

DIE DEMETHYLIERUNG VON AMINOPHENAZON UND CODEIN IN DER LEBER DES MENSCHEN

EINE UNTERSUCHUNG ÜBER DEN MIKROSOMALEN ELEKTRONENTRANSPORT

ELSE ACKERMANN

Institut für Pharmakologie der Medizinischen Akademie "Carl Gustav Carus" in Dresden
DDR, Abteilung für Klinische Pharmakologie

(Received 29 September 1969; accepted 2 December 1969)

Abstract—The activity of the mixed function oxidases and microsomal electron transport was determined in the microsomal fraction of human liver for aminophenazone and codeine. The microsomal fraction was contaminated with lysosomes and mitochondria.

The electron influx from the oxidative cytoplasmatic pentose pathway is lower in human liver than in rat liver. The V_{\max} of the glucose-6-phosphat/6-phosphogluconic acid dehydrogenase in the soluble fraction of human liver shows only 50% of the value found in the corresponding rat liver fraction. The NADPH-cytochrome *c* reductase has a lower reducing activity in the human microsomal fraction than in rat liver. The NADH-cytochrome *c* reductase represented mainly by the NADH-cytochrome *b*₅ reductase under the described experimental conditions, has lower V_{\max} in human than in rat liver. The molar concentrations of cytochrome *b*₅ and P 450 amount to only about 50% of the concentration found in rat liver. The spectral properties of both these cytochromes are identically with those of the rat. The difference spectrum with the ligand ethylisocyanid indicates spectral characteristics with pH dependent absorptions in the Soret region as described for other species.

The microsomal Fe_x (oxidized NADPH-acceptor) has in human microsomes the properties of a low spin hemoprotein. The V_{\max} of the substrates aminophenazone and codeine are lower in human liver microsomal fraction, but the K_m is ten and forty times greater respectively than in the rat. SKF-525A inhibits the aminophenazone-*N*-demethylation only at a concentration eight times greater than in rat liver to obtain an inhibition of the same degree between both species. On the contrary the codeine-*O*-demethylation of human microsomes is not inhibited up to a concentration of 0.8 mM. The female rat has a lower V_{\max} than the male rat. Though the V_{\max} of human individuals with both these substrates are not distinguished essentially from those of the female rat, the female rat has a lower K_m than human individuals but a greater K_m than the male rat. In spite of the similar V_{\max} the biological half life of aminophenazone of the female rat is only a half from that of men, but the twofold of the male rat.

DIE SAUERSTOFFÜBERTRAGUNG auf das lipophile Substrat ist das letzte Gied einer mikrosomalen Elektronentransportkette,^{1, 2} deren Enzyme in den *electron transferring vesicles* von anderen mikrosomalen Enzymen räumlich getrennt sind.³ Während über den mikrosomalen Elektronentransport der Ratten und anderer Tierspezies bereits viele Veröffentlichungen erschienen sind,^{1–8} gibt es über die mikrosomale Atemkette sowie ihre Beziehung zur Arzneimitteloxidation beim Menschen keine Angaben.

In einer früheren Veröffentlichung hatten wir bereits über die kleineren Maximalgeschwindigkeiten der NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase und der *N*- und *O*-Demethylase in der Mikrosomenfraktion der menschlichen Leber im Vergleich zur männlichen Ratte berichtet.⁹ Für 3,4-Benzpyren, Pentobarbital und 3-Methyl-4-aminoazobenzol hatten andere Autoren ebenfalls eine geringere, für Phenazetin dagegen eine größere Reaktionsgeschwindigkeit nachgewiesen.^{10, 11} Da sowohl die Maximalgeschwindigkeiten als auch die Michaelis-Menten Konstanten der von uns verwendeten zwei Substrate *N*-Monomethyl-*p*-nitroanilin und *p*-Nitroanisol keine allgemeingültigen Schlußfolgerungen über die Aktivität der mischfunktionellen Oxidasen zulassen, wurden in die weiteren Untersuchungen Aminophenazon und Codein mit einbezogen und die Michaelis-Menten Konstanten mit den beim Menschen längeren Halbwertszeiten in Beziehung gebracht. Die Untersuchungen über den mikrosomalen Elektronentransport werden ergänzt durch die Bestimmung der Maximalgeschwindigkeiten der NADH-Cytochrom-*c*-Reduktase und der molaren Konzentrationen der Funktionsproteine Cytochrom *b*₅ und P 450. Außerdem wird versucht, Aufschluß über den Bindungszustand des Eisens im Cytochrom P 450 und über die Beziehung der Hämgruppe zum Proteinanteil des Cytochroms zu erhalten.

METHODIK

1. Durchführung der Versuche und Material

Für die Bestimmung der Enzymaktivitäten diente menschliche durch Keilexzision operativ gewonnene Leber, aus der die Mikrosomenfraktion in der bereits beschriebenen Weise präpariert wurde.⁹ Verwendet wurde nur Leber von Patienten, die wegen eines unkomplizierten Gallensteinleidens cholezystektomiert wurden. Das Verhältnis des männlichen zum weiblichen Geschlecht betrug 1:3. Das Durchschnittsalter lag bei 46 Jahren. Die Mikrosomenfraktion der menschlichen Leber wies unter der angewendeten Fraktionierungstechnik eine besonders hohe lysosomale und mitochondriale Verunreinigung auf.⁹ Die Konstanz der Fraktionierungsbedingungen wurde in allen Versuchen mit einer Bilanzierung des Eiweißanteils aller Fraktionen überprüft. Dabei hatten die menschlichen Mikrosomen einen Anteil von 15.7%, die der männlichen Ratte von 18.5%, wenn man der Berechnung die im 10,000 g Niederschlag (Kerne, Mitochondrien, Lysosomen), 78,000 g Überstand (lösliche Fraktion) und Mikrosomen gefundenen Werte zugrundelegt. Der 78,000 g Niederschlag wurde nicht gewaschen, um eine Alteration spezifischer Eiweiß- oder Phospholipidstrukturen durch den Präparationsvorgang zu verhindern. Dadurch war die Mikrosomenfraktion beider Spezies mit Hämoglobin verunreinigt. Als Vergleich diente Leber männlicher bzw. weiblicher Wistarratten mit einem Gewicht zwischen 150 und 180 g, die in der gleichen Weise aufgearbeitet wurde.

2. Bestimmung der Aminophenazon-*N*- und Codein-*O*-Demethylierung

Die Ansätze enthielten Aminophenazon in einer Endkonzentration von 16 mM bzw. Codein von 20 mM. Das Inkubationsmedium bestand aus 0.05 M Trispuffer pH 7.4, in dem die Kofaktoren in folgender Endkonzentration gelöst waren:

NADPH 0.2 mM bzw. NADP 0.05 mM, Glukose-6-Phosphat 2 mM, MgSO₄ 5 mM und Nikotinamid 20 mM. Die Rückbildung des NADPH aus dem vorgegebenen oder im Verlauf der Reaktion entstandenen NADP erfolgte durch den 78,000 g Überstand, der den Ansätzen in einer Menge von 0.2 bis 0.4 ml zugegeben wurde.

Das entsprach einer NADPH-generierenden Aktivität von $30 \mu\text{M}/\text{mg}$ Protein/ml Ansatz/Minute. Versuchsansätze ohne das NADPH-generierende System enthielten NADPH in einer Endkonzentration von 1 mM . Um den Kofaktorverbrauch durch unspezifische Begleitreaktionen klein zu halten, wurde die Mikrosomenmenge auf eine Proteinkonzentration von 0.4 bis 0.8 mg bzw. 10 bis 20 mg Feuchtgewicht/ml Ansatz begrenzt und die Bedingungen einer Reaktion 0. Ordnung eingehalten. Gestartet wurde die Reaktion mit Mikrosomen in einem Volumen von 0.1 bis 0.4 ml und maximal 30 Minuten bei 37° inkubiert. Aus dem Inkubationsvolumen von 3 ml wurden 2 ml für die Formaldehydbestimmung entnommen. Reagentien wurden nach der von Nash angegebenen Methode angesetzt.¹² Als Eichlösung diente 35% iges Formaldehyd, deren genaue Konzentration iodometrisch ermittelt wurde.¹³ Die Semikarbazidkonzentration war 13.3 mM . Da Semikarbazid die Farbentwicklung verzögert,¹⁴ wurden die Inkubationsbedingungen so imitiert, daß die Formaldehydlösung die gleiche Semikarbazidkonzentration enthielt wie die Versuchsansätze. Der unter diesen Bedingungen ermittelte molare Extinktionskoeffizient für Formaldehyd war $0.735 \cdot 10^7 \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{Mol}^{-1}$. In jeder Versuchsreihe diente ein Formaldehydstandard als Kontrolle der Versuchsbedingungen.

