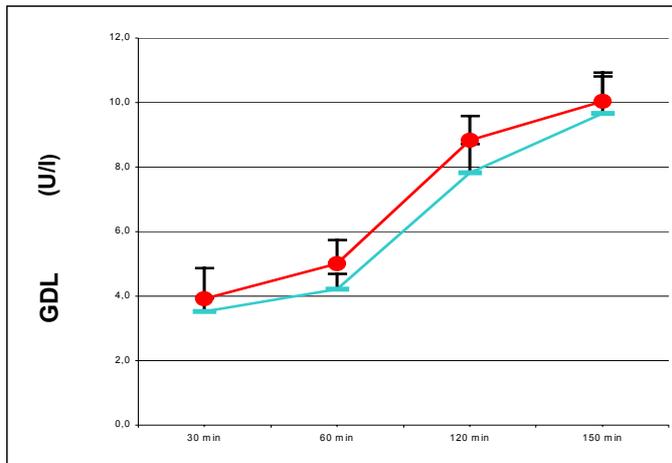


Abb.3

Abb.3 GDL-Aktivitäten der Gruppen A und B (n=6). Die einzelnen Markierungen stellen die Mittelwerte der Datenreihen dar, an denen die mittlere Standardabweichung abgetragen wurde (\pm SE).

—●— PPC 100 (B)
—■— Aqua d. (A)

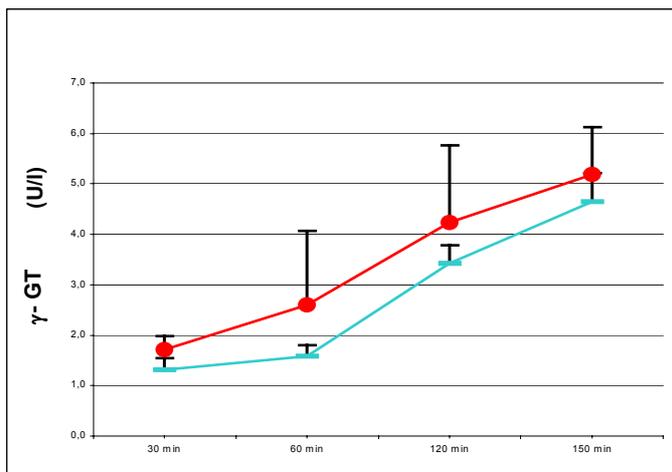


Abb.4

Abb.4 γ -GT der Gruppen A und B (n=6). Die einzelnen Markierungen stellen die Mittelwerte der Datenreihen dar, an denen die mittlere Standardabweichung abgetragen wurde (\pm SE).

—●— PPC 100 (B)
—■— Aqua d. (A)

Bei den Enzymaktivitäten der LAP zeigten sich nach 30 Minuten im Vergleich zur Versuchsgruppe A zunächst nur mäßig gesteigerte Aktivitäten der Gruppe B. Im Verlauf waren diese jedoch ausgeprägter und erreichten vierfach höhere Werte im Vergleich zur Aqua d.- Gruppe nach 150 Minuten (Gruppe C: 23,2 U/l; Gruppe A: 5,6 U/l). Trotz der deutlich sichtbaren Abweichung der Mittelwerte der Untersuchung fand sich knapp kein statistisch signifikanter Unterschied (Abb. 5).

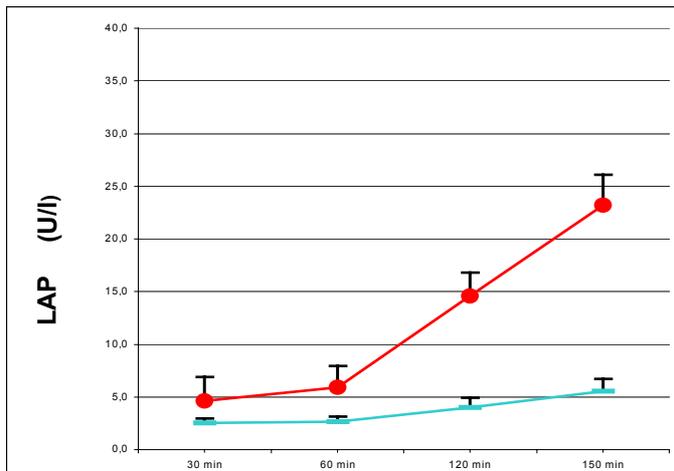


Abb. 5 LAP- Aktivität der Gruppen A und B (n=6). Die einzelnen Markierungen stellen die Mittelwerte der Datenreihen dar, an denen die mittlere Standardabweichung abgetragen wurde (\pm SE).

—●— PPC 100 (B)
—■— Aqua d. (A)

Abb.5

3.1.2 Gesamteiweiß- und Phospholipidgehalt

Verglichen mit der mit 100 mg/kg KG PPC behandelten Gruppe (B) konnten in der Versuchsgruppe A zum Zeitpunkt der ersten Bestimmung nach 30 Minuten nur etwa 60 % der Eiweißkonzentrationen gemessen werden. Im weiteren Verlauf bis zum Ende der Untersuchung gestaltete sich der Unterschied noch deutlicher (Abb.6), jedoch konnte trotz der Differenz keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

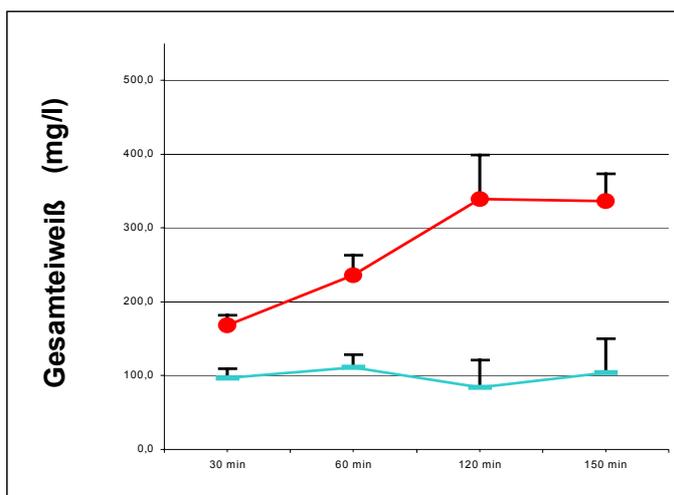


Abb. 6 Eiweißkonzentrationen der Gruppen A und B (n=6) . Die einzelnen Markierungen stellen die Mittelwerte der Datenreihen dar, an denen die mittlere Standardabweichung abgetragen wurde (\pm SE).

—●— PPC 100 (B)
—■— Aqua d. (A)

Abb.6

Die Phospholipidkonzentrationen zeigten ein ähnliches Verteilungsmuster, die Differenzen zwischen den beiden Gruppen waren insbesondere an den Endpunkten ausgeprägter. Aber auch hier konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 7).

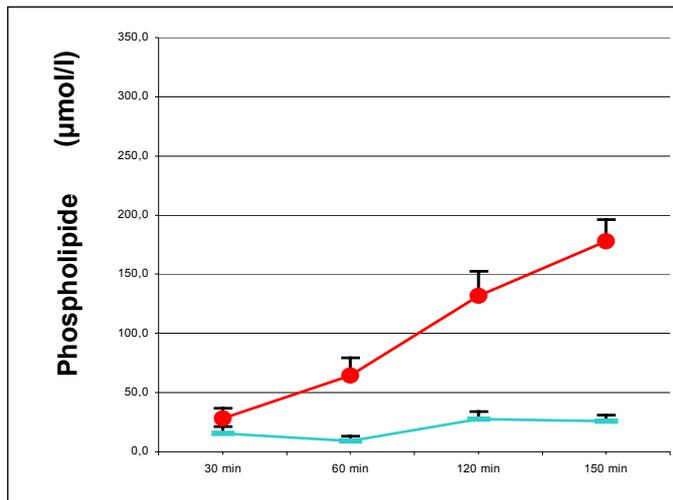


Abb. 7 Phospholipidkonzentrationen der Gruppen A und B (n=6). Die einzelnen Markierungen stellen die Mittelwerte der Datenreihen dar, an denen die mittlere Standardabweichung abgetragen wurde (\pm SE).

—●— PPC 100 (B)
—■— Aqua d. (A)

Abb.7

3.2 Perorale Verabreichung von PPC und Bestrahlung mit 2 Gy

In drei unterschiedlichen Dosierungen erhielten die Versuchstiere PPC über einen Zeitraum von 21 Tagen (Gruppe D 25 mg/kg KG, Gruppe E 50 mg/kg KG und Gruppe F 100 mg/kg KG). Nach einer auf das Abdomen begrenzten Bestrahlung von 2 Gy am 22. Tag wurden am 23.Tag, in adäquater Verfahrensweise zu den nicht bestrahlten Gruppen, mit Hilfe des Dünndarmperfusionsmodells die Enzymaktivitäten sowie die Protein- und Phospholipidkonzentrationen bestimmt. Die Ratten der Gruppe C erhielten im Gegensatz dazu statt PPC Aqua d. und dienten für dieses Procedere bei sonst analoger Behandlung als Placebogruppe.

3.2.1 Aktivitäten der Enzyme

Bei der AAP bewegte sich das Niveau der Aktivitäten der Gruppe F (PPC 100 mg/kg KG) am Endpunkt nahezu auf dem gleichen Level wie das der Placebogruppe. Die beiden

Versuchsgruppen mit der mittleren sowie niedrigen Dosierung lagen deutlich unter dem Niveau der Placebogruppe. Dabei konnte in der Gruppe E (PPC 50 mg/kg KG) eine statistische Signifikanz nach 120 Minuten dokumentiert werden ($p < 0,04$). Die Gruppe D (PPC 25 mg/kg KG) zeigte nach 120 Minuten ebenfalls signifikant erniedrigte Enzymaktivität ($p < 0,02$). Noch deutlicher hob sich das Ergebnis jedoch nach 150 Minuten ab, als in dieser Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $p < 0,004$ sogar eine hochsignifikante Reduzierung der Aktivität festgestellt werden konnte (Abb. 8).

