

## DER EINFLUSS VON ACETALDEHYD AUF COENZYM A-AKTIVITÄT UND ATMUNG VON LEBER- UND HIRNMITOCHONDRIEN

H. P. T. AMMON, C.-J. ESTLER und F. HEIM

Pharmakologisches Institut der Universität Erlangen-Nürnberg

(Received 16 August 1966; accepted 3 November 1966)

**Abstract**—Two hr after the intravenous injection of 6 mg/g ethanol the tissues and mitochondria of the liver and brain contain only 13–22 per cent of their normal content of active CoA. Acetaldehyde decreased the content of active CoA in isolated mitochondria of the liver and of the brain. In the brain mitochondria only 7 per cent of the normal content of active CoA are found in the presence of 0.5  $\mu$ moles acetaldehyde/ml. In the liver mitochondria 9 per cent of the normal content of active CoA are found in the presence of 6.1  $\mu$ moles acetaldehyde/ml.

It is suggested that acetaldehyde combines with the thiolgroup of the CoA forming a semimercaptale, which does not take part in the transacetylating reaction in the test of Kaplan and Lipmann. With increasing concentrations of acetaldehyde the total respiration of the mitochondria of the liver and brain decreases. In the mitochondria of the liver the amount of acetaldehyde oxydation increases, while total respiration tends to decrease. Brain mitochondria, which contain less than 7 per cent of active CoA are able to maintain 23–46 per cent of their total respiration.

NACH intravenöser Verabreichung einer an weißen Mäusen narkotisch wirkenden Menge von 4 mg/g Äthanol wurde im Gehirn und in der Leber dieser Tiere eine starke Abnahme der transacetylierenden Eigenschaft des CoA beobachtet,<sup>1, 2</sup> die sehr wahrscheinlich auf der Bildung eines Semimercaptals zwischen der funktionellen SH-Gruppe des CoA und des beim Alkoholabbau entstandenen Acetaldehyds beruht.<sup>3</sup> Da die Abnahme an aktivem CoA um 90 Prozent mit keiner Senkung der Sauerstoffaufnahme der Tiere einherging und sich im Stoffwechsel von Hirn und Leber keine Zeichen fanden, die auf eine schwere Schädigung der Zellatmung hinwiesen,<sup>1, 2</sup> und nach Blockierung des CoA die Gewinnung von Oxydationsenergie über den Pentosephosphatzyklus in größerem Umfange unwahrscheinlich erschien, haben wir in dieser Arbeit Untersuchungen an Mitochondrien von Gehirn und Leber durchgeführt, die einen Einblick in die Beziehungen zwischen Atmungsgröße und CoA-Aktivität geben sollten. Denn bei Versuchen an Mitochondrien unter Verwendung von Pyruvat bzw. Acetaldehyd als Atmungssubstrat entfällt die Oxydation dieser Substrate über den Pentosephosphatzyklus. Sie können nur unter Beteiligung des CoA über die aktivierte Essigsäure, den Zitronensäurezyklus und die Atmungskette endoxydiert werden.

Frühere Untersuchungen über den Einfluß von Alkoholen und Aldehyden auf die Atmung von Schnitten und Mitochondrien aus Gehirn und Leber haben ergeben, daß Äthanol die Atmung von Leberschnitten wesentlich stärker herabsetzt als die von stimulierten Hirnschnitten.<sup>4</sup> Dagegen führt Acetaldehyd auch in Hirnmitochondrien und Hirnschnitten zu einer starken Abnahme der Atmung.<sup>5, 6</sup> Diese Versuche weisen bereits darauf hin, daß nicht der Alkohol selbst, sondern der daraus gebildete Acetaldehyd die Atmung hemmt. Sie wird deshalb in Gegenwart von Äthanol in Leberschnitten, die aufgrund ihres größeren Gehalts an Alkoholdehydrogenase mehr Acetaldehyd aus Alkohol zu bilden vermögen, stärker gehemmt als in Hirnschnitten, da Hirngewebe praktisch keine Alkoholdehydrogenase besitzt.<sup>8</sup> Der hemmende Einfluß von Acetaldehyd auf die Atmung von Hirnmitochondrien ist dann am größten, wenn Pyruvat als Atmungssubstrat verwendet wird,<sup>7</sup> ein Befund, der vermuten läßt, daß Acetaldehyd die Einführung von Pyruvat in den Zitronensäurezyklus blockiert.

