

Die Aktivität der Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase und der Laktatdehydrogenase in menschlichen Kataraktlinsen

DIETER FRIEDBURG

Universitäts-Augenklinik Kiel (Direktor: Prof. Dr. H. PAU)

Eingegangen am 31. Mai 1966

Untersuchungen an verschiedenen experimentellen Katarakten ergaben bei Tierlinsen u.a. Störungen der Glykolyse (NORDMANN, DILLSCHNEIDER; NORDMANN, MANDEL, ARCHARD; MARONE, CITRONTI; SALMONY; BONAVOLANTA) und des aktiven Transportes von Kationen (DESIGNES, BARON, DELANY; PAU, LEITHÄUSER). Der Kationentransport gegen das Diffusionsgefälle ist ATP-abhängig (HARRIS, HAUSCHILDT, NORDQUIST; KERN, ROOSA, MURRAY; KINSEY, REDDY). Messungen der Aktivitäten verschiedener Enzyme des energieliefernden Stoffwechsels zeigten Unterschiede zwischen klaren Linsen und experimentellen Katarakten (NORMANN, MANDEL, SCHMITT; NORDMANN, MANDEL; WARTMANN, BECKER; GREEN, SOLOMON; SALMONY; DARDENNE, DRECHSLER; HOCKWIN, LICHT, NOLL; PIRIE; v. HEYNINGEN, PIRIE), auch scheint in getrübbten Linsen die Synthese energiereicher Phosphatbindungen vermindert zu sein (DE CONCILIIIS; PIRIE; LERMAN). Bisher wurden diese Untersuchungen vorwiegend an Tierlinsen durchgeführt, nur wenige an menschlichen Kataraktlinsen gewonnene Ergebnisse liegen vor (DARDENNE, DRECHSLER; PAU, LEITHÄUSER). Aufgrund der an Tierlinsen gewonnenen Ergebnisse scheint die Synthese energiereicher Phosphatbindungen für das Klarbleiben der Linse wichtig zu sein. In diesem Zusammenhang entsteht die Frage, ob bei menschlichen Kataraktlinsen eine Störung des energieliefernden Stoffwechsels vorliegt. Vermutlich erfolgt der überwiegende Teil der Energiegewinnung in der Linse über die Glykolyse (KINOSHITA, MEROLA). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Enzyme der Glykolyse, Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase und Laktatdehydrogenase¹ in verschiedenen menschlichen Katarakt-Linsen untersucht.

Material und Methodik

Verwendet wurden menschliche Katarakt-Linsen sowie klare Linsen aus Augen, die wegen Tumoren enucleiert werden mußten. Die morphologische Beurteilung erfolgte in vivo an der Spaltlampe. Die Linsen wurden in folgende Gruppen entsprechend der Trübungsform eingeordnet:

1. Klare Linsen.
2. Kernkatarakt (graue oder braune Kerntrübung, Rinde klar).

¹ Im Folgenden werden hierfür die Abkürzungen GAPDH und LDH verwendet.

3. Permeabilitätskatarakt (direkt subkapsulär gelegene tuffsteinartige hintere Schalen­trübung, übrige Rinde klar).

4. Typischer grauer Altersstar (Wasserspalt­en, Speichentrübungen, lamelläre Zerklüftung in den tiefen und mittleren Rindenschichten).

