

Table II. Antimicrobial activity of antamanide and perhydroantamanide

Compound	Minimal growth inhibiting concentration (γ /ml)							
	<i>Staph. aureus</i> 209 P	<i>Staph. aureus</i> UV-3	<i>Strept. faecalis</i>	<i>Sarcina lutea</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Mycob. phlei</i>	<i>E. coli</i>
Antamanide	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Perhydroantamanide	> 50	18	6-9	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50

antamanide while perhydroantamanide was found to be active against some gram-positive strains (Table II).

The above results indicate that the biological action of antamanide is probably not connected with increase in cation transport through membranes. As for perhydroantamanide, its comparatively high lipophilic properties and marked effect on the transmembranal transport provides a clue for the preparation of new antamanide analogues for membrane studies. The rational search for such analogues has been greatly facilitated now that the three dimensional structure of the antamanide-sodium complex has been proposed⁶.

Zusammenfassung. Untersuchungen mit Antamanid und Perhydroantamanid deuten darauf hin, dass für letzteres die Beeinflussung des Transportes von Na⁺- und K⁺-Ionen durch Membranen von Bedeutung sein kann.

YU. A. OVCHINNIKOV, V. T. IVANOV,
L. I. BARSUKOV, E. I. MELNIK,
N. A. ORESHNIKOVA, N. D. BOGOLYUBOVA,
I. D. RYABOVA, A. I. MIROSHNIKOV and
V. A. RIMSKAYA

⁶ V. T. IVANOV, A. I. MIROSHNIKOV, N. D. ABDULLAEV, L. B. SENYAVINA, S. F. ARKHIPOVA, N. N. UVAROVA, K. KH. KHALILULINA, V. F. BYSTROV and YU. A. OVCHINNIKOV, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 654 (1971).

*Shemyakin Institute for Chemistry of Natural Products,
USSR Academy of Sciences, Ul. Vavilova 32,
Moskwa (UdSSR), 27 September 1971.*

Altersbedingte Abnahme von Kreatinphosphat und Änderungen der Adeninnukleotide in der Skelettmuskulatur von Ratten

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass mit zunehmendem Alter der Gehalt an Kreatinphosphat (KP) in der Skelettmuskulatur von Ratten stark absinkt¹, ohne dass sich dabei die Menge des Gesamtkreatins ändert. Die Aktivität der Kreatinphosphokinase (E.C. 2.7.3.2.) blieb unverändert^{2,3}. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Reaktion Kreatin + ATP \rightarrow KP + ADP (LOHMANN⁴) im Alter gestört ist. Da die Störung nicht auf eine Abnahme der Kreatinphosphokinase zurückgeführt werden kann, haben wir in Muskeln von Ratten verschiedenen Alters ausser KP auch die Adeninnukleotide Adenosinmono-, -di- und -triphosphat (AMP, ADP, ATP) bestimmt.

Methoden. Junge (5-6 Monate) und alte (20-30 Monate) Wistar-Ratten der Alterszucht des Institutes wurden verwendet. Da keine Geschlechtsunterschiede im KP- und Nukleotidgehalt der Muskulatur gefunden wurden, benutzten wir männliche und weibliche Tiere zusammen. Die Ratten wurden mit Nembutal (i.p. 2.5 mg/100 g Körpergewicht) narkotisiert und meist nach 40-45 Min. durch Herzschnitt und Ausbluten getötet (abweichende Zeitdauer der Narkose s. Tabelle II).

Die weissen Muskeln (M. rectus femoris, M. gluteus maximus, peripherer Teil⁵) wurden sogleich in Äthanol-Trockeneis gefroren, gewogen und anschliessend in Perchlorsäure (PCA) während 30 Sek. homogenisiert (Ultraturax). Die Suspension wurde 10 Min. bei 3000 \times g zentrifugiert und der Überstand mit 5N KOH auf pH 7.5 gebracht. Der KClO₄-Niederschlag wurde während 5 Min. bei 3000 \times g abzentrifugiert.

Die Kreatin- und KP-Bestimmung erfolgte nach den Methoden von EGGLETON et al.⁵, ENNOR und STOCKEN⁶ und ENNOR⁷. Dabei wird als «totales Kreatin» die Summe des freien plus des im KP vorliegenden Kreatins bezeichnet. Im PCA-Extrakt wird das freie und, nach Säurehydrolyse, das totale Kreatin bestimmt; durch Subtraktion errechnet sich der Anteil des als KP vorliegenden Kreatins. Bei der Berechnung des als KP vorliegenden Kreatins in Prozenten des totalen Kreatins müssen natürlich die unterschiedlichen Molekulargewichte von Kreatin und KP berücksichtigt werden, falls Kreatin und KP, hier in mg pro g Muskel ausgedrückt, direkt miteinander verglichen werden (Tabelle I). Die KP-Werte in Tabelle I müssen deshalb immer zuerst durch 1.62 dividiert werden, will man sie mit den Werten für das totale Kreatin in Beziehung bringen.

