

DIE WIRKUNG DES ACETAZOLAMIDS UND EINGER VERWANDTER SULFONAMIDE AUF HARNSTOFFSYNTHESE UND GLUTAMINASE—I.

AKTIVITAT *IN VITRO*

E. GÖRES, P. LANGE und A. FÄHNDRICH

Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Humboldt-Universität Berlin
und if
Institut für Pharmakologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften Berlin-Buch

(Received 5 September 1964; accepted 26 October 1964)

Abstract—The effect of a number of sulphonamide derivatives was studied on the synthesis of urea and on the activity of the enzyme glutaminase *in vitro*. Most of the sulphonamides raised the formation of urea production in liver slices and in isolated mitochondria, but did not influence the activity of arginase. All the sulphonamides except hydrochlorothiazide raised the activity of glutaminase I. The results are discussed in connection with the side-effects produced by the administration of sulphonamides in patients with a diseased liver.

EINE Beeinflussung des Ammoniakstoffwechsels unter Acetazolamidgabe ist klinisch und tierexperimentell nachgewiesen. So können Leberkranke während der Behandlung mit Acetazolamid (A) Symptome entwickeln, die einem Coma hepaticum ähnlich sind. Dabei wird mitunter eine Erhöhung der Ammoniakkonzentration im Blut beobachtet.^{11, 30, 33} Zur Erklärung solcher Befunde sind prinzipiell drei Mechanismen denkbar: 1. Eine vermehrte Desaminierung verschiedener Aminosäuren, 2. eine verminderte Entgiftung des im Stoffwechsel anfallenden Ammoniaks über den Harnstoffzyklus in der Leber, 3. eine verminderte Eliminierung von Ammoniumionen mit dem Harn. Eine verminderte Ammoniumelimination im Harn könnte Folge der Ausscheidung eines alkalischen Harns sein, was unter der Wirkung der Carboanhydrasehemmer der Fall ist.²⁸ Damit wäre der erhöhte Ammoniakspiegel des Blutes eine indirekte Folge der Carboanhydrasehemmung durch das A oder ähnliche Substanzen. Zu dieser Feststellung gelangen auch Berry und Mitarb.⁷ und Posner und Mitarb.²⁵ Einige Autoren erklären die geringere NH₃-Elimination im Harn unter A mit einer herabgesetzten NH₃-Bildung als Folge der Hemmung der Nierenglutaminase durch das A(5). Allerdings wird an Ratten trotz des alkalischen Harns bei chronischer A-Gabe eine vermehrte NH₃-Ausscheidung beobachtet.^{27, 31} Auch am Hund konnte nach einmaliger A-Applikation eine erhöhte Ammonium-eliminierung mit dem Harn festgestellt werden.²⁴ Diese Beobachtung wird von Seldin und Mitarb.³¹ mit einer erhöhten Aktivität der Glutaminase I unter A erklärt.

In diesem Zusammenhang werden unsere eigenen Arbeiten von Bedeutung, nach denen es bei Ratten gelingt, die Toxizität von exogen zugeführten Ammoniumsalzen durch Vorbehandlung mit A oder einigen anderen Carboanhydrasehemmern sogar

herabzusetzen.²⁰ Bei diesen Versuchen konnten wir die paradox erscheinende Beobachtung machen, dass unter A der Blutspiegel an freien Ammoniumionen bei Ratten ansteigt. Wir haben uns daher mit verschiedenen Bildungs- und Entgiftungsmechanismen des NH₃ unter A beschäftigt. Über die Beeinflussung der Harnstoffsynthese und der Aktivität der Glutaminase I *in vitro* soll hier berichtet werden.

METHODIK

1. Anfertigung von Gewebeschnitten, Homogenaten, Mitochondrien-Gewinnung.

Die Herstellung der Gewebeschnitte erfolgte mit einer Rasierklinge aus freier Hand. Pro Ansatz wurden 3 Schnitte mit einem Frischgewicht von 150–200 mg verwendet. Zur Herstellung eines 10 %igen Homogenats wurden die Lebern männlicher Ratten in isotoner Sucroselösung im Ganzglashomogenisator nach Potter und Elvehjem²⁶ homogenisiert. Aus dem Homogenat haben wir durch fraktionierte Zentrifugation nach Schneider³² die Mitochondrien gewonnen, wobei die Mitochondrienfraktion zweimal mit isotoner Sucroselösung gewaschen wurde. In den Ansätzen war eine Mitochondrienmenge enthalten, die 200 mg Frischgewebe entsprach.

