

Zur cytospektrometrischen Erfassung der Succinodehydrogenase-Aktivität mit dem MTT-Reagens in isolierten Zellen*

Von

E. Schauenstein und Ellen Höfler-Bergthaler

Aus dem Institut für Biochemie der Universität Graz

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 17. Januar 1972)

Cytospectrometric Determination of the Succinodehydrogenase Activity in Isolated Cells with MTT Reagent

Nitrogen-dried smears of *Ehrlich* ascites tumor cells are stained with the tetrazolium salt *MTT* for succinodehydrogenase activity.

The intensity of the staining is measured cytospectrometrically by scanning the single cells.

The statistic distribution of the total extinctions of the single cells is analysed and shown graphically. Thus it is possible to obtain basic values for quantitative comparisons.

As an example for application, the strong inactivation of SDH by 4-Hydroxypentalen is presented.

Im Stickstoffstrom getrocknete Ausstriche von *Ehrlich*-Ascites-Tumorzellen werden mit dem Tetrazoliumsals *MTT* auf SDH-Aktivität gefärbt und die Intensität der Färbung cytospektrometrisch durch mäanderförmiges Absuchen der Einzelzellen gemessen.

Die statistische Verteilung der erhaltenen Gesamttextinctionen wird analysiert und graphisch dargestellt.

Dadurch ist es möglich, Bezugswerte für quantitative Vergleiche zu erhalten.

Als Anwendungsbeispiel dient die Inaktivierung der SDH durch 4-Hydroxypentalen.

Behandelt man native *Ehrlich*-Ascites-Tumorzellen (*EATZ*) mit isotonen Lösungen von 4-Hydroxypentalen (*HPE*) und färbt mit dem *MTT*-Reagens auf Aktivität der Succinodehydrogenase (SDH), so zeigt sich, daß die Aktivität des Enzyms bei einer *HPE*-Konzentration $\geq 3 \cdot 10^{-3}m$ gegenüber den Kontrollen drastisch gesenkt wird¹.

* Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. *Otto Kratky* zum 70. Geburtstag gewidmet.

Zur Quantifizierung dieses qualitativen Befundes wurde der Succinatgehalt der Zellen enzymatisch bestimmt, wobei sich ein Anstau um 95% der Kontrollwerte ergab. In der Folge wurde mit den gleichen Methoden gefunden, daß *HPE* die SDH mehrerer tierischer Tumoren wesentlich stärker hemmt als die von Normalgeweben².

Diese Ergebnisse ließen es wünschenswert erscheinen, die Untersuchungen auf ein größeres biologisches Material auszudehnen. Außerdem könnte etwa daran gedacht werden, Tumorzellen von Normalzellen in cytologischen bzw. histologischen Präparaten auf Grund des unterschiedlichen Verhaltens der SDH-Aktivitäten gegenüber *HPE* voneinander zu differenzieren.

Für solche Untersuchungen wäre es überaus vorteilhaft — für das zweitgenannte Projekt sogar eine Voraussetzung —, wenn es gelänge, die bisherigen qualitativ-orientierenden cytochemischen Färbungen mikrospektrometrisch zu quantifizieren.

Die großen Vorteile dieser Meßmethodik gegenüber anderen Methoden bestünden, abgesehen von der einfacheren Durchführung und dem geringeren Materialbedarf, vor allem darin, daß damit nicht nur ein Kollektivwert erhalten wird, der über das Verhalten aller Einzelzellen grob mittelt, sondern daß außerdem Informationen über das Verhalten der Einzelzelle, ggf. Vorhandensein von Untergruppen, Häufigkeit von Extremwerten und statistische Verteilungsformen zur Verfügung stehen. Hierüber soll im folgenden kurz berichtet werden.

Material und Methoden

Zellen des in NMRI-Mäusen beiderlei Geschlechts passagierten *Ehrlich-Ascites-Tumors*, Stamm Heidelberg — *Lettré (EATZ)*, die den Tieren zwischen dem 6. und 8. Tag post transpl. entnommen wurden.

Farbreagens: *MTT* = 3-(4',5'-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (pure a. r.; Koch-Light, Lab., Colnbrook, England).

Substrat: Dinatriumsuccinat (mit 6 Kristallwasser; Boehringer, Mannheim).

Phosphatpuffer: 0,06*m*, pH 7,4. Polyvinylpyrrolidon (BDH, England), 4-Hydroxy-2-penten-1-al (*HPE*), synthetisiert nach *Esterbauer* und *Weger*³, als $4,2 \cdot 10^{-3}m$ -Lösung. $n_D^{20} = 1,472$, $d_4^{20} = 1,004$, ϵ bei $44\ 700\text{ cm}^{-1} = 13\ 800$.

