

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
11. Jg. 1973, S. 479—481

Zur Frage der Wirkung einer Anaesthetie auf den Steroidstoffwechsel in der Leber

Von J. BREUER, E. PAULUS und H. BREUER

Institut für Klinische Biochemie und Klinische Chemie der Universität Bonn

(Eingegangen am 27. Juli/14. September 1973)

Der in-vitro-Stoffwechsel von [4-¹⁴C]Östron wurde in Leberschnitten unbehalteter und anaesthetisierter Ratten untersucht. Weder eine zweistündige Neuroleptanalgesie alleine noch die zusätzliche Gabe eines Muskelrelaxans und Beatmung mit N₂O/O₂ beeinflussten den Umsatz von [4-¹⁴C]Östron sowie die Bildung von [4-¹⁴C]Östradiol-17β und von hydroxylierten Metaboliten. Daraus wird der Schluß gezogen, daß die Aussagekraft von in-vitro-Versuchen mit Gewebe, das intra operationem gewonnen wurde, nicht eingeschränkt ist.

On the effect of anaesthesia on the metabolism of steroids in the liver

The metabolism in vitro of [4-¹⁴C]oestrone was studied in liver slices of untreated and of anaesthetised male Wistar rats. Neither neuroleptanalgesia alone nor the additional administration of a muscular relaxant and artificial respiration with N₂O/O₂ during two hours had any influence on the rate of the metabolism of [4-¹⁴C]oestrone, the formation of [4-¹⁴C]oestradiol-17β, or the formation of hydroxylated metabolites. It is concluded that the results of in vitro experiments performed with tissue, obtained during operation, are not affected by anaesthesia.

Die Untersuchung des in-vitro-Stoffwechsels von Steroidhormonen beim Menschen erfolgt fast ausschließlich an Gewebeproben, die intra operationem gewonnen werden. In diesem Zusammenhang erhebt sich die Frage, ob eine Anaesthetie die Aktivität von steroidmetabolisierenden Enzymen beeinflusst. Eine solche Wirkung könnte durch Aktivierung, durch Hemmung und/oder durch Induktion von Enzymen stattfinden. Im Hinblick auf die zum Teil weitreichenden Interpretationen der qualitativen und quantitativen Ergebnisse von in-vitro-Studien wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die oben gestellte Frage zu beantworten. Die Untersuchungen konnten aus naheliegenden Gründen nicht am Menschen durchgeführt werden; deshalb wurden Ratten verwendet, deren Steroidstoffwechsel demjenigen des Menschen ähnlich ist (vgl. (1)). Außerdem wurde eine Narkoseform verwendet, wie sie in der Humanmedizin häufig gebraucht wird.

Methodik

Steroide

[4-¹⁴C]Östron (3-Hydroxy-1,3,5(10)-östratrien-17-on; spez. Aktivität 50,0 mCi/mmol) wurde vom Radiochemical Centre, Amersham, England, bezogen; vor dem Gebrauch wurde [4-¹⁴C]Östron durch Chromatographie auf formamidimprägniertem Papier mit Monochlorbenzol als Laufmittel gereinigt. Östron, Östradiol-17β (1,3,5(10)-Östratrien-3,17β-diol) und Östriol (1,3,5(10)-Östratrien-3,16α,17β-triol) wurden von Schering AG, Berlin, bezogen.

Reagenzien und Lösungsmittel

Alle organischen Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert; die verwendeten Reagenzien waren von p. a. Reinheitsgrad (Merck, Darmstadt).

Tiere und Gewebe

Als Versuchstiere dienten männliche Wistar-Ratten im Alter von 8—10 Wochen (Gewicht 300—350 g). Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet und die Lebern nach dem Ausbluten entnommen. Die Gewebsschnitte wurden nach DEUTSCH (2) hergestellt.

Inkubationsbedingungen

Die Inkubationsversuche wurden unter optimalen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Diese Reaktionsbedingungen waren in kinetischen Untersuchungen unter Berücksichtigung des pH-Wertes, der Inkubationsdauer, der Gewebemenge und der Substratmenge vorher ermittelt worden. Jeweils 100 µg [4-¹⁴C] Östron (0,2 µCi) wurden mit 100 mg Leberschnitten in 5,0 ml glucoselhaltigem (20 mmol/l) KREBS-RINGER-Phosphatpuffer, pH 7,4, bei 37°C 120 min in einem Schüttelthermostaten unter Luft inkubiert. Das Steroid wurde in Propylenglycol (4 mg/ml) den Inkubationsansätzen zugesetzt; die Endkonzentration von Propylenglycol betrug 0,5%.

Aufarbeitung der Versuchsansätze

Nach Beendigung der Versuche wurden die Inkubationsansätze dreimal mit je 10 ml wassergesättigtem Essigsäureäthylester extrahiert und die vereinigten Extrakte unter Stickstoff im Rotationsverdampfer eingedampft. Die Extraktreste wurden in 0,3 ml Methanol aufgenommen.

