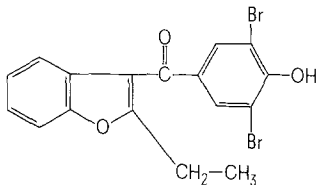


Die Hemmung von Enzymen der Inneren Mitochondrienmembran durch Benzbromaron

In der modernen Gichttherapie werden Derivate des Benzofurans als Uricosurica verwendet. Von DELTOUR et al.¹ wurde berichtet, dass diese Benzofuranderivate in vitro die Xanthinoxidase (E.C. 1.2.3.2) der Rattenleber hemmen. Von den untersuchten Verbindungen erwies sich

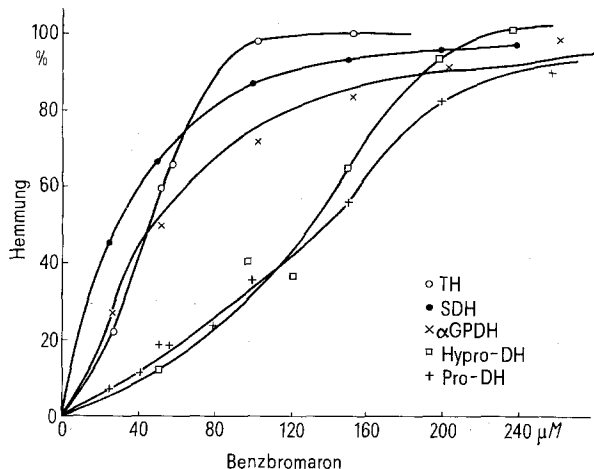


das Benzbromaron (Formel) als wirksamste Verbindung (5 μM bewirken 50% Hemmung). Die Hemmung der Xanthinoxidase liess sich allerdings in vivo nicht nachweisen².

Ob ausser Xanthinoxidase auch andere Metallflavoenzyme durch Benzofurane gehemmt werden, ist nicht bekannt. Wir haben daher die Wirkung von Benzbromaron (Firma Labaz) auf andere Flavoenzyme, die fest mit der inneren Mitochondrienmembran verbunden sind, untersucht: NADH-Dehydrogenase (E.C. 1.6.99.3)^{3,4}, Succinat-Dehydrogenase (E.C. 1.3.99.1)^{3,4}, α -Glycerophosphat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.2.1)⁵, Cholin-Dehydrogenase (E.C. 1.5.99.1)⁶, Prolin- und Hydroxyprolin-Dehydrogenase (E.C. 1.5.99)⁷. Zum Vergleich wurde noch Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (E.C. 1.2.1.9) als SH-Enzym und Pyridinnucleotid-Transhydrogenase (E.C. 1.6.1.1), die an die Mitochondrienmembran gebunden ist, aber kein Flavin enthält, untersucht.

Die Untersuchung von Enzymen, die nicht mit dem Purinstoffwechsel verbunden sind, schien uns deshalb von Interesse, weil wir an Hand vorläufiger klinischer Untersuchungen feststellten, dass unter hohen Dosen von Benzbromaron eine Zunahme der Triglyceride und Freien Fettsäuren im Plasma auftritt⁸.

Material und Methodik. Rattenlebermitochondrien wurden nach WEINBACH⁹ präpariert, einmal gefroren und aufgetaut. Dieses Präparat wurde für die Ermittlung der Hemmung von Enzymen der inneren Mitochondrienmembran durch Benzbromaron verwendet.



Hemmung von Enzymen der inneren Mitochondrienmembran durch Benzbromaron: TH, Pyridinnucleotid-Transhydrogenase; SDH, Succinat-Dehydrogenase; α -GPDH, α -Glycerophosphat-Dehydrogenase; Hypro-DH, Hydroxyprolin-Dehydrogenase; Pro-DH, Prolin-Dehydrogenase.

Prolin-, Hydroxyprolin-, Cholin-, Succinat- und α -Glycerophosphat-Dehydrogenase wurden durch die als Extinktionsabnahme bei 500 nm gemessene Reduktion von 2-(*p*-Iodphenyl)-3-(*p*-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid (INT) bestimmt¹⁰. Die Mitochondrienproteinkonzentration war 0,3 mg/ml, die Konzentration des jeweiligen Substrates 6,7 mM. Die Bestimmung der NADH-Dehydrogenase-Aktivität erfolgte nach MINAKAMI et al.¹¹, die der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase nach BEISENHERZ et al.¹² und die der Pyridinnucleotid-Transhydrogenase nach STEIN et al.¹³. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel wurde von Boehringer (Mannheim) bezogen.

Verschiedene Konzentrationen von Benzbromaron wurden als alkoholische Lösungen zugesetzt. Alkoholkontrollen wurden bei sämtlichen Tests mitgeführt. Protein wurde nach der Biuret-Methode bestimmt¹⁴.