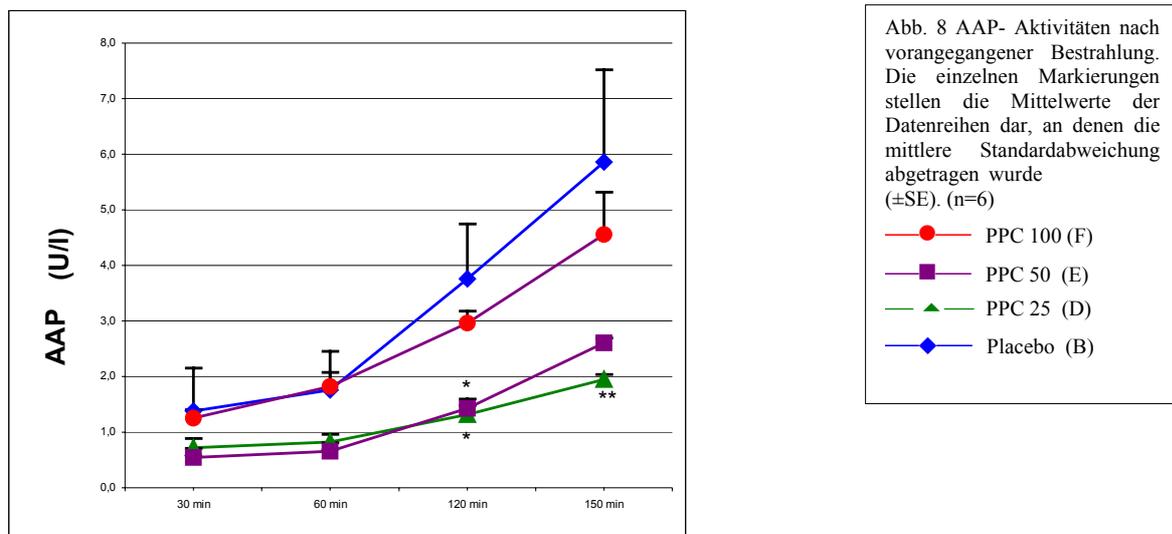


Abb.8

Bei den anderen untersuchten Enzymen DPP IV, GDL, γ -GT und LAP (Abb.9-12) fanden sich unter Behandlung mit PPC in einer Dosis von 100 mg/kg Kg PPC keine Reduktion der messbaren Enzymaktivitäten im Perfusat. Unter Vorbehandlung und Bestrahlung mit der genannten Dosis zeigten sich Aktivitäten, die teilweise relevant über denen der Kontrollgruppe lagen, im Falle der DPP IV etwa 20 % und bei der LAP noch deutlicher, was sich auch mit einem $p < 0,05$ nach 120 min als statistisch signifikant darstellte.

Wurden die Versuchstiere bestrahlt und hatten zuvor über 21 Tage PPC in einer Dosierung von 25 oder 50 mg/kg Kg PPC erhalten, stellte sich ein anderes Bild dar. Bei der AAP, der γ -GT, der DPP IV, der LAP und GDL lagen die Enzymaktivitäten deutlich niedriger, nämlich durchgehend nur bei ein bis zwei Drittel der Aktivitäten der Kontrollgruppe. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich der beiden Dosierungen ließen sich jedoch nur in der Gruppe D bei der Betrachtung der γ -GT- Werte nachweisen (Abb. 9-12).

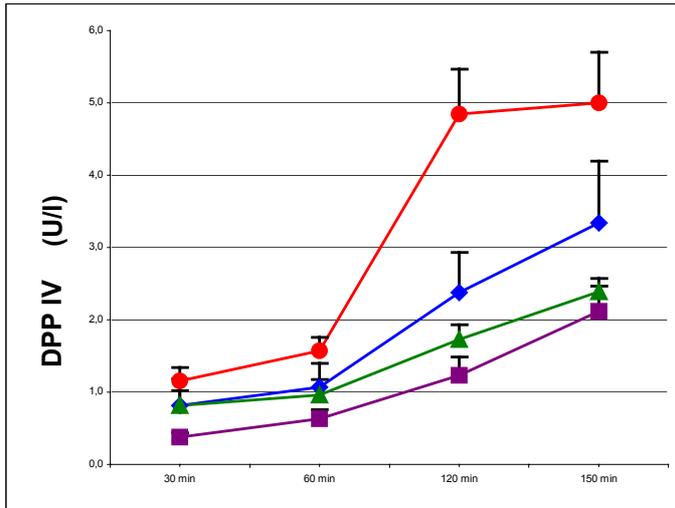


Abb.9

Abb. 9 DPP IV- Aktivitäten nach vorangegangener Bestrahlung. Die einzelnen Markierungen stellen die Mittelwerte der Datenreihen dar, an denen die mittlere Standardabweichung abgetragen wurde. (\pm SE). (n=6)

- PPC 100 (F)
- PPC 50 (E)
- ▲ PPC 25 (D)
- ◆ Placebo (B)

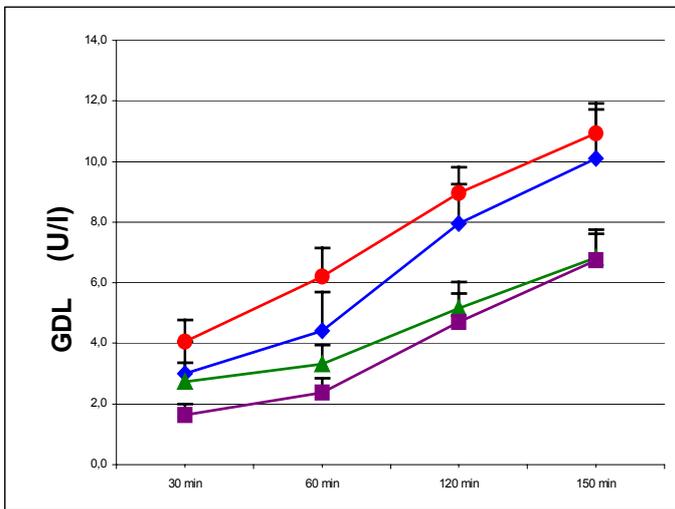


Abb.10

Abb. 10 GDL- Aktivitäten nach vorangegangener Bestrahlung. Die einzelnen Markierungen stellen die Mittelwerte der Datenreihen dar, an denen die mittlere Standardabweichung abgetragen wurde (\pm SE). (n=6)

- PPC 100 (F)
- PPC 50 (E)
- ▲ PPC 25 (D)
- ◆ Placebo (B)

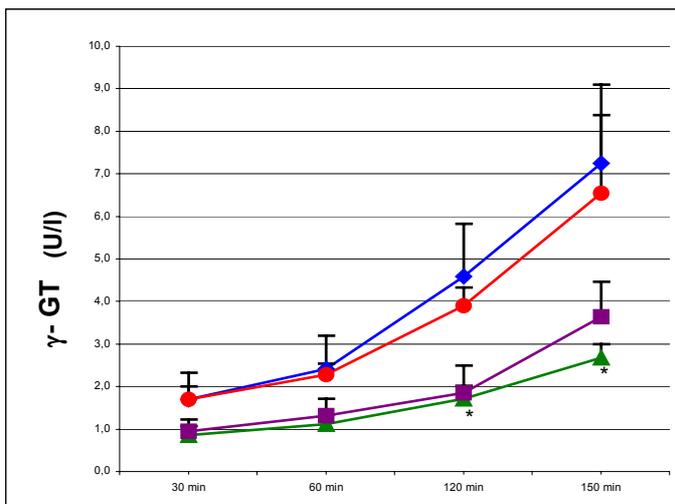


Abb.11

Abb. 11 γ -GT-Aktivitäten nach vorangegangener Bestrahlung. Die einzelnen Markierungen stellen die Mittelwerte der Datenreihen dar, an denen die mittlere Standardabweichung abgetragen wurde (\pm SE). (* $p < 0,05$). (n=6)

- PPC 100 (F)
- PPC 50 (E)
- ▲ PPC 25 (D)
- ◆ Placebo (B)

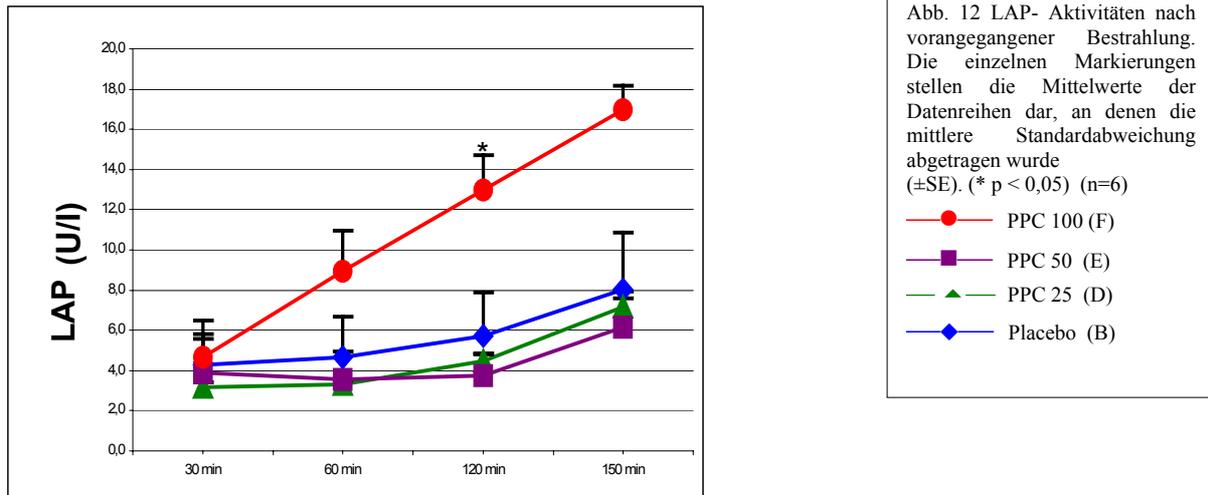


Abb.12

3.2.2 Verhalten der Gesamteiweißkonzentrationen

Verglichen mit den Tieren der Gruppe B war zum Ende der Beobachtungszeit bei der mittleren und niedrigen Dosis von 50 mg/kg KG PPC beziehungsweise 25 mg/kg KG der Testsubstanz eine Reduktion der nachweisbaren Eiweißkonzentration um 23 % bzw. 42 % ($p < 0,04$) feststellbar. Für die mit PPC 100 mg/kg KG PPC behandelten Ratten ergab sich hier kein Behandlungsvorteil in Bezug auf eine mögliche Strahlenprotektion. Die Mittelwerte dieser Gruppe lagen stets über denen der Kontrollgruppe nach 60 min und nach 150 min mit nachweisbarer Signifikanz ($p < 0,01$; $p < 0,03$) (Abb.13).

