

Changes in Dry Mass of Rat Liver Nuclei in Chronic Thioacetamide Poisoning

Liver injury induced by thioacetamide (TAA) was first demonstrated by FITZHUGH and NELSON¹ in 1948. Among the main events detected since then in liver cells after TAA poisoning, an increase of the size of the nuclei has been reported to occur (RATHER²). In this connection, an increased amount of ribonucleoproteic material has been demonstrated in these nuclei (LAIRD³); nevertheless, the role played by the nuclear water content is not well known (BADER et al.⁴).

The present preliminary report deals with the modifications induced by TAA on the volume and dry mass of liver nuclei and on the ratio of their water soluble/insoluble material.

Material and methods. Female Sprague-Dawley rats, 5 months old, weighing 250–300 g were used. Experimental animals were fed on a semisynthetic diet (Zoofarm, Italy) with TAA (0.032%) added. The animals were killed 5 months later.

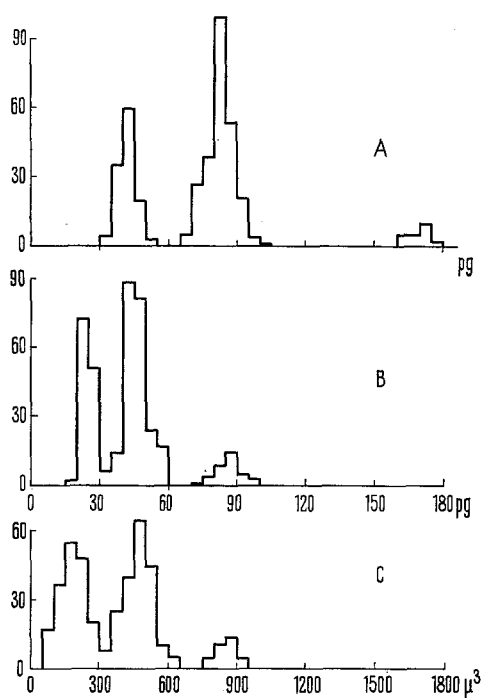


Fig. 1. Distribution of volumes (C) and of total (A) and insoluble (B) dry mass of nuclei isolated from normal animals (400 determinations).

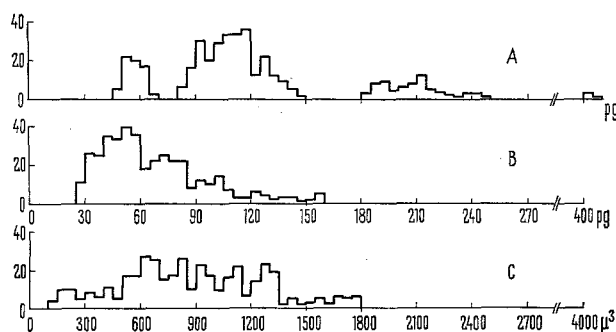


Fig. 2. Distribution of volumes (C) and of total (A) and insoluble (B) dry mass of nuclei isolated from TAA-treated animals (400 determinations).

Free nuclei were obtained from livers homogenized in anhydrous glycerol (a) and in BARNES, STOCKEN and ESNOUF⁵ fluid (b), using a PHILPOT and STANIER⁶ apparatus for homogenizing procedures. The nuclei isolated according to (a) maintained unaltered their proteic set; on the other hand, the nuclei isolated according to (b) underwent a notable loss of the water-soluble protein (HALE and KAY⁷; LAIRD⁸; TONGIANI⁹). The difference between the values obtained by means of the 2 methods gives an indication of the nuclear content of soluble proteins.

The diameters of nuclei isolated in glycerol were measured with a micrometer eyepiece previously calibrated. The nuclear dry mass was determined by an integrating microinterferometric apparatus devised by TONGIANI¹⁰, which gives directly the total optical path difference of the biological object integrated within a microscopic field of a known area.

Results and discussion. In control rats the liver nuclei isolated in anhydrous glycerol showed a distribution in 3 classes of dry weight. The average values for each class were 41.3, 81.6, 165.0 pg ($\text{pg} = 1.10 \cdot 10^{-12} \text{ g}$).

A similar distribution was observed for the nuclei isolated in BARNES et al.⁵ medium, for which the average values were 23.3, 45.1, 86.7 pg respectively.

Therefore, between corresponding groups of nuclei, there is a weight difference of about 40%, which is due to a loss of solid components in the nuclei suspended in the aqueous medium.

Besides, the nuclear volumes were distributed in 3 groups, with values of 187, 400, 800 μ^3 respectively (Figure 1).

