

Die β -Glucuronidase-Aktivität im Serum, Leber- und Nierengewebe beim Alloxan-Diabetes

R. E. DOHRMANN und M. KÖHLER

Medizinische Universitäts-Poliklinik Bonn (Direktor: Prof. Dr. F. TIEMANN)

Eingegangen am 28. März 1966

Activity of β -Glucuronidase in Serum, liver- and kidney tissue in Alloxan-Diabetes.

Summary. The β -Glucuronidase activities in the serum as well as in liver and kidney tissues were estimated. The following results were obtained. — 1. The serum β -Glucuronidase during diabetic metabolic decompensation was very high, where an increase of activity of approximately 10 times the one of the control group (around 530 γ /100 ml p-hr.) was measured. — 2. The diabetic animals showed their outstandingly high serum β -Glucuronidase activities through pronounced polyurea. Relations between serum activity and high blood sugar concentration in respect to urine sugar excretion could not be ascertained in the results on hand. — 3. In half the diabetic animals, the β -Glucuronidase activities of hepatic and renal tissues were low, whilst the activities in the rest of the animals tested coincided with the mean values of the control group.

L'activité de la bêta-glucuronidase dans le sérum et dans les tissus du foie et du rein dans le diabète induit par l'alloxane.

Résumé. Les activités de la β -Glucuronidase dans le sérum ainsi que dans les tissus hépatiques et rénaux chez les rats alloxanement diabétiques ont été mesurées. Les résultats suivants ont été obtenus. — 1. La β -Glucuronidase dans le sérum durant la décompensation métabolique diabétique est grandement augmentée, alors une activité tout au plus 10 fois supérieure à celle du groupe de contrôle (environ 530 γ /100 ml hre) a été enregistrée. — 2. Les

animaux diabétiques montrent leur augmentation des activités de la β -Glucuronidase dans le sérum par une polyurie assez prononcée. Des relations entre l'activité du sérum et l'importance de la concentration en sucre, compte tenu de l'excrétion du sucre dans l'urine, ne peuvent être reconnues dans les résultats disponibles. — 3. Chez la moitié des animaux diabétiques, les activités de la β -Glucuronidase dans les tissus hépatiques et rénaux étaient diminuées, alors que les activités chez le reste des animaux examinés coïncidaient avec la moyenne des valeurs obtenues chez le groupe de contrôle.

Zusammenfassung. Bei alloxan-diabetischen Ratten wurden die β -Glucuronidase-Aktivitäten des Serums sowie des Leber- und Nierengewebes bestimmt. Hierbei ergaben sich folgende Befunde: — 1. Die Serum- β -Glucuronidase ist im Zustand der diabetischen Stoffwechsellage stark erhöht, wobei maximal eine nahezu zehnfach höhere Aktivität als bei der Kontrollgruppe (ca. 530 γ /100 ml Std) gemessen wurde. — 2. Besonders hohe Serum- β -Glucuronidase-Aktivitäten wiesen die diabetischen Tiere mit hochgradiger Polyurie auf. Beziehungen zwischen der Serum-Aktivität und der Höhe der Blutzuckerkonzentration resp. Harnzuckerausscheidung ließen sich aus den vorliegenden Ergebnissen nicht erkennen. — 3. Bei der Hälfte der diabetischen Tiere waren die β -Glucuronidase-Aktivitäten des Leber- und Nierengewebes erniedrigt, während die Aktivitäten bei den übrigen Versuchstieren den Durchschnittswerten der Kontrollgruppe entsprachen.

1961 wurde erstmals über das auffällige Verhalten der Serum- β -Glucuronidase beim menschlichen Diabetes mellitus berichtet [3, 4]. Im Zustand der diabetischen Stoffwechsellage ist die Serum-Aktivität dieses Fermentes maximal bis auf das Zehnfache des Normalwertes erhöht, wobei keine Beziehungen zwischen der Höhe der β -Glucuronidase-Aktivität und der zugehörigen Blutzuckerkonzentration resp. Harnzuckerausscheidung bestehen. Diese Befunde konnten in jüngster Zeit von MILLER und Mitarb. weitgehend bestätigt werden [11].

In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob die β -Glucuronidase im Serum und zusätzlich in Leber und Niere beim experimentellen Alloxan-Diabetes ähnliche Veränderungen wie beim menschlichen Diabetes zeigt.