Papierchromatographie

Es wurde auf Schleicher-&-Schüll-Papier 2043b Mgl bei 25°C absteigend chromatographiert. Alle Trockenrückstände wurden zunächst der Chromatographie auf formamidimprägniertem Papier mit Monochlorbenzol unterworfen; die „Östriol“-Fraktion wurde auf formamidimprägniertem Papier mit Chloroform rechromatographiert. Die phenolischen Steroide, die als Testverbindungen dienten, wurden mit FOLIN-CROCALTEUS-Reagenz (3) sichtbar gemacht.

Quantitative Bestimmung

Die quantitative Bestimmung der phenolischen Steroide erfolgte auf den Papierchromatogrammen durch Messung der Radio-

aktivität mit einem Radiopapierchromatographen (Friesecke & Höpfner, Erlangen) unter Verwendung eines fensterlosen Methan-Durchflußzählers mit 4- π -Zählgeometrie (14% Zählbeute für ^{14}C). In einigen Vergleichsuntersuchungen wurde [4- ^{14}C]Östron von den Papierchromatogrammen eluiert und die methanolische Lösung zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 12 ml einer Szintillations-Lösung, enthaltend 5 g 2,5-Diphenyl-oxazol (PPO) und 0,3 g 1,4-Bis(4-methyl-5-phenyl-2-oxazolyl)-benzol (Dimethyl-POPOP)/l Toluol, gelöst und die Radioaktivität im Packard-Tri-Carb-Szintillations-Spektrometer (Modell 3003) unter Verwendung eines externen Standards gemessen. Die Zählbeute für ^{14}C betrug 80%.

Durchführung der Anaesthetie

Neuroleptanalgesie: Die Tiere erhielten zu Beginn der Narkose und nach 45 min intraperitoneal jeweils 0,02–0,03 mg/kg Körpergewicht Fentanyl (1-N-2-Phenaethyl-4-N-propionyl-anilinopiperidin-dihydrochlorid) und 1,25–1,50 mg/kg Körpergewicht Dehydrobenzperidol (1-[3-(4-Fluor-benzoyl)-propyl]-4-(2-oxo-1-benzimidazolyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridin). Neuroleptanalgesie bei gleichzeitiger Muskelrelaxation und Intubation eines $\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2$ -Gemisches: Neben den oben angegebenen Neuroleptanalgetica wurde den Tieren alle 15 min jeweils 1 mg/kg Körpergewicht Suxamethonium (Bernsteinsäure-bis-cholinester) intraperitoneal injiziert. Die vollständig relaxierten Tiere wurden mit einem Gemisch von $\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2$ (2,5:1) beatmet. Die Beatmung erfolgte nach Tracheotomie und Einsetzen eines kleinen Tubus mit Hilfe eines Narkoseapparates.

Alle Tiere wurden 120 min anaesthetisiert und anschließend sofort getötet.

Ergebnisse und Diskussion

Unter den hier gewählten Inkubationsbedingungen wurden im Mittel 60% der eingesetzten Menge von [4- ^{14}C]Östron durch Leberschnitte männlicher Wistar-Ratten metabolisiert (vgl. Tab. 1). Unter den Metaboliten wurden zwei Fraktionen papierchromatographisch nachgewiesen: [4- ^{14}C]Östradiol-17 β entstand zu etwa 3%, während die „Östriol“-Fraktion etwa 23% ausmachte. [4- ^{14}C]Östradiol-17 β war papierchromatographisch einheitlich und wurde nicht weiter identifiziert, zumal es sich bei diesem Reduktionsprodukt um einen bekannten Metaboliten von Östron handelt. Die „Östriol“-Fraktion enthält nach l. c. (1) 6 α -, 6 β -, 7 α -, 16 α - und 16 β -Hydroxyöstron, 6 α -, 6 β - und 7 α -Hydroxyöstradiol-17 β sowie 16-Epiöstriol. Auf eine vollständige Auftrennung der „Östriol“-Fraktion sowie die quantitative Bestimmung der einzelnen Metaboliten wurde verzichtet, da im vorliegenden

Zusammenhang die Gesamthydroxylierungsrate von Wichtigkeit war. Die an den zehn Kontrolltieren ermittelten quantitativen Ergebnisse für [4- ^{14}C]Östron, [4- ^{14}C]Östradiol-17 β und die „Östriol“-Fraktion stimmen im wesentlichen mit den Befunden früherer Arbeiten überein (4, 5).