3. Hemmung der Substratoxidation mit SKF 525-A

Um diese Verbindung in der geforderten Konzentration bei einem pH von 7.4 in Lösung zu bringen, mußte Tween 80 als Lösungsvermittler eingesetzt werden. Zu diesem Zweck wurde SKF 525-A in einer kleinen Menge Tween 80 vorgelöst und mit Puffer $1:100$ verdünnt. Von dieser Lösung wurden 0.2 ml dem Inkubationsansatz zugesetzt, sodaß Tween 80 $1:1500$ verdünnt wurde. Unter diesen Bedingungen waren weder eine durch den Lösungsvermittler hervorgerufene enzymatische Hemmung noch Aktivierung zu beobachten.

4. Bestimmung der NADH-Cytochrom *c*-Reduktase

Sie erfolgte, wie bereits für die NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase beschrieben.⁹ Elektronendonator war NADH in einer Endkonzentration von 0.2 mM . Die hohe Reaktionsgeschwindigkeit dieser Reduktase machte eine Verdünnung der Mikrosomenfraktion im Verhältnis $1:500$ notwendig, um eine Sättigungskinetik zu haben. Die optimale Proteinkonzentration lag bei 0.5 bis $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ Ansatz entsprechend 20 bis $40 \mu\text{g}$ Feuchtgewicht menschlicher Mikrosomen bzw. 10 bis $20 \mu\text{g}$ Rattenlebermikrosomen. Die Reduktion des Elektronenakzeptors Cytochrom *c* wurde bei 550 nm direkt spektrophotometrisch im Unicam SP 800 verfolgt und die Aktivität in Mol reduziertes Cytochrom *c* angegeben. Für die Berechnung wurde die Differenz der molaren Extinktionskoeffizienten des reduzierten und des oxidierten Cytochrom *c* eingesetzt.

Die Beziehung ergibt sich aus:

$$E = d \cdot c_{\text{red.}}(\text{red.-oxid.})$$

In der Gleichung bedeuten:

E = Meßgröße

d = Schichtdicke (1 cm)

$\text{red.-oxid.} = 19.6 \cdot 10^6 \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{Mol}^{-1}$

Da die NADH-Cytochrom *c*-Reduktase durch Kationen zu aktivieren ist,⁴ wurde als Inkubationsmedium 0.1 M Na-K-Phosphatpuffer pH 7.4 verwendet.

5. Bestimmung der Cytochrom P 450- und b_5 -Konzentrationen

Cytochrom P 450 wurde aus dem Differenzspektrum des mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ reduzierten Pigments nach Begasung mit CO aus einem generierenden System (conc. H_2SO_4 und HCOOH) für 1 Minute in Mikroküvetten mit einer Schichtdicke von 20 mm im Unicam SP 800 gemessen. Für die Differenz der Absorptionen zwischen 450 und 490 nm wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von $91 \cdot 10^6 \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{Mol}^{-1}$ ¹⁶ verwendet. Die Proteinkonzentration betrug für die Mikrosomen des Menschen ungefähr 0.7 mg/ml Ansatz und für die Ratte 1.0 bis 1.5 mg/ml.

Cytochrom b_5 wurde aus dem Differenzspektrum zwischen oxidiert und NADH reduzierter Form ermittelt.¹⁷ Die NADH-Endkonzentration war 0.3 mM. Für die Berechnung der Differenz der Absorptionen zwischen 427 und 409 nm diente der molare Extinktionskoeffizient von $150 \cdot 10^6 \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{Mol}^{-1}$.¹⁷

6. Äthylisocyanidspektren

In Methanol gelöstes Äthylisocyanid wurde in Trispuffer pH 7.4 suspendierten oxidierten bzw. mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ reduzierten Mikrosomen in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und das Differenzspektrum wie bereits beschrieben im Unicam SP 800 aufgenommen.

7. ESR-Spektren

Die Aufzeichnung der ESR-Spektren erfolgte mit einem X-Band-Superheterodyn-Spektrometer. Ein Klystron der Firma Tesla (CSSR) lieferte die erforderliche Mikrowellenenergie von 9.3 GHz. Die Feldstärke betrug 3300 Gauss.¹⁸ Zur g -Faktorbestimmung diente eine Relativmessung mit der Standardsubstanz 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl. Die Aufzeichnung der ESR-Spektren erfolgte mit Hilfe des Lock-in-Verfahrens als 1. Ableitung der Resonanzabsorption.^{19, 20} Gemessen wurden die unverdünnten Niederschläge bei 77°K.

8. Bestimmung der Glukose-6-Phosphat/6-Phosphoglukonsäure-Dehydrogenase

Die Reaktion wurde mit Glukose-6-Phosphat (Endkonzentration 0.83 mM) und NADP (0.133 mM) bei 30° durchgeführt und die Reaktion bei 340 nm im Unicam SP 800 verfolgt.²¹ Die ermittelten ΔE wurden mit dem molaren Extinktionskoeffizienten von $4.96 \cdot 10^6 \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{M}^{-1}$ für NADPH (Boehringer) errechnet. Die Proteinkonzentration der löslichen Fraktion lag zwischen 0.1 und 0.3 mg/ml Ansatz.

9. Eiweißbestimmung

Sie erfolgte nach der von Lowry angegebenen Methode²² und in der bereits beschriebenen Modifikation.⁹

10. Berechnung der Michaelis-Menten Konstante und Statistik

Die Michaelis-Menten Konstante wurde errechnet nach

$$K_m = \frac{b}{\bar{y}} - b \bar{x}$$

wobei b = Regressionskoeffizient

\bar{y} = Mittelwert der reziproken Reaktionsgeschwindigkeit v

Die ESR-Spektren wurden freundlicherweise von Herrn Dipl.-Chemiker Otto Ristau, Bereich Pharmakologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften in Berlin-Buch gemessen.

\bar{x} = Mittelwert der reziproken Substratkonzentration s bedeuten.
Signifikanzberechnungen wurden mit dem t -Test durchgeführt und die Streuung als mittlerer Fehler (s_x) des Mittelwertes (\bar{x}) angegeben.

Abkürzungen NADPH Nikotinsäureamid-adenindinukleotid-phosphat reduziert
NADP Nikotinsäureamid-adenindinukleotid-phosphat
NADH Nikotinsäureamid-adenindinukleotid reduziert
 V_{\max} Maximalgeschwindigkeit
 K_m Michaelis-Menten Konstante
ESR Elektronen-spin-Resonanz
SKF 525-A: β -Diäthylaminoäthyl-2,2-diphenylvalerat-HCL

Chemikalien Glukose-6-Phosphat: Reanal Budapest
NADPH 90%: VEB Arzneimittelwerk Dresden
NADH 82.5%:
NADPH pur.: Boehringer Mannheim
Cytochrom c : Cyto-Mack und Reanal Budapest
Serumalbumin: Behringwerke Marburg/Lahn
Aminophenazon und Codein $\cdot \frac{1}{3}$ H_3PO_4 : DAB 7
SKF 525-A: Röhm und Hass Pharma GmbH., Darmstadt

Äthylisocyanid wurde von Herrn Dipl. Chemiker Dr. H. Niedrich vom Bereich Pharmakologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften in Berlin-Buch synthetisiert und von Herrn Dr. W. Ruckpaul freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

ERGEBNISSE

1. Die N-Demethylierung des Aminophenazon

Unter Reaktionsbedingungen mit einem Überschuß an Aminophenazon bildet sich mehr Formaldehyd als 4-Aminoantipyrin, weil die Demethylierung des tertiären Amins zum sekundären eine größere Reaktionsgeschwindigkeit zeigt als die Demethylierung des sekundären zum primären Amin.²³ Das unter den angegebenen Versuchsbedingungen nachgewiesene Formaldehyd entspricht somit vorwiegend dem 4-Aminoantipyrin. Sowohl für den Menschen als auch für die männliche Ratte sind über einen Zeitraum von 40 Minuten die nachgewiesenen Mengen Formaldehyd proportional der Zeit. Die Abb. 1 zeigt aber auch, daß die Maximalgeschwindigkeiten zu jedem Zeitpunkt beim Menschen kleiner sind als bei der Ratte. Die Inkubationszeiten mit menschlichen Lebermikrosomen wurden deshalb mit 30 Minuten, die der Ratte mit 20 Minuten angesetzt. Unter diesen Inkubationsbedingungen ist allerdings auch eine Demethylierung des sekundären Amins als Folgereaktion wahrscheinlich.

