

## Originalbeiträge

### Einfluß eines Aktivators der Proteinkinase C (TPA) und eines $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisierenden Agonisten (A 23187) auf den Zinkmetabolismus der Ratte

K. Krämer, A. Markwitan, Ch. Montigel und J. Pallauf

Institut für Tierernährung der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Influence of an activator of proteinkinase C (TPA) and of a  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizing agonist (A 23187) on the zinc metabolism of the rat**

**Zusammenfassung:** An 8 Wochen alten, ca. 235 g schweren Albinoratten wurde der Einfluß von 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA), einem Aktivator der Proteinkinase C, und A 23187, einer Ca-Ionophore, die die intracelluläre freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erhöht, auf den Zinkmetabolismus geprüft. Jeweils 8 Tiere erhielten 24 h vor dem Töten eine ip-Injektion mit  $1,6 \times 10^{-7}$  mol TPA/kg GKM,  $1,6 \times 10^{-6}$  mol A 23187/kg GKM bzw. Dimethylsulfoxid, dem Lösungsmittel der Agonisten, als Kontrolle. Nach Applikation von TPA und A 23187 wurde eine erhebliche Verzehrsdepression beobachtet, die mit einer verminderten Gesamtkörpermasse und Lebermasse einherging. Die Serum-Zn-Konzentration fiel durch A 23187 signifikant von 710 auf  $470 \mu\text{g/L}$  ab. Infolge TPA- bzw. A 23187-Behandlung stieg die Zn-Konzentration in der Leber in Frisch- und Trockenmasse signifikant um 20 bzw. 30 % an. Die totale Leberzinkmenge

#### Abbreviation Index:

A 23187	Calciumionophore	iv	intravenös
AAS	Atomabsorptionsspek- trophotometrie	M	Mean (Mittelwert)
AP	Alkalische Phosphatase	MT	Metallothionein
cAMP	cyclisches Adenosinmo- nophosphat	PI	Phosphatidylinositol
DG	Diacylglycerol	PKC	Proteinkinase C
DMSO	Dimethylsulfoxid	PMSF	Phenylmethylsulfonylflu- orid
FM	Frischmasse	SD	Standard deviation (Standardabweichung)
GKM	Gesamtkörpermasse	TM	Trockenmasse
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	TPA	12-O-Tetradecanoyl- phorbol-13-acetat
ip	intraperitoneal		
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat		

war dagegen in allen Gruppen unverändert. Die Konzentration an Metallothionein (MT) in der Leber stieg durch TPA signifikant um das 2,4fache. Bei A 23187 betrug diese Zunahme lediglich das 1,5fache. Keine Veränderungen traten beim Mucosa-MT auf. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP) wurde im Serum nach TPA- bzw. A 23187-Behandlung von 258 U/L um 23 % bzw. 31 % signifikant reduziert. Die Glucosekonzentration im Serum blieb bei allen Versuchsvarianten unverändert im Normbereich. Harnstoff und Creatinin im Serum stiegen dagegen durch A 23187 signifikant an.

Die Untersuchung zeigt, daß TPA und A 23187 einen Einfluß auf den Zn-Metabolismus der Ratte ausüben, wobei dieser Effekt bei der Leber-MT-Induktion am ausgeprägtesten ist. Die durch TPA und A 23187 induzierte Verzehrsdepression hat zur Folge, daß auch Effekte auftreten, die nicht vom Hungerstoffwechsel zu unterscheiden sind. Daher sind zur Differenzierung zwischen Agonist- und Hungereffekt weitergehende Untersuchungen erforderlich.

**Summary:** The influence of 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate, an activator of protein kinase C and A 23187, a calcium ionophore increasing cytosolic free calcium concentration on zinc metabolism was investigated in a study with 24 eight-week old rats. Twenty-four hours before killing, the rats (235 g body weight, 8 per group) were either injected intraperitoneally with TPA ( $1.6 \times 10^{-7}$  mol/kg body weight) or A 23187 ( $1.6 \times 10^{-6}$  mol/kg body weight). Control rats received the solvent dimethylsulfoxide. The application of TPA and A 23187 provoked a marked decline in feed intake accompanied by a reduction in body weight and liver mass. Serum concentrations of zinc were reduced significantly after A 23187 injections. TPA and A 23187 increased liver zinc levels by 20 and 30 % respectively, if based on fresh and dry weight. The injections, however, did not alter total liver zinc. Liver metallothionein (MT) concentration was elevated 2.4-fold after TPA administration. The increase in response to A 23187 was only 1.5-fold and not significant. Mucosa MT levels were not altered. Serum activity of alkaline phosphatase was significantly reduced (TPA: -23 %, A 23187: -31 %). There was no change in serum glucose after injections. However, serum creatinin and urea were increased in response to A 23187.

In conclusion, TPA and A 23187 had an effect on zinc metabolism of the rat, most marked in the case of MT induction in the liver. There is evidence that the reduced feed intake caused by TPA and A 23187 resulted in effects indistinguishable from those caused by fasting. Further experiments are needed to clarify whether protein kinase C and cytosolic free calcium are directly involved in the regulation of zinc metabolism.

