



Doctoral Thesis

## **Cytochrom P-450-abhängige Monooxygenase-Aktivitäten in extrahepatischen Zellen der Ratte**

**Author(s):**

Frei, Karl

**Publication Date:**

1983

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000312458> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 7291

CYTOCHROM P-450-ABHAENGIGE MONOOXYGENASE-  
AKTIVITAETEN IN EXTRAHEPatischen ZELLEN DER RATTE

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
der  
EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
ZUERICH

vorgelegt von  
KARL FREI  
Dipl. Natw. ETH Zürich  
geboren am 28. April 1950  
von Nuglar-St. Pantaleon (SO)  
und Zürich

Angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. F.E. Würigler, Referent  
Prof. Dr. G. Zbinden, Korreferent

Zürich 1983

## ZUSAMMENFASSUNG

Es ist bekannt, dass Biotransformationen für viele Substanzen unerlässlich sind, um im Organismus eine toxische, mutagene oder karzinogene Aktivität auszuüben. Die Enzyme, die für die meisten Reaktionen der Phase I verantwortlich sind, sind in der Zelle in einem Multienzymkomplex (MFO-System) zusammengefasst, der sich in der Membran des glatten endoplasmatischen Retikulums befindet. Der Gehalt dieser Enzyme ist in der Leber am höchsten, währenddem er in extrahepatischen Organen sehr variabel ist. Um abzuklären, ob extrahepatische Gewebe für In-vivo-Mutagenitätstests geeignet sind, wurden die Enzymaktivitäten spezieller Zellpopulationen untersucht.

Die Zellen wurden aus einem subkutanen Granulationsgewebe der Ratte isoliert, das durch die Injektion von Luft gebildet worden war. In diesem experimentellen Granuloma können mutagene und karzinogene Effekte gemessen werden ("Granuloma Pouch Assay").

Bei der Epoxidierung von Aldrin zu Dieldrin, die durch das MFO-System katalysiert wird, handelt es sich um einen hoch spezifischen Indikator für eine Cytochrom P-450-abhängige Monooxygenasereaktion des Phenobarbital-Typs. Der Enzym-Assay wurde adaptiert zur Messung der Aktivitäten intakter, extrahepatischer Zellen.

Durch Vorbehandlung der Tiere mit Phenobarbital, Aldrin und Dieldrin wurde die Epoxidierungsrate in der Leber (S-9 Fraktion) 2fach induziert. In den untersuchten extrahepatischen Geweben (Granulationsgewebe, Milz und Thymus) konnte eine leichte, jedoch statistisch nicht signifikante Induktion festgestellt werden. Wenn die Aktivitätsbestimmung hingegen in intakten Granulom-Zellen erfolgte, konnte nach gleicher Vorbehandlung der Tiere eine Verdoppelung der Grundaktivität nachgewiesen werden. Die In-vitro-Modifikation in den extrahepatischen S-9 Fraktionen mit Propanol lieferte zusätzliche Hinweise dafür, dass nicht nur konstitutives, sondern auch noch induziertes Cytochrom P-450 vorhanden sein muss.

Dexamethason,  $\beta$ -Naphthoflavin und Disulfiram bewirkten in der Leber und den extrahepatischen Geweben eine Aktivitätserniedrigung.

Die Aldrin-Epoxidase-Aktivität wurde in Granulom-Zellkulturen nach 96-stündiger Dexamethason-Induktion versiebenfacht. Phenobarbital zeigte eine 1,6fache Erhöhung.

Mit Hilfe der zentrifugalen Elutriation konnten in der vorliegenden Arbeit die Zellen des Granulationsgewebes in 4 Subpopulationen fraktioniert werden. Diese unterscheiden sich in der Klonierbarkeit und der Enzymaktivität. Die Aldrin-Epoxidase-Aktivität der kleinsten Zellen (Fraktion 1), die einen Anteil von 45% ausmachen, war doppelt so hoch wie die unseparierter Zellen. Dies ist ein Indiz dafür, dass dieses extrahepatische Gewebe aus Subpopulationen mit unterschiedlichen MFO-Aktivitäten besteht.