Mit NADPH und dem generierenden System sind die auf Feuchtgewicht und Protein bezogenen Maximalgeschwindigkeiten für die Ratte signifikant größer als für den Menschen. Auch mit NADP und dem NADPH-generierenden System erhält man für den Menschen kleinere Reaktionsgeschwindigkeiten, die sich allerdings nur für die auf Feuchtgewicht bezogene Aktivität mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% sichern lassen (Tabelle 1). Verzichtet man auf das NADPH-generierende System und gibt nur NADPH in einer Sättigungskonzentration in das Reaktionsgemisch, dann sinken die Maximalgeschwindigkeiten ab.

Nikotinamid in einer Endkonzentration von 20 mM führt zu einer statistisch sig-

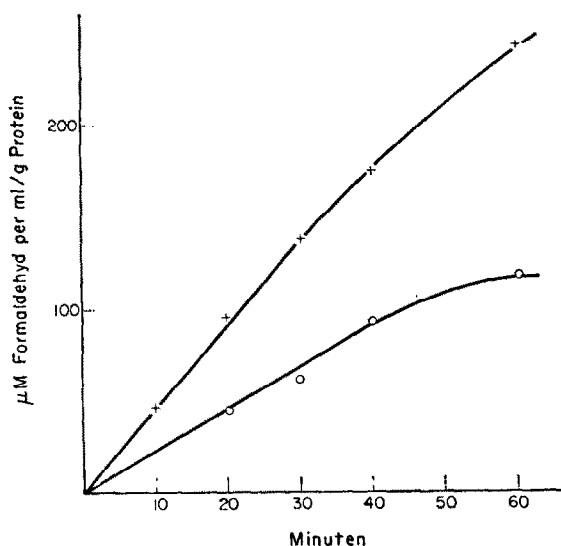


ABB. 1. Aminophenazon-*N*-Demethylierung in Abhängigkeit von der Zeit. ○—○ Mensch; +—+ Ratte.

TABELLE 1. AMINOPHENAZON-*N*-DEMETHYLIERUNG MIT VERSCHIEDENEN SYSTEMEN (V_{\max})

Aminophenazon- <i>N</i> -Demethylase						
Kofaktoren	μMol Formaldehyd/Minute					
	Mensch			Ratte		
	n	Feuchtgewicht (g)	Protein (g)	n	Feuchtgewicht (g)	Protein (g)
NADPH	10 (15)	0.062 ± 0.013	2.89 ± 0.16	—	—	—
NADPH + gener. Syst.	7 (11)	0.088 ± 0.013*	3.68 ± 0.44*	8 (24)	0.26 ± 0.03	6.0 ± 0.53
plus Nikotinamid	10 (17)	0.054 ± 0.01†	2.58 ± 0.19†	—	—	—
NADP + gener. Syst.	3 (5)	0.081 ± 0.018†	3.16 ± 0.56	7 (21)	0.24 ± 0.03	5.0 ± 0.54
plus Nikotinamid	5 (8)	0.08 ± 0.01	3.14 ± 0.5	—	—	—

Die in Klammern gesetzten Zahlen in der Spalte n geben die Gesamtzahl der Probanden bzw. der Versuchstiere an. Eingetragen sind der Mittelwert und der mittlere Fehler.

* Bedeutet $P < 1\%$, + bedeutet $P < 5\%$ im Vergleich zur Ratte.

† Bedeutet $P < 5\%$ im Vergleich zwischen NADPH und dem generierenden System und dem gleichen Ansatz plus Nikotinamid.

nifkanten Verminderung der Maximalgeschwindigkeiten in den Ansätzen, die NADPH und das NADPH-generierende System enthalten. Auf die Maximalgeschwindigkeiten in den Ansätzen mit NADP und dem NADPH-generierenden System hat Nikotinamid keinen Einfluß.

NADH hat eine wesentlich geringere Kofaktoraktivität als NADPH. Wenn man den mit einer NADPH-Konzentration von 1 mM ohne das generierende System erzielten Umsatz = 100% setzt, erhält man bei einem Einsatz von 1 mg Mikrosomenprotein der Rattenleber für

0.5 mM NADH	5%
1.0	18%
2.0	33%

der Aktivität.

Für menschliche Lebermikrosomen mit einem Einsatz von 0.4 mg Protein/ml erreicht man mit NADH in einer Endkonzentration von 1.0 mM noch 24% der mit der gleichen molaren Konzentration an NADPH ermittelten Aktivität.

2. Die Codein-O-Demethylierung

Unter der Annahme, daß der Hauptabbauweg über eine Ätherspaltung des Codein geht, wurde die entstandene Menge Formaldehyd als O-Demethylierungsleistung angesehen und die möglicherweise in geringem Umfang stattfindende N-Demethylierung des Codein vernachlässigt. Bei einer Inkubationszeit von 20 Minuten für die Ratte und 30 Minuten für den Menschen besteht für die nachgewiesene Menge

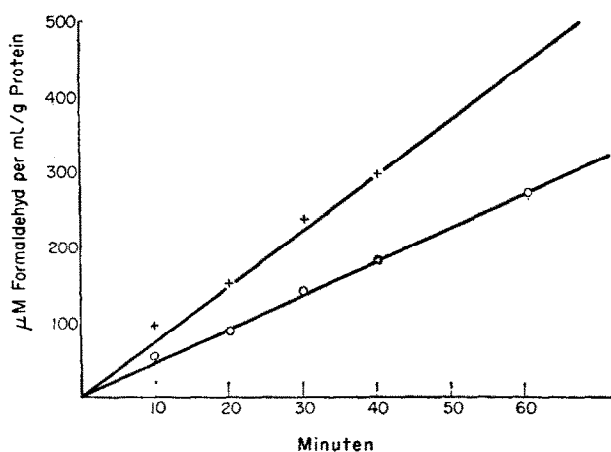


ABB. 2. Codein-O-Demethylierung in Abhängigkeit von der Zeit. ○—○ Mensch; +—+ Ratte

Formaldehyd Linearität (Abb. 2). Die Maximalgeschwindigkeiten der menschlichen Lebermikrosomen sind zu jedem Zeitpunkt kleiner als in der Ratte. Sowohl die auf Feuchtgewicht als auch auf Protein bezogenen als Mittelwerte berechneten Maximalgeschwindigkeiten der menschlichen Leber mit NADPH und dem NADPH-generierenden System betragen etwa 50% der in den Rattenlebermikrosomen gefundenen Werte (Tabelle 2).

TABELLE 2. CODEIN-*O*-DEMETHYLIERUNG MIT NADPH ALS KOFAKTOR UND DEM NADPH GENERIERENDEN SYSTEM (V_{\max})

Codein- <i>O</i> -Demethylase					
μM Formaldehyd/Min.					
Mensch			Ratte		
n	Feuchtgewicht (g)	Protein (g)	n	Feuchtgewicht (g)	Protein (g)
6 (17)	$0.143 \pm 0.021^*$	$5.65 \pm 0.88^*$	8 (24)	0.413 ± 0.008	10.9 ± 0.77

Die in Klammern gesetzten Zahlen in der Spalte n geben die Gesamtzahl der Probanden bzw. der Versuchstiere an. Eingetragen sind der Mittelwert und der mittlere Fehler des Mittelwerts.

* Bedeutet $P < 1\%$.

3. Michaelis-Menten Konstanten

Für Aminophenazon errechnet sich mit Rattenlebermikrosomen eine K_m von 0.4 mM, mit menschlichen Lebermikrosomen von 6.1 mM. Für Codein ergibt sich mit Rattenlebermikrosomen eine Dissoziationskonstante von 0.4 mM, für Mikrosomen des Menschen aber eine von 15 mM.

