

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 556—558, Juli 1969

Untersuchungen der Fructose-Phosphat-Aldolase¹⁾ bei experimenteller Leberschädigung an Ratten

II. Leberschädigung mit Diäthylnitrosamin

Von A. L. DIKOW und D. C. HADJIOLOV

Aus der Biochemischen Abteilung und der Abteilung für Experimentalkanzerogenese des Onkologischen Forschungsinstituts (Direktor: Prof. Dr. N. Antchew) Sofia/Bulgarien

(Eingegangen am 3. April 1969)

Verglichen werden die histochemischen Veränderungen der Aldolaseaktivität in der Leber mit der Gesamtaktivität und dem Isoenzymmuster der Serum- und Leberaldolase von Ratten, denen Diäthylnitrosamin verabreicht wurde.

Die Gesamt-Enzymaktivität im Serum steigt auf das Doppelte an und ist von einer Intensitätserhöhung einiger Isoenzymfraktionen sowie vom Auftreten neuer Fraktionen begleitet. Histochemisch werden wesentliche Veränderungen bei der Diformazanablagerung im Cytoplasma der Leberzellen beobachtet. In der Leber vermindert sich die Gesamt-Aldolaseaktivität, während das Verhältnis der Aktivitäten gegenüber FDP/FMP²⁾ ansteigt.

Diese Angaben zeigen eindeutig, daß Diäthylnitrosamin eine toxische Wirkung auf das Leberparenchym im Frühstadium der Kanzerogenese ausübt.

Studies on fructose phosphate aldolase during experimental liver damage in rats. II. Liver damage by diethylnitrosamine

Following the administration of diethylnitrosamine to rats, changes in the aldolase activity of the liver detected by histochemical methods were compared with the total activity and with the isoenzyme pattern of serum and liver aldolase.

The total enzyme activity of the serum was doubled. This increase was accompanied by an increase in the intensity of some isoenzyme fractions and by the appearance of new fractions. Histochemically, essential changes were observed in the deposition of diformazan in the cytoplasm of the liver cells. In the liver, the total aldolase activity decreased, while the ratio of activities against FDP/FMP increased. These data show clearly that diethylnitrosamine has a toxic effect on the liver parenchyma in the early stages of carcinogenesis.

Bei den Untersuchungen der Fructose-Phosphat-Aldolase im Serum von Ratten, denen 4-Dimethylaminoazobenzol verabreicht wurde, stellten wir wesentliche Veränderungen in der Gesamtaktivität und im Isoenzymmuster fest (1). Die Serum-Gesamtaldolaseaktivität steigt auf das Doppelte. Dies ist von der Intensitätserhöhung einzelner Isoenzymfraktionen vom Typ der Leber „B“ Aldolase begleitet. Diese Veränderungen und die Alterationen verschiedener anderer Gewebekonstituenten in der Leber sprechen für überwiegend dystrophische und nekrobiotische Prozesse in den frühesten Stadien der Kanzerogenese.

Unlängst wurde mitgeteilt, daß das starke Hepatokanzerogen Diäthylnitrosamin auf das Leberparenchym nicht toxisch wirkt (2).

Auf Grund unserer bisherigen Erfahrungen bei der Untersuchung der Wirkung von Azo-Farbstoffen stellten wir uns in dieser Arbeit die Aufgabe, die Aldolase-Gesamtaktivität und ihr Isoenzymmuster im Serum und im Leberparenchym von Ratten, denen Diäthylnitrosamin verabreicht wurde, zu untersuchen.

Material und Methoden

Die Versuche wurden an männlichen Albinoratten von 140 bis 160 g Gewicht durchgeführt. Die Tiere bekamen täglich im Trinkwasser 1 mg Diäthylnitrosamin 6mal in der Woche. Die Kontrolltiere wurden unter gleichen Bedingungen gehalten, er-

hielten jedoch kein Kanzerogen. Am 30. und 60. Tage nach Versuchsbeginn wurden die Tiere in Gruppen zu je 10 durch die A. femoralis entblutet. Das Blutserum wurde zur Untersuchung der Aldolase-Gesamtaktivität und des Isoenzymmusters nach dem von uns beschriebenen Verfahren (3) benutzt. Die Leber wurde unter Beigabe des gleichen Vol. Tris-EDTA-Borsäure Puffer pH 8,9 homogenisiert. Das Homogenat wurde 1 Std. bei 30 000 g² zentrifugiert. Nach früherer beschriebenem Verfahren (4) wurde im klaren Überstand die Aldolase-Gesamtaktivität gegenüber Fructose-1,6-diphosphat und Fructose-1-phosphat sowie das Isoenzymmuster der Aldolase bestimmt. Wir benutzten Kryostatschnitte zur histochemischen Manifestierung der Fructose-Phosphat-Aldolase nach dem Verfahren von WEGMANN und NEPVEUX (5) unter Zugabe von Na₂HAsO₄ ins Inkubationsmedium.

