

# DIE AKTIVITÄT DER PROKAINSPALTENDEN ESTERASE\* IN DER LEBER UND IM SERUM DER RATTE NACH CCl<sub>4</sub> UND HALOTHAN

I. HEINRICH und W. KLINGER

Aus dem Institut für Pharmakologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena

(Received 24 July 1967; accepted 11 October 1967)

**Zusammenfassung**—(1) Die PE-Aktivität wird nach Leberschädigung durch CCl<sub>4</sub> in der Leber vermindert und im Serum erhöht. (2) Halothan (1,5 Vol %) verursacht nach 4-stündiger Narkose keine signifikante Veränderung der PE-Aktivität in der Leber und im Serum. Nach fünf und elf 4-stündigen Halothannarkosen in Tagesabständen wird in der Leber eine verminderte Aktivität nachgewiesen, im Serum zeigt sich keine Änderung.

(3) Halothan verursacht nach Vorschädigung mit CCl<sub>4</sub> eine geringe, nicht signifikante Verminderung der PE-Aktivität in der Leber.

(4) Die pH-Aktivitätskurve zeigt bei normalen und CCl<sub>4</sub>-geschädigten Ratten im Leberhomogenat Unterschiede. Die pH-Aktivitätskurve der Seren ist identisch.

## EINLEITUNG

DER VERDACHT einer leberschädigenden Wirkung des Halothans wurde von zahlreichen Klinikern ausgesprochen<sup>1-5</sup>. Gezielte tierexperimentelle Untersuchungen liegen jedoch nur wenige vor.<sup>6-8</sup>

Nach Hazard und Mitarb,<sup>9</sup> Czyzyk<sup>10</sup> und Fischer<sup>11</sup> ist die Bestimmung der PE-Aktivität, die nach Remmer,<sup>12</sup> Benöhr und Mitarb<sup>13</sup> und Heinrich und Mitarb<sup>14</sup> im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist, ein empfindlicher Test zum Nachweis einer Leberschädigung.

Es ist bemerkenswert, daß die PE als mikrosomales Leberenzym auch unter normalen Bedingungen beim Menschen und bei der Maus im Plasma vorkommt<sup>10, 11, 15</sup>. Unter Berücksichtigung dieser Befunde wurde die PE als Indikator einer möglichen Leberschädigung nach Halothan für geeignet gehalten. Wir untersuchten in der Leber und im Serum von Ratten:

- (1) die PE-Aktivität nach einer Leberschädigung; als Schädigungsmodell wählten wir die CCl<sub>4</sub> Schädigung,
- (2) den Einfluß ein- und mehrmaliger Halothan-Narkosen auf die PE-Aktivität,
- (3) die PE-Aktivität nach Halothan und Vorschädigung mit CCl<sub>4</sub>, da Pichlmayr und Mitarb<sup>16</sup> vermuten, daß besonders dann eine Leberschädigung durch Halothan

\* Prokainspaltende Esterase = PE.

Für die Durchführung der Halothan-Narkosen danken wir Herrn Dr. Dr. H. Laube, Anästhesie-Abteilung der Chirurgischen Klinik der Friedrich-Schiller-Universität.

ausgelöst werden könnte, wenn eine bereits vorgeschädigte oder durch andere Faktoren zusätzlich belastete Leber vorliegt, und

(4) die pH-Abhängigkeit der PE-Aktivität bei normalen und geschädigten Ratten.

## METHODIK

### Tiermaterial

Zur Untersuchung wurden geschlechtsreife weibliche Wistar-Ratten (KG 150–230 g) aus der Koloniezucht des VEB Jenapharm eingesetzt. Die Tiere erhielten ein Nährkonzentrat (Arbeitsgruppe für Versuchstierzucht, Berlin), Körnerfutter und Wasser ad libitum.

### Versuchssubstanzen

$\text{CCl}_4$  reinst, appliziert als Mischung 1 Volumenteil  $\text{CCl}_4$  und 7 Volumenteile Erdnußöl.