2. Herstellung der Fermentextrakte; Bestimmung der Fermentaktivitäten.

(a) Harnstoffsynthese: Die Harnstoffbildung an Rattenleberschnitten und Mitochondrien wurde in 3 ml Krebs-Henseleit-Medium¹⁸ verfolgt. Als Inkubationsgefässe dienten normale Warburggefässe. Als Substrat haben wir α -Ketoglutarat und Zitrullin zugesetzt. Die Substrate wurden ebenso wie die Sulfonamide vor ihrem Zusatz zum Medium an der Glaselektrode auf pH 7,4 eingestellt. Nach 60 min Inkubation bei 37° wurden die Schnitte im Inkubationsmedium homogenisiert, das Protein mit 0,3 ml 2 %iger Essigsäure gefällt, für 3 min auf 100° erhitzt und nach Zentrifugieren im klaren Überstand der Harnstoff bestimmt. Die Mitochondrienansätze haben wir auf die gleiche Weise enteiweißt und im klaren Überstand den Harnstoff bestimmt. Dabei bedienten wir uns der kolorimetrischen Methode nach Archibald.¹ Durch Vergleichsreihen, die neben einer bestimmten Harnstoffmenge A enthielten, konnte ausgeschlossen werden, dass A die Harnstoffbestimmung stört. Um aber auch sicher zu sein, dass eine aus dem A während der Inkubation entstandene Substanz nicht die Harnstoffbestimmung beeinflusst, wurde der gebildete Harnstoff in einigen Versuchen mit der Urease-Methode bestimmt. Dabei verwendeten wir ein Arginase-freies Urease-Präparat. In Anlehnung an die bei Bergmeyer⁶ gegebenen Richtlinien wurde der Mitochondrienansatz nach 1 Stunde Inkubation bei 37° mit 4 %iger Perchlorsäure enteiweißt, und nach Ausfällen des Kaliumperchlorats wurden 2 ml des klaren Filtrates mit 10 ml Ureaslösung inkubiert. Die gebildete Menge NH₃ haben wir mit Nessler's Reagenz wie unten beschrieben bestimmt.

(b) Arginase-Aktivität: Die Arginase-Aktivität ist an einem Extrakt von Rattenlebern bestimmt worden. Dieser Extrakt wurde in Anlehnung an das Vorgehen von Greenstein u. Mitarb.¹² gewonnen. Jeder Ansatz enthiel 1,0 ml Fermentextrakt; als Medium diente ein Gemisch aus 0,4 ml, 0,15 M Phosphatpuffer pH 8,0; 0,5 ml einer 0,2 %igen Mangansulfatlösung und 1,0 ml einer 0,2 %igen Arginin-Hydrochlorid-Lösung. Nach 60 Min Inkubation bei 37° wurde der gebildete Harnstoff mit der Methode von Archibald¹ bestimmt.

(c) Glutaminase-I-Aktivität: Die Aktivität der Phosphat-aktivierbaren Glutaminase (Glutaminase I) wurde an Rattenlebermitochondrien und an einem nach Errera¹⁰

gewonnenen Extrakt aus Rattenleber bestimmt. An diesem Extrakt war nicht die durch Pyruvat aktivierbare Desaminierung des Glutamins festzustellen, er enthielt also keine Glutaminase II. Die Inkubation erfolgte in Warburggefäßen bei 37° für 60 min. Als Medium diente 0,02 M Tris- oder 0,02 M Phosphatpuffer, das Glutamin in einer Endkonzentration von 1×10^{-2} M enthielt. Die in den Tabellen und Abbildungen angegebenen Konzentrationen der Sulfonamide bezeichnen ebenfalls Endkonzentrationen im Versuchsansatz. Als Mass der Aktivität von Glutaminase I diente das freigesetzte Ammoniak oder die entstandene Glutaminsäure. Die Ammoniakbestimmung wurde nach der Methode von Braganca u. Mitarb.⁸ vorgenommen. Die Glutaminsäurebestimmung erfolgt enzymatisch mit gereinigter Glutamat-Dehydrogenase der Fa. Boehringer & Soehne Mannheim nach den bei Bergmeyer⁶ gegebenen Richtlinien. A beeinflusste nicht die Bestimmungsmethode.

3. Proteinbestimmung: Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Lowry²³ mit dem Folinischen Phenolreagenz vorgenommen.

ERGEBNISSE

1. Harnstoffbildung und Arginase-Aktivität unter A in vitro

Aus Tab. 1 ist ersichtlich, dass es unter A in Leberschnitten zu einer statistisch signifikanten Mehrbildung von Harnstoff kommt. Jedoch ist die Neubildung von