**Schlüsselwörter:** TPA – A 23187 – Metallothionein – Alkalische Phosphatase – Zink

**Key words:** TPA – A 23187 – metallothionein – alkaline phosphatase – zinc

## Einleitung

Der Zinkmetabolismus wird durch eine Reihe von Faktoren wie z.B. Nahrungs- karenz, Streß, Endotoxin- und Hormongaben beeinflußt. So erhöhen Glucagon und  $\beta$ -Rezeptoragonisten bzw. Dibutyryl-cAMP sowie Glucocorticoide den Zn- und Metallothionein (MT)-Spiegel in der Leber. Mit Ausnahme von Glucagon provozieren diese Agonisten auch eine Hypozinkämie (3, 4, 13, 14, 16, 17, 20). Auch für den Zinkstatusparameter Alkalische Phosphatase (AP) konnte ein Einfluß durch den Hormonstatus nachgewiesen werden. Beispielsweise führen Glucocorticoide bei Hunden und Insulinmangel bei Ratten zu einer deutlichen AP-Induktion (22, 39).

Nur wenige Arbeiten liegen über die Wirkung von Hormonen mit Phosphatidylinositol (PI)-Effektorsystem auf den Zn-Metabolismus vor. Zentrales Enzym dieses Signaltransduktionsmechanismus ist die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-spaltende Phospholipase C. Ihre Hydrolyseprodukte Inositoltriphosphat

(IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DG) gelten als Second Messenger. Während IP<sub>3</sub> zu einer Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung aus spezialisierten Vesikeln des Endoplasmatischen Retikulums führt, aktiviert DG eine Proteinkinase C (PKC). Der Anstieg der intracellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führt über Calmodulin und die PKC über ihre Phosphorylierungsprodukte zur spezifischen Zellantwort. Für Übersichten siehe 2, 23, 27. Lediglich eine Arbeitsgruppe (3, 4, 20) untersuchte den Einfluß von Noradrenalin, Angiotensin II, Vasopressin (natürliche Agonisten des PI-Effektorsystems) und 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) (Aktivator der PKC) auf die MT-Synthese in der Ratte. Dabei erwiesen sich alle Substanzen außer Vasopressin in der Leber als Zn-MT-Induktoren. TPA zeigte in einer Konzentration von  $1,6 \times 10^{-7}$  mol/kg Gesamtkörpermasse (GKM) 25 h nach ip-Injektion eine maximale Erhöhung von Zn in MT der Leberfrischmasse (4).

Auf Basis der Untersuchung von Brady et al. (4) sollte in der vorliegenden Arbeit neben TPA, auch die Wirkung der Ca<sup>2+</sup>-Ionophore A 23187 (Erhöhung der cytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration) auf den Zn-Metabolismus der Ratte untersucht werden. Dabei wurde über MT hinaus auch Zink und die Aktivität der AP in verschiedenen Geweben der Ratte bestimmt.

## Material und Methoden

### Tiermaterial und Haltung

Nach dem Absetzen im Alter von 3 Wochen wurden 24 männliche Albinoratten (institutseigene Inzuchlinie HK 51) auf 3 Gruppen verteilt und über 5 Wochen mit einer mehligen Diät auf der Basis von Cerealien und Säurecasein (Tab. 1) und deionisiertem Wasser *ad libitum* versorgt. Die Futteranalyse ergab einen nativen Gehalt von 22,8 µg Zn/g Futter und 0,71 % Phytat, woraus ein molarer Phytat/Zn-Quotient von 31 ermittelt wurde. Die tätowierten Tiere wurden in Makrolonkäfigen (4 Tiere/Käfig) auf Edelstahlrostern, bei 25 °C, einer rel. Luftfeuchte von ca. 55 % und einem 12stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten.

### Versuchsdurchführung und Probenaufbereitung

Nach der 5wöchigen Fütterungsperiode erhielten jeweils 8 Ratten mit durchschnittlich ca. 235 g GKM (Tab. 2) eine ip-Injektion mit  $1,6 \times 10^{-7}$  mol TPA/kg GKM (SERVA 32496), bzw.  $1,6 \times 10^{-6}$  mol A 23187/kg GKM (SIGMA C 7522) bzw. Dimethylsulfoxid (DMSO) (SERVA 20385), dem Lösungsmittel der Agonisten, als Kontrolle. 24 h nach der Injektion wurden die Ratten unter Chloroformarkose durch Dekapitation getötet, das Blut aufgefangen und durch Zentrifugation (15 min, 3000 g) das Serum gewonnen. Zur Erfassung des Zinkstatus wurden Leber, Dünndarm sowie eine Hintergliedmaße herauspräpariert. Der Dünndarm wurde mit eisgekühlter NaCl-Lösung (9 g/L) gespült und über einen Plastikstab gewendet. Alle Proben wurden bis zur Analyse bei -22 °C aufbewahrt.

Die Dünndarmmucosa wurde durch Abschaben auf einer gekühlten Glasplatte gewonnen. Die Homogenisierung des *os femoris* zur Analyse der Alkalischen Phosphatase erfolgte durch Mörsern unter Zugabe von flüssigem Stickstoff. Zur Extraktion der AP wurden die Gewebeproben in 20 mM Tris-HCl, pH 8,6, aufgenommen, mit 0,5 mM PMSF in Aceton (Endkonzentration) versetzt, in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator zerkleinert, 45 min bei 43 000 g zentrifugiert und der Überstand zur Analyse abgenommen.

