

Acta Medica Okayama

Volume 5, Issue 4

1936

Article 1

OKTOBER 1938

Die Zitrikodehydrase und die Gallensaure.

Tokuharu Ishihara*

*Okayama University,

Copyright ©1999 OKAYAMA UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL. All rights reserved.

Die Zitrikodehydrase und die Gallensaure.*

Tokuharu Ishihara

Abstract

1. Die Zitrikodehydrasewirkung von verschiedenen Organen wurde vergleichend untersucht. Unter den untersuchten Organen : Leber, Milz, Muskel, Niere und Hoden, ist die Leber in der Wirkung am stärksten. 2. Die Zitrikodehydrasewirkung der Leber äußert sich am stärksten bei einer H^+ -Konzentration von pH 8.2. In saurem Medium tritt im Gegensatz zu der Behauptung von Langecker die Spaltung starker zurück, als in alkalischem, stimmt aber mit der von Reichel und Neeff überein. 3. Die Wirkung der Gallensaure auf das Zitrikodehydrasesystem der Leber wurde studiert. Gallensaure wirkt auf die Zitronensaurespaltung stark hemmend ein. Die Hemmung tritt bei pH 8.2 am stärksten hervor, also gerade bei der optimalen H^+ -Ionenkonzentration für die Fermentwirkung. Die Menge der zugesetzten Cholsäure ist nicht von bedeutendem Einfluß, soweit der pH-Wert von 8.2 abweicht. 4. Azetondikarbonsäure wird durch Leberbrei nicht angegriffen. Dieses Resultat stimmt mit dem von Langecker völlig überein. Der Zitratabbau beim fermentativen Vorgang kann also nicht über Azetondikarbonsäure vor sich gehen.

Aus dem Biochemischen Institut der Med. Fakultät Okayama
(Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu).

Die Zitrikodehydrase und die Gallensäure.

Von

Tokuharu Ishihara.

Eingegangen am 18. September 1937.

Das Vorkommen der Zitrikodehydrase wurde, und zwar in großem Ausmaße, im tierischen sowie pflanzlichen (*Wagner-Jauregg* 1935) Organismus, von mehreren Autoren, wie *Battelli* und *Stern* (1911), *Thunberg* (1911, 1920, 1929), *Bernheim* (1928), *Hahn* und *Haarmann* (1929) u.s.w. sicher festgestellt. Der Chemismus des fermentativen Zitratabbauens in den tierischen Organen ist aber noch nicht endgültig aufgeklärt. Das haltbare Fermentpräparat wurde erst von *Bernheim* (1928) aus Schweine- und Schafleber, und dann vor kurzem von *Reichel* und *Neeff* (1936) aus Menschen-, Kalbs-, Schweine- und Pferdeleber dargestellt. Unter den verschiedenen Organbreien ist das zitratabbauende Vermögen der Leber dem der anderen Organe weitgehend überlegen, was *Langecker* (1934) experimentell bewiesen hat. Nach *Wagner-Jauregg* u. *Rauen* (1935) soll der Abbau der Zitronensäure stufenweise unter Mitwirkung zweier verschiedener Co-fermente (Co-dehydrase u. Flavin) erfolgen.

Da nun einerseits die Zitrikodehydrase im Kohlenhydrat-, Eiweiß- und Fettstoffwechsel eine größere Rolle zu spielen scheint, als z.B. *Martius* (1937) bis jetzt angenommen hat, und andererseits das Ferment vorwiegend in der Leber vorkommt, habe ich in der vorliegenden Arbeit den Einfluß der Gallensäure, die ja eines der wichtigsten Stoffwechselprodukte der Leber ist, auf die Wirkung dieses Fermentes untersucht. Die Gallensäure scheint sich an den physiologischen Stoffwechselvorgängen in großem Umfange zu beteiligen, wie schon von den Schülern Prof. Dr. T. Shimizus auf breiter experimenteller Basis einwandfrei bewiesen worden ist.

Vor dem vorzunehmenden Versuch mußte ich zunächst die Wirkungsbedingungen der Zitrikodehydrase selbst näher bestimmen, weil die benötigten Daten in der alten Literatur in den Einzelheiten noch nicht eindeutig klargestellt sind.

Experimenteller Teil.

1) Zitrikodehydrasewirkung und Wasserstoffionenkonzentration.