TABELLE 1. HARNSTOFFSYNTHESЕ IN LEBERSCHNITTEN

Nr.	Ansatz	µg Harnstoff/ 100 mg Gewebe	Streuung s =	Vers.- zahl n =	Überschreit.- wahrschein- lichkeit p =
1	ohne Inkubation	4,6	± 1,3	5	
2	α -Ketoglutarat 10^{-2} M	21,9	± 5,2	10	1 %
3	α -Ketoglutarat 10^{-2} M Zitrullin 10^{-2} M	90,9	± 16,3	5	$< 0,1\%$
4	α -Ketoglutarat 10^{-2} M Zitrullin 5×10^{-3} M	66,8	± 12,2	4	$< 0,1\%$
5	α -Ketoglutarat 10^{-2} M Acetazolamid 5×10^{-3} M ohne Leberschnitte	4,1	± 0,6	4	
6	α -Ketoglutarat 10^{-2} M Acetazolamid 5×10^{-3} M	35,8	± 6,8	8	$< 0,1\%$
7	α -Ketoglutarat 10^{-2} M Acetazolamid 5×10^{-4} M	28,4	± 0,4	4	2 %
8	α -Ketoglutarat 10^{-2} M Acetazolamid 1×10^{-4} M	23,1	± 0,8	4	$> 5\%$

Inkubation bei 37° für 60 Min., pro Ansatz 3 ml Krebs-Henseleit-Medium Die Ansätze 2 bis 4 wurden statistisch mit Nr. 1 verglichen; 6 bis 8 wurden mit Nr. 2 verglichen.

Harnstoff unter A in jedem Fall geringer als bei Zitrullinzusatz. Ähnliche Ergebnisse lassen sich an Lebermitochondrien gewinnen (Tab. 2). Eine eventuelle Störung der Harnstoffbestimmung durch das A wurde in Vergleichsreihen ausgeschlossen. Um aber einen spezifischen Harnstoffnachweis zu führen, bedienten wir uns in einigen Versuchen der Urease-Methode. Hierbei ergaben sich die gleichen Ergebnisse wie mit der kolorimetrischen Harnstoffbestimmung (Tab. 2). Sulfanilamid hat prinzipiell die gleiche Wirkung wie A. Auch das von uns als wirksames Diuretikum erkannte

TABELLE 2. HARNSTOFFSYNTHESE AN RATTENLEBERMITOCHONDRIEN

Nr.	Ansatz	μg Harnstoff/ 25 mg Mitochondrien- protein	Streuung s =	Ver- suchs- zahl n =	Überschreit- wahrschein- lichkeit p =
1	ohne Inkubation	4,3	± 0,6	6	
2	α-Ketoglutarat 10^{-2} M	36,5	± 1,1	11	$< 0,1\%$
3	α-Ketoglutarat 10^{-2} M Acetazolamid 1×10^{-3} M	64,9	± 2,7	6	$< 0,1\%$
4	α-Ketoglutarat 10^{-2} M Acetazolamid 1×10^{-4} M	51,6	± 1,7	6	$< 0,1\%$
5	α-Ketoglutarat 10^{-2} M Acetazolamid 1×10^{-5} M	37,6	± 1,8	4	$> 5\%$
6	α-Ketoglutarat 10^{-2} M Siccramid 1×10^{-3} M	65,9	± 1,3	5	$< 0,1\%$
7	α-Ketoglutarat 10^{-2} M Siccramid 1×10^{-4} M	53,3	± 1,9	5	$< 0,1\%$
8	α-Ketoglutarat 10^{-2} M Siccramid 1×10^{-5} M	42,9	± 3,1	4	$> 5\%$
9	α-Ketoglutarat 10^{-2} M Hydrochlorothiazid 1×10^{-3} M	29,9	± 2,6	6	$< 0,1\%$
10	α-Ketoglutarat 10^{-2} M Sulfanilamid 1×10^{-3} M	69,2	± 0,8	4	$< 0,1\%$
11	α-Ketoglutarat 10^{-2} M Sulfanilamid 1×10^{-4} M	53,1	± 0,5	4	$< 0,1\%$
12	α-Ketoglutarat 10^{-2} M Zitrullin 10^{-3} M	121,8	± 1,1	4	$< 0,1\%$
Harnstoffsynthese in Rattenlebermitochondrien, Harnstoffbestimmung mit Urease					
13	α-Ketoglutarat 10^{-2} M	27,2	± 2,3	6	
14	α-Ketoglutarat 10^{-2} M Acetazolamid 1×10^{-3} M	88,0	± 3,4	6	$< 0,1\%$
15	α-Ketoglutarat 10^{-2} M Zitrullin 1×10^{-3} M	130,0	± 7,8	4	$< 0,1\%$

Inkubation bei 37° für 60 Min. Ansatz Nr. 2 wurde statistisch mit 1 verglichen; Nr. 3–12 wurden mit 2 verglichen, 14 und 15 mit Nr. 13.