Ergebnisse

Am 30. Tage nach Versuchsbeginn zeigt die *histologische Untersuchung* Erscheinungen einer anfänglichen Chromatolyse in der zentralen Läppchenregion. Am 60. Tage umfaßt dieser Vorgang diffus das Leberparenchym. Eine große Anzahl der Hepatocyten unterliegt der sog. „blasigen Entartung“.

Bei den Kontrolltieren äußert sich die Aldolaseaktivität histochemisch im Cytoplasma der Leberzellen durch fein granulierte Diformazanablagerungen, die höchstwahrscheinlich auf die mitochondriale Lokalisation des Reaktionsproduktes zurückzuführen sind, da das Enzym indirekt nachweisbar ist (5).

Bereits am 30. Tage nach Versuchsbeginn konnte im Cytoplasma der Leberzellen der mit Diäthylnitrosamin gefütterten Ratten, vorwiegend zentrolobulär und inter-

¹⁾ Fructose-Phosphat-Aldolase: EC 4.1.2.7 u. EC 4.1.2.13

²⁾ Abkürzungen: FDP = Fructose-1,6-diphosphat
FMP = Fructose-1-phosphat.

mediär, eine intensivere Diformazanablagerung beobachtet werden.

Im Vergleich zu den Kontrollschnitten ist die Ablagerung in einzelnen Zellen oder Zellgruppen im Cytoplasma gröber, wobei einzelne Granula größer sind oder konfluieren. Manchmal schwinden auch die Kernkonturen, und die ganze Zelle füllt sich mit Diformazanablagerungen. Dieser Prozeß hält bis zum 60. Tage an, bei dem im Cytoplasma der Leberzellen grobe Diformazanablagerungen diffus festgestellt werden (Abb. 1 u. 2).

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der Bestimmung der Aldolase-Gesamtaktivität im Serum und der Leber bei Kontroll- und Versuchstieren dargestellt.

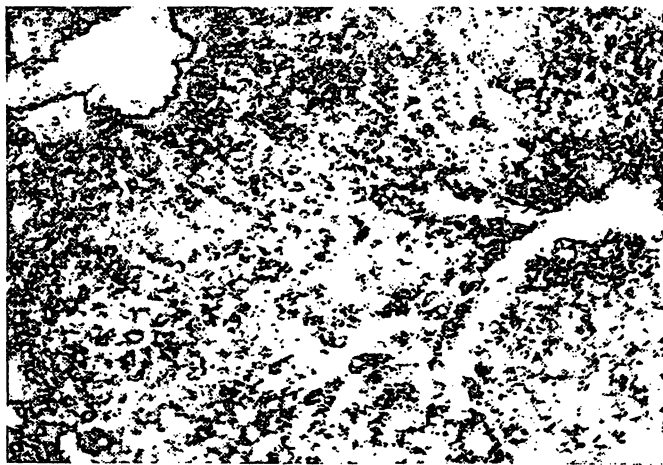


Abb. 1

Fructose-Phosphat-Aldolaseaktivität in der Rattenleber am 60. Tage nach Verabreichung von Diäthylnitrosamin (Substrat: Fructose-1,6-diphosphat). Vergr. 100fach

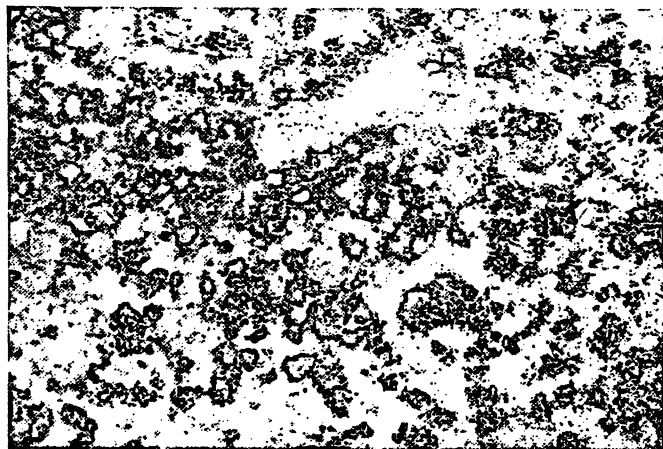


Abb. 2

Grobe Diformazanablagerungen im Cytoplasma der Leberzellen. An einigen Stellen fehlt die Cytoplasmaenzymaktivität (Detail von Abb. 1). Vergr. 200fach

