

Reduktion von III.

50 g III werden in 600 cm³ absolutem Alkohol gelöst und am Rückfluss 50 g Natrium eingetragen. Nach Beendigung der Reaktion wird mit HCl neutralisiert, vom entstandenen NaCl abfiltriert und der Alkohol abdestilliert. Im Rückstand werden die Amine durch Zusatz von NaOH abgetrennt, getrocknet und im Vakuum destilliert. Neben 10 g IV erhält man 30 g V vom Sdp._{12 mm} 63–65°, Äquivalentgewicht 77,8 (ber. 79,1). Das Di-Pikrat vom Smp. 206° erwies sich als identisch mit dem oben beschriebenen.

Reaktion von III mit Essigsäure-anhydrid.

5 g III werden mit 10 g Essigsäure-anhydrid 15 Minuten am Rückfluss zum Sieden erhitzt. Das überschüssige Essigsäure-anhydrid wird sodann im Vakuum bei 80° entfernt und der Rückstand aus Essigester umkrystallisiert. Man erhält 4,5 g farblose Kristalle vom Smp. 158°. Der Mischschmelzpunkt mit VI zeigt keine Erniedrigung.

Die Mikroanalysen verdanke ich dem mikrochemischen Laboratorium der Chemischen Anstalt.

Universität Basel, Anstalt für Anorganische Chemie.

145. Untersuchungen über die Gewebsatmung.

3. Mitteilung.

Die Abhängigkeit der durch Aminosäuren aktivierten Gewebsatmung von der Stoffwechsellage (Hungerzustand, Hyperthyreose)

von **Hugo Aebi**.

(2. VI. 47.)

1945 machten *Edbacher* und *Wiss*¹⁾ die bedeutsame Beobachtung, dass Aminosäuren imstande sind, die Atmung überlebender Gewebe in hohem Masse zu steigern. Sie wiesen darauf hin, dass für die Erzielung dieses Effektes, der bei Leer- und Substratatmung zu beobachten ist, die Einhaltung besonderer Versuchsbedingungen Voraussetzung ist. Dazu gehören in erster Linie die rasche und schonende Verarbeitung der Organe bei Eiskühlung zu relativ konzentrierten Extrakten und die sofortige Zugabe von Substrat und Effektoren zum Organextrakt. Auf diese Weise gelang es im *Warburg*-Versuch, in Organen von Ratte und Meerschweinchen ein bisher nicht beschriebenes, äusserst aktives, aber labiles Atmungssystem nachzuweisen. Wenn auch die Natur dieser aktivierten Atmung noch nicht geklärt ist, so nimmt *Wiss*²⁾ auf Grund seiner bisherigen Untersuchungen an, dass diese in Beziehung mit den Haeminfermenten stehen muss. Dafür sollen die Strukturgebundenheit, die vollständige Hemmbarkeit der aktivierten Atmung durch Blausäure (mol/1000) sowie die Notwendigkeit der Gegenwart von Sauerstoff sprechen.

¹⁾ Helv. **29**, 216 (1946).

²⁾ Helv. **29**, 889 (1946).

Um das Wesen dieses Aktivierungsmechanismus weiter zu klären, schien es von Interesse, den Einfluss der Stoffwechsellage, auf welchen *Wiss*¹⁾ bereits hingewiesen hatte, eingehender zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit soll insbesondere der Einfluss verschieden langer Nahrungskarenz und der Einfluss der Hyperthyreose auf die aktivierte Atmung von Rattenleberextrakten verfolgt werden. Wie gezeigt werden soll, bewirken einerseits das Hungernlassen, andererseits die Hyperthyreodisierung eine analoge Wirkung, indem sie die Aktivierbarkeit verstärken.

Betrachtet man die früher veröffentlichten Versuchsprotokolle, so erkennt man die grosse Labilität dieser Aktivierung, deren Grösse u. a. von der Herstellungsart und Konzentration des Organextraktes, sowie von der Art und Konzentration des Substrates und der zugesetzten Aminosäure abhängt. Es erschien zunächst recht ungewiss, ob es angesichts dieser Tatsache möglich sei, die Versuche in der beabsichtigten Richtung weiterzuführen. Die Überbrückung dieser Hauptschwierigkeit gelang nun dadurch, dass Versuchsbedingungen gewählt wurden, bei welchen der Aktivierungseffekt zuverlässig eintrat und sich — bei gleicher Vorbehandlung der Tiere — innerhalb eines gewissen Streubereiches befriedigend reproduzieren liess.

Bei genauer Einhaltung dieser normierten Versuchsbedingungen und Verwendung von homogenem Tiermaterial lassen sich nun die durch Änderung der Stoffwechsellage der Tiere bedingten Schwankungen der Aktivierung messend verfolgen. Zum Studium dieser Einflüsse wurde der durch *d*-Histidin aktivierte Brenztraubensäure-Abbau durch Rattenleberextrakt gewählt. Wenn im folgenden von der „Aktivierung“ gesprochen wird, so ist darunter stets der durch *d*-Histidin gesteigerte Brenztraubensäure-Abbau durch Leberextrakt zu verstehen.

Experimenteller Teil.