5. Intumescente Katarakt (Perlmutterglanz in der gequollenen und dicht getrü­bten Rinde).

6. Mature Katarakt (dicht getrü­bte Rinde ohne unterscheidbare Einzelheiten).

Die Starlinsen wurden sofort nach der Extraktion aufgefangen², klare Linsen aus Tumoraugen sofort nach Enucleation vorsichtig präpariert. Der Transport ins Labor erfolgte in einer eisgekühlten feuchten Kammer. Nach Abtrocknen auf Fließpapier wurde der Kern nach Anreißen der Kapsel vorsichtig ausgequetscht. Die danach verbleibenden Rindenmassen und die Linsenkapsel einschließlich Epithel wurden kurz als „Rinde“ bezeichnet und zusammen weiterverarbeitet. Nach Wiegen in Potter-Elvehjem-Homogenisatoren erfolgte sofort die Homogenisierung mit eiskalter 0,1 molarer Kaliumphosphatpufferlösung, pH-Wert 7,3. Nach Abzentrifugieren in der Kühlzentrifuge (20 min bei 28000 × g und ca. + 4°C) wurde der klare Überstand zur Enzymbestimmung verwendet. Diese erfolgte im optischen Test nach den von BÜCHER, LUH und PETTE angegebenen Arbeitsvorschriften. Zur Bestimmung des wasserlöslichen Proteinanteils wurde die Biuret-Methode benutzt.

Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1—4 zusammengefaßt, Tabelle 5 zeigt die Mittelwerte der gemessenen Enzymaktivitäten in klaren Linsen und

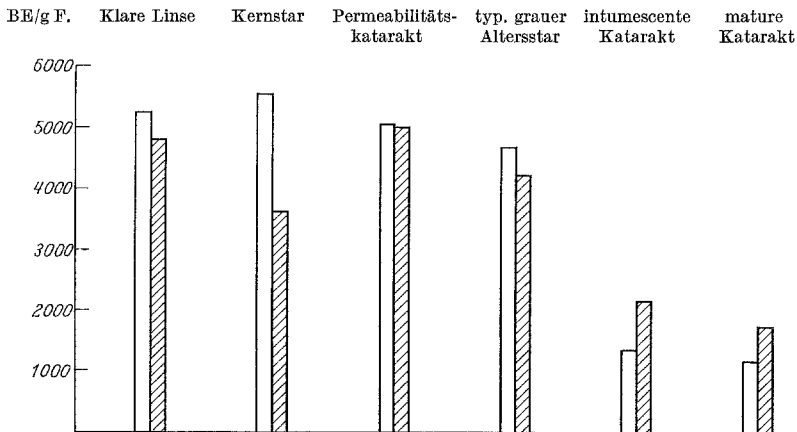


Abb. 1. Enzymaktivitäten in der Rinde menschlicher Linsen (Mittelwerte)
Dimension: BE/g Frischgewicht, □ GAPDH, ▨ LDH

bei den verschiedenen Kataraktformen. Das Verhältnis der beiden Enzyme zueinander ist in Abb. 1 für die verschiedenen Trübungsformen der Linsen graphisch dargestellt. Bei der intumescentsen Linse und bei der maturaen Katarakt ist eine Aktivitätsabnahme beider Enzyme deutlich zu erken­

² Bei Kernkatarakten wurde zur Zonulolyse α -Chymotrypsin verwendet. Kontrollen mit Kernstaren, die ohne dieses Enzym extrahiert wurden, ergaben die gleichen Enzymaktivitäten.

Tabelle 1. Die GAPDH-Aktivität in der Rinde menschlicher Linsen
Dimension: BE/g Frisch

Klare Linse	Klare Rinde bei Kernkatarakt	Permeabilitätskatarakt	Typischer grauer Altersstar	Intumescente Katarakt	Mature Katarakt
5680	5500	4960	4180	683	670
4900	6050	4120	3800	2080	1220
	5820	6020	4900	1850	1350
	4650	5400	5760	685	1465
	5550	6100		1390	
		4700			
		3980			

Tabelle 2. Die GAPDH-Aktivität in der Rinde menschlicher Linsen
Dimension: BE/mg Extraktprotein

Klare Linse	Klare Rinde bei Kernkatarakt	Permeabilitätskatarakt	Typischer grauer Altersstar	Intumescente Katarakt	Mature Katarakt
27,5	23,8	21,3	17,7	7,5	7,2
23,5	32,0	13,2	16,5	15,2	24,8
	29,1	23,8	22,4	12,6	15,3
	21,6	25,3	27,0	8,3	19,9
	26,2	29,0		9,4	
		21,7			
		18,6			