Halothan: 1,1,1-Trifluor-2-brom-2chloräthan (VEB Arzneimittelwerk Dresden). Prokainhydrochlorid (VEB Jenapharm).

### Schädigung mit $\text{CCl}_4$

Die Tiere wurden mit 0,5 ml bzw. 2,5 ml/kg KG  $\text{CCl}_4$  i.p. geschädigt. Der Zeitpunkt der PE-Aktivitätsbestimmung wurde variiert (siehe Ergebnisse). Die Kontrolltiere erhielten gleiche Volumina Erdnußöl i.p.

### Narkose mit Halothan

Die Versuchstiere wurden einem Narkosegasgemisch von Sauerstoff/Lachgas 1:1 als Trägergas plus 1,5 Vol % Halothan unter Verwendung des Fluotec Mark II ausgesetzt. Die Ratten befanden sich in Gruppen von 5–8 Tieren in Glasgefäßen, die mit 4 l/min Narkosegas durchströmt wurden. Der Versuch wurde bei 28°C durchgeführt. Die Kontrollgruppen wurden unter den gleichen Bedingungen in Luft gehalten. Nach einem deutlichen Exzitationsstadium kamen die Tiere nach 10–15 min in Seitenlage. Nach Beendigung der Narkose erhielten die Tiere eine 5 min dauernde Sauerstoffdusche und erwachten innerhalb 10 min.

Die jeweils 4-stündige Halothan-Narkose erfolgte 1,5 und 11 mal an aufeinanderfolgenden Tagen sowie nach Vorschädigung mit 0,5 ml/kg KG  $\text{CCl}_4$  i.p.

### Bestimmung der PE-Aktivität

Die Bestimmung der Enzymaktivität im Leberhomogenat und Serum erfolgte unmittelbar nach Dekapitierung der Tiere in Äthernarkose. Als Maß der Prokainspaltung wurde nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C und pH 7,4 die *p*-Aminobenzoësäure kolorimetrisch bestimmt. Die Methode wurde bereits beschrieben.<sup>14</sup>

### Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Die Aktivität der PE wird in  $\mu\text{Mol}$  hydrolysiertes Prokain/g Leberfeuchtgewicht bzw. ml Serum für jeweils 2 Stunden angegeben. Der vergleichsweise Bezug der PE-Aktivität normaler und halothanbehandelter Ratten auf Feuchtgewicht, Trocken Gewicht, Eiweißgehalt oder Gesamtlebergewicht ergab keine wesentlichen Unterschiede (siehe Tab. 1). Alle Ergebnisse werden mit arithmetischem Mittel und Standardfehler angegeben. Signifikanz wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P \leq 0,05$  angenommen.

TABELLE 1. PE-AKTIVITÄT IN DER LEBER NORMALER UND HALOTHANBEHANDELTER RATTEN, BERECHNET AUF VERSCHIEDENE BEZUGSGRÖßen

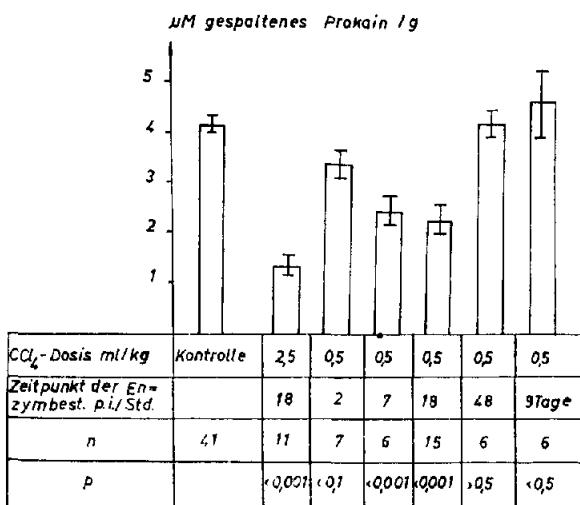
	n	/g Feuchtgewicht	/g Trockengewicht	/g Eiweiß	/Gesamtleber
Kontrolle	4	4,9 ± 0,77	16,10 ± 2,6	23,70 ± 3,5	37,33 ± 8,0
Halothan	7	3,0 ± 0,29 ≤ 0,02	9,24 ± 0,88 ≤ 0,02	17,0 ± 1,2 ≤ 0,05	19,61 ± 1,72 ≤ 0,02
P					

