

### 130. Sanji Kishi und Katsuhiko Haruno: Über die Leber-Asparaginase von mit *p*-Dimethylamino-azobenzol gefütterten Ratten\*)

[Aus dem biochemischen Institut der Medizinischen Hochschule Showa zu Tokio]

(Eingegangen am 11. März 1952)

Die Leber-Asparaginase von mit *p*-Dimethylamino-azobenzol (DAB) gefütterten Ratten wurde untersucht. Die Aktivität der Asparaginase nahm sehr bald stetig ab, solange DAB gegeben wurde. Wurde keine DAB mehr gegeben, so erlangte die Leber beinahe die Funktion der Normalleber wieder trotz der pathologischen Veränderungen, die in den späteren Stadien der Fütterung entstanden. Aber die schon neoplastisch veränderte Leber blieb immer noch sehr klein. Bei der Fütterung mit Leberpulver war die Leber an sich hochaktiv; sie wies eine gewisse Resistenz gegen DAB auf, wenn die Ratte mit einem Gemisch von DAB und Leberpulver gefüttert wurde.

Wie wir heute wissen, zeigt die Leber weißer Ratten, an die *p*-Dimethylamino-azobenzol (DAB) mit Reis verfüttert wird, nach etwa 9 Wochen zirrhatische Erscheinungen und läßt nach 17–20 Wochen makroskopisch die Bildung von Hepatomknoten erkennen<sup>1)</sup>.

Der erste Schritt zu einer biochemischen Erklärung der Ätiologie des Krebses könnte die enzymologische Untersuchung des hepatischen Gewebes der Ratte während der Krebserzeugung sein. In diesem Sinne haben schon mehrere Forscher Untersuchungen über die Funktion der Fermente Arginase<sup>2)</sup>, Cholinoxidase<sup>3)</sup>, Histidase<sup>2)</sup>, Katalase<sup>4,5)</sup>, Phosphatase<sup>6)</sup> sowie Pyrophosphatase<sup>7)</sup> angestellt. Wir selbst haben früher in der gleichen Absicht Esterase und Kathepsin<sup>8)</sup> untersucht und können nunmehr über unsere Versuche mit Asparaginase berichten. Wir haben dabei, wie es bei derartigen Versuchen natürlich wichtig ist, geprüft, ob die krebserzeugende Substanz das Ferment beeinflußt oder nicht.

Über die Funktion der Asparaginase in der Chemie der Geschwulste hat Mizuhara<sup>9)</sup> berichtet. Er hat die Leber-Asparaginase von sarkomtragenden (Kato-Stamm) Kaninchen untersucht und gefunden, daß ihre Funktion im Vergleich mit normalen Kaninchen stark geschwächt ist; auch war ihre Aktivität im Tumor selbst äußerst gering.

In neuerer Zeit haben Greenstein<sup>10)</sup> u. a. über die Asparaginase der Maus- und Rattenleber gearbeitet und darin zweierlei Arten von Asparaginase unter-

\*) Herrn Geheimrat Professor Dr. H. Wieland zum 75. Geburtstag gewidmet.

<sup>1)</sup> R. Kinoshita, Trans. Jap. Path. Soc. **27**, 665 [1937].

<sup>2)</sup> T. Masayama u. T. Yokoyama, Osaka Igak. Z. **37**, 829 [1938].

<sup>3)</sup> G. E. Woodward, Cancer Research **11**, 918 [1951].

<sup>4)</sup> W. Nakahara u. F. Fukuoka, Gann, Japan. J. Cancer Res. **38**, 340 [1944].

<sup>5)</sup> I. Yanagisawa, Gann, Japan. J. Cancer Res. **36**, 234 [1942].

<sup>6)</sup> T. Masayama u. T. Seki, Gann, Japan. J. Cancer Res. **34**, 176 [1940].

<sup>7)</sup> N. Nakano, Osaka Igak. Z. **42**, 1680 [1943].

<sup>8)</sup> S. Kishi u. K. Haruno, Gann, Japan. J. Cancer Res. **42**, 69 [1951].

<sup>9)</sup> S. Mizuhara u. J. Kinki, Gynecol. Soc. **12**, 18 [1929].

<sup>10)</sup> J. P. Greenstein, P. J. Fodor u. F. M. Leuthardt, Journ. Nat. Cancer Inst. **10**, 271 [1947].

schieden. Die eine Art, die säure- und hitzebeständiger ist, vermindert sich stark im hepatischen Gewebe, wenn es neoplastisch wird.

