

Zum Einfluß der Zn-Versorgung auf die Aktivität der alkalischen Ribonuclease bei Ratten

H.-P. Roth und M. Kirchgeßner

Institut für Ernährungsphysiologie der Technischen Universität München in Freising-Weihenstephan

Zusammenfassung:

Ziel dieser Arbeit war es, zu zeigen, ob die Aktivität des zinkabhängigen Enzyms alkalische Ribonuclease in zinksensitiven Geweben Rückschlüsse auf den Zn-Versorgungsstatus zuläßt. Hierzu wurden 27 entwöhnte männliche Sprague-Dawley-Ratten in drei Gruppen zu je 9 Tieren eingeteilt. Dabei standen einer Zn-Mangelgruppe, die eine Diät mit einem Zn-Gehalt von 3 ppm zur freien Verfügung erhielt, eine Pair-fed- sowie eine Ad-libitum-Kontrollgruppe mit einem Diät-Zn-Gehalt von jeweils 60 ppm gegenüber. Nach 22 Versuchstagen wurden die Tiere getötet, die Zink- und Proteingehalte sowie die Aktivität der alkalischen Ribonuclease in Serum, Hoden, Femur, Urin, Leber und Nieren bestimmt.

Obwohl die Zn-Konzentrationen in Serum, Hoden, Femur und Nieren der Mangeltiere signifikant erniedrigt waren, zeigte die alkalische Ribonuclease nur in den Nieren eine erhöhte, in den Hoden jedoch eine reduzierte und in Serum, Femur, Urin und Leber eine unveränderte Aktivität. Die Proteinkonzentration war in Serum und Femur infolge des Zn-Mangels erniedrigt, wogegen die Abnahme in Hoden, Leber und Nieren der verminderten Futteraufnahme zugeschrieben werden mußte. Die Wirkung des Diät-Zn-Mangels auf die Aktivität der alkalischen Ribonuclease war also mehr die Folge einer veränderten Futteraufnahme und Wachstumsrate als eines direkten Effektes von Zink auf das Enzymsystem. Somit scheidet die Aktivitätsbestimmung der alkalischen Ribonuclease als Parameter zur Diagnose der Zn-Versorgung und des Zn-Mangels aus.

Summary:

The purpose of this paper was to show whether the activity of the zinc-dependent enzyme alkaline ribonuclease in zinc-sensitive tissues allows conclusions to be drawn on the Zn supply status. For this 27 weaned male Sprague-Dawley rats were divided into three groups of 9 animals each. A Zn deficiency group, which was given a diet with a Zn content of 3 ppm ad libitum, was compared to a pair-fed and an ad libitum control group with a Zn content in the diet of 60 ppm each. After 22 trial days the animals were killed, and the zinc and protein contents as well as the activity of the alkaline ribonuclease in the serum, testicles, femur, urine, liver, and kidneys were determined.

Although the Zn concentration in the serum, testicles, femur, and kidneys of the deficiency animals were significantly reduced, the alkaline ribonuclease showed an increased activity only in the kidneys, in the testicles the activity was reduced, and in the serum, femur, urine and liver it remained unchanged. The protein concentration in serum and femur was reduced because of Zn deficiency, whereas the decrease in testicles, liver and kidneys must be attributed to the reduced feed intake. The influence of the dietary Zn deficiency on the activity of the alkaline ribonuclease was therefore more the result of an altered feed intake and growth rate

than a direct effect of zinc on the enzymatic system. Therefore the determination of the activity of the alkaline ribonuclease can be excluded as a parameter for the diagnosis of Zn supply and Zn deficiency.

