

Known antischwelling agents of mitochondria like KCN, Na-azide, amytal, antimycin A, and sucrose (0.88 M) were tested to observe their effects on both glutaminase I and the corresponding swelling. It was observed that both glutaminase I and swelling of fresh mitochondria were inhibited by these substances. However, with aged and preswollen mitochondria, all these inhibitors, except Na-azide, failed to inhibit the glutaminase I activity (Table II), indicating that the inhibition of enzymic activity by the above substances was primarily due to their antischwelling action on fresh mitochondria. Na-azide, however, was inhibitory to both swelling and glutaminase I. Hypertonic sucrose (0.88 M) in fresh mitochondrial preparation prevented swelling as well as glutaminase I activity with the usual 0.2 M phosphate concentration, but on further addition of phosphate to a final concentration of 0.4 M, both these activities reappeared.

That swelling of mitochondria releases some hydrolytic enzymes has been reported previously⁴; but no work has been done with regard to glutaminase I. Data presented above strongly suggest that swelling of mitochondria caused either by the added anions themselves, like phosphate and arsenate, or due to induced ageing or preswollen condition, as with pyrophosphate and sulphate, is a prerequisite condition for the demonstration of anion activation of glutaminase I of guineapig liver mitochondria.

S. R. GUHA and H. S. CHAKRAVARTI

Indian Institute for Biochemistry and experimental Medicine, Calcutta (India), March 7, 1960.

Zusammenfassung

Die dargelegten Versuche beweisen, dass die durch Anionen (Phosphat und Arsenat) herbeigeführte Anschwellung von Mitochondrien der Meerschweinchenleber eine Vorbedingung ist für die Glutaminase I-Aktivierung. Pyrophosphat, das die Schwellung hemmt, und Sulfat, das sie nicht beeinflusst, aktiviert das Enzym erst nach vorheriger Anschwellung der Mitochondrien.

Distributions of Cholesterol Amongst Liver Subcellular Fractions

Assays for the cholesterol content of various subcellular fractions derived from rat liver homogenates have been reported by a number of investigators¹⁻⁵ and are presented in Table I. In each instance mitochondria were isolated under conditions of centrifugation (18 000–24 000 × g for 10 min) sufficient to sediment microsomes as well.

Mitochondria obtained from rat and mouse liver homogenates by centrifugation at 8500 × g for 10 min, then washed by resuspension and recentrifugation, have been employed in studies of the cholesterol oxidase system⁶⁻⁹. Addition of the microsomal fraction to these '8500 × g' mitochondria, omission of the washing procedure, or isolation of mitochondria under higher centrifugal forces for the same time interval, in each case severely depressed oxidation of added cholesterol -C¹⁴ by the cholesterol oxidase present in the mitochondria. This has been traced in part to the relatively high endogenous content of free cholesterol in the liver microsomal fraction which effectively dilutes any added radioactive cholesterol.

Table II records the relative distribution of liver cholesterol amongst various subcellular fractions of a number of animals. The fractions were isolated according to the

scheme presented in the Figure. Liver specimens were washed three times with 10% w/v sucrose before homogenization in a Potter-Elvehjem homogenizer. The subcellular fractions were digested in warm 30% aq. KOH and the cholesterol extracted with petroleum ether. After the petroleum ether extracts were dried over anhydrous Na₂SO₄ aliquots were analyzed for cholesterol using the method of TRINDER¹⁰.

The consistency of the liver mitochondrial cholesterol content in several animal species is of interest. SCHOTZ, RICE, and ALFIN-SLATER³ found that their preparations of rat liver mitochondria contained 0.20 mg cholesterol. Our preparations, derived from the same volume of liver homogenate (4.0 ml), contained on the average only about 0.13 mg.

Tab. I. Percentage Recovery of Total Cholesterol in Mouse and Rat Liver Fractions

Fraction	Ref. 1 ^a	Ref. 2 ^b	Ref. 3 ^a	Ref. 4 ^a	Ref. 5 ^a
Nuclei	—	—	6.0	0.7	—
Mitochondria	1.3	3.5	13.7	1.2	2.2
Microsomes	—	5.1	—	1.9	—
Supernatant	—	2.8	—	0.3	—

^a Rat. ^b Mouse.