### Versuchstiere

Weißer Ratten von etwa 100 g anfänglichem Körpergewicht wurden in sechs Gruppen im Laboratorium gezüchtet: 1.) Normal-Ratten, die mit gewöhnlichem Futter (grob zerkleinerten Reiskörnern) 2 Wochen lang gefüttert wurden. 2.) Leberpulver-Ratten, die mit einer Mischung von 900 g Reis, 100 g Rinderleberpulver und 20 g Sojabohnenöl 2 Wochen lang gefüttert wurden; diese ersten beiden Gruppen dienten zur Kontrolle. 3.) DAB-Ratten (langdauernde Versuche), die mit Reisfuttermisch (1 kg Reiskörner und 0.6 g DAB in 20 g Sojabohnenöl) ununterbrochen 9–20 Wochen lang ernährt wurden. 4.) DAB-Ratten (Versuche mit einer Unterbrechung); hier wurde die Fütterung nach 3.) nach 9–20 Wochen eingestellt und die Tiere wurden dann 2–3 Wochen mit gewöhnlichem Futter weitergefüttert. 5.) DAB-Ratten (kurzdauernde Versuche); sie wurden nach 1–4 Wochen langer DAB-Fütterung, wie bei 3.), untersucht. 6.) DAB-Leberpulver-Ratten, die mit einem Futtermisch (aus 900 g Reis, 100 g Rinderleberpulver und 0.6 g DAB in 20 g Sojabohnenöl) 1–4 Wochen bis zum Versuch gefüttert wurden.

### Methodik

Herstellung des Enzympräparates: Nach der Dekapitation der Ratte wurde sofort die Leber herauspräpariert und gewogen, nachdem zunächst mit Filtrierpapier das Blut möglichst abgetupft worden war. Das frische Gewebe wurde mit wenig Seesand und bis zur zehnfachen Gewichtsmenge Glycerin fein verrieben und gut durchgeschüttelt. Ohne weitere Bearbeitung (z. B. Zentrifugierung) wurde nach einigen Stunden die so erhaltene Gewebesuspension als „Enzym-Lösung“ für die weiteren Versuche verwandt.

Ausführung des Versuchs: Zur Herstellung der Reaktionsmischung wurden in einem dickwandigen Reagensglas aus Pyrexglas (200 × 25 mm) zu 2 ccm der Enzym-Lösung (entsprechend 0.2 g des Originalgewebes) 4 ccm einer 0.1 *m* Asparagin-Lösung, die mit 0.1 *n* Natronlauge zuvor auf  $p_H$  7.5 eingestellt worden war, und 4 ccm einer 0.1 *m* Puffer-Lösung vom  $p_H$  8 (Phosphat-Puffer) bzw.  $p_H$  9.10 oder 11 (Glykokoll-NaOH-Puffer) zugegeben. Als Blindversuche dienten die gleichen Mischungen ohne Zusatz von Substrat bzw. Mischungen von Puffer-Lösungen und Substrat.

Die Reaktions-Lösungen wurden 24 Std. bei 38° unter Toluol gut verschlossen aufbewahrt. Nach dieser Zeit hatten sich die anfänglichen  $p_H$ -Werte nach der sauren Seite verschoben; lediglich der Ansatz bei  $p_H$  8 zeigte keine Änderung.

Des weiteren wurde nach der Folinischen Ammoniakbestimmungs-Methode verfahren. Der Reaktionsmischung wurden 5 ccm einer gesättigten Kaliumcarbonat-Lösung zugesetzt und das so in Freiheit gesetzte Ammoniak mit Luft in 10 ccm 0.02 *n* Schwefelsäure eingeblasen. Das Durchleiten von Luft wurde 2 Std. lang fortgesetzt und dann der Säureüberschuß mit 0.02 *n* Natronlauge mit Methylrot als Indicator titriert. Die ccm der durch das

gebildete Ammoniak neutralisierten Säure wurden schließlich mit 1.4 multipliziert; die so gewonnene Zahl bedeutet die Menge des Ammoniakstickstoffs in mg, welche durch die 1 g frischen Gewebes entsprechende Enzym-Lösung in 24 Stdn. bei 38° aus überschüssiger Asparagin-Lösung in Freiheit gesetzt worden war. Die Ergebnisse sind in den Tafeln und Abbildungen wiedergegeben.

