

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.