#### METHODIK

Die Mitochondrien wurden aus Gehirn und Leber 200–250 g schwerer, männlicher, weißer Ratten des Stammes Sprague–Dawley gewonnen. Alle Arbeitsgänge der Mitochondrienpräparationen erfolgten bei  $+ 2 \pm 1^\circ$ . Leber und Gehirn wurden mit 9 Teilen 0,25 M Saccharoselösung nach Potter–Elvehjem homogenisiert und 10 min bei 600 g zentrifugiert. Der Überstand wurde 10 min bei 9000 g zentrifugiert, danach der Bodensatz mit 2 Teilen 0,25 M Saccharose/g Frischgewicht resuspendiert und 10 min bei 12,000 g abzentrifugiert. Die Lebermitochondrien wurden in isotoner KCl-, die Hirnmitochondrien in 0,25 M Saccharoselösung aufgenommen.

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs erfolgte in der Warburgapparatur bei  $37^\circ$  in Sauerstoffatmosphäre. Die  $\text{CO}_2$ -Absorption erfolgte durch 20%ige KOH-Lösung. Nach Zugabe von 0,5–1,0–5,0–10,0  $\mu\text{Mol}$  frischdestilliertem Acetaldehyd/ml Ansatz wurde 10 min äquilibriert. Als Kontrollen dienten Mitochondrienansätze ohne Acetaldehyd. Das Inkubationsmedium wurde in Anlehnung an Fisher<sup>9</sup> zusammengesetzt: Natriumpyruvat 0,02 M (in den Versuchen zur Bestimmung der Acetaldehydoxydation wurde das Pyruvat weggelassen), KCl 0,05 M,  $\text{MgSO}_4$  0,002 M, ATP 0,001 M, NAD  $2 \times 10^{-4}$  M, Niacinamid 0,01 M, Cytochrom *c*  $1 \times 10^{-5}$  M, Kaliumphosphatpuffer pH 7,35 0,02 M, Mitochondriensuspension 5–10 mg Protein enthaltend. Endvolumen des Ansatzes 3 ml.

Da sich die zugegebenen Acetaldehydmengen wegen des niedrigen Siedepunktes von Acetaldehyd zwischen flüssiger Phase und Gasphase verteilen, wurde in Parallelversuchen, die keine Mitochondrien enthielten, nach der Äquilibrierung je eine Probe des Ansatzes mit flüssiger Luft abgekühlt und anschließend die wahre Acetaldehydkonzentration nach Klein und Korzis<sup>10</sup> bestimmt. Die in den Abbildungen angegebenen Werte für Acetaldehyd beziehen sich auf die analytisch ermittelte Acetaldehydkonzentration. Der Berechnung des Sauerstoffverbrauchs in  $\mu\text{Atom O}_2/10 \text{ mg Mitochondrienprotein/Stunde}$  wurde die Sauerstoffverbrauchsmessung während der ersten 10 min zugrunde gelegt. Der in den Abbildungen angegebene Anteil der Pyruvatoxydation an der Gesamtatmung wurde aus der Differenz zwischen dem Gesamtsauerstoffverbrauch und dem bei der Oxydation von Acetaldehyd verbrauchten Sauerstoff errechnet. Die Bestimmung des Mitochondrienproteins erfolgte nach Beisenherz und Mitarbeiter.<sup>11</sup>

Die CoA-Aktivität wurde 20 min nach Zusatz von Acetaldehyd zu den Mitochondrienansätzen in dem aus den Ansätzen hergestellten Kochsaft ermittelt. Wegen der geringen CoA-Aktivität der Ansätze mit Hirnmitochondrien mußte deren Kochsaft vor dem enzymatischen Test im Vakuum eingeeengt werden. Als Kontrolle diente das gleiche Vorgehen mit definierten CoA-Aktivitäten, die dem Inkubationsmedium (ohne Mitochondrien) zugesetzt wurden. Zur Bestimmung der CoA-Aktivität wurde der von Tabor und Mitarbeiter<sup>12</sup> modifizierte Test von Kaplan und Lipmann<sup>13</sup> verwendet. Das Prinzip dieser CoA-Bestimmungsmethode beruht auf der Fähigkeit von CoA mit Hilfe eines transacetylierenden Systems aus Taubenleber in Gegenwart von ATP und Glutathion, Acetat auf *p*-Nitroanilin zu übertragen.

