

l'éther pur (nous n'avons pas noté de modification importante de la densité optique de telles solutions après plusieurs jours), il n'en va pas de même lorsque, comme dans nos expériences enzymatiques, le formazan se trouve solubilisé dans un mélange eau-acétone contenant de nombreuses autres substances (substrat, activateurs, etc.). Dans ces expériences, nous avons constaté que le formazan se décolore assez rapidement et de façon irrégulière.

Quant à l'influence du pH sur la réduction du TPT, elle nous est apparue négligeable entre pH 4,0 et 12,5. Par contre, la réduction ne se fait plus que de façon incomplète au-dessous de pH 4,0.

L'utilisation de la méthode décrite nous a permis de classer les déshydrogénases étudiées de mitochondries de foie dans l'ordre suivant d'activité décroissante: citrico-, succino-, α -cétoglutaro-, pyruvo-, malico-, lacticodéshydrogénase. Ces données ne sont cependant valables que lorsque la préparation a été faite avec un maximum de précautions (température suffisamment basse, rapidité des manipulations, absence de contact entre la préparation et les parties métalliques de l'homogénéiseur, etc.); sinon, l'altération de la préparation enzymatique se traduit par une réduction de l'activité de toutes les déshydrogénases; la succinodéshydrogénase étant la moins atteinte, son activité devient alors supérieure à celle de la citricodéshydrogénase. Nous avons vérifié, en ce qui concerne la citricodéshydrogénase, que la formation de formazan (exprimée en microgrammes de formazan formés par gramme de tissu frais) est une fonction linéaire du temps dans les 60 premières minutes.

Nous avons enfin mené parallèlement aux déterminations par la méthode du TPT, des dosages d'activité des mêmes déshydrogénases par la méthode de Warburg et par celle de Thunberg (accepteur d'hydrogène: 1 cm³ d'une solution à 0,1% de dichlorophénol-indophénol). Nous avons constaté ainsi l'absence de parallélisme entre les données de ces trois méthodes. La succinodéshydrogénase est, en effet, plus active que la citricodéshydrogénase tant par les techniques de Warburg que par celle de Thunberg. Si ce fait n'a rien de surprenant en ce qui concerne la première (qui mesure toute une suite de réactions enzymatiques - dont les déshydrogénases ne sont qu'un maillon - aboutissant à l'utilisation d'oxygène moléculaire), la non-concordance des résultats entre les deux autres méthodes nous paraît devoir être attribuée à la nature même de l'accepteur, ainsi peut-être qu'à une inactivation partielle du complexe enzymatique au cours des manipulations nécessaires dans la technique de Thunberg¹.

En résumé, l'ensemble des propriétés physicochimiques du chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium que nous avons étudiées (coloration à l'état réduit, étendue de la bande de pH dans laquelle peut s'effectuer la réduction, validité de la loi de Beer-Lambert pour le formazan, etc.) nous a permis son utilisation pour la détermination de l'activité déshydrogénasique de mitochondries (cyclophorase) de foie de rat et de lapin. Nous avons comparé les résultats obtenus avec ceux de déterminations menées parallèlement par les méthodes de Warburg et de Thunberg.

J. NORDMANN, R. NORDMANN et ODETTE GAUCHERY

Laboratoire de biochimie, clinique chirurgicale de la Salpêtrière, Paris, le 10 septembre 1951.

¹ J. NORDMANN, R. NORDMANN et O. GAUCHERY, Bull. Soc. Chim. biol. (sous presse).

Summary

The quantitative determination of dehydrogenase activity in mitochondria, using 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as H-acceptor, is described. The results obtained with this technique are compared with those given by the methods of Warburg and Thunberg.