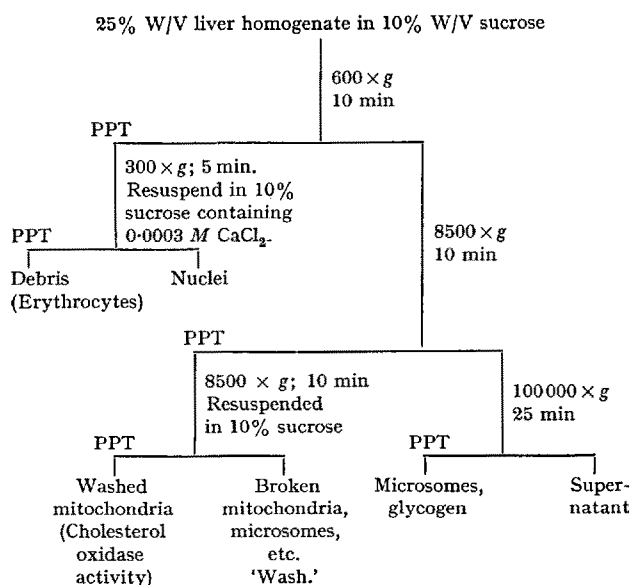
Tab. II. Average Percentage of Total Liver Cholesterol Recovered (No. of experiments in parentheses)

Fraction	Species					
	Mouse ^a (2)	Rat (3)	Chicken (3)	Rabbit (2)	Monkey (1)	Human (1)
Debris and nuclei	39.0	53.7	60.1	58.0	58.7	56.4
Mitochondria	7.8	6.3	7.6	8.1	6.5	6.9
Mitochond. wash	14.9	7.0	7.0	10.9	6.5	6.9
Microsomes	33.5	25.0	15.3	15.1	9.5	10.5
Supernatant	4.8	8.0	10.0	7.9	18.6	19.5

^a Pooled livers of 4 mice used.

¹ M. A. SWANSON and C. ARTOM, J. biol. Chem. 187, 281 (1950).
² N. KRETCHMER, and C. P. BARNUM, Arch. Biochem. Biophys 31, 141 (1951).
³ M. C. SCHOTZ, L. I. RICE, and R. B. ALFIN-SLATER, J. biol. Chem. 204, 19 (1953).
⁴ M. J. SPIRO and J. M. MCKIBBIN, J. biol. Chem. 219, 643 (1956).
⁵ J. G. HAUGE, Acta physiol. scand. 45, 375 (1958).
⁶ M. W. WHITEHOUSE, E. STAPLE, and S. GURIN, J. biol. Chem. 234, 276 (1959).
⁷ D. KRITCHEVSKY, R. R. KOLMAN, M. W. WHITEHOUSE, M. C. COTTRELL, and E. STAPLE, J. Lipid Res. 1, 83 (1959).
⁸ D. KRITCHEVSKY, M. W. WHITEHOUSE, and E. STAPLE, J. Lipid Res. 1, 154 (1960).
⁹ H. DANIELSSON and M. G. HORNING, Biochim. biophys. Acta 34, 596 (1959).
¹⁰ P. TRINDER, Analyst. 77, 321 (1952).
¹¹ Present address: Department of Biochemistry, University of Oxford (England).

Scheme of Liver Fractionation



Acknowledgements. We wish to thank Mrs. R. KOLMAN and Mrs. M. COTTRELL for skillful technical assistance. We are grateful to Dr. S. COOPERBAND for making the human liver available to us and to Dr. L. FERRIGAN for the monkey liver.

This work was supported, in part, by grants from The National Institutes of Health (H-3299) and the John A. Hartford Foundation, Inc.

D. KRITCHEVSKY, J. LANGAN,
and M. W. WHITEHOUSE¹¹

Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia (Pennsylvania) and Department of Biochemistry, School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, March 7, 1960.

Zusammenfassung

Der Cholesteringehalt der subzellulären Komponenten von Lebergewebe verschiedener Tierarten wurde untersucht. Die subzellulären Fraktionen bestanden hauptsächlich aus Mitochondrien und waren relativ frei von Mikrosomen.

Transaminasenaktivität nach Methyltestosteron-, Testosteronpropionat-, Chlorpromazin- und Methylthiouracilbehandlung

Eingehendere Untersuchungen über Aktivitätsänderungen der Transaminasen im Serum (SGO-T, SGP-T) liegen vor allem bei Herzinfarkt und bei Lebererkrankungen vor. Anfangs glaubte man, dass bei Lebererkrankungen der Fermentanstieg im Serum von dem Ausmass der Zellschädigung abhängig sei. Später jedoch haben experimentelle Untersuchungen und klinische Beobachtungen gezeigt, dass die Höhe der Serum-Fermentaktivität nicht nur durch die Freisetzung der Fermente aus dem erkrankten Organ beeinflusst wird, sondern auch von der Grösse des Fermentschwundes aus der Blutbahn abhängig ist. Nach AMELUNG *et al.*¹ können an dem Fermentschwund folgende Vorgänge beteiligt sein:

