

Veränderungen der Zellkinetik der Dünndarmschleimhaut durch Bleomycin®

G. Bürkle, B. Bühler, J. Dietz und V. Bürkle*

Nuklearmedizinische Abteilung (Leiter: Prof Dr. U. Feine)
des Medizinischen Strahleninstitutes (Direktor: Prof. Dr. W. Frommhold)
der Universität Tübingen

Eingegangen am 13. November 1972

Bleomycin®-Induced Changes in Cytokinesis of the Mucosa of the Small Intestine

Summary. The alterations in physiological regeneration of mucosa in the small intestine due to Bleomycin® were examined by radiological, histological and histo-autoradiographical methods. In contrast to published results it was possible to prove that Bleomycin® is liable to damage the regeneration region of the crypts with subsequent transformation and partial atrophy of the villous. There is every indication that the relatively specifically cytostatic effect (particularly on squamous cells and squamous-cell tumors) represents not a qualitative but only a quantitative difference from the effect seen in other tissues with different concentrations of Bleomycin®.

Zusammenfassung. Die Beeinträchtigung der physiologischen Regeneration der Dünndarmschleimhaut durch Bleomycin® wurde röntgenologisch, auflichtmikroskopisch, histologisch und histoautoradiographisch untersucht. Im Gegensatz zu bislang veröffentlichten Untersuchungsergebnissen konnte nachgewiesen werden, daß auch Bleomycin® eine Schädigung der Regenerationszone der Lieberkühnschen Krypten mit konsekutiver Schleimhauttransformation und partieller Zottenatrophie verursachen kann. Dies berechtigt zu der Annahme, daß bei dem relativ „spezifischen“ cytostatischen Wirkungsspektrum (insbesondere auf Plattenepithelien und Plattenepitheltumoren) kein qualitativer, sondern ein quantitativer Wirkungsunterschied bei verschiedener Bleomycin®-Konzentration in verschiedenen Geweben besteht.

Bleomycin® ist seit seiner Isolierung aus *Streptomyces verticillus* durch Umezawa u. Mitarb. (1966a, 1966b, 1968a) in den letzten Jahren wegen seiner antineoplastischen Wirkung in der Onkologie mit in den Vordergrund des Interesses getreten. Zunächst wurde insbesondere im japanischen Schrifttum, inzwischen aber auch im anglo-amerikanischen Sprachraum und in Deutschland über z.T. sehr gute Ergebnisse bei der Chemotherapie gewisser Tumoren berichtet. Erwähnt seien in diesem Zusammenhang insbesondere die Untersuchungen von Ichikawa u. Mitarb. (1967, 1969), die bei der ersten klinischen Erprobung von Bleomycin® an *Hauttumoren* entscheidende Tumorrückbildungen beobachtet haben. In der Folge haben auch Takeda u. Mitarb. (1970) und Pfister (1971) gute Chemotherapieergebnisse bei Plattenepithel-Geschwülsten der Haut mitgeteilt. Bleomycin® ist aber auch bei Neoplasien in der *Urologie* (Völter 1971), der *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*, (Ganzer u. Mitarb., 1971) und der *Gynäkologie* (Suzuki u. Mitarb., 1970) mit z.T. recht gutem Erfolg klinisch angewandt worden.

* Ergebnisse aus der Inaug.-Dissertation von B. Bühler wurden in diese Arbeit miteinbezogen. Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Die Nebenwirkungen von Bleomycin® sind nicht unerheblich. Hervorgehoben wird jedoch von den Autoren, die klinische Untersuchungen mit Bleomycin® durchgeführt haben, daß während der Behandlung bei den Patienten eine Leukopenie bzw. eine allgemein cytotoxische Wirkung praktisch nicht in Erscheinung tritt, die in der Tumorchemotherapie bei den meisten bislang bekannten Cytostatica die Behandlung limitiert. Wenn sich der Eindruck bestätigt, daß Bleomycin® kein ubiquitäres Proliferationsgift mit Depression des granulopoetischen Systems und Schädigung anderer Wechselgewebe (insbesondere des Dünndarms) ist, wenn also eine weitgehend selective Tumorstärke sich nachweisen ließe, dann würden tatsächlich ganz entscheidende, in den letzten Jahren immer mehr angestrebte Wirkungsunterschiede im Vergleich zu den meisten bislang bekannten antineoplastischen Substanzen bestehen.

Im Rahmen unserer chemotherapeutischen Beeinflussungsversuche chemisch induzierter Tumoren bei Laboratoriumsnagetieren, über die an anderer Stelle noch berichtet werden wird, haben wir aber — im Gegensatz zu Ishii u. Mitarb. (1968) und Matsuda u. Mitarb. (1968) Schleimhautalterationen des Dünndarms gesehen, die ähnlich aus Untersuchungen mit Methotrexat® (Bürkle u. Mitarb.; Eder u. Mitarb., 1966) bekannt sind. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Beeinträchtigung der physiologischen Regeneration der Dünndarmschleimhaut unter Bleomycin® zu sichern und näher zu differenzieren. Dazu eignet sich ganz hervorragend die autoradiographische Untersuchungsmethode, wie sie am Dünndarm insbesondere von Leblond u. Mitarb. (1948, 1956), von Oehlert u. Büchner (1961) und Eder (1966, 1969), Eder u. Mitarb. (1965, 1966) angewandt wurde. Interessant schien uns auch ein Vergleich unserer mit Bleomycin® gewonnenen Untersuchungsergebnisse mit den Untersuchungen von Eder u. Mitarb. (1966) mit Methotrexat®, weshalb wir unsere Untersuchungsmethodik in Anlehnung an die von diesen Autoren verwendeten Verfahren gehalten haben.

Untersuchungsgut und -methoden

Insgesamt 40 weibliche Ratten (SIV-Tiere, Züchter: Ivanovas, Kissleg, Allgäu) mit einem Körpergewicht von 245 ± 15 g (gehalten bei Altromin®-Standard-Diät und Trinkwasser ad libitum) wurden in den Versuch einbezogen. 30 Tiere erhielten eine einmalige Bleomycin®-Dosis von 40 mg/kg intraperitoneal; die restlichen 10 Tiere wurden als Kontrolltiere aufgearbeitet.