TABELLE 3. ARGINASEAKTIVITÄT

Ferment	Substrat	Sulfonamid	μg gebildeter Harnstoff nach 60 Min. Inkubat.	Ver- suchs- zahl n =
—	Arginin	—	5,4	4
1 ml	Arginin	—	48,7	4
—	Ornithin	—	11,0	4
—	—	Acetazolamid 5×10^{-3} M	2,0	3
1 ml	—	Acetazolamid 5×10^{-3} M	25,0	3
1 ml	Ornithin	—	42,5	3
1 ml	Arginin	—	1886 (\pm 193)	13
1 ml	Arginin	Acetazolamid 5×10^{-3} M	1737 (\pm 114)	13
1 ml	Arginin	Hydrochlorothiazid 1×10^{-3} M	1862 (\pm 74)	4
Das Ferment wurde 20 Min. ohne Substrat vorinkubiert				
1 ml	Arginin	—	1603 (\pm 143)	12
1 ml	Arginin	Acetazolamid 5×10^{-3} M	1597 (\pm 103)	12

Geprüft an einem Fermentextrakt aus Rattenleber; Substrat L-Argininhydrochlorid; Inkubation 60 Min. bei 38° .

Siccamid [2-(4(Chlorbenzolsulfonamido)-1, 3, 4-Thiodiazol-5-Sulfonamid]^{13, 19} bewirkt an Rattenlebermitochondrien eine signifikante Steigerung der Harnstoffsynthese. Das gilt dagegen nicht für das Hydrochlorothiazid. Hier ist im Gegenteil eine Hemmung festzustellen. Diese Inhibierung könnte nach unseren früheren Arbeiten¹⁴ mit einer verminderten Bereitstellung von ATP für die Harnstoffsynthese gedeutet werden.

TABELLE 4A. GLUTAMINASE-I-AKTIVITÄT

Mito- chondri- en	Substrat	Sulfonamid bzw. andere Substanzen	μg NH ₃	Streuung S =	Vers.- zahl n =	Überschr. wahrsch.- lichkeit P =
1 ml	Glutamin 10 ⁻² M	—	71,4	± 2,7	7	
1 ml	Glutamin 10 ⁻² M Bromsulphalein 1 × 10 ⁻³ M	32,0	± 4,4	4		< 0,1 %
—	Glutamin 10 ⁻² M Acetazolamid 5 × 10 ⁻³ M	4,7	± 1,2	4		< 0,1 %
1 ml	Glutamin 10 ⁻² M Acetazolamid 5 × 10 ⁻³ M	202,0	± 7,4	4		< 0,1 %
1 ml	Glutamin 10 ⁻² M Acetazolamid 1 × 10 ⁻³ M	152,0	± 3,0	5		< 0,1 %
1 ml	Glutamin 10 ⁻² M Acetazolamid 1 × 10 ⁻⁴ M	95,0	± 4,1	4		< 0,1 %
1 ml	Glutamin 10 ⁻² M Sulfanilamid 1 × 10 ⁻³ M	153,0	± 8,3	4		< 0,1 %
1 ml	Glutamin 10 ⁻² M Saponin 5 mg/Ansatz	62,9	± 2,8	4		> 5,0 %
1 ml	Glutamin 10 ⁻² M Saponin 5 mg/Ansatz	193,0	± 7,4	4		< 0,1 %
	Acetazolamid 5 × 10 ⁻³ M					

An Rattenlebermitochondrien. Bestimmung des aus Glutamin freigesetzten NH₃ mit Nessler's Reagenz; Inkubation 60 Min. bei 37° 1 ml Mitochondriensuspension entspricht der Mitochondriエンmenge aus 2 g frischem Lebergewebe.

TABELLE 4B. GLUTAMINASE-I-AKTIVITÄT

Extrakt	Substrat	Sulfonamid bzw. andere Substanzen	μg NH ₃	Streuung S =	Vers.- zahl n =	Überschr. wahrsch.- lichkeit P =
—	—	—	27,7	± 4,5	9	
1 ml	Glutamin 10 ⁻² M	—	85,9	± 3,5	9	< 0,1 %
1 ml	Pyruvat	—	34,9	± 6,3	4	> 5 %
1 ml	5 × 10 ⁻³ M	—	13,0	± 2,3	4	> 5 %
—	Glutamin 10 ⁻² M Acetazolamid 5 × 10 ⁻³ M	167,0	± 38,6	4		< 0,1 %
1 ml	Glutamin 10 ⁻² M Acetazolamid 5 × 10 ⁻³ M	144,0	± 22,6	4		< 1,0 %
1 ml	Glutamin 10 ⁻² M Acetazolamid 5 × 10 ⁻⁴ M	86,7	± 6,4	4		> 5 %

Am Rattenleberextrakt, NH₃-Bestimmung mit Nessler's Reagenz. 1 ml Fermentlösung entspricht 22 mg Protein; Inkubation 60 Min. bei 37°.