Arbeitsvorgang

0,2 ml einer Suspension, die pro ml 0,9proz. isotoner NaCl-Lösung 100 Mio nativer *EATZ* enthielt, wurden mit 0,5 ml isotoner NaCl-Lösung versetzt, 30 Min. bei 37 °C aerob inkubiert und anschließend 1 : 10 mit isotoner NaCl-Lösung verdünnt. Ein Tropfen dieser Suspension wurde auf einen Quarzobjektträger aufgetragen und im Stickstoffstrom bei Zimmertemp. getrocknet. Die auf den Objektträgern haftenden Zellen wurden anschließend mit *MTT-Co* nach *Pearse*⁴ 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Dann

wurden die Zellen von anhaftender Färbelösung durch Spülen mit 1proz. HCl befreit, 10 Min. lang in Calcium-Formol-Lösung fixiert und luftgetrocknet. Schließlich wurden die Präparate in *Kaysers* Glycerin—Gelatine (0,5 molar an CoCl_2) eingedeeckelt und — um sie vor Luftzutritt zu schützen — mit Umrandungslack der Fa. C. Zeiss versehen.

Sämtliche Messungen wurden mit dem UMSP I der Fa. C. Zeiss, Oberkochen, durchgeführt:

Objektiv: 100. Projektiv: 100. Meßblende in Objektebene: 1 μ . Leuchtblende: bei Aufnahme des Absorptionsspektrums: 5 μ ; bei mäanderförmiger Absuchung der Zellen: 2 μ .

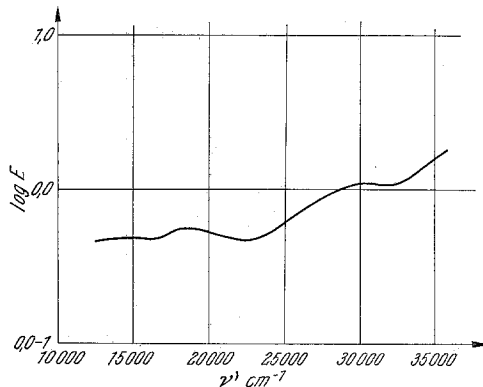


Abb. 1. Absorptionsspektrum eines mit *MTT*-Formazan auf *SDH*-Aktivität gefärbten Granulums im Plasma einer *EAT*-Zelle

Ergebnisse

Abb. 1 zeigt das Absorptionsspektrum eines auf *SDH*-Aktivität angefärbten Granulums einer *EAT*-Zelle. Um unkontrollierbare Störungen durch den diffusen Untergrund möglichst gering zu halten, wurde das Absorptionsmaximum bei 30 300 ν' zur quantitativen Auswertung herangezogen.

Sodann wurde ein Kollektiv von 51 Zellen bei 30 300 ν' durch mäanderförmiges Absuchen der Einzelzellen auf die Gesamtextinktion E_{ges} untersucht. Abb. 2a veranschaulicht die statistische Verteilung der erhaltenen Einzelwerte; Spalte *a* der Tab. 1 bringt die Meßergebnisse.

Selbstverständlich liefert die Methode nur Bezugswerte für quantitative Vergleiche.

Als Anwendungsbeispiel sei die eingangs erwähnte Blockierung der *SDH* der Tumorzellen durch *HPE* gebracht. *EATZ* wurden unter den angegebenen Bedingungen mit 0,5 ml isotoner *HPE*-Lösung inkubiert ($c_{\text{End}} = 3,0 \cdot 10^{-3}m$) und anschließend auf *SDH*-Aktivität gefärbt. Sodann wurden die E_{ges} -Werte von 53 Zellen bei 30 300 ν' gemessen und

ihre statistische Verteilung in Abb. 2b graphisch dargestellt. Spalte *b* der Tab. 1 enthält die Ergebnisse.