4. Hemmung durch SKF 525-A

SKF 525-A hemmt in Konzentrationen von 0.1 mM *in vitro* die Aminophenazon-*N*-Demethylierung der Ratte zu etwa 50% (Abb. 3b), während beim Menschen mindestens eine Hemmkonzentration von 0.8 mM notwendig ist (Abb. 3a). Der

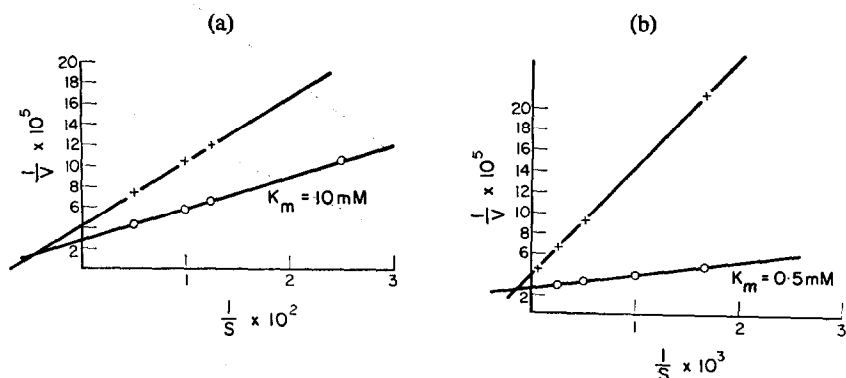


ABB. 3. Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Aminophenazonkonzentration in Lebermikrosomen, aufgetragen nach der Methode von Lineweaver und Burk. a. Mensch. b. Ratte.

○—○ Kontrolle; +—+ SKF 525-A (Mensch: 0.8 mM Ratte: 0.1 mM).

Einsatz höherer SKF 525-A-Mengen ist nicht möglich, weil durch die gleichzeitige Konzentrationserhöhung des Lösungsvermittlers die Reaktion unspezifisch gehemmt wird.

Während mit Codein als Substrat bei der Ratte eine Inhibitorkonzentration von 1.25 μM ausreicht, um die Reaktion kompetitiv zu hemmen, läßt sich in menschlichen Mikrosomen auch unter 0.8 mM keine Hemmung feststellen.

5. Aktivität der Pyridinnukleotid-Cytochrom *c*-Reduktasen

Die NADH-Cytochrom *c*-Reduktase hat beim Menschen und bei der männlichen Ratte einen mindestens 10 mal größeren Substratumsatz als die NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase. Die Maximalgeschwindigkeiten der NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase sind bei der männlichen Ratte für beide Bezugsgrößen größer als beim Menschen (Tabelle 3). Dagegen ergibt sich für die NADH-Cytochrom *c*-Reduktase nur ein Unterschied der Maximalgeschwindigkeiten zwischen Mensch und Ratte, wenn der ermittelte Wert auf Feuchtgewicht bezogen wird.

TABELLE 3. MAXIMALGESCHWINDIGKEITEN DER NADPH-UND NADH-CYTOCHROM *c*-REDUKTASE

	NADPH-Cytochrome- <i>c</i> -Reduktase			NADH-Cytochrome- <i>c</i> -Reduktase		
	n	$\mu\text{M red. Cytochrome c/Min Feuchtgewicht (g)}$	c/Min Protein (g)	n	$\mu\text{M red. Cytochrome c/Min Feuchtgewicht (g)}$	c/Min Protein
Mensch	10 (21)	$2.56 \pm 0.18^*$	$126.1 \pm 10.6^*$	11 (19)	$37.5 \pm 5.96^*$	1617 ± 270
Ratte	9 (23)	6.21 ± 9.4	197.2 ± 17.8	10 (30)	86.4 ± 4.42	2170 ± 281

Die in Klammern gesetzten Zahlen in der Spalte n geben die Gesamtzahl der Probanden bzw. der Versuchstiere an. Eingetragen sind der Mittelwert und der mittlere Fehler.

* Bedeutet $P < 1\%$.

6. Cytochrom *b*₅ und P 450

Unter den Bedingungen einer aeroben Reduktion mit NADH entstehen in Mikrosomen beider Spezies die für Cytochrome des *b*-Typs charakteristischen Spektren mit α -, β - und γ -Banden an typischer Stelle.^{7, 17} Mit NADPH treten die gleichen spektralen Veränderungen auf. Mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ als Reduktionsmittel verschiebt sich mit Rattenlebermikrosomen das Maximum der Soretbande von 427 nm auf 435 nm. Die Absorptionshöhe der γ -Bande nimmt besonders in Rattenlebermikrosomen fast um das Doppelte zu. In menschlichen Lebermikrosomen verschiebt sich das Maximum der Soretbande nur auf 431 nm, ebenfalls unter gleichzeitiger Erhöhung der Absorption.

CO-Begasung führt zu charakteristischen Absorptionen des reduzierten Cytochrom P 450 im Soretbereich. Zwischen Mensch und Ratte bestehen qualitativ keine spektralen Unterschiede. Vergleicht man die auf Feuchtgewicht oder Protein bezogenen Cytochrom *b*₅ oder P 450-Mengen, dann ergeben sich für die menschlichen Lebermikrosomen signifikant kleinere molare Cytochromkonzentrationen. Der Cytochrom P 450-Gehalt beträgt sogar weniger als 50% des in der Ratte gefundenen Wertes (Tabelle 4).

Wie bereits aus dem Soretmaximum des Cytochrom-*b*₅-Spektrums zu erkennen war, wird unter Dithionit auch dann mehr Cytochrom *b*₅ reduziert, wenn die Absorption nicht im spezifischen mit Dithionit ermittelten Maximum, sondern bei 427 nm gemessen wird. Auch diese Werte unterscheiden sich signifikant von denen der Ratte.

TABELLE 4. CYTOCHROM b_5 -UND CYTOCHROM P 450-GEHALT IN LEBERMIKROSOMEN

	Cytochrom b_5 reduziert mit NADH					Natriumdithionit					Cytochrom P450				
	n	Feuchtgew (g)	nM Mol	Protein (g)	n	Feuchtgew (g)	nM Mol	Protein (g)	n	Feuchtgew (g)	nM Mol	Protein (g)	n	Feuchtgew (g)	nM Mol
Mensch	6 (12)	3.64 ± 0.51†	151.2 ± 24.1*	186.0 ± 18.9	5 (10)	6.2 ± 0.74†	221.0 ± 18.4*	297.0 ± 28.6*	6 (12)	4.81 ± 0.93†	297.0 ± 28.6*	717.0 ± 48.3	7 (21)	11.7 ± 1.82	717.0 ± 48.3
Ratte	7 (21)	6.64 ± 1.0	186.0 ± 18.9	186.0 ± 18.9	7 (21)	14.6 ± 1.6	394.7 ± 40.5	394.7 ± 40.5	7 (21)	11.7 ± 1.82	394.7 ± 40.5	394.7 ± 40.5	7 (21)	11.7 ± 1.82	394.7 ± 40.5

Die in Klammern gesetzten Zahlen in der Spalte n geben die Gesamtzahl der Probanden bzw. der Versuchstiere an. Eingetragen sind der Mittelwert und der mittlere Fehler.

* bedeutet $P < 1\%$, † bedeutet $P < 5\%$.

7. Äthylisocyanid-Spektren

Mit Äthylisocyanid zeigen auch die mit Dithionit reduzierten menschlichen Mikrosomen die für Ratte und Kaninchen beschriebenen spektralen Veränderungen^{16, 24} mit Absorptionen bei 430 und 455 nm (Abb. 4a und 4b). Auch die Absorptionen des oxidierten Cytochrom P 450-Äthylisocyanidkomplexes mit einem Maximum bei 434 nm sowie die α - und β -Banden (Abb. 4a) unterscheiden sich qualitativ nicht von denen der Ratte (Abb. 4b).

