

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Szeged (Ungarn)  
(Direktor: Prof. Dr. I. GY. FAZEKAS)

## **Aktivitätsveränderung der Serum-Transaminase bei experimenteller Nicotinvergiftung**

Von

**LÁSZLÓ VERESS und BÉLA RENGEI**

*(Eingegangen am 1. Mai 1959)*

Seit der ersten Mitteilung von LADUE u. Mitarb. über die Aktivitätsveränderung der Serum-Glutamin-Oxalessigsäure-Transaminase (SGO-T) (wertvolles, in der Diagnostik des myokardialen Infarktes anwendbares Zeichen) bestätigten zahlreiche Verfasser diese Ergebnisse und breiteten die Untersuchungen auch auf andere pathologische Zustände aus, in erster Linie auf die Leberschäden verschiedenen Ursprungs. — Nach WROBLEWSKI u. Mitarb. (1956) weist die erhöhte Transaminaseaktivität schon in der präikterischen Periode akuter Hepatitis, noch bevor irgendein klinisches oder Laboratoriumssymptom der Hepatitis infectiosa in Erscheinung treten würde, auf eine Leberzellenbeeinträchtigung hin. Auch in chronischer Hepatitis, Cirrhose und im Fall von Geschwulstmetastasen kann diese Aktivität sogar den einzigsten ergreifbaren Beweis liefern (WROBLEWSKI 1955). Erhöhte Transaminaseaktivität wurde auch bei der Schwangerschaftstoxämie beschrieben (BORGLIN) und der Grund dafür gleichfalls in den Leberschäden gefunden. Die verschiedenen, in den Organismus von außen eingetragenen Giftstoffe, deren Abbau bzw. Neutralisierung physiologische Aufgabe der Leber ist, verursachen unter gewissen Umständen, durch Beeinträchtigung der Leberzellen, eine Aktivitätssteigerung der Transaminase. — MOLANDER u. Mitarb. berichteten bei Kohlentetrachloridvergiftung, BANG u. Mitarb. bei akuter und chronischer Alkoholvergiftung über signifikante Enzymaktivitätssteigerung, und behaupteten, daß zwischen dem Grad der so hervorgerufenen Leberzellbeeinträchtigung und der Erhöhung der Transaminaseaktivität enger Zusammenhang nachzuweisen sei.

Das Nicotin(3)N-Methyl-Pyrrolidyl-(2')(Pyridin) ist die bekannteste Verbindung der Alkaloiden von Pyridintyp. In reinem Zustand ist es eine fast vollkommen geruchlose dichte Flüssigkeit (Gefrierpunkt bei 247° C). An der Luft wird es braun und bekommt einen charakteristischen Tabakgeruch. Sein Abbau erfolgt im Organismus besonders in der Leber, aber auch in Lungen, Nieren und Milz, und kann auf 2 Weisen vor sich gehen: auf oxydativem Weg, wo nach Zerfall des Pyrolydinringes ein gegenwärtig noch unbekanntes Endprodukt entsteht (LARSON), oder aber auf fermentativem Weg, wo ein Abbau in Oxal-Malon-Bernsteinsäure, Methylamin und Ammoniak erfolgt (FRANKENBURG, WERLE u. MEYER, sowie SCHWIEBELBEIN).

Da der schädigende Einfluß des Nicotins auf die Leber bekannt ist, wurde entschlossen, die Aktivitätsveränderung der Serumtransaminase in experimentellen Nicotinvergiftungsfällen zu untersuchen. In dem uns zur Verfügung stehenden Schrifttum konnte nur ein menschlicher Fall vorgefunden werden, wo bei dem Patienten nach akuter Nicotinvergiftung mit Genesung eine Aktivitätssteigerung der SGO-T (155 E) nachzuweisen war (TÉNYI).

### Methoden

Zum Versuch wurden 7 Kaninchen mit 1500—2000 g Körpergewicht benützt. Davon dienten 2 Kaninchen als Kontrollen. Nach den Untersuchungen wurden die Kontrolltiere mit einer einmaligen letalen Dosis getötet, die Aktivität der SGO-T unmittelbar und 24 Std nach dem Tode festgestellt.