1. *Röntgenologische* Untersuchungen zur Darstellung des Dünndarmzottenreliefs *in vivo* wurden an jeweils 4 Tieren ohne Behandlung bzw. 72, 120 240 Std nach der Bleomycin®-Applikation durchgeführt. Dazu wurden den Tieren mittels einer Magensonde 4 ml einer 1:1 verdünnten Mikropaque®-Aufschwemmung in den Magen instilliert und — zur Doppelkontrastdarstellung — 5 ml Luft zusätzlich über die Magensonde verabreicht. Im posterior-anterioren Strahlengang wurde dann jeweils in Weichstrahltechnik (38 mA, 38 kV, 0,4 sec) mit dem Senograph (der Fa. Koch & Sterzel, KG, Essen) auf folienlosem Film (Definix Medical der Fa. Kodak) eine Aufnahme angefertigt. Die Vergrößerung der Röntgenaufnahmen erfolgte auf photographischem Wege.

2. Die *auflichtmikroskopische* Beurteilung des Zottenrasens führten wir mit dem „Tessovar“ der Fa. Zeiss, Oberkochen, durch. Untersucht wurden dabei die Duodeni sämtlicher 40 Tiere.

3. Zur *histologischen* Aufarbeitung ist von allen 40 Tieren eine 1—3 cm postpylorisch entnommene Duodenalmanschette nach 24stündiger Fixierung in gepuffertem 4%igem Formalin in üblicher Weise in Paraplast eingebettet worden. Jeweils 5 µ dicke Schnittpräparate wurden mit Hämalun allein oder mit Hämalun-Eosin gefärbt.

4. *Autoradiographische Untersuchungen*: 18 der mit Bleomycin® behandelten und 6 der unbehandelten Tiere (die nicht den Röntgenuntersuchungen unterworfen waren) wurden in 6 Gruppen zu je 4 Tieren aufgeteilt. Gruppe I wurde nach 4, Gruppe II nach 8, Gruppe III nach 16, Gruppe IV nach 24, Gruppe V nach 48, Gruppe VI nach 72 Std durch Entbluten in Thiogenal®-Narkose getötet. Die Tötung der Tiere erfolgte grundsätzlich zwischen 20.00 und 23.00 Uhr, um Schwankungen der diurnalen Mitoseaktivität als Fehlerquelle möglichst auszuschalten. Gruppe I–III erhielten 1 Std vor der Tötung, Gruppe IV–VI 24 Std vor der Tötung 2 µCi/g Körpergewicht Thymidin-Methyl-³H mit einer spezifischen Aktivität von 2,0 Ci/mMol (bezogen von dem Radiochemical Centre, Amersham). Die autoradiographischen Untersuchungen erfolgten nach der Dipping-Methode, wobei die Ilford-G5-Photoemulsion zur Anwendung kam. Expositionszeit 5 Tage (bei 4°C). Entwicklung und Fixation mit Kodak-Developer und Kodak-Unifix. Die Färbung der 5µ dicken Schnittpräparate mit Hämalaun sowie mit Hämalaun-Eosin erfolgte nach der Beschichtung mit der Photoemulsion und nach der Exposition.

a) Die *Gesamtzellzahl pro Krypte* wurde durch Auszählen der Kerne von 20 exakt längsgetroffenen Krypten in einem Duodenum-Schnittpräparat jeden Tieres festgestellt. Mitgezählt wurden dabei nicht in Karyolyse begriffene Kerne.

b) Die *Zählung der markierten Zellen* erfolgte ebenfalls an 20 exakt längsgetroffenen Krypten jeden Tieres. Als markiert wurden Zellen bezeichnet, deren Kern mindestens mit 10 Silberkörnern belegt war.

c) Der *Markierungsindex* wurde errechnet aus dem Verhältnis markierte Zellen: Gesamtzellzahl pro Krypte nach einmaliger Gabe von Thymidin-Methyl-³H 60 min vor Tötung der Tiere.

d) Die *Wanderungsgeschwindigkeit* der markierten Zellen erfolgte durch Ausmessen des markierten Bereichs von Kryptenhals in Richtung Zottenspitze mit einem Ocularmikrometer. Zur Messung dienten jeweils die 10 längsten, vertikal getroffenen Zotten eines Schnittpräparates.

5. *Zottenhöhen und Kryptentiefen* wurden jeweils ebenfalls mit dem Ocularmikrometer an den 10 längsten Zotten bzw. 10 tiefsten Krypten eines Schnittpräparates bestimmt.

6. Die *statistische Sicherung* erfolgte jeweils durch Vergleich der Mittelwerte (*t*-Test nach Student).

Ergebnisse

1. Röntgenologische Zottenreliefdarstellung *in vivo*

Bei den unbehandelten Tieren stellte sich das Duodenum-Innenrelief mit fischzugähnlich angeordneten, regelmäßigen, kreisrunden bis stäbchenförmigen Kontrastmittel-Füllungsdefekten dar, die auf einen regelrechten, finger- bis blattförmigen Zottenbesatz schließen ließen (Abb. 1).

72 Std nach Bleomycin®-Gabe dagegen zeigten sich sehr unterschiedlich große und meist nicht in ganzem Umfang abgrenzbare „Füllungsdefekte“. Zudem war der Kontrastmittelbeslag der inneren Oberfläche des Duodenum — wohl durch Sekretvermehrung — ungleichmäßig. Bis zu dieser Versuchszeit hat also offensichtlich ein Strukturumbau der Duodenalzotten stattgefunden (Abb. 2).

Bei den 120 Std nach Bleomycin®-Behandlung röntgenologisch untersuchten Tieren fand sich gegenüber dem Kontrollkollektiv noch eine ganz geringe Relief-Alteration, während das Duodenum 240 Std nach der einmaligen Bleomycin®-Dosis *in vivo* röntgenologisch keinen sicheren pathologischen Befund mehr ergab.

