Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
8. Jg., S. 406—408 Juli 1970

Einfluß von Phenobarbital auf Cholesterin-Biosynthese und -Verteilung bei der Maus

Von P. Glogner und H. Krönert

Aus der Medizinischen Univ.-Poliklinik Marburg/Lahn (Komm. Direktor: Prof. Dr. D. Voss)

(Eingegangen am 13. März 1970)

Männliche Albinomäuse wurden in zwei Gruppen geteilt, von denen eine 0,1 proz. Phenobarbital-Natrium-Lösung anstatt Trinkwasser erhielt. Nach 1, 4, 8, 23 und 30 Tagen wurden je 3 Tiere beider Gruppen getötet. Bestimmt wurden: Körpergewicht, relatives und absolutes Lebergewicht, Cholesterinsynthese aus ^{14}C-markiertem Natriumacetat in Leberschnitten, Protein-, Cholesteringehalt (frei und gesamt) sowie Serumcholesterin.
Die Ergebnisse zeigen, daß die Cholesterinsynthese in der Leber unter Phenobarbital in den ersten 8 Tagen stark gehemmt wird. Später wird von den vergrößerten Lebern insgesamt mehr Cholesterin gebildet. Lebercholesteringehalt und Esterquotient bleiben konstant, möglicherweise, weil die Substanz vermindert in das Blut abgegeben wird. Ein Hinweis darauf ist ein bis zum 23. Tag herabgesetzter Serumcholesterinspiegel. Die Ergebnisse werden diskutiert.

The effect of phenobarbital on the biosynthesis and distribution of cholesterol in the mouse

Male albino-mice were divided in two groups, one of which received a 0,1% solution of phenobarbital-sodium instead of drinking water up to one month.
After 1, 4, 8, 23 and 30 days 3 animals of each group were killed. Liver and body weight, cholesterol-biosynthesis from ^{14}C-acetate in liver slices, cholesterol- and protein content of the livers and plasma cholesterol (free and total) were measured.
The results show that the cholesterol synthesis in the livers of the phenobarbital-treated mice is strongly inhibited during the first 8—10 days (up to 67%).
Later on, more cholesterol is synthesized by the enlarged livers. The total cholesterol content of the livers remains constant, possibly because the release into the blood is reduced. Therefore the plasma cholesterol level is significantly lower. After 4 weeks there is no difference in plasma cholesterol compared with the control group. The results are discussed.

Nach Behandlung mit Phenobarbital kommt es bei Mäusen zu strukturellen und biochemischen Veränderungen in der Leber. Hervorzuheben sind eine Vergrößerung des Organs, Vermehrung des endoplasmatischen Retikulums mit erhöhter Aktivität fremdstoffoxydierender Enzyme, verstärkter Eiweißsynthese und Verschiebung des Verhältnisses NADP/NADPH zur oxydierten Seite (1—3). Parallel dazu wird Glucose vermehrt über den Pentosephosphatweg abgebaut (3), dessen Aktivität wahrscheinlich durch das NADP-Angebot limitiert wird (4).

Die Cholesterinsynthese aus Acetat benötigt bei mehreren Schritten reduziertes NADP: Bei der Reduktion von β-Hydroxy-β-methylglutaryl-Coenzym-A zur Mevalonsäure, ihrer Umwandlung zu Squalen und schließlich auf dem Wege von Squalen zum Endprodukt (5, 6). Bei diesen eingreifenden Stoffwechselveränderungen durch Phenobarbital lag es nahe zu prüfen, ob und wie die Cholesterinsynthese beeinflußt wird. Das Serumcholesterin wird ganz überwiegend in der Leber synthetisiert, dort mit langkettigen Fettsäuren verestert und bildet in freier und gebundener Form das Reservoir für die Organe (7). Eine Störung der Cholesterinsynthese müßte daher Folgen für die Verteilung im Serum und im peripheren Stoffwechsel haben. Prinzipiell sollte auch geklärt werden, ob induzierende Pharmaka wie Phenobarbital einen hypocholesterinämischen Effekt haben und ob dieser, falls anhaltend, eventuell therapeutisch ausgenutzt werden könne.