Aus Kontrollversuchen, in denen handelsüblichem CoA\* bei 37° eine entsprechende Menge Acetaldehyd zugesetzt wurde, geht hervor, daß die von uns beobachtete Abnahme der CoA-Aktivität in den Mitochondrienansätzen tatsächlich bei der Versuchstemperatur stattfindet und kein Kunstprodukt darstellt, das eventuell erst durch das Erhitzen bei der Bereitung des Kochsaftes entstehen könnte. Auch wurde durch Kontrollversuche gesichert, daß die theoretisch noch in den CoA-Testansatz gelangenden Aldehydmengen den Transacetylierungstest nicht beeinflussen.

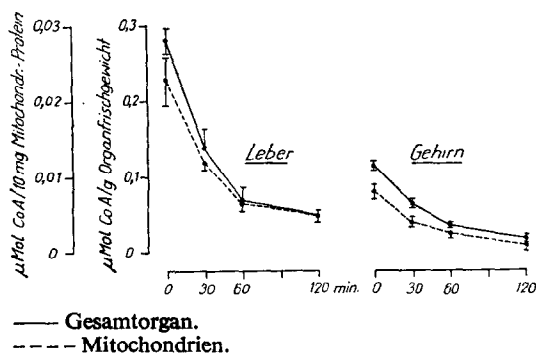
Mit der gleichen Methode zur Bestimmung der CoA-Aktivität wurde an weiblichen, weißen Mäusen des Stammes NMRI 30–60–120 min nach der intravenösen Injektion von 6 mg/g einer 20%igen (w/v) Alkohollösung die CoA-Aktivität im Kochsaft von Leber und Gehirn sowie in deren Mitochondrien ermittelt.

Die Mittelwerte aller Ergebnisse setzen sich aus 10–15 Einzelbestimmungen zusammen. Die statistische Überprüfung erfolgte mit Hilfe des *t*-Testes. Die Unterschiede der Mittelwerte in den einzelnen Gruppen wurden als signifikant angesehen wenn  $P \leq 0,05$ .

#### VERSUCHSERGEBNISSE

Wie aus Abb. 1 hervorgeht, nimmt *in vivo* bei weißen Mäusen nach der intravenösen Injektion von 6 mg/g Äthanol der Gehalt an aktivem CoA in Leber- und

ABB. 1. GEHALT AN AKTIVEM CoA IN LEBER UND GEHIRN SOWIE DEREN MITOCHONDRIEN BEI WEISSEN MÄUSEN NACH I.V. INJEKTION VON 6 MG ÄTHANOL/G



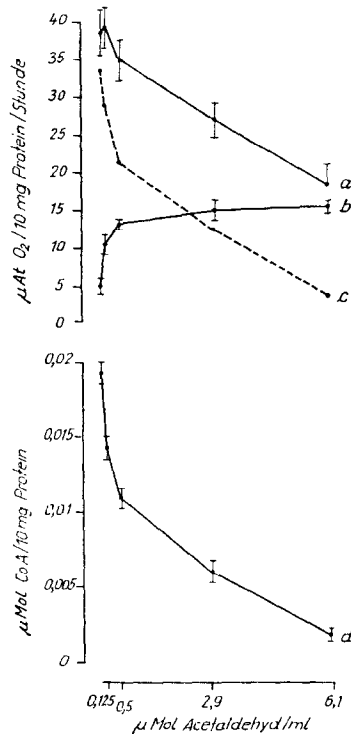
Hirngewebe sowie deren Mitochondrien kontinuierlich ab und beträgt nach 2 Stunden sowohl in den Gesamtorganen als auch in den Mitochondrien nur noch 13–22 Prozent des Ausgangswertes.

\* Fa. C. F. Boehringer & Soehne, Mannheim.

Die *in vitro* Versuche an Lebermitochondrien (Abb. 2) zeigen, daß der Gehalt an aktivem CoA mit steigenden Acetaldehydkonzentrationen abnimmt. Er beträgt in Gegenwart von 6,1  $\mu\text{Mol/ml}$  Acetaldehyd noch 9 Prozent des Ausgangswertes. Lebermitochondrien besitzen auch ohne Substratzusatz einen Sauerstoffverbrauch,

ABB. 2. EINFLUSS VON ACETALDEHYD AUF SAUERSTOFFVERBRAUCH UND CoA-AKTIVITÄT VON LEBERMITOCHONDRIEN

- a. Gesamtsauerstoffverbrauch,
- b. Sauerstoffverbrauch für die Aldehydoxydation,
- c. Sauerstoffverbrauch für die Pyruvatoxydation,
- d. Gehalt an aktivem CoA.