### Analytische Methoden

Die Zinkkonzentrationen wurden durch Atomabsorptionsspektrophotometrie (AAS) (Philips PU 9485) bei 213,3 nm in einer Luft-Acetylenflamme gemessen. Die Leber- und Futterproben wurden in Quarzschalen bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, bei 450 °C trocken-

Tab. 1. Zusammensetzung der Diät.

Komponente	g/kg Diät
Weizen	235
Gerste	200
Mais	200
Säurecasein (Fa. MEGGLE)	120
Hafer	100
Sojaextraktionsschrot	50
Mineralstoff- und Spurenelementvormischung <sup>1)</sup>	50
Sonnenblumenöl	30
Vitaminvormischung <sup>2)</sup>	10
D,L-Methionin	5
	1000

<sup>1)</sup> Mineralstoffe und Spurenelemente je kg Diät:

CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O p.a., 26,73 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> p.a., 6,68 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O p.a., 5,07 g; CaCO<sub>3</sub> p.a., 4,43 g; NaCl p.a., 2,47 g; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> p.a., 1,22 g; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O p.a., 298,68 mg; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O p.a., 184,59 mg; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O p.a., 27,50 mg; (CH<sub>3</sub>COO)<sub>3</sub>Cr p.a., 4,41 mg; CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O p.a., 2,83 mg; NaF p.a., 2,21 mg; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O p.a., 0,83 mg; KJ p.a., 0,65 mg; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O p.a., 0,25 mg

<sup>2)</sup> Vitaminzusatz je kg Diät:

D,L- $\alpha$ -Tocopherylacetat 100 mg D- $\alpha$ -TE; Retinol 1,8 mg RE; Menadion 5 mg; Cholecalciferol 0,025 mg; Ascorbinsäure 30 mg; Niacin 40 mg; Ca-D-Pantothenat 30 mg; Pyridoxin 10 mg; Riboflavin 10 mg; Thiaminmononitrat 8 mg; Folsäure 3 mg; Cobalamin 0,05 mg; Biotin 0,2 mg; Cholinchlorid 1150 mg; myo-Inositol 100 mg; p-Aminobenzoësäure 10 mg

verascht und in 0,3 M HCl suprapur für die AAS aufgenommen. Die Zn-Analyse im Serum wurde direkt nach Verdünnung mit 0,1 M HCl vorgenommen.

Metallothionein wurde mittels <sup>109</sup>Cd-Hämoglobin-Bindungsassay nach Eaton und Toal (15) bestimmt. Allerdings wurden die Proben bei einer höheren g-Zahl (20 000 g) zentrifugiert. Carrierfreies <sup>109</sup>Cd wurde von AMERSHAM (Cus. 1) bezogen.

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (EC 3.1.3.1) wurde nach der optimierten Standardmethode der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (12) unter Verwendung von Einzelreagenzien mit Diethanolaminpuffer (MERCK 16205) und p-Nitrophenylphosphat (ALDRICH N2, 200-2) ermittelt. Protein in den Gewebehomogenaten wurde nach der Lowry-Folin-Methode (10) mit Rinderserumalbumin als Standard analysiert. Zur Analyse von Creatinin (nach Jaffé), Harnstoff (Berthelot-Methode) und Glucose (GOD-Perid-Methode, ohne Enteiweißung) im Serum dienten Testkits der Firmen MERCK und BOEHRINGER. Die Bestimmung der Phytinsäure im Rattenfutter erfolgte mittels HPLC (32).

#### Statistische Methoden

Die untransformierten Daten wurden mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse und angepasstem Mittelwertvergleich nach Scheffé ausgewertet. Zur Ermittlung signifikanter GKM-Differenzen vor und nach Injektion von TPA, A 23187 und DMSO wurde der paired t-Test angewendet. Die bei der Varianzanalyse ermittelten Irrtumswahrscheinlichkeiten von  $P < 0,05$  werden als statistisch signifikant gewertet. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung der Einzelwerte ( $M \pm SD$ ) dargestellt.

#### Ergebnisse

##### Gesamtkörpermasse und Futteraufnahme

Die Gesamtkörpermasse der Ratten zu Beginn und am Ende der 5wöchigen Fütterungsperiode sowie 24 h nach ip-Injektion von DMSO, TPA und A 23187 ist in

Tab. 2 dargestellt. Die Gesamtkörpermasseentwicklung (Einzelwerte nicht aufgeführt) war während des gesamten Fütterungszeitraumes annähernd linear ansteigend mit einer mittleren Zunahme von 5,5 g/d und Tier. Im Vergleich zur 5. Fütterungswoche verringerte sich die mittlere tägliche Futteraufnahme nach Applikation von DMSO auf 70 % des Vergleichswertes (Tabelle 2). Die TPA- bzw. A 23187-behandelten Tiere stellten die Futteraufnahme fast vollständig ein (Tabelle 2). Dadurch reduzierte sich die Gesamtkörpermasse in diesen Gruppen signifikant. Die Gesamtkörpermasse der DMSO-Gruppe blieb mit 240 g annähernd konstant.