Material und Methoden

Männliche Mäuse eines schwedischen Inzuchtstammes, Durchschnittsgewicht etwa 30 g, erhielten ad libitum statt Wasser 0,1proz. Phenobarbital-Natriumlösung, die Kontrolltiere Trinkwasser. Standardfutter: Altromin-R nach Belieben. Nach 1, 4, 8, 23 und 30 Tagen wurden die Tiere getötet. Das Carotisblut wurde in den Zentrifugenröhrchen aufgefangen.
Nach Freipräparieren der Leber wurde das Organ in eiskalte Tyrodelösung eingelegt. Vom rechten Leberlappen stellten wir sehr dünne Schnitte her, die sich in der Tyrodelösung entfalteten. Die Schnitte wurden auf Filtrierpapier mit feiner Pinzette abgetupft und auf einem Uhrglas gewogen.
Jeweils 25 $\pm$ 1 mg Schnitte wurden in den Hauptraum von Warburg-Kegelgefäßen, Volumen etwa 5 m*l*, übergeführt. Weitere Beschickung der Gefäße: *Hauptraum*: 0,5 m*l* Warburg-Ringer-Glucoselösung, 0,02 m*l* Natrium-^{14}C-Acetat (u) = 2 μC (Radiochemical Centre, Amersham, England); spezif. Aktivität 28,2 m C/mMol. Endkonzentration 0,13 mM Acetat. *Einsatz*: 0,1 m*l* Hyaminhydroxyd, Packard. *Birne*: 0,2 m*l* 10proz. Perchlorsäure. Nach 5 Min. Äquilibrieren bei 37° im Warburg-Gerät, 3 Min. Begasen mit O_2, Schließen der Hähne, Schüttelfrequenz 90 Min., 37°, Versuchsdauer 1 Std. Danach Abstoppen durch Einkippen der Perchlorsäure.
Von jeder Maus wurden 3 Parallelversuche angesetzt. Die Untersuchung von Kontrolltieren und Phenobarbital-behandelten Mäusen erfolgte ebenfalls parallel zum gleichen Zeitpunkt.
Isolierung des Cholesterins: Überführen des Hauptrauminhaltes mit 4 m*l* Aceton/Äthanol (1 : 1, v/v) in Homogenisationsröhrchen nach Potter. 3 Min. Homogenisieren mit Teflon-Pistill unter Eiskühlung. 10 Min. Zentrifugieren bei 4000 U./Min. Zugabe von 0,1 m*l* acetathaltiger äthanolischer Cholesterinlösung (500 mg/100 m*l*) zum Überstand zur optimalen Ausfällung des markierten Cholesterins. Fällung mit 1proz. heißer Digitoninlösung. Nach 12 Stdn. Abzentrifugieren des Sediments 20 Min. bei 4000 U./Min. Vollständiges vorsichtiges Dekantieren des Überstandes, zwei-

faches Waschen des Sediments in 8 m/ 50proz. Äthanol, erneutes Zentrifugieren und Spaltung des ausgefällten Cholesterin-Digitoninkomplexes mit 1 m/ 10proz. äthanolischer Kaliumacetatlösung bei 70°. Zugabe von 2 m/ Äthanol und 12 m/ Szintillatorflüssigkeit (5 g PPO + 0,3 g Dimethyl-POPOP, Fa. Packard, / 1000 m/ Toluol).

Messung der ^{14}C-Aktivität im Flüssigkeitsscintillationszähler Packard 3375 in Polyäthylenmeßgefäßen. Meßkorrektur: Toluol-^{14}C-Standardreihe verschiedener Aktivitäten. Auswertung der Meßergebnisse über das Kanalverhältnis mit Hilfe einer Korrekturkurve.

Die Cholesterinbestimmung wurde mit der Methode von Zak (8) durchgeführt. Die Isolierung aus Serum und Lebergewebe erfolgte prinzipiell in der gleichen Weise. Der gefällte Cholesterin-Digitoninkomplex wurde 2 mal mit Äther gewaschen, abzentrifugiert, der Überstand vollständig dekantiert und das Sediment mit Restflüssigkeit im Exsikkator zur Trockene eingedampft. Zur Bestimmung des gesamten Cholesterins wurde der Aceton/Äthanolextrakt eingedampft, der Rückstand in Eisessig aufgenommen und die Messung direkt durchgeführt, da sich die Alkalihydrolyse der Ester als zu störanfällig erwies.