Über das Verschwinden von Adenosintriphosphat bei der Superpräzipitation von Aktomyosin-Gel

Obgleich eine Reihe von Forschern die Ansicht vertritt¹, daß die durch Adenosintriphosphat (ATP) hervorgerufene Synärese («Kontraktion») von Aktomyosin (AM) mit einem Abbau dieses Nukleotids einhergeht, ist ein direkter Nachweis dieses Abbaus aus methodischen Gründen bisher nicht gelungen. Die interessanten Befunde BUCHTHALS², nach denen durch Einwirkung von ATP auf Fadenknäuel von AM-Gel ein relativ geringfügiger Einbau von Purin und Phosphat [etwa im gleichen Verhältnis wie in der Adenosindiphosphorsäure (ADP)] in das Myosin stattfindet, sind für das vorliegende Problem nicht heranzuziehen, da die lange Einwirkungsdauer vor der Analyse (etwa 30 min) über Vorgänge bei der Kontraktion selbst direkt nichts aussagt. Die größte Schwierigkeit ist wohl in der mit der «Kontraktion» gleichzeitig einsetzenden Wirkung der ATPase zu sehen³, die gleichfalls zum Verschwinden von ATP (durch Abbau zu ADP) führt. Zur Differenzierung zwischen Kontraktion und ATPase-Wirkung empfiehlt sich nach unseren Erfahrungen die Anwendung von SH-Gruppen blockierenden Substanzen [zum Beispiel metallorganischen Quecksilber(2)- und Arsen(3)-Verbindungen], mit deren Hilfe es gelingt, diese Vorgänge wahlweise und reversibel «einzufrieren»⁴; allerdings ist es uns bisher nie gelungen, bei erhaltenener Kontraktion die ATPase auszuschalten. Mit der von uns früher⁵ angegebenen Methode der quantitativen Messung der AM-«Kontraktion» war der Einsatz der für die ATP-Bestimmung notwendigen Substanzmengen möglich. Für diese Bestimmung erwies sich die für ATP spezifische Beeinflussung der Viskosität von AM-Sol als ein auch in quantitativer Hinsicht geeignetes Verfahren⁶; denn die Länge des waagrechten Teils der Viskosität-Zeit-Kurve ist in Gegenwart von Magnesiumionen bei einer bestimmten ATPase-Aktivität des AM-Sols ein direktes Maß für die anfangs zugefügte ATP-Menge⁶. Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, verschwindet während der «Kontraktion» bei richtiger Dosierung das zugefügte ATP weitgehend, während im Kontrollversuch [bei dem *m*-Amino-*p*-oxyphenylarsen(III)-oxyd (oxarsan) die Kon-

¹ Vgl. zum Beispiel H. H. WEBER, Vortrag Bunsen-Tagung, 1951.

² F. BUCHTHAL, A. DEUTSCH, G. G. KNAPPEIS und A. MUNCH-PETERSEN, Acta physiol. Scand. 13, 167 (1947).

³ Abweichend von SZENT-GYÖRGYI Befunden [vgl. zum Beispiel Hung. acta Physiol. 2, Nr. 1-4 (1949), zitiert nach⁷], wonach nur kontrahiertes AM-Gel als magnesiumaktivierbare ATPase wirkt, finden wir in unseren Versuchen, daß auch nach Hemmung der Kontraktion durch die Arsen(3)-Verbindung Oxarsan die ATPase wirksam bleibt.

⁴ F. TURBA und G. KUSCHINSKY, Naturwissenschaften 37, 453 (1950). - Vgl. auch G. KUSCHINSKY und F. TURBA, Bioch. biophys. acta 6, 426 (1951).

⁵ G. KUSCHINSKY und F. TURBA, Biochem. Z. 321, 39 (1950).

⁶ G. KUSCHINSKY und F. TURBA, Bioch. biophys. Acta 6, 426 (1951). - Vgl. auch A. CSAPÓ, Acta physiol. Scand. 19, 101 (1949).

⁷ N. K. SARKAR, A. G. SZENT-GYÖRGYI und L. VARGA, Enzymologia 14, 267 (1950).

traktion gehemmt, die ATPase dagegen ebenso wie im Kontraktionsversuch unverändert gelassen hat] der größte Teil des ATP noch erhalten ist. Zur gleichen Zeit ist ein Zuwachs an anorganischem Phosphat in einer entsprechenden Größenordnung festzustellen, zum Beispiel 148 μ anorganisches P (Kontraktionsversuch) gegenüber 48 μ P (ohne Kontraktion); Summe aus anorganischem und säurelabilem P: 404 bzw. 448 μ .