1. Methodik.

Die entsprechend vorbehandelten Tiere werden durch Kopfschlag getötet, die Leber möglichst rasch entnommen, gewogen (auf $\pm 0,05$ g genau) und in einem eisgekühlten Mörser 2 Minuten mit der gleichen Gewichtsmenge Seesand gut verrieben. Nach portionenweiser Zugabe von eisgekühlter Phosphatpufferlösung ($p_H = 8,0$) — pro 1 g Organgewebe 1,33 cm³ Phosphatpuffer — wird der Brei zu einer homogenen Suspension verrührt und dann sofort zentrifugiert, wobei die von *Wiss* in der vorangehenden Arbeit dieser Serie angegebenen Kautelen genau einzuhalten sind. Die Zentrifuge (Modell „Ecco“) wird innert 15 Sekunden auf eine Tourenzahl von 2000 Touren pro Minute gebracht, 15 Sekunden so belassen und dann rasch wieder ausgeschaltet. Der vorsichtig in einen Erlenmeyerkolben dekantierte Extrakt wird mittels einer Pipette mit weiter Öffnung in die bereits mit Lauge, Puffer und Zusätzen versehenen *Warburg*-Gefässe verteilt, wobei vor jeder Entnahme gut umgeschwenkt wird. Die Gefässe werden nun sofort auf die Manometer aufgesetzt, mit Sauerstoff durchlüftet und in den Thermostaten von 38° C eingehängt.

¹⁾ Helv. 29, 889 (1946).

Die Dauer vom Zeitpunkt des Tötens des Tieres bis zum Einhängen der Manometer (sog. Vorbereitungszeit), die nach *Edlbacher* und *Wiss* (loc. cit.) nicht mehr als 25 Minuten betragen soll, dauerte in den hier mitgeteilten Versuchen 18–19 Minuten. Die Temperaturausgleichsperiode wurde ebenfalls möglichst kurz gewählt (8 Minuten).

Zur Normierung der Aktivierung wurden die folgenden Versuchsbedingungen, die sich in Vorversuchen am besten bewährt hatten, gewählt:

1. Vorbereitungszeit 18–19 Minuten, Temperaturausgleichsperiode 8 Minuten.
2. Extraktherstellung: pro 1 g Leber 1,33 cm³ Phosphatpufferlösung, molar/15, p_H = 8,0, eisgekühlt.

3. Kurzes Zentrifugieren nach konstantem Modus (siehe oben).

4. Extraktmenge: 1,0 cm³, bei einem Gesamtlüssigkeitsvolumen von 3 cm³.

5. Substrat: Natriumpyruvatatlösung („*Roche*“), molar/25 Endkonzentration.

6. Aktivierende Aminosäure: *d*-Histidin („*Roche*“), molar/100 Endkonzentration. *d*-Histidin, das von gleicher Wirksamkeit ist wie *l*-Histidin, wurde vorgezogen, weil dieses von der in der Leber vorhandenen Histidase nicht abgebaut wird. Sowohl Natriumpyruvat als auch *d*-Histidin wurden durch Auflösen in Phosphatpuffer p_H = 8,0 jeweils frisch hergestellt und direkt in den Hauptraum des Gefässes eingefüllt.

Der Sauerstoffverbrauch wurde nach der direkten Methode von *Warburg* gemessen. Die Bestimmung der nach dem Versuch im Extrakt noch vorhandenen Brenztraubensäure erfolgte nach der Methode von *F. B. Straub*¹⁾. Der Glykogengehalt der Extrakte wurde nach *Pflüger*²⁾ bestimmt. Zu Kontrollzwecken wurde von jedem Extrakt eine Trockengewichtsbestimmung durchgeführt, indem 1 cm³ Leberextrakt bei 110° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurde. Um die dabei ermittelten geringen Schwankungen in der Extraktkonzentration zu eliminieren, wurden die gemessenen Atmungsgrössen auf 100 mg Trockengewicht pro 1 cm³ Leberextrakt bezogen. Die Trockengewichte betragen bei der normierten Extraktherstellung meist 105–110 mg pro 1 cm³ Extrakt. Die verwendeten Ratten und Meerschweinchen stammen aus der Zucht des Vitamin-Institutes in Basel. Bei den einzelnen Versuchsserien wurden nur Tiere gleichen Alters und Geschlechts verwendet, die seit der Geburt unter gleichen Umweltsbedingungen gehalten wurden. Es ist somit die Gewähr geboten, dass es sich um ein möglichst homogenes Tiermaterial handelt.

2. Die Abhängigkeit der Aktivierung von der Dauer der Nahrungskarenz.

Abgesehen vom Alter, Geschlecht und Vorbehandlung ist es vor allem der Ernährungszustand der Versuchstiere, der für das Ausmass der unter den oben beschriebenen Bedingungen resultierenden Aktivierung von Bedeutung ist. Orientierende Versuche mit Meerschweinchen- und Rattenlebern haben ergeben, dass beim Meerschweinchen zwar die durch den verschiedenen Ernährungszustand bedingten Unterschiede bedeutend grösser sind als bei der Ratte, dass aber auch beim ersteren die schwer erfassbaren individuellen Unterschiede viel stärker zutage treten als bei der Ratte. Wie aus dem von *Wiss* veröffentlichten Versuchsprotokoll³⁾ zu ersehen ist, unterliegen beim Meerschweinchen sowohl Leeratmung als auch Aktivierung bei fortwährendem Hungern grossen Schwankungen, indem die Leeratmung stark abnimmt und die prozentuale Aktivierung ansteigt. Für unsern Zweck erscheint nun die Verwendung von Rattenleberextrakt insofern günstiger, als die Leerwerte, die absolut kleiner sind, in einem relativ

¹⁾ Z. physiol. Ch. **244**, 117 (1936).

