

## Methylierungsreaktionen mikrosomaler Phospholipide der Rattenleber bei akuter Tetrachlorkohlenstoffintoxikation

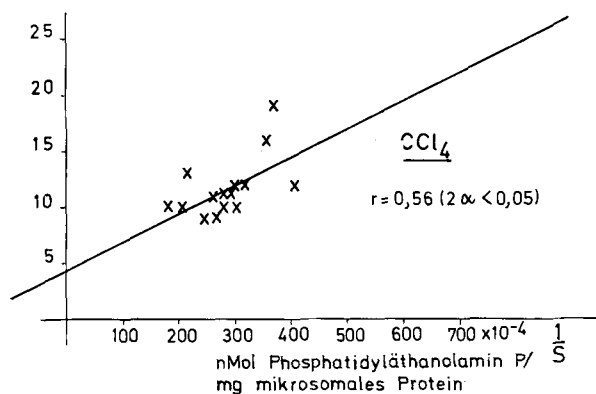
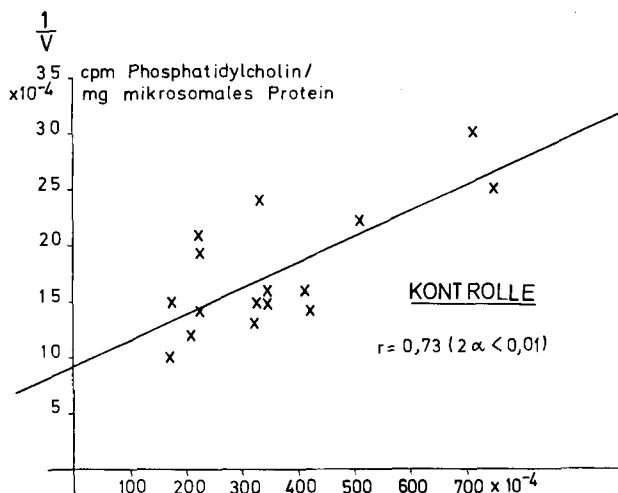
### Methylating Reactions on Microsomal Phospholipids in Rat Liver Intoxicated with Carbon Tetrachloride

Störungen des Phospholipidstoffwechsels bei toxischen Leberschädigungen manifestieren sich in erster Linie in einer verminderten Neusynthese von Phosphatidylcholin, ohne dass gleichzeitig die de-novo-Synthese von Phosphatidyläthanolamin gehemmt sein muss<sup>1,2</sup>. Die Folge sind Änderungen der relativen Konzentrationen einzelner Phospholipidfraktionen. So nimmt bei der akuten Tetrachlorkohlenstoffintoxikation die absolute Konzentration von Phosphatidylcholin in der Leber ab, während der relative Anteil von Phosphatidyläthanolamin ansteigt<sup>3</sup>. Diese Befunde lassen erwarten, dass zur Aufrechterhaltung des Metabolgleichgewichts bei eingeschränkter Neusynthese von Phosphatidylcholin und relativ erhöhtem Phosphatidyläthanolaminpool ein weiterer Syntheseweg von Phosphatidylcholin, die Methylierung von Phosphatidyläthanolamin, kompensatorisch gesteigert, ohne dass allerdings das Defizit voll ausgeglichen wird.

Bisherige Untersuchungen über Modulation dieses Metabolnebenweges bei akuter Tetrachlorkohlenstoff-

intoxikation haben entweder keine Wirkungen des Toxikons<sup>4</sup> oder sogar eine Hemmung der Methylierung von Phosphatidyläthanolamin gezeigt<sup>5</sup>.