Methodik

Als Versuchstiere dienten männliche Ratten vom Stamm Sprague dawley mit einem durchschnittlichen Gewicht um 300 g. Die Untersuchungen wurden in zwei Versuchsreihen mit jeweils 4 Tieren durchgeführt.

Zur Erzeugung der diabetischen Stoffwechsellage wurde den Tieren einmalig 200 mg Alloxan/kg Körpergewicht subcutan injiziert. Alloxan (Fa. Merck) war in Phosphat-Citrat-Puffer mit einem pH von 4.0 in einer Konzentration von 40 mg/ml gelöst [9].

Entsprechend der Angaben von MANCHESTER und YOUNG [10] standen die Versuchstiere 24 Std vor der Alloxan-Injektion bei Flüssigkeitszufuhr unter Nahrungskarenz. Zur Vermeidung toxischer Nebenerscheinungen erhielten die Tiere vom 2.—7. Tag nach Alloxanzufuhr täglich 4 I.E. Depot-Insulin (Novo-Lente) subcutan, vom 8.—10. Tag 2 I.E./Tag und am 11. und 12. Tag je 1 I.E.

Vorbeugend gegen Hypoglycämien erhielten die Tiere vom 2.—10. Tag nach Alloxanzufuhr 1%ige Glucoselösung als Trinkflüssigkeit. Vom 13. Tag nach Versuchsbeginn ab wurde kein Insulin mehr gegeben, während Standardfutter (nach Prof. BÄHNER, Fa. Latz, Euskirchen) und Wasser weiterhin in beliebiger Menge angeboten wurde.

Am 17. Tag nach der Alloxaninjektion, zu welchem Zeitpunkt eine manifeste diabetische Stoffwechsellage bestand, erfolgten die Bestimmungen der β -Glucuronidase-Aktivitäten von Serum, Leber- und Nierengewebe, sowie des Blutzuckers und der Harnzuckerausscheidung. Die Tiere wurden durch Nackenschlag getötet und aus den Carotiden entblutet.

Die Bestimmung der β -Glucuronidase-Aktivität erfolgte nach einer früher beschriebenen Methode, wobei

die Menge des vom Substrat Phenolphthalein-Glucuronid fermentativ abgespaltenen Phenolphthaleins colorimetrisch gemessen wird [2]. Für die Bestimmung der Serum-Aktivität setzten sich die Ansätze aus 0.7 ml Acetatpuffer (pH 5.0), 0.2 ml Serum und 0.1 ml Phenolphthalein-Glucuronid (0.01 m, wässrig gelöst) zusammen. Für die Bestimmung der Organ- β -Glucuronidase, wurde Leber- und Nierengewebe mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:60 homogenisiert und das Homogenat 10 min bei 2500 rpm (~ 800 g) zentrifugiert. Die Fermentaktivität wurde in dem Überstand bestimmt, wobei sich die Ansätze aus 0.8 ml Acetatpuffer (pH 5.0), 0.1 ml Homogenat und 0.1 ml Substrat zusammensetzten. Für die Bestimmung der Leerwerte enthielten die Ansätze anstelle des Substrates die aliquote Menge Acetatpuffer. Die Ablesung der Extinktionen erfolgte mit Filter 546 m μ im Eppendorf-Photometer. Die Aktivitäten sind in „ γ -freigesetztes Phenolphthalein/100 ml Serum.Std“ resp. in „ γ -freigesetztes Phenolphthalein/g Gewebe.Std“ angegeben. Die Blutzuckerbestimmung erfolgte nach der Methode von HAGEDORN-JENSEN [7, 8].

Ergebnisse

Die für die Versuchstiere gleichen Alters und Gewichtes gültigen Normalwerte betragen für die Blutzuckerkonzentration 108 (103–115) mg%, die 24-Std Harnmenge 13 (12–15) ml, für die β -Glucuronidase-Aktivitäten des Serums 537 (462–583) γ /100 ml-Std, des Lebergewebes 46000 (25500–54000) γ /g Gewebe-Std und des Nierengewebes 13900 (10400–18400) γ /g Gewebe-Std.