8. ESR-Spektren

Das ESR-Spektrum von Rattenlebermikrosomen mit den für mikrosomales Fe_x charakteristischen Signalen²⁵⁻²⁸ zeigt die Abb. 5b. Die mit $s_m = 2.42$ und $g_m = 2.20$

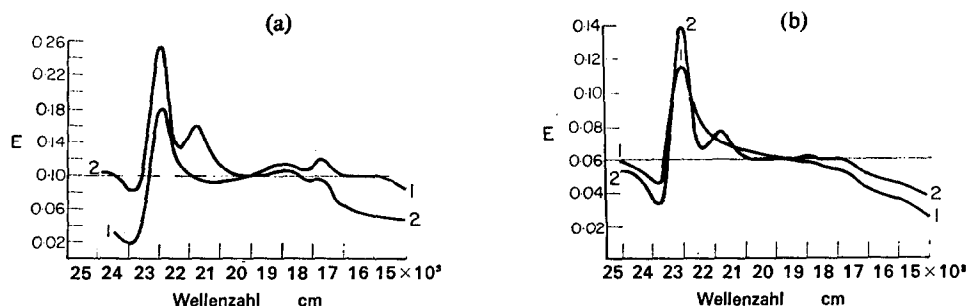


Abb. 4. Äthylisocyaniddifferenzspektrum von Lebermikrosomen. a. Mensch. b. Ratte. 1 = oxidierte Mikrosomen plus 1 mM Äthylisocyanid, 2 = reduzierte Mikrosomen ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) plus 1 mM Äthylisocyanid. Proteingehalt in menschlichen Mikrosomen: 0.74 mg/ml, Trispuffer pH 7.4 0.05 M, Ordinatenmaßstab 1:10. Proteingehalt in Rattenmikrosomen: 1.5 mg/ml, Trispuffer pH 7.4 0.05 M, Ordinatenmaßstab 1:5.

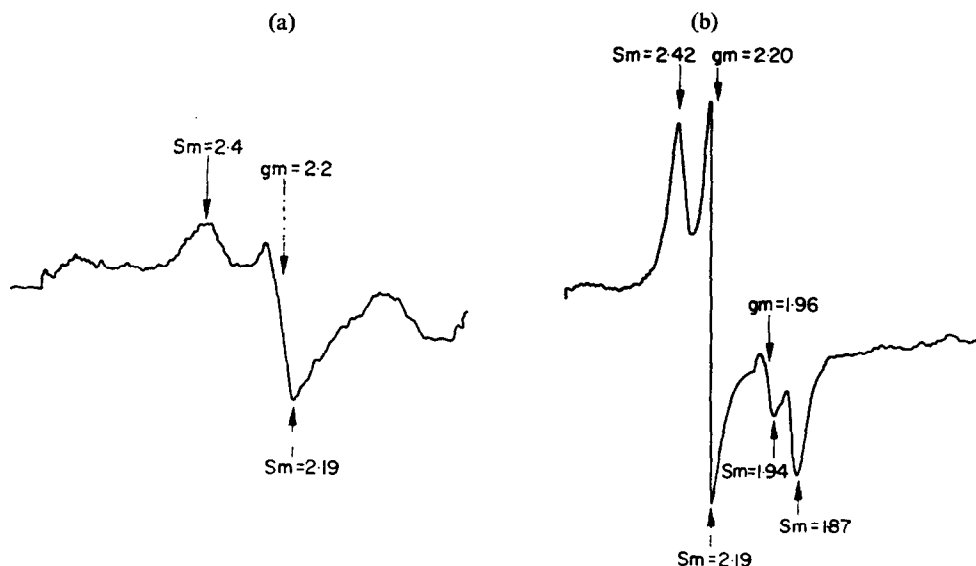


Abb. 5. ESR-Spektren von Lebermikrosomen. a. Mensch. b. Ratte. s_m = maximaler Wendepunkt der Resonanzkurve, g_m = maximale Absorption der Resonanzkurve. Modulationsamplitude: 100 Gauss (Mensch) bzw. 50 Gauss (Ratte) Mikrosomenmenge des Menschen entspricht 1 g Feuchtgewicht, Mikrosomenmenge der Ratte entspricht 4.5 g Feuchtgewicht Leber.

bezeichneten mikrosomalen Signale sind charakteristisch für low spin Hämoproteine. Die Signale bei $g_m = 1.96$ bzw. $s_m = 1.94$ und $s_m = 1.87$ sind Folge einer mitochondrialen Verunreinigung, denn sie finden sich in den Mitochondrien wieder. Die mikrosomale Verunreinigung der Mitochondrien zeigen die beschriebenen Signale bei $g_m = 2.42$ und $s_m = 2.20$ (Abb. 6b). Die Lebermikrosomen des Menschen haben identische Signale (Abb. 5a). Mitochondriale Signale lassen sich nicht mit Sicherheit nachweisen. Möglicherweise sind sie, wie die schräg verlaufende Nulllinie zeigt, durch andere nicht zu definierende Absorptionen überlagert (Abb. 6a). Die mitochondrialen Signale bei $g_m = 1.95$ und $s_m = 1.87$ entsprechen den bei der Ratte gefundenen (Abb. 6b).

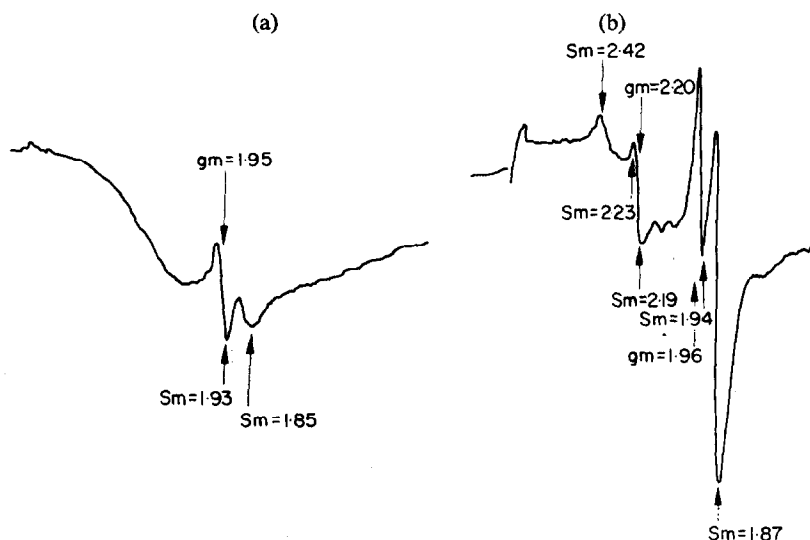


ABB. 6. ESR-Spektren von Lebermitochondrien. a. Mensch. b. Ratte. Bezeichnungen und Modulationsamplitude wie in Abb. 5. Mitochondrienmenge des Menschen entspricht 2 g Feuchtgewicht Leber, die der Ratte 5 g Feuchtgewicht Leber.

TABELLE 5. MAXIMALGESCHWINDIGKEITEN DER GLUKOSE-6-PHOSPHAT-DEHYDRONASE/6-PHOSPHOGLUKONSÄURE-DEHYDROGENASE

Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase/6-Phosphoglukonsäure-Dehydrogenase					
Mensch			Ratte		
n	Feuchtgewicht (g)	Protein (g)	n	Feuchtgewicht (g)	Protein (g)
14 (22)	1.19 ± 0.23	14.4 ± 1.35	7 (21)	3.04 ± 0.41	37.5 ± 1.58
P in % Vergleich zw. Mensch u. Ratte				< 1	< 1

Die in Klammern gesetzten Zahlen in der Spalte n geben die Gesamtzahl der Probanden bzw. der Versuchstiere an. Eingetragen sind der Mittelwert und der mittlere Fehler.

9. Glukose-6-Phosphat/6-Phosphoglukonsäure-Dehydrogenase

Die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase läßt sich in der löslichen Fraktion mit Glukose-6-Phosphat als Substrat nicht von der 6-Phosphoglukonsäure-Dehydrogenase trennen. Das Ergebnis der gesamten NADPH-generierenden Aktivität des 78,000 g Überstandes zeigt die Tabelle 5. Sowohl die spezifischen als auch die auf Feuchtgewicht bezogene Aktivität ist bei der männlichen Ratte mindestens doppelt so groß wie beim Menschen.

