

## Abnahme des Cytochroms P450 nach Inkubation mit $\text{CCl}_4$ in einem NADPH-regenerierenden System und teilweise Umwandlung in Cytochrom P420

Eine Schädigung mikrosomaler Enzyme in den ersten Stunden nach oraler Tetrachlorkohlenstoff-Gabe beschrieben erstmals SMUCKLER<sup>1</sup>, MCLEAN<sup>2</sup>, SLATER<sup>3</sup>, SASAME<sup>4</sup>, HENI<sup>5,6</sup>. Bei der akuten Tetrachlorkohlenstoffschädigung tritt zuerst eine isolierte Schädigung des Cytochroms P450 und damit zusammenhängend eine Störung des mikrosomalen Arzneimittelabbaus auf (SASAME<sup>4</sup>, SLATER<sup>3</sup>, SMUCKLER<sup>1</sup>, HENI<sup>5,6</sup>). Erst 24 h nach oraler Tetrachlorkohlenstoff-Gabe fanden GREEN et al.<sup>7</sup> einen statistisch signifikanten Anstieg des Cytochroms P420, der inaktiven Form des Cytochroms P450. Eine Abnahme des Cytochroms P450 und teilweise Umwandlung in Cytochrom P420 fanden OMURA und SATO<sup>8</sup> auch in vitro nach Zugabe von Desoxycholat und Phospholipase A und IMAI und SATO<sup>9</sup> nach Zugabe von KSCN und anderen Neutralsalzen.

Nach der von uns bereits früher aufgestellten Theorie (HENI<sup>8</sup>, HENI und REMMER<sup>5</sup>), nach der durch das mikrosomale Arzneimittel-metabolisierende Enzymsystem *in vivo* ein „aktiver“ Metabolit des Tetrachlorkohlenstoffs gebildet wird, der die Endoxydase dieses Enzymsystems das Cytochrom P450 schädigt, untersuchten wir, ob nach Zugabe eines NADPH-regenerierenden Systems zur Mikrosomenfraktion auch in vitro der Gehalt an Cytochrom P450 herabgesetzt wird. Dabei bewirkt Tetrachlorkohlenstoff allein, wie Vorversuche (HENI<sup>10</sup>) ergeben haben, keine Beeinflussung des Cytochroms P450.

**Material und Methoden.** 140–160 g schwere männliche Wistar-Ratten wurden mit Altromin®-Standardfutter und Wasser ad libitum ernährt. Eine zweite Tiergruppe erhielt außerdem 3 Tage lang je 80 mg/kg Körpergewicht Phenobarbital-Natrium i.p. injiziert. Nach der Tötung der Tiere führten wir die Mikrosomenpräparation nach REMMER<sup>11</sup> durch.

Ein Inkubationsansatz, bestehend aus 0,05 M Trispuffer pH 7,5, 5  $\mu\text{Mol}$   $\text{MgCl}_2$ , 8  $\mu\text{Mol}$  Natriumisocitrat, 1  $\mu\text{Mol}$  NADP-Natrium, Isocitratdehydrogenase und Mikrosomensuspension (ca. 2 mg mikrosomales Protein/ml), wurde vor der Zugabe von 5  $\mu\text{l}$   $\text{CCl}_4$ /5 ml 5 min bei 37°C in einem Wasserbad vorinkubiert. Die anschliessende Inkubationszeit betrug 5, 10, 15, 20 und 30 min.

Das Cytochrom P450 und das Cytochrom P420 wurde nach OMURA und SATO<sup>8</sup> bestimmt, wobei für das Cytochrom P450 ein mM-Extinktionskoeffizient von 91 und für das Cytochrom P420 ein solcher von 110 verwendet wurde<sup>8</sup>. Die mikrosomale Desmethylase bestimmten wir nach der Methode von SCHENKMAN et al.<sup>12</sup>, wobei wir

nach der Methode von SCHENKMAN et al.<sup>12</sup>, wobei wir

Tabelle I. Abnahme des Cytochroms P450 nach Inkubation der Mikrosomenfraktion mit einem NADPH-regenerierenden System nach Zugabe von 5  $\mu\text{l}$   $\text{CCl}_4$ /5 ml und Zunahme des Cytochroms P420