²⁾ Pflüger's Arch. Physiol. **114**, 242 (1906).

³⁾ Helv. **29**, 901 (1946).

geringen Schwankungsbereich liegen und sich gut reproduzieren lassen. Offenbar sind hier die Unterschiede in der stofflichen Zusammensetzung der Leber bei Sättigung und beim Hungern geringeren Schwankungen unterworfen als beim Meerschweinchen.

Tabelle 1.

Meerschweinchen, Versuchsdauer 2 h. Natriumpyruvinat molar/20, sonst normierte Versuchsbedingungen.

No.	Leeratmung des Leberextraktes	Zusatz von mol/20 Pyruvinat	Zusatz von mol/20 Pyruvinat + mol/100 <i>d</i> -Histidin
gefüttert:			
1	408 mm ³ O ₂	629 mm ³ O ₂	1082 mm ³ O ₂
2	415	684	1365
3	436	987	1346
24 Stunden gehungert:			
4	344 mm ³ O ₂	896 mm ³ O ₂	1836 mm ³ O ₂
5	340	802	1774
6	308	703	—

Bei den Rattenleberextrakten zeigt die Grösse von Leeratmung und Aktivierung (d. h. des durch Aminosäuren aktivierten Brenztraubensäure-Abbaues) bezüglich Streuung und Reproduzierbarkeit folgendes Verhalten:

Tabelle 2.

Ratte, Versuchsdauer 1 h. Normierte Bedingungen, O₂-Verbrauch auf 100 mg Trockengewicht reduziert.

Tiermaterial: männliche Ratten, Versuche 1—16: 6 Monate alt (ca. 180 g schwer)
Versuche 20—28: 4 Monate alt (ca. 140 g schwer)

No.	Nahrungskarenz	Trockengew./1 cm ³	Leeratmung des Leberextr.		Aktivierung: Zusatz von mol./25 Pyruvinat + mol./100 <i>d</i> -Histidin	
			abs.	red.	absolut	reduziert
1.	24 h	107 mg	218	204	1203	1125 mm ³ O ₂
2.	16	104	219	210	1215	1168
3.	24	102	227	222	1399	1370
4.	16	108	234	216	1429	1321
5.	24	108	252	233	1621	1500
6.	17	108	244	226	1414	1310
11.	46 h	106 mg	232	219	1649	1555 mm ³ O ₂
12.	52	111	251	226	1361	1227
13.	40	107	256	239	1448	1352
14.	43	105	278	265	1541	1470
16.	66	107	254	247	1645	1538
20.	19 h	110 mg	242	220	1652	1502 mm ³ O ₂
22.	19	107	220	206	1704	1590
24.	18	104	220	212	1555	1494
26.	19	117	223	191	1641	1403
28.	19	103	239	232	1428	1384

Über das Verhalten der Aktivierung bei verschiedener Nahrungskarenz geben die folgenden beiden Versuchsserien Aufschluss:

Tabelle 3.

Ratte, Versuchsdauer 1 h. Normierte Bedingungen, O₂-Verbrauch auf 100 mg Trockengewicht reduziert.

Serie A: weibl. Ratten, 13 Monate alt. Serie B: desgl. 5 Monate alt.

Nahrungskarenz:	Leeratmung	Zusatz von mol/25 Pyruv.	Zusatz von mol/100 <i>d</i> -Hist.	Aktivierung mol/25 Pyruv. + mol/100 <i>d</i> -Hist.
A. 16 h	189 mm ³ O ₂	192 mm ³ O ₂	263 mm ³ O ₂	1234 mm ³ O ₂
39	199	204	266	1510
88	202	219	225	1850
B. 14 h	158 mm ³ O ₂	218 mm ³ O ₂	229 mm ³ O ₂	1355 mm ³ O ₂
38	193	212	—	1380
64	205	224	261	1920
86	213	250	264	1960

Die auch bei der Ratte festzustellende Zunahme der aktivierten Gewebsatmung bei fortschreitendem Hungern ist am ehesten so zu deuten, dass es dabei zu einer Verarmung der Leber an Reservestoffen (Glykogen, Eiweiss) kommt. Da der prozentuale Anteil des aktiven Protoplasmas der Leberzellen dabei eine Vermehrung erfährt, kommt es gleichzeitig zu einer Erhöhung des Enzymgehaltes pro Gewichtseinheit Leber. Werden diese Versuche noch länger ausgedehnt, so ist ein Wiederabsinken der Aktivierung zu beobachten, dem relativ bald der exitus folgt. Bei jungen Tieren, schlechtem Ernährungszustand oder unter pathologischen Bedingungen wird dieses Maximum bei der Aktivierung vorher erreicht. Darauf wird weiter unten noch eingegangen. Im übrigen wurde das Verhalten der Aktivierung bei extrem langem Hungern nicht weiter verfolgt.