Zum Versuche wurde Kaninchenleberbrei benutzt, der möglichst sorgfältig unter peinlich aseptischen Bedingungen bereitet wurde. Zur Messung der zitratabbauenden Fähigkeit des Organbreies wurde die unzersetzt zurückbleibende Zitronensäure durch Pentabromazon-Methode nach *Kometiani* (1931) bestimmt. Die Zuverlässigkeit dieser Methode, die auf der *Stahreschen* Reaktion beruht, wurde wie von *Fürth* u.a. (1934), auch von *Langecker* einer Prüfung unterzogen und als befriedigend anerkannt (über die Methode, siehe *Langecker*, B. Z. 273, 44, 1934!).

Versuchsanordnung:

Pufferlösung: Phosphatpuffer von den pH 6.24, 7.15, 8.20 und 9.0.

Substrat: n-Natriumzitratlösung.

Versuchsdauer: 2 Stunden, ohne Durchlüftung.

Thermostatentemperatur: um 38°C.

Tabelle 1.
Prozentualer Zitratabbau durch Leberbrei bei verschiedenen pH.

pH	6.24	7.15	8.20	9.00
Abbau %	73.62	76.76	80.18	65.43

(Mittelwert von 5 Versuchsansätzen. Einzelne Daten werden in der Tabelle 3 - 6 zusammengestellt.)

Wie aus der Tabelle 1 ersichtlich ist, liegt die optimale H⁺-Ionenkonzentration für die Zitratspaltung durch Leberbrei unter dem pH-Bereich des Versuchs bei pH 8.2.

Langecker gab an, daß sein Leberbrei das Zitrat bei pH 6.3 stärker abbaue als bei pH 7.5 od. 8.2. Bei meinem Fall ist das Resultat also gerade das umgekehrte von seinem. Bei den Versuchen von *Reichel* und *Neeff* (1936) liegt die optimale H⁺-Ionenkonzentration seiner gereinigten Zitrikodehydrasepräparate aus Leber bei pH 7.6. Allerdings tritt die Spaltung bei pH 5.7 hier weit mehr zurück als bei 7.6 und 9.5.

2) Zitrikodehydrasewirkung in anderen Organen.

Zum Vergleich der zitratspaltenden Fähigkeit des Leberbreies und der Breie von anderen Organen wurden Muskel, Niere, Milz und Hoden von Kaninchen verwendet.

Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich ist, liegt das zitratspaltende Vermögen anderer Organe weit hinter dem der Leber zurück.

Tabelle 2.

Versuchsanordnung: Von allen Organen werden 5 g als Brei benutzt.

12 cc Phosphatpuffer von pH 8.2 + 1 cc n-Zitratlösung.

Wirkungsdauer: 2 Stunden ohne Durchlüftung. Thermostaten bei 38°C.

	Nr.	Niere	Muskel	Milz	Hoden	Leber
Wiedergefundene Zitronensäure in mg	1	34.178	59.003	59.713	62.170	12.865
	2	33.828	56.518	60.598	61.873	12.428
	3	32.848	58.365		60.863	12.603
	4	33.653	65.723		62.870	13.323
	5	33.208	57.935		62.073	12.253
Durchschnittswert		33.543	57.508	60.15	62.073	12.694
Abbau in %		52.08	10.15	6.02	3.02	80.18

Aus den Daten geht hervor, daß die Zitronensäure bei den angegebenen Versuchsbedingungen durch Leberbrei um 80.18, durch Nierenbrei um 52.08, durch Muskel-, Milz- und Hodenbrei aber nur noch um 10.15, 6.02 und 3.02% abgebaut wird.

3) *Beeinflussung der Zitrikodehydrasewirkung der Leber durch die Gallensäure.*

Wie aus den Tabellen 3–4 ersichtlich ist, wirkt die Gallensäure auf die Zitrikodehydrase der Leber als ein ausgeprägt hemmender Faktor ein, was ja bei einem physiologischen Geschehen möglicherweise auch der Fall sein könnte. Es ist auch von Interesse hierbei, daß die Hemmung gerade bei einer H⁺-Ionenkonzentration, die dem Ferment eine optimale Bedingung verschafft, am stärksten hervortritt.

Versuchsanordnung:

5 g Leberbrei. Phosphatpuffer von pH 6.24, 7.15, 8.20 und 9.00. Substrat: n-Natriumzitratlösung. 1%ige Natriumcholatlösung wird dazu in steigender Menge zugesetzt.

Die Menge der zugesetzten Cholsäure ist nicht von bedeutendem Einfluß. Bei einer H⁺-Ionenkonzentration, wo die Hemmung der Gallensäure am stärksten einsetzt und gleichzeitig eine optimale H⁺-Ionenkonzentration für das Fermentsystem entfaltet, tritt der Einfluß der zugesetzten Menge Cholsäure allerdings mehr in den Vordergrund, — je mehr Cholsäure, desto stärkere Hemmung.