Schlüsselwörter: Zn-Mangel, alkalische Ribonuclease Aktivität

Einleitung

Da Zink für die Aktivität einer Anzahl von Metalloenzymen essentiell ist, führt alimentärer Zn-Mangel zu erniedrigten Aktivitäten dieser Enzyme in zinksensitiven Geweben (Kirchgessner et al., 1976). Andererseits haben In-vitro-Untersuchungen gezeigt, daß Zink in einer Konzentration von 10^{-4} M die Aktivität der Hefe-Ribonuclease, eines Enzyms, das für die Katabolisierung der Ribonucleinsäuren verantwortlich ist (Ohtaka et al., 1963), vollständig hemmt. Umgekehrt konnten in Zn-Mangelgeweben von Ratten (Somers und Underwood, 1969; Prasad und Oberleas, 1973) und Menschen (Prasad et al., 1975; Prasad et al., 1978; Mahajan et al., 1982) erhöhte Enzymaktivitäten der Ribonuclease festgestellt werden. Die Bestimmung der Aktivität des zinkabhängigen Enzyms Ribonuclease könnte daher ein weiterer nützlicher Parameter für die Diagnose und Bestimmung der Zn-Versorgung und des Zn-Status bei Mensch und Tier sein. Die folgende Untersuchung soll zeigen, inwieweit die Aktivität der Ribonuclease in Geweben, die empfindlich auf einen alimentären Zn-Mangel reagieren, diese Forderung als ein weiterer verfügbarer Laborparameter erfüllen kann.

Material und Methoden

27 entwöhnte männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem mittleren Lebendgewicht von 47 ± 3 g wurden in 3 Gruppen zu je 9 Tieren eingeteilt. Sie bestanden aus einer Zn-Mangelgruppe, die eine Diät mit einem Zn-Gehalt von 3 mg/kg Trockensubstanz (TS) zur freien Verfügung erhielten, und einer Pair-fed- bzw. Ad-libitum-Kontrollgruppe mit einem Diät-Zn-Gehalt von 60 mg/kg TS. Die Pair-fed-Kontrollgruppe erhielt hierbei nur diejenige Diätmenge, die tags zuvor freiwillig von den Zn-Mangeltieren aufgenommen wurde. Die Versuchstiere wurden jeweils zu dritt in metallfreien Kunststoffkäfigen aus Makrolon gehalten. Die Unterbringung erfolgte in einem klimatisierten Raum bei etwa 23 °C und 60 % relativer Luftfeuchtigkeit. Nach 21 Versuchstagen wurden alle Tiere zur Urinsammlung für einen Tag einzeln in Stoffwechselkäfigen gehalten und anschließend nach einer 12stündigen Nüchterner unter Athernarkose dekapiert und sofort seziert.

Die Aktivität der alkalischen Ribonuclease (RNase) (EC 3.1.27.5) wurde nach der von Prasad und Oberleas (1973) modifizierten Methode von Sekine et al. (1969) in Serum, Hoden, Femur, Urin, Leber und Nieren bestimmt. Die Zn-Konzentration der einzelnen Gewebe und Organe wurde durch Atomabsorptionspektrophotometrie gemessen. Der Proteingehalt wurde mit Hilfe einer modifizierten Biuret-Methode (Inchiosa, 1964) ermittelt. Die mathematisch-statistische Auswertung erfolgte nach Linder (1960). Bei den jeweils zu den Mittelwerten angegebenen \pm -Werten der Tabellen handelt es sich um die Standardabweichung der Einz尔werte. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche hochgestellte Buchstaben in den Tabellen gekennzeichnet.

Ergebnisse

Bei den Depletionstieren mit einem Diät-Zn-Gehalt von 3 ppm zeigten sich bald nach Beginn des Versuches Zn-Mangelsymptome, wie sie bereits in früheren Untersuchungen ausführlich beschrieben wurden (Pallauf und Kirchgeßner, 1972; Roth und Kirchgeßner, 1975). Das Lebendgewicht der zu Versuchsbeginn 47 g schweren Tiere betrug bei Versuchsende nach 22 Tagen 60 g im Falle der Zn-Mangelratten, 79 g für die Pair-fed-Tiere und 157 g für die Ad-libitum-Kontrolltiere.

Wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist, weisen die Gewebe und Organe der Zn-Mangelratten mit Ausnahme der Leber gegenüber pair-fed als auch ad libitum gefütterten Kontrolltieren signifikant reduzierte Zn-Konzentrationen auf. Die durch den alimentären Zn-Mangel bedingte Abnahme der Zn-Konzentrationen der Depletionstiere im Vergleich zu den Pair-fed- bzw. Ad-libitum-Kontrollratten betrug beim Serum 70 bzw. 68 %, beim Femur 57 bzw. 62 %, im Hoden 29 bzw. 31 % und in den Nieren 28 bzw. 24 %.