In Tabelle 1 sind die Befunde von sechs alloxan-diabetischen Tieren zusammengefaßt, wobei das Ausmaß der bestehenden Stoffwechseldekompensation unterschiedlich stark war. Dieses zeigte sich in einer Gewichtsabnahme von –11 bis max. –32% des Ausgangswertes, einer Glucosurie von 0.3 bis max. 6.3 g% und einer Hyperglycämie bei 5 Tieren zwischen 185 bis 278 mg%. Die 24-Std-Harnmenge war bei vier Tieren mit 39 bis max. 73 ml erhöht, während bei zwei Tieren die Harnproduktion mit 7 und 12 ml im Normalbereich lag.

Die Glucuronidase-Aktivität des Serums war mit einer Ausnahme (Nr. 6) auf Werte zwischen 985 bis max. 4920 γ /100 ml-Std erhöht. Demgegenüber war das Verhalten der β -Glucuronidase-Aktivitäten des Leber- und Nierengewebes bei den diabetischen Tieren unterschiedlich. Bei drei Tieren (Nr. 2–4) lagen die Aktivitäten unterhalb des Normalwertes. Die β -Glucuronidase-Aktivität des Lebergewebes betrug

hierbei 11800 und 25000 γ /g Gewebe-Std und die des Nierengewebes 5220, 8500 und 8550 γ /g Gewebe-Std. Bei den übrigen Tieren (Nr. 1, 5, 6) entsprachen die Aktivitäten der Leber- β -Glucuronidase denen der Kontrollgruppe, während die Aktivität der Nieren- β -Glucuronidase in diesen Fällen etwas oberhalb der Normwerte (33200, 20000 und 19100 γ /g Gewebe-Std) lagen.

Besprechung

Nach den vorliegenden Befunden ist die Aktivität der Serum- β -Glucuronidase beim experimentellen Alloxan-Diabetes in ungefähr gleichem Ausmaß wie beim menschlichen Diabetes mellitus erhöht. Maximal wurden bis auf das Zehnfache des Normalwertes gesteigerte Aktivitäten gemessen. Beziehungen zwischen der Höhe der Serum- β -Glucuronidase-Aktivität und der Höhe der zugehörigen Blutzuckerkonzentration oder Harnzuckerausscheidung lassen sich aus den Ergebnissen nicht ableiten. Demgegenüber ist hervorzuheben, daß die Versuchstiere mit den Symptomen einer schweren diabetischen Stoffwechseldekompensation und insbesondere einer hochgradigen Polyurie die höchsten Serum- β -Glucuronidase-Aktivitäten zeigten, während die Fermentaktivität bei zwei diabetischen Tieren ohne gesteigerte Harnproduktion (Nr. 5, 6) einmal im Normbereich und im anderen Fall nur auf das Doppelte der Norm erhöht war.

Die β -Glucuronidase-Aktivitäten der Leber und Nieren wiesen eine relativ große Schwankungsbreite auf, wobei die Werte für das Lebergewebe (12000–56000 γ /g Gewebe-Std) etwa doppelt bis vierfach höher als die des zugehörigen Nierengewebes (5500–33000 γ /g Gewebe-Std) lagen. Beim Alloxan-Diabetes waren die Aktivitäten der Organ- β -Glucuronidasen in der Hälfte der Fälle niedriger als die der Kontrollgruppe. Hierzu ist insbesondere der Befund bei Tier Nr. 4 mit einer Fermentaktivität der Leber von nur 11800 γ /g Gewebe-Std und einer Aktivität des Nierengewebes von 5220 γ /g Gewebe-Std hervorzuheben. Bei den übrigen diabetischen Tieren war die Organ- β -Glucuronidase im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht erhöht.