2. Auflichtmikroskopische Beurteilung

Bei der auflichtmikroskopischen Beurteilung des duodenalen Zottenrasens zeigte das Kontrollkollektiv dichtstehende, hohe, finger-, zungen- und blatt-

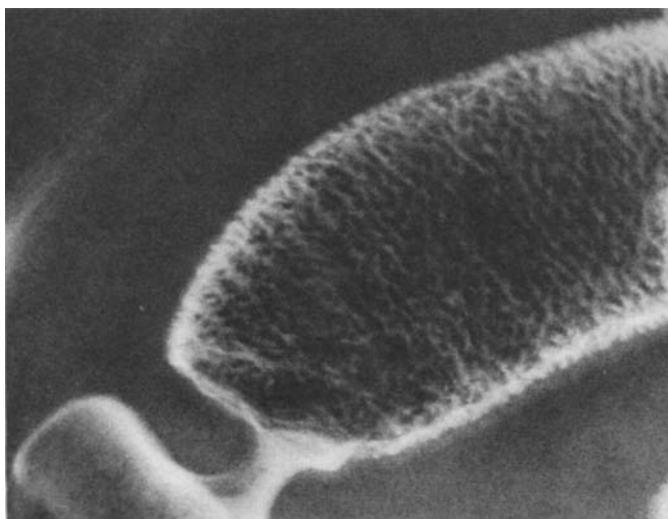


Abb. 1. Röntgenologischer Aspekt des duodenalen Zottenreliefs einer unbehandelten Ratte.
Im linken unteren Bildbereich der Pyloruskanal. Vergr. 14×

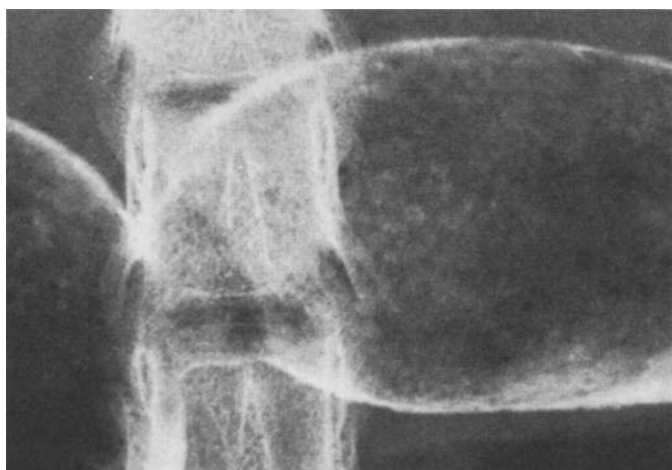


Abb. 2. Postpylorische Duodenalmanschette 72 Std nach Bleomycin®-Applikation (40 mg/kg).
Zottenformationen sind röntgenologisch am lebenden Versuchstier nicht mehr sicher nachzuweisen. Vergr. 14×

förmige Zottenkonfigurationen im Duodenum (Abb. 3). In den Versuchsgruppen I—IV waren bei Lupenvergrößerung die Zottenformationen gegenüber den unbehandelten Tieren unverändert.

48 Std nach Bleomycin®-Gabe wurden auflichtmikroskopisch die ersten Veränderungen der Zotten festgestellt: es fanden sich Höhenminderungen und Synechien der Zotten. Die Zottenoberfläche erschien unregelmäßig, „samartig“ feingehöckert und grauweiß gesprenkelt (Abb. 4).

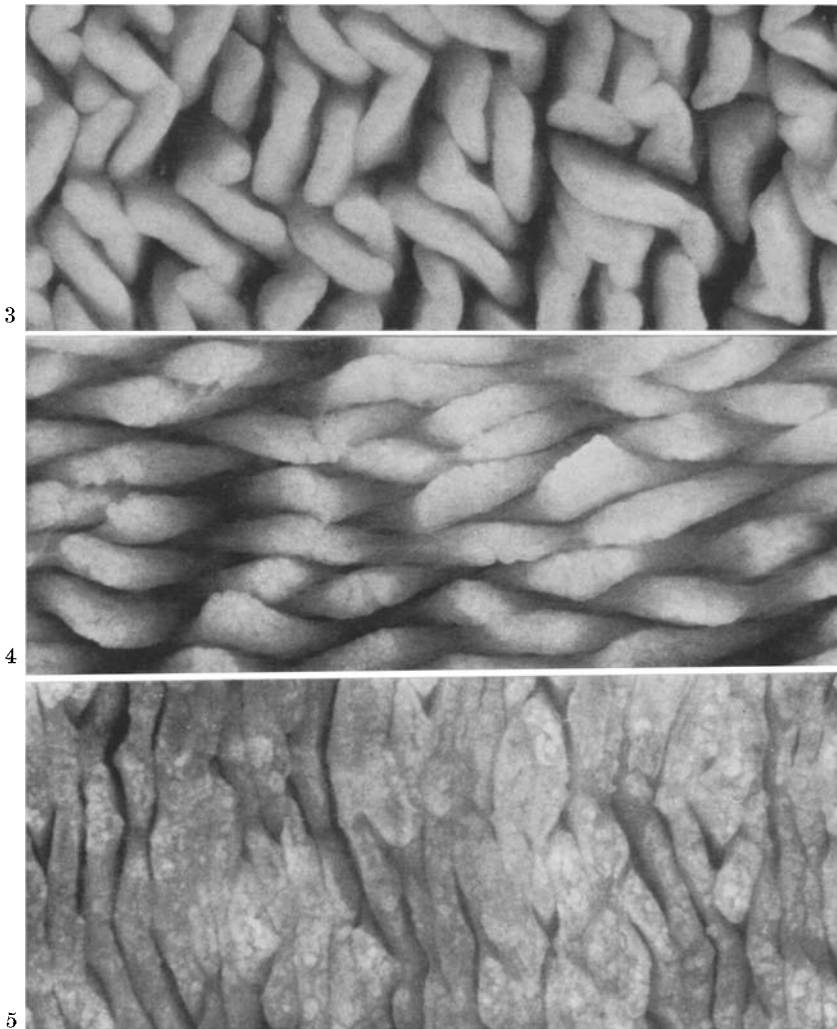


Abb. 3. Auflichtmikroskopisch unauffälliger duodenaler Zottenrasen eines Kontrolltieres mit hohen, zungen- bis blattförmigen Zotten

Abb. 4.: Unregelmäßig feingehöckerte Zottenoberfläche im Duodenum einer Ratte 48 Std nach einmaliger intraperitonealer Bleomycin®-Gabe (40 mg/kg) mit deutlicher Höhenminderung der Zotten

Abb. 5. Fortgeschrittene Synechien stark höhengeminderter, z.T. nur noch rudimentärer Duodenalzotten 72 Std nach einmaliger Bleomycin®-Applikation (40 mg/kg)

72 Std nach Bleomycin®-Applikation wurden erhebliche Zottensynechien bei ausgeprägter Höhenminderung des Reliefs beobachtet. Die Zottenstrukturen zeigten sich bei der Mehrzahl der Tiere nur noch rudimentär (Abb. 5).

