

## Die $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -aktivierte Transport-ATPase bei experimenteller Herzinsuffizienz durch Kobaltchlorid\*

H. DRANSFELD, J. LIPINSKI und E. BORSCH-GALETKE

Pharmakologisches Institut der Universität Düsseldorf

Eingegangen am 11. Februar 1971

### The $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -Activated Transport-ATPase in Experimental Cardiac Insufficiency Caused by Cobaltous Chloride

*Summary.* 1. Injections of cobaltous chloride (5 mg/rat) on ten consecutive days, producing heart insufficiency, increase the specific activity of the sodium-potassium-activated ATPase of the vesicle-fraction by about 100%.

2. After only one injection of 5 or 7.5 mg cobaltous chloride the activity of the  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase is not increased. The activity of the enzyme from kidneys is not increased before the fourth injection, whereas in the heart an increase is found after the second injection. Even after ten injections the increase of activity of the enzyme from heart muscle is more than that of the enzyme from kidneys.

3. In adrenalectomized as well as in metyrapone-pretreated rats cobaltous chloride increases the enzyme activity. Therefore this increase cannot be caused by a stimulation of the adrenal cortex. We propose that repeated administrations of cobaltous chloride cause a cardiac insufficiency combined with structural alterations of the membranes of the sarcoplasmatic reticulum which change the activity of membrane-bound enzymes.

*Key-Words:* Transport Adenosinetriphosphatase — Cobalt — Cardiac Insufficiency — Metyrapone — Adrenalectomy.

Ein gehäuftes Auftreten von Herzinsuffizienz mit einer Letalitätsrate von 40—50% wurde 1965/66 bei chronischen Trinkern gewisser Bierarten festgestellt (McDermott et al., 1966; Auger u. Chenard, 1967; Bonenfant et al., 1967; Herrell, 1967; J.A.M.A., 1967; Sargent u. Rose, 1967). Als Ursache konnte der Zusatz von Kobalt nachgewiesen werden, der von den Brauereien zur Verbesserung der Schaumqualität zugesetzt worden war (Morin u. Daniel, 1967). Im Tierexperiment konnte eine experimentelle Herzinsuffizienz durch Kobaltchloridinjektionen nachgewiesen werden (Kasperek et al., 1969; Knieriem u. Herbertz, 1969).

\* Die Ergebnisse wurden auf der 11. Frühjahrstagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft am 18. März 1970 in Mainz vorgetragen.

Nach Fleckenstein (1967, 1968) wird durch Kobalt eine als Utilisationsinsuffizienz bezeichnete Herzinsuffizienz hervorgerufen, die therapeutisch besonders gut durch Herzglykoside beeinflusst werden kann. Da die Herzglykoside einen hemmenden Einfluß auf die Transport-ATPase ausüben (Dransfeld et al., 1964; Glynn, 1964), haben wir untersucht, ob mit der Entwicklung einer Utilisationsinsuffizienz durch Kobaltchlorid eine Aktivitätsänderung der Transport-ATPase verbunden ist.

### Methoden

*1. Kobaltchloridbehandlung.* Entsprechend der von Knieriem u. Herberitz (1969) für eine experimentelle Herzinsuffizienz durch Kobaltchlorid angegebenen Methode erhielten 30 Ratten 10 Tage lang je 5 mg/die Kobaltchlorid i.p. Die Kobaltchloridinjektionen wurden in diesem und in den folgenden Versuchen nachmittags zwischen 15 und 16 Uhr durchgeführt mit Ausnahme der letzten Injektion, die 2 Std vor dem Töten der Tiere am Vormittag erfolgte. Eine andere Gruppe von 70 Ratten wurde zuerst in Äthernarkose nach der Methode von Bahnsen epinephrektomiert (Bomskov, 1937). Die Tiere erhielten Trockenfutter (Fa. Höveler), Leitungswasser und nach der Operation 0,1%ige NaCl-Lösung ad libitum. 45 Ratten erhielten am 11. und 12. Tag, 25 Ratten am 11., 12., 13. und 14. Tag nach der Epinephrektomie 5 mg/die Kobaltchlorid i.p. Die vollständige Entfernung der Nebennieren wurde bei der Entnahme der Organe kontrolliert. Eine dritte Gruppe von 25 Ratten erhielt 13 Tage lang jeden Nachmittag 20 mg/kg Metyrapon<sup>1</sup> i.p., vom 5. Tag an wurden zusätzlich 5 mg/die Kobaltchlorid i.p. gegeben. Eine einmalige Dosis von 7,5 mg Kobaltchlorid i.p. erhielten jeweils 9 Ratten 12 oder 6 Std und 10 Tiere 3 Std vor dem Töten.