Um eine subakute Nicotinvergiftung hervorrufen zu können, wurden an den ersten 3 Tagen täglich 3 mg/kg Körpergewicht Nicotin intravenös verabreicht. Vom 4. Tag ab wurden die Tiere subcutan behandelt und ihnen weitere 7 Tage täglich 20 mg/kg Nicotin in 2 Teilen (in 6stündigem Zeitabstand) verabreicht.

Während der Versuche wurde die SGO-T-Aktivität täglich gemessen, die Thymoltrübungsprobe sowie die Retentionsprobe mit Bromsulphalein alle Tage durchgeführt, der Bilirubinwert sowie die Eiweißfraktionen des Blutserums jeden Tag bestimmt.

Zur Bestimmung der SGO-T-Aktivität wurde die gewissermaßen geänderte Methode von DUBACH angewendet. Diese Methode beruht auf folgendem Prinzipium: die in dem zu untersuchenden Material vorhandene Transaminase überträgt die Alfa-Amino-Gruppe der dazugegebenen Asparaginsäure auf die Alfa-Ketoglutarsäure, dabei entstehen Oxalessigsäure und Glutaminsäure. Die Oxalessigsäure verwandelt sich unter dem Einfluß des Anilincitrats in Pyrotraubensäure, die mit Dinitrophenylhydrazin Hydrazon bildet. — Hydrazon, mit Toluol durchschüttelt, bildet seinerseits, unter dem Einfluß von alkoholischer Kalilauge, einen roten Komplex, dessen Farbenintensität mit der Menge der entstandenen Pyrotraubensäure bzw. mit der Transaminaseaktivität in geradem Verhältnis steht. Bei dieser Methode ergibt eine Einheit die Aktivität, bei der in 1 ml Serum während 20 min bei 25° C 1  $\gamma$  Pyrotraubensäure entsteht.

### Lösungen

I. dl Asparaginsäure . . . . . 2,66 g

$K_2HPO_4$  . . . . . 2,00 g

Alfa-Ketoglutarsäure . . . . . 0,60 g

Diese Stoffe werden in 1 n KOH aufgelöst, auf 7,4 p<sub>H</sub> eingestellt, und das Volumen auf 100 ml aufgefüllt (im Kühlschrank etwa 4—5 Wochen zu bewahren).

II. 100%ige Trichloressigsäure.

III. 5 g Citronensäure in 5 ml destilliertem Wasser aufgelöst, 5 ml Anilin zugeben. — Falls Trübung ist die Lösung auszutauschen.

IV. In 20 ml konzentriertem HCl werden 100 mg 2,4-Dinitrophenylhydrazin aufgelöst, mit destilliertem Wasser auf 100 ml ergänzt.

V. Toluol.

VI. 2,5%ige KOH-Lösung. — 3—4-täglich neue Lösung anzufertigen.

### Verfahren

Bei jeder Bestimmung muß man auch eine „blinde“ Probe durchführen und deshalb folgendermaßen verfahren: In 2 Zentrifugalröhren werden je 0,5 ml

Serum, dann in die „Blinde“ je 1 Tropfen Lösung II. und III. eingemessen, dann in beiden Röhren je 0,5 ml Lösung I. zugegeben und an 25° C gehalten. Punkt nach 20 min werden dem zu untersuchenden Material je 1 Tropfen Lösung II. und III. zugegeben und zusammengeschüttelt. Nach wieder 20 min werden in den beiden Röhren je 0,5 ml Lösung IV. zugesetzt, geschüttelt und 5 min stengelassen. Danach werden die beiden Röhren je 2 ml Lösung V. zugegeben, stark geschüttelt, und bei einer Umdrehzahl von 1500/min zentrifugiert. Von den entstehenden 3 Schichten wird aus der oberen, bißchen gelblichen 1 ml abgesaugt, dazu 3 ml Lösung VI. gegeben. Nach Zusammenschüttelung wird die Extinktion der entstandenen roten Farbe — der Blindprobe gegenüber — in einer Cuvette von 10 mm mit einem Filter S 57 abgelesen.