Bei den Versuchstieren, die 120 Std nach Bleomycin®-Gabe getötet wurden, erschien das Zottenrelief nicht so gleichförmig und regelmäßig wie beim Kontroll-

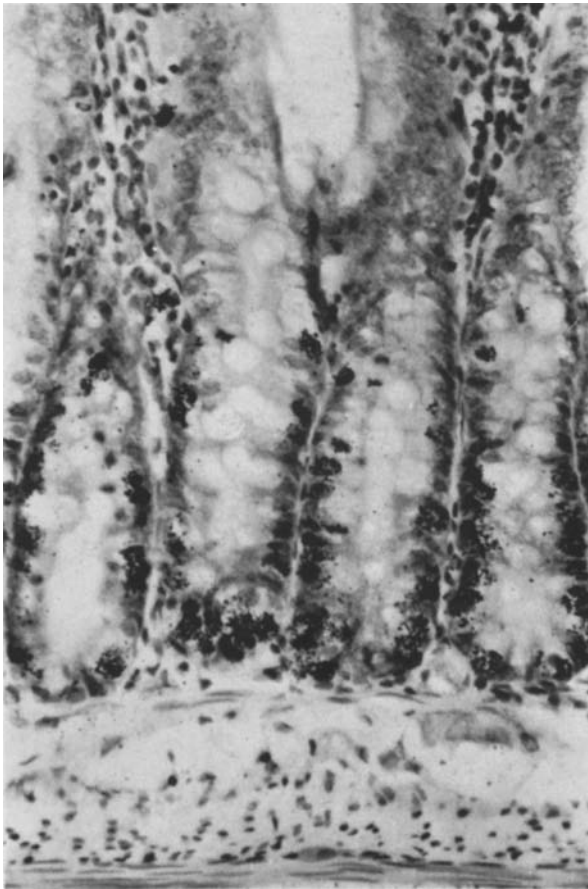


Abb. 6. Vertikalschnitt durch die Regenerationszone der Duodenalschleimhaut eines unbehandelten Kontrolltieres. Regelrechte autoradiographische Darstellung der DNS-synthetisierenden Zellen 1 Std nach Thymidin-Methyl- ^3H -Gabe. Hämalaun. $188\times$

kollektiv, auch waren vereinzelt noch Zottensynechien nachweisbar. Insgesamt fanden sich jedoch nur noch unwesentliche Veränderungen, die schließlich bei den 240 Std nach Bleomycin®-Gabe getöteten Tieren auflichtmikroskopisch nicht mehr festgestellt werden konnten.

3. Histologische Befunde

Die Duodena der Kontrolltiere zeigten durchweg hohe, schlanke, dicht stehende, fingerförmige Zotten mit hochprismatischem Deckepithel, basal orientierten Zellkernen, regelmäßiger Kryptenauskleidung und reichlich Mitosen in den Lieberkühnschen Krypten. Das Zottenstroma war unauffällig (Abb. 6).

4 Std nach Bleomycin®-Gabe sind die Zottenstrukturen ebenso wie das Zottenstroma unverändert. In den Kryptenregionen sind Mitosefiguren selten. Dabei

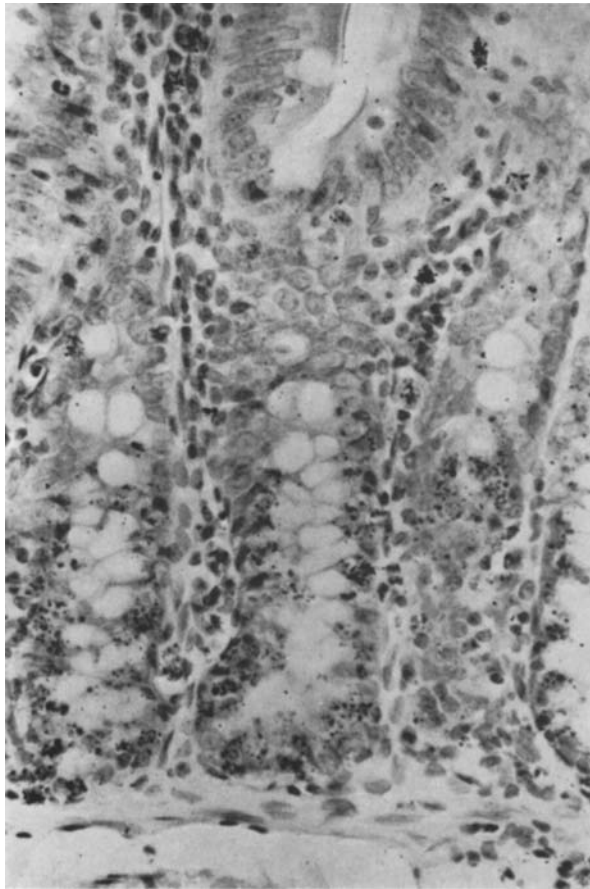


Abb. 7. Vertikalschnitt durch die Kryptenregion einer Ratte 8 Std nach einmaliger Bleomycin®-Gabe (40 mg/kg i. p.). Ausgeprägte degenerative Veränderungen zahlreicher Kern- und Zellen. Deutlich verminderte Markierung gegenüber Abb. 6. 1 Std nach Thymidin-Methyl-³H-Gabe. Hämalaun. 188×

finden sich jedoch geringgradige vacuolige Veränderungen einzelner Kryptenzellen, vermehrt Kernpyknose und Karyolyse.

8 Std nach Bleomycin®-Applikation zeigen sich schwere degenerative Schädigungen eines großen Teils der Zellen im Kryptengrund (Abb. 7). Die Kryptenlumina enthalten z. T. reichlich Zelldetritus und Granulocyten.

Nach 16 Std überwiegen vacuoläre Veränderungen der Kryptenzellen bis in den Bereich des Kryptenhalses. Die Kryptenauskleidung erscheint stark abgeflacht. Bis zu dieser Zeit stellt sich das Zottenepithel noch regelmäßig einschichtig und hochprismatisch dar. Die Lamina mucosa ist nun in den tieferen Schichten bereits entzündlich-zellig infiltriert.

24 Std nach Bleomycin®-Applikation finden sich Epithelzell- und -kerngrößenunterschiede in den unteren Zottenregionen; das Kryptenbild ist praktisch das gleiche wie bei dem nach 16 Std getöteten Versuchskollektiv.