Wir haben deshalb den  $^{14}\text{CH}_3$ -Einbau aus in vivo appliziertem L-Methionin-Methyl- $^{14}\text{C}$  in die Phospholipide von Lebermikrosomen Tetrachlorkohlenstoff-vergifteter Ratten untersucht. 200 g schweren, männlichen Wistar-Ratten wurden 1,25 ml  $\text{CCl}_4/\text{kg KG}$  in 50% Mineralöl in leichter Äthernarkose per os verabreicht und  $5\frac{1}{2}$  h später, 30 min vor Töten der Tiere, 0,5  $\mu\text{Ci}$  L-Methionin-Methyl- $^{14}\text{C}$ /Tier (spezifische Aktivität 56 mCi/mMol)<sup>6</sup> i.p. appliziert. Ein Kontrollkollektiv erhielt statt  $\text{CCl}_4$  entsprechende Volumina Mineralöl per os. Die so rasch wie möglich entnommenen Lebern wurden mit eiskalter physiologischer NaCl-Lösung perfundiert, im 2,5-fachen Volumen 0,25 M Saccharoselösung pH 7,4 homogenisiert und die Mikrosomen durch Fällung mit  $\text{CaCl}_2$  gewonnen<sup>7</sup>. Nach Extraktion der Lipide mit Chloroform-Methanol 2:1<sup>8</sup> wurden die mikrosomalen Phospholipide dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt<sup>9</sup>, zur Mes-



Doppelt reziproke Auftragung der Radioaktivitätseinbauten von Methionin-Methyl- $^{14}\text{C}$  in mikrosomales Phosphatidylcholin gegen die mikrosomalen Phosphatidyläthanolaminkonzentrationen,  $r =$  Korrelationskoeffizient. (Die statistische Berechnung erfolgte nach Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 6. Auflage, 1962, 170, 5ff.)

<sup>1</sup> A. HALBREICH und J. MAGER, *Biochim. biophys. Acta* 187, 584 (1969).

<sup>2</sup> H. SCHRIEWER, J. LOHMANN und H. M. RAUEN, *Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.)*, im Druck (1975).

<sup>3</sup> M. SUGANO, S. CHO, K. IMAIZUMI und M. WADA, *Biochem. Pharmacol.* 19, 2325 (1970).

<sup>4</sup> Y. SHIMIZU, *J. Lipid Res.* 10, 479 (1969).

<sup>5</sup> G. FEUER, S. D. COOPER, F. A. DE LA IGLESIA und G. LUMB, *Int. J. clin. Pharmacol.* 5, 389 (1972).

<sup>6</sup> Amersham Buchler GmbH & Co., KG., Braunschweig.

<sup>7</sup> D. L. CINTI, P. MOLDEUS und J. B. SCHENKMAN, *Biochem. Pharmacol.* 21, 3249 (1972).

<sup>8</sup> J. FOLCH, M. LEES und G. A. SLOANE-STANLEY, *J. biol. Chem.* 226, 497 (1957).

<sup>9</sup> F. KUNZ und D. KOSIN, *Clin. chim. Acta* 27, 185 (1970).

Radioaktivitätseinbauten von L-Methionin-Methyl- $^{14}\text{C}$  in Phosphatidylcholin und Sphingomyelin sowie prozentuale Phosphatidyläthanolamingehalte von Rattenlebermikrosomen nach akuter  $\text{CCl}_4$ -Intoxikation

	Kontrolle (n = 16)	$\text{CCl}_4$ (n = 16)
Radioaktivitätseinbauten in Phosphatidylcholin (cpm/mg mikrosomales Protein)	$59,7 \pm 16,8$	$82,8 \pm 18,8 \uparrow$
Radioaktivitätseinbauten in Sphingomyelin (cpm/mg mikrosomales Protein)	$2,9 \pm 1,5$	$3,6 \pm 2,0$
Verhältnis der spezifischen Radioaktivitäten von Gesamtlipiden (cpm/mg) zu Proteinen (cpm/mg)	$100 \pm 17,7$	$146,0 \pm 24,3 \uparrow$
Kontrolle = 100%		
Auf Gesamtphospholipide ( $\mu\text{Mol P/mg}$ mikrosomales Protein) bezogener Phosphatidyläthanolamingehalt ( $\mu\text{Mol P/mg}$ mikrosomales Protein)	$11,0 \pm 3,1$	$12,9 \pm 2,9 (\uparrow)$

n = Anzahl der Tiere. Statistische Ergebnisauswertung nach dem Wilcoxon-Test: Statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle: ( $\uparrow$ ) =  $2\alpha < 0,1$ ;  $\uparrow$  =  $2\alpha < 0,01$ .

sung der Radioaktivität die mit Jod markierten Kieselgelzonen in Szintillatorröhrchen übergeführt und mit Permablend III (Fa. Packard, 91% PPO, 9% bis-MSB) als Szintillatorlösung versetzt.

