

$r = 1,93(\pm 0,05) \cdot 10^{-7}$ cm aufweist. Unter Annahme eines spezifischen Gewichtes von $d_4 = 1,33$ ergibt sich danach für das Hämovanadin in der Henzelösung ein Molekulargewicht von $24\,400 \pm 1\,900$.

Tabelle II

Diffusionskoeffizient und Molgewicht von braunrotem Hämovanadin. Henzelösung I: pH = 2,5; 277 γ Vanadium/ml. Henzelösung II: pH = 2,8; 144,5 γ Vanadium/ml.

Probe	Diffusionsdauer t_s	ml Ausgangslösung diffundiert Q_{ml}	Diffusionskoeffizient $D \cdot 10^7$ bei 5°C	Molekelradius $r \cdot 10^7$ cm	Molekulargewicht M
I	86 400	1,14	7,06	1,88	22 500
	86 400	1,08	6,78	1,96	25 500
	86 400	1,10	6,71	1,98	26 200
II	129 600	1,66	6,85	1,94	24 700
	138 600	1,80	6,95	1,91	23 500
	164 700	2,14	6,93	1,92	23 900

Die Konstanz von Q_{ml} in der Zeiteinheit bei den verschiedenen Versuchen macht es unwahrscheinlich, dass in der Henzelösung mehrere, sich im Molekulargewicht wesentlich unterscheidende, vanadiumhaltige Chromoproteide vorkommen. In Übereinstimmung mit der Empfindlichkeit des Hämovanadins gegen pH-Werte unterhalb 2,5 wurden bei Diffusionsversuchen mit einem schwach angesäuerten Hämolyt (pH = 2,2) Molekulargewichte gefunden, die um etwa eine Zehnerpotenz niedriger lagen als die oben angegebenen Werte für nicht-denaturiertes, braunrotes Hämovanadin.

Nimmt man an, dass das braunrote Hämovanadin in der Henzelösung denselben Vanadiumgehalt hat wie das aus dieser Lösung mit Azeton gefällte braune Präzipitat, nämlich 4,58 % V, so enthält 1 Molekül braunrotes Hämovanadin etwa 24 Atome Vanadium.

Die Versuche am Hämovanadin wurden von Oktober bis Dezember 1953 an der Zoologischen Station Neapel ausgeführt, der wir für ihre grosszügige Unterstützung herzlich danken. Den Aufenthalt in Italien ermöglichte uns eine Zuwendung des Consiglio Nazionale delle Ricerche in Rom. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft förderte die Arbeit durch ein E. BAYER gebotenes Stipendium.

H.-J. BIELIG und E. BAYER

Max-Planck-Institut für medizinische Forschung,
Institut für Chemie, Heidelberg, den 27. April 1954.

Summary

The red-brown haemovanadin which is contained in the haemolysate (Henze Solution) of blood cells of the ascidia *Phallusia mamillata* Cuvier is a chromoprotein with trivalent vanadium as the central atom and sulphuric acid bound coordinatively. It is found to have a molecular weight of $24\,400 \pm 1\,900$ according to the estimation of the diffusion coefficient ($D_{5^\circ} = 6.87 \pm 0.2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ at pH 2.5–2.8).

Über die Natur des Leberglykogens normaler und diabetischer Tiere unter verschiedenen Bedingungen

Die zahlreichen Untersuchungen über den Glykogenstoffwechsel im diabetischen Organismus beschäftigen sich ausschliesslich mit der Menge, nicht aber mit der

Natur des gebildeten Polysaccharids. Die Befunde, die wir bei unseren Untersuchungen über den Gehalt der Leber und des Muskels an Hexosephosphorsäuren beim normalen und diabetischen Tiere erhielten¹, veranlassten uns, diese Frage zu prüfen.