Inku- bations- zeit (min)	nMol Cyto- chrom P450/ mg Protein	nMol Cyto- chrom P420/ mg Protein	Cyto- chrom P450 (%)	Cyto- chrom P420 (%)
0	0,42 ± 0,04	~	100	—
30	0,44 ± 0,04	~	104	—
nach Zugabe von 5 $\mu\text{l}$ $\text{CCl}_4$				
5	0,37 ± 0,04	0,03 ± 0,005	88	19
10	0,28 ± 0,02*	0,09 ± 0,01	67	55
15	0,23 ± 0,03*	0,11 ± 0,01	55	69
20	0,18 ± 0,01*	0,13 ± 0,02	43	81
30	0,18 ± 0,02*	0,16 ± 0,02	43	100

n = 4–5; \* p < 0,05;  $\bar{x} \pm s$ .

das in vitro gebildete Formaldehyd nach NASH<sup>13</sup> bestimmten.

**Resultat und Diskussion.** Nach Zugabe von 5  $\mu\text{l}$   $\text{CCl}_4$  und einem NADPH-regenerierenden System fand sich in vitro eine deutliche, statistisch signifikante Abnahme des Cytochroms P450. Das Cytochrom P450 nahm nach 10 min von 0,42 nMol/mg Protein auf 0,28 und nach 20 min auf 0,18 nMol ab (Tabelle I). Die Abnahme erreichte bereits nach 20 min ihren maximalen Wert. Das Cytochrom P420 stieg von einem zunächst nicht messbaren Wert auf 0,09 bzw. 0,13 nMol/mg Protein im gleichen Zeitraum an (Tabelle I).

Nach Phenobarbitalvorbehandlung fand sich eine wesentlich deutlichere Abnahme des Cytochroms P450 von 0,94 nMol auf 0,66 nMol nach 10 min und auf 0,31 nMol nach 30 min (Tabelle II). Nach Tetrachlorkohlenstoff-Gabe ist auch die Aktivität der mikrosomalen Desmethylase vermindert. So nahm das in vitro aus Aminopyrin gebildete Formaldehyd von 7,51 auf 5,22 nMol/min/mg Protein und nach Phenobarbitalvorbehandlung von 20,11 auf 9,19 nMol/min/mg Protein ab (Tabelle III).

Zusammenfassend lassen sich unsere Ergebnisse folgendermassen interpretieren. Durch Tetrachlorkohlenstoff wird die Endoxydase des mikrosomalen Arzneimittel-metabolisierenden Enzymsystems das Cytochrom P450 isoliert geschädigt. Entsprechend ist auch die Aktivität der mikrosomalen Desmethylase vermindert. Diese

<sup>1</sup> E. A. SMUCKLER, E. ARRHENIUS und T. HULTIN, Biochem. J. 103, 55 (1967).

<sup>2</sup> A. E. M. MCLEAN, Biochem. Pharmac. 16, 2030 (1967).

<sup>3</sup> T. F. SLATER und B. C. SAWYER, Biochem. J. 111, 317 (1969).

<sup>4</sup> H. A. SASAME, J. A. CASTRO und J. R. GILETTE, Biochem. Pharmac. 17, 1759 (1968).

<sup>5</sup> N. HENI und H. REMMER, Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 266, 354 (1970).

<sup>6</sup> N. HENI, Experientia 27, 293 (1971).

<sup>7</sup> F. E. GREENE, B. STRIPP und J. R. GILETTE, Biochem. Pharmac. 18, 1531 (1969).

<sup>8</sup> T. OMURA und R. SATO, J. biol. Chem. 239, 2370 (1964).

<sup>9</sup> Y. IMAI und R. SATO, J. Biochem. 7, 419 (1967).

<sup>10</sup> N. HENI, unveröffentlicht.

<sup>11</sup> H. REMMER, H. GREIM, J. B. SCHENKMAN und R. W. ESTABROOK, in *Methods in Enzymology* (Academic Press, New York and London 1967), Vol. 10, p. 703.

<sup>12</sup> J. B. SCHENKMAN, H. REMMER und R. W. ESTABROOK, Molec. Pharmac. 3, 113 (1967).

<sup>13</sup> T. NASH, Biochem. J. 55, 416 (1953).