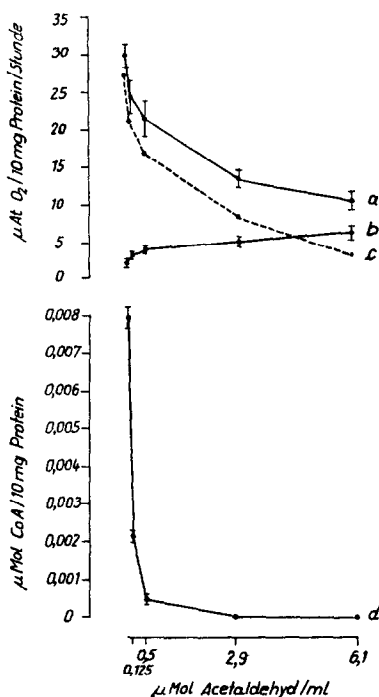
der—während 10 min gemessen—5  $\mu\text{Atom O}_2/10 \text{ mg Protein/Stunde}$  beträgt. Zugesezter Acetaldehyd wird durch die Lebermitochondrien oxydiert. Der  $\text{O}_2$ -Verbrauch steigt bis zu einer Acetaldehydkonzentration von 0,5  $\mu\text{Mol/ml}$  stark, bis zu 2,9  $\mu\text{Mol/ml}$  nur noch geringfügig und zwischen 2,9 und 6,1  $\mu\text{Mol/ml}$  nicht mehr an. Der Gesamtsauerstoffverbrauch der Lebermitochondrien wird durch 0,125–0,5  $\mu\text{Mol/ml}$  Acetaldehyd noch nicht signifikant beeinflusst. Er nimmt in Gegenwart von 2,9–6,1  $\mu\text{Mol/ml}$  dosisabhängig ab. Die Abnahme der Pyruvatatmung erfolgt fast proportional zu der an aktivem CoA.

Der Gehalt der Hirnmitochondrien an aktivem CoA (Abb. 3) nimmt schon in Anwesenheit von 0,5  $\mu\text{Mol/ml}$  Acetaldehyd auf 7 Prozent des Normalwertes ab. Hirnmitochondrien besitzen auch ohne Substratzusatz einen Sauerstoffverbrauch von 2,5  $\mu\text{Atom O}_2/10 \text{ mg Protein/Stunde}$ . Die Aldehydatmung ist—ebenfalls gemessen

während 10 min—gering. Sie beträgt bei einer Aldehydkonzentration von  $0,5 \mu\text{Mol/ml}$  und bei  $2,9 \mu\text{Mol/ml}$  etwa  $1/5$  der von Lebermitochondrien oxydierten Aldehydmengen. Die Gesamt- und Pyruvatatmung werden durch steigende Aldehydkonzentrationen zunehmend gehemmt. In Gegenwart von  $2,9 \mu\text{Mol}$  Acetaldehyd/ml erfolgt noch eine Sauerstoffaufnahme durch Hirnmitochondrien, obwohl mit der Methode von Kaplan und Lipmann aktives CoA nicht mehr nachzuweisen ist.

ABB. 3. EINFLUSS VON ACETALDEHYD AUF SAUERSTOFFVERBRAUCH UND COA-AKTIVITÄT VON GEHIRNMITOCHONDRIEN

- a. Gesamtsauerstoffverbrauch,
- b. Sauerstoffverbrauch für die Aldehydoxydation,
- c. Sauerstoffverbrauch für die Pyruvatoxydation,
- d. Gehalt an aktivem CoA.