Untersucht wurde die Absorption des Jod-Glykogen-Komplexes in halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung nach SCHLAMOWITZ², in halbgesättigter Natriumsulfatlösung und in wässriger Lösung, die Aufspaltungskurve des Glykogens bei der Hydrolyse in *n* HCl sowie die Zahl der Endgruppen nach der Methode von POTTER und HASSID³. Das Glykogen wurde nach den Angaben von SCHLAMOWITZ⁴ isoliert, mit dem Unterschied, dass wir zur Extraktion nicht nur 5%ige, sondern auch 30%ige Trichloressigsäure benützten und dass wir vor der Essigsäurefällung die wasserunlöslichen Stoffe durch Zentrifugieren entfernten. Die Reinheit des Glykogens bestimmten wir durch Reduktion nach $2\frac{1}{4}$ h Hydrolyse in *n* HCl nach HAGEDORN-JENSEN⁵ und nach NELSON⁶, den Phosphatgehalt nach FISKE und SUBARROW⁷. Es wurden hauptsächlich Ratten von 160 bis 200 g Körpergewicht benützt. Die alloxandiabetischen Tiere wurden 15–20 Tage nach der Verabreichung des Alloxans (15 mg/100 g Körpergewicht subkutan) verwendet; die Glukoseausscheidung betrug bei konstanter Nahrungsaufnahme täglich 6,0–8,5 g. Das Leberglykogen wurde nach Fütterung mit gemischter Diät, bei hungernden Tieren (Normaltiere 24 h, diabetische 36 h) nach Zufuhr von Glukose, Fruktose und Sorbose untersucht. Jede Versuchsserie wurde an 3–7 Tieren ausgeführt. Daneben wurde das Leberglykogen nach Glukosefütterung² auch bei einem normalen, 2 kg schweren und bei einem diabetischen Kaninchen untersucht, das 20 Tage vorher intravenös 80 mg/kg Körpergewicht Alloxan erhalten hatte und dessen Blutzucker 550 mg % betrug.

Zunächst haben wir in halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung die Jod-Glykogen-Absorptionskurve des Leberglykogens des normalen, mit Glukose gefütterten Kaninchens aufgenommen. Wie aus der Abbildung 1 hervorgeht, erhielten wir denselben Kurvenverlauf wie SCHLAMOWITZ² mit einem Absorptionsmaximum bei etwa 496 $m\mu$. Das Leberglykogen der Ratte nach Glukosefütterung ergibt unter gleichen Bedingungen annähernd denselben Kurvenverlauf wie dasjenige des Kaninchens (Abb. 1). Das Maximum liegt ebenfalls bei 496 $m\mu$, doch ist die Absorptionsintensität geringer (in halbgesättigtem Natriumsulfat ist die Absorption grösser und die Farbe stabiler als in halbgesättigtem Ammoniumsulfat). Bei den Versuchen mit alloxandiabetischen Ratten unter gleichen Bedingungen sind 2 Feststellungen hervorzuheben: 1. die Absorptionsintensität ist wesentlich geringer als beim Normaltier; 2. es besteht eine Verschiebung des Maximums nach dem kürzeren Wellenbereich (480 $m\mu$, Abb. 1). Dementsprechend ist auch die Farbe des Jod-Glykogen-Komplexes in halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung bei alloxandiabetischen Tieren anders als bei normalen, braungelb beim diabetischen, rot beim normalen. Die Untersuchung des Leberglykogens des diabetischen Kaninchens zeigte gleiche Verhältnisse (Abb. 1). Die Unterschiede in Absorption und Farbe zwischen Jod-Glykogen-Komplex

¹ E. DUPASQUIER und L. LASZT (im Druck).

² M. SCHLAMOWITZ, J. biol. Chem. 190, 519 (1951).

³ A. L. POTTER und W. Z. HASSID, J. Amer. Chem. Soc. 70, 3488 (1948).

⁴ M. SCHLAMOWITZ, J. biol. Chem. 188, 145 (1951).