Ergebnisse und Diskussion. Ausser der NADH-Dehydrogenase wurden sämtliche von uns untersuchten Mitochondrienenzyme durch Benzbromaron gehemmt. Die 50%ige Hemmung der einzelnen Enzyme tritt zwischen 25 und 160 μM Benzbromaron auf (Figur), während für Xanthinoxidase 5 μM gefunden wurde¹. Über den Mechanismus der Hemmung ist an Hand unserer Ergebnisse keine endgültige Entscheidung möglich, doch deutet der sigmoidale Kurvenverlauf auf allosterische Hemmung hin. Die Möglichkeit, dass Benzbromaron speziell mit SH-Enzymen reagiert, wurde ausgeschlossen, da bei Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase keine Hemmung gefunden wurde.

Vom medizinischen Standpunkt aus scheint die starke Hemmung der membrangebundenen intramitochondrialen α -Glycerophosphat-Dehydrogenase und der Pyridinnucleotid-Transhydrogenase interessant zu sein.

α -Glycerophosphat-Dehydrogenase ist am Transport des Wasserstoffs aus dem Cytoplasma in die Mitochondrien beteiligt: Eine Hemmung der membrangebundenen α -Glycerophosphat-Dehydrogenase kann zum Anstieg von NADH und α -Glycerophosphat im Cytoplasma führen. Daraus sollte eine Steigerung der Triglyceridsynthese resultieren, da das extramitochondriale α -Glycerophosphat-Niveau ein kontrollierender Faktor der Glyceridsynthese ist¹⁵.

¹ G. DELTOUR, J. BROEKHUYSEN, M. GHISLAIN, F. BOURGEOIS und F. BINON, Archs. int. Pharmacodyn. 165, 25 (1967).

² F. DELBARRE, C. AUSCHER, J. L. OLIVER und A. ROSE, Sem. Hôp. Paris 43, 1127 (1967).

³ G. L. SOTTOCASA, B. KUYLENSTIERN, L. ERNSTER und A. BERGSTRAND, J. Cell Biol. 32, 415 (1967).

⁴ G. L. SOTTOCASA, B. KUYLENSTIERN, L. ERNSTER und A. BERGSTRAND, Meth. Enzymol. 10, 448 (1967).

⁵ R. W. BROSEMER, W. VOGEL und Th. BÜCHER, Biochem. Z. 338, 854 (1963).

⁶ W. KAISER und F. L. BYGRAVE, Europ. J. Biochem. 4, 582 (1968).

⁷ G. BRUNNER und W. NEUPERT, FEBS Lett. 3, 283 (1969).

⁸ W. BRESNIK und M. M. MÜLLER, unveröffentlichte Daten.

⁹ E. C. WEINBACH, Analyt. Biochem. 2, 335 (1961).

¹⁰ R. KRAMAR, Z. physiol. Chem. 352, 1267 (1971).

¹¹ S. MINAKAMI, R. L. RINGLER und T. P. SINGER, J. biol. Chem. 237, 569 (1962).

¹² G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZE, Th. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADE, E. MEYER-ARENDT und G. PFLEIDERER, Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953).

¹³ A. M. STEIN, N. O. KAPLAN und M. M. CIOTTI, J. biol. Chem. 234, 979 (1959).

¹⁴ A. SOLS, Nature, Lond. 160, 89 (1947).

¹⁵ M. I. GURR und A. T. JAMES, Lipid Biochemistry (Chapman and Hall Ltd., London 1971).

Es ist denkbar, dass auch die starke Hemmung der Pyridinnucleotid-Transhydrogenase eine der Ursachen für die Änderung der Fettsäuresynthese ist: Pyridinnucleotid-Transhydrogenase ist für den verglichen mit NAD hohen Reduktionsgrad des NADP in gekoppelten Mitochondrien^{16,17} verantwortlich. Eine Hemmung des Enzyms bedingt daher erhöhtes NADH-Angebot, was zu einer Steigerung der intramitochondrialen (NADH-abhängigen) de novo-Synthese und zur Kettenverlängerung von Fettsäuren führen kann¹⁸.

Tatsächlich konnten wir bei einer kürzlich durchgeführten klinischen Studie feststellen, dass Patienten bei einer extrem hohen Dosierung von Benzbromaron (400–600 mg/Tag) eine deutliche Vermehrung der Freien Fettsäuren und Triglyceride im Plasma aufweisen⁸. Unsere hier berichteten in vitro Versuche bieten eine mögliche Erklärung für diese klinische Beobachtung.

Summary. The uricosuric drug benzbromarone inhibits a number of membrane-bound mitochondrial enzymes. A

strong inhibition of succinate dehydrogenase, α -glycerophosphate dehydrogenase and pyridinnucleotide transhydrogenase was found (approximately 28, 48, 45 μ M benzbromarone for 50% inhibition respectively). Some possible consequences of these results for the lipid metabolism in patients during benzbromarone are discussed.

R. KRAMAR und M. M. MÜLLER

Medizinisch-Chemisches Institut der Universität Wien,
Währingerstrasse 10, A-1090 Wien (Österreich),
4. September 1972.