Tab. 2. Gesamtkörpermasse der Ratten zu Versuchsbeginn (Alter 21 d), Gesamtkörpermasse und Futteraufnahme vor und nach Applikation von DMSO (Kontrolle), TPA und A 23187 sowie Lebermasse und Lebertrockenmasse am Versuchsende

		DMSO (Kontrolle)	TPA	A 23187
Gesamtkörpermasse [g]	Versuchsbeginn	48,4±4,9	48,7±5,2	48,6±5,2
	vor Applikation	240±17,6	248±18,4 <sup>A</sup>	242±17,6 <sup>a</sup>
	nach Applikation	240±15,7	232±17,1 <sup>B</sup>	234±15,5 <sup>b</sup>
Futteraufnahme [g/24 h]	vor Applikation	19,6	20,2	19,5
	nach Applikation	13,9	1,9	0,6
Lebermasse [g]		10,0±1,1	9,1±0,9	8,7±1,1
Lebertrockenmasse [%]		29,9±1,7	30,3±1,3	29,0±1,2

Hochgestellte unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Differenzen der Gesamtkörpermasse vor und nach Applikation der Agonisten A,B = P < 0,001; a,b = P < 0,01

### Zinkkonzentration

In Abbildung 1 sind die Zinkkonzentrationen in Serum und Leber dargestellt. Durch Applikation der Calciumionophore A 23187 fiel gegenüber der DMSO-Kontrolle die Serum-Zn-Konzentration signifikant von 710 ± 90 auf 470 ± 110 µg/mL ab. Eine nur geringfügig niedrigere, nicht signifikant veränderte Serumzinkkonzentration war in der TPA-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Infolge TPA- bzw. A 23187-Behandlung stieg die Zn-Konzentration in der Leber, bezogen auf Frisch- und Trockenmasse, signifikant um ca. 20 bzw. 30 % an. Die gesamte Leberzinkmenge spiegelte diese Effekte nicht wider, da sie unabhängig von der Behandlung konstant blieb (Abb. 1). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß trotz einer tendenziellen Verminderung der Lebermasse nach TPA- bzw. A 23187-Injektion im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe die prozentuale Lebertrockenmasse mit ca. 30 % nahezu konstant blieb (Tab. 2).

### Metallothionein

Die MT-Konzentration in der Leberfrischmasse (Abbildung 2) erhöhte sich durch die Wirkung von TPA gegenüber der DMSO-Kontrolle signifikant um das

2,4fache. Die gesamte MT-Menge stieg um das 2,1fache von  $161 \pm 35 \mu\text{g}$  in der Kontrolle auf  $329 \pm 91 \mu\text{g}$  bei den TPA-behandelten Tieren. Werden 7 mol Zn pro mol MT unterstellt, verdoppelte sich in der Gesamtleber das MT-gebundene Zn von  $12,8 \mu\text{g}$  (Kontrolle) auf  $25,1 \mu\text{g}$  nach TPA-Applikation. A 23187 führte zu einer im Mittel 1,5fachen MT-Konzentration, wobei dieser Unterschied infolge hoher individueller Schwankungen nicht signifikant war. Die gesamte Leber enthielt in dieser Gruppe  $199 \pm 68 \mu\text{g}$  MT. TPA und A 23187 zeigten keinen signifikanten Effekt auf die insgesamt geringe Konzentration an Mucosa-MT (Abb. 2). In der Kontrolle wurden  $1,5 \pm 0,1 \mu\text{g/g FM}$  vs.  $2,3 \pm 0,7$  bzw.  $1,7 \pm 0,7 \mu\text{g/g FM}$  nach TPA- bzw. A 23187-Behandlung gefunden.

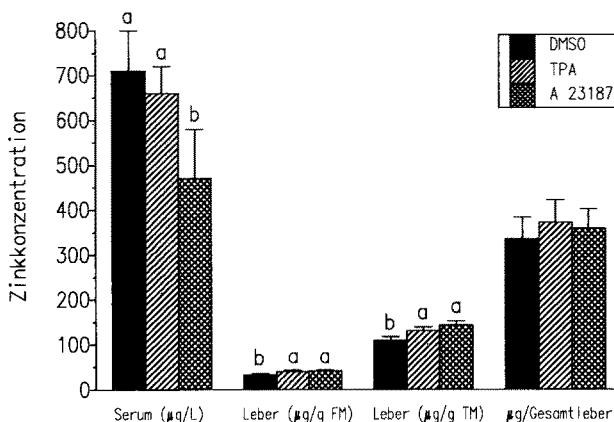


Abb. 1. Zinkkonzentrationen ( $M \pm SD$ ) in Serum, Leberfrischmasse (FM), Lebertrockenmasse (TM) und in der Gesamtleber von Ratten 24 h nach Applikation von DMSO (Kontrolle), TPA und A 23187. Durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnete Balken eines Parameters unterscheiden sich signifikant ( $P < 0,05$ ).

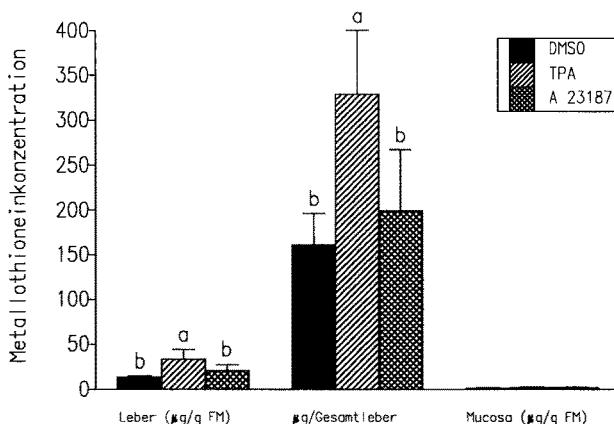


Abb. 2. Metallothioneinekonzentrationen ( $M \pm SD$ ) in der Leberfrischmasse (FM), in der Gesamtleber und der Frischmasse (FM) der Dünndarmmucosa von Ratten 24 h nach Applikation von DMSO (Kontrolle), TPA und A 23187. Durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnete Balken eines Parameters unterscheiden sich signifikant ( $P < 0,05$ ).