Die Aktivität der Ribonuclease, eines zinkabhängigen Enzyms, war im Serum der Zn-Mangelratten gegenüber den ad libitum gefütterten Kontrollratten um 49 % erniedrigt (Tab. 2). Im Vergleich zu den Pair-fed-Kontrolltieren, deren Diät zwar ausreichend Zink enthielt, die aber stark restriktiv gefüttert wurden, zeigten sich keine Aktivitätsunterschiede. Dies bedeutet, daß die erniedrigte Aktivität der Ribonuclease im Serum

Tabelle 1. Zn-Konzentrationen in Serum, Femur, Hoden, Urin, Leber und Nieren von Zn-Mangel- und Kontrollratten.

| Gewebe (Zn-Konzentration) | Zn-Mangelratten (3 ppm Diät-Zn) | Pair-fed- Kontrollratten (60 ppm Diät-Zn) | Ad-libitum- Kontrollratten (60 ppm Diät-Zn) |
|------------------------------|------------------------------------|---|---|
| Serum (µg Zn/ml) | 0,44 ± 0,08 ^a | 1,45 ± 0,14 ^b | 1,38 ± 0,12 ^b |
| Femur (µg Zn/g TS) | 98,0 ± 6,2 ^a | 226 ± 13 ^b | 260 ± 7 ^c |
| Hoden (µg Zn/g TS) | 133 ± 16 ^a | 188 ± 19 ^b | 193 ± 14 ^b |
| Leber (µg Zn/g TS) | 81,8 ± 7,1 ^a | 84,9 ± 5,6 ^a | 84,4 ± 6,7 ^a |
| Nieren (µg Zn/g TS) | 106 ± 7 ^a | 147 ± 13 ^b | 139 ± 11 ^b |

Tabelle 2. Aktivität der Ribonuclease in Serum, Femur, Hoden, Harn, Leber und Nieren von Zn-Mangel- und Kontrollratten.

| Gewebe (Aktivität) | Zn-Mangelratten (3 ppm Diät-Zn) | Pair-fed- Kontrollratten (60 ppm Diät-Zn) | Ad-libitum- Kontrollratten (60 ppm Diät-Zn) |
|-----------------------|------------------------------------|---|---|
| Serum (Δ E/min/ml) | 0,90 ± 0,07 ^a | 1,09 ± 0,29 ^a | 1,75 ± 0,22 ^b |
| Hoden (Δ E/min/g FS) | < Nachweisgrenze (0,00) | 0,64 ± 0,21 ^b | 0,94 ± 0,03 ^c |
| Femur (Δ E/min/g FS) | 2,71 ± 0,51 ^a | 2,23 ± 0,30 ^a | 2,65 ± 0,35 ^a |
| Harn (Δ E/min/ml) | 1,53 ± 0,31 ^a | 1,13 ± 0,59 ^a | 1,69 ± 0,73 ^a |
| Leber (Δ E/min/g FS) | 2,29 ± 0,12 ^a | 2,27 ± 0,16 ^a | 2,53 ± 0,14 ^b |
| Nieren (Δ E/min/g FS) | 11,6 ± 2,7 ^a | 5,7 ± 3,0 ^b | 6,4 ± 1,6 ^b |

Tabelle 3. Proteinkonzentration in Serum, Femur, Hoden, Leber und Nieren von Zn-Mangel- und Kontrollratten.

| Gewebe (Proteinkonzentration) | Zn-Mangelratten (3 ppm Diät-Zn) | Pair-fed- Kontrollratten (60 ppm Diät-Zn) | Ad-libitum- Kontrollratten (60 ppm Diät-Zn) |
|----------------------------------|------------------------------------|---|---|
| Serum (g Protein/100 ml) | 5,08 ± 0,27 ^a | 5,73 ± 0,21 ^b | 5,81 ± 0,17 ^b |
| Femur (mg Protein/g FS) | 26,3 ± 5,0 ^a | 35,4 ± 4,6 ^b | 31,8 ± 3,3 ^b |
| Hoden (mg Protein/g FS) | 47,4 ± 3,7 ^a | 45,0 ± 2,7 ^a | 51,6 ± 1,1 ^b |
| Leber (mg Protein/g FS) | 124 ± 2 ^a | 127 ± 5 ^a | 139 ± 3 ^b |
| Nieren (mg Protein/g FS) | 73,5 ± 2,9 ^a | 73,0 ± 2,9 ^a | 79,3 ± 1,9 ^b |