Wie aus der Tabelle weiter hervorgeht, hatte eine Neuroleptanalgesie mit Thalamonal (Fentanyl und Dehydrobenzperidol) während zwei Stunden keinen erkennbaren Effekt auf den Umsatz von [4- ^{14}C]Östron sowie die Bildung von [4- ^{14}C]Östradiol-17 β und die Hydroxylierung der beiden Östrogene zu polaren Metaboliten. Auch unter den Bedingungen einer Neuroleptanalgesie in Kombination mit einem Muskelrelaxans und Beatmung mit $\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2$ (Dauer ebenfalls zwei Stunden) konnte keine Wirkung auf den Umsatz, die Reduktion und die Hydroxylierung von [4- ^{14}C]Östron nachgewiesen werden.

Die in der vorgelegten Arbeit angewandte Neuroleptanalgesie entspricht — auch in der Dosierung — der in der Humanmedizin üblichen Narkoseform (vgl. 6, 7). Wie bereits eingangs erwähnt, bestehen hinsichtlich des Intermediärstoffwechsels von Östrogenen zwischen der Rattenleber und der Leber des Menschen keine wesentlichen Unterschiede; die enzymatischen Reaktionen sind weitgehend identisch (vgl. 1). Diese Feststellung sowie die hier erhobenen Befunde lassen — bei aller gebotenen Vorsicht — den Schluß zu, daß der in-vitro-Stoffwechsel von Steroidhormonen in menschlichem Gewebe durch eine Anaesthetie nicht beeinflusst wird; infolgedessen dürfte die Aussagekraft von in-vitro-Versuchen durch die Tatsache, daß das Gewebe intra operationem entnommen wurde, nicht eingeschränkt sein. Abschließend sei erwähnt, daß TORNETTA und BOGER (8) beim Menschen 5 Tage nach einer Anaesthetie mit Fentanyl und Dehydrobenzperidol (INN: Droperidol) ebenfalls keine Veränderung verschiedener Leberfunktionsproben (z. B. alkalische Phosphatase, Lactatdehydrogenase, Aspartat- und Alanintransaminase sowie Bromsulphthaleintest) gefunden haben. Die häufig beobachtete Induktion von Leberenzymen durch Pharmaka (vgl. 9) scheint bei einer zeitlich begrenzten Narkose keine wesentliche Rolle zu spielen.

Tab. 1

Stoffwechsel von [4- ^{14}C]Östron in Leberschnitten normaler und unter verschiedenen Bedingungen anaesthetisierter männlicher Wistar-Ratten. Jeweils 100 μg [4- ^{14}C]Östron wurden mit 100 mg Leberschnitten in 5,0 ml glucosehaltigem KREBS-RINGER-Phosphatpuffer, pH 7,4, bei 37°C unter Luft 120 min inkubiert. Weitere Einzelheiten über die Anaesthetie und die Inkubationsversuche vgl. Methodik. Die Werte in der Tabelle sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von jeweils 10 Tieren; alle Bestimmungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. In Klammern sind die höchsten und niedrigsten Werte für die einzelnen Gruppen angegeben
 E_1 = [4- ^{14}C]Östron, E_2 = [4- ^{14}C]Östradiol-17 β , E_3 = „Östriol“-Fraktion (polare Metaboliten)

Experimentelle Bedingungen	Zahl der Tiere	E_1 umgesetzt μg	E_2 gebildet μg	E_3 gebildet μg
Kontrollen	10	60 \pm 9,8 (43–75)	3,0 \pm 1,1 (1,6–5,0)	23 \pm 4,2 (17–33)
Neuroleptanalgesie	10	56 \pm 8,1 (36–74)	3,4 \pm 1,2 (2,5–4,2)	19 \pm 3,5 (15–30)
Neuroleptanalgesie + Muskelrelaxans + $\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2$	10	64 \pm 7,0 (47–73)	3,1 \pm 1,1 (1,4–4,2)	18 \pm 5,7 (11–31)

Literatur

1. BREUER, H. & KNUPPEN, R. (1969), in: *Methods in Enzymology*, Vol. XV, ed. CLAYTON, R. B., Academic Press, New York, 691—735. — 2. DEUTSCH, W. (1936), *J. Physiol.* 87, 56 P. — 3. FOLIN, O. & CIOCALTEU, V. (1927), *J. Biol. Chem.* 73, 627—635. — 4. BREUER, H., NOCKE, L. & KNUPPEN, R. (1959), *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 315, 72—79. — 5. BREUER, H., NOCKE, L. & PANGELS, G. (1960), *Acta Endocrinol. (Copenhagen)* 34, 359—365. — 6. STÖCKER, L. (1967), *Narkose*, Thieme, Stuttgart. — 7. ALLGÖWER, M. (1971), *Allgemeine und spezielle Chirurgie*, Springer, Berlin-Heidelberg-New York. — 8. TORNETTA, F. J. & BOGER, W. P. (1964), *Anaesthesia and Analgesia — Current Researches* 43, 544—559. — 9. REMMER, H. (1972), *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 5, 116—136.

Prof. Dr. H. Breuer
Inst. für Klin. Biochemie
53 Bonn-Venusberg