Tabelle 3. Die LDH-Aktivität in der Rinde menschlicher Linsen
Dimension: BE/g Frisch

Klare Linse	Klare Rinde bei Kernkatarakt	Permeabilitätskatarakt	Typischer grauer Altersstar	Intumescente Katarakt	Mature Katarakt
5400	3740	4230	3480	910	1010
4220	3590	4720	3570	3740	1710
	3730	6180	5800	2880	1940
	3120	3890	3950	1380	2240
	3930	6380		2080	
		5050			
		4470			

Tabelle 4. Die LDH-Aktivität in der Rinde menschlicher Linsen
Dimension: BE/mg Extraktprotein

Klare Linse	Klare Rinde bei Kernkatarakt	Permeabilitätskatarakt	Typischer grauer Altersstar	Intumescente Katarakt	Mature Katarakt
26,2	15,6	18,1	14,8	10,0	10,8
20,2	18,1	14,0	15,5	27,4	34,5
	18,6	24,4	26,4	19,7	22,0
	14,4	18,3	19,4	16,6	30,3
	18,6	30,4		14,1	
		23,2			
		20,8			

Tabelle 5. Die GAPDH- und LDH-Aktivität in der Rinde der menschlichen Linsen.
(Mittelwert \pm dessen Standardabweichung)

Dimen- sion	Klare Linse $n = 2$	Klare Rinde von Kern- katarakt $n = 5$	Permeabili- tätskatarakt $n = 7$	Typischer grauer Alters- star $n = 4$	Intumescente Katarakt $n = 5$	Mature Katarakt $n = 4$
GAPDH BE/g F	5290	5510 \pm 239	5040 \pm 320	4660 \pm 419	1340 \pm 289	1176 \pm 176
GAPDH BE/mg Prot.	25,5	26,5 \pm 1,59	21,8 \pm 2,0	20,9 \pm 4,4	10,6 \pm 1,44	16,8 \pm 3,74
LDH BE/g F	4810	3620 \pm 137	4990 \pm 361	4200 \pm 543	2200 \pm 509	1730 \pm 262
LDH BE/mg Prot.	23,2	17,06 \pm 0,87	21,3 \pm 2,01	19,0 \pm 2,75	17,6 \pm 2,93	24,4 \pm 5,22

nen. Auffällig ist die Senkung der LDH-Aktivität bei gleichbleibender GAPDH-Aktivität in der völlig klaren Rinde von Kernstaren, zumal in den meisten Geweben die LDH-Aktivitäten diejenigen von GAPDH übertreffen (DELBRÜCK; SCHMIDT, E., SCHMIDT, F. W.; REIM, SCHRAMM). Ein ähnliches Verhältnis findet sich nur in der Kalbsaorta (DELBRÜCK).

Diskussion

Als Bezugsgröße für die Enzymaktivität wurde sowohl das Frischgewicht der Linse als auch die Menge des extrahierbaren Proteins gewählt. Für Vergleiche mit anderen Geweben ist das Extraktprotein die geeignete Bezugsgröße (DELBRÜCK). Für den Vergleich der Enzymaktivitäten in verschiedenen Linsen ist aber das wasserlösliche Protein wegen der starken Schwankungen in den Katarakt-Linsen weniger geeignet. Als Bezugsgröße ist in diesem Fall das Frischgewicht vorzuziehen, zumal der Extrazellularraum der Augenlinse nur ca. 6% des Frischgewichtes ausmacht (TOFT, KINOSHITA) und Fehler durch Bezug auf extrazelluläre Substanzen (DELBRÜCK) daher gering sind. Lediglich bei intumescenden Linsen mit großer Wasseraufnahme besteht hier eine Täuschungsmöglichkeit.