Rechnung: Transaminaseeinheit =  $169 \cdot E^2 + 970 \cdot E$  ( $E$  = Extinktion).

### Ergebnisse

Die Aktivitätsveränderung der SGO-T zeigt folgende Tabelle.

Tabelle. *Wirkung subakuter Nicotinvergiftung auf die Transaminase-Aktivität im Kaninchenserum*

Anzahl der Tage	Behandelte Kaninchen					Kontrollkaninchen		Bemerkung
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
1	17	27	19	25	19	19	25	intravenöse Behandlung
2	19	29	25	19	25	25	19	
3	26	25	29	29	19	25	29	subcutane Behandlung
4	20	23	29	39	29	19	29	
5	39	39	40	36	88	25	25	Ende der Behandlung
6	100	115	146	95	126	29	19	
7	181	192	253	204	230	29	25	
8	263	306	373	254	284	19	19	
9	373	404	395	341	386	29	29	
10	393	437	426	448	467	19	29	
11	387	440	425	439	446	19	25	
12	360	428	428	442	415	29	19	
13	341	394	413	402	321	25	17	
14	293	324	341	376	200	17	19	
15	202	300	294	305	204	19	25	
16	142	212	227	237	115	25	29	
17	96	154	147	149	39	29	26	
18	37	76	158	95	39	29	19	
19	17	62	87	63	29	19	17	
20	19	29	39	29	19	19	19	
21	29	25	34	29	19	29	19	

Aus der Tabelle geht hervor, daß der normale Transaminasewert von Kaninchen, im Mittelwert, um 20 E liegt. Bei Nicotinvergiftung stieg dieser Wert bei allen Kaninchen erheblich auf das 15—20fache des Ausgangswertes. Von den durchgeführten Leberfunktionsproben schwankte die Thymoltrübungsprobe zwischen 0,4—2,8 E, der Serum-

bilirubinwert zwischen 0,04—0,38 mg. %, die Bromsulphalein-Retentionsprobe zwischen 0—2%. — Von den Serumeiweißfraktionen lag der Wert des Albumins zwischen 56—61%, der des  $\alpha_{1-2}$ -Globulins zwischen 7 bis 11%, der des  $\beta$ -Globulins zwischen 10—13%, der des  $\gamma$ -Globulins zwischen 15—17%. — Die Transaminaseaktivität des Blutserums in Kaninchen mit normalem SGO-T-Niveau (19,25 E) betrug unmittelbar nach Zufuhr der einmaligen tödlichen Dosis (50 mg pro kg Körpergewicht) 181 bzw. 159 E, nach 24 Std (die Tiere bei + 10° C gehalten) 95 bzw. 79 E.

### *Besprechung*

Die SGO-T-Aktivität begann am 5. Tag bei einem Kaninchen bedeutend, bei den übrigen mäßig anzusteigen. Dieser Anstieg war vom 6.—10. Tag sehr hochgradig, vom 11. Tag ab, nach Einstellung der Behandlung, nahm sie anfangs langsam, später aber energisch ab, und erreichte am 19. bzw. 20. Tage, das normale Niveau. An den ersten 3 Tagen zeigte also die SGO-T-Aktivität überhaupt keine Veränderung, obwohl das täglich intravenös verabreichte Nicotin eine für die subletale Vergiftung charakteristische klassische Biphasenwirkung ausübte (FEURT). Diese Erscheinung könnte folgendermaßen erklärt werden:

So der oxydative wie der fermentative Abbau des Nicotins erfolgt vermutlich rasch bei intravenöser Zufuhr, kann aber mit der Absorption nicht Schritt halten, weshalb das Gift auch in verhältnismäßig kleiner Menge schwere Nervensystemssymptome hervorrufen kann. Da bei intravenöser Einspritzung auch der Zeitfaktor eine entscheidende Rolle spielt, wurde von mehreren Verfassern die Methode der Tropfinfusion verwendet; auf diese Art können wesentlich größere Mengen (9 mg/kg während 8 Std  $DL_{50}$ ) eingetragen werden. Aber auch so konnte der letale Ausgang in bedeutender Zahl der Fälle nicht vermieden werden. Die intravenöse Behandlung hat also auf jede Weise ihr Risiko, dabei ist die Nicotinmenge in beschränktem Maße einzuführen, weshalb bedeutendere Beeinträchtigungen im Organismus nicht zu erwarten sind.