Das Lebereiweiß bestimmten wir mit der Biuret-Methode aus einem 5proz. wäßr. Homogenat.

Ergebnisse

Nach Behandlung mit Phenobarbital kommt es bei Mäusen zu einem Anstieg des absoluten und relativen Lebergewichtes. Vom 8. Tage an war der Unterschied gegenüber den Kontrollen signifikant (Tab. 1). Die Proteinkonzentration in der Leber nimmt unter Phenobarbital deutlich zu und ist trotz der sehr kleinen Untersuchungsgruppe am 4., 8. und 23. Tag signifikant höher.

Tab. 1
Relatives Lebergewicht und Proteinkonzentration in der Mäuseleber unter Phenobarbital

Tage	Kontrolle rel. Lebergewicht (mg/g Maus)	Kontrolle Protein (mg/g Leber)	Phenobarbital rel. Lebergewicht (mg/g Maus)	Phenobarbital Protein (mg/g Leber)	Signifikanz p
1	52	160	60	157	n. s. n. s.
4	58	142	78	180	n. s. < 0,004
8	54	135	79	163	< 0,02 < 0,003
23	60	129	102	144	< 0,003 < 0,02
30	56	132	90	144	< 0,002 n. s.

n. s. = nicht signifikant

Der Einbau von ^{14}C-Acetat in das Cholesterin wird, wie aus Abbildung 1 hervorgeht, unter dem Einfluß von Phenobarbital gehemmt. Da bei den Versuchsgruppen die Einbaurate in der Zeiteinheit spontan stark schwankt, gibt die prozentuale Hemmung der Cholesterinbiosynthese gegenüber den Kontrollen ein klareres Bild (Abb. 2a).

Die Grafik gibt aber lediglich wieder, wie stark dieser Einfluß bezogen auf Gramm Lebergewicht ist. Die Lebern phenobarbitalbehandelter Tiere sind jedoch größer. Nimmt man die erforderliche Korrektur vor und vergleicht den Einfluß von Phenobarbital auf die Synthese von Cholesterin mit den Kontrollen so ergibt sich, daß in den ersten 8(—10) Tagen Cholesterin vermindert gebildet wird. Ebenso verhält sich die spezifische Aktivität. Später ist diese Bilanz positiv, d. h. die vergrößerten Lebern synthetisieren insgesamt mehr Cholesterin unter dem induzierendem Agens (Abb. 2b).

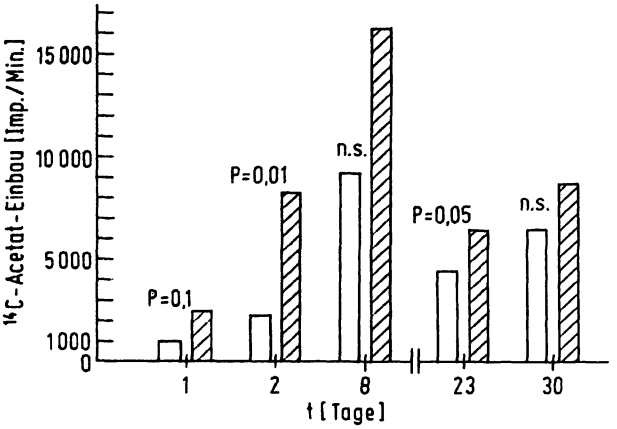
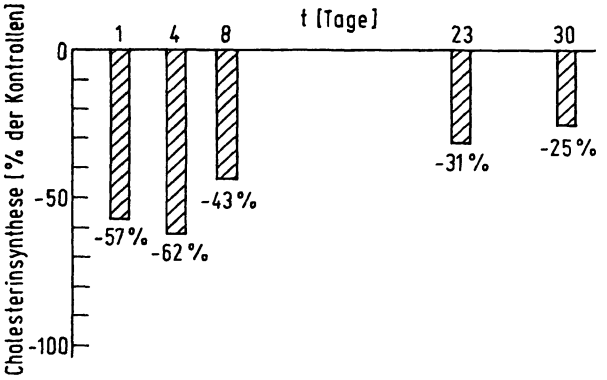
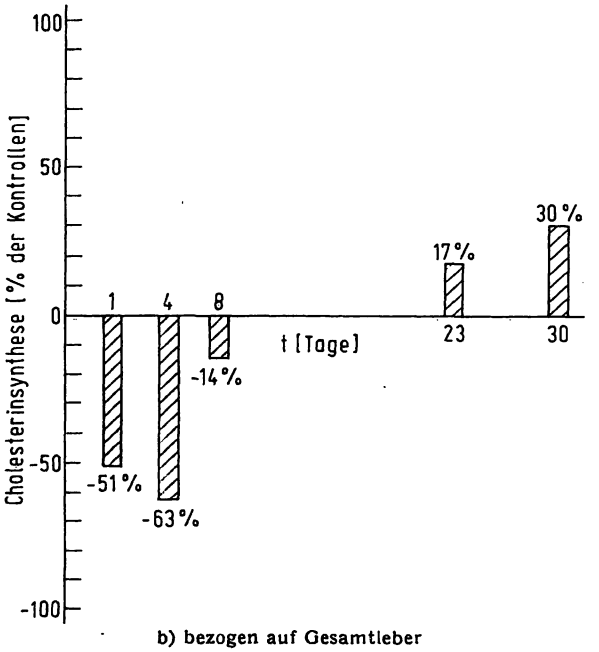