Tafel 1. Funktion der Leber-Asparaginase von Normal- und mit Leberpulver gefütterten Ratten

Gruppe	Kontroll-Ratten	Anzahl d. Tiere	PH			
			8	9	10	11
1	Normal-Ratten	12	9.3 (15.9-4.1)	9.5 (17.3-3.4)	10.4 (19.0-5.2)	10.1 (17.2-5.5)
2	Leberpulver-Ratten . . . . .	14	14.3 (26.6-10.0)	15.6 (26.7-9.2)	15.8 (23.9-11.2)	14.7 (23.9-10.5)

Die Zahlen bezeichnen den Ammoniak-Stickstoff in mg, welcher durch 1 g frisches Lebergewebe in 24 Stdn. bei 38° aus Asparagin frei gemacht worden ist; das gleiche gilt auch für die Tafel 2 und die Abbild. 1 und 2.

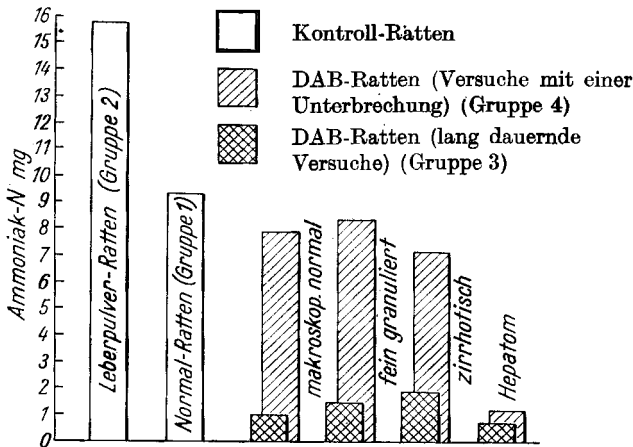
Tafel 2. Funktion der Leber-Asparaginase von mit DAB gefütterten Ratten

Gruppe	Leberbefund	Anzahl d. Tiere	PH			
			8	9	10	11
3. DAB-Ratten (lang dauernde Versuche)	makroskopisch normal . . . . .	3	0.99 (1.17-0.89)	0.91 (1.00-0.86)	0.91 (1.12-0.78)	0.85 (1.00-0.78)
	fein granuliert .	2	1.27 (1.34-1.20)	1.27 (1.34-1.20)	1.44 (1.60-1.28)	1.41 (1.60-1.23)
	zirrhotisch . . . .	2	1.75 (2.24-1.27)	1.75 (2.24-1.27)	2.15 (3.08-1.22)	2.26 (3.36-1.16)
	Hepatom . . . . .	1	0.70	0.84	0.98	1.12
4. DAB-Ratten (Ver- suche mit einer Unterbrechung)	makroskopisch normal . . . . .	5	8.11 (10.9-3.64)	8.05 (10.3-3.78)	8.86 (11.0-4.62)	8.23 (9.80-4.34)
	fein granuliert .	5	8.96 (12.1-5.74)	8.34 (10.7-6.02)	8.68 (11.2-6.30)	6.81 (11.0-6.44)
	zirrhotisch . . . .	22	7.31 (11.3-2.38)	7.05 (9.80-2.52)	8.12 (10.6-3.78)	7.95 (10.9-3.64)
	Hepatom . . . . .	5	1.28 (1.96-0.84)	1.34 (1.82-0.70)	1.66 (2.38-0.70)	1.68 (2.66-0.70)

### Ergebnisse und Bemerkungen

Die Funktion der Leber-Asparaginase der Normal-Ratte (Gruppe 1) ist durchschnittlich ziemlich stark, wenn sie auch Schwankungen unterworfen ist; die mit einem Gemisch von Reis und 10-proz. Leberpulver über 2 Wochen gefütterten Ratten (Gruppe 2) wiesen eine erstaunlich hohe Aktivität auf

(Tafel 1 und Abbild. 1). Die Ratten, die den langdauernden Versuch (9–20 Wochen) mit der DAB-Fütterung überlebten und bis kurz vor der Abtötung mit diesem Futter ernährt worden waren (Gruppe 3), zeigten eine äußerst geringe Aktivität der Leber-Asparaginase und gleichzeitig schon größere oder