Einerseits um den Krampfzustand mit letalem Ende zu vermeiden, und andererseits um den Organismus — in erster Linie die Leber — durch Zufuhr von wesentlich größerer Nicotinmenge beeinträchtigen zu können, wurde auf die eine langsamere Absorption sichernde subcutane Behandlung übergegangen. Aus unseren Ergebnissen geht hervor, daß sich unsere Idee für richtig erwies und daß, trotz der vorgefundenen bedeutenden Steigerung der SGO-T-Aktivität — Zeichen des Leberzellschadens — kein einziges Tier während der Versuche in Krämpfen eingegangen ist. Vom 8. Tag ab zeigten aber die Tiere Unruhe, Zittern, Schwäche, verzehrten ihr Futter nicht mehr, in 2 Fällen wurden sogar nach der subcutanen Injektion mild ablaufende Krämpfe beobachtet.

Wegen dieser Erscheinungen und um die Veränderung der SGO-T-Aktivität auch im Zustand nach Vergiftung untersuchen zu können, wurde die Behandlung am 10. Tage unterbrochen. Am Versuchsende traten auch schon nach subcutanen Injektionen Krämpfe auf, weshalb daran gedacht wurde, daß in den verschiedenen Organen, in erster Linie in der Leber, der oxydative und fermentative Abbau des Nicotins infolge der Vergiftung in großem Maße geschädigt bzw. gelähmt wurde.

Unter dem Einfluß des Nicotins zeigt sich also zweifelsohne eine bedeutende Steigerung der Transaminaseaktivität, dieser Anstieg bleibt aber bedeutend hinter der im Schrifttum beschriebenen, durch Kohlentetrachlorid verursachten Aktivitätssteigerung (27840 E). Der Unterschied kann zuerst dadurch erklärt werden, daß das Kohlentetrachlorid die Leber ausgesprochener beeinträchtigt als das Nicotin. Die Zufuhr einer Nicotinmenge, die gleiche Leberschäden verursachen sollte wie das Kohlentetrachlorid, ist, wegen der aufs Nervensystem ausgeübten schädigenden Wirkung, unmöglich.

Die durchgeführten Leberfunktionsproben und Serumeiweißfraktionen sind, im Laufe der Versuche, zwischen den Normalwerten geblieben. Das stimmt mit der Beobachtung von WROBLEWSKI u. Mitarb. in aller Hinsicht überein, daß nämlich die Veränderung des Transaminase-Niveaus (bei Leberläsion) mit der Veränderung der Leberfunktionsproben nicht notwendigerweise parallel verläuft, da die Veränderung in erster Linie der Index der Zellschäden und nicht des Verderbens der Leberfunktion sei. — Die makroskopische Untersuchung der Kaninchenleber ergab eine kleingradige fleckige Entartung, die Mikroschnitte zeigten, besonders ums Zentrum der Läppchen, Zellveränderungen mäßigen Grades, wie Gequollenheit, Vakuolisierung, Zeichen einer Kariolyse, stellenweise centrolobuläre Fettablagerung.

In unseren Versuchen wurde nicht nur die Steigerung der SGO-T-Aktivität bei experimenteller Nicotinvergiftung nachgewiesen, sondern es kann auf Grund der Beobachtungen des Wirkungsmechanismus bei Nicotinvergiftung auch darauf gefolgert werden, daß der plötzliche Tod bei akuter Vergiftung wahrscheinlich dadurch bedingt ist, daß der Organismus wegen des relativ langsameren Abbaus die Wirkung des absorbierenden Giftes auf das Nervensystem nicht verhindern kann.

