

Charakterisierung von Meerschweinchen nach Adaptation an unterschiedlich hohe Vitamin-C-Zufuhren

3. Mikrosomale Cytochrome in Leber und Nieren

E. Degkwitz¹⁾ und R.-H. Bödeker²⁾

¹⁾ Biochemisches Institut

²⁾ Institut für Medizinische Informatik, Arbeitsgruppe Medizinische Statistik, Justus-Liebig-Universität Gießen

Characterization of guinea pigs adapted to differently high vitamin C supplies.

3. Microsomal cytochromes in liver and kidneys

Zusammenfassung: Bei Meerschweinchen hängen die spezifischen Gehalte der mikrosomalen Cytochrome P-450 (P-454) und b_5 und der Gesamtgehalt des mikrosomalen Proteins in Leber und Nierenrinde davon ab, an welches Ausmaß der Vitamin-C-Versorgung der Organismus adaptiert ist (mindestens 6 Wochen). Bei sehr niedriger Versorgung – mit 5 mg Vitamin C in 100 g Futter –, die gerade noch ein Überleben gestattet, sind die Gehalte der Cytochrome in beiden Organen erniedrigt (bei akkumulativer Zufuhr – alle 3 1/2 Tage via Schlundsonde – sind sie nicht deutlich vermindert). Der verringerte Gehalt des Cytochrom P-450 führt bei Injektion von Evipan zu einer entsprechend verlängerten Schlafzeit; dies steht mit anderen, bereits beschriebenen Einschränkungen von Stoffwechselaktivitäten bei marginaler Versorgung mit Vitamin C in Einklang. Durch mehrfache Injektionen von Evipan wird der Gehalt des Cytochroms aber auch bei diesen Tieren induziert, auf dasselbe Niveau wie bei besser mit Vitamin C versorgten Tieren. Unser alter Befund, daß bei 14tägiger Vitamin-C-freier Fütterung der spezifische Gehalt des Cytochrom P-450 in der Leber erheblich abnimmt, trifft nur für dieses Organ und für den Fall zu, daß die Meerschweinchen vorher reichlich mit Vitamin C versorgt waren. Nach Adaptation an mittlere und geringe Zufuhr von Vitamin C erfolgt kein entsprechender Abfall. Die Abnahme des Cytochroms nach reichlicher Versorgung beruht anscheinend auf einer verminderten Stimulierung seiner Synthese im Rahmen von Veränderungen der hormonellen Steuerung des Stoffwechsels, so daß nur ein indirekter Zusammenhang mit dem Mangel an Vitamin C vorliegt.

Vermutlich sind die Folgen einer Vitamin-C-freien Fütterung, zumindest in der Leber, generell von der vorangegangenen Adaptation abhängig. Der starke Abfall des Cytochrom P-450 und die bereits beschriebene gleichzeitige Verringerung des mitochondrialen Kompartiments werfen die Frage auf, ob eine maximale Versorgung mit Vitamin C vorteilhaft bzw. physiologisch optimal ist.

Summary: The specific amounts of the microsomal cytochromes P-450 (P-454) and b_5 and the amounts of microsomal protein in liver and renal cortex of guinea pigs depend on the extent of the vitamin C supply to which the animals are adapted (at least 6 weeks). In the case of low supply – with 5 mg vitamin C in 100 g food – which still permits to survive, the amounts of the cytochromes are decreased in both organs (an accumulative supply – every 3.5 days via stomach tube – causes no evident decreases). The reduced amount of cytochrome P-450 gives rise to a corresponding elongation of the sleeping time after injection of evipane; this agrees with other reports upon restriction of metabolic activities by marginal supply. But the amount of the cytochrome is induced as well in these animals by several injections of evipane, to the same level as in animals supplied with more vitamin C. Our early report on a considerable decrease of the specific amount of cytochrome P-450 in the liver by omission of vitamin C for 14 days proves correct only in this organ and when the guinea pigs were previously abundantly supplied with vitamin C. There is no corresponding decrease after an adaptation to medium and lesser supplies of vitamin C. The decrease of the cytochrome after abundant supply seems to be due

to a diminished stimulation of its synthesis in connection with modifications in the hormonal control of the metabolism and, thus, is only indirectly connected with the lack of vitamin C.