1. intra- oder extravasaler Abbau bzw. Inaktivierung der Transaminasen;

2. Aufnahme der Fermente in aktiver Form durch die Zellen;

3. Ausscheidung der Fermente durch Leber oder Niere. Auf eine Diskrepanz zwischen dem Ausmass der Lebernekrosen und der Aktivitätszunahme der Transaminasen im Blutserum machten schon MOLANDER *et al.*² aufmerksam, die bei Kranken mit cholangiolitischer Zirrhose, wo in der Leber weniger eine Nekrose zu finden war, eine höhere Transaminasenaktivität vorfanden als bei Kranken mit Laenecscher Zirrhose. Einige Arzneimittel (Salvarsan, Methyltestosteron, Paraaminosalicylsäure, Methylthiouracil, Chlorpromazin, Phenothiazin, Toluylen-diamin, Dinitrophenol, Atophan) können eine cholangiolitische Hepatitis mit Icterus hervorrufen. Grösste Aufmerksamkeit widmet man in letzter Zeit dem Icterus nach der Chlorpromazinbehandlung und seiner Derivate. Der Icterus nach diesem Arzneimittel tritt ungefähr in 1% der Fälle ein, jedoch haben SHAY und SIPLET³ eine Aktivitätszunahme der SGO-T während 1–4wöchiger Therapie bei fast 30% ihrer Kranken festgestellt.

Wir haben uns die Aufgabe gestellt, nicht nur den Einfluss des Chlorpromazins, sondern auch des Methyltestosterons und Methylthiouracils auf die Fermentaktivität der SGO-T und SGP-T zu verfolgen. Wir untersuchten 62 Kranke der Psychiatrischen Abteilung, die mit Chlorpromazin etwas über 2 Wochen behandelt wurden. Eine Aktivitätserhöhung der SGO-T mit einem Maximalwert von 248 Einheiten fanden wir bei 12 Kranken. Die Aktivitätsbestimmung wurde jedoch nicht in allen Fällen von Beginn der Chlorpromazinbehandlung an durchgeführt. Eine 14tägige perorale Methylthiouracilbehandlung (200 bis 400 mg täglich), die bei 6 Kranken angesetzt wurde, rief keinen bemerkenswerten Aktivitätsanstieg hervor. Weitere 40 Kranke bekamen vorwiegend wegen Osteoporose 30 mg Methyltestosteron *per os* täglich. Bei 31 Kranken (77%) wurde nach durchschnittlicher 10tägiger Behandlung ein Anstieg der SGO-T (Maximalwert 275 Einheiten) und der SGP-T (Maximalwert 260 Einheiten) gegenüber dem Ausgangswert vor der Behandlung festgestellt. Die Leberfunktionsteste (Bilirubinämie, Thymoltrübungstest, Takatareaktion und Weltmannkoagulationsband) blieben unverändert. Bei 10 Patienten, die täglich 30 mg Testosteronpropionat i. m. mindestens 14 Tage hindurch erhielten, wurde keine Aktivitätsveränderung der Transaminasen beobachtet. Bei 6 Versuchsratten (3 weibliche und 3 männliche), denen 10 Tage lang täglich 5 mg Methyltestosteron verabreicht wurde, haben wir keine histologischen Veränderungen in der Leber vorgefunden.

An Hand unserer Ergebnisse müssen wir annehmen, dass Methyltestosteron im Vergleich zu Chlorpromazin wesentlich öfters einen Aktivitätsanstieg der Transaminasen hervorruft. Der Aktivitätsanstieg ist beim Methyltestosteron wahrscheinlich durch die Methylgruppe bedingt und braucht nicht immer eine toxische Schädigung der Leber zu bedeuten.

Wir danken Herrn Prof. E. VENCOVSKÝ von der Psychiatrischen Universitätsklinik Plzeň für die freundliche Überlassung des Krankengutes und Herrn Prof. J. VANĚK aus dem Pathologisch-Anatomischen Institut für die Anfertigung der histologischen Präparate.

V. PETERA und V. LAHN

Medizinische Universitätsklinik Plzeň (Tschechoslowakei), 3. März 1960.

¹ D. AMELUNG, H. D. HORN und E. SCHRÖDER, *Klin. Wschr.* 36, 963 (1958).

² D. W. MOLANDER, E. SHEPHARD und A. M. PAYNE, *J. Amer. med. Ass.* 163, 1461 (1957).

³ H. SHAY und H. SIPLET, *Gastroenterology* 32, 571 (1957).