Tabelle II. Entsprechende Versuchsanordnung wie in Tabelle I. Ergebnisse bei Phenobarbital-vorbehandelten Tieren

Inku- bations- zeit (min)	nMol Cyto- chrom P450/ mg Protein	nMol Cyto- chrom P420/ mg Protein	Cyto- chrom P450 (%)	Cyto- chrom P420 (%)
0	0,94 ± 0,07	—	100	—
30	0,92 ± 0,07	—	98	—
nach Zugabe von 5 $\mu\text{l}$ $\text{CCl}_4$				
5	0,78 ± 0,05*	0,08 ± 0,01	83	25
10	0,66 ± 0,05*	0,16 ± 0,02	70	48
15	0,53 ± 0,05*	0,25 ± 0,02	56,5	76
20	0,42 ± 0,03*	0,28 ± 0,04	44,5	85
30	0,31 ± 0,03*	0,33 ± 0,04	33	100

n = 4–5; \* p < 0,05;  $\bar{x} \pm s$ .

zunächst nur in vivo beobachtete Abnahme des Cytochroms P450 lässt sich auch in vitro nach Zugabe eines NADPH-regenerierenden Systems wiederholen. Durch den Abbau des Tetrachlorkohlenstoffs wird wahrscheinlich ein «aktiver» Metabolit gebildet, der den Gehalt an Cytochrom P450 vermindert und teilweise in das Cytochrom P420, der inaktiven, teilweise von der Membran losgelösten Form umwandelt. Nach Phenobarbitalvorbehandlung ist die Wirkung des Tetrachlorkohlenstoffs wesentlich verstärkt.

Ein Nachweis des vermuteten «aktiven» Metaboliten des Tetrachlorkohlenstoffs ist bisher noch nicht gelungen (SASAME<sup>4</sup>, REMMER<sup>14</sup>, HENI und REMMER<sup>5,15</sup>). GARNER und MCLEAN<sup>16</sup> konnten durch Nachweis von  $^{14}\text{CO}_2$  in der Atemluft mit  $^{14}\text{CCl}_4$  behandelter Tiere lediglich nachweisen, dass Tetrachlorkohlenstoff in vivo abgebaut wird. Eine Aktivierung des mikrosomalen Arzneimittel-metabolisierenden Enzymsystems durch DDT oder Phen-

barbital steigert die Umwandlung von  $\text{CCl}_4$  in  $\text{CO}_2$  und verstärkt die toxische Wirkung des Tetrachlorkohlenstoffs, während Substanzen, die dieses Enzymsystem hemmen, eine Abschwächung der Schädigung bewirken (GARNER und MCLEAN<sup>16</sup>). Wie eigene Vorversuche ergeben haben, bewirkt eine direkte Zugabe des  $\text{CCl}_4$  zur Mikrosomenfraktion ohne gleichzeitige Zugabe eines NADPH-regenerierenden Systems keine Beeinflussung des Cytochroms P450<sup>10</sup>. Es ist anzunehmen, dass von dem mikrosomalen Arzneimittel-metabolisierenden Enzymsystem ein möglicherweise sehr kurzebiger Metabolit des  $\text{CCl}_4$  gebildet wird, der bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte (SASAME<sup>4</sup>, REMMER<sup>14</sup>, HENI und REMMER<sup>5,15</sup>).

**Summary.** Isolated damage of cytochrome P450 and partial conversion to cytochrome P420 appears after incubation of carbon tetrachloride with a NADPH-regenerating enzyme system and the microsomal fraction. This effect enlarges after phenobarbital pretreatment.

N. HENI

Medizinische Klinik der Universität,  
Hugstetterstrasse 55, D-78 Freiburg (Deutschland),  
28. Dezember 1970.

Tabelle III. Abnahme der Aktivität der mikrosomalen Desmethylase nach in-vitro-Zugabe von 5 µl  $\text{CCl}_4$ /5 ml

Vorbehandlung	nMol Formaldehyd/ mg Protein/min	(%)
Kontrolltiere	7,51 ± 0,52	100
Kontrolltiere + 5 µl $\text{CCl}_4$	5,22 ± 0,41	69
Phenobarbital	20,11 ± 0,95	100
Phenobarbital + 5 µl $\text{CCl}_4$	9,19 ± 0,61	46

$n = 4$ ;  $\bar{x} \pm s$ .

<sup>14</sup> H. REMMER, Am. J. Med. 49, 617 (1970).

<sup>15</sup> N. HENI und H. REMMER, Arch. Toxikol., in Vorbereitung.

<sup>16</sup> R. C. GARNER und A. E. M. MCLEAN, Biochem. Pharmac. 18, 645 (1969).