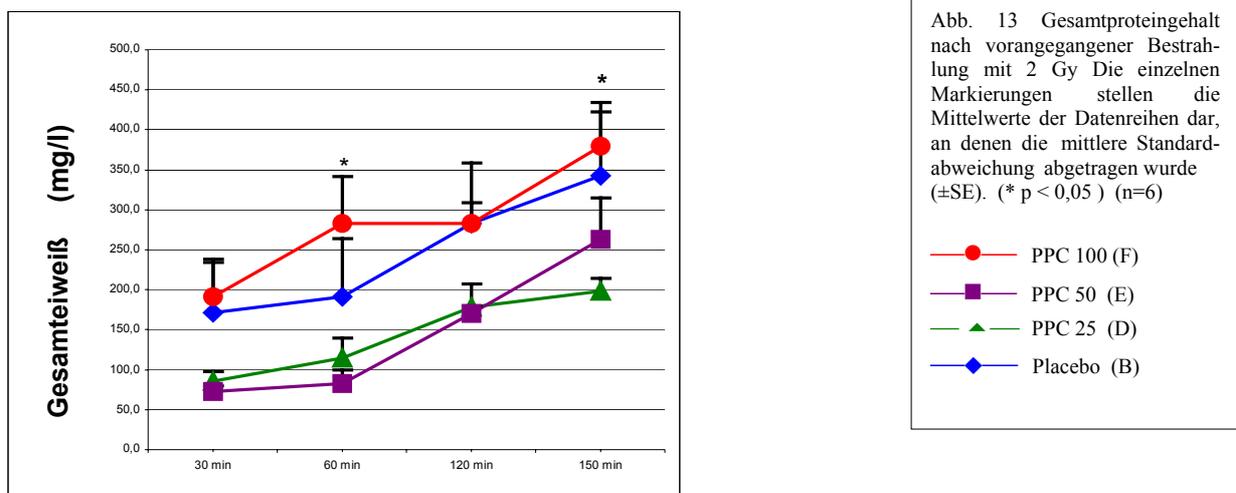


Abb.13

3.2.3 Verhalten der Phospholipide

Ähnlich den Enzymkonzentrationen war festzustellen, dass im gesamten Perfusionsverlauf die Phospholipidkonzentrationen der Gruppe F erheblich höher lagen als die der Kontrollgruppe. Am Endpunkt der Untersuchung nach 150 min mit 147 $\mu\text{mol/l}$ sogar mehr als 100% im Vergleich zur Placebogruppe (66,7 $\mu\text{mol/l}$).

Die Behandlung mit niedrig dosiertem PPC führte dagegen zu einer deutlichen Verminderung der im Perfusat nachweisbaren Phospholipidkonzentrationen. Dabei fanden sich insbesondere bei Gruppe E signifikant geringere Konzentrationen (nach 60 min $p < 0,11$; nach 120 min $p < 0,01$; nach 150 Minuten $p < 0,03$ (Abb.14)).

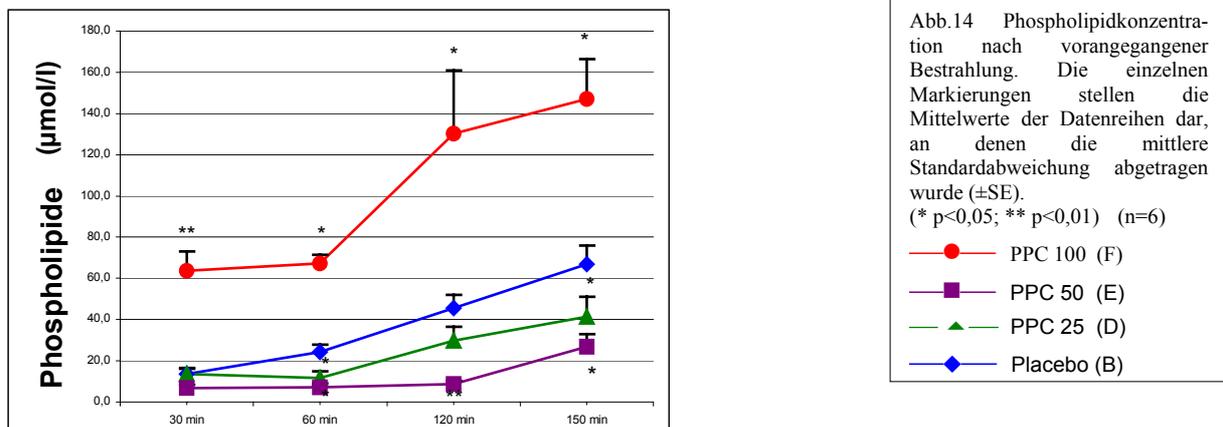


Abb.14

Abb.14 Phospholipidkonzentration nach vorangegangener Bestrahlung. Die einzelnen Markierungen stellen die Mittelwerte der Datenreihen dar, an denen die mittlere Standardabweichung abgetragen wurde ($\pm\text{SE}$). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) ($n=6$)

- PPC 100 (F)
- PPC 50 (E)
- ▲— PPC 25 (D)
- ◆— Placebo (B)

4 Diskussion

Jede lebende Zelle wird an ihrer Oberfläche von einer Plasmamembran umgeben, die als Barriere zwischen Cytoplasma und Extrazellularraum dient. Der Aufbau der Membranen folgt einem einheitlichen Grundprinzip, bei dem Phospholipide in Form einer bimolekularen amphipolaren Lipiddoppelschicht den wesentlichsten strukturellen Baustein darstellen (70,82). Neben der Separation des Intra- vom Extrazellularraum und der Funktion als Zytoskelett kommen der Zellmembran durch integrierte Endo- und Exopeptidasen weitere Aufgaben, z.B. in der Hydrolyse und Assimilation von Nahrungsbestandteilen oder in der Signalerkennung und -übertragung zu (58,64). Man kann also davon ausgehen, dass eine Membrandestruktion mit einer erheblichen Störung der integralen Funktionen einhergehen muss und damit die Funktion und das Überleben der Zelle selbst wesentlich beeinträchtigt werden (27,86).

Das Ziel der Untersuchung war die Beurteilung der radioprotektiven Potenz von peroral zugeführten essentiellen Phospholipiden gegen ionisierende Strahlung, wie sie zum Beispiel im Rahmen einer Radiotherapie auftritt. Die eindeutige Aufgabe einer Strahlentherapie ist dabei die Zerstörung des malignen Gewebes unter größtmöglicher Schonung des gesunden Gewebes. Nicht allein die Inaktivierung der proliferierenden Tumorzellen bestimmt die Wirksamkeit der Therapie, sondern letztendlich begrenzt die Strahlenreaktion des gesunden Gewebes den Behandlungserfolg (39).

4.1 Low Dose- Bestrahlung mit 2 Gy

Es handelt sich bei therapeutischer Bestrahlung, bezogen auf den Gesamtorganismus, um Strahlendosen im sublethalen Bereich, welche auf ein umschriebenes Areal bzw. Organ einwirken. Die zellulären, insbesondere molekularen Veränderungen, die nach einer Bestrahlung zum Tod der Zelle führen, sind nur teilweise geklärt. Als sehr empfindliches Target für ionisierende Strahlen gilt die DNS. Nicht reparierte DNS- Läsionen, wie Doppelstrangbrüche, können sich zu chromosomalen Aberrationen entwickeln, die nach wenigen Zellzyklen den Verlust der Teilungsfähigkeit zur Folge haben. Die Zelle unterliegt dem Mitosetod oder dem reproduktiven Zelltod. Bei einem völlig anderem Mechanismus, beim Interphase-Zelltod, der vorwiegend über eine Apoptose abläuft (53), führen DNS- Läsionen vor Erreichen der Mitose zu einer programmierten Desintegration der Zelle (65).

Bezogen auf den Gastrointestinaltrakt weisen Duodenum und Dünndarm die höchste Strahlenempfindlichkeit auf. Dickdarm-, Magen- und Ösophagusschleimhaut folgen in der genannten Reihenfolge (80). Das klinische Bild der radiogen bedingten Reaktion im Bereich des Dünndarms imponiert dabei in erster Linie in Form von enteritischen Symptomen, resultierend in Resorptionsstörungen, Anorexie sowie einer katabolen Stoffwechsellage (29,34). Das histomorphologische Korrelat der Strahleneinwirkung im Dünndarm resultiert dabei in der Frühphase in einer Verminderung der Mitoserate, der Anzahl der Kryptenzellen, Becherzellen und der Enterozyten (14,15,17,16,26).

Wie FREEMAN et al. (38) durch eine Aktivitätszunahme der Myeloperoxidase im Ileum nach Bestrahlung von Frettchen zeigen konnte, ist bei partieller abdomineller Bestrahlung eine deutlichere Entzündungsreaktion der Mucosa als bei einer Ganzkörperbestrahlung feststellbar. Eine mögliche Ursache wurde dabei in einer stärkeren Zunahme des Prostaglandin E₂-Spiegels unter Ganzkörperbestrahlung gesehen, von dem eine partiell protektive Wirkung nach Einwirkung ionisierender Strahlung bereits beschrieben wurde (48).

Versuchsreihen von STEPANOVA et al. (85) fanden, dass bei der Einwirkung von Röntgenstrahlen auf den Dünndarmbereich von Ratten unter 1,0 Gy lediglich geringfügige strukturelle Veränderungen der Membran- Lipid- Zusammensetzung auftraten, die nur einen marginalen Nachweis einer Erhöhung des untersuchten Protein- und Phospholipidgehaltes erlaubten. Die wirksamsten Strahlendosen zum Nachweis strahleninduzierter Beschädigungen der Bürstensaummembran fanden sich hier zwischen 1,0 Gy und 6,0 Gy.