In TAA-treated rats, the dry masses of nuclei isolated in glycerol were regularly distributed into 4 classes (54.2, 109.4, 210.2, 405.5 pg). No class distribution was detected for nuclei obtained from homogenates in BARNES et al.⁵ medium. The volumes of liver nuclei varied randomly, so no distribution in classes was observed (Figure 2).

Moreover, as regards both total dry mass and volume, the control nuclei showed a regular distribution in classes, with a geometrical progression among them. Also in TAA-treated rats the regular distribution into classes of total dry weight was roughly maintained; nevertheless, the dry mass of all nuclei was markedly increased, because the average weight of each was higher than that observed for the control animals.

On the other hand, as regards the nuclear volume, it is very difficult to show any disposition in classes, because the nuclei ranged randomly between 100 and 1750 μ^3 . This irregular disposition of the volume observed in these pathological nuclei could be chiefly related to an irregular increase of the intranuclear water.

¹ O. G. FITZHUGH and A. A. NELSON, *Science* 108, 626 (1948).

² L. J. RATHER, *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 88, 38 (1951).

³ A. K. LAIRD, *Fedn Proc.* 11, 244 (1952).

⁴ G. BADER, K. J. STILLER, R. HOLLAND-LETZ and R. BERGLEITER, *Expl Path.* 7, 256 (1967).

⁵ D. W. H. BARNES, M. P. ESNOUF and L. A. STOCKEN, in *Advances in Radiobiology* (Ed. G. C. DE HEVESY, A. G. FORSSBERG and J. D. ABBAT; Oliver and Boyd, Edinburgh 1957).

⁶ J. ST. PHILPOT and J. STAINER, *Biochem. J.* 63, 214 (1956).

⁷ A. J. HALE and E. R. KAY, *Biophys. biochem. Cytol.* 2, 147 (1956).

⁸ A. K. LAIRD, *Archs Biochem. Biophys.* 46, 119 (1953).

⁹ R. TONGIANI, *Sperimentale*, in press (1969).

¹⁰ R. TONGIANI, *Acta Histochem.*, in press (1969).

Furthermore, it can be concluded that in the controls the ratio of water-soluble and insoluble components of the nuclei remained unchanged for each class. On the other hand, this ratio becomes irregular in the treated animals, where the dry weight of nuclei isolated in aqueous medium show no disposition into classes. This indicates that these modifications depend on each other, because the classes of nuclei isolated in anhydrous glycerol are well defined.

In conclusion it can be pointed out that the integrating interferometric apparatus used was able to demonstrate that the increase of nuclear water is an actual event in some enlarged nuclei of the TAA-treated liver, as remarkable as the one observed for the solid components. Furthermore these modifications are more severe than those observed in acute intoxication, where the biochemical data showed quantitative modification for the soluble components only (BARTON et al.)^{11,12}.

Riassunto. Dopo intossicazione con TAA, l'aumento di volume dei nuclei di fegato isolati è sostenuto sia da un accresciuto contenuto di acqua che di sostanze solide. Anche il rapporto fra sostanze solubili e insolubili è modificato.

G. MALVALDI

*Istituto di Patologia Generale,
Università di Pisa (Italy), 24 March 1969.*

¹¹ A. D. BARTON, E. A. CERNY and K. M. TRACY, *Archs Biochem. Biophys.* 109, 36 (1965).

¹² The author wishes to thank Prof. E. PUCCINELLI for stimulating discussion during the work and Mr. E. MADRIGALI for technical assistance.

Neue Aspekte zur Frage der Nephrotoxizität von Phenacetin

Der Metabolismus von Phenacetin ist seit Einführung dieser Verbindung als Antipyretikum vor bald 100 Jahren wiederholt und recht eingehend bearbeitet worden¹⁻³. Es ist daher bemerkenswert, dass BÜCH et al.^{4,5} vor kurzem noch einen letzten, bisher unbekannten Hauptmetaboliten, den Sulfatester von 2-Hydroxyphenetidin, identifiziert und der quantitativen Bestimmung zugänglich gemacht haben. Diese polare und gut harnfähige Verbindung stellt das Endprodukt des Abbauweges von Phenacetin über Phenetidin dar. Der Phenacetinmetabolismus dürfte damit in den Grundzügen nun lückenlos bekannt sein und lässt sich in Anlehnung an BÜCH et al.⁶ gemäss Figur 1 zusammenfassen. Das wiedergegebene Reaktionsschema gilt sowohl für den Menschen wie für die Ratte.

Im Verlauf von eigenen Untersuchungen zur Frage der Nephrotoxizität von Phenacetin bei der Ratte hat sich herausgestellt, dass eine auffallende Dosisabhängigkeit der Metabolisierung von Phenacetin besteht. Dieses Phänomen, das nachstehend beschrieben werden soll, ist von Interesse zunächst als Ausnahme von den Regeln der allgemeinen Pharmakokinetik und ferner, im konkreten Fall des Phenacetins, in toxikologischer Hinsicht.