⁵ H. C. HAGEDORN und B. N. JENSEN, Biochem. Z. 135, 46 (1923); 137, 92 (1923).

⁶ N. NELSON, J. biol. Chem. 153, 375 (1944).

⁷ G. H. FISKE und Y. SUBARROW, J. biol. Chem. 66, 375 (1925).

der Leber normaler und diabetischer Tiere sind auch in salzfreier, wässriger Lösung vorhanden (Abb. 2). Das Leberglykogen alloxandiabetischer Ratten, die mit Glukose gefüttert und mit Insulin behandelt wurden, zeigt die gleiche Absorptionskurve und die gleichen Farbverhältnisse wie beim Normaltier, jedoch ist die Absorptionsintensität grösser (Abb. 1). Beim mit Insulin behandelten Tier war die Menge des isolierten Glykogens grösser. Es wurde nicht die absolute, sondern nur die isolierte Glykogenmenge gewogen (Tabelle).

Isolierte Menge Glykogen je Leber

Fütterungsart	Normal		Diabetisch	
	Lebergewicht g	Glykogenmenge mg	Lebergewicht g	Glykogenmenge mg
Glukose* . .	5,5 (7)	53,0	6,5 (7) [5,9 (4)]	68,5 187,0
Fruktose** .	5,7 (4)	160,0	6,1 (4)	190,0
Sorbose*** .	5,85 (3)	26,2	6,1 (3)	31,5

() Zahl der Tiere. * Je 5 cm³ 20%ige Lösung, 3 und 2 h vor der Leberentnahme. [] Behandlung mit Insulin: am 3. und 2. Tag vor dem Versuch 2 × 12 E., 24 h vorher hungern, 4 und 3 h vor der Leberentnahme je 8 E., 3 und 2 h vorher je 5 cm³ 20%ige Glukose-Lösung. ** Je 5 cm³ 15%ige Lösung, 5 und 3 h vor der Leberentnahme. *** Je 5 cm³ 10%ige Lösung, 6 und 3 h vor der Leberentnahme.

Nach Fruktosefütterung besteht zwischen normalen und diabetischen Ratten nur noch ein geringer Unterschied in der Absorptionsintensität, die Farbe ist gleich. Die Menge des isolierten Glykogens ist hier grösser als

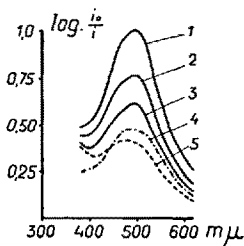


Abb. 1. Absorptionskurve des Jod-Glykogen-Komplexes der Leber von mit Glukose gefütterten Tieren, in halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung. 1 Kaninchen, normal; 2 Ratte, diabetisch, mit Insulin behandelt; 3 Ratte, normal; 4 Kaninchen, diabetisch; 5 Ratte, diabetisch. Alle Messungen sind mit dem Beckmann-Photometer (1-cm³-Küvette) unter Berücksichtigung der Lichtstreuung des Glykogens und der Absorption der verwendeten Jodlösung aufgenommen worden.

nach Glukosefütterung. Dieses unterschiedliche Verhalten des Glykogens, je nachdem, ob Glukose oder Fruktose verfüttert wurde, kann nicht etwa auf die langsamere Resorption der Fruktose zurückgeführt werden, da nach Verabreichung von Sorbose, die bekanntlich noch wesentlich langsamer resorbiert wird, die gleichen Verhältnisse wie nach Glukosefütterung zu beobachten sind. Es wäre falsch, anzunehmen, dass der Fruktosestoffwechsel insulinunabhängig ist. Es wird nämlich auch die zugeführte Fruktose beim diabetischen Tier zum Teil unverändert und zum Teil in Form von Glukose ausgeschieden.

