

Enzymatic Test for the Detection of a Riboflavin Deficiency. NADPH-Dependent Glutathione Reductase of Red Blood Cells and its Activation by FAD in vitro¹

Up to now, no enzymatic test has been available for the detection of a riboflavin deficiency². Blood riboflavin levels and urinary excretion data are used to evaluate the riboflavin nutritional status in animals and humans. An enzymatic assay comparable with that applied in measuring the thiamine or pyridoxine status (transketolase³ or glutamic-oxalacetic transaminase⁴ activities of erythrocytes, respectively) has been tried in our laboratory and showed promising results.

NADPH-dependent glutathione reductase of red blood cells appears to be a flavoenzyme. FAD is capable of stimulating the enzyme activity of red blood cells of rats⁵ and humans⁶. Lately, ICÉN⁷ demonstrated that the purified enzyme from human red blood cells contains a flavin which behaves like FAD.

We found that, in riboflavin-deficient rats, the NADPH-dependent glutathione reductase activity of hemolyzed red blood cells when FAD is added is activated to a significantly larger extent than in animals fed riboflavin. Using an optical test, which is based on the method of RACKER⁸, we observed that the glutathione reductase from rats fed a riboflavin supplemented diet was activated by about 70% on the average after addition of FAD to the assay system, while the enzyme activity from animals fed a riboflavin deficient diet was increased by 200–300%.

In humans, the NADPH-dependent glutathione reductase in red blood cells is more active than in rats and the extent of activation by FAD is less pronounced. In healthy blood donors, for instance, the activity of the enzyme is only slightly influenced by the addition of FAD, leading to an inhibition or activation of about 0–10%. This is in agreement with the observation of ICÉN⁷, who found an activation of about 9% of the purified native glutathione reductase when adding FAD. In patients with clinical symptoms of riboflavin deficiency (stomatitis etc.) we observed an activation of the glutathione reductase of up to 20% and more. Further work is in progress⁹.

Zusammenfassung. Die NADPH-spezifische Glutathionereduktaseaktivität hämolysierter Erythrozyten erscheint brauchbar als Parameter zur Erfassung von Riboflavinmangelzuständen. Die Enzymaktivität wird in vitro durch einen Zusatz von FAD bei Riboflavinmangelratten wesentlich stärker erhöht als bei Kontrollratten. Untersuchungen mit menschlichen Erythrozyten deuten darauf hin, dass auch hier die Aktivierbarkeit des Enzyms durch FAD vom Riboflavinstatus abhängt.

D. GLATZLE, F. WEBER and O. WISS

Department of Vitamin and Nutritional Research,
F. Hoffmann-La Roche & Co. Ltd., Basel
(Switzerland), 16 August 1968.

¹ The following abbreviations are used: NADPH, reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (triphosphopyridine nucleotide); FAD, flavin adenine dinucleotide.

² W. N. PEARSON, Am. J. clin. Nutr. 20, 514 (1967).

³ M. BRIN, M. V. DIBBLE, A. PREL, E. McMULLEN, A. BOURQUIN and N. CHEN, Am. J. clin. Nutr. 17, 240 (1965).

⁴ N. RAICA JR. and H. E. SAUBERLICH, Am. J. clin. Nutr. 15, 67 (1964).

⁵ J. A. BUZARD and F. KOPKO, J. biol. Chem. 238, 464 (1963).

⁶ E. M. SCOTT, I. W. DUNCAN and V. EKSTRAND, J. biol. Chem. 238, 3928 (1963).

⁷ A. ICÉN, Scand. J. clin. Lab. Invest. 20, Suppl. 96, 29 (1967).

⁸ E. RACKER, in *Methods in Enzymology* (Ed. S. P. Colowick and N. O. KAPLAN; Academic Press, New York 1955), vol. 2, p. 722.

⁹ Note added in proof. Meanwhile we received notice that G. E. J. STAAL et al., Ned. Tijdschr. Geneesk. 112, 1008 (1968) observed a very similar effect of FAD on the glutathione reductase from erythrocytes of a patient who suffered from α -thalassaemia. No explanation is given for this; our results suggest that there possibly was a riboflavin deficiency in the patient. The in vivo activation of the enzyme by riboflavin phosphate which was observed in this case is in agreement with an in vivo reactivation we found in rats, when riboflavin deficient animals had been supplemented with riboflavin.