3. Versuche mit hyperthyreotischen Tieren.

Es ist bekannt, dass es bei der Hyperthyreose zu einer Steigerung aller Stoffwechselforgänge im Organismus kommt. Durch Verabreichung von Schilddrüsenpräparaten, resp. Thyroxin, gelingt es, diese Steigerung experimentell zu erzeugen, wobei zur Beurteilung des Grades derselben u. a. der Verlauf der Gewichtskurve, das Verhalten der Tiere und das Verschwinden des Leberglykogens dienen. Wird die Behandlung nach dem Auftreten einer deutlichen Wirkung längere Zeit fortgesetzt, so kann es zur Erschöpfung des Organismus kommen, und die Wirkung schlägt ins Gegenteil um. Dass es dabei auch in der Leber zu einer Aktivitätssteigerung von Fermenten kommt, hat *J. R. Klein*¹⁾ 1939 am Beispiel der *d*-Aminosäure-oxydase gezeigt.

¹⁾ J. Biol. Chem. **128**, 659 (1939).

Darnach wies Leberbrei von hyperthyreotischen Ratten einen gegenüber der Norm um ca. 100% vermehrten Gehalt an *d*-Aminosäureoxydase auf, bei thyroidectomierten Ratten war er vermindert.

Wie nun aus den unten wiedergegebenen Versuchen zu ersehen ist, zeigen die von hyperthyreotischen Ratten gewonnenen Leberextrakte bei strenger Einhaltung der normierten Versuchsbedingungen eine gegenüber den Normaltieren deutlich verstärkte Aktivierbarkeit, während die Leeratmung dieser Extrakte nur relativ geringe Unterschiede aufweisen.

Zur Erzeugung einer leichten bis mittelstarken Hyperthyreose wurden Ratten in folgender Weise vorbehandelt: Täglich erhielten die Tiere 30 Minuten vor der Fütterung, die jeweilen 17—18 Uhr erfolgte, 0,5 mg Thyroxin „Roche“. Zu 0,5 cm³ einer 1-prom. Lösung wurde etwas Saccharoselösung zugegeben und dieses den Tieren in Glasnöpfchen dargeboten.

Da diese Lösung sofort begierig aufgenommen wurde, musste nur in wenigen Ausnahmen von der Magensonde Gebrauch gemacht werden. Dieses Vorgehen zur Erzeugung der Hyperthyreose ist zwar zeitraubender und in seiner Wirkung schwieriger zu beurteilen als die sonst übliche Injektionsbehandlung, doch ist sie schonender und bei protrahierter Anwendung der Schilddrüsenwirkung näher kommend als eine kurze Stossbehandlung mit Injektionen.

Um Aufschluss über den Zeitpunkt des Wirkungseintrittes zu erhalten, wurde eine Serie von 24 Ratten dieser Vorbehandlung unterworfen und die Aktivierung der Leberextrakte dieser Tiere mit denjenigen von Kontrolltieren verglichen. Wie aus Fig. 1 und 2 zu ersehen ist, ist die Aktivierung bereits am 4.—5. Tag gegenüber der Norm deutlich vermehrt und steigt bei fortdauernder Hyperthyreodisierung noch weiter an. Zum gleichen Zeitpunkt beginnt auch die Gewichtskurve der bis dahin wachsenden Tiere zu fallen.

An 2 weiteren Serien wurde nach 10-, resp. 20-tägiger Hyperthyreodisierung das Aktivierungsvermögen bei verschieden lange dauernder Nahrungskarenz mit demjenigen von Normaltieren verglichen.

Es erwies sich nun, dass die Substratatmung der Leberextrakte hyperthyreotischer Ratten unter gleichen Versuchsbedingungen bedeutend stärker aktiviert wird als diejenige von unter gleichen Bedingungen gehaltenen Kontrolltieren. Während Normaltiere, deren Atmungsgrößen sich mit den oben mitgeteilten Zahlen decken, mit fortschreitendem Hungern das Ansteigen der Werte zeigen, ist bei den hyperthyreotischen Ratten nach Erreichen eines Maximums bei ca. 38 h Nahrungskarenz ein Wiederabsinken festzustellen. In einzelnen Fällen konnte beobachtet werden, dass die bei den hyperthyreotischen Tieren gefundenen Aktivierungsgrößen bei extrem langer Nahrungskarenz von 86 h sogar unter die Normalwerte fallen können. Meist ertragen die hyperthyreotischen Ratten jedoch eine so lange Nahrungskarenz im Gegensatz zu den Kontrolltieren nicht.

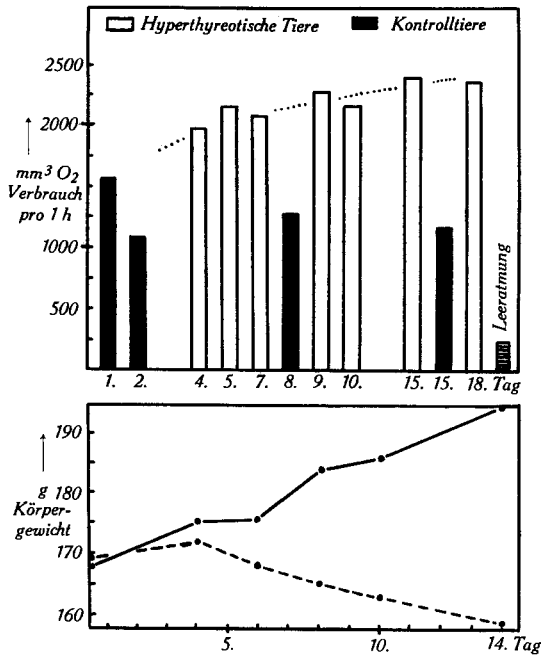


Fig. 1 und 2.