Die Enzymaktivitäten für LDH liegen bei unseren Untersuchungen in klaren menschlichen Linsen höher als die von DARDENNE und DRECHSLER mitgeteilten Werte. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, daß die genannten Autoren ganze Linsen — also auch den weniger aktiven Kern — untersuchten. Beim Vergleich mit Tierlinsen ergaben sich die gleichen Werte, die WARTMANN und BECKER bei Kaninchen fanden, SALMONY gibt allerdings wesentlich niedrigere Werte für Kaninchenlinsen an. Auch in Meerschweinchenlinsen liegt nach HOCKWIN,

LICHT, NOLL die LDH-Aktivität deutlich unter unseren für menschliche Linsen gefundenen Werten. Die LDH-Aktivität von Rinderlinsen (DARDENNE, DRECHSLER) wird weit übertroffen, in klarer menschlicher Rinde konnte von uns etwa die 10fache Aktivität gemessen werden. Bei diesen Vergleichen muß aber berücksichtigt werden, daß die Enzymaktivitäten unter verschiedenen Versuchsbedingungen bestimmt wurden, was gerade bei der LDH zu erheblichen Aktivitätsunterschieden führen kann (BÜCHER, LUH, PETTE). Die GAPDH-Aktivität klarer Rinde liegt nur wenig unter der von Leber (SCHMIDT, E., SCHMIDT, F. W.), LDH zeigt etwa ein Drittel der für Leber angegebenen Aktivität (SCHMIDT, E., SCHMIDT, F. W.). Man kann demnach nicht von einer „Bradytrophie“ des Stoffwechsels der Linsenoberfläche (oberflächliche Rinde einschl. Epithel und Kapsel) sprechen.

In der Rinde von Kernstaren entspricht die GAPDH-Aktivität derjenigen klarer Linsen; die von uns gefundene sehr konstant niedrigere LDH-Aktivität, die vom Grad der Kerntrübung unabhängig war, wurde schon erwähnt. Eine Deutung dieses Befundes kann bisher nicht gegeben werden. Offenbar reichen die vorhandenen Enzymaktivitäten, wie der klinische Verlauf des Kernstars zeigt, zur Klarerhaltung der Rinde aus. Dagegen zeigt sich bei den Rindenstaren mit zunehmender Trübung ein Absinken der Enzymaktivitäten, bei maturen Katarakten betragen sie nur ein Viertel, bzw. ein Drittel der in klarer Rinde gemessenen Werte. Vergleicht man intumescende und mature Katarakte mit der klaren Rinde der Kernstare, so ergibt sich ein Verhältnis von etwa 1 : 4 für GAPDH, bzw. 1 : 2 für LDH. Diese Ergebnisse sind statistisch gesichert ($P < 0,05$). Allerdings kann bei intumescenden Katarakten wegen der Quellung der Bezug auf das Frischgewicht irreführen, der Vergleich der auf Protein bezogenen Werte zeigt aber ebenfalls deutlich niedrigere Enzymaktivitäten. Die Differenz ist für GAPDH statistisch gesichert ($P < 0,05$). Bei der Messung kann immer nur ein Mittelwert aus den Enzymaktivitäten in verschiedenen Zonen des Untersuchungsmaterials bestimmt werden. Wenn man annimmt, daß in den getrübbten Partien teilweise klarerer Linsen ähnliche Veränderungen auftreten wie in total getrübbter Rinde, so wird deutlich, daß in Linsen mit wenig getrübbter Substanz der Enzymaktivitätsverlust durch das Überwiegen klarer Rindenbezirke maskiert werden kann. Dies muß man für die Permeabilitätskatarakt annehmen, deren zunächst nur subkapsuläre schmale Schalenstrübung volumenmäßig nur einen sehr geringen Anteil der Rinde ausmacht. Auch für den typischen grauen Altersstar gelten ähnliche Überlegungen, wenn auch bei dieser in der Tiefe der Rinde beginnenden Starform schon früh ein größerer Anteil der Rinde getrübt ist als bei der Permeabilitätskatarakt. Die im Vergleich mit klarer Rinde nur minimal

niedrigeren GAPDH-Werte besagen also nicht, daß bei diesen Starformen die Enzymaktivität weitgehend erhalten ist. Es ist wahrscheinlicher, daß in bestimmten Rindenbezirken lokalisierte Störungen der Enzymaktivitäten bei der Permeabilitätskatarakt und dem typischen grauen Alterstar auftreten. Die Frage, ob die Abnahme der Enzymaktivität Ursache oder Folge der Linsentrübung ist, kann an Hand der vorliegenden Ergebnisse nicht entschieden werden. Sie soll in weiteren Experimenten noch eingehender untersucht werden.