Fische mit abweichender Normallage

Bei einigen Fischarten bildet die Längsachse bei Normallage einen Winkel mit der Horizontalen. Unter Normallage verstehen wir die Gleichgewichtshaltung, bei der keine Lagekorrektur erfolgt. Wir nennen Arten, die in Normallage mit dem Kopf schräg nach oben zeigen (*Thayeria*, *Hemiodus*, *Poecilobrycon*), Schrägstehender Arten, die in Normallage mit dem Kopf schräg oder senkrecht nach unten weisen (*Abramites*, *Chilodus*, *Monocirrhus*, *Aeoliscus*), bezeichnen wir als Kopfstehender Arten, die in Normallage 180° bauchoben schwimmen (*Synodontis nigriventris*), heissen Rückenschwimmer. Die systematische Stellung der besprochenen Arten geht aus Tabelle 3 hervor.

Thayeria und *Hemiodus*¹ weisen immer 25° nach oben. *Poecilobrycon* schwimmt am Tag im Hellen 45–75° kopfoben, nachts im Dunkeln viel weniger schräg. Die Neigung fällt mit zunehmender Körperlänge. Auch die Kopfstehender *Abramites* und *Chilodus* verringern ihre Schräglage mit steigender Körperlänge. Jungtiere schwimmen fast senkrecht kopf unten, adulte Fische nehmen dauernd eine Normallage von 45° ein. *Monocirrhus* treibt normalerweise

etwa 45° kopf unten und legt sich bei Beunruhigung auf die Seite, mit horizontaler Längs- und Dorsoventralachse. *Aeoliscus* schwimmt in Normallage vertikal kopf unten. Die meisten *Synodontis*-Arten schwimmen nur in Rückenlage, wenn sie Kontakt mit der Wasseroberfläche haben. *S. nigriventris* u.a. schwimmen auch im Freiwasser in Rückenlage. Die Drehung in Rückenlage geschieht um die Längs- oder um die Querachse. Die *Synodontis*-Arten können in Ruhe vertikal, kopf oben oder - unten schwimmen. *Anostomus* und *Leporinus* werden fälschlich als Kopfstehender bezeichnet^{2–6}, denn sie schwimmen nur ausnahmsweise kopf unten. Sie können beim Fressen jede Lage einnehmen, ruhen aber stets in Horizontallage. *Leporinus* neigt sich senkrecht nach oben, wenn er die Unterseite von Blättern abweidet. *Anostomus* dreht sich um 135–180° in Rückenlage, wenn er mit seinem oberständigen Maul Nahrung vom Boden aufnimmt. Die Drehung in Rückenlage erfolgt um die Längs- oder um die Querachse. Nach dem Fressen dreht sich *Anostomus* sofort wieder in die horizontale Normallage.

Tabelle I. Die Neigung der Utriculus-Statolithen bei Fischen (Characiformes) mit abweichender Normallage

Art	Länge des Fisches in mm	Neigung der Utriculus-Statolithen gegen die Fisch-längsachse in Grad
Schrägsteher:		
<i>Hemiodus</i>	35	12
<i>semitaeniatus</i>	35	16
<i>Thayeria</i>	?	26*
<i>obliqua</i>	35	26
<i>Poecilobrycon</i>	5	31*
<i>eques</i>	22	24
	26	18
	26	17
	26	13
	28	17
	29	21
	30	17*
	36	15
	45	9
	52	7
	50-60	14*
Kopfsteher:		
<i>Chilodus</i>	?	5-10*
<i>punctatus</i>	39	12
	44	17
	45	12
<i>Aramites microcephalus</i>	60	6

* Daten nach 10.

Der Utriculus-Otolith (Lapillus) ermöglicht die Gleichgewichtsorientierung der Fische^{7,8}. Bei *Gymnocrymbus* liegt er bei Normallage horizontal im Fisch und im Raum⁹, im Gegensatz zu Fischen mit abweichender Normallage (Tabelle I). Bei *Thayeria* und *Hemiodus* liegt er bei Normallage waagrecht im Raum. *Poecilobrycon* bringt ihn nachts in Horizontallage¹⁰. Bei *Chilodus* und *Aramites* ist er bei Normallage der Tiere 50-70° gegen die Horizontale geneigt, was eine Beteiligung anderer Otolithen an der Gleichgewichtsorientierung dieser Kopfsteher vermuten lässt.

