

## **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 E<sub>2</sub>-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 SF<sub>2</sub>-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 SF<sub>2</sub>-Wert von 1. Als Ergebnis der SF<sub>2</sub>-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  $\alpha_2$ -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 O<sub>2</sub>- 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.  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\gamma$ -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.