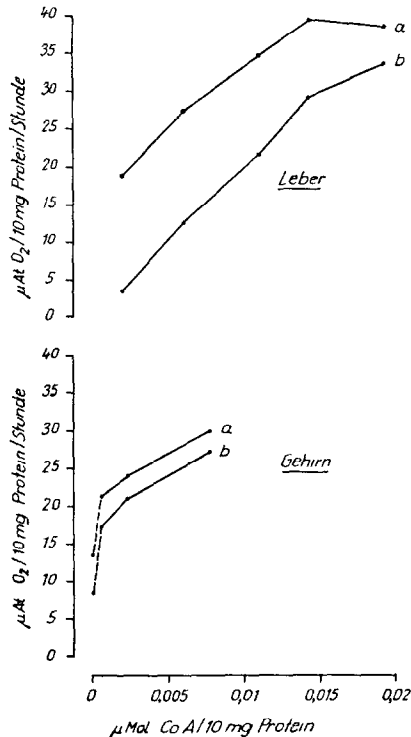
#### DISKUSSION

Die Abnahme des Gehalts an aktivem CoA in Leber- und Hirngewebe sowie in den Mitochondrien dieser Organe nach intravenöser Verabreichung von  $6 \text{ mg/kg}$  Äthanol (Abb. 1) ist nicht auf den Alkohol selbst, sondern auf den intermediär daraus entstandenen Acetaldehyd zurückzuführen. Wie von uns bereits an reinem CoA sowie an Leber- und Hirnhomogenaten nachgewiesen wurde<sup>3</sup> und sich aus den in Abb. 2 und 3 dargestellten Befunden an isolierten Mitochondrien aus Rattenleber und -gehirn ergibt, hemmt Acetaldehyd dosisabhängig die transacetylierenden Eigenschaften des CoA, indem es mit der funktionellen SH-Gruppe des Coenzym ein Semimercaptal bildet. Die Inaktivierung des CoA durch geringe Acetaldehydkonzentrationen ist in Leber- und Hirnmitochondrien etwa gleichgroß. Dabei wird

infolge des geringeren normalen CoA-Gehalts der Hirnmitochondrien im Vergleich zu dem der Lebermitochondrien, z.B. durch  $0,5 \mu\text{Mol/ml}$  Acetaldehyd, im Gehirn der normale CoA-Gehalt um 93 Prozent, in den Lebermitochondrien nur um 43 Prozent herabgesetzt.

ABB. 4. SAUERSTOFFVERBRAUCH VON MITOCHONDRIEN AUS LEBER UND GEHIRN IN ABHÄNGIGKEIT VON DEREN GEHALT AN AKTIVEM COA

- a. für die Gesamtoxydation (Pyruvat + Acetaldehyd),  
b. für die Pyruvatoxydation.



Der oxydative Abbau des Acetaldehyd zu Acetyl-CoA kann über die Dehydrierung des freien Aldehyd zu freiem Acetat und Bindung des Acetat an CoA erfolgen. Er könnte auch darin bestehen, daß die Mitochondrien den an die Thiolgruppen des CoA gebundenen Aldehyd zu Acetyl-CoA dehydrieren. Die Vermutung, daß dieser Weg möglich ist, wird gestützt durch die Befunde von Casier und Polet<sup>14</sup> sowie Schulmann, Zureck und Westerfeld,<sup>15</sup> daß markierter Äthylalkohol und Acetaldehyd in wesentlich größeren Mengen in Cholesterin und Fettsäuren eingebaut werden als Acetat.

Zwischen dem Gehalt an aktivem CoA einerseits und der Gesamt- und Pyruvatatmung andererseits, ergibt sich für Lebermitochondrien eine lineare, für Hirnmitochondrien eine exponentielle Beziehung (Abb. 4). Von Hirnmitochondrien wird selbst dann noch Pyruvat und Aldehyd veratmet, wenn mit Hilfe des Kaplan-Lipmann-Testes aktives CoA nicht mehr nachzuweisen ist (untere Grenze der Nachweisbarkeit  $0,0005 \mu\text{Mol}/10 \text{ mg Protein}$ ) (Abb. 4).

Acetaldehydkonzentrationen von 0,25–0,125  $\mu\text{Mol/ml}$ , die nach Beobachtungen von Hulpén, Clark und Oneyett<sup>16</sup> im menschlichen Blut bei einem Blutalkoholspiegel von 1,0–0,5 g/l gefunden werden, senken, wie aus Abb. 2 und 3 hervorgeht, signifikant den Gehalt der Leber- und Hirnmitochondrien an aktivem CoA. Sie führen nur in den Hirn- jedoch nicht in den Lebermitochondrien zu einer Abnahme der Atmung.

Die *in vivo* nach 6 mg/g Äthanol beobachtete Abnahme an aktivem Leber-CoA auf 22 Prozent des Ausgangswertes wird in isolierten Lebermitochondrien bei etwa 3,4  $\mu\text{Mol/ml}$  Acetaldehyd erreicht, einer Konzentration, die nach Abb. 2 die Gesamt- und Pyruvatatmung der Lebermitochondrien signifikant senkt. In der Leber ist deshalb erst nach Aufnahme verhältnismäßig hoher Alkoholdosen mit dem Auftreten von Acetaldehydmengen zu rechnen, die den Gehalt an aktivem CoA soweit reduzieren, daß es zur signifikanten Abnahme der Atmung kommt.