DISKUSSION

Die Ergebnisse zeigen, daß auch für den Menschen in der Mikrosomenfraktion eine Elektronentransportkette angenommen werden muß, die sich nicht grundsätzlich von der in der Ratte und anderen Spezies gefundenen unterscheidet. Allerdings sind sowohl der Elektroneneinstrom in die Elektronentransportkette als auch die Elektronenflußkapazität in menschlichen Mikrosomen kleiner als in denen der männlichen Ratte. So hat die Glukose-6-Phosphat/6-Phosphoglukonsäure-Dehydrogenase in der löslichen Fraktion der menschlichen Leber kleinere V_{\max} als in der Rattenleber. Im Zusammenhang mit der kleineren V_{\max} der NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase entspricht das im Verhältnis zur Rattenleber geringere Angebot an reduzierenden Äquivalenten der kleineren Elektronentransportkapazität in der menschlichen Leber. Die im menschlichen Lebermikrosomen wesentlich geringere Konzentration an Cytochrom P 450 ist demnach nur als eine Adaptation der terminalen Oxidase als des letzten Gliedes der Elektronenflußkette an ein geringeres Angebot an Elektronen zu deuten. Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß auch andere in diesen Versuchen nicht erfaßte NADPH-liefernde Prozesse reduzierende Äquivalente liefern können.

Die NADH-Cytochrom *c*-Reduktase reduziert Cytochrom *c* etwa 10 mal schneller pro Zeiteinheit als die NADPH-Cytochrom *c*-Reduktase. Nicht geklärt ist bis jetzt, ob die NADH-Cytochrom *c*-Reduktase Elektronen zum Cytochrom b_5 transportieren kann oder ob dieses Cytochrom die Elektronen nur von einer spezifischen NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase empfängt. In nicht gereinigten mikrosomalen Präparationen werden etwa 50% der unter NADH zu beobachtenden Cytochrom *c*-Reduktion auf die NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase zurückzuführen sein,⁷ für die Cytochrom *c* kein Elektronenakzeptor ist. Da aber zwischen Cytochrom b_5 und Cytochrom *c* ein Elektronentransfer stattfindet, kann letzteres zumindest unter *in vitro* Bedingungen indirekt als Elektronenakzeptor dienen.²⁹ Beide Reaktionen zusammen scheinen auch in menschlichen Lebermikrosomen die größte Elektronentransportkapazität zu besitzen. Die spezifische V_{\max} der NADH-Cytochrom *c*-Reduktase unterscheidet sich nicht signifikant von der der männlichen Ratte. Da auch in den Mitochondrien eine NADH-Cytochrom *c*-Reduktase enthalten ist,³⁰ kann die Bestimmung dieser Reduktase durch die in menschlichen Mikrosomen besonders hohe mitochondriale Verunreinigung verfälscht sein. In den Lysosomen ist außerdem ein aktives Membrankomponenten lösendes Enzym vorhanden, das bevorzugt die NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase aus dem Phospholipidkomplex herauslösen und stimulieren kann.³¹ Dadurch läßt sich möglicherweise vor allem in menschlichen Lebermikrosomen ein Teil der NADH-Cytochrom *c*-Reduktase-Aktivität auf Grund der lysosomalen Verunreinigung auf lysosomale, die Aktivität steigernde Eigenwirkung zurückführen.

Bei der vorgegebenen Verdünnung von 1:500 scheint allerdings die ermittelte Aktivität vorwiegend mikrosomaler Natur zu sein.

Cytochrom b_5 wird durch eine spezifische NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase reduziert.⁷ Da dieses Pigment unter aeroben Bedingungen auch beim Menschen durch NADPH reduziert werden kann, muß eine spezifische Reduktase für den Elektronentransport zum Cytochrom b_5 postuliert werden. Unter Dithionit verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Soretbande zum langwelligen Bereich unter Intensivierung auch der α -Bande. Die Dithionit bedingte Intensivierung der Soretbande und die Verschiebung des Maximums im Vergleich zum enzymatisch reduzierten Cytochrom b_5 ist auf eine Verunreinigung mit Hämoglobin zurückzuführen, wie Hämbestimmungen bestätigt haben. In der menschlichen Mikrosomenfraktion ist die Verschiebung der Soretbande als Folge eines geringeren Hämoglobingehalts weniger deutlich.

Die zwischen Mensch und männlicher Ratte gleichen Absorptionsmaxima des reduzierten Cytochrom P 450 mit CO oder Äthylisocyanid lassen für den Menschen eine ähnliche oder sogar gleiche räumliche Anordnung der Liganden zu spezifischen Reaktionsstellen im Proteinanteil des Cytochroms vermuten. Im reduzierten Zustand liegt Cytochrom P 450 wie das Äthylisocyaniddifferenzspektrum zeigt, in zwei konvertierbaren Formen vor, die in einem pH-abhängigen Gleichgewicht stehen.^{24, 32} Bei pH 7.5 ist sowohl für die Ratte als auch für den Menschen das Gleichgewicht der beiden Zustandsformen entgegen den Angaben von Imai²⁴ noch zugunsten der 430-Form verschoben. Diese Form zeigt eine außerordentlich große Affinität zu Sauerstoff.²⁴ Das spektrale Verhalten der menschlichen Mikrosomen mit Äthylisocyanid als Liganden gibt zu der Vermutung Anlaß, daß ebenfalls zwei spektral unterscheidbare Hämoproteine mit verschiedenen molaren Extinktionskoeffizienten^{33,34} und unterschiedlichen K_m für Sauerstoff existieren.³⁵ Der allgemein zur Bestimmung des reduzierten Cytochrom P 450 angegebene molare Extinktionskoeffizient von $91.10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{Mol}^{-1}$ ¹⁶ stellt somit nur eine Mischung zweier Hämoproteine dar. Es bleibt abzuwarten, ob die Anzahl der Hämoproteine speziesabhängig ist. Auf Grund des kleinen Redoxpotentials⁷ liegt Cytochrom P 450 auch in menschlichen Mikrosomen im oxidierten Zustand vor, wie die im ESR-Spektrum nachweisbaren Fe_x -Partikel zeigen.^{1, 25, 27, 28} Auch in menschlichen Lebermikrosomen hat das oxidierte Cytochrom P 450 die Charakteristika eines low spin Hämoproteins.²⁵⁻²⁸

Die mitochondrialen Signale lassen sich zumindest teilweise auf die Succinatdehydrogenase zurückführen^{36, 37} und dem Nichthämeisenprotein zuordnen. Die Zuordnung einer Elektronenspin-Resonanz in Gewebefractionen ist schwierig, weil viele Radikale und nicht näher definierte Verbindungen mit paramagnetischen Eigenschaften ESR-Signale geben können. So führen Redoxreaktionen des Pyridinnukleotid-Cytochrom c -Systems bei tiefen Temperaturen zu einer ungepaarten elektronischen Konfiguration, sodaß Absorptionen und Überlagerungseffekte mit keiner eindeutigen Zuordnung der Signale durch freie Radikale hervorgerufen werden können.³⁸

Der beim Menschen kleineren Elektronenflußkapazität der Mikrosomenfraktion entsprechen die kleineren V_{\max} für Aminophenazon und Codein im Vergleich zur männlichen Ratte. Für die Demethylierung beider Substrate ist auch NADPH als Kofaktor notwendig. Für die V_{\max} ist das Angebot an NADPH während der ganzen Inkubationszeit von Bedeutung. So ist eine optimale NADPH-Konzentration nur in den Reaktionsmischungen gewährleistet, in denen bereits NADPH vorgegeben und

seine Rückbildung durch ein entsprechendes System gesichert ist. Durch einen Überschuß an NADPH schließt man die Möglichkeit aus, daß durch Pyrophosphatasen^{39, 40} und Nukleosidasen^{41, 42} in ungereinigten Mikrosomenfraktionen unkontrollierbare Pyridinnukleotid verbrauchende Prozesse vor allem bei längeren Inkubationszeiten zu einem Kofaktormangel führen. Das in den Reaktionsmischungen mit Mikrosomen beider Spezies ausreichende Angebot an spezifischen reduzierenden Äquivalenten erklärt auch die über mindestens 40 Minuten linear verlaufende Demethylierung beider Substrate.