Die Ergebnisse der Transaminasebestimmungen, die mit dem Serum der durch einmalige letale Dosis getöteten Tiere durchgeführt worden sind, führen zur Folgerung, daß auch in menschlichen Nicotinvergiftungsfällen — wenn auch andere Bedingungen bestehen (die seit dem Tod verflossene Zeit, die Aufbewahrung der Leiche bei entsprechender Temperatur die Ausschließbarkeit eines myokardialen Infarktes usw.) — diese Methode, neben anderen Untersuchungsverfahren, zum Beweis der Vergiftung angewendet werden könne.

### Zusammenfassung

In 5 Kaninchen wurde die Wirkung der subakuten Nicotinvergiftung untersucht, die SGO-T-Aktivität, das Serumbilirubin bestimmt, die Thymol-Trübungsprobe und die Eiweißfraktionen durchgeführt. Es wurde folgendes festgestellt:

1. Unter dem Einfluß der Behandlung stieg die SGO-T-Aktivität auf das 15—20fache der Normalwerte an, und kehrte nach Einstellung der Behandlung am 20. Versuchstag auf die Normale zurück.

2. Die durchgeführten Leberfunktionsproben und Serumeiweißfraktionen blieben zwischen den normalen Wertgrenzen.

3. Im Falle von 2 Kaninchen, die durch einmalige letale Dosis getötet worden sind, blieb die SGO-T-Aktivität auch 24 Std nach dem Tode bedeutend erhöht.

4. Es wird vorausgesetzt, daß der plötzliche Tod nach einer akuten Nicotinvergiftung durch die Ganglionlähmung bedingt ist, die wegen der Zeitdifferenz zwischen Absorption und Abbau des Giftes zustande kommt.

### Literatur

BANG, N. U., K. IVERSEN, T. JAGT and S. MADSEN: Serum glutamic oxalacetic transaminase activity in acute and chronic alcoholism. *J. Amer. med. Ass.* **168**, 157 (1958). — BORGLIN, N. E.: Serum transaminase activity in uncomplicated and complicated pregnancy and in newborns. *J. clin. Endocr.* **8**, 872 (1958). — DUBACH, U. C.: Eine einfache Methode zur Bestimmung der Serum-Glutamin-Oxalessigsäure-Transaminase. *Schweiz. med. Wschr.* **87**, 185 (1957). — FEURT, S. D., J. H. JENKINS, F. A. HAGENS and H. A. COCKFORD: Pharmacology and toxicology of nicotin with special reference to species variation. *Science* **127**, 1054 (1958). — FRANKENBURG, W. G.: Nicotine degradation in vitro induced by agents from tobaccosseed. *Nature (Lond.)* **175**, 945 (1955). — LADUE, J. S., F. WROBLEWSKI and A. KARMEN: Serum glutamic transaminase activity in human acute transmural myocardial infarction. *Science* **120**, 497 (1954). — LARSON, P. S.: Metabolism of nicotin and nature of tobacco smoke irritants. *Ind. Eng. Chem.* **44**, 279 (1952). — MOLANDER, D. W., F. WROBLEWSKI and J. S. LADUE: Serum glutamic-oxalacetic transaminase as an index of hepatocellular integrity. *J. Lab. clin. Med.* **43**, 345 (1955). — SCHIEVELBEIN, H., u. E. WERLE: Zur Frage der Entstehung von Methylamin beim Abbau des Nikotins durch Leber und zum Abbau von Methylamin durch Leber. *Arzneimittel-Forsch.* **2**, 117 (1957). — TÉNYI, M.: Klinikai tapasztalatok a serum transaminase aktivitás mérésével. *Orv. Hetil.* **35**, 1207 (1958). — WERLE, E., u. A. MEYER: Über den Abbau von Tabakalkaloiden durch tierisches Gewebe. *Biochem. Z.* **321**, 221 (1950). — WROBLEWSKI, F., and J. S. LADUE: Serum glutamic-oxalacetic transaminase activity as an index of liver cell injury. *Ann. intern. Med.* **43**, 345 (1955). — Serum glutamic-oxalacetic aminopherase (transaminase) in hepatitis. *J. Amer. med. Ass.* **160**, 1130 (1956).

Dr. LASZLO VERESS,

Bela Rengei, Szeged (Ungarn), Kossuth Lajos sugarut 40  
Institut für gerichtliche Medizin der Universität