Methodik. Tierversuche: Zur Verwendung gelangten weibliche, 150–200 g schwere Füllinsdorfer Albinoratten. Die Tiere erhielten 16 Stunden vor Versuchsbeginn und während des ganzen Stoffwechselversuchs kein Futter, hatten jedoch stets Zugang zu Trinkwasser. Bei Versuchsbeginn wurde jeder Ratte die berechnete Dosis Phenacetin in Form von 2,0–3,0 ml einer homogenen Suspension von pulverisiertem Phenacetin in 10% Gummiarabikum per Schlundsonde eingegeben. Anschliessend Harnkollekte – je 2 gleich behandelte Ratten pro Stoffwechselkäfig – während 24 Stunden. Chemische Analysen: Phenacetin, N-Azetaminophenol und *p*-Phenetidin wurden nach den von B. BRODIE und J. AXELROD³ beschriebenen Verfahren, das 2-Hydroxyphenetidinsulfat nach der von H. BÜCH et al.⁵ entwickelten Methode bestimmt.

Ergebnisse und Interpretation. Die Ergebnisse eines repräsentativen von 5 analogen Versuchen sind in der Tabelle I zusammengestellt. Bestimmt wurden die wichtigsten Phenacetinmetabolite⁶ im 24-Stunden-Harn von Ratten nach einmaliger oraler Gabe von Phenacetin. Man erkennt, dass mit von 33 mg/kg bis 900 mg/kg zunehmender Dosis ein massiver Anstieg der mit dem Harn

ausgeschiedenen Dosisprozente von *p*-Phenetidin und Hydroxyphenetidinsulfat einhergeht. Demgegenüber bleiben die Dosisprozente des unverändert ausgeschiedenen Phenacetins und des gesamten N-Azetaminophenols konstant bzw. nehmen leicht ab. Es erfährt, um die Situation mit andern Worten zu umschreiben, bei einer 9fachen Erhöhung der Dosis von 33 mg/kg auf 300 mg/kg die mit dem Harn eliminierte Phenacetinmenge erwartungsgemäss ebenfalls eine ungefähr 9fache Zunahme, die ausgeschiedene Phenetidinmenge jedoch steigt beim gleichen Dosisprung um einen Faktor von 90. Es kommt demnach mit steigender Dosis zu einer beträchtlichen Verschiebung der Metabolisierung von Phenacetin in Richtung des Abbauweges über Phenetidin. Da nun Phenetidin bzw. dessen in vivo entstehende N-oxydierte Derivate ausgesprochene Blutgifte sind – wobei vor allem die Hämoglobinbildung^{3,7} und die Verkürzung der Lebensdauer der Erythrozyten⁸ eingehender untersucht worden sind – und da die hämatotoxischen Nebenwirkungen von Phenacetin im wesentlichen auf intermediär entstehendes Phenetidin zurückzuführen sind^{3,7}, liegt es auf der Hand, dass die beschriebene Verschiebung der Metabolisierung in Richtung Phenetidin für die Interpretation der verschiedenen Aspekte der Phenacetintoxizität von Interesse ist, und dies um so mehr, als eine gleichsinnige Verschiebung auch beim Menschen nachgewiesen werden kann⁹.

¹ O. HINSBERG und G. TREUFEL, *Arch. exp. Path. Pharmac.* 33, 216 (1894).

² J. N. SMITH und R. T. WILLIAMS, *Biochem. J.* 44, 239 (1949).

³ B. BRODIE und J. AXELROD, *J. Pharmac. exp. Ther.* 97, 58 (1949).

⁴ H. BÜCH, H. HAEUSER, K. PFLEGER und W. RUEDIGER, *Arch. exp. Path. Pharmac.* 253, 25 (1966).

⁵ H. BÜCH, K. PFLEGER, W. RUMMEL, V. ULLRICH, D. HEY und H. STAUDINGER, *Biochem. Pharmac.* 16, 2247 (1967).

⁶ Die beiden Hydroxyderivate von Phenacetin (2-Hydroxyphenacetin und 3-Hydroxyphenacetin) wurden nicht mitbestimmt, weil diese Metabolite zusammen lediglich etwa 0,1% der Dosis ausmachen⁵.

⁷ H. BAADER, S. GIRGIS, M. KIESE, H. MENZEL und L. SKROBOT, *Arch. exp. Path. Pharmac.* 241, 317 (1961).

⁸ A. PLETSCHER, A. STUDER und P. MIESCHER, *Schweiz. med. Wschr.* 88, 1214 (1958).

⁹ J. RAAFLAUB und U. C. DUBACH, *Br. med. J.* (1969), im Druck.