Wegen der Fähigkeit des Granulationsgewebes, Aldrin zu epoxidieren, wurde in dieser Arbeit Aldrin und Dieldrin hinsichtlich ihrer Mutagenität überprüft. Aldrin und Dieldrin induzierten in den verwendeten Dosierungen keine Spezifisch-Lokus-Mutationen ( $6-TG^r$ ) in den Granulomzellen.

Beim Vergleich der Enzymaktivitäten von Hepatozyten mit Granulomzellen fällt auf, dass die Aldrin-Epoxidase-Aktivität von Hepatozyten rund 3000 mal höher ist. Dennoch hat die limitierte Biotransformationskapazität extrahepatischer Zellen eine biologische Bedeutung, indem toxische, mutagene oder karzinogene Metabolite innerhalb der Zelle gebildet werden können. Bestätigt wird dies durch vorläufige Resultate mit den Promutagenen Dimethylnitrosamin und Aflatoxin B<sub>1</sub>. Nach lokaler Applikation vermögen beide Substanzen Spezifisch-Lokus-Mutationen zu induzieren, währenddem nach systemischer kein mutagener Effekt auftritt.

## S U M M A R Y

Biotransformation is often necessary to convert chemicals into their ultimate toxic, mutagenic or carcinogenic metabolites. The enzymes responsible for most of these reactions (phase I metabolism) belong to a multienzyme complex (MFO) which is localized within the membranes of endoplasmic reticulum. The activity of this enzyme system is highest in the liver and low or even undetectable in extrahepatic tissues. In order to determine the applicability of extrahepatic tissues for mutagenicity tests in whole animals the enzyme activities were measured in specific cell populations.

The cells were isolated from a subcutaneous granulation tissue induced by an injection of air. In this experimental granuloma, mutagenic and carcinogenic effects can be measured (granuloma pouch assay).

The epoxidation of aldrin catalyzed by the MFO system is known to be a highly sensitive indicator for phenobarbital inducible cytochrome P-450-dependent monooxygenase activities. The enzyme assay was adapted for measuring epoxidation in intact, extrahepatic cells.

Pretreatment of animals with phenobarbital, aldrin or dieldrin increased the S-9 fraction epoxidation rate in liver 2-fold, whereas the extrahepatic induction rate (granulation tissue, spleen and thymus) was only moderate and not statistically different from controls. In marked contrast the activity in intact granuloma cells was doubled after the same pretreatment of the animals. In vitro modification of the extrahepatic S-9 fractions with propanol indicate that this activity is composed of constitutive cytochrome P-450 as well as of an induced variety.

Dexamethasone,  $\beta$ -naphthoflavone or disulfiram treatment in vivo depressed enzyme activity in all tissues investigated.

In cultures of isolated granuloma cells aldrin epoxidase activity was enhanced 7-fold after dexamethasone-treatment (96 hr). Phenobarbital (96 hr) caused a 1.6-fold increase.

Granuloma cells were separated by centrifugal elutriation into 4 subpopulations, which differed in their growth capacity (cloning efficiency) and enzyme activity. The smallest cells (fraction 1) which represent about 45% of the recovered cells, exhibited a 2-fold higher aldrin epoxidase activity than the total mixed cell population. This indicates the presence of subpopulations in this extrahepatic tissue enriched in enzymes involved in xenobiotic metabolism.

In a mutagenicity test it was investigated whether the epoxidation of aldrin leads to mutagenic metabolites using the granuloma pouch assay. Aldrin or dieldrin were not able to induce specific locus mutations (6-TG<sup>r</sup>) in granuloma cells.

A comparison of the epoxidase activity in hepatocytes and granuloma cells showed a difference of about 3000-fold in favour of the liver cells. Nevertheless, the limited biotransformation capacity of extra-hepatic cells has a biological significance, in that toxic, mutagenic or carcinogenic metabolites can be formed within these cells. This is illustrated by preliminary results with the promutagens dimethylnitrosamine and aflatoxin B<sub>1</sub> which both caused specific locus mutations in granuloma pouch cells when injected directly into the pouch.