*2. Enzympräparation.* Unmittelbar nach dem Töten und Entbluten der Ratten (250–350 g) wurden Herz, Nieren und Gehirn herauspräpariert und in eisgekühlte 0,25 M Saccharose gelegt. Die weitere Aufarbeitung wurde im Kühlraum bei 0–4° C durchgeführt.

Ähnlich wie in einer früheren Arbeit erfolgte die Enzympräparation unter Zusatz von Desoxycholat (DOC) zum Homogenisationsmedium (Dransfeld et al., 1966). Nach Entfernen von Binde- und Fettgewebe wurden die Organe gewogen, zerschnitten und im Ultraturax 20 sec mit dem 10fachen Volumen (pro Gramm Frischgewicht) einer Lösung homogenisiert, die 0,03 M Histidin-HCl (pH 6,8), 0,25 M Saccharose, 0,005 M EDTA und 0,1% DOC enthielt.

Aus dem so gewonnenen „Homogenat“ wurde die „Vesikelfraktion“ durch aufeinanderfolgende Zentrifugation der jeweiligen Überstände isoliert: 10 min bei 1600 g, 10 min bei 9200 g, 90 min bei 35000 g. Der letzte Niederschlag wurde mit 0,25 M Saccharoselösung (5 ml/g Feuchtgewebe) suspendiert. Die Membranfraktion des Herzmuskels wurde nach der früher angegebenen Methode präpariert (Dransfeld u. Greff, 1964). Die Bestimmung der ATPase-Aktivität wurde schon ausführlich beschrieben (Dransfeld et al., 1966).

### Ergebnisse

In der ersten Versuchsserie wurden Ratten 10 Tage lang mit 5 mg/die Kobaltchlorid i.p. behandelt und die Aktivität der Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>-aktivierten Transport-ATPase in verschiedenen Zellfraktionen des Herzmuskels

<sup>1</sup> Wir danken der Fa. CIBA für die Überlassung des Metopiron®.

Tabelle. Spezifische Aktivität der  $Mg^{++}$ - bzw.  $Na^+ + K^+$ -aktivierten ATPase aus Homogenat, Vesikel- und Membranfraktion des Herzmuskels der Ratte nach Behandlung mit Kobaltchlorid (10 Tage lang 5 mg  $CoCl_2$ /die)

		ATPase-Aktivität $\mu\text{Mol Pa/mg Eiweiß/Std}$		$Na^+ + K^+$ - ATPase in %
		$Mg^{++}$ -ATPase	$Na^+ + K^+$ - ATPase	
Homo- genat	Kontrolle	0,65 $\pm$ 0,13	0,25 $\pm$ 0,04	100
	Kobaltchlorid	0,27 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,06	116
Vesikel	Kontrolle	0,68 $\pm$ 0,04	0,58 $\pm$ 0,12	100
	Kobaltchlorid	0,72 $\pm$ 0,07	1,20 $\pm$ 0,1**	206
Membran	Kontrolle	1,62 $\pm$ 0,32	0,81 $\pm$ 0,18	100
	Kobaltchlorid	2,10 $\pm$ 0,45	1,37 $\pm$ 0,22*	169

Inkubationsmedium (Endkonzentrationen): 1.  $Mg^{++}$ -ATPase: 3 mM  $Mg^{++}$ , 3 mM ATP, 125 mM Tris-HCl (pH 7,4). 2.  $Na^+ + K^+$ -ATPase: Zusätzlich 10 mM  $K^+$  und 100 mM  $Na^+$ . Zur Vesikelfraktion wurden außerdem 5 mM  $NaN_3$  zugesetzt.

Mittelwerte und mittlere Fehler der Mittelwerte von mindestens acht Doppelbestimmungen. Signifikanz gegenüber Kontrollwert:

\*  $p < 0,01$ .