### Alkalische Phosphatase

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase fiel infolge der TPA- bzw. A 23187-Applikation im Serum signifikant von  $258 \pm 25$  U/L auf  $200 \pm 26$  bzw.  $178 \pm 10$  U/L ab (Abb. 3). Die spezifischen Aktivitäten der Leber- und Knochen-AP (Abb. 3) stiegen zwar durch TPA und A 23187 an, wegen der hohen Streuung der Einzelwerte konnten jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Eine leichte, nicht signifikante Erhöhung der intestinalen AP konnte nach Injektion von A 23187 beobachtet werden. TPA hingegen reduzierte die intestinale AP tendenziell um ca. 10 %.

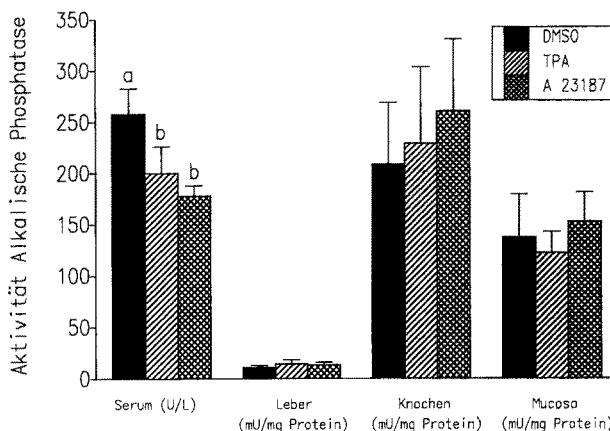


Abb. 3. Aktivitäten der Alkalischen Phosphatase ( $M \pm SD$ ) in Serum (Volumenaktivität) sowie Leber, Knochen und Dünndarmmucosa (bezogen auf Protein) von Ratten 24 h nach Applikation von DMSO (Kontrolle), TPA und A 23187. Durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnete Balken eines Parameters unterscheiden sich signifikant ( $P < 0,05$ ).

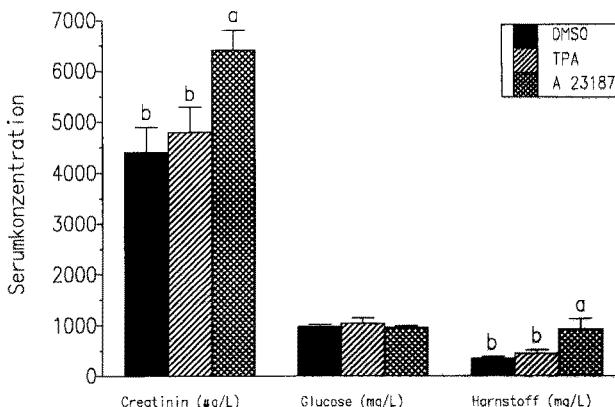


Abb. 4. Konzentrationen ( $M \pm SD$ ) an Creatinin, Glucose und Harnstoff im Serum von Ratten 24 h nach Applikation von DMSO (Kontrolle), TPA und A 23187. Durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnete Balken eines Parameters unterscheiden sich signifikant ( $P < 0,05$ ).

### Serumparameter

Zur Charakterisierung der Stoffwechselleage wurden die Glucose-, Harnstoff- und Creatinininspiegel im Serum bestimmt (Abb. 4). Eine Veränderung der Glucosekonzentration war bei keiner der 3 Behandlungen festzustellen. Nach Applikation der Calciumionophore stieg sowohl die Harnstoff- als auch die Creatininkonzentration im Serum signifikant an. Die Harnstoffkonzentration war dabei gegenüber der DMSO-Kontrolle annähernd um den Faktor 3 höher und die Creatininkonzentration erhöhte sich um 45 %.

### Diskussion

Im Mittelpunkt der vorliegenden Untersuchung steht die Frage, ob das PI-Effektorsystem an der Regulation des Zn-Metabolismus, wie es von der Arbeitsgruppe Brady (3, 4, 20) für die MT-Synthese gezeigt wurde, beteiligt ist. Um in diesem Effektorsystem den PKC- und  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Signalweg getrennt zu erfassen, wurden Substanzen eingesetzt, die wie TPA die PKC aktivieren und über A 23187 die intracelluläre freie Ca-Konzentration erhöhen.

Nach Applikation von TPA und A 23187 wurde eine erhebliche Verzehrsdepression beobachtet, die mit einer verminderten Gesamtkörper- und Lebermasse einherging. Ein derartiger Einfluß auf die Futteraufnahme wurde von Brady et al. (4) nicht beschrieben. Über einen verzehrsreduzierenden Effekt bei der Ratte durch Vasopressin, einem natürlichen Agonisten des PI-Effektorsystems, wird jedoch an anderer Stelle berichtet (11). In einem nachfolgenden Experiment zum Einfluß einer totalen Futterrestriktion auf den Zn-Metabolismus der Ratte, konnten bereits nach 24 h, neben einer Gesamtkörper- und Lebermassedepression, typische Hunger-induzierte metabolische Veränderungen wie Glycogenolyse und Ketogenese nachgewiesen werden (24). Vor dem Hintergrund einer möglichen Überlagerung von Agonist- und Hungereffekt müssen daher auch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung interpretiert werden.

