

DER EINFLUSS VON BARBITURATEN AUF DIE ENTGIFTUNGSGESCHWINDIGKEIT DES ÄTHANOLS*

H.-D. FISCHER

Pharmakologisches Institut der Medizinischen Akademie "Carl Gustav Carus", Dresden

(Received 20 October 1961; accepted 6 November 1961)

Abstract—5 days' after treatment with hexobarbital, ethyl alcohol was eliminated at an increased rate in rabbits and mice. The effect quickly disappeared on stopping the treatment. It was possible to exclude habituation phenomena, i.e. a substratum induced adaptation mechanism, experimentally for a short test period.

The mean liver weight, but not its protein, is raised by hexobarbital treatment, yet the total ADH is the same as before, because liver enzyme concentration decreases at the same time. The same applies to catalase activity. The total diphosphopyridine nucleotide content is unchanged, but the DPN: DPNH ratio is distinctly increased. There is a positive correlation between speed of elimination and DPN: DPNH ratio.

The possible mode of action by which hexobarbital increases alcohol elimination is discussed.

DIE Applikation einer subnarkotischen Barbituratmenge beeinflusst die Abbaugeschwindigkeit gleichzeitig aufgenommenen Äthanols nicht.¹ Hingegen schien ein Befund Whittlesleys² darauf hinzudeuten, dass wiederholte Gaben kleiner Barbituratdosen die Alkoholentgiftung zu steigern vermögen. Wir untersuchten deshalb zunächst den Einfluss einer mehrtägigen Behandlung mit Hexobarbital oder Phenobarbital auf den Verlauf des Alkoholblutspiegels nach intravenöser Injektion von Äthylalkohol bei Kaninchen und beobachteten hierbei eine deutliche Steigerung der Alkoholeliminationsgeschwindigkeit.³

Übereinstimmende Ergebnisse lieferten unsere nachfolgenden Versuche an Mäusen,⁴ während eine Beschleunigung der Alkoholentgiftung bei zwei Hunden nicht erzielt werden konnte.⁵ Gewöhnungserscheinungen im Sinne eines substratinduzierten Adaptationsmechanismus liegen in unseren Versuchen nicht vor,³ so dass die Umsatzsteigerung andere Ursachen haben muss.

Unsere Versuchsanordnung basierte auf der Hypothese, dass es sich bei der Umsatzerhöhung für Alkohol nach Barbituratgaben nicht um den gleichen, noch ungeklärten,⁶ recht unspezifischen Effekt handelt, wie ihn dieselben Substanzen an oxydierenden Mikrosomenenzymen der Leber⁴ hervorrufen.⁸⁻¹⁰ Vielmehr richteten wir unser Augenmerk auf die für den Alkoholabbau spezifische ADH, deren Coenzym Diphosphopyridinnucleotid und bestimmten darüber hinaus die Katalaseaktivität, um auch deren eventuellen Anteil an der Oxydation des Äthylalkohols in der Leber¹ unter Kontrolle zu haben.

* Teilergebnisse wurden auf dem V. Internationalen Kongress für Biochemie vom 10. bis 16.8.61 in Moskau vorgetragen.

METHODEN

Als Tiermaterial dienten männliche Kaninchen. Bei den Tieren der Hexobarbitalgruppe wurde zunächst die normale Entgiftungsgeschwindigkeit festgestellt. Anschliessend erhielten die Kaninchen 5 Tage lang täglich 50 mg/kg Hexobarbital i.m. Am 6. Tage, 16 Stunden nach der letzten Barbituratinjektion, zu einem Zeitpunkt, in dem in früheren Versuchen³ eine Erhöhung der Eliminationsgeschwindigkeit mit Sicherheit festgestellt werden konnte, wurden die Tiere getötet und die Leberwerte bestimmt. Hierzu wurde die Leber *in toto* entnommen und vor den notwendigen Wägungen mit Filterpapier trocken getupft. Bei den nicht mit Hexobarbital behandelten Tieren der Kontrollgruppe erfolgte die Bestimmung mindestens 20 Stunden nach einem Alkoholeliminationsversuch. Zu diesem Zeitpunkt dürfte eine durch die vorangegangene Alkoholyxidation eingetretene Verschiebung der Pyridinnucleotidgehalte der Leber¹¹⁻¹³ mit Sicherheit wieder normalisiert sein.

Diphosphopyridinnucleotidgehalt

DPN und DPNH wurden nach der Methode von Spirtes und Eichel¹⁴ bestimmt.