¹⁶ L. DANIELSON und L. ERNSTER, *Biochem. Z.* 338, 188 (1963).

¹⁷ M. KLINGENBERG und W. SLENCZKA, *Biochem. Z.* 337, 486 (1959).

¹⁸ A. F. WHEREAT, M. W. OROSHIMO und J. NELSON, *J. biol. Chem.* 244, 6498 (1969).

The Phosphorylases System of the Cardiac Muscle of Normal and Reserpinized Rats Poisoned with 2,4-Dinitrophenol

The glycogenolytic effect of 2,4-dinitrophenol (DNP) on the skeletal muscle in vivo, was recently explained by, among other factors, the increase of the activity of phosphorylase *b* kinase, the enzyme that catalyzes the conversion: phosphorylase *b* to *a*, and consequently the content of phosphorylase *a* is found increased¹. The effect of glycogenolytic agents such as adrenalin and other catecholamines seem to be mediated by increasing the production of adenosine 3', 5' phosphate which increases the activity of phosphorylase *b* kinase². Recent studies, however, show that this nucleotide is not increased either in DNP-poisoned animals³ or in anoxia⁴. In order to accumulate evidence of the similarities of the action of the DNP with that of anoxia on the glycogenolysis, we performed determinations of phosphorylase *a*, phosphorylase *b* kinase and lactic acid in the heart of rats poisoned with DNP. Experiments were also made in reserpinized animals. The comparison between the effect of DNP and those of glucagon and anoxia is discussed.

The content of phosphorylases in rat hearts in vivo was determined in adult rats that were injected i.p. with 2.5 mg/100 g DNP. After 1 h they were anesthetized with

ether and the hearts were rapidly removed, weighed and ground in ice-cold solution containing 0.001 *M* EDTA – 0.02 *M* Sodium fluoride pH 6.8 in the proportion of 25 ml/g of muscle. After the treatment of the extract with either norit A or not, 20 mg/ml, 1.0 ml of the centrifuged extract were taken and incubated with glycogen for 20 min at 30°C and aliquots of 0.4 ml were then treated with glucose-1-phosphate, and either water or AMP as previously described¹. The activity of phosphorylase *b* kinase was determined in male rats that were either injected or not with DNP 2.5 mg/100 g. After 1 h they were anesthetized with ether and the blood was drained from the jugular vein. The hearts were cooled for 30 min in crushed ice, then weighed and ground in sand with ice-cold solution of 0.002 *M* EDTA pH 7.0 in proportion of 2 ml/g heart. The homogenate was then centrifuged at 4000 $\times$ *g* for 30 min and the supernatant was filtered through glass wool and the activity of phosphorylase *b* kinase was determined immediately, as described¹.

Table I shows that the content of phosphorylase *a* in hearts of rats poisoned with DNP is increased when compared with normal rats, by about 3 times, and also that the phosphorylase *a* is in high level, due the activity of the phosphorylase *b* kinase. This effect was also found in skeletal muscle in vivo¹. By the other hand, as the effect of the DNP could only be detected in vivo⁵, and its action on the phosphorylases system occurs after 1 h from the injection, it was important to know its effect in perfused hearts, to avoid both the action of the metabolic products of the reduction of DNP in liver and the possibility of the increase of adrenalin in the blood circulation. The experiments in perfused hearts were done in adult

Table I. Content of phosphorylase *a* and total and of phosphorylase *b* kinase in hearts of rats poisoned with DNP 2.5 mg/100 g

Determination	Normal rats		DNP poisoned rats	
Phosphorylase <i>a</i> (10 rats)	7.0 $\pm$	1.7 ^a	25.2 $\pm$	3.1
Total phosphorylase (+ AMP) (10 rats)	67.2 $\pm$	7.1	85.3 $\pm$	13.0
Ratio Phosphorylase <i>a</i> /Total phosphorylase $\times$ 100	10.4 $\pm$	1.1	30.7 $\pm$	6.5
Phosphorylase <i>b</i> kinase (10 rats)	1346 $\pm$	480	3384 $\pm$	334

^a S.E.M. The activity of phosphorylase *a* and total are expressed in units according to CORI¹⁰ per gram of heart. The activity of phosphorylase *b* kinase is expressed in units of phosphorylase *a* formed from phosphorylase *b* in 15 min according to FISHER and KREBS method¹¹.

¹ A. FOCESI JR., Q. S. TAHIN, M. M. EL-GUINDY and A. E. VERCESI, *Experientia* 25, 1243 (1969).

² G. T. CORI and B. ILLINGWORTH, *Biochim. biophys. Acta.* 27, 105 (1956).

³ A. FOCESI JR. and A. E. VERCESI, unpublished results.

⁴ H. E. MORGAN and A. PARMEGGIANI, in *Control of Glycogen Metabolism* (Ed. W. J. WHELAN and M. P. CAMERON, Ciba Foundation Symposium 1964), p. 254.