#### ZUSAMMENFASSUNG

In vorliegender Arbeit wurde bei weißen Mäusen der Einfluß einer intravenösen Injektion von 6 mg/g Alkohol auf den Gehalt an aktivem CoA von Leber und Gehirn sowie deren Mitochondrien untersucht.

An isolierten Mitochondrien von Rattenleber und -gehirn wurden in einem Medium, welches Pyruvat als Atmungssubstrat enthielt, Sauerstoffverbrauch und Gehalt an aktivem CoA in Gegenwart von 0,125–0,5–2,9–6,1  $\mu\text{Mol}$  Acetaldehyd/ml bestimmt.

1. Zwei Stunden nach der Alkoholinjektion beträgt der Gehalt an aktivem CoA von Leber- und Hirngewebe sowie von Leber- und Hirnmitochondrien 13–22 Prozent des Normalwertes.

2. Auch durch Acetaldehyd wird der Gehalt an aktivem CoA isolierter Leber- und Hirnmitochondrien stark herabgesetzt. In Hirnmitochondrien sind bei einer Acetaldehydkonzentration von 0,5  $\mu\text{Mol/ml}$  noch 7 Prozent, in Lebermitochondrien bei 6,1  $\mu\text{Mol/ml}$  noch 9 Prozent an aktivem CoA nachweisbar.

3. Sehr wahrscheinlich bildet der Acetaldehyd mit der funktionellen SH-Gruppe des CoA ein Semimercaptal, das im Kaplan-Lipmann-Test an der dem quantitativen Nachweis von CoA dienenden Transacetylierungsreaktion nicht mehr teilnimmt.

4. Mit steigender Aldehydkonzentration nimmt die Gesamtatmung der Leber- und Hirnmitochondrien ab. Der Anteil der Aldehydoxydation an der Gesamtatmung nimmt besonders in den Lebermitochondrien zu.

5. Hirnmitochondrien sind mit einem Gehalt an aktivem CoA unter 7 Prozent des Normalwertes noch imstande, 23–46 Prozent ihrer Gesamtatmung aufrecht zu erhalten.

*Anerkennung*—Wir danken Frl. H. Darweger für die gewissenhafte Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche.

#### LITERATUR

1. H. P. T. AMMON, C.-J. ESTLER und F. HEIM, *Archs int. Pharmacodyn. Thér.* **154**, 108 (1965).
2. H. P. T. AMMON, C.-J. ESTLER und F. HEIM, *Archs int. Pharmacodyn. Thér.* **159**, 258 (1966).
3. H. P. T. AMMON, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* **251**, 114 (1965).
4. J. H. QUASTEL, *Q. Jl. Alcohol* **20**, 428 (1959).
5. K. H. KIESSLING, *Exp. cell. Res.* **27**, 367 (1963).
6. E. MAJCHROWICZ, *Can. J. Biochem.* **43**, 1041 (1965).

7. C. T. BEER and J. H. QUASTEL, *Can. J. Biochem. Physiol.* **39**, 531 (1958).
8. J. MARDONES, *Physiological Pharmacology*, p. 113. Academic Press, New York (1963).
9. G. L. FISCHER, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **90**, 153 (1955).
10. H. KLEIN und J. KORZIS, *Die Medizinische* **1**, 345 (1958).
11. G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADE, E. MEYER-ARENDT und G. PFLEIDERER, *Z. Naturforsch.* **8b**, 555 (1953).
12. H. TABOR, A. MEHLER and E. STADTMANN, *J. biol. Chem.* **204**, 127 (1953).
13. N. O. KAPLAN and F. LIPMANN, *J. biol. Chem.* **147**, 37 (1948).
14. H. CASIER and H. POLET, *Archs int. Pharmacodyn Thér.* **120**, 498 (1959).
15. M. P. SCHULMAN, R. ZUREK and W. W. WESTERFELD, *Am. Assoc. Advmt. Sci. Washington D.C.* No. 47, 29 (1957).
16. H. R. HULPIEU, W. C. CLARK and H. ONYETT, in *Drill's Pharmacology in Medicine*, p. 218. McGraw-Hill, New York (1965).