### The Influence of Deoxycorticosterone, Digitoxigenin and Cyanide Ions on the Respiration of *Fusarium lini* (BOLLEY)<sup>1</sup>

It has been demonstrated that growing cultures of *Fusarium lini* (BOLLEY) (*Fungi imperfecti*) are able to hydroxylate cardenolides<sup>3-5</sup> and bufadienolides<sup>6-8</sup> in 12 $\beta$ -position whereas steroids of the androstane and pregnane series<sup>9,10</sup> are oxygenated in 15 $\alpha$ -position. Most likely a single enzyme is responsible for the various hydroxylations<sup>11</sup>. The site of the attack seems to be determined by the stereochemistry of the substrate. It was also observed that upon simultaneous incubation of deoxycorticosterone and digitoxigenin which served as models the rate of the hydroxylation of the former retarded whereas the oxygenation of the latter is enhanced<sup>11</sup> (cf.<sup>12</sup>). Furthermore it is known that cyanide ions influence the course of steroid hydroxylations<sup>13,14</sup>. In the case of *F. lini* KCN enhances the enzymatic activity of the microorganism at low concentrations while it inhibits it at higher concentrations<sup>11</sup>.

Since cyanide is a poison of respiration, it was interesting to investigate the dependence of the respiration of growing cultures of *Fusarium lini* in the presence of both cyanide ions at various concentrations and the steroid substrates which are hydroxylated. In the first experiment the respiration of the micro-organism was measured only in the presence of cyanide ions of various concentrations in the Warburg apparatus using ROBBIE's technique<sup>15</sup>. Figure 1 shows that CN<sup>-</sup> inhibits the respiration of *F. lini* proportional to its concentration.

In the presence of only either deoxycorticosterone or digitoxigenin used again as model substrates, the respiration was normal before the hydroxylation reaction took place. During the hydroxylation of deoxycorticosterone

the respiration was diminished as observed by ČAPEK et al.<sup>16</sup> in other cases. However, in the presence of digitoxigenin the O<sub>2</sub>-uptake was surprisingly enhanced during the hydroxylation. In the presence of equimolar amounts of both substrates the respiration was enhanced again, even before the hydroxylation took place. The results of these experiments are summarized in the Table.

As previously mentioned, the presence of cyanide ions in 10<sup>-3</sup> M concentration reduces the respiration during the first hours of the microbial growth. However, in the following period cyanide intensifies the consumption of O<sub>2</sub>.

<sup>1</sup> Reactions with Micro-organisms. Part. 20<sup>2</sup>.

<sup>2</sup> Part 19: W. ZÜRCHER, E. WEISS-BERG and CH. TAMM, Helv. chim. Acta 52, 2429 (1969).

<sup>3</sup> A. GUBLER and CH. TAMM, Helv. chim. Acta 41, 297 (1958).

<sup>4</sup> CH. TAMM and A. GUBLER, Helv. chim. Acta 41, 1762 (1958).

<sup>5</sup> CH. TAMM and A. GUBLER, Helv. chim. Acta 42, 239 (1959).

<sup>6</sup> CH. TAMM and A. GUBLER, Helv. chim. Acta 42, 473 (1959).

<sup>7</sup> M. SCHÜPBACH and CH. TAMM, Helv. chim. Acta 47, 2217 (1964).

<sup>8</sup> M. SCHÜPBACH and CH. TAMM, Helv. chim. Acta 47, 2226 (1964).

<sup>9</sup> A. GUBLER and CH. TAMM, Helv. chim. Acta 41, 301 (1958).

<sup>10</sup> CH. TAMM, A. GUBLER, G. JUHASZ, E. WEISS-BERG and W. ZÜRCHER, Helv. chim. Acta 46, 889 (1963).

<sup>11</sup> E. WEISS-BERG and CH. TAMM, Helv. chim. Acta 46, 1166 (1963).

<sup>12</sup> Y. NOZAKI, E. MASUO and D. SATOH, Agric. biol. Chem., Jap. 26, 399 (1962).

<sup>13</sup> K. ZETSCHÉ, Naturwissenschaften 47, 232 (1960).

<sup>14</sup> CH. J. SIH and F. L. WEISENBORN, J. Am. chem. Soc. 82, 2653 (1960).

<sup>15</sup> W. A. ROBBIE, Methods med. Res. 1, 307 (1948).

<sup>16</sup> A. ČAPEK, H. PAVLU and O. HANČ, Folia biol., Praha 4, 337 (1958).