Zur Klärung der Frage, ob eine direkte Beeinflussung von Fermenten des Harnstoffzyklus durch A vorliegt, wurde von uns zunächst die Aktivität der Arginase bestimmt. Um möglichst viele andere fermentative Reaktionen auszuschliessen, haben wir mit einem Arginase-Extrakt aus Rattenleber nach Greenstein u. Mitarb.¹² gearbeitet. Hierbei ergab sich keine Beeinflussung der Arginase-Aktivität durch A (Tab. 3). Auch eine Vorinkubation des Leberextraktes ohne Substrat liess keine Beeinflussung der Aktivität durch A erkennen.

2. Glutaminase-Aktivität unter dem Einfluss von Acetazolamid

Die erhöhte Harnstoffsynthese unter A könnte mit einer vermehrten Bereitstellung von Vorstufen erklärt werden. Hier kommen erhöhtes CO_2 -Angebot als Folge der Carboanhydrasehemmung, aber auch nach den eingangs zitierten Arbeiten Ammoniak in Frage. Da Glutamin als ein wesentlicher Stickstofflieferant für die Harnstoffsynthese angesehen wird, wurde von uns seine Desaminierung unter dem Einfluss verschiedener Sulfonamide untersucht. Tab. 4 a zeigt die Aktivität der Glutaminase I. Man erkennt eine konzentrationsabhängige Steigerung der Ammoniakbildung unter A. Als Vergleich wurde der bekannte Hemmer der Glutaminase I, das Bromsulphalein, mit in die Versuche einbezogen.²⁹ Um auszuschliessen, dass es sich um einen Membraneneffekt des A an den Mitochondrien handelt, wie er etwa an Erythrocyten gezeigt wurde,^{15, 16} haben wir die Glutaminase I-Aktivität unter Saponinzusatz bestimmt. Auch hier zeigte sich eine gesteigerte Desaminierung des Glutamins unter A. Die gleichen Ergebnisse lassen sich auch an einem Fermentextrakt der Rattenleber, der keine Pyruvataktivierbare Glutaminase enthält, erzielen (vgl. Tab. 4). In der Abb. 1 ist die Abhängigkeit der Glutamin-Desaminierung von der Fermentkonzentration dargestellt. Verwendet wurde auch hier ein Glutaminase II-freier Extrakt aus Rattenleber in der Präparation nach Errera.¹⁰ In diesen Versuchen wurde die gebildete Glutaminsäure mit gereinigter Glutamat-Dehydrogenase bestimmt. Jedem eingezeichneten Punkt der Abb. 1 liegen Mittelwerte aus 3 Ansätzen zugrunde. Man erkennt, dass Ferment allein und A + Ferment praktisch keine Glutaminsäure bilden, wie zu erwarten war.

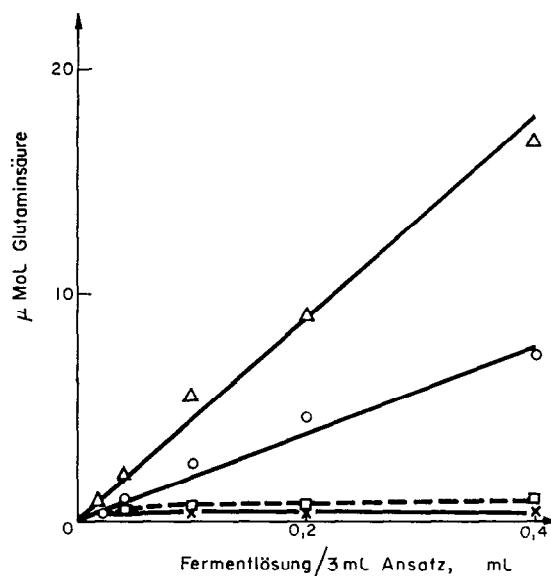


ABB. 1. Glutaminsäurebildung nach verschiedenen Konzentrationen Glutaminase I; Inkubation 60 Min. bei 37°. 0,4 ml Fermentlösung entsprechen 10 mg Protein. Bestimmung der Glutaminase mit Glutamatdehydrogenase.

- ×—× Ferment (Rattenleberextrakt nach Errera (10))
- Ferment und Acetazolamid 5×10^{-3} M
- Ferment und Glutamin 1×10^{-2} M
- △—△ Ferment und Glutamin 1×10^{-2} M und Acetazolamid 5×10^{-3} M

Erst das Vorhandensein von Ferment, Glutamin + A gibt die starke Glutaminsäurebildung, wie sie die obere Kurve der Abb. 1 zeigt.