Es stellt sich nun die Frage, ob in der Leber diabetischer Tiere verschiedene Polysaccharide, darunter auch normales Glykogen, gebildet werden. Wir haben versucht, das isolierte Polysaccharid in mehrere Fraktionen

zu zerlegen durch stufenweise Fällung mit gesättigter wässriger Ammoniumsulfatlösung (g.A.S.-Lösung). Dabei fanden wir, dass nach Zusatz der 6fachen Menge g.A.S.-Lösung zu der Polysaccharidlösung, die aus der Leber normaler oder diabetischer Tiere gewonnen ist, sofort eine Fällung entsteht. Der durch Abzentrifugierung isolierte Niederschlag ist in Wasser löslich. Zentrifugiert man hingegen den Niederschlag erst nach 12–14 h ab, so zeigt sich ein wesentlicher Unterschied.

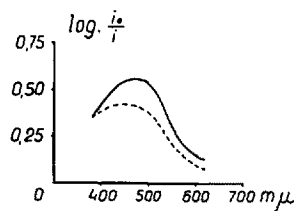


Abb. 2. Absorptionskurve des Jod-Glykogen-Komplexes der Leber von mit Glukose gefütterten Ratten, in salzfreier, wässriger Lösung (3 cm³ 0,5%ige Glykogen- + 0,1 cm³ Jodlösung: 0,125% Jod, 0,25% Kaliumjodid). Ausgezogene Linie: normal. Gestrichelte Linie: diabetisch.

Das Polysaccharid von normalen Tieren ist in Wasser und in *n* HCl bei Zimmertemperatur unlöslich, wohl aber beim Erwärmen. Dagegen löst sich das Polysaccharid von diabetischen Tieren auch in der Kälte glatt in Wasser. Mit gesättigtem Natriumsulfat bleibt diese Reaktion aus. Um Anhaltspunkte über den Zusammenhang zwischen der Struktur des Polysaccharids und der erwähnten Reaktion zu erhalten, haben wir die gleichen Versuche auch mit Amylose und Amylopectin (Kartoffel¹) durchgeführt. Beide Stoffe verhalten sich wie Normalglykogen. Zur Fraktionierung gingen wir von 4 cm³ einer 2,5%igen Lösung des Polysaccharids aus, die mit 3½ Volumen g.A.S.-Lösung versetzt und nach 5' Stehen während 10' zentrifugiert wurden. Die über-

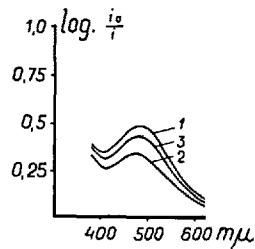


Abb. 3. Absorptionskurven des Jod-Polysaccharid-Komplexes der verschiedenen Fraktionen in halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung. 1 Fraktion 1; 2 Fraktion 2; 3 Totalgemisch.

stehende Flüssigkeit wurde mit 2½ Volumen und schliesslich mit dem dreifachen Volumen g.A.S.-Lösung versetzt und jeweils zentrifugiert. Mit dem 3½-fachen Volumen g.A.S.-Lösung ergab sich für das Polysaccharid des diabetischen Tieres eine erste Fraktion, mit dem sechsfachen eine zweite und mit dem neunfachen (letztere in 2 von 4 Versuchen) eine dritte. Beim Normaltier erhielten wir nur eine Fällung nach Versetzen mit dem 3½-fachen Volumen. Die einzelnen Fällungen wurden auf die gleiche Weise wie die Glykogenrohextrakte gereinigt (Eliminierung des Fällungsmittels). Dass es sich hier um verschiedene Polysaccharide handelt, geht aus der Verschiedenheit der Absorptionsintensität der Jod-Komplexe (Abb. 3) sowie der Aufspaltungsgeschwindig-

¹ Ich danke dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Genf für die freundliche Überlassung dieser Produkte.

keit der Polysaccharide hervor. Es sei hier besonders auf die rasche Aufspaltung des aus der Leber diabetischer Ratten isolierten Polysaccharids hingewiesen. Dieses ist bereits nach etwa 60–65' (nach Vorbehandlung mit Insulin 135') aufgespalten, Fraktion 3 nach 35', Fraktion 1 nach 75' (Abb. 4).