Nikotinamid ist auch für die Mikrosomen der menschlichen Leber ein Hemmer der durch die mischfunktionellen Oxidasen vermittelten Reaktionen, wie bereits für die Ratte mit Anilin und Aminophenazon beschrieben.⁴³ Die Ursache dieser Hemmung liegt wahrscheinlich in einer Bindung des Nikotinamids an spezifische Bindungsstellen des oxidierten Cytochrom P 450 begründet.⁴⁴

NADH hat ebenfalls eine Kofaktorwirkung, die aber nur maximal 30% der mit NADPH erzielten Aktivität ausmacht. Andere Autoren geben für die Aminophenazon-*N*-Demethylierung NADH gegenüber NADPH als gleichwertigen Elektronenspender an.⁴⁵ Da die Kofaktoraktivität nicht über eine NADH-NADPH-Transhydrogenase zustandekommt,⁴⁶ muß Cytochrom b_5 entgegen früheren Vorstellungen am Elektronentransport auf xenobiotische Substanzen beteiligt sein. Die Kofaktoreigenschaften des NADH lassen sich andererseits durch eine Flavoreduktase erklären, die Elektronen von NADH zum Cytochrom P 450 transferiert.⁵ Ob für diese Funktion in menschlichen Lebermikrosomen ebenfalls eine spezifische, den Quertransport übernehmende Reduktase vorhanden ist, bleibt offen.

Gegenüber dem mikrosomalen Hemmer SKF 525-A verhält sich die menschliche Leber anders als die der männlichen Ratte. Um einen mit der Ratte vergleichbaren Hemmeffekt zu erzielen, mußte in Inkubaten mit menschlichen Lebermikrosomen eine etwa 8 bis 10 mal größere InhibitorKonzentration eingesetzt werden. Der Hemmtyp ist nichtkompetitiv, während für die Ratte ein gemischter Hemmtyp angenommen werden muß. Da in der beschriebenen Reaktion nur Formaldehyd ohne Differenzierung des Reaktionsproduktes bestimmt wurde, kann wahrscheinlich als Folge der kompetitiven Hemmung des tertiären Amins Aminophenazon⁴⁷ und der nichtkompetitiven des sekundären Amins Monomethylaminoantipyrin⁴⁸ der Hemmtyp nicht eindeutig zugeordnet werden. Außerdem scheint der Hemmtyp speziesabhängig zu sein, da sich Ratte und Kaninchen nicht einheitlich verhalten.⁴⁷ Die Codein-*O*-Demethylierung läßt sich in menschlichen Lebermikrosomen durch SKF 525-A bis zu einer Konzentration von 0.8 mM nicht hemmen, während bei der Ratte bereits 1.25 μ M zu einem deutlichen Effekt führen. Unter der Annahme, daß auch beim Menschen die Hemmung der *O*-Demethylierung kompetitiver Natur ist, läßt sich der fehlende Inhibitionseffekt durch die große K_m für Codein deuten.

Für die Ratte liegt die für eine 50%ige Hemmung notwendige InhibitorKonzentration mindestens eine Zehnerpotenz niedriger als in der Literatur beschrieben.⁴⁹⁻⁵¹ Die ungebundene Konzentration des Inhibitors sinkt erheblich mit steigender Eiweißkonzentration durch unspezifische Bindung. Die Hemmeffektivität steigt, wenn die Proteinkonzentration sinkt.⁵² Da die Ansätze mit Codein als Substrat nur 0.2 bis 0.4 mg Mikrosomenprotein und zusätzlich maximal 1.0 mg Protein der löslichen Fraktion/ml Ansatz enthielten, die in der Literatur angegebenen durch Verwendung des 9000 g Überstandes mit der eiweißreichen löslichen Fraktion etwa die 100 fache

TABELLE 6. MAXIMALGESCHWINDIGKEITEN, MICHAELIS-MENTEN KONSTANTEN UND BIOLOGISCHE HALBWERTZEITEN DES MENSCHEN IM VERGLEICH ZUR MÄNNLICHEN UND WEIBLICHEN RATTE

Substrat	V_{\max} μ M Formaldehyd/gProt./Min.						K_m mM						Halbwertszeit h					
	Mensch		Ratte weiblich		Ratte männlich		Mensch		Ratte weiblich		Ratte männlich		Mensch		Ratte weiblich		Ratte männlich	
	n	\bar{x} s \bar{x}	n	\bar{x} s \bar{x}	n	\bar{x} s \bar{x}	n	\bar{x} s \bar{x}	n	\bar{x} s \bar{x}	n	\bar{x} s \bar{x}	n	\bar{x} s \bar{x}	n	\bar{x} s \bar{x}	n	\bar{x} s \bar{x}
Codein	6 (17)	5.7±0.9	4 (12)	2.7±0.25†	8 (24)	10.9±0.8*	5 (10)	15±2.0	4 (12)	0.7±0.25*	6 (18)	0.4±0.06*	—	—	—	—	—	—
Amino-phenazon (11)	7 (12)	3.7±0.4	4 (12)	3.1±0.3	8 (24)	6.0±0.5*	7 (12)	6.1±1.5	4 (12)	1.9±0.4	5 (15)	0.43±0.07*24	5.0±0.4*	4 (8)	2.4±0.5†	4 (14)	1.1±0.37	—

* bedeutet $P < 1\%$, † bedeutet $P < 5\%$.

Menge Eiweiß, erklären sich die Befunde durch Konzentrationsunterschiede des Inhibitors.

Die V_{\max} unter den Bedingungen einer Reaktion 0. Ordnung lassen keine Aussagen über den Substratumsatz im lebenden Organismus zu, weil *in vivo* selten eine Sättigungskinetik besteht. Die für den Menschen ermittelten K_m sind 10 bis 40 mal größer als die der männlichen Ratte. Wie aus der Tabelle 6 zu ersehen ist, entsprechen den kleinen V_{\max} des Menschen die großen K_m . Die Tabelle zeigt aber auch, daß die V_{\max} keine ausreichende Information über Speziesunterschiede geben. Während nämlich die V_{\max} der weiblichen Ratte mit den Substraten Aminophenazon und Codein nur maximal 50% des Umsatzes der männlichen Ratte betragen und damit mit denen des Menschen vergleichbar sind, zeigen die Dissoziationskonstanten des Enzym-Substrat-Komplexes Werte, die nur um das 4 oder 2 fache höher liegen als die der männlichen Ratte. Trotz annähernd gleicher V_{\max} hat der Mensch noch um eine Zehnerpotenz größere Dissoziationskonstanten für Codein und eine doppelt so große für Aminophenazon. Dadurch erklärt sich auch die biologische Halbwertszeit für Aminophenazon von 5 Stunden für den Menschen beiderlei Geschlechts im Vergleich zu 1,1 Stunden männlicher Ratten, während die biologische Halbwertszeit weiblicher Ratten wegen der kleineren V_{\max} und der größeren K_m etwa doppelt so groß ist wie die der männlichen Ratte, aber nur halb so groß wie die des Menschen. Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit der von Gillette gemachten Beobachtung über die Beziehung zwischen K_m und V_{\max} zur Beurteilung von Speziesunterschieden.⁵³ Geschlechtsunterschiede scheinen auf Grund der Untersuchungen von Vesell^{54, 55} beim Menschen nicht vorzuliegen. Auch wir fanden weder *in vivo* noch *in vitro* in orientierenden Versuchen einen Anhalt für geschlechtsbedingte Unterschiede im Arzneimittelmetabolismus.

Die Sauerstoffübertragung auf das Substrat erfolgt mittels des reduzierten Cytochrom P 450.⁵⁶ Diese spezifische Funktion wird durch einen das Cytochrom P 450 umschließenden Phospholipidkomplex mitbestimmt, der wahrscheinlich lipoid-löslichen Substraten einen gerichteten Transport zu hydrophoben allosterischen Rezeptorarealen erlaubt. Speziesbedingte Differenzen in der Packungsdichte des Phospholipidkomplexes z. B. durch unterschiedliche Beteiligung ungesättigter Fettsäuren könnten die Substratanflutung zu den hydrophoben Rezeptorarealen des Proteinanteils des Cytochroms modifizieren und die Unterschiede in den V_{\max} und K_m zwischen Mensch und Ratte erklären. Da die Konformation eines Proteins von der Aminosäuresequenz bestimmt wird,⁵⁷ kann eine von der Ratte abweichende Proteinstruktur die Konformationsaktivität allosterischer Reaktionsstellen im Proteinanteil dieses Cytochroms beim Menschen so verändern, daß die Substratanlagerung behindert wird.⁵⁷ Da wahrscheinlich auch Hormone eine Konformationsänderung auslösen, ließen sich so die größeren Affinitäten einiger Arzneimittel zum mikrosomalen Cytochrom P 450 der männlichen im Vergleich zur weiblichen Ratte begründen.⁵⁸

Danksagungen—Herrn Dr. Seifert und Herrn Dr. Haumann von der Chirurgischen Klinik der Medizinischen Akademie "Carl Gustav Carus" in Dresden sei für die Vorbereitung der Patienten und die Keilexzisionen gedankt.