Anlehnend an frühere Untersuchungen, bei denen nach partieller abdomineller low dose-Bestrahlung mit 2,0 Gy eine deutliche Aktivitätszunahme ausgewählter Peptidasen sowie des Gesamteiweißgehaltes im Perfusat ermittelt werden konnte (36), wurde sich erneut für diese Strahlendosis und eine begrenzt abdominelle Bestrahlung entschieden. Diese entspricht typischen Fraktionsdosen der klinischen Strahlentherapie im Rahmen einer konventionell fraktionierten Behandlung.

Ein weiterer Grund eine Bestrahlungsdosis von 2,0 Gy zu wählen war, dass Studien zur intrinsischen Strahlenempfindlichkeit mit dem sogenannten SF₂-Test („surviving fraction nach 2 Gy) durchgeführt werden. Dieser in vitro-Test bestimmt die überlebende Fraktion klonogener Zellen nach einer Strahlendosis von 2 Gy. 100% überlebende Zellen entsprechen dabei einem SF₂-Wert von 1. Als Ergebnis der SF₂-Bestimmungen kann, neben anderen wichtigen radiobiologischen Parametern, die Aussage zur Strahlenempfindlichkeit verschiedener Tumorarten konkretisiert werden (65,10).

Einer der grundlegenden Mechanismen der schädigenden Wirkung ionisierender Strahlung ist in der Beeinflussung der Membranintegrität zu sehen (12,19). Der Zeitpunkt der Strahleneinwirkung hat auf das Ausmaß der Strahlenschädigung dann einen Einfluss, wenn die physiologischen, tageszeitlich bedingten Aktivitätslevel der Bürstensaumenzyme erhöht sind (19). Da die physiologischen Enzymaktivitäten im Dünndarm einer circadianen Rhythmik folgen, die am Beginn der Lichtperiode einen Aktivitätsanstieg erkennen lassen (14), wurde als Bestrahlungszeitpunkt 8.30 Uhr gewählt.

Das Verhalten der Bürstensaumenzymaktivitäten lässt dabei nach Bestrahlung ein typisches Muster erkennen. Wie BECCIOLINI et al. bei der Untersuchung von Dünndarm-Homogenat nach Einwirkung von ionisierender Bestrahlung zeigen konnten, kommt es zu einem initialen Anstieg der Enzymaktivitäten mit Maximum nach etwa einem Tag und zur Rückkehr auf das Kontrollniveau in der Erholungsphase am dritten Tag (18). In Anlehnung an diese Ergebnisse wurden daher die Untersuchungen zur Bestimmung der Enzymaktivitäten am Dünndarm-perfusionsmodell einen Tag nach vorangegangener Bestrahlung um 9.00 Uhr begonnen.

4.2 Behandlung mit Phosphatidylcholin

Essentielle Phospholipide sind mittlerweile seit mehr als 60 Jahren insbesondere in der Hepatologie zur Therapie der toxischen Hepatitis, von Virushepatitiden und flankierend als Zusatztherapie der chronischen Hepatitis und der Leberzirrhose im klinischem Einsatz. Zudem fanden sich in Tierversuchen sowohl in niedrigen Dosierungen von 25 mg/kg KG PPC und 50 mg/kg KG PPC als auch in höheren Dosen von mehr als 250 mg/kg KG PPC regenerative und präventive Effekte auf die Dünndarmmukosa und Hepatozyten nach Einwirkung externer Noxen (8,2,66,67,44,30,3,4).

In Anlehnung an diese Arbeiten wurde nun eine radioprotektive Wirkung der Substanz PPC nach oraler Applikation untersucht. Ähnliche Effekte konnten bereits teilweise für Probucol, ein Dithioetherderivat, welches zur Therapie von Hyperlipoproteinämien zum Einsatz kommt (21), für Tirilazad, einem als Antioxidans verwendeten 21-Aminosteroid (35), und für anorganische Thiophosphate wie Amifostine (79) nachgewiesen werden.

Es wurde eine mittlere Dosis von 100 mg/kg KG PPC mit entsprechender Kontrollgruppe gewählt um einen möglichen Eigeneffekt des PPC zu beurteilen. Von Interesse war außerdem zur Beurteilung einer Dosisabhängigkeit der low dose- Bereich des Pharmakons, so dass wir je einer Versuchsgruppe 50 mg/kg KG PPC und 25 mg/kg KG PPC verabreichten. Wie in tierexperimentellen Studien (54) nachgewiesen werden konnte, bietet die orale Applikation

hinsichtlich ihrer Wirksamkeit dabei leichte Vorteile im Vergleich zur i.v. Applikation. Auf Grund einer initialen Anreicherung mit Pool- Bildung in der Darmwand selbst, beobachtet man nach peroraler Applikation gleichmäßigere, langanhaltende Plasmaspiegel. Nach Resorption wird die maximale Plasmakonzentration nach 6 – 8 Stunden erreicht, die Halbwertszeit der im Versuch markierten Acyl- und Cholinanteile ergab sich nach 20 bzw. 30 Stunden.

Entsprechend den Kenntnissen über eine circadiane Rhythmik der Aktivitätslevel der intestinalen Enzyme beim Versuchstier Ratte (19) wurde streng auf eine stets zeitgleiche Fütterung geachtet. Um eine Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse zu gewährleisten, musste außerdem berücksichtigt werden, dass neben einer exakten, stets gleichen Abfolge der PPC- Applikation (Schlündelung mittels Knopfkanüle), der Bestrahlung und der Präparation, versuchstierspezifische Besonderheiten zu beachten sind. Entsprechend den mit dem Perfusionsmodell durchgeführten Voruntersuchungen wurden weibliche, 10 – 12 Wochen alte Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 220 – 250 g (36) benutzt. Wie LEKIM et al. (54) mit doppelt markiertem EPL nachweisen konnten, wird PPC zunächst in der Darmwand angereichert und durch Hydrolyse in 1-Acyl-lyso-Phosphatidylcholin umgewandelt. Anschließend erfolgt eine (Re)synthese von PPC, Triglyceriden und Glycerophosphocholin. Bei weiblichen Tieren war nach Aufnahme des PPC eine zu den männlichen Versuchstieren vermehrte Aktivität der markierten Acylgruppe in der Leber zu bemerken. In den Lipidfraktionen der Leber wurde die aufgenommene Acylgruppe verstärkt in den Neutrallipiden sowie im Lysophosphatidylcholin nachgewiesen, während die männlichen Ratten eine Aktivitätszunahme in den Phosphatidyläthanolamin- und Phosphatidylcholinfraktionen zeigten. Inwieweit geschlechtsspezifische Variationen des PPC-Metabolismus der Ratte dabei eine Beeinflussung der Versuchsergebnisse hervorrufen können, kann allerdings nur schwer beurteilt werden. Zur Klärung dieser Fragestellung sollten weiterführende Untersuchungen folgen.

Bei der peroralen Verabreichung von PPC sollte nach Möglichkeit von einer Narkotisierung der Versuchstiere abgesehen werden, da eine Verminderung der Darmmotilität mit verzögerter Resorption der Substanz als Folge zu bemerken sind (88,54).

4.3 Das Dünndarmperfusionsmodell

Das Dünndarmperfusionsmodell stellt ein erprobtes Untersuchungsverfahren zur Beurteilung von Interaktionen und Aktivitäten der Bürstensaumenzyme nach Einwirkung externer Noxen sowie ionisierender Strahlung dar (36,22,73). Um die untersuchungsbedingten Wechselwirkungen zwischen Perfusat selbst und der Membran möglichst gering zu halten, wählten wir als physiologisches Perfusionsmedium Ringer-Lösung. Mutmaßlich ist jedoch dennoch von einer geringen Membranirritation auszugehen, da bereits in der Placebo- Gruppe eine mäßige Aktivitätszunahme der lysosomalen und membrangebundenen Enzyme im Versuchsverlauf zu erkennen ist. Außer der mechanischen Beanspruchung im Sinne einer Volumenbelastung mit konsekutiver Zunahme der Wandspannung und der physiologischen Apoptosis kommt als Ursache möglicherweise eine Mikrovesikulation der Mikrovilli in Betracht (63,23,73).

Die Präparation der Dünndarmsegmente erfolgte nach Anästhesie mit Urethan, ein tierexperimentell häufig genutztes und auf Interaktionen sehr gut untersuchtes Injektionsnarkotikum, bei dem die sedierende, analgesierende Wirkung durch unterschiedlich starke Beeinflussung multipler Neurotransmittersysteme (z.B. cholinerge Nicotinrezeptoren, GABA- und Glycinrezeptoren) erfolgt (42). Innerhalb des Narkoseregimes ist der Bereich, in dem eine chirurgische Toleranz entwickelt wird, sehr schmal, so dass Todesfälle und zu flache Narkosen bei allen Protokollen auftreten können. Die Narkosetiefe ist dabei in gleicher Dosierung von Alter, Geschlecht, Muskelmasse und vom Genotyp abhängig (6). Zu diskutieren ist in diesem Zusammenhang, wie stark die Variable „individuelle Urethanwirkung“ als mögliche Ursache für Einzelwertdiskrepanzen in Betracht kommt. Wie ABDELMALEK et al. berichteten, kann es während der Narkose durch Beeinflussung des α_2 -adrenergen Systems und Verringerung des Herzzeitvolumens zu teils erheblichen Kreislaufaffektionen kommen (1,41). Im Magen-Darm-Trakt selbst ist Urethan, ähnlich anderen Injektionsnarkotika (z.B. Ketamin, Midazolam, Pentobarbital), für eine Hemmung der gastrointestinalen Motilität verantwortlich zu machen (88). Dabei konnte eine Reduzierung der carrier- vermittelten Membranpermeabilität nachgewiesen werden. Nach Untersuchungen von FORREST et al. (37) scheint ein weiterer Mechanismus der Interaktionen zwischen Phosphatidylcholin- Membranen und Urethan an der Membran-Wasser-„Schnittstelle“ stattzufinden, an der in der Bilayerschicht eine Beeinflussung der

Interlipid-Separation beobachtet werden kann. Entsprechend dem typischen Verlauf einer Plasmaspiegel- Zeit- Kurve nach Resorption mit initialem Anstieg und allmählicher Elimination (V_{max} 0,087 mg/ml/h), wäre demnach innerhalb des Untersuchungszeitraumes eine Zunahme der Membranpermeabilität zu erwarten (69), was letztendlich ebenfalls die Aktivitätszunahme der Peptidasen und die Erhöhung der Eiweißkonzentrationen in der Placebogruppe begründen könnte.