Alkoholdehydrogenase

Die Messung der ADH wurde nach Homogenisieren von etwa 1 g Leber bei 0° C in 0,01 M Phosphatpuffer von pH 7,5 und anschliessendem halbstündigen Zentrifugieren (0° C, 21 000 × g) mit 0,1 ml des Überstandes/Küvette in Anlehnung an die Methode von Theorell und Bonnicksen¹⁵ durchgeführt. Die nicht zu vernachlässigende alkoholunabhängige initiale DPN-Reduktion des Überstandes wurde korrigiert.¹¹

Katalaseaktivität

In einem Teil des für die ADH-Bestimmung verwendeten Überstandes wurde nach Euler und Josephson¹⁶ die Katalaseaktivität gemessen. Die Reaktionszeiten verkürzten wir auf 30, 60 und 90 sec.¹⁷

Alkoholbestimmung

Die Alkoholanalyse erfolgte mit der von Bücher und Redetzki¹⁸ beschriebenen und von uns geringfügig modifizierten enzymatischen Methode.

Alkoholentgiftungsgeschwindigkeit

Die Entgiftungsgeschwindigkeit (V_e) des Äthanols in mg/kg/hr wurde aus dem linearen Abfall des Blutalkoholspiegels nach i.v. Injektion von 33 % igem (v/v) Alkohol in Dosen von 1 g/kg Körpergewicht berechnet.³

Eiweissgehalt

Die Berechnung des Eiweissgehaltes erfolgte in der üblichen Weise nach Bestimmung des Stickstoffs mit der Kjeldahl-Methode.

ERGEBNISSE

Lebergewicht und Eiweissgehalt der Frischleber

Das durchschnittliche Tiergewicht differiert zwischen den beiden gebildeten Gruppen nur geringfügig und wird von der Behandlung mit Alkohol und Barbituraten nicht beeinflusst. Wir bezogen das Lebergewicht auf das Gewicht der Tiere (reduziertes

Lebergewicht), um jeden Unterschied zu eliminieren. Das reduzierte Lebergewicht scheint nach der Barbituratbehandlung erhöht zu sein. Das Ergebnis lässt sich jedoch infolge der grossen Streuung statistisch nicht sichern. Gleichzeitig bleibt der Eiweissgehalt der Frischleber konstant (Tabelle 1).

TABELLE 1. WIRKUNG EINER MEHRTÄGIGEN HEXOBARBITALBEHANDLUNG AUF EIWEISSGEHALT UND GEWICHT VON KANINCHENLEBER

	Anzahl der Tiere	Körpergewicht (kg)	Lebergewicht red. auf Körpergewicht (g/kg)	Eiweissgehalt (Frischleber) (%)
Kontrollgruppe (Variationsbreite)	8	3,6 (3,2 – 4,2)	20,5 (17,1 – 26,1)	20,6 (16,1 – 24,0)
Hexobarbitalgruppe (Variationsbreite)	8	3,8 (3,3 – 4,3)	25,9 (22,7 – 34,5)	20,4 (15,3 – 22,9)
Irrtumswahrscheinlichkeit P	—	—	~ 10 %	—

Enzymgehalte

Die Konzentration der ADH im frischen Lebergewebe ist nach der 5-tägigen Barbituratbehandlung vermindert. Allerdings ist die Abnahme nicht statistisch sicher. Da jedoch gleichzeitig das Lebergewicht steigt, bleibt die gesamte auf das Körpergewicht reduzierte ADH-Menge etwa konstant (Tabelle 2).

TABELLE 2. GEHALT UND MENGE DER LEBER-ADH VON KANINCHEN IN ABHÄNGIGKEIT EINER MEHRTÄGIGEN HEXOBARBITALBEHANDLUNG

	Anzahl der Tiere	ADH-Gehalt der Frischleber (mg/g)	ADH-Menge reduz. auf Körpergewicht (mg/kg)
Kontrollgruppe (Variationsbreite)	8	1,82 (1,40 – 2,27)	37,26 (32,19 – 41,79)
Hexobarbitalgruppe (Variationsbreite)	8	1,53 (1,05 – 2,03)	39,58 (32,50 – 44,71)
Irrtumswahrscheinlichkeit P	—	< 10 %	—

Das von der ADH über Konzentration und Menge Gesagte gilt sinngemäss auch für die Katalaseaktivität.