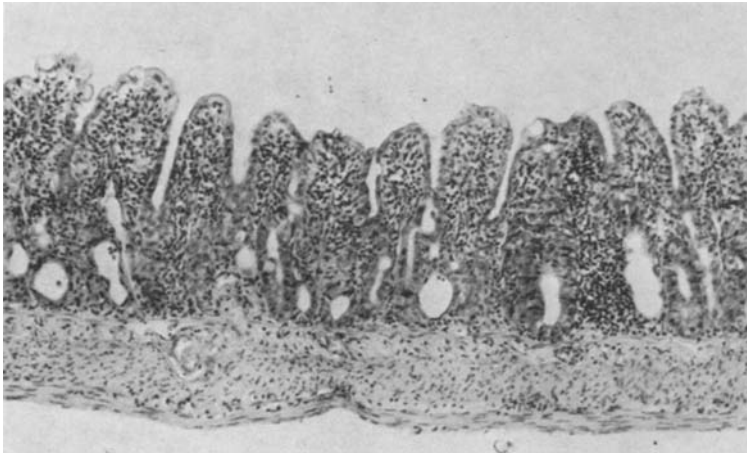


Abb. 8. Schleimhaut-Transformation im Duodenum mit Verplumpung und Abflachung der Zotten, Veränderung des Zotten-/Krypten-Längenverhältnisses, cystischer Aufweitung einzelner Krypten und rundzelligen Infiltrationen der Lamina mucosa. HE. 56×

48 Std nach Versuchsbeginn ist das Zottenstroma deutlich bis in den Zotten-spitzenbereich lympho-plasmazellulär infiltriert; die Zotten sind verplumpt, abgeflacht. Das Deckepithel hat die Basalständigkeit der Kerne verloren. Die Epithelkerne sind überwiegend rund bis oval, nicht mehr länglich. Im Zottenspitzenbereich erscheinen die Zellkerne ebenso wie das Cytoplasma aufgetrieben und teilweise vacuolig verändert.

72 Std nach Bleomycin®-Gabe sind stärkste Schleimhautveränderungen nachweisbar (Abb. 8): Die Zotten sind stark dekonfiguriert, erniedrigt um etwa die Hälfte ihrer ursprünglichen Höhe und zeigen zahlreiche Synechien. Das Zotten-/Krypten-Längenverhältnis erscheint nahezu wie 1:1, wobei die Kryptentiefe praktisch wieder die Werte der unbehandelten Tiere erreicht hat. Die Krypten-region hat ihren morphologischen Aspekt jedoch keineswegs normalisiert. Es ist zur Ausbildung zahlreicher atypischer tubulärer Strukturen gekommen, die gelegentlich cystisch erweitert sind. Das Drüsenepithel ist häufig mehrschichtig, stark basophil und polymorph, sodaß stellenweise eine Ähnlichkeit mit den normalen Epithelzellen völlig vermißt wird. Bei der außerdem nachzuweisenden starken Änderung der Zellfärbbarkeit unter Zunahme der basophilen Substanzen in der Zelle erinnern das Zellbild und die Gewebsstrukturen in umschriebenen Bezirken viel eher an das Bild eines Adenocarcinoms, wobei selbstverständlich die übrigen morphologischen Kriterien einer malignen Neubildung fehlen. Im Zottenstroma reichlich Lymphocyten, Plasmazellen, eosinophile und — weniger zahlreich — neutrophile Granulocyten. Auch die Zottenepithelien sind basophiler als beim Kontrollkollektiv; sie sind überwiegend kubisch, im Zottenspitzenbereich mehrschichtig, häufig feinvacuolär verändert, sodaß nahezu schaumzellartige Zellstrukturen an der Zottenspitze zu beobachten sind.

120 Std nach Bleomycin®-Applikation sind immer noch cystische Erweiterungen der Krypten und Unregelmäßigkeiten der verstärkt basophilen Krypten-

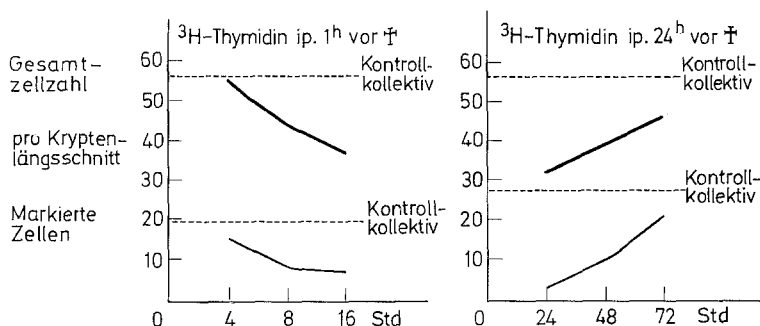


Abb. 9. Zellen nach einmaliger Bleomycin®-Applikation (40 mg/kg KG i. p.)

epithelien nachweisbar. Die Zotten haben an Länge wieder zugenommen; sie sind jedoch zumeist noch von unregelmäßigem, teilweise mehrschichtigem Epithel bedeckt, das eine basale Kernorientierung häufig noch vermissen läßt. Auch lockere entzündliche Stromainfiltrate (überwiegend Lymphocyten, Plasmazellen und Eosinophile) sind noch erkennbar, ebenso gelegentliche Zottensynechien.

240 Std nach Bleomycin®-Gabe hat sich dann das Strukturbild der Duodenalschleimhaut wieder weitgehend normalisiert.

4. Autoradiographische Befunde

a) *Gesamtzellzahl pro Kryptenlängsschnitt* (Abb. 9). Eine Veränderung der Gesamtzellzahl in der Krypte ist 4 Std nach der Bleomycin®-Injektion noch nicht nachzuweisen; aber 8 Std post injectionem zeigt sich eine deutliche Abnahme der Gesamtzellzahl gegenüber den Kontrolltieren bis zu einem Minimum, das 24 Std nach der Injektion erreicht wird. Die Tiere der Versuchsgruppen V und VI (also 48 bzw. 72 Std post injectionem) zeigen wieder eine Zunahme der Gesamtzellzahl im Kryptenbereich, die jedoch gegenüber den Kontrolltieren noch signifikant zurückbleibt.

b) *Anzahl der markierten Zellen pro Kryptenlängsschnitt* (Abb. 9). Bei den mit Bleomycin® behandelten Tieren ist bereits nach 4 Std eine eindeutige Verringerung der in den Kryptenlängsschnitten nachweisbaren markierten Zellen zu erkennen. Die Zahl der markierten Zellen im Kryptenlängsschnitt nimmt 8 und 16 Std nach Applikation des Antibiotikums noch weiter ab. In der Versuchsgruppe IV (also 24 Std post injectionem, wobei das ³H-markierte Thymidin gleichzeitig mit Bleomycin®-Applikation verabreicht wurde) ist die kleinste Zahl markierter Zellen festzustellen. Eine Erholung der ³H-Thymidin-Einbauhemmung fand sich in den nach 48 und 72 Std getöteten Tieren, wobei die markierten Zellen jedoch die Werte der Kontrolltiere noch nicht erreichen.