\*\*  $p < 0,001$ , Pa = anorganisches Phosphat.

untersucht. Die  $Na^+ + K^+$ -ATPase-Aktivität der Vesikelfraktion ist nach der Behandlung mit Kobaltchlorid auf etwa das Doppelte des Kontrollwertes angestiegen (Tabelle). Um mehr als 50% steigt auch die  $Na^+ + K^+$ -ATPase-Aktivität der Membranfraktion infolge der Kobaltchloridbehandlung an. Im Gegensatz hierzu ist der geringere Anstieg der  $Mg^{++}$ -ATPase-Aktivität in der Vesikel- und Membranfraktion nicht signifikant. Der Befund, daß im Homogenat keine sichere Steigerung der  $Na^+ + K^+$ -ATPase-Aktivität gefunden wurde, könnte durch die stärkere Verunreinigung dieser Enzymsuspension verursacht sein.

Den Erfolg der Reinigung der Enzymsuspension zeigt die schon bei den Kontrollen um 100% gesteigerte spezifische Aktivität (d. h. Aktivität bezogen auf Milligramm Eiweiß) der  $Na^+ + K^+$ -ATPase der Vesikelfraktion gegenüber dem Homogenat, aus dem die Vesikelfraktion isoliert wurde. Die spezifische Aktivität der ATPasen aus der Membranfraktion ist sogar auf das Dreifache angestiegen. Die Präparation wurde nach einer für die Membranisolierung aus Muskelgewebe besonders geeigneten Methode durchgeführt.

Da die Vesikelfraktion die stärkste Steigerung ihrer ATPase-Aktivität durch die Kobaltchloridbehandlung zeigte, wurden für die weiteren Untersuchungen nur die Vesikel-ATPase des Herzmuskels und die mit gleicher Methode gewonnenen Fraktionen aus Niere und Hirn verwendet.

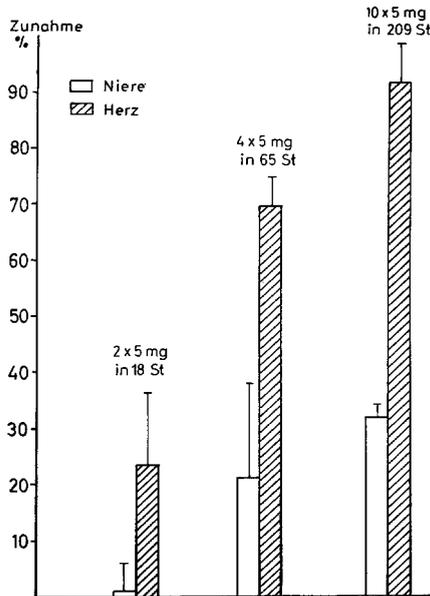


Abb.1. Prozentuale Steigerung der  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase-Aktivität der Vesikelfraktion aus Herz und der nach der gleichen Methode gewonnenen Fraktion aus Nieren nach Behandlung von Ratten mit Kobaltchlorid in angegebener Dosierung und Dauer. Bestimmung der Enzymaktivität wie in der Tabelle. Weiße Säulen: Nieren, schraffierte Säulen: Herz, Mittelwerte und mittlere Fehler der Mittelwerte von mindestens acht Doppelansätzen

#### *Einfluß von Behandlungsdauer und Kobaltmenge auf die Steigerung der $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase-Aktivität*

Der Einfluß der Behandlungsdauer auf die Steigerung der Transport-ATPase-Aktivität ist in der Abb.1 dargestellt. Neben der  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase der Vesikelfraktion aus Herzmuskel wurde auch das nach gleicher Methode präparierte Enzym aus Nieren untersucht. Die Kobaltchloridbehandlung hat auf die Nieren-ATPase eine geringere Wirkung als auf die Herzmuskel-ATPase. Die Aktivität der  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase aus Nieren ist nach 209 Std langer (10maliger) und nach 65stündiger (4maliger) Behandlung mit Kobaltchlorid erhöht, die  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase aus Herzmuskel ist auch schon nach 18stündiger (2maliger) Behandlung um etwa 25% angestiegen. Bei einmaliger Behandlung konnte nach 3, 6 und 12 Std keine Steigerung der ATPase-Aktivität gefunden werden, auch nicht durch eine Erhöhung der Dosis auf 7,5 mg.