Über die mechanischen Ursachen des Kopfstehens von *Chilodus* und *Aramites* geben mit MS 222 narkotisierte Individuen Aufschluss. Sie drehen sich 180° um ihre Querachse (Tabelle II) und schwimmen kopf- und bauchoben. Bei den betäubten Fischen liegt das Auftriebszentrum senkrecht über dem Schwerpunkt. In Normallage schwimmen kleine und grosse Exemplare so, dass ihr Schwerpunkt senkrecht über dem Auftriebszentrum liegt. Um diese Lage einzuhalten, braucht das Tier die geringste Kraft, abgesehen von der um 180° gedrehten, passiven Lage bauch- und kopfböen. Die mechanische Drehtendenz, gegen die ein Fisch ankämpfen muss, ist gleich Null, wenn sein Schwerpunkt senkrecht über dem Auftriebszentrum liegt. Sie steigt mit dem Sinus des Winkels, den die Linie Schwerpunkt-Auftriebszentrum mit der Vertikalen bildet, und erreicht bei 90 und 180° je ein Maximum. Adulte *Aramites* und *Chilodus* würden in diesen Fällen 45° kopfböen-bauchunten bzw. 45° kopfunten-bauchoben schwimmen. Beide Lagen habe ich nie beobachtet. Die schräge Normallage der Kopfsteher *Aramites* und *Chilodus* und die Abnahme ihrer Neigung mit steigender Körperlänge finden ihre Erklärung in der Position von Auftriebszentrum und Schwerpunkt und der mit dem Wachstum einhergehenden Veränderung der Beziehung beider Punkte zueinander. Schliesslich sei erwähnt, dass *Aramites* und

Tabelle II. Die Neigung der Längsachse von Kopfsteher (Characiformes) gegen die Horizontale bei Normallage und in Narkose

Art	Länge des Fisches in mm	Neigung des Fisches gegen die Horizontale in Grad bei Normallage	Neigung des Fisches gegen die Horizontale in Grad bei Narkose
<i>C. punctatus</i>	35	60	240
	38	55	235
	60	45	225
<i>A. microcephalus</i>	60	45	225

Tabelle III. Systematische Stellung der besprochenen Fische

Ordnung	Unterordnung	Familie	Gattung
Ostariophysi	Characoidei	Characidae	<i>Gymnocrymbus</i>
			<i>Thayeria</i>
		Lebiasinidae	<i>Poecilobrycon</i>
		Anostomidae	<i>Aramites</i>
			<i>Anostomus</i>
			<i>Leporinus</i>
		Hemiodontidae	<i>Hemiodus</i>
		Chilodontidae	<i>Chilodus</i>
Perciformes	Siluroidei	Mochokidae	<i>Synodontis</i>
	Percoidei	Nandidae	<i>Monocirrhus</i>
Gasterosteiformes	Aulostomoidei	Centriscidae	<i>Aeoliscus</i>

Chilodus, wie auch *Hemiodus* und *Thayeria*, verschiedenen Familien der Characoidei angehören (Tabelle III). Es handelt sich bei ihrer abweichenden Normallage also jeweils um eine Konvergenz¹¹.

Summary. Fish which normally swim with their long axes obliquely to the horizontal were observed alive in aquaria. The angle of inclination of the lapilli was measured in several species of slope-oriented fish (Table I). The mechanical equilibrium was studied in the headstanders *Chilodus* and *Aramites* (Table II).

WOLFGANG PFEIFFER

Zoophysiological Institut der Universität, 74 Tübingen (Deutschland), 21. Juni 1968.

¹ W. PFEIFFER, Z. vergl. Physiol. 47, 111 (1963).² H. R. AXELROD, C. W. EMMENS, D. SCULTHORPE, W. VORDERWINKLER, R. SOCOLOF und N. PRONEK, *Exotic Tropical Fishes* (T.H.F. Publ. Inc., Jersey City 1962).³ E. S. HERALD, *Fische. Knaurs Tierreich in Farben* (Droemer, München 1961).⁴ W. T. INNES, *Exotic Aquarium Fishes*, 19th edn (Press of Innes & Sons, Philadelphia 1956).⁵ G. STERBA, *Süßwasserfische aus aller Welt* (Zimmer und Herzog, Berchtesgaden 1959).⁶ D. VOGT und H. WERMUTH, in *Knaurs Aquarien und Terrarienbuch* (T. Droemer, München 1965), p. 53.⁷ E. VON HOLST, Z. vergl. Physiol. 32, 60 (1932).⁸ W. PFEIFFER, Int. Rev. gen. exp. Zool. 7, 77 (1964).⁹ W. AHRENS, Z. vergl. Physiol. 32, 49 (1950).¹⁰ W. BRAEMER und H. BRAEMER, Z. vergl. Physiol. 40, 529 (1958).¹¹ Diese Arbeit wurde im Department of Zoology, University of British Columbia, Vancouver, Canada, durchgeführt mit Unterstützung des National Research Council von Kanada.