Wie die Tabelle zeigt, nimmt die Einbaurate von  $^{14}\text{CH}_3$  in die mikrosomale Phosphatidylcholinfraktion Tetrachlorkohlenstoff-vergifteter Rattenlebern im Vergleich zu den Werten der Kontrolle um ca. 40% zu. Gleichzeitig steigt auch der auf die Gesamtphospholipide bezogene Phosphatidyläthanolamingehalt in der Lebermikrosomenfraktion unter der  $\text{CCl}_4$ -Intoxikation leicht an. Im Gegensatz zur erhöhten Methylierung von Phosphatidyläthanolamin ist die Änderung der Einbauraten in die Sphingomyelinfraktion deutlich geringer und lässt sich statistisch nicht sichern. Da das Verhältnis der spezifischen Radioaktivitäten der mikrosomalen Gesamtlipide zu mikrosomalen Proteinen bei der  $\text{CCl}_4$ -Intoxikation ebenfalls erheblich gesteigert ist, kann gefolgert werden, dass auch die Umsatzraten der durch Methylierung modifizierten Lipide der Lebermikrosomen im Verhältnis zu den Umsatzraten der neu synthetisierten mikrosomalen Proteine nach Tetrachlorkohlenstoffvergiftung zunehmen.

Obwohl im wesentlichen nur die Hexaenspecies von Phosphatidyläthanolamin spezifische Substrate der mikrosomalen Methionin-Phosphatidyläthanolamin-Methyltransferase sind<sup>10</sup>, scheint auch zwischen dem mikrosomalen Pool an Gesamt-Phosphatidyläthanolamin und der Einbaurate von  $^{14}\text{CH}_3$  in die Phosphatidylcholinfraktion der Lebermikrosomen eine deutliche Beziehung zu bestehen (Figur).

Die bei doppelt reziproker Auftragung der  $^{14}\text{CH}_3$ -Einbauraten gegen die entsprechenden Phosphatidyläthanolaminkonzentrationen berechneten Regressionsgeraden des Kontroll- und  $\text{CCl}_4$ -Kollektivs erstrecken sich zwar über verschieden grosse Bereiche von 1/S, sind statistisch parallel und differieren in ihren Restvarianzen. Auch bei Berücksichtigung der unterschiedlichen Restvarianzen unterscheiden sich die Schnittpunkte der beiden Geraden  $1/V_{\max}$  und  $1/K_m$  jedoch statistisch signifikant ( $2\alpha < 0.005$ ). Unter der Voraussetzung, dass die berechneten Regressionsgeraden auch in den nicht erfassten Bereichen

von 1/S gültig sind, nimmt somit die «Affinität» der Phosphatidylcholinmarkierung zum mikrosomalen Gehalt an Gesamt-Phosphatidyläthanolamin nach  $\text{CCl}_4$ -Intoxikation deutlich ab, während die «Maximalgeschwindigkeit» dieser Reaktion ansteigt. Dieser Befund ist insofern bemerkenswert, als der Polyensäuregehalt der Leberphospholipide und somit die Konzentration des spezifischen Substrats der Methionin-Phospholipid-Methyltransferase unter der  $\text{CCl}_4$ -Intoxikation abnimmt<sup>3</sup>.