Um die Einflussnahme externer Faktoren, wie zum Beispiel Körpertemperaturschwankungen, zu minimieren, wurde während der OP- Prozedur ein beheizter OP- Tisch verwendet.

Temperaturabhängig treten in den Membranbereichen des untersuchten Membranareals Phasenübergänge der Lipide vom flüssigkristallinen Status zum Gel auf, die einen deutlichen Einflussfaktor für die Membranpermeabilität darstellen. Dabei spielt insbesondere die äußere Lipidschicht eine Schlüsselrolle in der Organisation der Plasmamembran als Mosaik geordneter Mikrodomänen (62). Gehäuft treten diese Phasenübergänge in einem Temperaturbereich von 30°C und später von 39°C- 40°C auf (25).

Während moderate Hypothermien noch keinen wesentlichen Einfluss auf die Blutversorgung und den O₂- Umsatz im Bereich der jejunalen Mukosa haben (87), kommt es bei der Unterschreitung von etwa 28 °C beim Versuchstier Ratte zu einer deutlichen Reduktion der Sauerstoffbilanz und damit der Stoffwechselfvorgänge (11). Nicht zu vermeidende Schwankungen der Körpertemperatur während der Laparotomie dürften jedoch trotz der ergriffenen Maßnahmen eine weitere Einflussgröße auf einzelne Untersuchungsergebnisse darstellen.

4.4 Interpretation der Ergebnisse

Die vorliegende Ergebnisse belegen deutlich eine radioprotektive Wirkung von oral verabreichtem PPC in den von uns verwendeten Niedrigdosisbereichen von 50 mg/kg KG PPC und vor allem 25 mg/kg KG PPC.

Neben der unmittelbaren DNS- Schädigung werden ein Großteil der Strahleneffekte „indirekt“ durch chemisch aktive Modifikationen der Wassermoleküle verursacht. Die Zunahme von Peroxidasereaktionen wird dabei dadurch begründet, dass durch die Radiolyse von Wasser Sauerstoffradikale entstehen (39), die für eine Aktivitätsverminderung antioxidativer Enzyme (z.B. Superoxiddismutase, Catalase, Glutathion Reduktase) sowie eine Induktion der Lipidperoxidation verantwortlich zu machen sind (78,77). Ein möglicher

Mechanismus dieser protektiven Wirkung könnte in einer Verminderung der Lipidperoxidation begründet sein (4,3). Gelingt es, die Peroxidasereaktion zu vermindern, ist demnach eine Begrenzung der Entzündungsreaktion sowie eine schnellere Regeneration des Kryptenepithels zu erwarten, wie bereits für die Glutathionperoxidase Gpx 1 nachgewiesen werden konnte (31).

Ein weiterer protektiver Mechanismus ist möglicherweise in einer Beschleunigung der Regeneration von Membranschäden zu sehen. Als direkte Folge ionisierender Bestrahlung kommt es durch eine Erweiterung der Membranlipidtransition zu einer deutlichen Erhöhung der Membranfluidität (47,89) mit zunehmender Einschränkung funktioneller Eigenschaften (z.B. Ca^{2+} -Transport und Permeabilität) (49,32).

Besteht vor dem Ereignis eines strukturellen Schadens der Membran ein exzessives Angebot von Phosphatidylcholin, ist bei intakter Membran- Phospholipid- Homöostase durch eine Aktivierung der Phospholipase A_2 zunächst eine verstärkte Hydrolyse des Phosphatidylcholins zu Glycerophosphocholin zu bemerken (54,7). Im Falle einer eingetretenen Membranschädigung (z.B. durch Einwirkung von Gamma- Strahlung) führt dagegen eine vermehrte Aktivierung der Phosphocholincytidyltransferase zu einer konsekutiv akzelerierten (Neu)Synthese von benötigtem Phosphatidylcholin, wobei nun ausreichend Glycerophosphocholin als Substrat zur Verfügung steht (7). Aus einer somit möglicherweise beschleunigten Restitutio der Membranintegrität könnte eine erhebliche Schadensbegrenzung, messbar in vermindertem Anstieg der Enzymaktivitäten im Perfusat resultieren.

Im Gegensatz zu den verwendeten Niedrigdosierungen von 25 mg/kg KG PPC und 50 mg/kg KG PPC konnten für die mit 100 mg/kg KG PPC behandelte Versuchstiergruppe kein Behandlungsvorteil ausgemacht werden. Die ermittelten Eiweiß- und Phospholipidkonzentrationen sowie die Enzymaktivitäten, insbesondere die Aktivitäten der LAP und der DPP IV, waren im Vergleich zur Kontrollgruppe sogar erhöht. Die Ursache dieser deutlichen Ergebnisse erscheint zunächst unklar. Das von uns verwendete Phosphatidylcholin wird vom Hersteller, da es einen physiologischen Membranbestandteil darstellt, als nebenwirkungsfrei und inert geschildert (54). Dennoch könnte eine mögliche Ursache in der Zusammensetzung des Präparates begründet sein. Nach dem „Certificate of Analysis“ (Certificate) besteht das Produkt zu 96% aus Phosphatidylcholin und zu etwa 3% aus Lysophosphatidylcholine (LPC), so dass unter Behandlung mit 100 mg/kg KG PPC anteilig ebenfalls eine relativ hohe Dosis LPC am Wirkort präsent war. Insbesondere in Verbindung mit Dünndarmischämien ist eine potenzierende Wirkung des LPC mit Auftreten von ausgeprägten Permeabilitätsstörungen

bereits beschrieben worden (71), so dass sogar Makromoleküle wie Dextran oder Proteine die Membran passieren können (86). Ischämische Ereignisse sind im Rahmen der Präparation des Dünndarmperfusionsmodells nicht auszuschließen. Ebenso könnten Kreislaufinstabilitäten mit konsekutivem intestinalen „low flow“ auch durch Blutdruckschwankungen unter Anwendung der Urethannarkose beim einzelnen Versuchstier aufgetreten sein.

In anderen Untersuchungen (60) fand sich nach Einwirkung von LPC dosisabhängig eine deutliche Zunahme der Apoptoserate sowie eine LPC- induzierte Zelllysis. Zusätzlich wurden auch entzündungsmodulatorische Wirkungen für LPC beschrieben (76), welche in Verbindung mit der einwirkenden ionisierenden Bestrahlung, die in enteritischer Symptomatik resultiert, eine additive Wirkung beider Mechanismen bewirken könnte.

Einen Einfluss auf die unterschiedlich starke Aktivitätszunahme der Enzyme im Perfusat scheint die Verankerung und die Lokalisation der einzelnen Enzyme zu haben. Obwohl sich nach Strahleneinwirkung bei der DPP IV, als transmembranösem Glycoprotein (83), ein membrangebundenes Enzym mit einer starken Aktivitätserhöhung zeigt, könnte die Tatsache einer membranassoziierten Bindung (z.B. durch hydrophile Domänen, Glycosyl-Phosphatidylinositolanker oder N- terminale Anbindung) eine verzögerte Abgabe und damit langsamere Aktivitätszunahme im Perfusat bedeuten (57). Damit wäre eine mögliche Erklärung der vergleichsweise niedrigen Enzymnachweise der AAP, GLD und γ -GT während der Ringer- Perfusion gegeben. Die besonderen Aktivitätszunahmen lysosomaler Enzyme wie der LAP im Perfusat waren auch in früheren Untersuchungen (36) nach Einwirkung ionisierender Strahlung bereits beschrieben worden. Man könnte daher von einer guten Indikatorfunktion der LAP bei der Beurteilung von Membranintegritätsstörungen sprechen.

In Anbetracht der Ergebnisse, ist eine prophylaktische Applikation der Substanz PPC zur Vermeidung strahleninduzierter Schäden in praktischer Anwendung durchaus denkbar. Dennoch sollten weitere Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit der Substanzwirkung erfolgen.

5. Zusammenfassung

Die Erkenntnisse über den Pathomechanismus einer Strahlenreaktion von sich schnell regenerierenden Gewebearten, wie zum Beispiel Dünndarmepithel, sind von entscheidender Bedeutung im Rahmen einer Radiotherapie und des Managements von Strahlenunfällen (84). Ionisierende Bestrahlung induziert dabei eine Reihe von Symptomen, die sich mit Übelkeit, Erbrechen, Meteorismus, Tenesmen, Blut- und Schleimabgängen als klinisches Bild einer Strahlenenteritis präsentieren (80).

Die Aufgabenstellung war der Nachweis eines möglichen radioprotektiven Effekts von PPC auf die Dünndarmmukosa nach Einwirkung ionisierender Strahlung im therapeutischen Bereich. Bereits in früheren Untersuchungen (36) konnte gezeigt werden, dass es nach einer partiellen abdominalen Bestrahlung zu einer Aktivitätszunahme ausgewählter Peptidasen sowie des Gesamteiweiß- und Phospholipidgehaltes im Dünndarmperusionsmodell kommt. Aufbauend auf diese Ergebnisse erfolgte nun im Vorfeld der Bestrahlung eine perorale Fütterung mit PPC in insgesamt drei Dosierungen (25 mg/kg KG PPC, 50 mg/kg KG PPC und 100 mg/kg KG PPC) über einen Zeitraum von insgesamt 21 Tagen. Im Anschluss wurde am 22. Tag die auf das Abdomen begrenzte Bestrahlung von 2 Gy durchgeführt und am 23. Tag nach Beginn der Fütterung wurden mit Hilfe eines Dünndarmperusionsmodells die Aktivitäten der AAP, der DPP IV, der γ -GT, der GDL, der LAP, des Phospholipidgehaltes und des TP- Gehaltes bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Versuchstiergruppen, die PPC in niedrigen Dosierungen von 25 mg/kg KG PPC und 50 mg/kg KG PPC erhielten, deutlich niedrigere Enzymaktivitäten nach Bestrahlung als die Placebogruppe aufwiesen.