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß die Aktivität im Serum der mit Diäthylnitrosamin gefütterten Ratten bereits am 30. Tage auf das Doppelte ansteigt. Diese Veränderungen persistieren während der ganzen Untersuchungszeit. Im Leberparenchym vermindert sich die Aldolase stark gegenüber FDP und FMP, wobei sich

Tab. 1

Aldolase-Gesamtaktivität im Serum der Kontroll- und Versuchstiere in mU/ml und in der Leber in μ Mol FDP oder FMP pro mg Gewebe-eiweiß und 1 Min. bei 37° sowie das Verhältnis der Aktivitäten gegenüber den beiden Substraten (Mittelwerte aus 10 Bestimmungen).

Ratten	Aldolaseaktivitäten im Serum	Aldolaseaktivität in der Leber		
		FDP ¹⁾	FMP ¹⁾	FDP/FMP ¹⁾
Kontrolltiere	56,46	0,93	0,83	1,12
Versuchstiere 30. Tag	106,92	0,47	0,27	1,74
Versuchstiere 60. Tag	112,59	0,36	0,24	1,50

das Verhältnis der Aktivitäten gegenüber beiden Substraten zugunsten des FDP verändert.

Das Isoenzymmuster der Serumaldolase der Kontrolltiere (Abb. 3a) besteht aus 5—6 Isoenzymfraktionen — 2 kathodische und 4 anodische, die schwach intensiv sind. Nur die anodisch bei der Startlinie liegende Fraktion tritt deutlich hervor. Am 30. und besonders am 60. Tage (Abb. 3b, c) beobachtet man bei den Versuchstieren wesentliche Veränderungen. Die Intensität der bei der Startlinie liegenden Fraktion steigt auf ein Mehrfaches an. Von erhöhter Intensität ist auch die Isoenzymfraktion, die sich in der Mitte — zwischen der Startlinie und dem anodischen Ende des Enzymogramms — befindet. Zwischen diesen Fraktionen treten 2 neue hervor, von denen die eine bedeutend intensiver ist (Abb. 3c). Beide kathodischen Fraktionen sind deutlich abgesondert und intensiver, besonders jene, die näher bei der Startlinie liegt. Das Isoenzymmuster der Leberaldolase der Kontrollen (Abb. 4a) besteht aus 2 kathodischen Fraktionen von sehr hoher Intensität und aus 7—8 anodischen Fraktionen. Die nahe bei der Startlinie liegenden anodischen Fraktionen sind ziemlich intensiv, und die weiter entfernten besitzen eine schwächere Intensität. Bei den mit Diäthylnitrosamin gefütterten Ratten werden keine wesentlichen Veränderungen nachgewiesen, mit Ausnahme der erhöhten Intensität von 2 der anodischen Fraktionen, die nahe bei der Startlinie liegen. Eine von ihnen verschwindet fast (Abb. 4b).

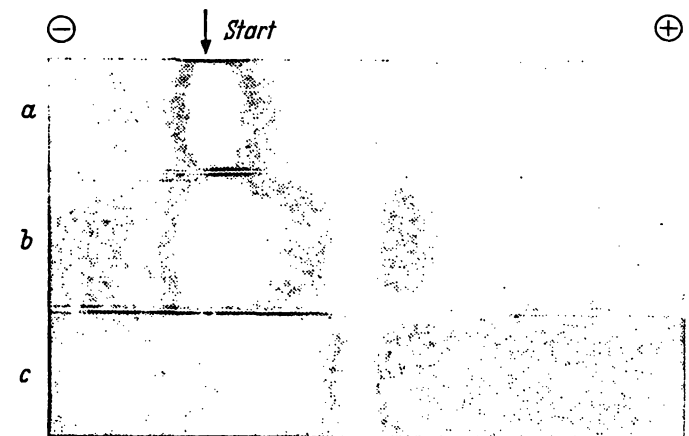


Abb. 3

Isoenzymmuster der Fructose-Phosphat-Aldolase im Rattenserum:
 a) bei Kontrolltieren
 b) am 30. Tage und
 c) am 60. Tage nach der Verabreichung von Diäthylnitrosamin