Aktivitätsangabe in  $\mu\text{M}$  gespaltenes Prokain/Bezugsgröße als  $\bar{X} \pm s\bar{x}$ 

## ERGEBNISSE

PE-Aktivität bei normalen und  $\text{CCl}_4$ -geschädigten Ratten

Bei der normalen Ratte wurde in der Leber eine durchschnittliche PE-Aktivität von  $4,16 \mu\text{mol/g}$  Feuchtgewicht/2 Stunden gemessen, im Serum nur eine sehr geringe Aktivität von  $0,08 \mu\text{Mol/ml}$ /2 Stunden. Nach Schädigung mit  $\text{CCl}_4$  zeigt sich eine Verminderung der PE-Aktivität in der Leber, verbunden mit einem Anstieg der Aktivität im Serum. Besonders deutlich wird diese Wirkung 18 Stunden nach einer Dosis von  $2,5 \text{ ml/kg KG } \text{CCl}_4$ . Nach  $0,5 \text{ ml/kg KG } \text{CCl}_4$  wurde die PE-Aktivität in verschiedenen Zeitabständen nach der Schädigung untersucht. Das Maximum der Aktivitätsänderungen konnte nach 18 Stunden ermittelt werden. Nach 48 Stunden waren die PE-Werte wieder im Normbereich. Die Ergebnisse sind in den Abb. 1 und 2 dargestellt.

ABB. 1. PE-Aktivität in der Rattenleber nach  $\text{CCl}_4$ . Angabe: arithmetisches Mittel und Standardfehler. Signifikanzprüfung gegen Kontrolle.

## PE-Aktivität nach Halothan-Narkosen

Nach Halothan-Narkosen konnten keine Veränderungen der PE-Aktivität im Serum nachgewiesen werden. Nach fünf 4-stündigen Halothan-Narkosen an aufeinanderfolgenden Tagen kommt es in der Leber zu einem signifikanten Aktivitätsverlust (siehe Tab. 2).

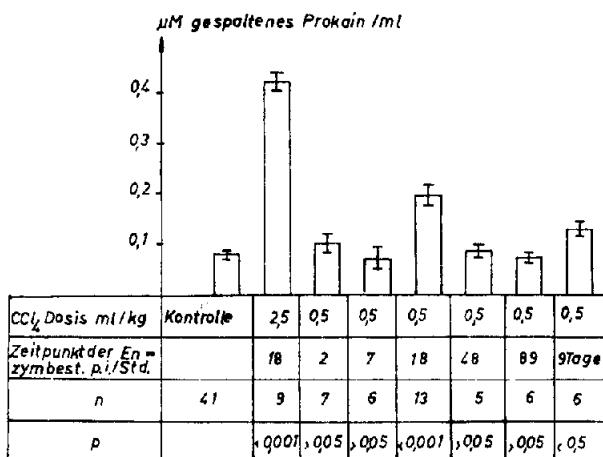


ABB. 2. PE-Aktivität im Rattenserum nach CCl<sub>4</sub>. Angabe: arithmetisches Mittel und Standardfehler. Signifikanzprüfung gegen Kontrolle.

#### PE-Aktivität nach Halothan- und CCl<sub>4</sub>-Vorschädigung

Für die Vorschädigung der Leber wählten wir die CCl<sub>4</sub>-Dosis von 0,5 ml/kg KG, die die PE-Aktivität nicht maximal verändert und es ermöglicht, eine zusätzliche Leberschädigung durch Halothan zu erfassen. Auf dem Höhepunkt der CCl<sub>4</sub>-Schädigung erhielten die Tiere eine 4-stündige Halothan-Narkose. Die Ergebnisse zeigt die Tab. 2. Es konnten keine signifikanten Veränderungen gegenüber den nur mit CCl<sub>4</sub> geschädigten Ratten festgestellt werden.