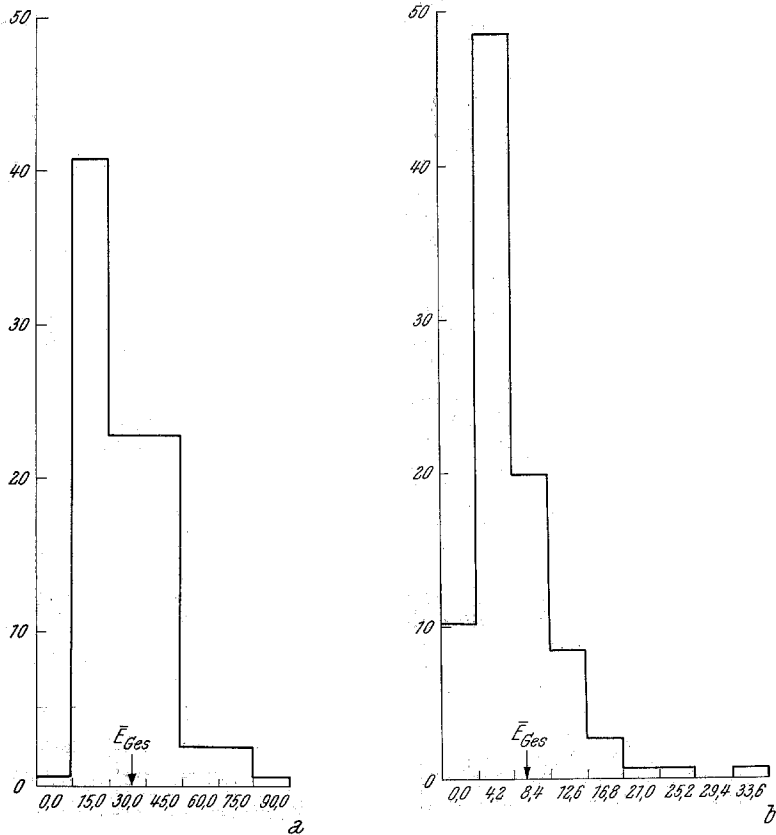


Abb. 2. Statistische Verteilung der E_{ges} -Werte mit *MTT*-Formazan auf *SDH*-Aktivität gefärbter *EAT*-Zellen. Meßwellenlänge: 30 300 μ . *a*: nach Inkubation in isotoner *NaCl*-Lösung; *b*: nach Inkubation in isotoner $3 \cdot 10^{-3}$ m Lösung. Abszisse: In Klassen zusammengefaßte E_{ges} -Werte. Ordinate: Relative Häufigkeit in %

Die Ergebnisse zeigen, daß es möglich ist, die cytochemische Färbung mit *MTT* mikrospektrometrisch zu quantifizieren und statistisch auszuwerten.

Eine spezielle Diskussion dieses Befundes soll an Hand eines größeren biologischen Materials in einer späteren Arbeit gegeben werden. Dort wird gezeigt werden, daß die Methode auch für Organzellen anwendbar ist, wenn es gelingt, aus dem betreffenden Organ (oder Organstück)

native Einzelzellen zu gewinnen, wofür mehrere gangbare Methoden zur Verfügung stehen.

Tabelle 1

Inkubation	<i>a</i>	<i>b</i>
<i>n</i>	51	53
\bar{E}_{ges}	32,0	7,0
<i>s</i>	18,4	6,1
Median	25,1	4,9
\bar{E}_{ges}^+	32,0	6,2
<i>s</i> ⁺	18,4	4,4 (<i>n</i> = 51)
$\Delta \bar{E}^+$	25,8 ± 7,0 (Wahrscheinlichkeit der Sicherheit: 99%)	

n = Zahl der gemessenen Zellen; \bar{E}_{ges} = arithmetisches Mittel der E_{ges} -Einzelwerte; *s* = Standardabweichung; + bedeutet, daß die betreffenden Werte nach zulässiger Eliminierung von Ausreißern erhalten wurden; *a* = Inkubation in isotoner NaCl-Lösung; *b* = Inkubation in isotoner $3 \cdot 10^{-3}m$ -HPE-Lösung.

Die statistische Verarbeitung des Materials erfolgte im Grazer Rechenzentrum durch Herrn Professor Dr. J. Gölles, dem an dieser Stelle hierfür herzlichst gedankt sei. Die Problematik der statistischen Auswertung wird von Gölles in einer gesonderten Mitteilung behandelt werden.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung des Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Wien, durchgeführt.

Literatur

- ¹ E. Schauenstein und E. Kapfer, Mh. Chem., im Druck (1972).
- ² E. Kapfer und E. Schauenstein, Z. Krebsforsch., im Druck (1972).
- ³ H. Esterbauer und W. Weger, Mh. Chem. **98**, 1884, 1994 (1967).
- ⁴ A. Pearse, Principles of Dehydrogenase Histochem. 2nd ed., pp. 536, 910. London: Churchill. 1960.