Besonderer Dank gilt auch Leonore Morgenstern und Hanna Haun für die technische Assistenz.

LITERATUR

1. H. S. MASON, J. C. NORTH und M. VANNESTE, *Fedn. Proc.* **24**, 1172 (1965).
2. T. OMURA, R. SATO, D. Y. COOPER, O. ROSENTHAL und R. W. ESTABROOK, *Fedn. Proc.* **24**, 1181 (1965).

3. Y. IMAI, A. ITO und R. SATO, *J. Biochem. (Tokyo)* **60**, 417 (1966).
4. P. SIEKEVITZ, *Fedn. Proc.* **24**, 1153 (1965).
5. R. SATO, T. OMURA und H. NISHIBAYASHI, *Oxidases and related redox systems* Vol. 2 S.861 (Eds. TSOO R. KING, HOWARD S. MASON, MARTIN MORRISON) John Wiley, New York (1965).
6. H. S. MASON, T. YAMANO, J. C. NORTH, Y. HASHIMOTO und P. SAKAGISHI, *Oxidases and related redox systems* Vol. 2 S.879 (Ed.: TSOO R. KING, HOWARD S. MASON, MARTIN MORRISON) John Wiley, New York (1965).
7. P. STRITTMATTER, *Biological oxidations* S.171 (Ed. Thomas P. Singer) Interscience P, New York (1968).
8. E. BLUME, H. KLUGE und H. FRUNDER, *Acta biol. med. german.* **9**, 566 (1962).
9. E. ACKERMANN und I. HEINRICH, *Biochem. Pharmac.* **19**, 327 (1970).
10. R. KUNTZMAN, L. C. MARK, L. BRAND, M. JACOBSON, W. LEVIN und A. H. CONNEY, *J. Pharmac. exp. Ther.* **152**, 151 (1966).
11. R. KUNTZMAN, L. C. MARK, L. BRAND, M. JACOBSON, K. SCHNEIDMAN und A. H. CONNEY, *Pharmacologist* **6**, 187 (1964).
12. T. NASH, *Biochem. J.* **55**, 416 (1953).
13. K. H. BAUER und H. MOLL, *Die organische Analyse unter besonderer Berücksichtigung der Arzneistoffe* (Eds R. POHLOUDEK FABINI und TH. BEYRICH) Geest und Portig K.G. (1967).
14. R. E. STITZEL, F. E. GREEN, R. FURNER und H. CONWAY, *Biochem. Pharmac.* **15**, 1001 (1966).
15. T. YONATANI und G. S. RAY, *J. biol. Chem.* **240**, 4503 (1965).
16. T. OMURA und R. SATO, *J. biol. Chem.* **239**, 2379 (1964).
17. M. KLINGENBERG, *Archs Biochem. Biophys.* **75**, 376 (1958).
18. C. SCHOFFA und O. RISTAU, *Exp. Tech. Phys.* **8**, 217 (1960).
19. H. REIN, O. RISTAU und F. JUNG, *Z. phys. Chem.* **221**, 197 (1962).
20. H. REIN, O. RISTAU, F. HACKENBERGER und F. JUNG, *Biochim. biophys. Acta* **167**, 538 (1968).
21. H. M. RAUEN, *Biochemisches Taschenbuch* 2. Auflage, 2. Teil S.717. Springer Verlag, Berlin (1964).
22. H. O. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, *J. biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
23. TH. GRAM, J. T. WILSON und R. J. FOUTS, *J. Pharmac. exp. Ther.* **159**, 172 (1968).
24. Y. IMAI und R. SATO, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **23**, 5 (1966).
25. Y. MIYAKE, J. YOSHIHIRO, L. GAYLOR und H. S. MASON, *J. biol. Chem.* **243**, 5788 (1968).
26. Y. HASHIMOTO, T. YAMANO und H. S. MASON, *J. biol. Chem.* **237**, PC 3843 (1962).
27. T. YAMANO, Y. HASHIMOTO und H. S. MASON, *Fedn Proc.* **22**, 586 (1963).
28. K. MURAKAMI und H. S. MASON, *J. biol. Chem.* **242**, 1102 (1967).
29. P. STRITTMATTER und S. V. VELICK, *J. biol. Chem.* **221**, 277 (1956).
30. G. J. HOGEBOOM, *J. biol. Chem.* **177**, 847 (1949).
31. S. TAKESUE und T. OMURA, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **30**, 723 (1968).
32. Y. IMAI und R. SATO, *J. Biochem. (Tokyo)* **63**, 270 (1968).
33. A. HILDEBRANDT, H. REMMER und R. W. ESTABROOK, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **30**, 607 (1968).
34. R. KUNTZMAN, W. LEVIN, M. JACOBSON und A. H. CONNEY, *Life Sci.* **7**, 215 (1968).
35. H. J. STAUDINGER, B. KEREKJARTO, V. ULLRICH und Z. ZUBRZYCKI, *Oxidases and related redox systems* Vol. 2, S.815 (Ed. TSOO R. KING, HOWARD S. MASON, MARTIN MORRISON) John Wiley, New York (1965).
36. R. H. SANDS und H. BEINERT, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **3**, 47 (1960).
37. Y. MIYAKE, H. S. MASON und W. LANDGRAF, *J. biol. Chem.* **242**, 393 (1967).
38. TH. HOLLOCHER, *J. biol. Chem.* **240**, 491 (1965).
39. K. B. JACOBSON und N. O. KAPLAN, *J. biol. Chem.* **226**, 427 (1957).
40. K. B. JACOBSON und N. O. KAPLAN, *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 31 (1957).
41. E. C. G. HOFMANN und S. M. RAPOPORT, *Biochim. biophys. Acta* **18**, 295 (1955).
42. L. J. ZATMAN, N. O. KAPLAN und C. O. COLOWICK, *J. biol. Chem.* **200**, 197 (1953).
43. J. SCHENKMAN, J. A. BALL und R. W. ESTABROOK, *Biochem. Pharmac.* **16**, 1071 (1967).
44. J. SCHENKMAN, H. REMMER und R. W. ESTABROOK, *Molec. Pharmac.* **3**, 113 (1967).
45. Meetings. Hepatic micromes and drug oxidations. *Science* **160**, 1368 (1968).
46. K. KRISCH und H. J. STAUDINGER, *Biochem. Z.* **334**, 312 (1964).
47. J. R. GILLETTE, *Advanc. Pharmacol.* **4**, 219 (1966).

48. J. R. GILLETTE, *Progress in Drug Research* (Ed. E. JUCKER) Vol. 6, p. 13 (1963).
49. J. R. COOPER, J. AXELROD und B. B. BRODIE, *J. Pharmac. exp. Ther.* **112**, 55 (1954).
50. J. AXELROD, J. REICHENTHAL und B. B. BRODIE, *J. Pharmac. exp. Ther.* **112**, 49 (1954).
51. J. R. FOUTS und B. B. BRODIE, *J. Pharmac. exp. Ther.* **115**, 68 (1955).
52. J. R. GILLETTE, Sec. Pharmacol. Meeting. *Drugs and enzymes* S.9. (Eds B. B. BRODIE und J. R. GILLETTE) Pergamon Press, Oxford (1965).
53. J. R. GILLETTE, *Fedn Proc.* **26**, 1040 (1967).
54. E. S. VESELL und J. G. PAGE, *Science* **159**, 1479 (1968).
55. E. S. VESELL und J. G. PAGE, *Science* **161**, 72 (1968).
56. Y. IMAI und R. SETO, *J. Biochem. (Tokyo)* **62**, 239 (1967).
57. W. SCHELER, *Grundlagen der allgemeinen Pharmakologie*. VEB Gustav Fischer Verlag Jena (1969).
58. J. B. SCHENKMAN, I. PREY, H. REMMER und R. W. ESTABROOK, *Molec. Pharmac.* **3**, 516 (1967).