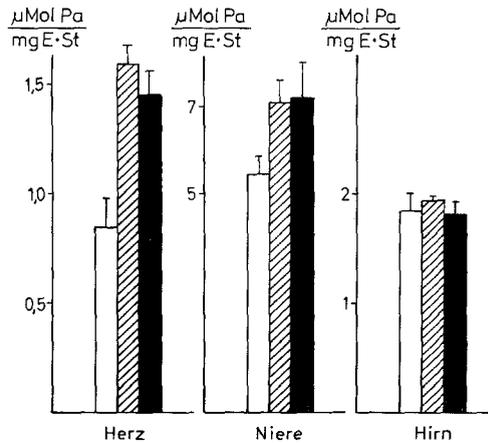


Abb. 2.  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -aktivierte ATPase nach Vorbehandlung der Ratten mit Kobaltchlorid bzw. Kobaltchlorid + Metyrapon. Enzymansätze wie in der Tabelle. Weiße Säulen: Kontrolltiere, schraffierte Säulen: 9 Tage lang mit je 5 mg Kobaltchlorid i.p. behandelt, schwarze Säulen: 13 Tage lang 20 mg/kg Metyrapon i.p. und vom 5.—13. Tag 5 mg  $\text{CoCl}_2$  i.p. Mittelwerte und mittlere Fehler der Mittelwerte von mindestens sechs Doppelansätzen

#### *Die Kobaltwirkung bei gleichzeitiger Behandlung mit Metyrapon*

Da die spezifische Aktivität der  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase bei epinephrektomierten Tieren vermindert ist (Chignell u. Titus, 1966), sollte durch die folgenden Versuche geklärt werden, ob die aktivierende Wirkung des Kobaltchlorids durch Metyrapon-Behandlung oder Epinephrektomie aufgehoben wird. Die Abb. 2 zeigt, daß die spezifische Aktivität der  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase aus Herzmuskel und Niere nach 9 tägiger Behandlung mit Kobaltchlorid erhöht ist. Diese Steigerung wird durch eine Behandlung mit Metyrapon nicht verhindert. Die Aktivität der  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase aus Hirngewebe wird durch die Behandlung mit Kobalt nicht gesteigert, und auch die kombinierte Verabreichung von Kobalt und Metyrapon hat keine Wirkung.

#### *Einfluß der Epinephrektomie auf die Kobaltwirkung*

In weiteren Versuchen wurde die Kobaltwirkung auf die  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase epinephrektomierter Ratten untersucht. Dabei zeigte es sich, daß nach Epinephrektomie die Toxizität des Kobaltchlorids stark gesteigert ist. Schon nach 4 tägiger Behandlung mit 5 mg Kobaltchlorid/die starben 48 von 70 Tieren. In dieser Versuchsreihe wurde deshalb die Behandlung mit Kobaltchlorid nur 2 bzw. 4 Tage lang durchgeführt. Nach 4 tägiger Behandlung mit Kobaltchlorid war die Aktivität der  $\text{Na}^+$

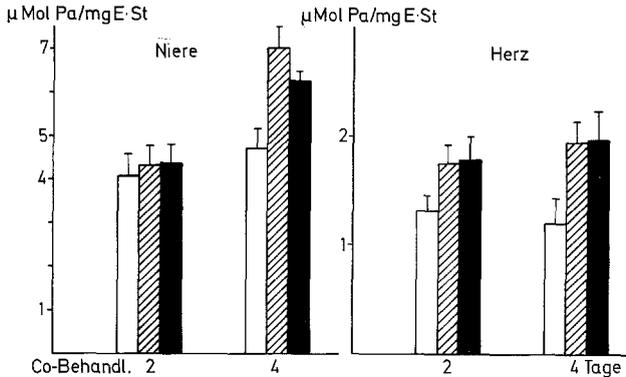


Abb. 3. Einfluß der Epinephrektomie auf die spezifische Aktivität der  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -aktivierten ATPase der Vesikelfraktion des Herzens und der mit gleicher Methode gewonnenen Fraktion aus Nieren von Ratten. Enzymsätze wie in der Tabelle. Weiße Säulen: Kontrolltiere, schraffierte Säulen:  $\text{CoCl}_2$  2 bzw. 4 Tage lang je 5 mg/die, schwarze Säulen: 10 Tage nach Epinephrektomie 2 bzw. 4 Tage lang je 5 mg/die  $\text{CoCl}_2$ . Mittelwerte und mittlere Fehler der Mittelwerte von mindestens sieben Doppelansätzen

+  $\text{K}^+$ -ATPase aus Herzmuskel und Nieren bei den epinephrektomierten Tieren ungefähr ebenso stark angestiegen wie bei den nicht epinephrektomierten Tieren. Nach 2-tägiger Behandlung mit Kobaltchlorid zeigten nur die  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPasen aus Herzen, nicht aber die aus Nieren epinephrektomierter Tiere einen Anstieg gegenüber den Kontrollen (Abb. 3).