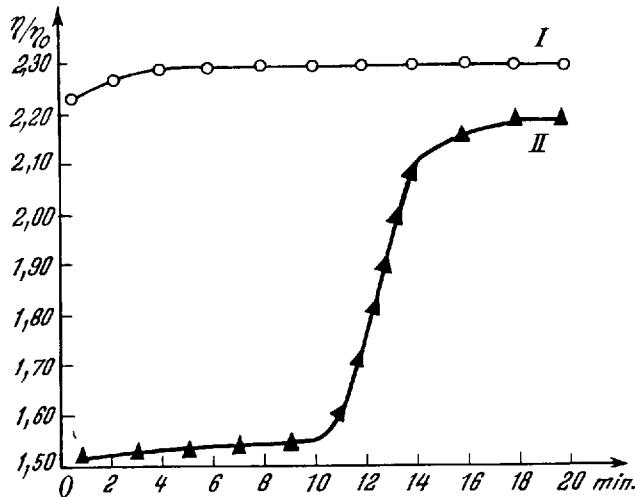


Abb. 1.

Verschwinden von ATP bei der «Kontraktion» von Actomyosin-Gel
 Abszisse: Zeit in Minuten; Ordinate: relative Viskosität. Ansatz I: 5 cm³ AM-Gel (etwa 1,4 mg N/cm³), 1 cm³ ATP-Lösung (5 mg lufttrockenes Ba-ATP umgefällt als Mg-Salz/cm³), nach etwa 10 s 1 cm³ Oxarsanolösung (4,7 mg/cm³), sofort dazu 1 cm³ Salyrganlösung (5 mg/cm³) zur Ausschaltung der ATPase, die von Oxarsan nicht gehemmt wird, 2 cm³ Wasser, abzentrifugiert. Volumen des superpräzipitierten Gels 0,5 cm³, 0,75 cm³ der überst. Lösung + 0,25 cm³ 4 mM KCl + 0,3 cm³ BAL (0,1 cm³/14 cm³ Wasser) zur Ausschaltung der Hemmung durch die Schwermetallverbindungen; + 2 cm³ AM-Sol; 2 cm³ zur Viskositätsmessung. – Ansatz II: wie I, aber zunächst 1 cm³ Oxarsanolösung 10 min (Zimmertemperatur) einwirken lassen, dann ATP-Zusatz usw. Volumen des abzentrifugierten Gels 3,2 cm³. – 0 = Beginn der viskosimetrischen Messung.

Ein Verschwinden von ATP durch Adsorption an das Protein ist auch deshalb auszuschließen, weil nach Trichloressigsäure-Behandlung nicht wesentlich mehr ATP nachzuweisen ist. Wir sind damit beschäftigt, die entstandenen Ab- und Umbauprodukte des ATP chemisch zu identifizieren. Das bei der Kontraktion beobachtete Verschwinden von ATP unterscheidet sich durch die große Geschwindigkeit des Vorgangs von der als ATPase bezeichneten Fermentwirkung. Ob es sich auch im ersten Fall um eine echte Fermentwirkung handelt, ist zunächst nicht zu entscheiden. Wenn man ATP zu AM-Sol hinzufügt, findet sich im Gegensatz zu den oben beschriebenen Befunden *kein* Unterschied im ATP-Gehalt der Lösungen in Abhängigkeit von dem Eintritt oder der Hemmung der Dissoziation (Abb. 2) (Versuchsanordnung in Parallele zur «Kontraktion» bei niederen Ionenstärken). Auch dieses Ergebnis weist darauf hin, daß ATP nur unter den Bedingungen, die zu einer «Kontraktion» führen, in der oben beschriebenen Weise verändert wird. Im Zusammenhang mit den Resultaten von WEBER liegt also die Annahme einer Freisetzung von Energie aus dem ATP während der «Synärese» des AM-Gels nahe. Das läßt sich in Einklang mit Befunden von SARKAR, SZENT-GYÖRGYI und VARGA¹ bringen, wo-

¹ N. K. SARKAR, A. G. SZENT-GYÖRGYI und L. VARGA, Enzymologia 14, 267 (1950).