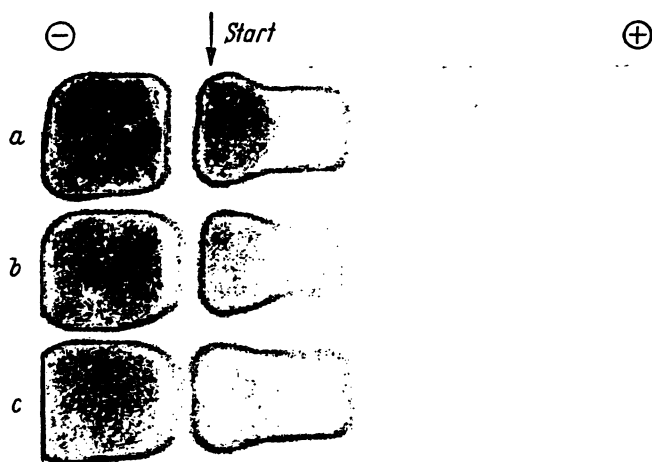


Abb. 4

Isoenzymmuster der Fructose-Phosphat-Aldolase in der Rattenleber:
 a) bei Kontrolltieren
 b) am 30. Tage und
 c) am 60. Tage nach Verabreichung von Diäthylnitrosamin

Diskussion

Im Gegensatz zu einigen Beobachtungen über die niedrige Toxizität von Diäthylnitrosamin zeigen die unsererseits gewonnenen Ergebnisse, daß sich in der Leber vom 30. bis 60. Tage des Versuches progressive Veränderungen entwickeln, einschließlich sog. blasiger Entartung der Leberzellen. Ähnlich wie bei unseren Erfahrungen mit 4-Dimethylaminoazobenzol, sind die alternativen Prozesse von wesentlichen Veränderungen in den

Membranstrukturen der Zelle begleitet, welches zu groben Diformazanablagerungen bei der histochemischen Demonstration des Enzyms führt. Dies könnte man als einen Anstieg der Enzymaktivität betrachten. Die Veränderungen der Gesamtaktivität der Leberaldolase bei den mit Diäthylnitrosamin gefütterten Tieren, die in einer starken Verminderung der Enzymaktivität, insbesondere gegenüber des FMP bestehen, stehen im Gegensatz dazu. Der Anstieg der Gesamtaktivität der Serumaldolase auf das Doppelte bei den Versuchstieren (im Vergleich zu den Kontrollen), spricht für einen Enzymaustritt in das Blut infolge der toxischen Parenchymschädigung. Diese Ansicht wird durch die Veränderungen im Verhältnis der Enzymaktivität gegenüber beiden Substraten (FDP/FMP) unterstützt, welches 1,74 erreicht und auf eine Störung des spezifischen Stoffwechsels der Fructose in der Leber hinweist. Die veränderten und neu hervorgetretenen Fraktionen im Isoenzymmuster der Serumaldolase bei den Versuchstieren entsprechen nach ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit den Fraktionen der normalen Leber und sind vom Typ der Leber „B“ Aldolase. Die gewonnenen Ergebnisse nach der Untersuchung der Leberaldolase an Ratten, denen Diäthylnitrosamin verabreicht wurde, bestätigen unsere vorhergehenden Beobachtungen (1,6) über die Entwicklung der verbreiteten alternativen und nekrobiotischen Veränderungen im Leberparenchym im Frühstadium der Kanzerogenese.

Literatur

1. DIKOW, A. L. und D. C. HADJIOLOV, diese Z., 7, 160 (1969). —
2. MACEE, P. N., Mechanism of Biological Action of Dimethylnitrosamine (Discussion) in „Alkylierend wirkende Verbindungen“, Hamburg (1963). —
3. DIKOW, A. L., diese Z. 6, 386 (1968). —
4. DIKOW, A. L. und V. GENOWA, diese Z. 7, 155 (1969). —
5. NEPVEUX, P. und R. WEGMANN, Ann. Histochem., 10, 177 (1965). —
6. HADJIOLOV, D. C., Neoplasma, 15, 399 (1968).

Dr. A. L. Dikow
 Boul. Christo Botew 14
 Sofia, Bulgarien