Tabelle 3.

Leberbrei 5 g pH = 6.24

Pufferlösung, cc		12	11	10	9
n-Natriumzitratlösung, cc		1	1	1	1
1% Natriumcholatlösung, cc		0	1	2	3
Wiedergefundene Zitronensäure in mg	I	15.963	19.685	21.488	24.420
	II	16.869	19.535	22.198	25.750
	III	17.757	20.420	23.080	24.858
	IV	17.313	19.973	21.925	25.303
	V	16.514	20.395	22.643	24.595
Mittelwert, mg		16.888	20.042	22.167	24.985
Abbau in %		73.62	68.69	65.37	60.97

Tabelle 4.

Leberbrei 5 g pH = 7.15

Pufferlösung, cc		12	11	10	9
n-Natriumzitratlösung, cc		1	1	1	1
1% Natriumcholatlösung, cc		0	1	2	3
Wiedergefundene Zitronensäure in mg	I	14.205	22.198	23.972	25.750
	II	15.185	21.750	23.080	26.635
	III	14.380	21.488	22.373	26.170
	IV	15.535	20.953	23.528	25.303
	V	15.090	21.313	23.178	27.528
Mittelwert, mg		14.879	21.540	23.226	26.277
Abbau in %		76.76	66.35	63.71	58.95

Tabelle 5.
Leberbrei 5 g pH = 8.20

Pufferlösung, cc		12	11	10	9
n-Natriumzitratlösung, cc		1	1	1	1
1 % Natriumcholatlösung, cc		0	1	2	3
Wiedergefundene Zitronensäure in mg	I	12.865	22.198	26.635	31.965
	II	12.428	23.080	27.528	32.410
	III	12.603	21.925	26.170	32.848
	IV	13.323	22.643	26.548	31.518
	V	12.253	23.703	28.410	31.073
Mittelwert, mg		12.694	22.710	27.058	31.965
Abbau in %		80.18	64.52	57.73	50.06

Tabelle 6.
Leberbrei 5 g pH = 9.00

Pufferlösung, cc		12	11	10	9
n-Natriumzitratlösung, cc		1	1	1	1
1 % Natriumcholatlösung, cc		0	1	2	3
Wiedergefundene Zitronensäure in mg	I	21.313	24.420	26.635	28.410
	II	22.198	25.750	25.925	29.295
	III	21.750	24.858	27.528	28.053
	IV	23.080	25.303	27.965	28.858
	V	22.285	24.210	27.255	29.033
Mittelwert, mg		22.125	24.908	27.058	28.650
Abbau in %		65.43	61.09	57.73	55.24

4) Ist Leber Azetondikarbonsäure zu spalten befähigt?

Die Zwischenstufe der enzymatischen Zitratspaltung ist noch nicht bekannt. Bis jetzt waren viele Autoren der Anschauung, daß diese Spaltung über Azetondikarbonsäure vor sich gehe. z.B. *Wieland* u. *Sonderhoff* (1932 u. 1933), *Reichel* u. *Neeff* (1936).

In den Organismus eingeführte Zitronensäure wird weitgehend gespalten und nur ein geringer Teil davon kommt zur Ausscheidung durch die Niere. Zum Leberbrei zugesetzte Zitronensäure wird auch ebenso leicht wie vollständig gespalten. Wenn diese Spaltung über Azetondikarbonsäure vor sich ginge, müßte die genannte Säure durch den Leberbrei unter gleichen Bedingungen genau so leicht wie beim Zitrat gespalten werden. Dies ist aber tatsächlich nicht der Fall, wie einmal von *Langecker* (1934) nachgewiesen und wiederum durch die Ergebnisse vorliegender Versuche experimentell festgestellt werden konnte. Azetondikarbonsäure wird durch die Leber nicht angegriffen, wie man aus der folgenden Tabelle ersieht und wie *Wagner-Jauregg* u. *Rauen* (1935) beobachtet hat.

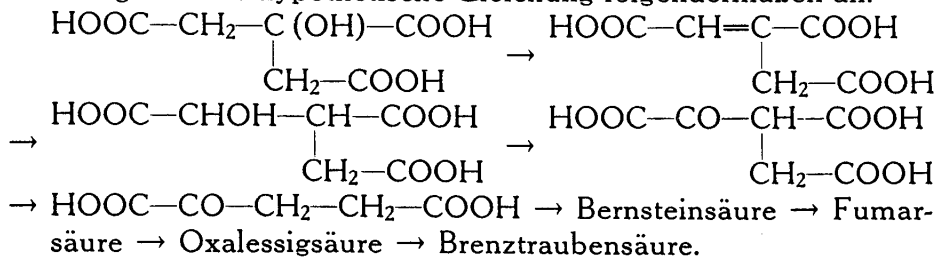
Tabelle 7.