#### pH-Aktivitätskurven der PE bei normalen und geschädigten Ratten

Zur näheren Charakterisierung der PE wurden in der Leber und im Serum normaler und CCl<sub>4</sub>-geschädigter Ratten pH-Aktivitätskurven bestimmt.

Die nichtenzymatische, mit steigendem pH-Wert erhöhte Procainhydrolyse wurde in Parallelversuchen ermittelt und abgezogen (siehe Abb. 3 und 4). Die pH-Abhängigkeit der PE-Aktivität im Leberhomogenat normaler und geschädigter Ratten ist unterschiedlich. Das pH-Maximum der Aktivität in der geschädigten Leber ist weiter ins Alkalische verschoben und liegt im Bereich des Minimums der Kontrolle. Im Serum verlaufen die Kurven gleichsinnig.

#### DISKUSSION

Am endoplasmatischen Retikulum ist die hepatotoxische Wirkung von halogenierten Kohlenwasserstoffen besonders früh nachweisbar<sup>17-21</sup>.

Neubert und Mitarb<sup>22</sup> fanden nach experimenteller Leberschädigung einen herabgesetzten Aminophenazonabbau durch die Lebermikrosomenfraktion.

In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen von Netter<sup>19</sup> und Fischer<sup>11</sup> konnten wir bei der Ratte nur eine sehr geringe PE-Aktivität im Serum feststellen. Die Erhöhung im Serum nach CCl<sub>4</sub>-Schädigung läßt vermuten, daß das Enzym aus der Leber stammt, da bei den verwendeten CCl<sub>4</sub>-Dosen bisher keine extrahepatischen Schäden beobachtet wurden<sup>24</sup> und die PE-Aktivität zum Zeitpunkt der stärksten Erhöhung im Serum in der Leber am geringsten ist.

Netter<sup>23</sup> konnte allerdings in fermentkinetischen Untersuchungen nachweisen, daß die PE der Leber und im Plasma bei Mäusen nicht identisch sind und vermutet,

TABELLE 2. AKTIVITÄT DER PE IN DER LEBER UND IM SERUM BEI KONTROLL-RATTEN, HALOTHAN- UND CCL<sub>4</sub>-BEHANDELTE RATTEN

Substanz	Dosis	Häufigkeit d. Behandlung	Narkose- dauer in Stunden	Zeit von Behandlungs- beginn b.z. Enzymbest.	Leber			Serum			
					KG	μMol/g Frischg.	n	p	μMol/ml	n	p
Kontrolle					221 ± 5	4,16 ± 0,18	41		0,08 ± 0,01	41	—
Halothan	1,5Vol%	1	4	4 Stunden	200 ± 10				0,08 ± 0,03	6	>0,05
Halothan	1,5Vol%	1	4	6 Stunden	176 ± 5	3,28 ± 0,42	6	<0,1	0,12 ± 0,02	6	<0,25
Halothan	1,5Vol%	5	4	5 Tage*	181 ± 3	3,04 ± 0,25	7	<0,01	0,07 ± 0,03	7	>0,05
Halothan	1,5Vol%	11	4	11 Tage*	190 ± 5	2,93 ± 0,25	†4	<0,05	0,07 ± 0,01	†4	>0,05
CCl <sub>4</sub>	0,5ml/kg	1		18 Stunden	211 ± 24	2,28 ± 0,23	15	<0,001	0,20 ± 0,02	13	<0,001
CCl <sub>4</sub>	0,5ml/kg	1	4	20 Stunden	204 ± 9	1,72 ± 0,19	11	†	0,23 ± 0,02	11	†
Halothan	1,5Vol%	1									