### Diskussion

Durch unsere Untersuchungen wird eine Steigerung der spezifischen Aktivität der  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -aktivierten ATPase aus Herz und Nieren von Ratten nach mehrmaliger Behandlung mit Kobaltchlorid i.p. (5 mg/die) nachgewiesen. Mehrere Autoren fanden bei epinephrektomierten Tieren eine Abnahme der spezifischen Aktivität der  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -aktivierten ATPase aus Nieren, die durch Behandlung der epinephrektomierten Tiere mit Nebennierenrindenhormonen restituiert werden konnte (Chignell et al., 1965; Chignell u. Titus, 1966; Joergensen, 1968). Nach diesen Befunden wäre es denkbar, daß die Kobaltwirkung nicht direkt, sondern über eine Stimulierung der Nebennierenrinde abläuft.

In unseren Untersuchungen an epinephrektomierten und Metyrapon-behandelten Tieren blieb jedoch die aktivierende Wirkung des Kobaltchlorids auf die ATPase erhalten. Demnach kommt die Kobaltwirkung nicht über eine erhöhte Ausschüttung von Nebennierenrindenhormonen

zustande, und die erhöhte Enzymaktivität kann nicht als eine durch Corticosteroide stimulierte Enzyminduktion interpretiert werden. Gegen eine Enzyminduktion spricht auch der langsame Anstieg der Aktivität nach Behandlung mit Kobaltchlorid, da im allgemeinen bei einer Enzyminduktion durch Hormone schon kurz nach Induktionsbeginn die Enzymaktivität erhöht ist und nach etwa 3—9 Std ein Maximum erreicht (Dixon u. Webb, 1966).

Manitius et al. (1968) wiesen nach 4—5 tägiger Behandlung von Ratten mit Glucocorticoiden eine Erhöhung der  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -aktivierten-ATPase-Aktivität im Homogenat aus Nieren nach. Da sich in der Fraktion der Plasmamembranen keine Aktivitätssteigerung fand, nehmen die Autoren an, daß eine Vermehrung der Plasmamembranen pro Zelle stattfindet, wobei die Enzymaktivität pro Einheit der Plasmamembranen unverändert bleibt. Nach Behandlung mit Kobaltchlorid fanden wir eine erhöhte  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase-Aktivität in der Vesikelfraktion, jedoch nicht im Homogenat.

Für unsere Ergebnisse trifft die oben angeführte Erklärung also nicht zu. Die durch die Kobaltwirkung erhöhte Aktivität der  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase aus Herzmuskel war erst bei zunehmender Fraktionierung der Zellbestandteile nachzuweisen. Es muß sich also um eine echte Steigerung der spezifischen Aktivität handeln. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen beobachteten Knieriem u. Herbertz (1969) nach mehrmaliger Injektion von Kobaltchlorid bei Ratten Zeichen einer experimentellen Herzinsuffizienz: ausgeprägte Schwellungen der Mitochondrien, Dilatationen des sarkoplasmatischen Reticulum (Vesikel-Fraktion), des tubulären Systems und weitere Veränderungen.

Aufgrund dieser Befunde nehmen wir an, daß wiederholte Gaben von Kobaltchlorid durch Veränderungen des sarkoplasmatischen Reticulum eine Steigerung der Aktivität von membrangebundenen Enzymen bewirkt. Diese Befunde würden in Übereinstimmung stehen mit der Ansicht, daß die  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase der primäre Angriffspunkt für die therapeutische Wirkung der Herzglykoside ist. Da diese Pharmaka die Aktivität der  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase hemmen, dürfte auch die durch die Kobaltchloridbehandlung gesteigerte ATPase-Aktivität durch Herzglykoside vermindert werden.