Aufgrund dieses Verhaltens erhebt sich die Frage, ob die erhöhten Serum- β -Glucuronidase-Aktivitäten durch eine pathologisch gesteigerte Zellpermeabilität (z. B. von Leber, Niere und Pancreas) zu erklären sind,

Tabelle 1. Verhalten von Blutzucker, Harnzucker, 24-Std-Harnmenge und β -Glucuronidase-Aktivität von Serum, Leber und Nieren beim Alloxan-Diabetes der Ratte

Protok. Nr.	Nr.	Tiergewicht		Gewichtsverlust (in %)	Blutzucker (mg %)	Harnzucker (g %)	Aceton i. Harn	Harnmenge (ml/24 Std)	β -Glucuronidase-Aktivität		
		Vers. Beg.	Vers. Ende						Serum (γ /100 ml-Std)	Leber (γ /g Gewebe-Std)	Niere (γ /g Gewebe-Std)
IV/24/6/64	1	250	170	–32	278	6.3	∅	73	3480	50000	33200
II/12/5/64	2	300	230	–24	255	3.0	∅	65	4080	25000	8500
I/12/5/64	3	260	210	–19	206	2.2	∅	56	2270	25000	8550
III/12/5/64	4	220	180	–18	186	2.4	∅	39	4920	11800	5220
II/24/6/64	5	370	330	–11	117	0.3	∅	12	985	40500	20000
I/24/6/64	6	300	250	–17	185	0.8	∅	7	480	45000	19100

wodurch eine Verschiebung der Enzymkonzentration vom intracellulären in den extracellulären Raum erfolgen würde. Unter dieser Vorstellung wäre jedoch zu fordern, daß beim Diabetes mellitus auch die Aktivitäten anderer Fermente im Blut erhöht sind. Da jedoch bei dieser Erkrankung keine gesteigerten Serumfermentkonzentrationen — insbesondere der sog. leberspezifischen Fermente — nachzuweisen sind [1, 12], liegen den beschriebenen Veränderungen der β -Glucuronidase im Zustand einer diabetischen Stoffwechseldekompensation wahrscheinlich komplexere Störungen, z. B. Änderungen im Rahmen des Glucuronidstoffwechsels [5, 6, 13] zugrunde.

Literatur

- [1] ABDERHALDEN, R.: Klinische Enzymologie. Stuttgart: Georg Thieme, 1958.
- [2] DOHRMANN, R. E.: Zur klinischen Bestimmung und Kinetik der β -Glucuronidase. Dtsch. Arch. klin. Med. **206**, 322 (1960).
- [3] — Das Verhalten der β -Glucuronidase-Aktivität im Serum beim Diabetes mellitus. 4^e Congrès de la Fédération Internation. du Diabète. Genève, 10—14 Juillet, Genève: Editions Médecine et Hygiène, 1961.
- [4] — Die β -Glucuronidase-Aktivität des Serums beim Diabetes mellitus. VII International Congress of Internal Medicine, 5.—8. 9. 1962, München. Stuttgart: Georg Thieme, 1963.
- [5] FISHMAN, W. H.: Studies on β -Glucuronidase. III. The increase in β -glucuronidase activity of mammalian tissues induced by feeding glucuronidogenic substances. J. biol. Chem. **136**, 229—235 (1940).
- [6] —, and S. GREEN: Glucosiduronic acid synthesis by β -Glucuronidase in a transfer reaction. J. Endocr. and Metab. **15**, 876 (1955).
- [7] HAGEDORN, H. C., und B. N. JENSEN: Zur Mikrobestimmung des Blutzuckers mittels Ferricyanid. Biochem. Z. **135**, 46 (1923).
- [8] — — Die Ferricanidmethode zur Blutzuckerbestimmung II. Biochem. Z. **137**, 92 (1923).
- [9] KLEBANOFF, S. J., and A. L. GREENBAUM: The Effect of pH on the Diabetogenic Action of Alloxan. J. Endocr. **11**, 314 (1954).
- [10] MANCHESTER, K. L., and F. G. YOUNG: The Influence of the Induction of Alloxan-Diabetes on the incorporation of Amino-Acids into Protein of Rat Diaphragm. Biochem. J. **77**, 386 (1960).
- [11] MILLER, F. B., F. P. KEYES and P. W. CERRERI: Increase of Serum- β -Glucuronidase activity in human diabetes mellitus. J. amer. med. Ass. **195**, 189 (1966).
- [12] RICHTERICH, R.: Enzymopathologie, Enzyme in Klinik und Forschung. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer, 1958.
- [13] SALTZMAN, A., W. T. CARAWAY and J. A. BECK: Serum Glucuronic Acid Levels in Diabetes mellitus. Metabolism **3**, 11 (1959).

Priv. Doz. Dr. R. E. DOHRMANN
Medizinische Univ. Poliklinik
Bonn, Wilhelmstraße 35