### Zink und Metallothionein

Die Messung der Plasma- bzw. Serum-Zn-Konzentration ist eine weit verbreitete Methode zur Diagnose der Zn-Versorgung. Eine Hypozinkämie ist jedoch nicht nur durch eine verminderte Zn-Zufuhr, sondern auch durch Stimuli wie Stress, Endotoxine, Infektionen, Glucocorticoide, Interleukin 1, Glucagon und Adrenalin induzierbar (8, 9). Futterrestriktion führt bei der Ratte (21, 35, 37) hingegen zu keinen Veränderungen und beim Menschen (40) sowie bei Puten (36) zu einem Anstieg des Plasma-Zn-Spiegels. Diese Untersuchungen zeigen, daß die durch A 23187 provozierte Hypozinkämie nicht auf die gleichzeitige Futterdepression zurückzuführen ist. Wahrscheinlich induziert A 23187 *per se* eine Hypozinkämie oder führt zu systemischen Effekten, ähnlich der Stress- und Hormon-vermittelten Depression der Serum-Zn-Konzentration. Dabei könnte eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige ACTH-Ausschüttung im Hypothalamus eine Rolle spielen, wie sie durch Vasopressin und Catecholamine induziert wird (26, S. 694). Der daran gekoppelte Anstieg des Plasma-Glucocorticoid-Spiegels könnte die Hypozinkämie auslösen.

Bezogen auf Frischmasse steigt in der Leber bei Futterentzug oder restriktiver

Fütterung die Zn-Konzentration, hauptsächlich gebunden an MT, an (5, 21, 36, 37). Ein Anstieg des Leber-MT-Gehaltes wird auch nach *in vivo*-Applikation der  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisierenden Hormone Noradrenalin und Angiotensin II sowie TPA, jedoch nicht nach Arg-Vasopressin-Injektion, beobachtet (3, 4, 20). Helvig und Brady (20) zeigten neben der Erhöhung des Leber-MT-Gehaltes nach iv- und ip-Applikation von Angiotensin II auch einen signifikanten Anstieg der Leber-Zn-Konzentration ( $\mu\text{g/g FM}$ ). In der vorliegenden Untersuchung wurden nach Applikation von TPA und A 23187 ebenfalls erhöhte Konzentrationen an Zn und MT in der Leber nachgewiesen. Jedoch bleibt durch die gleichzeitig beobachtete Nahrungskarenz unklar, ob der Hunger- oder der Agonisteffekt im Vordergrund steht. Jedenfalls entspricht die Erhöhung der Leber-Zn-Konzentration ( $\mu\text{g/g}$ ) keiner Zunahme der gesamten Leber-Zn-Menge, die in diesem Versuch unabhängig von der Behandlung konstant blieb. Diesem Aspekt wurde bislang in der Literatur zum Zn-Metabolismus im Hunger bzw. nach Hormonapplikation wenig Aufmerksamkeit gewidmet. Es ist lediglich aus 2 Untersuchungen bekannt, daß bei Nahrungskarenz die totale Leberzinkmenge der Pute bis zu 48 h konstant bleibt (36), bzw. die der Ratte vermindert wird (24). Als Ursache für die unveränderte Leber-Zn-Menge in der vorliegenden Untersuchung ist die Reduktion der Lebermasse anzusehen, die wahrscheinlich aus der Entleerung der Glycogenspeicher resultiert. Gleichzeitig erfolgte eine Dehydratation der Leber, da die Lebertrockenmasse in % der Frischmasse konstant blieb. Obwohl keine Netto-Zn-Akkumulation in der Leber stattfindet, wurde nach Applikation von TPA und A 23187 die Synthese von MT in der Leber induziert, wobei dieser Effekt in der TPA-Gruppe weit deutlicher ausgeprägt war als nach A 23187-Injektion. Aus dieser Beobachtung kann in Übereinstimmung mit Brady et al. (4) geschlossen werden, daß TPA MT in der Leber zu induzieren vermag. Zu A 23187 liegen aus der Literatur keine vergleichbaren Untersuchungen vor. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß andere Hormone, die infolge Nahrungskarenz sezerniert werden, oder durch Gewebskatabolismus freigesetztes Zn auch zur Erhöhung des Leber-MT beitragen.

#### *Alkalische Phosphatase*

Die Alkalische Phosphatase reagiert neben einem alimentären Zn-Mangel auch auf eine Reihe physiologischer, pathophysiologischer und hormoneller Stimuli (28). Beispielsweise führt eine Endotoxin-Applikation an Ratten zu einer Reduktion der Plasma-AP-Aktivität, die mit einer Verminderung der Plasma-Zn-Konzentration und der Futteraufnahme einhergeht (6). In anderen Untersuchungen reagierte die Serum- bzw. Plasma-AP der Ratte auf eine alleinige Nahrungskarenz von 18–24 h Dauer mit einer 50–60%igen Reduktion (7, 30). Die im vorliegenden Versuch beobachtete Depression der Serum-AP-Aktivität kann daher als direkter Effekt der verringerten Futteraufnahme gewertet werden. Der nach Applikation von TPA und A 23187 beobachtete, tendenzielle Anstieg der Leber- und Knochen-AP ist schwieriger zu interpretieren. Sowohl TPA als auch A 23187 fördern die Ca-Freisetzung aus Knochen (1, 38). Da die Knochenresorption mit einer Erhöhung der Knochen-AP-Aktivität einhergeht (31), könnte damit zumindest der Anstieg der Knochen-AP erklärt werden.