Coenzymgehalt

Die Veränderungen im Diphosphopyridinnucleotidgehalt nach 5-maliger Barbituratinjektion sind wesentlich grösser und statistisch hochsignifikant. Es ist ein deutlicher Abfall des Gehalts an DPNH zu erkennen, während im DPN-Gehalt keine merkliche Änderung eintritt. Infolgedessen ist auch der Gesamtgehalt an Diphosphopyridinnucleotid, bezogen auf die Frischlebereinwaage, vermindert. Bei Berücksichtigung des erhöhten Lebergewichts ist jedoch die auf das Körpergewicht reduzierte Gesamtmenge an DPN auf Kosten des DPNH erhöht. Eine Änderung im Gesamtbestand an Diphosphopyridinnucleotid lässt sich dann ebenso wenig wie im Enzymgehalt sichern.

Als entscheidende Folge sehen wir einen statistisch hochsignifikanten Anstieg des Verhältnisses DPN : DPNH von 1,77 in der Kontrollgruppe auf 2,35 in der Hexobarbitalgruppe (Tabelle 3).

TABELLE 3. RED./OX.-ZUSTAND DES DIPHOSPHOPYRIDINNUCLEOTIDSYSTEMS DER KANINCHENLEBER UNTER DEM EINFLUSS EINER MEHRTÄGIGEN HEXOBARBITALBEHANDLUNG

Anzahl der Tiere	DPN-Gehalt der Frischleber ($\mu\text{g/g}$)	DPNH-Gehalt der Frischleber ($\mu\text{g/g}$)	Verhältnis DPN : DPNH	DPN-Menge		DPNH-Menge		DPN-Menge	
				reduz. auf Körpergewicht (mg/kg)	reduz. auf Körpergewicht (mg/kg)	reduz. auf Körpergewicht (mg/kg)	reduz. auf Körpergewicht (mg/kg)	reduz. auf Körpergewicht (mg/kg)	reduz. auf Körpergewicht (mg/kg)
8	463 (411 — 532)	269 (240 — 299)	1,77 (1,58 — 1,97)	9,40 (8,04 — 11,72)	5,50 (4,26 — 6,34)	14,90 (12,33 — 18,06)			
7	441 (401 — 531)	189 (170 — 225)	2,35 (1,95 — 2,86)	11,42 (9,78 — 13,22)	4,90 (4,42 — 5,94)	16,32 (14,20 — 17,84)			
—	—	< 0,1 %	< 0,1 %	< 5 %	~ 10 %	—			

Kontrollgruppe
(Variationsbreite)

Hexobarbitalgruppe
(Variationsbreite)

Irrtumswahrscheinlichkeit P

Alkoholentgiftungsgeschwindigkeit

Die beiden Gruppen unterscheiden sich in ihrem ursprünglichen normalen Entgiftungsvermögen nicht. Innerhalb jeder Gruppe besteht eine positive Korrelation zwischen V_e und DPN : DPNH-Quotient. Beim Test der Korrelationskoeffizienten r ist die Irrtumswahrscheinlichkeit P kleiner als 0,1 %. Im Vergleich zu der bei den Tieren der zweiten Gruppe vor der Barbituratbehandlung bestimmten V_e von 165 mg/kg/hr ist das nach der Behandlung festgestellte Verhältnis DPN : DPNH derart verschoben (siehe auch Tabelle 3), dass demselben eigentlich eine höhere V_e nämlich 215 mg/kg/hr entspricht (Abb. 1).

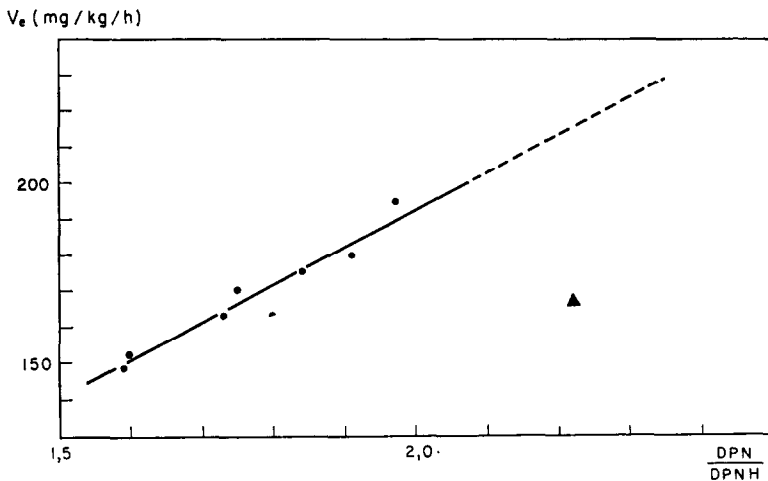


ABB. 1. Abhängigkeit der normalen Alkoholentgiftungsgeschwindigkeit vom Verhältnis DPN:DPNH bei Kanichen.