der Zn-Mangelratten und der Pair-fed-Tiere mit der reduzierten Futteraufnahme zusammenhängt. Im Hoden der Mangeltiere sank die Aktivität der Ribonuclease unter die analytische Nachweisgrenze und unterschied sich damit signifikant von den Werten der beiden Kontrollgruppen. Aber auch hier führte die verminderte Futteraufnahme der Pair-fed-Kontrollratten gegenüber den ad libitum gefütterten Tieren zu einem Aktivitätsabfall von 32 %. Demnach bewirkten im Hoden sowohl alimentärer Zn-Mangel als auch verminderte Futteraufnahme reduzierte Aktivitäten der Ribonuclease. In Femur und Urin waren bei allen 3 Versuchsgruppen keine signifikanten Aktivitätsunterschiede festzustellen. Die Aktivität der Ribonuclease in der Leber der Zn-Mangeltiere war zwar im Vergleich zu den Ad-libitum-Kontrollratten um 10 % reduziert, aber identisch mit den Leberwerten der Pair-fed-Gruppe, was wiederum als Futteraufnahmeeffekt zu deuten ist. Dagegen zeigte sich in den Nieren der Zn-Mangelratten gegenüber den Pair-fed-Kontrolltieren sowie den ad libitum gefütterten Kontrollratten eine um 100 % höhere Aktivität der Ribonuclease.

Die Proteinkonzentration (Tab. 3) in Serum und Femur der Zn-Mangelratten war sowohl gegenüber den pair-fed als auch den ad libitum gefütterten Kontrollratten signifikant reduziert. In Hoden, Leber und Nieren der Zn-Mangelratten war die Proteinkonzentration lediglich gegenüber den ad libitum gefütterten Kontrolltieren, nicht aber im Vergleich mit den Pair-fed-Kontrollratten, erniedrigt. Dies zeigt, daß in diesen drei Organen die reduzierte Proteinkonzentration der Zn-Mangeltiere wiederum auf die reduzierte Futteraufnahme und nicht auf die Zn-Mangelernährung zurückzuführen ist.

Diskussion

Die Aktivität der Hefe-Ribonuclease wird durch Zugabe von Zinkionen gehemmt. Umgekehrt fanden Somers und Underwood (1969) in den Hoden von Zn-Mangelratten mit signifikant geringeren Konzentrationen an Zink und Protein eine höhere Ribonucleaseaktivität im Vergleich zu pair-fed und ad libitum gefütterten Kontrollratten. Sie folgerten daraus, daß die erhöhte Ribonucleaseaktivität zu einem gesteigerten Proteinabbau führt, so daß der Protein- und Nucleinsäurenstoffwechsel in den Hoden der Zn-Mangelratten gestört ist. Bei physiologischen Konzentrationen

nen werden nämlich durch Hemmung der Ribonuclease die Ribonucleinsäuren vor übermäßigem Abbau geschützt. Dagegen erhöhte sich bei den niedrigen testikulären Zn-Konzentrationen der Zn-Mangelratten die Ribonucleaseaktivität und damit der Proteinabbau, was an der verminderten Proteinkonzentration zu erkennen ist. Auch in den Untersuchungen von Prasad und Oberleas (1973) zeigten sich in Hoden, Nieren, Knochen und Thymus von Zn-Mangelratten höhere Aktivitäten der Ribonuclease als bei den Kontrolltieren. Diese werden auch teilweise für die Wachstumsverzögerung nach Zn-Mangelernährung verantwortlich gemacht, wie sie bei vielen tierischen Spezies sowie auch beim Menschen auftreten. Auch bei Patienten mit Sichelzellenanämie, deren Plasma-Zn-Gehalte reduziert waren und die sich möglicherweise in einem Zn-Mangelstatus befinden, war die Ribonucleaseaktivität im Plasma gegenüber Kontrollpatienten gesteigert (Prasad et al., 1975). Nach einer Zn-Therapie erhöhte sich der Plasma-Zn-Gehalt, und die Aktivität der Plasmaribonuclease erniedrigte sich wieder.

Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu den vorliegenden Versuchsergebnissen. Obwohl die Zn-Konzentrationen in Serum, Hoden, Femur und Nieren der Mangeltiere signifikant erniedrigt waren, erhöhte sich die Aktivität der Ribonuclease nur in den Nieren, während sie in Serum, Femur, Urin und Leber unverändert und im Hoden sogar unter der Nachweisgrenze lag. Die Proteinkonzentration war nur in Serum und Femur erniedrigt, die Abnahme der Proteinkonzentration in Hoden, Leber und Nieren mußte hingegen der verminderten Futteraufnahme und nicht dem Zn-Mangel zugeschrieben werden. Diese Ergebnisse werden im Prinzip durch die Untersuchungen von Chesters und Will (1978) bestätigt, die bei Zn-Mangelratten im Vergleich zu Pair-fed-Kontrolltieren feststellten, daß die Aktivität der alkalischen Ribonuclease in Leber, Nieren und Hoden unverändert im Thymus erhöht und im Ösophagus reduziert war. Auch sie vermuten, daß die Wirkung von Zn-Mangel auf die Aktivität der alkalischen Ribonuclease wahrscheinlich aufgrund sekundärer Effekte zustande kommt, da eine Reduktion der Futteraufnahme oder der Wachstumsrate gewebespezifische Änderungen der Ribonuclease und der Ribonuclease-Inhibitorkonzentration verursacht (Chesters und Will, 1978). Die zur In-vitro-Hemmung der Aktivität der Ribonuclease erforderlichen Konzentrationen an Zink waren so hoch, so daß man davon ausgehen kann, daß eine Änderung der Gewebe-Zn-Konzentration infolge alimentären Zn-Mangels die Enzymaktivität nicht zu beeinflussen vermag.

In einem Schlundsondenexperiment (Faraji und Swendseid, 1983), bei dem die Zn-Mangelratten die gleiche Diätmenge erhielten wie die Kontrolltiere, zeigten sich in allen untersuchten Geweben keine Unterschiede in der Aktivität der alkalischen Ribonuclease. Auch in einem Per-ox-Versuch der gleichen Autoren war kein Unterschied in der Aktivität der Ribonuclease in Plasma, Leber und Nieren zwischen Zn-Mangel- und Pair-fed-Ratten festzustellen. Dagegen lag bei ad libitum gefütterten Kontrollratten die Ribonucleaseaktivität signifikant höher als bei Pair-fed- oder Zn-Mangelratten.

Insgesamt kann aus den vorliegenden Ergebnissen gefolgert werden, daß die Wirkung eines Diät-Zn-Mangels bei Ratten auf die Aktivität der alkalischen Ribonuclease in den verschiedenen Geweben mehr die Folge

einer veränderten Futteraufnahme und Wachstumsrate ist und nicht ein direkter Effekt von Zink auf das Enzymsystem. Somit eignet sich die Aktivitätsbestimmung der alkalischen Ribonuclease nicht als Parameter zur Diagnose des Zn-Versorgungsstatus.

Literatur

1. Chesters JK, Will M (1978) Br J Nutr 39:375–382
2. Faraji B, Swendseid ME (1983) J Nutr 113:447–455
3. Inchiosa MA (1964) J Lab Clin Med 63:319–324
4. Kirchgeßner M, Roth HP (1975) Zbl Vet Med A22:14–26
5. Kirchgeßner M, Roth HP, Weigand E (1976) Biochemical changes in zinc deficiency. In: Trace elements in human health and disease, Vol I:189–225, Academic Press, New York
6. Linder A (1960) Statistische Methoden für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure, 3. Aufl, Birkhäuser Verlag, Basel Stuttgart
7. Mahajan SK, Prasad AS, Rabbani P, Briggs WA, McDonald FD (1982) Am J Clin Nutr 36:1177–1183
8. Ohtaka Y, Uchida K, Sakai T (1963) J Biochem 54:322–327
9. Pallauf J, Kirchgeßner M (1972) Veterinär-Medizinische Nachrichten H4:321–331
10. Prasad AS, Oberleas D (1973) J Lab Clin Med 82:461–466
11. Prasad AS, Schoomaker EB, Ortega J, Brewer GJ, Oberleas D, Oelshleger FJ, Jr (1975) Clin Chem 21/4:582–587
12. Prasad AS, Rabbani P, Abbasi A, Bowersox E, Fox Spivey MR (1978) Ann Intern Med 89:483–490
13. Sekine H, Nakano E, Sakaguchi K (1969) A Biochem Biophys Acta 174:202–210
14. Somers M, Underwood EJ (1969) Aust J Biol Sci 22:1277–1282

Eingegangen 24. April 1985

Für die Verfasser:

Dr. H.-P. Roth, Inst. f. Ernährungsphysiologie der Techn. Universität München in Freising-Weihenstephan, 8050 Freising-Weihenstephan