

Die Konzentration der Pyridinnucleotide in verschiedenen Organen des gesunden Meerschweinchens¹.

Von

O. Gabriel, O. F. Schwarz und O. Hoffmann-Ostenhof.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 5. Mai 1954.)

Mit der Absicht, die erhaltenen Werte als Grundlage für spätere Untersuchungen über Veränderungen unter pathologischen Bedingungen zu benützen, wurde es unternommen, den Gehalt an oxydierten und reduzierten Pyridinnucleotiden in Leber, Niere, Herz und Hirn normaler Meerschweinchen zu bestimmen.

Einleitung.

Die Funktion der Pyridinnucleotide (PN) als wichtige Teilkatalysatoren der biologischen Oxydationsmechanismen ist wohlbekannt². Es erschien uns deshalb lohnend, die Veränderungen der Konzentration dieser enzymatischen Komplemente³ und auch des Verhältnisses zwischen reduzierten und oxydierten PN im Tierorganismus unter dem Einfluß verschiedener pathologischer Veränderungen zu studieren.

Leider sind die verschiedenen, in der Literatur zu findenden Angaben über die Konzentration der PN und auch insbesondere über das Verhältnis der reduzierten und oxydierten Formen der PN nicht sehr umfassend und divergieren manchmal beträchtlich, was vermutlich sowohl auf die häufig nicht sehr schonende Art der Extraktion und auch auf die Verschiedenheit der Methoden zurückzuführen ist. Aus diesem Grunde sahen wir uns veranlaßt, eigene Messungen der Konzentrationen dieser Substanzen und dem Verhältnis zwischen oxydierten und reduzierten PN in verschiedenen Organen des gesunden Meerschweinchens

¹ Herrn Prof. Dr. *L. Ebert* zum 60. Geburtstag gewidmet.

² Vgl. z. B. *F. Schlenk* in „The Enzymes“, herausgegeben von *J. B. Sumner* und *K. Myrbäck*, Bd. II/1, S. 250. New York. 1951.

³ *L. Michaelis*, *ibid.*, Bd. II/1, S. 1. — Vgl. auch *O. Hoffmann-Ostenhof*, *Adv. Enzymology* 14, 219 (1953).

vorzunehmen, um auf diese Weise eine Grundlage für unsere späteren Untersuchungen zu gewinnen.

Zur Bestimmung der Pyridinnucleotide gibt es einerseits biologische Methoden, wie z. B. den „Gärttest“⁴, und andererseits physikalisch-chemische Methoden, von welchen die Spektrophotometrie wohl die wichtigste ist. Während die biologischen Methoden eine leichtere Unterscheidung zwischen Diphosphopyridinnucleotid (DPN) und Triphosphopyridinnucleotid (TPN) erlauben, dürfte in bezug auf die Genauigkeit der Analyse die Spektrophotometrie überlegen sein. Da wir nicht annehmen, daß für unsere Fragestellungen eine Unterscheidung zwischen DPN und TPN von großer Bedeutung sein wird, verwendeten wir eine spektrophotometrische Arbeitsweise, welche im wesentlichen der von *Feigelson* und Mitarbeitern⁵ ausgearbeiteten Methode entspricht. Diese gestattet in verhältnismäßig einfacher Weise, außer der Gesamtkonzentration der PN auch den Anteil der reduzierten und oxydierten Formen dieser Stoffe zu bestimmen.

Methodik.

Die Bestimmungsmethode von *Feigelson* und Mitarbeitern⁵ beruht im wesentlichen darauf, daß das biologische Material unter möglichst schonenden Bedingungen mit Trichloressigsäure extrahiert wird, wobei die Pyridinnucleotide in Lösung gehen. Aus der Lösung werden die Substanzen dann an einer Kolonne von Aktivkohle einer bestimmten Korngröße (*Nuchar C*) selektiv adsorbiert, in der Folge mit Pyridin eluiert und nach Reduktion zu den entsprechenden Dihydroformen ($\text{DPN} \cdot \text{H}_2$ und $\text{TPN} \cdot \text{H}_2$) spektrophotometrisch durch Messung bei 3400 Å (Absorptionsmaximum der reduzierten Pyridinnucleotide) bestimmt. Auf diese Weise werden nur die oxydierten Pyridinnucleotide erfaßt, da die reduzierten Formen dieser Stoffe sehr säurelabil sind und deshalb bei der Extraktion zerstört werden. Wenn man hingegen dafür sorgt, daß bei der Extraktion die reduzierten Formen der Pyridinnucleotide oxydiert und damit in die säurestabile Form überführt werden, so erhält man bei der analog durchgeführten Messung Werte, welche der Gesamtkonzentration der Pyridinnucleotide, das heißt der Summe an oxydierten und reduzierten Pyridinnucleotiden, entspricht. Durch Subtraktion der Werte für die oxydierten Formen von den Werten der Gesamtkonzentration läßt sich die Konzentration der reduzierten Formen der Pyridinnucleotide berechnen.