In Abb. 2 ist die pH-Abhängigkeit der Glutamin-Desaminierung von Rattenlebermitochondrien dargestellt. Die gebildete Glutaminsäure wurde wieder fermentativ bestimmt. Die erhöhte Glutaminsäurebildung unter A zeigt die gleiche pH-

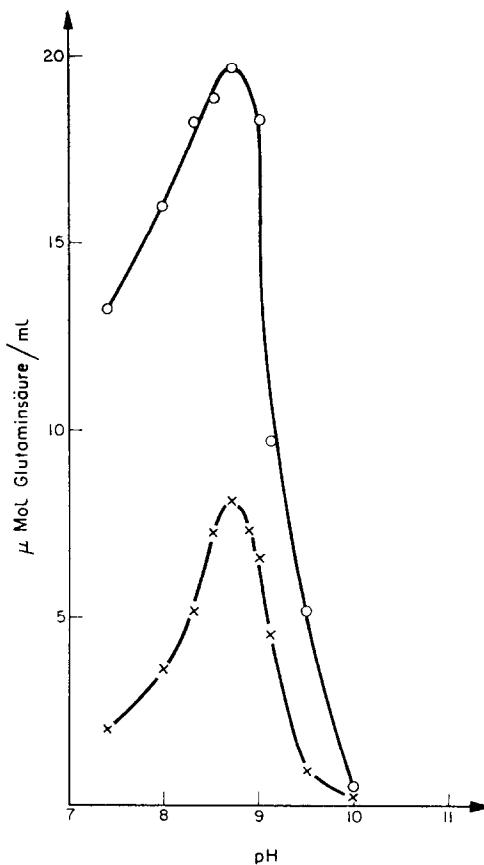


ABB. 2. pH-Abhängigkeit der Glutaminase I-Aktivität an Rattenlebermitochondrien. Inkubation 1 Std. bei 37°. Die Bestimmung der Glutaminsäurekonzentration erfolgte mit Glutamatdehydrogenase. Pro Ansatz sind Mitochondrien aus 200 mg Frischgewebe enthalten.

— x — x Mitochondrien und Glutamin 1×10^{-2} M

— o — o Mitochondrien und Glutamin 1×10^{-2} M und Acetazolamid 5×10^{-3} M

Abhängigkeit wie ohne A. Die Abhängigkeit der Glutaminase I-Aktivität von der Inkubationszeit geht aus Abb. 3 hervor. Man erkennt unter A eine wesentlich schnellere Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion als ohne das Sulfonamid. In Tab. 5 wurde der Fermentextrakt ohne Glutamin und Phosphat verschiedene Zeiten vorinkubiert. Nach dieser Vorinkubationsperiode haben wir Phosphat und L-Glutamin zugesetzt und nunmehr 60 min bei 37° inkubiert. Man erkennt, dass die Fermentaktivität in Abhängigkeit von der Vorinkubationszeit abnimmt. War dagegen bei der Vorinkubation A zugegen, so zeigt sich bis zu 40 min keine Abnahme der Glutaminase I-Aktivität. Erst ab 60 min Vorinkubationszeit kommt es zu einem wesentlichen Aktivitätsverlust.

TABELLE 5. AKTIVITÄT DER GLUTAMINASE I NACH VERSCHIEDENEN VORINKUBATIONSZEITEN. NACH DEN ANGEgebenEN VORINKUBATIONSZEITEN WURDE DER RATTENLEBEREXTRAKT IN GEGENWART VON L-GLUTAMIN UND PHOSPHAT ERNEUT FÜR 60 MIN BEI 37° INKUBIERT

Vorinkubationszeit in Minuten	Acetazolamid Mol/l	μMol gebildete Glutaminsäure nach 60 Min Inkubation
0	—	9,4
0	5×10^{-3}	18,1
5	—	8,7
5	5×10^{-3}	17,9
10	—	8,4
10	5×10^{-3}	17,7
20	—	3,3
20	5×10^{-3}	17,5
40	—	1,6
40	5×10^{-3}	17,0
60	—	0,8
60	5×10^{-3}	15,4
120	—	0,4
120	5×10^{-3}	6,4

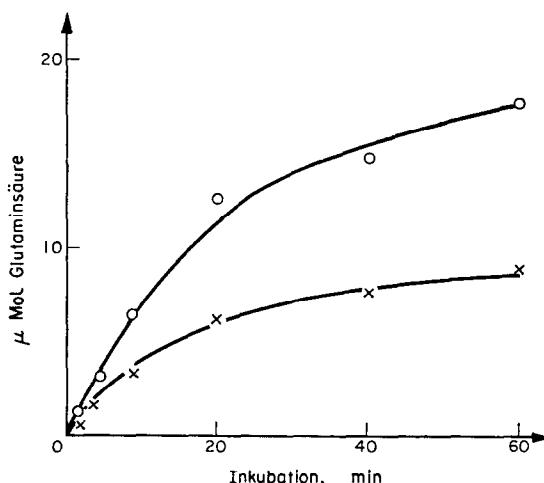


ABB. 3. Glutaminase I-Aktivität an einem nach Errera (10) hergestellten Rattenleberextrakt in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Pro Ansatz sind 10 mg Protein enthalten; die Inkubation erfolgte bei 37°.