c) *Markierungsindex in der Krypte* (Abb. 10). Der aus der Gesamtzellzahl und der Anzahl der markierten Zellen errechnete Markierungsindex zeigt bereits 4 Std nach der Bleomycin®-Injektion eine Abnahme, die sich jedoch erst nach 8 und 16 Std bei den angewandten statistischen Methoden als signifikant erweist. Nach diesen Versuchszeiten ist der mittlere Markierungsindex nur noch wenig

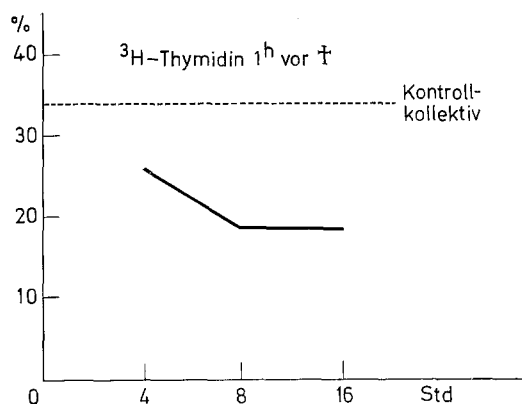


Abb. 10. Markierungsindex = $\left(\frac{\text{markierte Zellen}}{\text{Gesamtzahl}} \right)$ in der Duodenalkrypte nach einmaliger Bleomycin®-Applikation (40 mg/kg KG i. p.)

über der Hälfte des Normalwertes. [24 Std nach Bleomycin®-Injektion (bei simultaner ^3H -Thymidin-Gabe) wurde ein gegenüber den Kontrolltieren stark verminderter markierter Zellgehalt der Krypten bestimmt, der sich bis 72 Std nach der Bleomycin®-Behandlung praktisch wieder erholt hat und gegenüber den Kontrollwerten keine eindeutigen Unterschiede mehr zeigt.]

d) *Die Wanderungsgeschwindigkeit* (Abb. 11) der sich differenzierenden Enterocyten vom Kryptenhals in Richtung Zottenspitze wurde durch Bleomycin® in der hier verwandten Dosis nicht beeinträchtigt. Im Einzelnen wurden folgende Mittelwerte der Markierungsbereiche bei 24 Std vor der Tötung markierten Tieren gemessen: Gruppe IV: 128 μ ; Gruppe V: 149 μ ; Gruppe VI: 155 μ . Das Kontrollkollektiv für die Gruppen IV—VI zeigte einen mittleren markierten Bereich von 155 μ . Die angegebenen Meßwerte erweisen sich im t-Test ($p \leq 0,05$) als nicht signifikant unterschiedlich. Sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den behandelten Tieren zeigten 1 Std nach ^3H -Thymidin-Injektion nur die Zellen in der Regenerationszone eine Markierung; 24 Std später ist bei den Kontrolltieren ungefähr die Hälfte des Zottenepithels mit markierten Zellen besetzt. Bei den behandelten Tieren fanden sich entsprechende Meßwerte. Da bei ihnen aber die Zottenlänge nach der Bleomycin®-Injektion abgenommen hat, ist — bei unverminderter Wanderungsgeschwindigkeit — ein größerer Teil der Zotten mit markierten Zellen besetzt.

5. Zottenhöhen und Kryptentiefen (Abb. 11)

Nach einmaliger Bleomycin®-Applikation kam es zu einer eindeutigen Zottenhöhen-Abnahme. Dabei wurden in der Versuchstiergruppe VI (Tötung 72 Std nach Bleomycin®-Gabe) eine durchschnittliche Zottenhöhe von 234 μ gemessen, während das Kontrollkollektiv eine mittlere Zottenhöhe von 460 μ aufwies. Die statistische Signifikanz der Zottenverkürzung ist bereits 48 Std nach Bleomycin®-Applikation nachzuweisen, während in den Versuchsgruppen I—IV

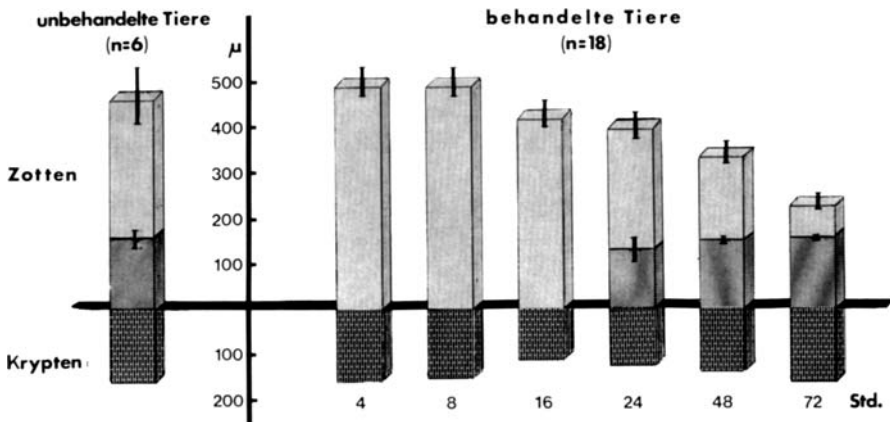


Abb. 11. Zottenhöhe und Kryptentiefe nach einmaliger Bleomycin®-Applikation (40 mg/kg KG i. p.). Der mittlere Teil stellt die Wanderungstrecke differenzierter Zellen 24 Std nach ^3H -Thymidin-Gabe dar

(d.h. also bis 24 Std nach Versuchsbeginn) die Zottenlängen-Abnahme rechnerisch noch nicht als gesichert angesehen werden kann.

In den Versuchstiergruppen III und IV (also 16 bzw. 24 Std nach Bleomycin®-Applikation) sind die Kryptentiefen gegenüber dem Kontrollkollektiv signifikant verringert. 72 Std nach der Injektion wurde die Kryptentiefe jedoch wieder entsprechend den Meßwerten bei unbehandelten Tieren gefunden.