Praktisch gingen wir derart vor, daß wir Meerschweinchen mit einem Durchschnittsgewicht von 300 g durch Genickschlag töteten, die Organe, deren Pyridinnucleotidgehalt wir messen wollten, sofort entnehmen und in eine Aceton-Trockeneis-Mischung eintrugen. Portionen von etwa 1 g des zu untersuchenden Gewebes wurden rasch und genau gewogen und

⁴ H. v. Euler, F. Schlenk, H. Heiwinkel und B. Högberg, Z. physiol. Chem. 256, 208 (1938).

⁵ P. Feigelson, J. N. Williams, Jr. und C. A. Elvehjem, J. Biol. Chem. 185, 741 (1951).

darauf im „Homogenizer“ von *Potter* und *Elvehjem*⁶ entweder (zur Bestimmung des oxydierten Anteiles der Pyridinnucleotide) mit 6 ml 2%iger Trichloressigsäure allein oder (zur Bestimmung der Gesamtkonzentration der Pyridinnucleotide) mit 9 ml einer wäßr. Lösung, welche in bezug auf Trichloressigsäure 2%ig und in bezug auf Wasserstoffperoxyd 5%ig ist, unter Eiskühlung homogenisiert.

Die sonst üblichen „Homogenizer“ wurden für die Extraktion mit Wasserstoffperoxyd trichterförmig erweitert, um ein Überriesen des Homogenats durch das starke Schäumen zu verhindern.

Die erhaltenen Vollhomogenate wurden nach kurzem Stehen bei 10000 U/Min. zentrifugiert, das Sediment nach Abgießen der überstehenden Flüssigkeit mit etwas 2%iger Trichloressigsäure gewaschen, die überstehenden Flüssigkeiten vereinigt und auf ein bestimmtes Volumen gebracht.

Da uns die von den amerikanischen Autoren⁵ verwendete Sorte von Aktivkohle nicht zur Verfügung stand, mußten wir für die Extraktion eine Modifikation des Verfahrens entwickeln. Es gelang uns, durch entsprechende Vorbehandlung⁷ aus handelsüblichem Norit eine Präparation herzustellen, welche quantitativ die Pyridinnucleotide aus den Lösungen adsorbiert, wenn sie mit diesen verrührt wird. Durch Verrühren mit 10%igem wäßrigen Pyridin lassen sich die Pyridinnucleotide wieder quantitativ eluieren.

Die Reduktion der Pyridinnucleotide zu ihren Dihydroderivaten erfolgte mit Hilfe einer Lösung von 0,2 g Natriumdithionit in 10 ml 0,5 m NaHCO₃-Lösung, die unmittelbar vor der Verwendung hergestellt werden muß.

Ergebnisse und Diskussion.

Die Ergebnisse unserer Meßreihen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Wie man aus Tabelle 1 ersieht, erlaubt die beschriebene Methode eine recht genaue Bestimmung der gesuchten Werte; die Abweichungen dürften sogar mehr auf individuelle Verschiedenheiten der einzelnen Tiere als auf Meßfehler zurückzuführen sein.

Soweit Vergleichsmöglichkeiten vorhanden sind, stimmen unsere Werte im allgemeinen mit denjenigen anderer Untersucher⁸ gut überein.

⁶ *R. V. Potter* und *C. A. Elvehjem*, *J. Biol. Chem.* 114, 495 (1936).

⁷ 150 g Norit werden in 1 l 10%iger Salzsäure aufgekocht und darauf filtriert. Anschließend wird die Aktivkohle in 2 l destilliertem Wasser suspendiert und wiederholt gewaschen; schließlich trocknet man 8 bis 10 Std. bei 85 bis 95°.