Abscisse: Inkubationszeit

Ordinate: μMol gebildete Glutaminsäure; bestimmt mit Glutamatdehydrogenase

— x — x Glutaminase I; Substrat L-Glutamin 1×10^{-2} M

— ○ — ○ Glutaminase I; Substrat L-Glutamin 1×10^{-2} M und Acetazolamid 5×10^{-3} M

DISKUSSION

Aus unseren Versuchen geht klar hervor, dass es in Gegenwart von A zu einer vermehrten Harnstoffbildung in Leberschnitten und Mitochondrien kommt. Weiterhin konnten wir eine Aktivierung der Glutaminase I durch A und einige andere Sulfonamide nachweisen. Da das L-Glutamin NH₃ für die Harnstoffsynthese liefern

kann,^{2, 22} möchten wir annehmen, dass die Aktivierung der Glutaminase I der primäre Vorgang ist. Diese Annahme könnte auch zur Erklärung der Beobachtung herangezogen werden, dass man bei Ratten unter A einen erhöhten Blut-Ammoniak-Spiegel findet.²⁰ Dadurch wird gleichzeitig mehr freie Glutaminsäure verfügbar, die für eine Entgiftung von exogen zugeführten Ammoniumsalzen bereitsteht. Denn dass die Glutaminsäure der Hauptacceptor für die Ammoniakentgiftung ist, wird auch durch neuere Untersuchungen bestätigt.⁹ Damit könnte die von uns beobachtete Toxizitätsvermindernde Wirkung des A für exogen zugeführte Ammoniumsalze erklärt werden.^{16, 20}

Obwohl sicher ist, dass Glutamin als Stickstoffdonator für die Harnstoffsynthese dient, ist nach Untersuchungen von Archibald² und von Bach u. Smith⁴ unklar, welche Bedeutung die Glutaminase I für die Harnstoffsynthese hat.

Natürlich muss auch in Erwägung gezogen werden, dass eine direkte Beeinflussung der Fermente des Harnstoffzyklus durch A erfolgt. Die Arginase-Aktivität ist nach unseren Untersuchungen nicht verändert, was mit Befunden von Beaton⁵ übereinstimmt. Inwieweit das auch für die übrigen Fermente des Harnstoffzyklus zutrifft, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Die von uns erhobenen Befunde würden auch die Verschlechterung des Zustandes von Leberkrenken nach A-Gabe mit gleichzeitiger Erhöhung des NH₃ im Blut, wie sie häufig beschrieben wurde^{11, 30, 33} erklären. Bei solchen Patienten kann infolge des Leberschadens das vermehrt aus dem Glutamin freigesetzte NH₃ nicht in den Harnstoffzyklus eingehen.

Unsere Befunde widersprechen sich mit denen von Beaton.⁵ Er sieht an Rattenieren nach Vorbehandlung der Tiere mit A eine Hemmung der Glutaminase I. Die Glutaminase I der Leber war in seinen Versuchen nicht beeinflusst. Inwieweit diese Unterschiede mit der Vorbehandlung bei Beaton und unseren reinen *in vitro*-Versuchen zu erklären sind, lässt sich zur Zeit noch nicht sagen. Wir meinen aber, dass sowohl die pH-Abhängigkeit (Abb. 2), die Abhängigkeit der Glutaminsäurebildung von der Fermentkonzentration (Abb. 1) als auch die fermentative Bestimmung der gebildeten Glutaminsäure zwingend für unsere Versuchsergebnisse sprechen. Im übrigen weisen auch die Befunde von Seldin u. Mitarb.²⁴ in diese Richtung.

Es erhebt sich nun die Frage wie der Mechanismus der Aktivierung der Glutaminase I durch A, Sulfanilamid und Siccamid zu erklären wäre. Die Glutaminase I ist durch Phosphat und andere bivalente Anionen wie Sulfat und Arsenat aktivierbar.²⁹ Dabei wird nach den Vorstellungen von Roberts²⁹ das Phosphat an eine kationische Gruppe des Fermentes gebunden und die zweite negative Ladung des Phosphats tritt in Beziehung zum Glutamin. Möglicherweise kann das Acetazolamid diese Ionenfunktion übernehmen. Auch die Befunde der Tab. 5 sprechen in diesem Sinne. Hier zeigt sich, dass A in der Lage ist, die Inaktivierung des Fermentes bei seiner Inkubation ohne Substrat zu verzögern. Die gleichen Ergebnisse sind für das Phosphat beschrieben.^{17, 34} Dieses Problem kann aber erst nach weiteren Versuchen, vor allem unter Einbeziehung einer grösseren Zahl von Sulfonamiden, gelöst werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Harnstoffbildung unter Acetazolamid, Sulfanilamid und Siccamid und die Aktivität der Glutaminase I *in vitro* verfolgt.