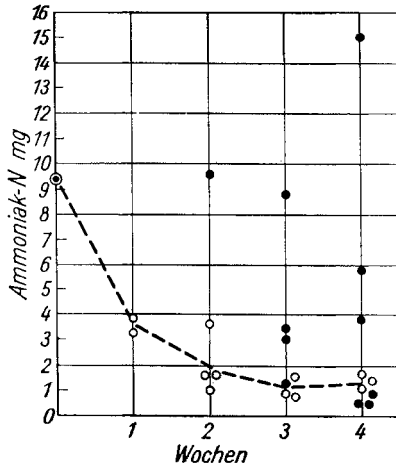
Abbild. 1. Aktivität der Leber-Asparaginase bei pH 9

kleinere pathologische Veränderungen. Es fanden sich makroskopisch normale Lebern, Lebern mit fein granulierter Oberfläche, zirrhotische Lebern und Hepatome (Tafel 2 und Abbild. 1). Bei der 4. Gruppe dagegen, die zuerst genau wie die Gruppe 3 lange Zeit (9–20 Wochen) mit DAB Futtergemisch gefüttert und dann anschließend nach Einstellung der DAB-Fütterung noch 2–3 weitere Wochen mit gewöhnlichem Futter ernährt worden war, war trotz der pathologischen Veränderungen der Leber die Asparaginase-Funktion nicht wesentlich geschwächt; sie blieb mit der der Normalleber vergleichbar. Doch blieb die Aktivität der Asparaginase des Hepatoms immer noch sehr klein (Tafel 2 und Abbild. 1). Die Ratten dieser Gruppe waren frei von DAB. Die Funktion des Ferments der mit DAB-Futter kurze Zeit gefütterten Ratten (Gruppe 5) sank erst nach einer Woche auf etwa  $\frac{1}{3}$  und nach 2 Wochen auf etwa  $\frac{1}{5}$  von derjenigen der Normal-Ratte. Nach 3–4 Wochen war bereits das Minimum der Aktivität (Abbild. 2) erreicht. Die Giftwirkung von DAB auf die Asparaginase zeigt sich hier deutlich.

Wenn Ratten (Gruppe 6) DAB und Leberpulver zusammen fraßen, zeigte die Asparaginase-Aktivität der Leber ein ganz anderes Bild als bei bloßer DAB-Fütterung (Abbild. 2). In manchen Fällen war die Aktivität der Asparaginase gering, in anderen aber sehr stark, trotz der 3–4 Wochen langen DAB-Zufuhr. Vielleicht steht das Leberpulver im Wettstreit gegen den DAB-Einfluß. Nakahara u. Mitarbb.<sup>11)</sup> haben schon früher die merkwürdige Tatsache betont, daß Leberpulver eine eigentümlich hemmende Wirkung auf die Erzeugung des DAB-Hepatoms ausübt.

<sup>11)</sup> W. Nakahara, K. Mori u. T. Fujiwara, Gann, Japan. J. Cancer Res. **32**, 465 [1938].

Auf Grund dieser Ergebnisse sind wir zu der Anschauung gelangt, daß jede dauernde Störung gewisser Leberenzyme die Leber schließlich neoplastisch machen kann, und daß andererseits nach Beseitigung der Störungsquelle sich die Leber jedesmal zum normalen Zustand zurückbildet und dadurch die Krebsentwicklung gehemmt wird.



Abbild. 2. Aktivität der Leber-Asparaginase bei  $pH$  9

- Normal-Ratten (Durchschnittszahl) (Gruppe 1),
- DAB-Ratten (kurz dauernde Versuche) (Gruppe 5),
- DAB-Leberpulver-Ratten (Gruppe 6)

Die Kurve zeigt die wöchentliche Abnahme der Aktivität bei DAB-Ratten

### Berichtigung

Jahrg. 85 [1952], Heft 6, S. 647, Zeile 1 der Zusammenfassung des Inhalts, lies „Oberflächenspannung“ statt „Oberflächenbehandlung“.

Verantwortlich für den Inhalt: Prof. Dr. Clemens Schöpf, Darmstadt. Redaktion: Dr. Albert Ellmer, Freiburg i. Br.  
Verantwortlich für den Anzeigenteil: Anton Burger, Verlag Chemie, GmbH. (Geschäftsführer Eduard Kreuzhage),  
Weinheim/Bergstr.; Druck: Druckerei Winter, Heidelberg.

Copyright 1952 by Verlag Chemie, GmbH., Weinheim/Bergstr. Printed in Germany. Alle Rechte vorbehalten, insbesondere die der Übersetzung. Kein Teil dieser Zeitschrift darf in irgendeiner Form — durch Photokopie, Mikrofilm oder irgend ein anderes Verfahren — ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert werden — All rights reserved (including those of translations into foreign languages). No part of this issue may be reproduced in any form, by photostat, microfilm, or any other means, without written permission from the publishers. Preis jährlich DM 90.—; Einzelheft DM 8.—. Abbestellungen nur bis spätestens 6 Wochen vor Ablauf eines Halbjahres. Gerichtsstand und Erfüllungsort Weinheim/Bergstr. Lieferung erfolgt auf Rechnung und Gefahr des Empfängers.