The effects of omission of vitamin C supply probably depend generally on the previous adaptation, at least in the liver. The considerable decrease of the cytochrome P-450 and the simultaneous reduction of the mitochondrial compartment raise the question of if a maximum supply with vitamin C is favorable resp. the physiological optimum.

Schlüsselwörter: Meerschweinchen, unterschiedliche Vitamin-C-Substitutionen – mikrosomales Protein und P-450 und b_5 in Leber und Nierenrinde – Vitamin-C-freie Fütterung, Induktion und Schlafzeiten mit Evipane

Key words: Guinea pigs, different vitamin C supplies – hepatic and renal cortex microsomal protein and cytochromes P-450 and b_5 – omission of vitamin C, induction and sleeping times with evipane

Einleitung

Unsere vorangegangenen Untersuchungen zur Biochemie des Vitamin C hatten gezeigt, daß Meerschweinchen bei langfristiger Fütterung (mindestens 6 Wochen) ihre Ascorbinsäurespiegel an die Höhe der Vitamin-C-Zufuhr adaptieren (7) und darüber hinaus auch die Blutspiegel von Cholesterin, Glucose, Triacylglyceriden und Hämoglobin von der Versorgung mit Vitamin C abhängig sind (9). Der weitere Befund, daß die mitochondriale, respiratorische Ausstattung der Leber bei Adaptation an hohe Zufuhr vermehrt ist (10), weist auf einen Anstieg der Regie der Schilddrüsenhormone hin. Denn es ist bekannt, daß das mitochondriale Kompartiment von diesen Hormonen beeinflußt wird (auch morphologisch) (13). Dieser Hinweis ist inzwischen von uns bestätigt, da wir einen Anstieg des Thyroxins im Blut gefunden haben (11).

Für die weiteren Untersuchungen zur Charakterisierung der Adaptation an die Höhe der Vitamin-C-Zufuhr, haben wir aus mehreren Gründen die Gehalte der mikrosomalen Cytochrome P-450 (P-454) und b_5 in Leber und Nierenrinde gewählt. Wir hatten aus viel früheren Untersuchungen zu Wirkungsmechanismen des Vitamins (5, 6) den Befund, daß die spezifischen Gehalte dieser Cytochrome bereits in den ersten zwei Wochen Vitamin-C-freier Fütterung – vorher hoch versorgter Meerschweinchen – erheblich abnehmen. Der Befund in der Leber ist von zahlreichen anderen Autoren aus anderen Forschungsrichtungen gut dokumentiert (siehe Übersichtsreferate aus Spezial-Kongressen 14 u. 27). Er war jedoch bisher biochemisch nicht einzuordnen. Untersuchungen zur Aktivität, der Kinetik und der Induzierbarkeit der P-450-Monooxygenase bei derart Vitamin-C-frei gefütterten Tieren, sowie zur Halbwertszeit des Häms und der Aktivität der Hämoxygenase (5, 17, 18, 19, 25 u. 26) haben keinen Hinweis auf den Reaktionsschritt ergeben, bei dem das Vitamin eingreift. Aufgrund unserer neueren Ergebnisse, daß Meerschweinchen sich an die jeweilige Versorgung mit Vitamin C adaptieren (7, 8, 9) und sich dabei die hormonelle Steuerung des Stoffwechsels ändert (10, 11), ergibt sich nun für die Ursache der Abnahmen der beiden mikrosomalen Cytochrome ein völlig neuer Aspekt: Sie könnten Adaptationsvorgänge widerspiegeln und damit nur indirekt für das Vitamin spezifisch sein – weit entfernt von einer direkten Co-Funktion. Dies stünde auch im Einklang mit den Angaben (24), daß die Zusammensetzung des endoplasmatischen Retikulums endokrinen Einflüssen unterliegt und dem Hinweis auf morphologische Veränderungen durch Schilddrüsenhormone (13).