Unter diesen Sulfonamiden kommt es in Rattenleberschnitten und isolierten Mitochondrien zu einer erhöhten Harnstoffbildung. Eine Ausnahme bildet das

Hydrochlorothiazid. Die Arginase-Aktivität wurde durch die geprüften Verbindungen nicht beeinflusst.

Die geprüften Sulfonamide mit Ausnahme des Hydrochlorothiazids steigern die Aktivität der Glutaminase I.

Die Befunde werden in Zusammenhang mit Nebenwirkungen des Acetazolamids bei Leberkranken diskutiert. Die Ursache für die Wirkung des A auf die Glutaminase wird in einer Hemmung der Inaktivierung des Fermentes gesehen.

LITERATUR

1. R. ARCHIBALD, *J. biol. Chem.* **157**, 507 (1945).
2. R. ARCHIBALD, *J. biol. Chem.* **157**, 519 (1945).
3. S. BACH, *Biochem. J.* **33**, 1833 (1939).
4. S. BACH und M. SMITH, *Biochem. J.* **64**, 417 (1956).
5. J. BEATON, *Canad. J. Biochem. Physiol.* **39**, 663 (1961).
6. H-U. BERGMAYER, *Methoden der enzymatischen Analyse; Verlag Chemie Weinheim/Bergstrasse* (1962).
7. J. BERRY, J. FLANAGAN, E. OWEN und M. TYOR, *Clin. Res.* **7**, 154 (1959).
8. B. BRAGANCA, J. QUASTEL und R. SCHUCHER, *Arch. Biochem.* **52**, 18 (1954).
9. G. DUDA und Ph. HANLER, *J. biol. Chem.* **232**, 303 (1953).
10. M. ERRERA, *J. biol. Chem.* **178**, 483 (1949).
11. G. GRABNER, H. KRYGICZ, A. NEUMAYR und H. PUXKANDL, *Wiener Z. inn. Med. Grenzgebiete* **41**, 81 (1960).
12. J. GREENSTEIN, W. JENRETTE und G. MIDER, *J. nat. Cancer Inst.* **1**, 687 (1941).
13. E. GÖRES und H. WEIMANN *Dtsch. Gesundheitswesen* **15**, 244, 1960().
14. E. GÖRES, *J. Pharmac. Toxicol. USSR* **26**, 192 (1963).
15. M. JACOBS, *J. gen. Physiol.* **25**, 539 (1942).
16. F. JUNG und P. LANGE, *Acta biol. med. german. Suppl.* II, 77 (1963).
17. J. KLINGMAN und P. HANLER, *J. biol. Chem.* **232**, 369 (1958).
18. H. A. KREBS und K. HENSELEIT, *HOPPE-SEYLERs, Z. physiol. Chem.* **210**, 33 (1932).
19. G. KÜHN, E. GÖRES, F. JUNG und G. HILGETAG, *Acta biol. med. german.* **3**, 574 (1959).
20. P. LANGE, D. BLASIEWSKI, E. GÖRES und F. JUNG, *Acta biol. med. german.* **13**, 369 (1964).
21. E. LEONARD und J. ORLOFF, *Am. J. Physiol.* **182**, 131 (1955).
22. F. LEUTHARDT und B. GLASSON, *Helv. chim. Acta* **25**, 630 (1942).
23. O. LOWRY, N. ROSEBROUGH, A. FARR und J. RANDALL, *J. biol. Chem.* **193** 265 (1951).
24. T. MAREN, B. WADSWORTH, E. YALE und L. ALSONO, *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **95**, 277 (1954).
25. J. POSNER und F. PLUM, *J. clin. Invest.* **39**, 1246 (1960).
26. V. POTTER und C. ELVEHJEM, *J. biol. Chem.* **114**, 495, (1936).
27. F. RECTOR, D. SELDIN, A. ROBERTS und J. CAPENHAVER, *Am. J. Physiol.* **179**, 353 (1954).
28. R. RICHTERICH, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **20**, 326 (1962).
29. E. ROBERTS, in: *The Enzymes*, second edition, vol. 4, Academic Press, New York and London (1960).
30. W. ROSENTHAL, A. DAWSON, J. DE GROOTE und S. SHERLOCK, *Gastroenterology* **33**, 268 (1957).
31. D. SELDIN, F. RECTOR und H. TENG, *Am. J. Physiol.* **189**, 551 (1957).
32. W. SCHNEIDER, *J. biol. Chem.* **176**, 259 (1948).
33. L. WEBSTER und CH. DAVIDSON, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **91**, 27 (1956).
34. W. WILLIAMS und L. MANSON, *J. biol. Chem.* **232**, 229 (1958).