### Literatur

- Auger, C., Chenard, J.: Quebec beer-drinkers' cardiomyopathy: Ultrastructural changes in one case. *Canad. med. Ass. J.* **97**, 916—921 (1967).
- Bomskov, Ch.: *Methodik der Hormonforschung*, S. 480. Leipzig: G. Thieme 1937.
- Bonenfant, J. L., Miller, G., Roy, P. E.: Quebec beer-drinkers' cardiomyopathy: Pathological studies. *Canad. med. Ass. J.* **97**, 910—915 (1967).

- Chignell, C. F., Roddy, P. M., Titus, E. O.: Effect of adrenal steroids on a  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$  dependent adenosinetriphosphatase. *Life Sci.* **4**, 559—566 (1965).
- Titus, E. O.: Effect of adrenal steroids on a  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -requiring adenosinetriphosphatase from rat kidney. *J. biol. Chem.* **241**, 5083—5089 (1966).
- Dixon, M., Webb, E. C.: *Enzymes*, pp. 498—510. London: Longmans, Green and Co. Ltd. 1966.
- Dransfeld, H., Greeff, K.: Der Einfluß des Prednison- und Prednisolonbisguanylhydrazons auf die  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -stimulierte Membran-ATPase des Meerschweinchenherzens. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak.* **249**, 425—431 (1964).
- — Berger, H., Cautius, V.: Die verschiedene Empfindlichkeit der  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -aktivierten ATPase des Herz- und Skelettmuskels gegen *k*-Strophanthin. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.* **254**, 225—234 (1964).
- — Meng, K., Schwarzmann, D.: Zum Wirkungsmechanismus der neuen herz wirksamen Sterinderivate Prednison- und Prednisolonbisguanylhydrazon. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak.* **247**, 341 (1964).
- Fleckenstein, A.: Stoffwechselprobleme bei der Myokardinsuffizienz. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **51**, 15—29 (1967).
- Experimentelle Pathologie der akuten und chronischen Herzinsuffizienz. *Verh. Dtsch. Ges. Kreisl.-Forsch.* **34**, 15—31 (1968).
- Döring, J., Kammermeier, H.: Myokardstoffwechsel und Insuffizienz. *Ärztl. Forsch.* **21**, 1—14 (1967).
- Glynn, I. M.: The action of cardiac glycosides on ion movements. *Pharmacol. Rev.* **16**, 381—407 (1964).
- Herrell, W. E.: Beer au cobalt and cardiohepatic failure. *Clin. Med.* **74**, 15—16 (1967).
- J.A.M.A.: Quebec beer-drinkers' cardiomyopathy. *J. Amer. med. Ass.* **202**, 1145 (1967).
- Joergensen, P. L.: Regulation of the  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -activated ATP hydrolizing enzyme system in rat kidney. 1. The effect of adrenalectomy and the supply of sodium on the enzyme system. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **151**, 212—224 (1968).
- Kasperek, K., Siller, V., Knieriem, H. J.: Neutronen-aktivierungsanalytische Bestimmung von Kobalt und Calcium bei der experimentellen Herzinsuffizienz durch Kobaltchlorid. *Z. ges. exp. Med.* **150**, 316—324 (1969).
- Knieriem, H. J., Herbertz, G.: Elektronenmikroskopische Befunde sowie photometrische und aktivierungsanalytische Ergebnisse bei experimenteller Herzinsuffizienz durch Kobaltchlorid. *Virchows Arch., Abt. B Zellpath.* **2**, 32—46 (1969).
- Manitius, A., Bensch, K., Epstein, F. H.:  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -activated ATPase in kidney cell membranes of normal and Methylprednisolone-treated rats. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **150**, 563—571 (1968).
- McDermott, P. H., Delaney, R. L., Egan, J. B., Sullivan, I. F.: Myocardosis and cardiac failure in men. *J. Amer. med. Ass.* **198**, 253 (1966).
- Morin, G., Daniel, P.: Quebec beer-drinkers' cardiomyopathy: Etiological Considerations. *Canad. med. Ass. J.* **97**, 926—928 (1967).
- Sargent, A. U., Rose, B.: Quebec beer-drinkers' cardiomyopathy: Immunochemical studies. *Canad. med. Ass. J.* **97**, 922—923 (1967).

H. Dransfeld  
 J. Lipinski  
 E. Borsch-Galetke  
 Pharmakologisches Institut  
 der Universität  
 BRD-4000 Düsseldorf, Moorenstr. 5  
 Deutschland