Fig. 1. Zunahme des Aktivierungsvermögens von Leberextrakt im Verlauf der Hyperthyreodisierungsbehandlung mit Thyroxin („Roche“) verglichen mit demjenigen von Kontrolltieren.

Männliche Ratten, 5 Monate alt, Nahrungskarenz 14—16 h. Normierte Bedingungen. Werte auf 100 mg Trockengewicht/1 cm³ Extrakt reduziert.

Fig. 2. Gewichtskurve der hyperthyreodisierten - - - - - und normalen . — . Ratten. Manifestwerden der Thyroxinwirkung am 4.—5. Behandlungstag.

Tabelle 4.

weibl. Ratten, 12 Monate alt, 10-tägige Hyperthyreodisierung, normierte Versuchsbedingungen, O₂-Verbrauch auf 100 mg Trockengewicht reduziert. Versuchsdauer 1 h.

A. = Hyperthyreotische Tiere B. = Normale Tiere

Nahrungskarenz	Trockengew./1 cm³	Leeratmung		Aktivierung mol/25 Pyruv. + mol/100 d-Hist.		Nach dem Versuch noch vorhandenes Pyruvinat (zu Beginn = 13,2 mg)
		abs.	red.	absolut	red.	
A. 14 h	111 mg	212	191	2485 ¹⁾	2240	2,8 mg/3 cm³ Fl. ¹⁾
	38	105	204	2677	2550	3,2
	62	116	234	2815	2430	1,8
B. 15 h	118 mg	220	186	1964	1665	5,0 mg/3 cm³ Fl.
	39	107	199	1765	1650	5,6
	63	118	225	2348	1990	3,4

¹⁾ Der Berechnung des in Fig. 3 dargestellten Quotienten O₂/BRS wurden u. a. diese Werte zugrunde gelegt nach Abzug des bei Zusatz von mol/25 Pyruvinat allein zu beobachtenden O₂-Verbrauches resp. BRS-Abbaues.

Bei jüngeren Ratten (5 Monate alt), sowie bei 20-tägiger Hyperthyreodisierung ergeben sich dieselben Unterschiede.

Um nun das Verhalten der Aktivierung bei Ratten mit starker Hyperthyreose zu untersuchen, wurden Tiere mit Schilddrüsenvoll-extrakten behandelt, indem ihnen täglich 1 Tablette „Tabloid“ Thyroid gland¹⁾ fein verrieben und in Wasser suspendiert, mit der Magensonde verabreicht wurde. Schon nach 4—5 Tagen wies eine beträchtliche Gewichtsabnahme, sowie das Verhalten der Tiere auf das erfolgte Manifestwerden der Schilddrüsenwirkung hin.

Bereits nach 6-tägiger Behandlung liessen sich die oben gezeigten Unterschiede feststellen. Nach Fortsetzung dieser Schilddrüsenbehandlung während weiterer 6 Tage zeigte es sich, dass die Leberextrakte dieser Tiere, die das typische Bild einer starken Hyperthyreose boten, kaum mehr aktivierbar waren. Lediglich die Tiere mit einer Karenz von 38 h — bei welcher die Tiere mit mässiger Hyperthyreose maximale Aktivierbarkeit zeigten — aktivierten schwach. Leerwerte und Aktivierbarkeit bei den Kontrolltieren blieben im Rahmen der obigen Werte.

Tabelle 5.

männliche Ratten, 9 Monate alt. Normierte Versuchsbedingungen. Vergleich zwischen 6 resp. 12 Tage mit Schilddrüsenvoll-extrakt behandelten Tieren und Kontrolltieren. Versuchsdauer 1 h.

Nahrungs karenz	Kontrolltiere:		Hyperthyreotische Tiere:	
	Leeratmung	Aktivierung mol/25 Pyr. mol/100 <i>d</i> -H.	Leeratmung	Aktivierung mol/25 Pyruvinat mol/100 <i>d</i> -Histidin
14 h	230 mm ³ O ₂	1479 mm ³ O ₂	nach 6-tägiger Behandlung: 216 mm ³ O ₂ 2268 mm ³ O ₂	
12 h	230	1598	nach 12-tägiger Behandlung:	
38 h	225	1270	(134	184) Vers.dauer 30 Min.
62 h	225	1144	220	1091
			248	375

Das Absinken der Stoffwechselforgänge unter die Norm ist ein Charakteristikum des toxischen Stadiums der Hyperthyreose. In diesem Sinne werden die obigen Befunde am ehesten zu deuten sein.

Weiter wurde nun auch die Wirkung von *in vitro* zugesetztem Thyroxin (molar/1000 und geringer) auf die Leeratmung der Leberextrakte und auf den aktivierten Brenztraubensäure-Abbau bei den verschiedensten Versuchsbedingungen untersucht z. B. bei Vorschaltung einer anaeroben Phase vor dem Atmungsversuch oder bei Verwendung von O₂-armen Gasgemischen (5—10% O₂), wie dies von *Haarmann*²⁾ und *Mansfeld*³⁾ zum Nachweis

¹⁾ von *Burrough, Wellcome Co.*, London (1 Tabl. entspr. 0,32 g frische Sch.drüse).

²⁾ *Ar. Pth.* **180**, 167 (1935).