Diskussion

Eine *selektiv antineoplastische* Wirkung bei möglichst weitgehender Schonung nicht zum Tumor gehöriger Zellen und Gewebe ist das Ziel bei der Suche neuer Krebschemotherapeutica. Die bislang bekannten und klinisch eingesetzten cancerotoxischen Substanzen wirken leider in ausgeprägtem Maße auch allgemein cytotoxisch, sodaß ihr Einsatz häufig mit einer Schädigung der proliferationsaktiven Wechselgewebe (insbesondere des Knochenmarkes und des Dünndarmes) erkauft wird, wobei die Dosierung hinsichtlich des cancerostatischen oder cancerociden Effektes unzureichend bleiben muß.

Bei Bleomycin®-Behandlungen sind im klinischen Versuch Leukopenie oder profuse Durchfälle als Zeichen der gefürchteten Knochenmarks- bzw. Dünndarmschädigung praktisch nicht in Erscheinung getreten, obwohl von zahlreichen Autoren — in allerdings unterschiedlichem Maße — die antineoplastische Wirkung von Bleomycin® insbesondere bei Plattenepitheltumoren beobachtet werden konnte.

Dies führt zu der grundsätzlichen Frage, ob Plattenepithel und Plattenepitheltumoren auf Grund irgendwelcher gewebsspezifischer Besonderheiten „sensibel“ sind gegenüber dem Antibiotikum Bleomycin®, und andere, noch proliferationsaktivere Gewebe wie das Knochenmark oder die Dünndarmschleimhaut „resistent“. Dieser Eindruck mußte auch nach den bislang berichteten experimentellen Unter-

suchungsergebnissen entstehen, zumal bei umfangreichen Toxizitätsuntersuchungen im akuten, subchronischen und chronischen Versuch — auch bei Anwendung weit höherer Bleomycin-Dosierungen wie in vorliegendem Experiment — außer einer Hyperaemie histologisch „keine nennenswerten Veränderungen“ der Dünndarmschleimhaut festgestellt wurden (Ishii u. Mitarb., 1968; Matsuda u. Mitarb., 1968).

Nach unseren Untersuchungen ist jedoch auch die Dünndarmschleimhaut Manifestationsort einer cytostatischen Bleomycin®-Wirkung: Die gesamte Zellpopulation der Lieberkühnschen Krypten wurde durch eine einmalige Bleomycin®-Gabe in der angegebenen Dosierung erheblich reduziert; gleichzeitig verminderte sich die Zahl der DNS-synthetisierenden Zellen im Verhältnis zu der Gesamtzellzahl in der Germinativzone in erheblichem Maße (Markierungsindex). Die Schädigung der Regenerationszone durch Bleomycin®, die histologisch auch durch degenerative Kernveränderungen in Erscheinung tritt, führte unter unseren Versuchsbedingungen bereits zu einer deutlichen *Schleimhauttransformation* mit *partiell*em Zottenschwund und Abnahme der Kryptentiefe.

Bemerkenswert ist, daß die Mechanismen der Epithelregeneration und-Wanderung beim Tier (Leblond u. Mitarb., 1956; Oehlert u. Büchner, 1961) im Prinzip — bei etwas anderen zeitlichen Verhältnissen — die gleichen sind wie beim Menschen (MacDonald u. Mitarb., 1964). Bei Berücksichtigung etwas unterschiedlicher zeitlicher Verhältnisse ist eine Beeinträchtigung auch der Zellkinetik im menschlichen Dünndarm durch Bleomycin® zu erwarten. Ob die vergleichsweise wesentlich niedrigere Dosierung beim Menschen im klinischen Versuch das Gleichgewicht zwischen Zelldesquamation und Zellregeneration so stark beeinträchtigen kann, daß es zu einem Strukturumbau der Dünndarmschleimhaut kommt, werden bioptische Untersuchungen während Bleomycin®-Behandlungen zeigen müssen.

Die absolute Wanderungsgeschwindigkeit der sich differenzierenden Deckepithelien in Richtung Zottenspitze wurde durch Bleomycin® nicht beeinträchtigt. Ein merklicher antibiotischer Effekt auf die Wanderungsgeschwindigkeit, ähnlich wie er von Eder und Goppelt (1966) nach Tetracyclinbehandlung nachgewiesen wurde, konnte von uns nicht festgestellt werden. Diese Autoren haben nach Tetracyclinbehandlung außer den Zelldegenerationen in den Krypten eine Verzögerung der physiologischen Zelldesquamation im Zottenspitzenbereich und schließlich eine daraus resultierende Zottenhypertrophie beobachtet. Dem entspricht auch die Feststellung einer erheblichen Verzögerung der Wanderungsrate der Dünndarmepithelzellen bei keimfreien Tieren durch Leshner u. Mitarb. (1964). Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, daß nach Methotrexat®-Applikation im Stoßversuch von Eder u. Mitarb. (1966) nach passagerem Sistieren der Zellauswanderung in Richtung Zottenspitze eine weit überschießende Zellwanderung autoradiographisch erkennbar gemacht werden konnte. Wir nehmen an, daß sich bei unserer Versuchsanordnung der antibiotische (die Zellauswanderung verzögernde) und der cytostatische Effekt des Bleomycin® (mit der nachfolgenden beschleunigten Zellwanderung) überlappen.

Festzustellen ist jedenfalls, daß auch Bleomycin® auf die proliferationsaktive Dünndarmschleimhaut cytostatisch wirksam ist. Wenn die antineoplastische Wirkung demgegenüber in den Vordergrund tritt, handelt es sich offensichtlich um ein *quantitatives* Problem. Unterschiedliche Bleomycin®-Konzentrationen in

verschiedenen Organsystemen von Laboratoriumstieren wurden denn auch sowohl über die antibakterielle Aktivität von Organextrakten als auch nach Tritium-Markierung von Bleomycin® von Ishizuka u. Mitarb. (1967), von Ichikawa u. Mitarb. (1967) sowie von Umezawa u. Mitarb. (1968) festgestellt. Die relativ gute antineoplastische Wirksamkeit, die dem Bleomycin im Schrifttum für bestimmte (meist Plattenepithel-) Tumoren zugeschrieben wird, scheint durch eine Anreicherung dieses Chemotherapeutikums in bestimmten Tumoren zustande zu kommen. Für diese Annahme sprechen auch unsere an autochthonen, chemisch induzierten Tiertumoren gewonnenen Therapieergebnisse [Bürkle u. Mitarb., (b)].