Anggeben sind  $\bar{X} \pm s$   
Signifikanzprüfung gegen Kontrolle

\* Enzymbestimmung unmittelbar nach der letzten Halothan-Narkose

† 4 Tiere gestorben

‡ Signifikanzprüfung gegen CCl<sub>4</sub>-Kontrolle

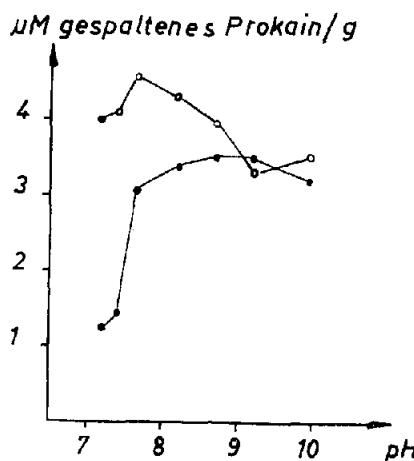


ABB. 3. Aktivitäts-pH-Kurve der PE im Leberhomogenat. Kontrolle ○—○; CCl<sub>4</sub>-Ratten ●—● Zur Bestimmung wurden Homogenate von 4 Lebern gemischt.

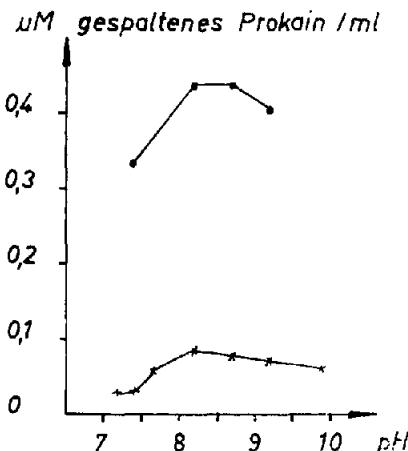


ABB. 4. Aktivitäts-pH-Kurven der PE im Serum. Kontrolle ×—×; CCl<sub>4</sub>-Ratten ●—● Zur Bestimmung wurden Seren von 4 Tieren gemischt.

daß das Enzym bei seiner Abgabe aus der Leberzelle in das Plasma noch verändert wird oder daß es möglicherweise noch andere Bildungsorte für die PE außerhalb der Leber gibt.

*In einigen Arbeiten wird die PE der Gruppe der Pseudocholinesterasen zugeschrieben.*<sup>25, 26</sup>

Die Pseudocholinesterasen sind im Bericht der Enzymkommission<sup>27</sup> mit dem Systemnamen Acylcholin-acylhydrolase (Trivialnamen Cholinesterase) getrennt von der Benzoylcholinhydrolase aufgeführt. Die PE wurde als ein selbständiges Enzym nicht gennant. In der Literatur wird diese scharfe Trennung jedoch nicht immer angewandt und die Benzoylcholinesterase z. B. den Pseudocholinesterasen zugeordnet.<sup>4, 28</sup> Nimmt man an, daß die PE eine Pseudocholinesterase ist, so müßte man gleiche Veränderungen der Pseudocholinesterase und der PE nach einer Leberschädigung erwarten, vorausgesetzt, daß sich die  $K_M$  vor und nach der Schädigung nicht ändern.

In Untersuchungen an Ratten wurden jedoch die Cholinesterase-Aktivitäten nach  $CCl_4$ -Schädigung in der Leber und im Serum erniedrigt gefunden.<sup>24</sup> Zum Unterschied zur PE ist bei normalen Ratten außerdem eine höhere Aktivität der Cholinesterase nachweisbar,<sup>11, 24</sup>