⁸ *J. Robinson*, *N. Levitas*, *F. Rosen* und *W. A. Perlzweig*, *J. Biol. Chem.* 170, 653 (1947). — *P. Feigelson*, *J. N. Williams, Jr.* und *C. A. Elvehjem*, *ibid.* 185, 741 (1951). — *C. Carruthers* und *V. Suntzeff*, *Arch. Biochem.*

Tabelle I. Konzentration der oxydierten und reduzierten Pyridinnucleotide in verschiedenen Geweben des Meerschweinchens. Die Zahlen stellen μg PN pro g Frischgewebe dar und sind arithmetische Mittelwerte aus den erhaltenen Ergebnissen; der mittlere Fehler wurde aus der Formel

$$\bar{M} = \pm \sqrt{\frac{\sum f^2}{n(n-1)}}$$

berechnet. In der Klammer ist die Anzahl der Versuche angegeben.

| Organ | PN | PN + PN · H ₂ | PN · H ₂ (ber.) | PN/PN · H ₂ |
|-----------------|---------------|--------------------------|----------------------------|------------------------|
| Leber | 515 ± 18 (12) | 664 ± 22 (7) | 149 | 3,46 |
| Niere | 311 ± 15 (10) | 497 ± 19 (8) | 186 | 1,67 |
| Herz | 290 ± 18 (4) | 412 ± 15 (8) | 122 | 2,38 |
| Hirn | 176 ± 8 (5) | 209 ± 11 (5) | 33 | 5,33 |

Als Ausnahme sind die Ergebnisse von *McIllwain* und Mitarbeitern⁹ zu erwähnen, welche im Hirn des Meerschweinchens etwas geringere Konzentrationen von Pyridinnucleotiden fanden als wir, was vermutlich auf die verschiedene Methodik zurückzuführen ist. Auch in bezug auf die Verteilung der PN auf die einzelnen Organe stimmen unsere Ergebnisse mit denjenigen anderer Autoren überein; *Jandorf*¹⁰ fand bei der Ratte, daß die Konzentration der PN in den Organen Hirn, Muskel, Niere und Leber in der angegebenen Reihenfolge ansteigt, was völlig unseren Werten entspricht.

Aus dem Vergleich unserer Werte mit Angaben über die PN-Konzentrationen bei anderen Tieren ergibt sich, daß der Gehalt der Zellen an PN desto höher ist, je kleiner die betreffende Tierspezies ist; dies stimmt mit der allgemein beobachteten größeren Intensität der Stoffwechselfvorgänge bei kleineren Tieren überein.

In ähnlicher Weise lassen sich wahrscheinlich auch die Konzentrationsunterschiede an PN zwischen den einzelnen von uns untersuchten Organen deuten: es ist anzunehmen, daß auch diese Werte Unterschiede in den Stoffwechselintensitäten widerspiegeln.

Ohne Zweifel kommt auch dem Verhältnis zwischen oxydierten und reduzierten Formen der PN eine biologische Bedeutung zu; die Verhältnisse sind hier allerdings nicht leicht überschaubar. Entsprechend der Rolle der PN als Wasserstoff- bzw. Elektronenüberträger zwischen den Stoffwechselsubstraten einerseits und demjenigen Enzymsystem, welches die Elektronen schließlich zum molekularen Sauerstoff transportiert,

Biophysics 45, 140 (1953). — *D. R. Strength, I. Ringler und W. L. Nelson*, ibid. 48, 107 (1954).

⁹ *M. Gore, F. Ibbot und H. McIllwain*, Biochemic. J. 47, 121 (1950).

¹⁰ *B. Jandorf*, J. Biol. Chem. 150, 89 (1943).

könnten vor allem folgende Faktoren als bestimmend für die Größe der Werte $PN/PN \cdot H_2$ fungieren: Konzentration der Wasserstoffdonatoren (Stoffwechselfsubstrate); Konzentration bzw. Funktionstüchtigkeit der Pyridinnucleotid-spezifischen Dehydrogenasen (Transhydrogenasen³); Konzentration bzw. Funktionstüchtigkeit der Fermentsysteme, welche den Weitertransport der Elektronen bis zum Sauerstoff katalysieren und von welchen wir wissen, daß sie aus einer Anzahl von Einzelfermenten bestehen; und schließlich die Konzentration, das heißt der Partialdruck des Sauerstoffes. Es ist zur Zeit kaum möglich, die Bedeutung jedes dieser Faktoren für das Gesamtsystem zu ermessen.

Abschließend soll hier kurz berichtet werden, daß wir in orientierenden Vorversuchen an diphtherie-intoxifizierten Meerschweinchen¹¹ in den Organen Leber, Niere und Herz eine signifikante Erhöhung des Quotienten $PN/PN \cdot H_2$ beobachten konnten.

¹¹ Vgl. dazu *H. Eibl, W. Zischka, I. Dreher, O. F. Schwarz und O. Hoffmann-Ostenhof*, *Mh. Chem.* **81**, 616 (1950). — *O. F. Schwarz, H. Eibl, W. Zischka und O. Hoffmann-Ostenhof*, *ibid.* **82**, 391 (1951). — *W. Zischka, H. Eibl, O. F. Schwarz und O. Hoffmann-Ostenhof*, *ibid.* **82**, 571 (1951).