Zusammenfassung

In der Rinde klarer und getrübler menschlicher Linsen wurde die Aktivität der Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase und der Lactatdehydrogenase im optischen Test bestimmt. Da die Enzymaktivitäten nur wenig unter den für die Leber angegebenen Werten liegen, kann der Linsenstoffwechsel nicht als „bradytroph“ bezeichnet werden. Mit zunehmender Rindentrübung war ein zunehmender Aktivitätsverlust der Enzyme zu beobachten, in maturen Katarakten konnte nur ein Viertel, bzw. ein Drittel der Enzymaktivität klarer Rinde gemessen werden. Die klare Rinde von Kernstaren zeigte im Vergleich mit völlig klaren Linsen lediglich eine geringe Abnahme der Aktivität der Lactatdehydrogenase.

Summary

The activity of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and of Lactate dehydrogenase (LDH) in the cortex of clear and opaque human lenses has been determined by means of the UV-method. The mean values of enzyme activities in the cortex of clear lenses amounted to 25,5 BE³/mg of soluble protein (5290 BE/g wet weight) for GAPDH and to 23,2 BE/mg of soluble protein (4810 BE/g wet weight) for LDH, which means that these values were not considerably lower than the values reported for the liver. With an increase in the opacity of the cortex an increasing loss of enzyme activity has been observed, in mature cataracts only a quarter or a third of the enzyme activity found in clear cortex could be measured. Nuclear cataracts showed in their clear cortex merely a slight decrease of the activity of LDH compared to completely clear lenses.

Herrn Dr. G. WALPURGER von der I. Med. Universitäts-Klinik Kiel danke ich für die Einführung in die Methodik und seine wertvollen Anregungen. Herrn Dr. PULSS vom Institut für Tierernährung der Universität Kiel möchte ich an dieser Stelle herzlich für die bereitwillige Erlaubnis zur Benutzung der Kühlzentrifuge danken.

³ 1 BE (25°C, 1 ml, 100 sec; $\Delta E_{266} = 0,100$) corresponds to 0,0182 μ mole of substrate converted in 1 min at 25°C.