Abb. 1
Einbau von ^{14}C-markiertem Acetat in das Lebercholesterin bei chronischer Verabfolgung von Phenolbarbital (weiße Säulen n = 3) im Vergleich zu Kontrollen (schraffierte Säulen, n = 3) (Imp./Min. pro 25 mg Leberschnitte, Feuchtgewicht)



a) bezogen auf g Leber



b) bezogen auf Gesamtleber

Abb. 2
Prozentuale Hemmung der Cholesterinsynthese aus Acetat in der Leber nach Phenolarbital

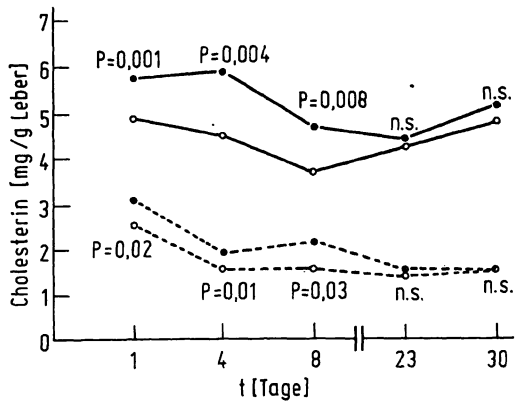


Abb. 3

Cholesterinkonzentration in der Leber • = Kontrollen (n = 3), o = Phenobarbital (n = 3). Durchgezogene Linien = Gesamtcholesterin, gestrichelte = freies Cholesterin, p = Signifikanz der Differenzwerte

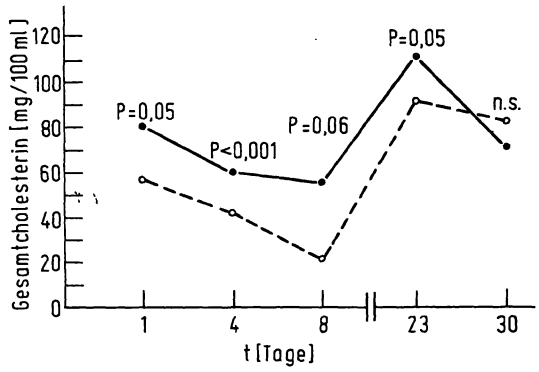


Abb. 4

Verhalten des Serumcholesterinspiegels bei Mäusen. •——• Kontrollen (n = 3) o- - - - -o chron. Behandlung (n = 3) mit Phenobarbital

Die Konzentration des gesamten wie des veresterten Cholesterins ist bis zum 23. Tag in der Leber signifikant erniedrigt, wenn Phenobarbital verabfolgt wird. Später ist kein Unterschied zur Kontrollgruppe mehr festzustellen (Abb. 3).

Rechnet man diese Werte auf die gesamte Leber um, so zeigt sich aber, daß in beiden Gruppen und in den ersten 8 Tagen der Cholesteringehalt gleich groß ist. Nach dem 23. Tag findet sich sogar mehr Lebercholesterin in der Behandlungsgruppe. Der Ester-Quotient liegt annähernd konstant bei 35—40% und bleibt unbeeinflußt. Das Serumcholesterin (Abb. 4) fällt unter Phenobarbitalbehandlung rasch ab. Die Erniedrigung ist bis zum 23. Tag nachweisbar.