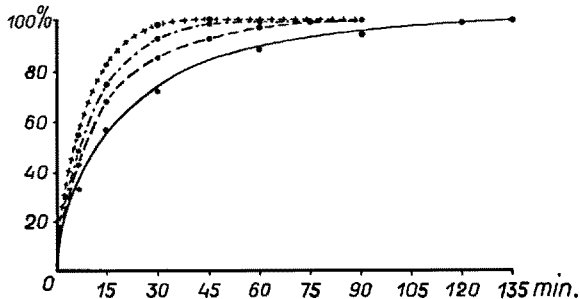


Abb. 4. Aufspaltungskurven der verschiedenen Polysaccharidfraktionen der Leber nach Hydrolyse in 2 N HCl (10 mg Polysaccharid in 10 cm³ Wasser gelöst + 10 cm³ 2 N HCl). Diabetische, mit Glukose gefütterte Ratte: ---- erste Fraktion; zweite Fraktion; +++ dritte Fraktion. Diabetische, mit Insulin behandelte, mit Glukose gefütterte Ratte: —————

Die Endgruppenzahlbestimmungen haben merkwürdigerweise sowohl beim normalen als beim diabetischen Glykogen den gleichen Wert ergeben (normal: 19,8, diabetisch: 19,3). Zu dieser Untersuchung wurden je 10 mit Glukose gefütterte, normale und diabetische Ratten verwendet. Die Perjodatoxydation erfolgte in 100-mg-Portionen und als Endwert wurden 25 h gewählt.

Die Versuche zeigen, dass in der Leber diabetischer Tiere andere, und zwar labilere Polysaccharide gebildet werden als bei normalen Tieren. Es werden weitere Untersuchungen über die Natur der im Muskel normaler und diabetischer Tiere vorhandenen Polysaccharide sowie über deren enzymatische Spaltung durchgeführt.

L. LASZT

Physiologisches Institut der Universität Fribourg, den 17. April 1954.

Summary

In the liver of diabetic animals, other and more labile polysaccharids are formed than in that of normal animals.

The iodine absorption, the speed of breakdown and the reaction with saturated ammonium sulfate of the polysaccharids isolated from the liver are different in the diabetic animal from those in the normal one.

The stepwise precipitation with ammonium sulfate of the polysaccharide isolated from the liver yielded 3 fractions in the diabetic animal whereas there was only one in the normal animal.

Veränderungen in der Mitochondrienfraktion der Rattenleber nach Total- und Leberfeldbestrahlung (1000 r)

Der Mechanismus der Strahlenwirkung auf den lebenden Organismus ist noch in vielfacher Beziehung unklar. Bekannt sind vor allem die Schädigungen des Zellkerns, welcher Röntgenstrahlen gegenüber besonders empfindlich ist. Das komplexe klinische Bild, das nach Strahleneinwirkungen auftritt, lässt eine Vielzahl von Störungen namentlich auch im Bereiche des Zellplasmas vermuten. Über eine Herabsetzung der oxydativen Phos-

phorylierung in den Milzmitochondrien bestrahlter Tiere ist kürzlich von verschiedenen Autoren berichtet worden¹. Im Gegensatz dazu sind Wirkungen auf die relativ strahlenresistente Leber weniger bekannt, obgleich dieses Organ im Intermediärstoffwechsel eine zentrale Stellung einnimmt. Es wurde daher das Verhalten von Mitochondrien aus der Leber normaler und bestrahlter Ratten untersucht.