Literatur

- BONAVOLANTA, C.: Sui rapporti fra composizione dell' umore acqueo e metabolismo del cristallino. Variazioni del contenuto in glucosio ed in acido lattico nell' umore acqueo dopo cataratta sperimentale da massaggio. *Ann. Ottal.* **76**, 247—265 (1950).
- BÜCHER, LUH u. PETTE: In: HOPPE-SEYLER/THIERFELDER, *Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch chemischen Analyse*, 10. Aufl. Bd. 6., Teil A. Springer: Berlin 1964.
- CONCILLIS, U. DE: L'ATP nella cataratta complicata ad uveite anafilattica sperimentale. *Arch. Ottal.* **62**, 83—87 (1958).
- DARDENNE, U., u. G. DRECHSLER: Die Aktivität der Milchsäuredehydrogenase in tierischen und menschlichen Augenlinsen. *Albrecht v. Graefes Arch. Ophthal.* **164**, 156—162 (1961).
- DELBEÜCK, A.: Untersuchungen über Enzyme des Energie-Stoffwechsels im Bindegewebe. *Klin. Wschr.* **40**, 13, 677—684 (1962).
- DESIGNES, P., BARON et DELANNY: Variations des ions sodium et potassium dans le cristallin normal et pathologique. *Arch. Ophtal. (Paris)*, N. S. **13**, 408 (1953).
- GREEN, U., and S. A. SOLOMON: Hexokinase of rabbit lenses. Effect of age of animal. *Arch. Ophthal.* **61**, 616—625 (1959).
- HARRIS, J. E., and L. GRUBER: The electrolyte and water balance of the lens. *Exp. Eye Res.* **1**, 372—384 (1962).
- J. D. HAUSCHILDT, and C. T. NORDQUIST: Lens metabolism as studied with the reversible cation shift. I. The role of glucose. *Amer. J. Ophthal.* **38**, 141—147 (1954).
- HEYNINGEN, R. v., and A. PIRIE: Hexokinase in x-ray cataract in rabbits. *Amer. J. Ophthal.* **43**, 893—898 (1957).
- HOCKWIN, O., W. LICHT u. E. NOLL: Veränderungen verschiedener Fermentaktivitäten in Linsen von Meerschweinchen mit zunehmendem Lebensalter. *Albrecht v. Graefes Arch. Ophthal.* **167**, 158—168 (1964).
- KERN, H. L., P. ROOSA, and MURRAY, S.: Evidence for active transport of alkali metal cations by calv. lens. *Exp. Eye Res.* **1**, 385—395 (1962).
- KINOSHITA, J. H., and L. MEROLA: The utilization of pyruvate and its conversion to glutamate in calv lens. *Exp. Eye Res.* **1**, 53—59 (1961).
- KINSEY, V. E., and D. V. N. REDDY: Studies on the crystalline lens. XI. The relative role of the epithelium and capsule in transport. *Invest. Ophthal.* **4**, 104—116 (1965).
- LERMAN, S.: The lens in human and experimental galactosemia N.Y.St. *J. Med.* **62**, 785—803 (1962).
- , and B. K. ISHIDA: Pathogenetic factors in experimental galactose cataract. III. *Arch. Ophthal.* **63**, 136—139 (1960).
- MARONE, G., e M. CITRONI: Indagini sulle intorbidamenti lenticolari da anossia. *Nota I. Riv. Med. aeronaut.* **13**, 655—672 (1951).
- NORDMANN, J., et L. DILLSCHNEIDER: Au sujet du métabolisme hydrocarboné du cristallin. *Bull. Soc. franc. Ophtal.* **64**, 122—127 (1951).
- , and P. MANDEL: Enzyme studies in radiation cataract. *Amer. J. Ophthal.* **40**, 871—876 (1955).
- —, and M. ARCHARD: Inhibition of sugar metabolism in the lens. *Brit. J. Ophthal.* **38**, 673—679 (1954).
- — et M. L. SCHMITT: La pathogénie de la cataracte alloxanique *Bull. Soc. franc. Ophtal.* **68**, 450—457 (1955).

- PAU, H., u. U. LEITHÄUSER: Die „Kationenpumpe“ in ihrer Bedeutung für die verschiedenen erworbenen Katarakte. *Albrecht v. Graefes Arch. Ophthal.* **166**, 440—450 (1964).
- PIRIE, A.: Biochemical changes in radiation cataract. *Trans. Ophthal. Soc. U. K.* **76**, 461—475 (1956).
- REIM, M., u. H. P. SCHRAMM: Beitrag zur biochemischen Wirkung des JUDR auf die Hornhaut. *Albrecht v. Graefes Arch. Ophthal.* **168**, 185—197 (1965).
- SALMONY, D.: Some biochemical changes in naphthalene cataract. *Brit. J. Ophthal.* **44**, 29—34 (1960).
- SCHMIDT, E., u. F. W. SCHMIDT: Enzym-Muster menschlicher Gewebe. *Klin. Wschr.* **38**, 957—962 (1960).
- TOFT, R. A., and J. KINOSHITA: The effect of calium on rat lens permeability. *Invest. Ophthal.* **4**, 122—128 (1965).
- WARTMANN, B., and B. BECKER: Enzymatic activities of the lens. A preliminary survey. *Amer. J. Ophthal. Ser. III*, **42**, 342—346 (1956).

Dr. D. FRIEDBURG
Universitäts-Augenklinik
23 Kiel