Fischer<sup>11</sup> beobachtete bei  $CCl_4$ -behandelten Ratten (5–10 ml/kg KG s.c., 24–48 Stunden) ebenfalls erniedrigte PE-Aktivitäten in der Leber, jedoch unveränderte Werte im Serum. Andere Ergebnisse erhielten Brauer und Mitarb<sup>20</sup> in Untersuchungen an *Hunden*. Sie fanden nach einer  $CCl_4$ -Schädigung eine deutliche Erhöhung der Serumcholinesterase bei gleichzeitig erniedriger Leberaktivität. In Untersuchungen an *Menschen* konnte man übereinstimmend erniedrigte Aktivitäten der Pseudocholinesterase bei Leberkrankheiten nachweisen.<sup>30, 4</sup> Strehler und Mitarb<sup>31</sup> und Mann<sup>23</sup> berichten von einem Anstieg der Serum-Cholinesterase-aktivität in der Restitutionsphase nach Hepatitis. Vergleichende Untersuchungen der PE- und der Cholinesterase-Aktivität bei leberkranken Patienten zeigten ein gleichsinniges Verhalten. Sowohl in der Leber als auch im Serum konnte eine Verminderung festgestellt werden.<sup>9, 10, 11</sup> Erhöhte Aktivitäten im Serum sind nur wenige beschrieben. Hazard<sup>9</sup> fand neben überwiegend erniedrigten auch vereinzelt erhöhte PE-Aktivitäten bei leberkranken Patienten.

Nach den dargestellten Befunden bei verschiedenen Spezies ist die Zuordnung der PE zur Gruppe der Pseudocholinesteren problematisch, es sei denn, man würde eine unterschiedliche Veränderung der  $K_M$  für Prokain und andere Substrate der Pseudocholinesterase unter Schädigungsbedingungen annehmen. Derartige Beobachtungen liegen für andere Mikrosomenenzyme nach einer Leberschädigung vor.

Börnig<sup>33</sup> beschreibt z.B. eine erniedrigte  $K_M$  der Glucose-6-phosphatase nach einer  $CCl_4$ -Einwirkung, Netter<sup>23</sup> beobachtete eine veränderte  $K_M$  für Mäuseleber-Mikrosomen nach Solubilisierung mit Desoxycholat. In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen von Kekwick<sup>34</sup> interessant, der bei Vergleich der Hydrolyserate verschiedener Substrate in Seren Hepatitiskranker undges unter Menschen Unterschiede feststellte. Seren gesunder Menschen hydrolysierten am stärksten Butyrylcholin, Seren Hepatitiskranker dagegen Propionylcholin.

Krisch<sup>35</sup> hat an einer isolierten mikrosomalen Schweineleberesterase nachgewiesen, daß Lebermikrosomen nur eine einzige einheitliche Leberesterase enthalten, die verschiedene Substrate mit unterschiedlichen Affinitäten zu hydrolyseren vermag. Das unterschiedliche Verhalten der Aktivitäten von PE und Pseudocholinesterasen unter Schädigungsbedingungen und der Befund von Krisch lassen sich nur unter der Annahme einer unterschiedlichen Veränderung der  $K_M$  nach einer Schädigung in Übereinstimmung bringen.

Der Nachweis unterschiedlicher pH-Abhängigkeiten der PE-Aktivität weist auf eine Veränderung des Enzyms selbst in unseren Versuchen bei normalen und geschädigten Tieren hin.

*Die geringe Dosis von 0,5 ml/kg KG  $CCl_4$  führt zu deutlichen Veränderungen typischer Leberenzyme.<sup>36, 20</sup>*

Auch die PE-Aktivität in der Leber und im Serum zeigt deutliche Veränderungen bei dieser Dosis. Die Bestimmung der PE-Aktivität kann daher als ein empfindlicher Leberschädigungstest nach  $CCl_4$  betrachtet werden, wobei die PE-Aktivitätsveränderungen in der Leber die im Serum übertreffen.

Die in unserer Versuchsanordnung unveränderten PE-Aktivitäten nach einmaliger Halothan-Narkose sprechen gegen eine Leberschädigung. Dagegen können die Werte nach 5- und 11- maliger Narkose als Zeichen einer Leberschädigung gewertet werden.