▲ bedeutet einen entsprechenden Mittelwert— V_e über DPN:DPNH—der mit Hexobarbital behandelten Tiere. V_e wurde vor und DPN:DPNH nach der Behandlung bestimmt. Der Quotient ist durch die Behandlung derart verschoben, dass ihm nunmehr eine um etwa 30 Prozent höhere V_e entspricht als die Tiere normalerweise aufwiesen.

DISKUSSION

Für die Stimulation mikrosomaler Oxydasen mit gemischter Funktion wurde verschiedentlich eine erhöhte Lebereiweissynthese verantwortlich gemacht,¹⁹ die bei Barbituratbehandlung auftritt.^{20, 21} Die experimentellen Befunde scheinen diese Ansicht teilweise gut zu stützen. Die Gewichtszunahme der Leber nach Barbiturateinwirkung wird von einigen Autoren auch einer diffusen Leberverfettung zugeschrieben.²² In unseren Versuchen konnten wir keine Änderung des Eiweissgehaltes der Frischleber unter der Hexobarbitalbehandlung beobachten, wie es bei einer Verfettung wohl zu erwarten gewesen wäre. Es scheint sich vielmehr um ein normales Wachstum zu handeln, das allerdings die ADH nicht mit einbezieht. Die Menge dieses Enzyms bleibt unter den beschriebenen Versuchsbedingungen für die Tiere annähernd konstant. Die Gesamtaktivität der Katalase verändert sich gleichfalls nicht.

Eine Vermehrung der für den Alkoholabbau verantwortlichen Fermente als entscheidende Folge der Barbituratbehandlung und wesentlicher Grund für die Umsatzsteigerung konnten wir also an Hand dieser Versuchsergebnisse ausschliessen.

Unter der Einwirkung von Hexobarbital tritt dagegen eine Verschiebung des Red/Ox-Zustandes im DPN/DPNH-System ein. Während der Gesamtbestand gleich bleibt, verschiebt sich das Verhältnis DPN : DPNH zugunsten der oxydierten Form. Die DPN- und DPNH-Konzentration im Sinne des thermodynamischen Aktivitätsbegriffs bezogen auf den Lösungsraum einzelner Kompartimente, z.B. den für den Alkoholabbau verantwortlichen²³ C-Raum,²⁴ lassen sich z.Z. noch nicht direkt ermitteln und sind nur indirekt über den Quotienten Pyruvat/Lactat zugänglich.²⁴⁻²⁶ Allerdings erscheint der Wert des Gehaltsquotienten DPN : DPNH, wie wir ihn bestimmten, in vieler Hinsicht verantwortlich für das Ausmass des Alkoholentgiftungsvermögens. Dies wird deutlich beim Betrachten der Verhältnisse nach längerem Fasten¹¹ und spielt vielleicht auch bei seiner Beeinflussung durch Tolbutamid¹² eine Rolle. Da die beiden Versuchsgruppen sich in ihrer ursprünglichen Alkoholentgiftungsgeschwindigkeit nicht unterscheiden, sollte also auch die in unseren Versuchen beobachtete Erhöhung des Quotienten verantwortlich gemacht werden können für die durch die Hexobarbitalbehandlung verursachte Umsatzsteigerung. Allein wir können nicht aus dem blossen Anstieg des Quotienten bereits auf die Höhe der hieraus resultierenden Beschleunigung der Alkoholelimination schliessen. Hierzu setzt uns erst die Beobachtung in die Lage, dass sowohl in der Kontroll- wie in der Barbituratgruppe eine feste positive Korrelation zwischen DPN : DPNH-Verhältnis und V_e besteht. Der Quotient wird durch die Barbituratbehandlung derart verändert, dass er einer rund 30 % höheren V_e entspricht, als sie bei diesen Tieren vor den Hexobarbitalinjektionen ermittelt wurde. Der mit Hilfe dieser Verschiebung erklärbare Eliminationsgewinn entspricht damit tatsächlich in guter Näherung dem in unseren vorangegangenen Versuchen ermittelten Anstieg der Entgiftungsgeschwindigkeit.³