³⁾ Die Hormone der Schilddrüse und ihre Wirkungen, Verlag B. Schwabe Basel (1943).

einer in vitro-Wirkung im *Warburg*-Versuch vorgeschlagen worden ist. Eine Wirkung konnte jedoch in keinem Falle festgestellt werden, was mit dem Grossteil der in der Literatur zu findenden Versuchsergebnissen übereinstimmt.

4. Untersuchungen über den Brenztraubensäure-Abbau bei der Aktivierung.

Dass bei der durch Aminosäuren aktivierten Substratatmung die zum Leberextrakt zugesetzte Brenztraubensäure unter günstigen Versuchsbedingungen zum grössten Teil abgebaut wird, hat bereits *Wiss* (loc. cit.) festgestellt. Auch unter den hier verwendeten normierten Versuchsbedingungen wird die zugesetzte Brenztraubensäuremenge, die bei einem Gesamtflüssigkeitsvolumen von 3 cm³ und einer Endkonzentration von molar/25 13,2 mg beträgt (als Natriumpyruvinate), weitgehend abgebaut. Bei der Bestimmung der nach dem *Warburg*-Versuch noch vorhandenen Brenztraubensäure interessierte die Beziehung zwischen der abgebauten Brenztraubensäure und dem hierbei gemessenen Sauerstoffverbrauch. Wie nun aus Fig. 3 zu ersehen ist, war dieses Verhältnis bei der aktivierten Atmung der Leberextrakte von Normaltieren und von hyperthyreotischen Tieren dasselbe. Es ist demnach anzunehmen, dass die oben beobachtete Steigerung der Aktivierung bei der Hyperthyreose nicht durch eine qualitative Änderung des Aktivierungsmechanismus bedingt ist, sondern dass es sich hierbei um eine Intensivierung desselben Vorganges handelt. In beiden Fällen entspricht dem Brenztraubensäure-Abbau von 10 mg ein Sauerstoffverbrauch von durchschnittlich 3880 mm³ O₂. (10 mg Natriumpyruvinate entsprechen $88 \times 10/110 = 8$ mg Brenztraubensäure).

Die Bestimmung des respiratorischen Quotienten des aktivierten Brenztraubensäure-Abbaues wurde nach *Warburg* vorgenommen, indem bei paarweiser Verwendung der Manometer im einen Gefäss zur Absorption der gebildeten CO₂ 0,2 cm³ 10-proz. NaOH eingefüllt wurde, im zweiten nicht. Während im ersten der O₂-Verbrauch in üblicher Weise bestimmt wurde, zeigte der zweite Manometer die Differenz von O₂-Verbrauch und CO₂-Produktion an. Aus diesen beiden Daten liess sich der respirat. Quotient $RQ = CO_2/O_2$ für den durch Aminosäuren aktivierten Brenztraubensäureabbau im Mittel zu $RQ \approx 0,73$ bestimmen. Auf Grund dieser Resultate ergeben sich für den durch *d*-Histidin aktivierten und unter normierten Versuchsbedingungen erfolgten Brenztraubensäure-Abbau durch Leberextrakt folgende Mengenverhältnisse:

a) 1 mg Brenztraubensäure abgebaut entspricht einem O₂-Verbrauch von ca. 388 mm³ (384 mm³ entsprechen der Relation: 1 Mol Brenztraubensäure = $\frac{3}{2}$ Mol O₂) $Q O_2/BRS \approx 1,5$.

b) Respiratorischer Quotient = 0,73. (Bei einem RQ von 0,66 kommen auf 2 Mol produzierte CO₂ 3 Mol O₂ verbrauchter Sauerstoff.)

Bei vollständigem Abbau der Brenztraubensäure zu H_2O und CO_2 werden pro Mol Brenztraubensäure $2\frac{1}{2}$ Mol O_2 benötigt und 3 Mol CO_2 gebildet. Bei Annahme des vollständigen oxydativen Abbaues gelten somit folgende Relationen: 1 mg Brenztraubensäure = $640\text{ mm}^3 O_2$; $Q O_2/BRS = 2,5$, respirat. Quotient $RQ = 1,2$. Es folgt daraus, dass wenigstens unter diesen Bedingungen kein vollständiger Abbau zu Kohlendioxyd und Wasser stattfindet, sondern es muss sich hier um einen Oxydationsmechanismus handeln, bei welchem die Brenztraubensäure nur unvollständig oxydiert wird.

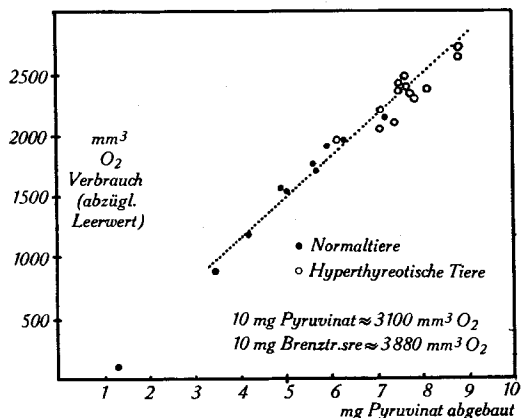


Fig. 3.

Grösse des Sauerstoffverbrauches und Brenztraubensäure-Abbau bei der durch *d*-Histidin aktivierten Substratatmung von Leberextrakten normaler und hyperthyreotischer Ratten.