Die Befunde sind so zu deuten, daß Phenobarbital die Cholesterinsynthese der Leber rasch hemmt. Der Cholesteringehalt der Leber bleibt konstant, da vermutlich Cholesterin vermindert in das Serum abgegeben wird. Nach 3 Wochen nehmen Cholesterinproduktion und sein Gehalt in der Leber zu. Der Blutspiegel gleicht sich verzögert an.

Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, daß vorübergehend unter Phenobarbital eine Hemmung der Cholesterinsynthese in der Leber eintritt. Die Frage nach der Ursache dafür bleibt noch offen. Es ist möglich, daß es durch die Induktion der hydroxylierenden Enzymsysteme in den Mikrosomen (2) zu einem Mehrverbrauch und Mangel an stationärem NADPH kommt, wodurch wiederum die Cholesterinsynthese gehemmt wird, die ebenfalls NADPH benötigt. An welcher Stelle es zu einem Aufstau von Zwischenprodukten kommt, muß noch abgeklärt werden. Im Gegensatz zu den mitgeteilten Resultaten fanden Jones und Armstrong an Goldhamstern eine aktivierte Synthese nach 4tägiger Phenobarbitalbehandlung. Möglicherweise ist eine 24stdg. Fastenperiode vor den Versuchen für das abweichende Verhalten verantwortlich. Eine Aktivierung wurde auch an den Mikrosomenfraktionen von Rattenlebern nach einwöchiger Phenobarbital-Therapie beobachtet. Sie war jedoch im wesentlichen auf den Weg Mevalonsäure-Cholesterin beschränkt (10). Die zitierten Arbeiten geben die Synthese lediglich zu einem Zeitpunkt nach Phenobarbital-Behandlung wieder. Diese Befunde sind mit unseren nicht vergleichbar.

Der Einfluß von Phenobarbital ist abhängig von der Dauer der Behandlung, d.h. die anfängliche Hemmung der Cholesterinsynthese geht bei chronischer Verabfolgung in eine Aktivierung über. Die Aktivierung ist an die Lebervergrößerung gebunden. Die Befunde lassen es als zweifelhaft erscheinen, durch induzierende Pharmaka wie Phenobarbital einen anhaltenden Effekt auf die Lebercholesterinsynthese und den Cholesterinspiegel im Serum auszuüben, der evtl. therapeutisch genutzt werden könnte. Offenbar heben komplexe gegenregulatorische Vorgänge die Wirkung auf.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für die Unterstützung dieser Arbeit, die Teile der Dissertation von H. Krönert enthält, gedankt.

Literatur

1. Conney, A. H., C. Davison, R. Gastel und J. J. Burns, J. Pharmacol. Exper. Therap., Baltimore *130*, 1 (1960). — 2. Remmer, H., Arch. exp. Path. Pharmakol. *235*, 279 (1959). — 3. Kunz, W., G. Schaude, H. Schimmassek, W. Schmid und W. Siess, Proc. of the Europ. Soc., for the Study of Drug Toxicity VII. Rom, (1966). — 4. Hollmann, S., Nicht-glykolytische Stoffwechselwege der Glukose. G. Thieme Verlag, Stuttgart (1961). — 5. Chen, T. T. und K. Bloch, J. biol. Chemistry *226*, 921 (1957). — 6. Olson, J. A., M. Lindberg und K. Bloch, J. biol. Chemistry *226*, 941 (1957). — 7. Cook, R. P., Cholesterol. Academic. Press, New York, (1958). — 8. Zak, B. und N. Ressler, Amer. J. Clin. Path. *25*, 433 (1955). — 9. Jones, A. L. und D. T. Armstrong, Proc. Soc. exp. Biol. Med., New York *119*, 1136 (1965). — 10. Wada, F., K. Hirata und Y. Sakamoto, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) *143*, 273 (1967).

Doz. Dr. med. P. Glogner
cand. med. Heinz Krönert
Medizinische Universitäts-Poliklinik
355 Marburg (Lahn)
Robert-Koch-Str. 7a