Höhere Dosierungen von exogen zugeführten PPC (100 mg/kg KG) zeigten keinen protektiven Effekt bei der Einwirkung von ionisierender Strahlung im therapeutischen Bereich auf die Dünndarmschleimhaut.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass niedrig dosiertes PPC, in Dosen von 25 mg/kg KG und 50 mg/kg KG, in der Lage ist, strahleninduzierte Membranintegritätsstörungen zu reduzieren. Weitere Untersuchungen auf mögliche Protektion von PPC auf andere, zum Beispiel toxische Membranbarrierestörungen sollten folgen.

6 Literatur

1. Abdelmalek A, Ayad G, Thornton SN: Cardiovascular effects of catecholamines injected into the DBB of rats, influence of urethane anaesthesia and local colchicine. *Brain Res* 821(1999) 50-9
2. Anand BS, Romero JJ, Sanduja SK, Lichtenberger LM: Phospholipid association reduces the gastric mucosal toxicity of aspirin in human subjects. *Am J Gastroenterol* 94 (1999) 1818-22
3. Aleynik SI, Leo MA, Ma X, Aleynik MK, Lieber CS: Polyenylphosphatidylcholine prevents carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation while it attenuates liver fibrosis. *J Hepatol* 27(1997) 554-61
4. Aleynik MK, Leo MA, Aleynik SI, Lieber CS: Polyenylphosphatidylcholine opposes the increase of cytochrome P-4502E1 by ethanol and corrects its iron-induced decrease. *Alcohol Clin Exp Res* 23 (1999) 96-100
5. Aleynik SI, Leo MA, Takeshige U, Aleynik MK, Lieber CS: Dilinoleoylphosphatidylcholine is the active antioxidant of polyenylphosphatidylcholine. *J Investig Med* 47 (1999) 507-12
6. Arras M, Autenried P, Rettich A, Spaeni D, Rulicke T: Optimisation of intraperitoneal injection anaesthesia in mice drugs, dosages, adverse effects, and anaesthesia depth. *Comp Med* 51 (2001) 443-56
7. Baburina I, Jackowski S: Cellular responses to excess phospholipid. *J Biol Chem* 274 (1999) 9400-08
8. Barrios JM, Lichtenberger LM: Role of biliary phosphatidylcholine in bile acid protection and NSAID injury of the ileal mucosa in rats. *Gastroenterology* 118 (2000) 1179-86

9. Bartlett GR: Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* 234 (1959) 466-8
10. Baumann M, Tahian A, Budach W: Radiosensitivity of tumor cells: The predictive value of SF2. In: Beck-Bornholdt H-P (Hrsg.) *Current topics of radiobiology of tumors*. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo (1993) 87-98
11. Beattie J, Chambers RD: Oxygen consumption in heat-adapted animals. *Quart J Exp Physiol* 38 (1953) 55-60
12. Becciolini A, Benucci A, Casati V, Nardinò A, Porciani S, Rizzi M: Post-irradiation enzyme activities of the rat small intestine: effects on circadian fluctuations. *Strahlentherapie* 155 (1979) 869-74
13. Becciolini A, Benucci A, Porciani S, Nardino A, Lanini A: Dipeptidase activity in the small intestine after irradiation at different times at the day. *Strahlentherapie* 158 (1982) 368-74
14. Becciolini A, Cremonini D, Balzi M, Fabbrica D, Cinotti S: Irradiation at different times of the day. Morphology and kinetics of the small intestine. *Acta Radiol Oncol* 21 (1982) 169-75
15. Becciolini A, Cremonini D, Fabbrica D, Balzi M: Qualitative and quantitative effects on the morphology of the small intestine after multiple daily fraction. *Acta Radiol Oncol* 23 (1984) 353-9
16. Becciolini A, Cremonini D, Fabbrica D, Balzi M: Cell proliferation and differentiation in the small intestine after irradiation with multiple fractions. *Acta Radiol Oncol* 25 (1986) 51-6
17. Becciolini A, Fabbrica D, Cremonini D, Balzi M: Quantitative changes in the goblet cells of the rat small intestine after irradiation. *Acta Radiol Oncol* 24 (1985) 291-9

18. Becciolini A, Gerber GB, Buracchi A, Deroo J: Intestinal enzyme distribution after supralethal irradiation. *Strahlentherapie* 153 (1977) 485-8
19. Becciolini A, Giachè V, Scubla E, D'Abbondio D: Circadian phenomena and irradiation. Modifications of enzyme activity in the small intestine after sublethal exposure. *Acta Oncol* 26 (1987) 477-81
20. Benderitter M, Vincent-Genod L, Berroud A, Voisin P: Simultaneous analysis of radio-induced membrane alteration and cell viability by flow cytometry. *Cytometry* 39 (2000) 151-7
21. Bonsack ME, Felemovicius I, Baptista ML, Delaney JP: Radioprotection of the intestinal mucosa of rats by probucol. *Radiat Res* 151 (1999) 69-73
22. Bossmann B, Haschen RJ: Release of enzymes from rat jejunal mucosa during in vitro incubation. *J Clin Chem Clin Biochem* 21 (1983) 659-3
23. Bossmann B, Haschen RJ: De novo synthesis of brush border membrane enzymes during intestinal perfusion with bile salt in the rat. *J Clin Chem Clin Biochem* 22 (1984) 449-51
24. Bossmann B, Haschen RJ, Schmidt R, Linss W: Biochemical and morphologic studies on the effect of bile acids on the epithelium of the rat jejunum. *Acta Histochem* 74 (1984) 217-34
25. Brasitus TA, Tale AR, Schachter D: Thermotropic transitions in rat intestinal plasma membranes studied by differential scanning calorimetry and fluorescence polarisation. *Biochemistry* 19 (1980) 1256-61
26. Brennan PC, Carr KE, Seed T, McCullough JS: Acute and protracted radiation effects on small intestinal morphological parameters. *Int J Radiat Biol* 73 (1998) 691-8

27. Buko V, Artsukevich A, Maltsev A, Nikitin V, Ignatenko K, Gundermann KJ, Schuhmacher R: Effect of polyunsaturated phosphatidylcholine on lipid structure and cAMP-dependent signal transduction in the liver of rats chronically intoxicated with ethanol. *Exp Toxic Pathol* 46 (1994) 375-82
28. Certificate of Analysis (1996) Rhône- Poulence Rorer, Cologne Germany, Batch No. 60160
29. Dinges S, Deger S, Koswig S, Boehmer D, Schnorr D, Wiegel T, Loening SA, Dietel M, Hinkelbein W, Budach V: High-dose rate interstitial with external beam irradiation for localized prostate cancer-results of a prospective trial. *Radiother Oncol* 48 (1998) 197-202
30. Dunjic BS, Axelson J, ArRajab A, Larsson K, Bengmark S: Gastroprotective capability of exogenous phosphatidylcholine in experimentally induced chronic gastric ulcers in rats. *Scand J Gastroenterol* 28 (1993) 89-94
31. Esworthy RS, Mann JR, Sam M, Chu FF: Low glutathione peroxidase activity in Gpx1 knockout mice protects jejunum crypts from gamma-irradiation damage. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279 (2000) 426-36
32. Exerowa D, Kashichiev D, Platikanov D: Stability and permeability of amphiphile bilayers. *Adv Colloid Interface Sci* 40 (1992) 201-56
33. Farr VE, Rehfeld N, Reichelt D, Haschen RJ: Vergleichende Untersuchung zur Bestimmung der Aminosäurearylamidase im menschlichen Serum. *Z Med Lab Tech* 9 (1968) 78-86
34. Feinendegen LE: Radiation risk of tissue late effects, a net consequence of probabilities of various cellular responses. *Eur J Nucl Med*. 18 (1991) 740-51
35. Felemovicius I, Bonsack ME, Griffin RJ, Delaney JP: Radioprotection of the rat intestinal mucosa by tirilazad. *Int J Radiat Biol* 73 (1998) 219-23

36. Fittkau M, Grothey A, Gerlach R, Schmoll HJ: A low dose of ionizing radiation increases luminal release of intestinal peptidases in rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 127 (2001) 96-100
37. Forrest BJ, Rodham DK: The interaction of urethane, an intravenous general anaesthetic, with phosphatidylcholine membranes. *Biochim Biophys Acta* 863 (1986) 1-8
38. Freeman SL, Hossain M, Mac Naughton WK: Radiation-induced acute intestinal inflammation differs following total-body versus abdominopelvic irradiation in the ferret. *Int J Radiat Biol* 77 (2001) 389-395
39. Fritz- Niggli H: Strahlentherapie des Krebses: Strahlenbiologische Grundlagen. In: *Strahlengefährdung/ Strahlenschutz: ein Leitfaden für die Praxis*. Verlag Hans Huber Bern; Göttingen; Toronto; Seattle: 4.überarbeitete und ergänzte Auflage (1997)137
40. Gläser D, Kleine R: Beitrag zur Eiweißbestimmung in stark verdünnten Lösungen. *Pharmazie* 17 (1962) 32-6
41. Gumbleton M, Nicholls PJ, Taylor G: Possible hemodynamic basis to urethane anaesthesia- induced reduction in renal clearance. *Drug Metab Dispos* 16 (1988) 640-4
42. Hara K, Harris RA: The anaesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels. *Anesth Analg* 94 (2002) 313-8
43. Hidajat N, MaurerJ, Schroder RJ, Wolf M, Vogl T, Felix R: Radiation exposure in spiral computed tomography. Dose distribution and dose reduction. *Invest Radiol* 34 (1999) 51-7
44. Holecek M, Mraz J, Koldova P, Skopec F: Effect of polyunsaturated phosphatidylcholine on liver regeneration onset after hepatectomy in the rat. *Arzneimittelforschung* 42 (1992) 337-9
45. Hooper NM, Low MG, Turner AJ: Renal dipeptidase is one of the membrane proteins released by phosphatidylinositolspecific phospholipase C. *Biochem J* 244 (1987) 465-9