Die Bestimmung der Adeninnukleotide wurde nach Säulenchromatographie entsprechend der Methode von

¹ F. VERZAR und M. ERMINI, *Experientia* 24, 902 (1968); 26, 630 (1970); *Gerontologia* 16, 223 (1970).

² M. ERMINI, *Gerontologia* 16, 65 und 231 (1970).

³ M. ERMINI, *Experientia* 26, 173 (1970).

⁴ K. LOHMANN, *Biochem. Z.* 271, 264 (1934).

⁵ P. EGGLETON, S. R. ELSDEN und N. GOUGH, *Biochem. J.* 17, 526 (1943).

⁶ A. H. ENNOR und L. A. STOCKEN, *Biochem. J.* 42, 557 (1948).

⁷ A. H. ENNOR, in *Methods in Enzymology* (Ed. S. P. COLOWICK und N. O. KAPLAN; Academic Press, New York 1957), Vol. 3.

Tabelle I. Gehalt von Kreatin, Kreatinphosphat (KP) und Adenin-Nukleotiden in weissen Muskeln von jungen und alten Ratten in Ruhe

Nr.	Alter (Mo)	Geschlecht	Gewicht (g)	Totales Kreatin	Kreatinphosphat	KP phosphoryl. Kreatin in % von totalem Kreatin	Adenin-Nukleotide ($\mu\text{mol/g}$ Muskel)				Q ATP/ADP
				(mg/g Muskel)			AMP	ADP	ATP	Total	
27	5	♂	420	4.46	4.20	58	0.14	0.77	4.01	4.92	5.2
18	5	♀	250	4.40	4.12	57	0.13	0.86	4.94	5.93	5.7
32	5	♀	200	4.38	4.20	59	0.20	0.84	—	—	—
44	5	♀	200	4.75	4.62	60	0.15	1.00	6.14	7.29	6.1
04	6	♂	410	4.44	3.67	51	0.23	0.56	5.43	6.31	9.7
Mittel				4.49	4.16	57.0	0.17	0.81	5.13	6.11	6.7
17	15	♂	500	4.44	3.41	49	0.14	0.81	3.46	4.51	4.3
26	20	♀	300	3.82	2.06	41	0.14	1.03	3.66	4.83	3.6
05	20	♀	240	4.62	2.88	39	0.07	3.07	2.12	5.26	0.7
45	25	♀	350	4.88	3.62	46	0.21	2.42	4.31	7.00	1.8
33	26	♂	330	4.04	2.32	35	0.40	1.95	4.16	6.51	2.1
19	30	♀	200	4.08	2.34	35	0.44	3.87	2.43	6.74	0.6
Mittel				4.31	2.77	40.8	0.23	2.19	3.36	5.81	2.2

Tabelle II. Gehalt von Kreatin, Kreatinphosphat (KP) und Adenin-Nukleotiden in weissen Muskeln von jungen männlichen Ratten nach erschöpfender Arbeit und verschiedener Erholungszeit

Nr.	Alter (Mo)	Geschlecht	Gewicht (g)	Erholung (Min. nach Schwimmen)	Totales Kreatin	Kreatinphosphat	KP Kreatin phosphoryl. in % vom totalen Kreatin	Adenin-Nukleotide $\mu\text{mol/g}$ Muskel				Q ATP/ADP
					(mg/g Muskel)			AMP	ADP	ATP	Total	
24	6	♂	390	0	4.80	2.90	37	0.16	1.11	13.44	14.71	12.1
25	6	♂	420	0	4.85	2.98	38	0.08	0.78	7.35	8.21	9.4
28	6	♂	510	0	4.59	2.46	33	0.39	0.95	10.59	11.93	11.1
Mittel + SD					4.75	2.78	36	0.21	0.95	10.46	11.62	10.9
22	6	♂	450	5	4.47	3.03	41	0.10	0.74	9.01	9.85	12.2
23	6	♂	480	18	3.95	3.79	58	0.14	0.74	12.56	13.44	17.0

DEUTSCH und NILSSON⁸ durchgeführt (Dowex-1, 200–400 mesh, Cl-Form, Bettvolumen 0.8 cm² × 5 cm, Fließgeschwindigkeit 1 ml pro Min.). Die Nucleotide wurden in den einzelnen Fraktionen spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt. Ein molarer Extinktionskoeffizient von 14 200 (COHN und CARTER⁹) wurde zur Berechnung der Nukleotidkonzentration benützt.

Die Kreatin- und KP-Konzentrationen wurden in mg/g und die Nukleotidkonzentrationen in $\mu\text{mol/g}$ Muskel-frischgewicht ausgedrückt.