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden die bereits beschriebenen Befunde bei den beiden mikrosomalen Cytochromen überprüft und ergänzt. Sie wurden

einerseits bei voll adaptierten Meerschweinchen wiederholt, weil die Tiere in den früheren Versuchen zu kurzfristig gefüttert wurden. Das bekannte vorübergehende Über- bzw. Unterschwingen von Parametern infolge von Konzentrationsänderungen während der Adaptationsphase konnte zu inadäquaten Werten bei den hoch versorgten Kontrolltieren geführt haben und damit zu nur scheinbaren Veränderungen in der Vitamin-C-frei gefütterten Versuchsgruppe; bei dieser konnten sich außerdem die durch den Adaptationsverlauf bedingten Veränderungen zu denen der Vitamin-C-freien Fütterung addiert haben. Außerdem wurde das Ergebnis einer Vitamin-C-freien Fütterung auch bei vorher an geringe Zufuhren adaptierte Meerschweinchen überprüft. Der gängigen – aber nie bewiesenen und vermutlich nicht zutreffenden (12) – Meinung entsprechend, daß eine maximale Versorgung mit Vitamin C für Meerschweinchen optimal und physiologisch sei, wurden (auch von uns) diese Untersuchungen stets nur bei derart vorgefütterten Tieren durchgeführt.

Bei den Untersuchungen in der Nierenrinde erschien es angemessener, die Gehalte der beiden mikrosomalen Cytochrome pro Gramm Gewebe zu berechnen. Denn die Zellen der Nierenrinde enthalten viel weniger endoplasmatisches Retikulum als die Leber, so daß Berechnungen der spezifischen Gehalte zu unnötigen Ungenauigkeiten führen würden. Da bei der mischfunktionellen Monooxygenase der Nierenrinde das Maximum im Differenzspektrum des Cytochroms etwas verschoben ist, wird es hier dementsprechend als Cytochrom P-454 bezeichnet.

Bezüglich der minimalen Substitution bei Meerschweinchen, die noch ein Überleben ermöglicht, haben andere Autoren oft das Vitamin C nicht über das Futter, sondern in zeitlichen Abständen, akkumulativ via Schlundsonde appliziert. Es erschien informativ, die Ergebnisse bei der von uns gefundenen marginalen Versorgung mit 5 mg Vitamin C in 100 g Futter mit denen bei einer derartigen Substitution zu vergleichen.

Da bekannt ist, daß das Schlafmittel Evipan auch den Gehalt des Cytochrom P-450 in der Leber induziert, wurde das Barbiturat verwendet, um weitere Informationen über verbliebene Stoffwechselaktivitäten bei den marginal, mit 5 mg Vitamin C in 100 g Futter versorgten Meerschweinchen zu erhalten. Denn diese Tiere zeigen einige Besonderheiten: im Verlauf der Umstellung auf diese Substitution sind nur schwache Adaptationsvorgänge zu erkennen (8), sie führt zu langsamerem Wachstum (11) und letztlich meist zu extremen Werten, als bei den etwas höher substituierten Tieren (8, 9, 10). Mittels Evipan konnte anhand der Schlafzeit die Auswirkung des verminderten Gehaltes an Cytochrom P-450 ermittelt werden, mehrfache Gaben konnten über das Ausmaß der Induzierbarkeit des Gehaltes an Cytochrom P-450 in der Leber Auskunft geben.