### Serumparameter

Um metabolische Veränderungen durch die verabreichten Substanzen TPA und A 23187 nachweisen zu können, wurden im Blutserum Glucose, Harnstoff und Creatinin analysiert. Im Hunger bzw. postabsorptiven Stadium ist i.d.R. ein Abfall der Blutglucosekonzentration zu beobachten, der zur Sekretion gluconeogenetischer Hormone wie Glucagon, Catecholamine, Vasopressin, Angiotensin II und Glucocorticoide führt (26, S. 374 f, 33). Im vorliegenden Experiment blieb jedoch, nach Applikation von TPA bzw. A 23187, trotz einer fast vollständigen Einstellung der Futteraufnahme, der Serum-Glucose-Spiegel unverändert. Glycogenolyse und Gluconeogenese werden durch TPA bzw. A 23187 über die PKC bzw. über  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin aktiviert (18) und wirken vermutlich so im vorliegenden Versuch frühzeitig dem Absinken der Blutglucose entgegen. Der Anstieg der Harnstoff-Konzentration nach Applikation von A 23187 ist wahrscheinlich auf eine, durch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Prozesse, gesteigerte Harnstoffproduktion zurückzuführen. Die Harnstoffsynthese jedenfalls wird durch Hormone wie Angiotensin II, Vasopressin und Catecholamine stimuliert (19). Darüber hinaus fördert *in vitro* ein Anstieg der extramitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration die Citrullinsynthese (29). Möglicherweise liegt auch eine eingeschränkte Nierenfunktion vor, die mit einer verminderten Harnstoffexkretion einhergeht, da nach Levy et al. (25) erhöhte Creatininwerte im Serum, wie sie nach Applikation von A 23187 beobachtet wurden, u.a. auf eine verminderte glomeruläre Filtration schließen lassen. Für diese Annahme spricht auch, daß die Ca-Ionophore *in vivo* cardiovasculäre Funktionen herabsetzt (34). Die durch A 23187 induzierten Veränderungen bei Harnstoff und Creatinin lassen auf eine ausgeprägte Beeinflussung des Gesamtorganismus durch diese Substanz schließen, da ähnliche Veränderungen bei reiner Nahrungskarenz (24) nicht auftraten.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann geschlossen werden, daß *in vivo*-Experimente mit dem Phorbolester TPA und der Calciumionophore A 23187 hinsichtlich des Zn-Metabolismus nur einen eingeschränkten Aussagewert aufweisen, da Wirkungen auftreten, die den Gesamtorganismus beeinflussen. Insbesondere bei der Leber-Zn-Konzentration, bezogen auf Gewichtseinheit, und bei der Serumaktivität der Alkalischen Phosphatase zeigen sich Effekte, wie sie auch bei einer Nahrungskarenz beobachtet werden. Zur Trennung dieser Effekte sind weitergehende Untersuchungen erforderlich.

### Literatur

1. Abraham DC, Wadkins CL, Conaway HH (1988) Enhancement of fetal rat limb bone resorption by phorbol ester (PMA) and ionophore A-23187. *Calcif Tissue Int* 42:191-195
2. Berridge MJ, Irvine RF (1984) Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312:315-321
3. Brady FO, Helvig BS (1984) Effect of epinephrine and norepinephrine on zinc thionein levels and induction in rat liver. *Am J Physiol* 247:E318-E322
4. Brady FO, Helvig BS, Funk AE, Garrett SH (1987) The involvement of catecholamines and polypeptide hormones in the multihormonal modulation of rat hepatic thionein levels. In: Kägi JHR, Kojima Y (eds) *Metallothionein II. Experimentia Supplementum*, Vol 52. Birkhäuser, Basel, pp 555-563
5. Bremner I, Davies NT (1975) The induction of metallothionein in rat liver by zinc injection and restriction of food intake. *Biochem J* 149:733-738