Besprechung der Ergebnisse.

Wenn in den beiden vorangegangenen Arbeiten über die Aktivierung auf die Labilität dieser Erscheinung und auf die Schwierigkeit der Reproduzierbarkeit der dabei erzielten Ergebnisse hingewiesen worden ist, so betreffen diese Vorbehalte vor allem die Art der Extraktgewinnung, die Menge, resp. die Konzentration des untersuchten Organextraktes einerseits, sowie Art und Konzentration der verwendeten Zusätze andererseits. Wie aus den mitgeteilten Versuchen zu ersehen ist, gelingt es bei Normierung dieser Versuchsbedingungen Resultate zu erhalten, die bei der Beurteilung des Aktivierungsvermögens Schlüsse auf den Einfluss der Vorbehandlung der Versuchstiere zulassen. Ist das Verhalten der Organextrakte in bezug auf Aktivierung bei einer Serie gleichartiger Tiere einmal in der von *Wiss* (loc. cit.) beschriebenen Art und Weise untersucht und hierbei die optimale Enzymkonzentration ermittelt worden, so lassen sich die Resultate bei der Aktivierung in befriedigender Weise reproduzieren. Die Regelmässigkeit, mit der dieser Aktivierungseffekt in ungefähr

derselben Grösse eintritt, beweist, dass es sich bei der von *Edlbacher* und *Wiss* beobachteten Aktivierung der Gewebsatmung durch Aminosäuren nicht um eine „Zufälligkeit“ handeln kann, sondern um einen Mechanismus, der zwar in seinem Wesen noch ungeklärt ist, der aber bei geeigneter Wahl der Versuchsbedingungen ein gesetzmässiges Verhalten zeigt.

An Rattenlebern ist, wie oben gezeigt wurde, beim Hungernlassen der Tiere ein Ansteigen der Aktivierbarkeit festzustellen. Während diese bei den Normaltieren selbst bei 86-stündigem Hungern immer noch zunimmt, erreicht sie bei den hyperthyreotischen Tieren bereits nach 36 h maximale Werte und sinkt dann etwas ab. Dieses Verhalten ist verständlich, wenn man bedenkt, dass bei der Hyperthyreose der Grundumsatz beträchtlich erhöht ist und alle Stoffwechselforgänge beschleunigt ablaufen. Es muss daher vorzeitig zu einer Erschöpfung des Organismus kommen. Während Normaltiere bei gutem Ernährungszustand eine 84-stündige Nahrungskarenz in der Regel ertragen, überstehen hyperthyreotische Ratten diese nur in ca. der Hälfte der Fälle. Da der Stoffwechsel bei der Hyperthyreose und im Hungerzustand viel gemeinsame Züge aufweisen — man spricht bei der Hyperthyreose ja von einem „Hungerstoffwechsel bei Nahrungszufuhr“ —, ist es verständlich, dass die Aktivierung bei mässigen Graden der Hyperthyreose gesteigert ist. Dass die Leber im Hungerzustand und bei Hyperthyreose ein analoges Verhalten zeigt, hat *Schönholzer*¹⁾ auf Grund des weitgehende Übereinstimmung zeigenden pathologisch-histologischen Befundes festgestellt.

Ob nun die durch Hunger oder Hyperthyreodisierung erzeugbare Steigerung der Aktivierbarkeit auf einer Erhöhung der Enzymkonzentration beruht infolge Schwund von gespeicherten Reservestoffen, wie das *Klein* (loc. cit.) für die *d*-Aminosäure-oxydase angenommen hat, oder ob es bei diesen Zuständen, die eine tiefgreifende Veränderung der Stoffwechsellage darstellen, zu einer Vermehrung resp. Verminderung von Effektoren kommt, lässt sich mit Sicherheit noch nicht beantworten. Wie *Wiss* (loc. cit.) gezeigt hat, sind es jedenfalls neben der aktivierenden Aminosäure insbesondere die am Citronensäurecyclus beteiligten Stoffe, denen als Effektoren resp. Katalysatoren grosse Bedeutung zukommt.

Die beim durch Aminosäuren aktivierten Brenztraubensäure-Abbau gemachte Feststellung, dass diese nur unvollständig oxydiert wird, stimmt mit den von *Krebs* und *Eggleston*²⁾ sowie *Evans*³⁾ erhobenen Befunden überein. Darnach soll zwar die durch Taubenmuskelbrei abgebaute Brenztraubensäure vollständig zu CO₂ und H₂O oxydiert werden, die durch Taubenleberbrei abgebaute Brenztrauben-

1) Beitr. path. Anat. **97**, 526 (1936).

2) Biochem. J. **34**, 442 (1940).

3) Biochem. J. **34**, 829 (1940).

säure jedoch nicht. Für den Abbau in der Leber postulieren sie, neben dem eigentlichen Citronensäurecyclus, durch welchen vor allem geringe Brenztraubensäurekonzentrationen abgebaut werden sollen, noch 2 weitere Abbauewege, welche vorzugsweise bei der Gegenwart höherer Brenztraubensäurekonzentrationen beschritten werden sollen, nämlich erstens die Oxydation zu α -Ketoglutar säure und zweitens die Oxydation zu Acetessigsäure. Die oben für den aktivierten Brenztraubensäure-Abbau gefundenen Quotienten $Q = O_2/BRS \approx 1,5$ und $CO_2/O_2 \approx 0,7$ lassen es als durchaus möglich erscheinen, dass diese Abbauewege wenigstens teilweise auch hier beschritten werden. Diese Relationen haben indessen nur Gültigkeit für die unter normierten Bedingungen durchgeführten Versuche und können sich bei Änderung derselben beträchtlich verschieben. So beobachtete *Wiss* (loc. cit.) bei Verwendung höherer Enzymmengen und Zugabe von molar/500 Fumarsäure einen vollständigen oxydativen Abbau der Brenztraubensäure zu Kohlendioxyd und Wasser.