#### LITERATUR

1. M. S. SADOVE und V. E. WALLACE, *Halothane*. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1962).
2. H. AFFOLTER, G. HARTMANN, V. KAMPFHAMMER und S. SCHEIDECKER, *Schweiz. med. Wschr.* **94**, 396 (1964).
3. C. MÖRGENSTERN, J. HAUMANN, L. COSSEL, B. WOHLGEMUT und D. KUNZE, *Arzneimittel-Forsch.* **15**, 349 (1965).
4. H. J. KLUGMANN und K. HAMBSCH, *Dts. Gesundh. wes.* **20**, 569 (1965).
5. O. KLINGE, *Klin. Wschr.* **43**, 1042 (1965).
6. *Leberfunktion und postoperativer Eingriff, Anaesthesia-Tagung in Heidelberg*. George Thieme, Stuttgart (1964).
7. O. SCHIMASSEK, W. KUNZ und H. J. GALLWITZ, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **251**, 195 (1965).
8. K. L. SCHOLLER, *Der Anaesthesist* **15**, 145 (1966).
9. R. HAZARD und A. LAFITTE, *Presse méd.* **61**, 285 (1953).
10. A. CZYZYK, *Z. ges. inn. Med.* **11**, 1085 (1956).
11. A. FISCHER, L. PERENYI und S. RHONY, *Acta Med. Acad. Sci. hung.* **12**, 229 (1958).
12. H. REMMER, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **238**, 36 (1960).
13. H. C. BENÖHR, W. FRANZ und K. KRISCH, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak.* **225**, 163 (1966).
14. I. HEINRICH und W. KLINGER, *Acta biol. med. germ.* **20**, 55 (1968).
15. K. J. NETTER, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **235**, 498 (1959).
16. I. PICHLMAYR, *Der Anaesthesist* **13**, 293 (1964).
17. H. BÖRNIG, *Habilitationsschrift der Med. Fak. Univ. Jena* 1961.
18. G. RICHTER, *Habilitationsschrift der Med. Fak. Univ. Jena* (1961).
19. G. L. PLAA und R. E. LARSON, *Archs envir. Hlth* **9**, 536 (1964).
20. T. F. SLATER, *Nature, Lond.* **209** 36 (1966).
21. H. FRUNDER, *3. Gesamittagung der Ges. f. exp. Med. d. DDR* 20. in Leipzig (1966).
22. D. NEUBERT und D. MAIBAUER, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak.* **235**, 291 (1959).
23. K. J. NETTER und G. SEIDEL, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **246**, 486 (1964).
24. R. W. BRAUER und M. A. ROOT, *J. Pharmac. exp. Ther.* **88**, 109 (1946).
25. W. KALOW, *J. Pharmac. exp. Ther.* **104**, 122 (1952).
26. O. GOMORI, *Am. J. clin. path.* **24**, 99 (1954).
27. *Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry, J.U.B. Symposium Series 20*. Pergamon Press, Oxford (1961).
28. J. G. LIDDEL, E. NEWMAN und D. F. BROWN, *Nature, Lond.* **198**, 1090 (1963).
29. R. W. BRAUER und M. A. ROOT, *Am. J. Physiol.* **149**, 611 (1947).
30. W. LANG und G. INTSELULOGLU, *Klin. Wschr.* **40**, 312 (1962).
31. E. STREHLER und H. MEYER, *Helv. med. Acta* **19**, 555 (1952).
32. J. D. MANN, W. J. MANDEL, P. L. EICHMAN, M. A. KNOWLTON und V. M. SBOROV, *Am. J. Lab. clin. Med.* **39**, 543 (1952).
33. H. BÖRNIG, A. HORN und V. MÜCKE, *Acta biol. med. germ.* **9**, 623 (1962).
34. B. G. KEKWICK, *Biochem. J.* **76**, 420 (1960).
35. K. KRISCH, *Biochem. Z.* **337**, 546 (1963).
36. F. H. BRUNS und W. WOLLENWEBER, *Klin. Wschr.* **40**, 995 (1962).