Für die Untersuchung des Einflusses der Arbeit auf den KP- und Nukleotidgehalt der Skelettmuskulatur junger Ratten wurden die Tiere in ein enges, mit Wasser gefülltes Glasgefäß gebracht, wo sie durch Wassertreten nach 3–5 Min. zur Erschöpfung gebracht werden konnten¹⁰.

Versuche. In Tabelle I sind die Kreatin-, KP- und Nukleotidwerte in der weissen Muskulatur von 5 jungen und 6 alten Ratten angeführt.

Der ATP-Gehalt der Muskeln sinkt bei alten Tieren auf etwa $\frac{2}{3}$ des Wertes der jungen. Dagegen nimmt bei alten

Tieren der Gehalt an ADP stark zu. AMP verändert sich im Alter nur wenig. Bezüglich KP wurde der frühere Befund einer starken Abnahme bei alten Ratten bestätigt.

Zur Veranschaulichung der Beziehung des ATP zum ADP wurde der Quotient ATP/ADP gebildet. Dabei kann eine Abhängigkeit dieses Quotienten zum KP beobachtet werden.

Tabelle I zeigt, dass jeweils einem niedrigen KP-Wert auch ein niedriger ATP/ADP-Wert zugeordnet ist; junge Tiere haben hohe KP- und ATP/ADP-Werte, während bei alten Tieren beide Werte niedrig sind.

In Tabelle II sind Arbeitsversuche an jungen Tieren wiedergegeben. Dabei wurden 3 Tiere – nach 3 Minuten Schwimmen – ohne Erholung, nach 5 Min. und 18 Min. Erholung getötet.

⁸ A. DEUTSCH und R. NILSSON, Acta chem. scand. 7, 1288 (1953).

⁹ W. E. COHN und C. E. CARTER, J. Am. chem. Soc. 72, 4273 (1950).

¹⁰ S. M. HORVATH, Am. J. Physiol. 145, 77 (1945).

Unmittelbar nach der Arbeit war das zu KP phosphorylierte Kreatin auf 33–38% vom totalen Kreatin gesunken. Dagegen waren die Menge der Gesamtnukleotide und ebenso der ATP/ADP-Wert höher als nach Ruhe (Tabelle I). Nach 18 Min. war bereits dasselbe KP erreicht, wie es normalerweise nach Ruhe in jungen Ratten gefunden wird. Die Versuche zeigen, dass durch diese Art der Arbeit das KP zwar erniedrigt wird, das ATP aber auf Kosten des KP seine normale Konzentration beibehält.

Untersuchungen über den Einfluss des Alterns auf den Gehalt von Adeninnukleotiden in der Skelettmuskulatur von Säugern liegen in geringer Zahl vor und sind zum Teil widersprechend. HORVATH¹⁰ fand keinen Unterschied zwischen jungen und alten Ratten im ATP-Gehalt der Muskulatur. ROCKSTEIN und BRANDT¹¹ sowie MITOLO¹² bestätigen dies. Untersuchungen von FROLKIS¹³ hingegen ergaben Hinweise auf eine Abnahme im Alter.

Aufgrund der vorliegenden Befunde darf gefolgert werden, dass in der Skelettmuskulatur die Restitution von KP im Alter mit der Abnahme des ATP unter gleichzeitiger Zunahme des ADP korreliert ist.

Summary. The content of phosphocreatine and of the adenine nucleotides, ATP, ADP and AMP in the white skeletal muscle of rats of different ages has been determined.

There is an age-dependent relation between the quantity of phosphocreatine and the ratio of ATP/ADP. Young

rats contain relatively much phosphocreatine (up to 57%) and a high ATP/ADP ratio (mean 6.7) while old rats show less phosphocreatine (40.8%) and also a low ATP/ADP ratio (mean 2.2).

M. ERMINI^{14,15}, I. SZELÉNYI¹⁶ und P. MOSER¹⁷

*Institut für experimentelle Gerontologie,
Nonnenweg 7, CH-4000 Basel (Schweiz),
5. Oktober 1971.*

¹¹ M. ROCKSTEIN und K. P. BRANDT, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 107, 177 (1961).

¹² M. MITOLO, *G. Geront.*, Suppl. 33, 63 (1964).

¹³ V. V. FROLKIS, *Proc. 8th Int. Congress Geront.*, Washington 1969, Vol. 1, p. 147.

¹⁴ M. ERMINI dankt der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften für eine Verlängerung seines Stipendiums und I. SZELÉNYI dankt für ein USA Forschungs-Stipendium an das Institut für experimentelle Gerontologie in Basel. Herrn Prof. F. VERZÁR sind wir für die Leitung dieser und weiterer Arbeiten zu Dank verbunden.