Die Möglichkeit einer Beschleunigung der Alkoholentgiftungsgeschwindigkeit durch Veränderung des Quotienten DPN : DPNH ist verständlich, da der geschwindigkeitsbestimmende Schritt beim Abbau des Äthanol unter normalen Stoffwechselbedingungen die Dissoziation des bei der Alkoholoxydation gebildeten ADH--DPNH-Komplexes ist,¹⁵ und der Quotient durch Verminderung des DPNH-Gehaltes, wie in unserem Falle, erhöht wird. Der entgegengesetzte Effekt tritt beim Fasten auf.¹¹ Hier scheint der DPNH-Gehalt erhöht zu sein, was eine Verlangsamung des Alkoholabbaus nach sich zieht. Die Änderung des Quotienten allein auf Grund eines erhöhten oder nicht allzusehr erniedrigten DPN-Gehaltes sollte entsprechend der Annahme, dass der Zerfall des ADH-DPNH-Komplexes die Gesamtgeschwindigkeit begrenzt, keinen Einfluss auf die Alkoholentgiftungsgeschwindigkeit ausüben. Versuche mit Nikotinsäureamid an Mäusen²⁷ und Kaninchen,⁵ bei denen durch eine Erhöhung des DPN-Spiegels der DPN : DPNH-Quotient stark ansteigt, scheinen diese Auffassung zu bestätigen.

Die Einwirkung der Barbiturate auf das DPN/DPNH-System kann wahrscheinlich auf zwei Wegen erfolgen. Erstens wird Hexobarbital eine Funktionsänderung in den Mikrosomen der Leber hervorrufen, wo sein Abbau mit der Oxydation des Cyclohexenylrings beginnt.²⁸ Diese Substratoxydation ist obligatorisch gekoppelt mit der Dehydrierung von TPNH, wodurch eine Verarmung an Wasserstoff eintritt, die über verschiedene Fermentsysteme,^{29, 30} aus dem DPNH-Reservoir ausgeglichen werden könnte. Dieser Mechanismus spielt aber sicherlich keine grosse Rolle, da einmal die verabreichten Hexobarbitaldosen zu gering erscheinen und zum anderen das TPN überwiegend in der reduzierten Form als Donator für reduktive Synthesen vorliegt,

während beim DPN, vor allem in bezug auf dessen Konzentration, gerade das Gegenteil der Fall ist.²⁴ Die zweite Möglichkeit der Einflussnahme des Hexobarbitals, die unseres Erachtens im vorliegenden Falle tatsächlich zur Wirkung kommt, ist die Hemmung der oxydativen Phosphorylierung, wie sie für Oxybarbiturate beschrieben wurde.³¹ Da die oxydative Phosphorylierung für die Aufrechterhaltung der mehr oder weniger weitgehenden Reduktion von Di- und Triphosphopyridinnucleotid verantwortlich sein dürfte,³² sollte deren teilweise Hemmung zu einer Verschiebung des Red/Ox-Status in diesen Systemen führen. Wir konnten das für den Quotienten DPN : DPNH in unseren Versuchen nachweisen und betrachten dies als ausschlaggebend für die erhöhte Alkoholentgiftungsgeschwindigkeit nach mehrmaligen Hexobarbitalgaben.

ZUSAMMENFASSUNG

Wir untersuchten verschiedene Faktoren, die das nach 5-tägiger Hexobarbitalbehandlung beobachtete schnellere Absinken des Blutalkoholspiegels bei Kaninchen verursachen können.

Ogleich das durchschnittliche auf das Körpergewicht reduzierte Lebergewicht während der Hexobarbitalbehandlung zunimmt, bleibt bei konstantem Eiweissgehalt der Frischleber die ADH-Menge pro Kilogramm Tier und die Gesamtkatalaseaktivität unverändert, da die Enzymkonzentration (in mg/g_{fr}) gleichzeitig absinken.

Auch die Gesamtmenge an Diphosphopyridinnucleotid ändert sich nicht. Allerdings verschiebt sich das Verhältnis DPN : DPNH zugunsten der oxydierten Form nach höheren Werten. Es besteht eine positive Korrelation zwischen V_e und DPN : DPNH-Quotient. Die beobachtete Erhöhung des Quotienten entspricht in ihrem Ausmass gut der beschriebenen Steigerung der V_e nach längerer Barbituratbehandlung.