	Wiedergefundene Azetodikarbonsäure in mg						
Nr.	1	2	3	4	5	Mittel	
Pufferlösung, 12 cc n-Natriumazetondikarbonatlös. 1 cc	70.253	71.485	70.992	69.513	71.978	70.844	
Pufferlösung, 12 cc n-Natriumazetondikarbonatlös. 1 cc Leberbrei, 5 g	67.788	69.020	68.280	68.774	69.267	68.625	Umsatz in % <u>3.13</u>

Die Bestimmung der Azetondikarbonsäure wurde nach der von *Langecker* (1934) ausgearbeiteten Pentabromazeton-Methode ausgeführt.

Nach Abschließung meiner Arbeit ist eine vorläufige Mitteilung von *Martius* und *Knoop* über „den physiologischen Abbau der Zitronensäure“ erschienen. Nach *Martius* und *Knoop* (1937) u. *Martius* (1937) soll der fermentative Abbau der Zitronensäure nicht über Azetondikarbonsäure, wie die frühere Anschauung der meisten Autoren war, sondern über α -Ketoglutar säure vor sich gehen. Die Autoren konnten nämlich bei der fermentativen Spaltung der Zitronensäure durch Leber α -Ketoglutar säure als deren Dinitrophenylhydrazon isolieren, die nach ihnen als eine der Zwischenstufen dieses Vorganges anzusehen wäre.

Sie geben die hypothetische Gleichung folgendermaßen an.



Zusammenfassung.

1. Die Zitrikodehydrasewirkung von verschiedenen Organen wurde vergleichend untersucht. Unter den untersuchten Organen: Leber, Milz, Muskel, Niere und Hoden, ist die Leber in der Wirkung am stärksten.

2. Die Zitrikodehydradewirkung der Leber äußert sich am stärksten bei einer H^+ -Konzentration von pH 8.2. In saurem Medium tritt im Gegensatz zu der Behauptung von *Langecker* die Spaltung stärker zurück, als in alkalischem, stimmt aber mit der von *Reichel* und *Neeff* überein.

3. Die Wirkung der Gallensäure auf das Zitrikodehydrasesystem der Leber wurde studiert. Gallensäure wirkt auf die Zitronensäurespaltung stark hemmend ein. Die Hemmung tritt bei pH 8.2 am stärksten hervor, also gerade bei der optimalen H^+ -Ionenkonzentration für die Fermentwirkung. Die Menge der zugesetzten Cholsäure ist nicht von bedeutendem Einfluß, soweit der pH-Wert von 8.2 abweicht.

4. Azetondikarbonsäure wird durch Leberbrei nicht angegriffen. Dieses Resultat stimmt mit dem von *Langecker* völlig überein. Der Zitratabbau beim fermentativen Vorgang kann also nicht über Azetondikarbonsäure vor sich gehen.

Literatur.

- Battelli, F.* u. *Stern, L.*, B. Z. 31, 478, 1911, 34, 263, 1911 u. 67, 443, 1914. — *Bernheim, F.*, Bioch. J. 22, 1178, 1928. — *Fürth, O.*, *Minnibeck H.* u. *Edel, E.*, B. Z. 269, 379, 1934. — *Hahn, A.* u. *Haarmann, W.*, Z. f. Biol. 89, 332, 1929. — *Kometiani, P.A.*, Z. f. analyt. Chemie 86, 359, 1931. — *Langecker, H.*, B. Z. 273, 43, 1934. — *Martius, C.* u. *Knoop, F.*, Z. physiol. Chem. 246, 1, 1937. — *Martius, C.*, Z. physiol. Chem. 247, 104, 1937. — *Reichel, L.* u. *Neeff, A.*, Z. physiol. Chem. 240, 163, 1936. — *Thunberg, T.*, Skand. Archiv Physiol. 24, 72, 1911 u. 40, 1, 1920. — *Wieland, H.* u. *Sonderhoff, R.*, Ann. der Chemie 499, 213, 1932 u. 503, 61, 1933. — *Wagner-Jauregg Th.* u. *Rauen, H.*, Z. physiol. Chem. 233, 215, 1935.
-