Der Fa. Heinr. Mack, 7918 Illertissen/Bayern, danken wir für die freundliche Überlassung von Bleomycin®-Versuchsmengen. Fräulein A. Berens wird für die hervorragende technische Mitarbeit gedankt.

Literatur

- Bürkle, G., Anger, K., Bürkle, V., Wolf, E.: Exsudative Enteropathie bei experimentell induzierten sprueähnlichen Dünndarmveränderungen (im Druck) (a).
- Bürkle, G., Dietz, J., Bühler, B., Bürkle, V.: Autoradiographische Untersuchungen zur antineoplastischen Wirkung von Bleomycin® auf autochthone Oesophagustumoren im Experimen et (In Vorbereitung.) (b).
- Eder, M.: Zellerneuerung im Magen-Darm-Trakt. Verh. dtsh. Ges. Path., 50. Tagg. 75—90 (1966).
- Eder, M.: Die Bedeutung des „Turnover“ von Epithelersatz und -differenzierung für die Orthologie und Pathologie der Dünndarmfunktion. Verh. Dtsch. Ges. Path., 53. Tagg., Mainz 1969, S. 45—55. Stuttgart: Fischer 1969.
- Eder, M., Goppelt, D.: Änderungen in der physiologischen Zellregeneration der Dünndarmschleimhaut bei Tetracyclin. Klin. Wschr. **44**, 1158 (1966).
- Eder, M., Löhrs, U.: Experimentelle Regenerationsstörungen der Darmschleimhaut. Dtsch. Arch. klin. Med. **210**, 202—216 (1965).
- Eder, M., Rostock, H., Vogel, G.: Die Wirkung von Folsäureantagonisten (Methotrexat) auf die Regeneration der Darmschleimhaut. Virchows Arch. path. Anat. **341**, 164—176 (1966).
- Ganzer, U., Nitze, H. R., Ritter, R.: Erste Erfahrungen mit dem neuen Cytostaticum Bleomycin. H.N.O. **19**, 115—117 (1971).
- Ichikawa, T., Matsuda, A., Yamamoto, K., Tsubosaki, M., Kaihara, T., Sakamoto, K., Umezawa, H.: Biological studies on Bleomycin A. J. Antibiot. (Tokyo) Ser. A **20**, 149—155 (1967).
- Ichikawa, T., Nakano, I., Hirokawa, I.: Bleomycin treatment of the tumors of penis and scrotum. J. Urol. (Baltimore) **102**, 699—707 (1969).
- Ishii, Y., Shinozaki, H., Tanaka, T., Kijima, K., Miyamoto, K., Matsuda, A.: Acute toxicity of Bleomycin. Druckschrift v. Mai 1968 der Fa. Nippon Kayaku Co., Ltd., Tokyo, Japan.
- Ishizuka, M., Takayama, H., Takeuchi, T., Umezawa, H.: Activity and toxicity of Bleomycin. J. Antibiot. (Tokyo), Ser. A **20**, 15—24 (1967).
- Leblond, C. P., Messier, B., Kopriwa, B.: Thymidine-³H as a tool for the investigation of the renewal of cell populations. Lab. Invest. **8**, 296—308 (1956).
- Leblond, C. P., Stevens, C. E.: The constant renewal of the intestinal epithelium in albino rats. Anat. Rec. **100**, 357—378 (1948).
- Leshner, S., Walburg, H. E., Sacher, G. A.: Generation cycle in the duodenal crypt cells of germ-free and conventional mice. Nature (Lond.) **202**, 884—886 (1964).
- MacDonald, W., Trier, J. S., Everett, N. B.: Cell proliferation and migration in the stomach, duodenum and rectum of man: Radioautographic studies. Gastroenterology **46**, 405—417 (1964).
- Matsuda, A., Miyamoto, K., Tsubosaki, M., Ishibashi, H., Ota, K., Shimada, M., Ito, K., Yoshioka, O., Yamaguchi, Y., Sakamoto, K., Tanaka, T.: Subacute and chronic toxicities of Bleomycin. Druckschrift v. Mai 1968 der Fa. Nippon Kayaku Co., Ltd., Tokyo, Japan.

- Oehlert, W., Büchner, Th.: Mechanismus und zeitlicher Ablauf der physiologischen Regeneration im mehrschichtigen Plattenepithel und in der Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes der weißen Maus. *Beitr. path. Anat.* **125**, 347—402 (1961).
- Pfister, R.: Die antibiotische Behandlung maligner epithelialer Tumoren der Haut mit Bleomycin — Erste Erfahrungen. *Fortschr. Med.* **89**, 583—589 (1971).
- Suzuki, M., Murai, A., Watanabe, T., Nunokawa, O.: Treatment of cancer of the female genital organs with a new anticancer agent, Bleomycin. *Vortr. auf d. 6. World Congress of Gynaecology and Obstetrics of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics and the 18th Annual Meeting of the American College of Obstetricians and Gynaecologists*, 1970, New York, USA.
- Takeda, K., Sagawa, Y., Arakawa, T.: Therapeutic effect of Bleomycin for skin tumors. *Gann* **61**, 207—218 (1970).
- Umezawa, H., Ishizuka, M., Maeda, K., Takeuchi, T.: Studies on Bleomycin. *Cancer (Philad.)* **20**, 891—895 (1967).
- Umezawa, H., Ishizuka, M., Kimura, K., Iwanaga, J., Takeuchi, T.: Biological studies on individual Bleomycins. *J. Antibiot. (Tokyo)* **21**, 592—602 (1968a).
- Umezawa, H., Ishizuka, M., Hori, S., Chimura, H., Takeuchi, T.: The distribution of ^3H -Bleomycin in mouse tissue. *J. Antibiot. (Tokyo), Ser. A*, **21**, 638—642 (1968b).
- Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T., Okami, Y.: New antibiotics, Bleomycin A and B. *J. Antibiot. (Tokyo), Ser. A* **19**, 200—209 (1966a).
- Umezawa, H., Suhara, Y., Takita, T., Maeda, K.: Purification of Bleomycins. *J. Antibiot. (Tokyo)* **19a**, 210—215 (1966b).
- Völter, D.: Erste Erfahrungen mit Bleomycin in der Urologie. *Fortschr. Med.* **80**, 593—594 (1971).

Dr. Gernot Bürkle
Brigitte Bühler
Jochen Dietz
Volker Bürkle
Medizinisches Strahleninstitut
der Universität
D-7400 Tübingen, Röntgenweg 11
Bundesrepublik Deutschland