46. Ianzini F, Guidoni L, Indovina PL, Viti V, Erriu G, Onnis S, Randaccio P: Gamma-irradiation effects on phosphatidylcholine multilayer liposomes: calorimetric, NMR, and spectrofluorimetric studies. *Radiat Res* 98 (1984) 154-166
47. Karbownik M, Reiter RJ, Qi W, Garcia JJ, Tan DX, Manchester LC: Protective effects of melatonin against oxidation of guanine bases in DNA and decreased microsomal membrane fluidity in rat liver induced by whole body ionizing radiation. *Mol Cell Biochem* 211 (2000) 137- 44
48. Keelan M, Thomson AB, Clandinin MT, Tavernini M, Walker K, Cheeseman CI: Effects of oral enprostil, a synthetic prostaglandin E₂, on intestinal brush border membrane lipid composition following abdominal irradiation in the rat. *Clin Invest Med* 12 (1989) 350-356
49. Khizhniak SV, Bublik AA, Kisil EA, Voijsitskij VM, Kucherenko NE: Effect of ionizing radiation on the structure and functional properties of the basolateral membrane of small intestine enterocytes. *Radiats Biol Radioecol* 39 (1999) 644-7
50. Küllertz G.: Die Bedeutung der Aktivitätsbestimmung des Enzyms Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) im klinischen Laboratorium. *Lab Med* 12 (1988) 123-30
51. Küllertz G, Boigk J: Dipeptidylpeptidase IV- Aktivität in Serum und Synovia bei Patienten mit rheumatoider Arthritis. *Z Rheumatol* 45 (1986) 52-56
52. Kunz D, Bühling F, Hütter HJ, Aoyagi T, Ansorge S: Aminopeptidase N (CD13, EC3.3.4.11.2) occurs on the surface of resting and concanavalin A-stimulated lymphocytes. *Biol Chem Hoppe Seyler* 374 (1993) 291-296
53. Labejof LP, Galle P, Mangabeira PA, de Oliveira AH, Severo MI: Histological changes in rat duodenum mucosa after whole-body gamma irradiation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 48 (5) (2002) 537-545
54. Lekim D, Graf E: Animal experimental studies on the pharmacokinetics of "essential" phospholipids (EPL). *Arzneimittelforschung* 26 (1976) 1772-82

55. Lieber CS, Robins SJ, Leo MA: Hepatic phosphatidylethylamine methyltransferase activity is decreased by ethanol and increased by phosphatidylcholine. *Alcohol Clin Exp Res* 18 (1994) 592-595
56. Lieber CS, Robins SJ, Li J, DeCarli LM, Mak KM, Fasulo JM, Leo MA : Phosphatidylcholine protects against fibrosis and cirrhosis in the baboon. *Gastroenterology* 106 (1994) 152-9
57. Low MG: Biochemistry of the glycosyl- phosphatidylinositol membrane protein anchors. *Biochem J* 244 (1987)1-13
58. Macnair, RD, Kenny AJ: Proteins of the kidney microvillar membrane. *Biochem J* 179 (1979) 379-95
59. Marathe D, Mishra KP: Radiation-induced changes in permeability in unilamellar phospholipid liposomes. *Radiat Res* 157 (2002) 685-92
60. Masamune A, Sakai Y, Satoh A, Fujita M, Yoshida M, Shimosegawa T: Lysophosphatidylcholine induces apoptosis in AR42J cells. *Pancreas* 22 (2001) 75-83
61. Mi LJ, Mak KM, Lieber CS: Attenuation of alcohol-induced apoptosis of hepatocytes in rat livers by polyenylphosphytidylcholine(PPC). *Alcohol Clin Exp Res* 24 (2000) 207-12
62. Milhiet PE, Giocondi MC, Le Grimellec C: Cholesterol is not crucial for the existence of microdomains in kidney brush-border membrane models. *J Biol Chem* 277 (2002) 875-878
63. Misch DW, Giebel PE, Faust RG: Intestinal microvilli: responses to feeding and fasting. *Eur J Cell Biol* 21 (1980) 269-279
64. Miura S, Song I, Morita A, Erickson RH, Kim YS: Distribution and biosynthesis of aminopeptidase N and dipeptidylpeptidase IV in rat small intestine. *Biochim Biophys Acta* 761(1983) 66-75

65. Molls M: Strahlenbiologische Grundlagen der Strahlentherapie. In: Schmoll H-J, Höffgen K, Possinger K(Hrsg): Kompendium Internistische Onkologie. Springer, Berlin Heidelberg New York (1999) 499-507
66. Navder KP, Baraona E, Lieber CS: Polyenylphosphatidylcholine attenuates alcohol-induced fatty liver and hyperlipemia in rat. *J Nutr* 127 (1997) 1800- 6
67. Navder KP, Baraona E, Lieber CS: Dilinoleoylphosphatidylcholine protects human low density lipoproteins against oxidation. *Atherosclerosis* 152 (2000) 89-95
68. Nejdfors P, Ekelund M, Westrom BR, Willen R, Jeppson B: Intestinal permeability in humans is increased after radiation therapy. *Dis Colon Rectum* 43 (2000) 1582-7
69. O'Flaherty EJ, Sichak SP: The kinetics of urethane elimination in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 68 (1983) 354-8
70. Op den Kamp JAF (Hrsg.): Biological Membranes: Structure, Biogenesis and Dynamics. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg 1994
71. Otamiri T, Sjudahl R, Tagesson C: Lysophosphatidylcholine potentiates the increase in mucosal permeability after small-intestinal ischaemia. *Scand J Gastroenterol* 21 (1986) 1131-6
72. Friedman A, Cordon-Cardo C, Kolesnick R: Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 293 (2001) 293-7
73. Preiss M: Wechselwirkungen von zellulären Membranbereichen des Magen-Darm-Traktes mit hydrophoben Verbindungen (Acetylsalicylsäure, essentielle Phospholipide). Diss 334 (1998) Martin-Luther-Universität Halle
74. Pritchard DM, Potten CS, Korsmeyer SJ, Roberts S, Hickman JA: Damage induced apoptosis in intestinal epithelia from bcl-2-null and bax-null mice: Investigations of the mechanistic determinants of epithelial apoptosis in vivo. *Oncogene* 18 (1999) 7287-93

75. Riehl T, Cohn S, Tessner T, Schloemann S, Stenson WF: Lipopolysaccharide is radioprotective in the mouse intestine through a prostaglandine-mediated mechanism. *Gastroenterology* 118 (2000)
76. Ryborg AK, Deleuran B, Sogaard H, Kragballe K: Intracutaneous injection of lysophosphatidylcholine induces skin inflammation and accumulation of leukocytes. *Acta Derm Venereol* 80 (2000) 242-6
77. Sabitha KE, Shyamaladevi CS: Oxidant and antioxidant changes in patients with oral cancer and treated with radiotherapy. *Oral Oncol* 35 (1999) 273-7
78. Sadani GR, Nadkarni GD: Changes in lipid peroxide levels and the activity of reactive oxygen scavenging systems in thyroid tissue after exposure to radioactive iodine in rats. *Thyroid* 7 (1997) 937- 41
79. Santini V: Amifostine: Chemotherapeutic and radiotherapeutic protective effects. *Expert Opin Pharmacother* 2 (2001) 479-89
80. Sauer R, Keilholz L: Akute und chronische Toxizität der Strahlentherapie. In: Schmoll H-J, Höffgen K, Possinger K (Hrsg): *Kompendium Internistische Onkologie*. Springer, Berlin Heidelberg New York (1999) 554-67
81. Singer SJ, Nicolson GL: The structure and chemistry of mammalian cell membranes. *Am J Pathol* 65 (1971) 427-37
82. Singer SJ, Nicolson GL: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175 (1972) 720-31
83. Slimane TA, Lenoir C, Bello V, Delaunay JL, Goding JW, Chwetzoff S, Maurice M, Fransen JA, Trugnan G: The cytoplasmatic/ transmembrane domain of dipeptidyl peptidase IV, a type II glycoprotein, contains an apical targeting signal that does not specifically interact with lipid rafts. *Exp Cell Res* 270 (2001) 45-55

84. Somosy Z, Horvath G, Telbisz A, Rez G, Palfia Z: Morphological aspects of ionizing radiation response of small intestine. *Micron* 33 (2) (2002):167-78
85. Stepanova LI, Stepanov Iu V, Voijsitskiy VM, Kucherenko ME: Membrane lipids of brush border of the rat small intestine as affected by ionizing radiation. *Ukr Biokhim Zh* 71 (1999) 48-52
86. Tagesson C, Franzen L, Dahl G, Weström B: Lysophosphatidylcholine increases rat ileal permeability to macromolecules. *Gut* 26 (1985)369-77
87. Thoren A, Elam M, Ricksten SE: Jejunal mucosal perfusion is well maintained during mild hypothermic cardiopulmonary bypass in humans. *Anesth Analg* 92 (2001) 5-11
88. Yuasa H, Watanabe J: Influence of urethane anesthesia and abdominal surgery on gastrointestinal motility in rats. *Biol Pharm Bull* 17 (1994) 1309-12
89. Zuidam NJ, Versluis C, Vernooy EA, Crommelin DJ: Gamma-irradiation of liposomes composed of saturated phospholipids: effect of bilayer composition, size, concentration and absorbed dose on chemical degradation and physical destabilization of liposomes. *Biochem Biophys Acta* 1280 (1996) 135-48

7 Thesen

1. Ionisierende Bestrahlung im Rahmen einer fraktionierten Strahlentherapie führt auch im gesunden Gewebe zur Beeinträchtigung der Zellfunktion. Dabei sind Zellsysteme mit kurzlebigen Endzellen, wie Dünndarmepithel, besonders betroffen.
2. Als qualitativer Ausdruck eines Strahlenschadens im Bereich des Dünndarms kommt es im Dünndarmperfuisionsmodell bei Ratten zu einer Freisetzung intestinaler Peptidasen.
3. Mit Hilfe des Dünndarmperfuisionsmodells lassen sich im Tierversuch strahleninduzierte Störungen der Membranintegrität auch quantifizieren.
4. Mögliche Ursache der unterschiedlich hohen Enzymaktivitäten sind in der Lokalisation der einzelnen Enzyme und der Art der membranären Verankerung zu suchen.
5. Die perorale Applikation von PPC, bei der es durch Pool- Bildung in der Darmwand selbst zu einem gleichmäßigerem Plasmaspiegel kommt, erweist sich als praktikable Darreichungsform im Tierversuch.
6. Phosphatidylcholin bewirkt eine Membranprotektion bei Dünndarmepithelzellen von Ratten nach Einwirkung ionisierender Strahlung.
7. Die membranprotektive Wirkung ist von der Dosierung des PPC abhängig.
8. Niedrig dosiertes PPC wirkt dabei effektiver in Bezug auf eine Strahlenprotektion als höher dosiertes PPC.
9. Die strahlenprotektive Wirkung beruht auf mehreren Mechanismen. Dabei ist die Hauptursache vermutlich auf eine Verminderung der Lipidperoxidation zurückzuführen.