¹⁵ Istituto di Gerontologia Sperimentale, I.N.R.C.A., Via Birarelli 8, I-60100 Ancona (Italia).

¹⁶ Institute of Pathophysiology, Hoegyes Endre-u 7/9, Budapest IX (Ungarn).

¹⁷ Institut für experimentelle Gerontologie, Nonnenweg 7, CH-4000 Basel (Schweiz).

Aktivität der Aldolase und der Succinatdehydrogenase (SDH) in der weissen und roten Skelettmuskulatur junger und alter Ratten

Im Rahmen unserer Untersuchungen über den Einfluss des Alterns auf den Energiehaushalt der Skelettmuskulatur von Ratten fanden wir eine Altersabnahme des Kreatinphosphates (KP)¹. Die Ursache dafür scheint in einer Verschiebung des Gleichgewichtes von ATP zu ADP zu Gunsten des ADP zu liegen². Es ergab sich deshalb die Frage, welcher der ATP-liefernden Prozesse im Muskel mit dem Alter so weit verändert ist, dass nicht mehr genug ATP resynthetisiert werden kann.

Glycolyse und Krebs-Zyklus sind die beiden Prozesse des anaeroben und aeroben Abbaus der Glucose im Muskel, bei welchen das während der Kontraktion anfallende ADP zu ATP resynthetisiert wird. Wir wählten deshalb zur Prüfung je ein Enzym dieser Prozesse. Es wurden Aktivitätsbestimmungen in Muskelextrakten von jungen und alten Ratten gemacht. Für die anaerobe Glycolyse ist FDP-Aldolase (E.C. 4.1.2.b Fructosediphosphat-Aldolase) und für den aeroben «Krebs-Zyklus» die SDH (E.C. 1.3.99.1) (Succinatdehydrogenase) gewählt worden.

Methoden. Für die Aldolase-Extraktion wurden 9 junge (4–7 Monate) und 11 alte (22–29 Monate) Wistar-Ratten aus der Alterszucht des Institutes verwendet und für die SDH-Extraktion 9 junge (3–7 Monate) und 16 alte (20–30 Monate) Ratten. Bei den jungen wurde an 5 Tieren, bei den alten an 9 Tieren gleichzeitig sowohl Aldolase als auch SDH bestimmt (Tabelle I und II, siehe Vergleich der Präparationsnummern). Für die Extraktion der beiden Enzyme wurden die Tiere 40–45 Min nach i.p. Injektion von 2,5 mg/100 g Nembutal, im Schlaf durch Herzschnitt und Ausbluten getötet. Weisse (M. rectus fem.; M. gluteus max. peripherer Teil) und rote Muskelstücke (M. piriformis; M. vastus intermedius; M. gluta-

eus max. zentraler Teil) wurden präpariert, gewogen und sogleich in eisgekühlte 0,14M KCl-Lösung übergeführt.

Bei einigen Tieren wurde zum Vergleich auch die SDH-Aktivität in Mitochondrien-Suspensionen der Leber bestimmt (Tabelle II). Die Gewebstücke wurden während 1 Min. im Ultraturax homogenisiert und die Suspension 10 Min. bei 800 × g zentrifugiert. Der Niederschlag (Kerne, Zellen, Myofibrillen) wurde verworfen; der Überstand 30 Min. bei 8000 × g zentrifugiert. Hierbei wurden die Mitochondrien sedimentiert. Die Menge beträgt 1.1% bei weisser und 1.6% bei roter Muskulatur vom Gesamthomogenat. Der Niederschlag wurde in 0.14M KCl resuspendiert und zur Messung der SDH-Aktivität verwendet. – Im Überstand wurde die Aldolase-Aktivität bestimmt. Alle präparativen Arbeiten wurden bei 2°C ausgeführt.

Die Aktivität der Aldolase wurde nach SIBLEY und LEHNINGER⁴ gemessen, wobei die aus FDP entstehenden Triosen nach Reaktion mit Dinitrophenylhydrazin (DNPH) bei 540 nm spektrophotometrisch bestimmt werden.

Die Aktivität der Succinatdehydrogenase (SDH) wurde nach der Methode von LESTER und SMITH⁵ bestimmt. Es wurde dabei die Menge des reduzierten Neotetrazoliumchlorids (NTC) spektrophotometrisch bei 505 nm gemessen.

¹ M. ERMINI, *Gerontologia* 16, 65 (1970).

² M. ERMINI, I. SZELÉNYI und P. MOSER, *Experientia* 28, (1972).

³ M. ERMINI, *Experientia* 26, 173 (1970).

⁴ J. A. SIBLEY und A. L. LEHNINGER, *J. biol. Chem.* 177, 859 (1949).

⁵ R. L. LESTER und A. S. SMITH, *Biochim. biophys. Acta* 47, 475 (1961).