Bei den verschiedenen Graden der Hyperthyreose verhält sich nun der durch Aminosäuren aktivierte Brenztraubensäure-Abbau prinzipiell gleich wie die bisher bekannten für die Hyperthyreose charakteristischen Veränderungen: Nach einer kurzen Periode der Latenz (1. Stadium) kommt es zu einer Steigerung und Intensivierung aller Stoffwechselfvorgänge (Hyperthyreose s. s.), wobei es zur Veränderung des Stoffwechsels im Sinne des Hungerzustandes kommt. Wird die Behandlung fortgesetzt und eventuell verstärkt, so kommt es nach Überwindung eines vom Organismus geleisteten Widerstandes zur Erschöpfung und schliesslich zum Zusammenbruch des gesamten Stoffwechselgeschehens (3., toxisches Stadium). Die hier in bezug auf den Hyperthyreosestoffwechsel gemachten Beobachtungen lassen sich somit gut in das bisher bekannte Bild dieser Stoffwechselkrankheit einfügen.

Andererseits haben diese Ausführungen dargetan, von welcher Bedeutung die Stoffwechsellage für den Ablauf von enzymatischen Reaktionen sein kann. Unbefriedigend bleibt indessen die unverbindliche Bezeichnung „Stoffwechsellage“. Hier werden weitere Untersuchungen einsetzen müssen.

Zusammenfassung.

1. Bei genauer Einhaltung normierter Versuchsbedingungen gelingt es, das Ausmass der Aktivierbarkeit von Leberextrakten durch Aminosäuren bei gleichartigen Tieren befriedigend zu reproduzieren.

Auf diese Weise lässt sich der Einfluss der Stoffwechsellage auf den durch *d*-Histidin aktivierten Brenztraubensäure-Abbau von Rattenleberextrakten untersuchen.

2. Sowohl langes Hungern als auch Hyperthyreodisierung bewirken eine deutliche Verstärkung der Aktivierbarkeit der Leberextrakte.

3. Unter den gewählten Versuchsbedingungen erfolgt nur ein unvollständiger oxydativer Abbau der Brenztraubensäure, $Q O_2/BRS \approx 1,5$, $RQ CO_2/O_2 \approx 0,7$. (Bei vollständiger Oxydation $Q O_2/BRS = 2,5$, $RQ CO_2/O_2 = 1,2$.)

Herrn Dr. O. Wiss, der mir nach dem Tode von Herrn Prof. S. Etlbacher mit seinem Rat zur Seite gestanden ist, möchte ich an dieser Stelle herzlich danken. Ebenso danke ich den Herren Proff. I. Abelin und A. von Muralt, deren Entgegenkommen mir die Fertigstellung dieser Arbeit erlaubt hat.

Basel, Physiologisch-chemisches Institut
der Universität, und
Bern, Medizinisch-chemisches Institut der
Universität, Mai 1947.

146. Über die Photochemie des Tetrabenzoyl-äthylens VIII

von H. Schmid, M. Hochweber und H. von Halban.

(6. VI. 47.)

In der vorliegenden Abhandlung berichten wir über die Konstitution der tief orange-gelb gefärbten Verbindung „B“, die bei längerer Belichtung der photoaktiven Form von Tetrabenzoyl-äthylen gebildet wird. Durch die bisherigen Untersuchungen liess sich noch kein tieferer Einblick in den konstitutionellen Bau des Photoproduktes gewinnen, obwohl die früheren Arbeiten z. T. wertvolle Beiträge zu diesem Problem geliefert haben¹⁾.

Das neutral reagierende „B“ schmilzt bei 153° unter Zersetzung. Durch wiederholtes Umkrystallisieren aus verschiedenen Lösungsmitteln und durch Chromatographie an Calciumsulfat — an Aluminiumoxyd und Zinkcarbonat wurde die Substanz zerstört — liess sich der Schmelzpunkt nicht ändern. An der Einheitlichkeit der Substanz kann daher nicht gezweifelt werden.

In Übereinstimmung mit früheren Befunden¹⁾ fanden wir für „B“ die Bruttoformel $C_{30}H_{20}O_4$. „B“ ist also ein Isomeres des Tetrabenzoyl-äthylens. Die Substanz zeigte mit Eisen(III)-chlorid keine Farbreaktion, sie reagierte nicht mit Diazomethan und liess sich nicht acetylieren. Auch die Bestimmung des aktiven Wasserstoffes nach Zerewitinoff gab stets geringere als für 1 aktives H-Atom berechnete Werte. Es darf daher auf das Fehlen einer Hydroxylgruppe in „B“ geschlossen werden.

¹⁾ H. Keller und H. v. Halban, Helv. **29**, 1466 (1946); **28**, 542, 59 (1945) und dort angeführte frühere Veröffentlichungen.