Ratten beiderlei Geschlechts von 200 bis 300 g Körpergewicht wurden folgendermassen behandelt: 1. Leberfeldbestrahlung (3 × 2 cm) a) mit Betatron (Serie I) 1000 r, 31 MeV, b) mit üblicher Röntgenbestrahlung (Serie II) 1000 r, 200 kV, 15 mA, Cu 0,5, HWS_{Cu} 0,83, FA 40 cm. 2. Allgemeinbestrahlung (Serie III), 1000 r, 250 kV, 15 mA, Th I, HWS_{Cu} 1,52, FA 50 cm. Töten der Tiere 1–3 Tage (Allgemeinbestrahlung) bzw. 1–10 Tage (Leberfeldbestrahlung) nach Strahleneinwirkung. Es wurden bestimmt: a) Das relative Lebergewicht und der Wassergehalt des Lebergewebes. b) Die Aktivität der Succinodehydrase im Totalhomogenat nach SCHNEIDER und POTTER² als Beispiel eines einzelnen am Kohlenhydratabbau beteiligten Ferments. c) die Pyruvatoxydation und die Mitochondrienschwellung nach RAAFLAUB³ bzw. AEBI und ABELIN⁴. Zur Pyruvatoxydation bedarf es der morphologischen und funktionellen Intaktheit der Mitochondrien, da dieser Oxydationsvorgang auf der Zusammenarbeit einer ganzen Reihe von Fermenten (Enzymkomplex der Zyklusphosphatase) beruht. Andererseits ist die Unterdrückung der ausgeprägten Schwellungstendenz der isolierten Mitochondrien an die Bildung (Resynthese) einer genügenden Menge von ATP gebunden. Die Schwellung der Mitochondrien kann auf photometrischem Wege als Extinktionsabfall erfasst werden. Beide Verfahren geben somit indirekt Aufschluss über das Funktionieren der oxydativen Phosphorylierung. Die angewandten Methoden sind beschrieben (siehe ⁵).

Die Resultate sind in der Tabelle wiedergegeben. Es ergibt sich folgender Befund: Während die Aktivität der Succinodehydrase von der Bestrahlung in keiner Weise beeinflusst wird, lassen sowohl die verminderte Pyruvatoxydation als auch der erhöhte Schwellungsgrad der Mitochondrien (Extinktionsabnahme der Mitochondrien suspension) auf eine Störung der oxydativen Phosphorylierung von allerdings geringem Ausmass schliessen.

Dieser fundamentale Prozess der Energieumwandlung erleidet somit nicht nur in der Milz, sondern auch in der eher strahlenresistenten Leber eine *in vitro* fassbare Schädigung. Da es sich hier anscheinend um eine generell auftretende Stoffwechselstörung handelt, ist zu vermuten, dass ihr bei der Genese des Strahlenschadens eine Bedeutung zukommt. Schliesslich ist folgender Befund von Interesse: Obwohl die Totalbestrahlung innerhalb von 4 Tagen stets zum Tode führte, die Lokalbestrahlung im Gegensatz dazu sich in keinem einzigen Fall letal auswirkte, hatten beide Bestrahlungsverfahren qualitativ und quantitativ die gleichen biochemischen Veränderungen zur Folge. Es darf daher angenommen

¹ R. L. POTTER und F. H. BETHELL, Federation Proc. 11, 270 (1952). – E. MAXWELL und G. ASHWELL, Arch. Biochem. 43, 389 (1953). – D. W. VAN BEKKUM, H. J. JONGEPIER, H. T. M. NIEUWERKERK und J. A. COHEN, Transactions Faraday Soc. 49, 363 (1953), Brit. J. Radiol. 27, 127 (1954).

² W. C. SCHNEIDER und V. R. POTTER, J. Biol. Chem. 149, 217 (1943).

³ J. RAAFLAUB, Helv. physiol. Acta 11, 142 (1953).

⁴ H. AEBI und I. ABELIN, Biochem. Z. 324, 364 (1953).

⁵ H. AEBI und I. ABELIN, Biochem. Z. 324, 364 (1953).