Unsere Ergebnisse stimmen mit den von SHIMIZU<sup>4</sup> in der Gesamtleber gemessenen Befunden nicht überein. Die Unterschiede dürften zum Teil darauf beruhen, dass wir den radioaktiv markierten «Precursor» nicht i.v., sondern i.p. und in einer kürzeren Zeitperiode vor Töten der mit geringerer  $\text{CCl}_4$ -Dosis geschädigten Tiere verabreicht haben. Auch die von FEUER et al.<sup>5</sup> in vitro bei der akuten  $\text{CCl}_4$ -Intoxikation der Ratte registrierte Aktivitätsabnahme der mikrosomalen  $^{14}\text{CH}_3$ -Methionin-Phospholipid-Methyltransferase muss unseren in vivo gewonnenen Ergebnissen nicht widersprechen, da den publizierten Daten nicht zu entnehmen ist, zu welchem Zeitpunkt die Aktivität gemessen wurde. Weiterhin ist bisher unbekannt, inwieweit die mikrosomale Methionin-Phospholipid-Methyltransferase für die in-vivo-Methylierung von Phosphatidyläthanolamin geschwindigkeitsbestimmend ist.

**Summary.** Six h after oral administration of carbon tetrachloride, the turnover of  $^{14}\text{CH}_3$  from injected Methionine-Methyl- $^{14}\text{C}$  in microsomal lipids is increased in comparison with the turnover in microsomal proteins.

H. SCHRIEWER, H. KLÜSENER und  
H. M. RAUEN

*Abteilung für experimentelle Zellforschung  
im Physiologisch-Chemischen Institut  
der Westfälischen Wilhelms-Universität,  
D-44 Münster/Westfalen (Bundesrepublik Deutschland,  
BRD), 19. März 1975.*

<sup>10</sup> G. ARVIDSON, Eur. J. Biochem. 4, 478 (1968).

## Role of Bile in Intestinal Absorption of $^{203}\text{Pb}$ in Rats

Biliary excretion of lead was studied as early as in the last century. AUB et al.<sup>1</sup> list in their monograph quite a number of authors who had been engaged in the problem. Opinions of those authors on biliary excretion of lead differed however. BLAXTER and COWIE<sup>2</sup> studied excretion of lead in sheep and found bile to be an important excretion pathway for lead. CASTELLINO et al.<sup>3</sup> investigated excretion of lead via bile and via the wall of the gastrointestinal tract in rats and found that the greatest part of lead revealed in stool had been excreted with bile. According to those authors, lead in bile is most probably bound to proteins. In the course of 24 h after a single i.v. administration of  $^{210}\text{Pb}$ , an average 6.7% of the dose administered are excreted via bile in rats<sup>4</sup>.

KLAASSEN and SHOEMAN<sup>5</sup> compared biliary excretion of lead in rats, rabbits and dogs. They established the highest rats of biliary excretion of lead in rats. These authors also studied the enterohepatic circulation (EHC) of lead and came to the conclusion that it was insignificant. The role of bile in the absorption of lead has not been studied.

The present authors studied absorption of  $^{203}\text{Pb}$  excreted via bile during 24 h after i.v. administration of

$^{203}\text{PbCl}_2$  on the one hand and absorption of  $^{203}\text{Pb}$  administered into the duodenum in the form of  $^{203}\text{PbCl}_2$  in rats with both cannulated and non-cannulated bile duct on the other hand. The aim of the study was to evaluate the role of bile in absorption of lead.

**Materials and methods.** Female Wistar rats (mean weight 200 g) fed on pellet diet were used in the experiments. Rats were starved for 24 h before the study but had free access to water.

The rats were divided into 3 groups: 1. group: Donors (9 rats) were given i.v.  $^{203}\text{PbCl}_2$  (in the dose of 125  $\mu\text{g}$  of  $\text{Pb}^{2+}$  per rat). Bile was collected in donors every 2 h, its radioactivity was measured and the bile obtained

<sup>1</sup> J. C. AUB, L. T. FAIRHALL, A. S. MINOT and P. REZNIKOFF, in *Lead Poisoning* (Williams and Wilkins Publishers, Baltimore 1926).

<sup>2</sup> K. L. BLAXTER and A. T. COWIE, Nature, Lond. 157, 588 (1946).

<sup>3</sup> N. CASTELLINO, P. LAMANNA and B. GRIECO, Folia med. 48, 601 (1965).

<sup>4</sup> M. CIKRT, Br. J. ind. Med. 29, 74 (1972).

<sup>5</sup> C. D. KLAASSEN and D. W. SHOEMAN, Toxic. appl. Pharmac. 29, 434 (1974).