6. Chesters JK, Will M (1978) The assessment of zinc status of an animal from the uptake of  $^{65}\text{Zn}$  by the cells of whole blood in vitro. *Br J Nutr* 38:297–306
7. Chua B, Shrager E (1978) Effects of experimental diabetes and food intake on rat intestine and serum alkaline phosphatase. *J Nutr* 108:196–202
8. Cousins RJ (1985) Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol Rev* 65:238–309
9. Cousins RJ (1989) Systemic transport of zinc. In: Mills CF (ed) Zinc in Human Biology. Springer, London, pp 79–93
10. Dawson RMC, Elliott DC, Elliott WH, Jones KM (1986) Data for Biochemical Research. 3d ed, Clarendon Press, Oxford, p 543
11. Delpretre E, Langhans W, Scharrer E (1989) Untersuchungen zum Mechanismus des verzehrsreduzierenden Effekts von Adiuretin bei Ratten. *J Anim Physiol a Anim Nutr* 62:14–15 (Abstract)
12. Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie (1972) Standard-Methode zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase (AP). *Z Klin Chem Klin Biochem* 10:191
13. DiSilvestro RA, Cousins RJ (1984) Mediation of endotoxin-induced changes in zinc metabolism in rats. *Am J Physiol* 247:E436–E441
14. Dunn MA, Cousins RJ (1989) Kinetics of zinc metabolism in the rat: effect of dibutyryl cAMP. *Am J Physiol* 256:E420–E430
15. Eaton DL, Toal BF (1982) Evaluation of the cd/hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Tox Appl Pharm* 66:134–142
16. Etzel KR, Cousins RJ (1981) Hormonal regulation of liver metallothionein: independent and synergistic action of glucagon and glucocorticoids. *Proc Soc Exp Biol Med* 167:233–236
17. Etzel KR, Shapiro SG, Cousins RJ (1979) Regulation of liver metallothionein and plasma zinc by the glucocorticoid dexamethasone. *Biochem Biophys Res Commun* 89:1120–1126
18. Exton JH (1988) The roles of calcium and phosphoinositides in the mechanisms of  $\alpha_1$ -adrenergic and other agonists. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 111:117–224
19. Häussinger D, Gerok W (1986) Metabolism of amino acids and ammonia. In: Thurman RG, Kauffman FC, Jungermann K (eds) Regulation of Hepatic Metabolism. Intra- and Intercellular Compartmentation. Plenum Press, New York, pp 253–291
20. Helvig BS, Brady FO (1984) Effects of glucagon, Arg-vasopressin, and angiotensin II on rat hepatic zinc thionein levels. *Life Sci* 35:2513–2518
21. Hidalgo J, Borrás M, Garvey JS, Armario A (1990) Liver, brain, and heart metallothionein induction by stress. *J Neurochem* 55:651–654
22. Hoffman WE, Sanecki RK, Dorner JL, Rippy MP, Solter PF, Kuhlenschmitt MS (1988) Isoenzymes of alkaline phosphatase from liver and intestines of dogs and rabbits. In: Blackmore DJ (ed) Animal Clinical Biochemistry. Cambridge University Press, Cambridge, pp 181–187
23. Holub BJ (1987) The cellular forms and functions of the inositol phospholipids and their metabolic derivatives. *Nutr Rev* 45:65–71
24. Krämer K, Markwitan A, Menne A, Pallauf J (1992) Zinc metabolism in fasted rats. (in Vorbereitung)
25. Levy AS, Perrone RD, Madias NE (1988) Serum creatinine and renal function. *Ann Rev Med* 39:465–490
26. Löffler G, Petrides PE (1988) Physiologische Chemie. 4. Aufl, Springer, Berlin
27. Mayr GW (1990) Inositolphosphate und Inositolphospholipide. Aktuelle und zukünftige Bedeutung in der Medizin. *Dt Ärztebl* 87:C491–C494
28. McComb RB, Bowers GN Jr, Posen S (1979) Alkaline Phosphatase. Plenum Press, New York
29. McCormack JG, Denton RM (1990) Intracellular calcium ions and intramitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  in the regulation of energy metabolism in mammalian tissues. *Proc Nutr Soc* 49:57–75
30. Menahan LA, Sobocinski KA, Austin BP (1984) The origin of plasma alkaline phosphatase activity in mice and rats. *Comp Biochem Physiol* 79:B279–B283
31. Meyer-Sabellek W, Sinha P, Köttgen E (1988) Alkaline phosphatase. Laboratory and clinical implications. *J Chromatogr* 429:419–444

32. Neusser H, Pallauf J (1988) Bestimmung von Phytinsäure in Futtermitteln und Faeces mittels Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie. *J Anim Physiol a Anim Nutr* 60:20 (Abstract)
33. Pilkis SJ, El-Maghrabi MR, Claus TH (1988) Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Ann Rev Biochem* 57:755–783
34. Pressman BC (1976) Biological applications of ionophores. *Ann Rev Biochem* 45:501–530
35. Richards MP, Cousins RJ (1976) Metallothionein and its relationship to the metabolism of dietary zinc in rats. *J Nutr* 106:1591–1599
36. Richards MP, Rosebrough RW, Steele NC (1987) Effects of starvation and refeeding on tissue zinc, copper and iron in turkey pouls. *J Nutr* 117:481–489
37. Sato M, Mehra RK, Bremner I (1984) Measurement of plasma metallothionein-I in the assessment of zinc status of zinc-deficient and stressed rats. *J Nutr* 114:1683–1689
38. Simeckova A, Neradilova M, Blahos J, Vana V (1987) The effect of verapamil and the calcium ionophore A 23187 on the calcium and phosphorus content of bone. *Physiol Bohemoslov* 36:149–152
39. Skillen AW, Hawthorne GC, Turner GA (1987) Serum alkaline phosphatase in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Horm Metabol Res* 19:505–506
40. Spencer H, Kramer L, Osis D (1985) Zinc metabolism in man. *Toxicol Oncol* 5/6:265–278

Eingegangen 24. Juni 1992  
akzeptiert 13. August 1992

Für die Verfasserin:

Prof. Dr. J. Pallauf, Justus-Liebig-Universität Giessen, Institut für Tierernährung, Senckenbergstr. 5, D-6300 Giessen