Der mögliche Wirkungsmechanismus des Hexobarbitals wird diskutiert.

Anerkennung—Wir danken Frau I. v. Löbbecke für ihre wertvolle Mitarbeit.

LITERATUR

1. H. ELBEL und F. SCHLEYER, *Blutalkohol*. Thieme, Stuttgart (1956).
2. P. WHITTLESLEY, *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **95**, 81 (1954). (Zit. nach 1).
3. H.-D. FISCHER und W. OELSSNER, *Med. Exp.* **3**, 213 (1960).
4. H.-D. FISCHER und W. OELSSNER, *Klin. Wschr.* **39**, 1265 (1961)
5. H.-D. FISCHER. Unveröffentlicht.
6. H. REMMER, M. SIEGERT und H. W. LIEBENSCHÜTZ, *Klin. Wschr.* **39**, 490 (1961).
7. H. S. MASON, *Advanc. Enzymol.* **19**, 174 (1957).
8. B. ALSLEBEN und H. REMMER, *Klin. Wschr.* **36**, 332 (1958); H. REMMER, *Naturwissenschaften* **45**, 189 (1958); *Ibid.* **46**, 580 (1959); *Arch. exp. Path. Pharmacol.* **235**, 279 (1959); *Ibid.* **237**, 296 (1959).
9. R. KATO, *Med. exp.* **3**, 95 (1960).
10. A. H. CONNEY und J. J. BURNS, *Nature, Lond.* **184**, 363 (1959).
11. M. E. SMITH und H. W. NEWMAN, *J. Biol. Chem.* **234**, 1544 (1959).
12. H. BÜTTNER, F. PORTWICH und K. ENGELHARDT, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* **240**, 573 (1961).
13. O. FORSANDER, N. RÄIHÄ und H. SUOLAMAINEN, *Hoppe-Seyl. Z.* **312**, 243 (1958).
14. M. A. SPIRITES und H. J. EICHEL, *Arch. Biochem. Biophys.* **53**, 308 (1954).
15. H. THEORELL und R. K. BONNICHSEN, *Acta Chem. Scand.* **5**, 1105 (1951).
16. H. v. EULER und K. JOSEPHSON, *Liebigs Ann.* **452**, 158 (1927).
17. A. C. MAEHLY, *Advanc. Enzymol.* **1**, 378 (1954).
18. T. BÜCHER und H. REDEZKI, *Klin. Wschr.* **20**, 615 (1951).
19. J. C. ARCOS, A. H. CONNEY und NG. PH. BUU-HOI, *J. Biol. Chem.* **236**, 1291 (1961).
20. J. M. FUJIMOTO und G. L. PLAA, *J. Pharmacol.* **131**, 282 (1961).

21. A. H. CONNEY, C. DAVISON, R. GASTEL und J. J. BURNS, *J. Pharmacol.* **130**, 1 (1960).
22. P. PELTOLA, M. K. PAASONEN und L. MEURMAN, *Ann. Med. Exp.* **38**, 214 (1960) (Zit. nach *Dtsch. med. Wschr.* **86**, 322 (1961)).
23. A. NYBERG, J. SCHUBERT und L. ÄNGGARD, *Acta Chem. Scand.* **7**, 1170 (1953).
24. T. BÜCHER und M. KLINGENBERG, *Angew. Chem.* **70**, 552 (1958).
25. H. J. HOHORST, F. H. KREUTZ und T. BÜCHER, *Biochem. Z.* **332**, 18 (1959).
26. H. HOLZER, G. SCHULTZ und F. LYNEN, *Biochem. Z.* **328**, 252 (1956).
27. E. M. SMITH, J. E. NEWMAN und H. W. NEWMAN, *Proc. Soc. Exp. Biol.* **95**, 541 (1957).
28. J. R. COOPER und B. B. BRODIE, *J. Pharmacol.* **114**, 409 (1955).
29. H. HOLZER und S. SCHNEIDER, *Biochem. Z.* **330**, 240 (1958).
30. N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, vol. 2, p. 681. New York (1955).
31. W. N. ALDRIDGE und V. H. PARKER, *Biochem. J.* **76**, 47 (1960).
32. M. KLINGENBERG, *Vortrag gehalten auf dem 11. Mosbacher Colloquium der Ges. f. Physiol. Chem.* (Zit. nach *Angew. Chem.* **72**, 325, 1960).