Tabellenanhang

Tab.2 Vergleich der Aktivitäten membrangebundener Enzyme in jejunalen Bürstensaummembranen der unbestrahlten Kontrollgruppen nach Perfusion des Jejunums. Zuvor war eine Fütterung von Aqua d. (Gruppe A) bzw. 100mg/kg KG PPC (Gruppe B) über 21 Tage erfolgt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm der Standardabweichung.

		Gruppe A (Aqua d.)				Gruppe B (PPC 100 mg/kg)			
		30 min	60 min	120 min	150 min	30 min	60 min	120 min	150 min
AAP	U/l	1,3 \pm 0,2	1,6 \pm 0,2	3,4 \pm 0,4	4,6 \pm 0,6	1,7 \pm 0,3	2,6 \pm 0,6	4,2 \pm 1,1	5,2 \pm 1,3
DPP IV	U/l	0,8 \pm 0,2	1,2 \pm 0,2	3,0 \pm 0,1	4,0 \pm 0,2	1,4 \pm 0,3	2 \pm 0,6	3,1 \pm 1,1	4,7 \pm 1,2
GDL	U/l	3,5 \pm 1,0	4,2 \pm 0,7	7,8 \pm 0,8	9,7 \pm 0,9	3,9 \pm 0,6	5,0 \pm 1,0	8,8 \pm 1,7	10,0 \pm 1,6
γ-GT	U/l	1,2 \pm 0,4	1,6 \pm 0,3	3,3 \pm 0,2	4,5 \pm 0,4	1,4 \pm 0,3	1,4 \pm 0,3	4,8 \pm 1,5	4,9 \pm 0,9
LAP	U/l	2,5 \pm 0,4	2,7 \pm 0,5	4,0 \pm 0,9	5,6 \pm 1,1	4,6 \pm 0,5	5,9 \pm 0,1	14,6 \pm 0,2	23,2 \pm 0,5
PL	μ mol/l	15,3 \pm 6,0	9,3 \pm 3,8	27,8 \pm 6,3	25,9 \pm 5,4	28,3 \pm 8,7	64,6 \pm 15,0	131,9 \pm 20,6	177,6 \pm 18,9
TP	mg/l	96,5 \pm 13,0	111,3 \pm 17,4	83,9 \pm 37,5	104,1 \pm 46,5	168,6 \pm 13,0	235,7 \pm 27,9	339,6 \pm 59,1	336,2 \pm 37,6

Tab.3 Vergleich der Aktivitäten membrangebundener Enzyme in jejunalen Bürstensaummembranen nach Einwirkung ionisierender Strahlung von 2 Gy auf das Abdomen. Die Versuchstiergruppen erhielten im Vorfeld über einen Zeitraum von 21 Tagen entweder Aqua d.(Gruppe C) oder PPC in unterschiedlichen Dosierungen (Gruppen D- F). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm der Standardabweichung.

		Gruppe C (Aqua d.)				Gruppe D (25 mg/kg KG)			
		30 min	60 min	120 min	150 min	30 min	60 min	120 min	150 min
AAP	U/l	1,4 \pm 0,8	1,8 \pm 0,7	3,8 \pm 1,0	5,9 \pm 1,7	0,7 \pm 0,2	0,8 \pm 0,1	1,3* \pm 0,2	1,9** \pm 0,1
DPP IV	U/l	0,8 \pm 0,4	1,1 \pm 0,3	2,4 \pm 0,5	3,3 \pm 0,9	0,8 \pm 0,2	1,0 \pm 0,2	1,7 \pm 0,2	2,4 \pm 0,2
GDL	U/l	3,0 \pm 1,0	4,4 \pm 1,3	8,0 \pm 1,3	10,1 \pm 1,6	2,7 \pm 0,6	3,3 \pm 0,6	5,2 \pm 0,9	6,8 \pm 0,8
γ-GT	U/l	1,7 \pm 0,6	2,4 \pm 0,8	4,6* \pm 1,2	7,3* \pm 1,8	0,9 \pm 0,2	1,1 \pm 0,2	1,7 \pm 0,3	2,7 \pm 0,3
LAP	U/l	4,3 \pm 2,2	4,7 \pm 2,0	5,7 \pm 2,2	8,0 \pm 2,9	3,2 \pm 0,3	3,3 \pm 0,2	4,5 \pm 0,4	7,2 \pm 0,7
PL	μ mol/l	13,6 \pm 2,6	24,4 \pm 3,4	45,7 \pm 6,4	66,9 \pm 9,0	13,4 \pm 3,1	11,8* \pm 3,1	29,9 \pm 6,8	41,4* \pm 9,6
TP	mg/l	171,1 \pm 66,7	190,8 \pm 72,9	282,8 \pm 76,2	342,8 \pm 79,2	85,4 \pm 12,1	114,7 \pm 24,8	178,3 \pm 28,9	198,6* \pm 15,2

*p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle, **p<0,01 im Vergleich zur Kontrolle

Tab.3 (Fortsetzung) Vergleich der Aktivitäten membrangebundener Enzyme in jejunalen Bürstensaummembranen nach Einwirkung ionisierender Strahlung von 2 Gy auf das Abdomen. Die Versuchstiergruppen erhielten im Vorfeld über einen Zeitraum von 21 Tagen entweder Aqua d.(Gruppe C) oder PPC in unterschiedlichen Dosierungen (Gruppen D- F). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm der Standardabweichung.

		Gruppe E (50 mg/kg KG)				Gruppe F (100 mg/kg KG)			
		30 min	60 min	120 min	150 min	30 min	60 min	120 min	150 min
AAP	U/l	0,5 \pm 0,2	0,7 \pm 0,3	1,4* \pm 0,4	2,6 \pm 0,5	1,3 \pm 0,1	1,8 \pm 0,3	3,0 \pm 0,2	4,6 \pm 0,8
DPP IV	U/l	0,4 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	1,2 \pm 0,3	2,1 \pm 0,3	1,2 \pm 0,2	1,6 \pm 0,2	4,8 \pm 0,6	5,0 \pm 0,7
GDL	U/l	1,6 \pm 0,4	2,4 \pm 0,5	4,7 \pm 0,9	6,8 \pm 1,0	4,1 \pm 0,7	6,2 \pm 1,0	9,0 \pm 0,8	10,9 \pm 1,0
γ-GT	U/l	0,9 \pm 0,3	1,3 \pm 0,4	1,8 \pm 0,7	3,6 \pm 0,8	1,7 \pm 0,3	2,3 \pm 0,3	3,9 \pm 0,4	6,5 \pm 1,8
LAP	U/l	3,9 \pm 1,7	3,5 \pm 1,4	3,7 \pm 1,1	6,1 \pm 1,5	4,7 \pm 1,1	8,9 \pm 2,0	13,0* \pm 1,8	17,0 \pm 1,2
PL	μ mol/l	6,8 \pm 1,6	7,1* \pm 2,1	8,8** \pm 1,7	26,7* \pm 6,4	63,5** \pm 9,4	67,3* \pm 4,0	130,2' \pm 30,6	147,0* \pm 19,4
TP	mg/l	72,7 \pm 7,2	82,7 \pm 17,2	170,1 \pm 8,9	263,4 \pm 51,5	191,7 \pm 42,7	283* \pm 59,0	283,0 \pm 26,2	379,8* \pm 54,5

*p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle, **p<0,01 im Vergleich zur Kontrolle

Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Geburtsdatum und Ort: 22.02.1971 in Halle/ Saale
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: BRD

Schulbildung:

09/77- 08/78 POS „Ernst Thälmann“ Rochlitz
09/78- 08/87 POS „Albert Höbner“ Erlau
09/87- 08/89 EOS „Friedrich Schiller“ Rochlitz

09/89- 09/91 Wehrdienst

Beruflicher Werdegang:

10/91 Studium der Humanmedizin an der
Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg
08/93 Physikum
09/94 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/96 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 1996 Tätigkeit als Arzt im Praktikum und Assistenzarzt
an der Medizinischen Klinik der BG- Kliniken
Bergmannstrost Halle

03/00 Approbation als Arzt

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ausschließlich mit den angegebenen Hilfsmitteln und der zitierten Literatur verfasst habe.

Hiermit erkläre ich, dass ich den Antrag auf Eröffnung des Promotionsverfahrens erstmalig an die Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg stelle.

Weiterhin erkläre ich, diesen Antrag in der Vergangenheit an keiner anderen Medizinischen Fakultät gestellt zu haben.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. habil. Dr. rer. Nat. G. Müller und Herrn Prof. Dr. med. habil. H.-J. Schmoll für die Überlassung des Themas dieser Dissertationsschrift.

Frau Dr. Fittkau danke ich für die fachliche Unterstützung und Betreuung der Arbeit, den Laborantinnen des Institutes für Klinische Chemie und Pathobiochemie, insbesondere Frau Gräber und Frau Trümpler, danke ich für ihre sorgfältige Arbeit und ihre großzügige Hilfe beim Erlernen der Methodik.

Herzlich danken möchte ich außerdem meiner Frau Kati und meinen Eltern für Ihre unablässige Unterstützung und Motivation bei der Fertigstellung meiner Promotion. Ihnen widme ich diese Arbeit.