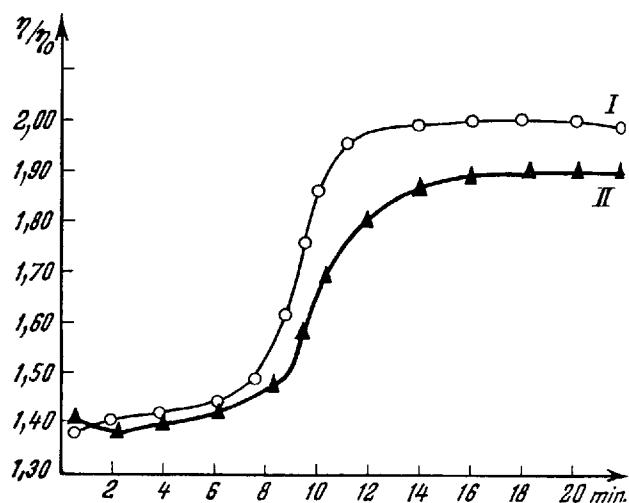


Abb. 2. – Verhalten des ATP im Versuch mit AM-Sol unter den in Abbildung 1 angegebenen Versuchsbedingungen. Abweichend davon statt 2 cm³ Wasser 2 cm³ Trichloressigsäure (40%), danach Trichloressigsäure fünfmal mit Äther ausgeschüttelt.

nach in der glyzerinextrahierten Muskelfaser Freisetzung von Phosphat und entwickelte Spannung einander parallel gehen.

Der Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

G. KUSCHINSKY, F. TURBA und I. KÖHLER

Pharmakologisches Institut der Universität Mainz, den 15. Oktober 1951.

Summary

(1) In the synerizing ("contraction") of actomyosin gel, the ATP added disappears almost completely, while in the control experiment (contraction inhibited, ATPase intact), the greater part of the ATP remains.

(2) At the same time there is a corresponding increase in free inorganic phosphate.

(3) In analogous experiments with actomyosin sol, in contrast to the findings mentioned above, no difference in the ATP content of the solutions is found, irrespective of whether the dissociation into actin and myosin occurs or is inhibited.

Azione dell'insulina e della difosfotiamina sull'ATP (Adenosinatrifosfato) del fegato

Nel diabete sperimentale da allossana e nel diabete mellito l'insulina agisce favorendo i processi di fosforilazione della tiamina¹. Questi processi in tali condizioni patologiche risultano nettamente alterati². È anche noto che nel diabete pancreatico (da spancreatizzazione e da allossana) esiste una deficienza di ATP e di fosfocreatina³. Tenendo presenti le osservazioni di LIPTON e ELVEHJEM⁴ e di WEIL-MALHERBE⁵ secondo le quali in

¹ D. SILIPRANDI e N. SILIPRANDI, Nature, 1951 (in corso di stampa). – N. SILIPRANDI e F. NAVAZIO, Acta med. Scand. 1951 (in corso di stampa).

² D. SILIPRANDI e N. SILIPRANDI, Acta vitaminologica 5, 3 (1951).

³ A. MOSCHINI, C. r. Soc. Biol. 111, 668 (1932). – TH. CAHN e J. HOUGET, C. r. Acad. Sci. Paris 203, 354 (1936). – V. BACCARI, Boll. Soc. it. Biol. Sper. 25, 356 (1949).

⁴ M. A. LIPTON e C. A. ELVEHJEM, J. Biol. Chem. 136, 637 (1940).

⁵ H. WEIL-MALHERBE, Bioch. J. 33, 1997 (1939).