Material und Methoden

Zu Züchtung, Haltung und weiteren Daten der Meerschweinchen siehe Lit. 9. Für eine vollständige Adaptation erhielten die Meerschweinchen die angegebene Diät mindestens sechs Wochen lang, bei unvollständiger Adaptation dreieinhalb Wochen. Die Vitamin-C-freie Fütterung erfolgte stets zwei Wochen lang, bei vorher voll adaptierten Tieren. Die akkumulativen Gaben von Vitamin C via Schlundsonde erfolgten – bei Vitamin-C-freier Diät – im Abstand von dreieinhalb Tagen. Dabei wurde jeweils die Menge appliziert, die von den Tieren innerhalb der letzten Zeitspanne mit dem Futter aufgenommen worden wäre, wenn es 5 mg Vitamin C in 100 g enthalten hätte. Der Futterverzehr wurde jedoch nicht direkt ermittelt, weil die hierzu erforderliche Einzelhaltung für Meerschweinchen erfahrungsgemäß eine deutliche Streßsituation darstellt. Für die Berechnung der anzunehmenden Futteraufnahme (die im Verlauf der 6wöchigen Adap-

tation mit dem erheblichen Gewichtsanstieg zunimmt!) und der daraus resultierenden Zufuhr an Vitamin C wurde folgende empirisch aufgestellte Beziehung zugrunde gelegt: $[g] \text{ Futteraufnahme pro Tag} = 20.3 + 0.0156 \times g \text{ Körpergewicht}$ (Bereich 450–750 g).

Evipan wurde (außer bei der Dosiswirkungskurve) mit 34 mg/kg Körpergewicht morgens gegen 8 Uhr intraperitoneal injiziert, bei den dreifachen Gaben am ersten, dritten und fünften Tag. Die Meerschweinchen wurden zwei Tage nach der (letzten) Evipan-Injektion (wie (9) die anderen Tiere) morgens zwischen 8 und 9 Uhr, durch Genickschlag getötet und ausgeblutet. Zur Präparation der Mikrosomenfraktion siehe (5). Cytochrom P-450 und P-454 wurden nach der Methode von Omura und Sato (21, 22) bestimmt, Cytochrom b_5 nach der Methode von Chance und Pappenheimer (4), Klingenberg (16) und Modirzadeh und Kamin (20).

Protein wurde nach der Methode von Beisenherz et al. (1) ermittelt, die dabei auftretende Trübung nach Bode et al. (3).

Evipan-Na wurde von der Firma „Merck Darmstadt“ bezogen, alle anderen Chemikalien von der Firma „Boehringer Mannheim“.

Statistik

Es wurden ein- und zweifaktorielle Varianzanalysen verwendet. Wenn die H_0 -Hypothesen („Die unterschiedliche Versorgung mit Vitamin C bzw. die Vitamin-C-freie Fütterung u.ä. haben keinen Einfluß auf den untersuchten Parameter“) verworfen werden konnten, weil nicht alle Stichproben aus sog. Grundgesamtheiten stammen, deren Lagparameter identisch sind (d.h. $p < 0.050$) wurden zum Teil einzelne Gruppen paarweise mittels Scheffe-Test verglichen, dies ist bei den angegebenen p-Werten stets vermerkt. Alle anderen Wahrscheinlichkeiten sind Ergebnisse der Varianzanalysen. Ähnliche p-Werte sind oft zusammengefaßt (mindestens bzw. höchstens $p = 0.X$). Siehe auch Lit. 9. Dem Trend in der modernen Statistik folgend, wird die Angabe „signifikant (different)“ bei einem Ergebnis $p < 0.05$ nicht verwendet.

Ergebnisse

A. Leber

1) Ergebnisse bei vollständiger Adaptation an unterschiedlich hohe Vitamin-C-Zufuhren (Tab. 1)

Einfache Varianzanalysen der 6 unterschiedlich hoch versorgten Gruppen ergeben Unterschiede bei den spezifischen Gehalten der Cytochrome b_5 ($p = 0.005$) und P-450 ($<<0.0001$). Sie sind bei den marginal, mit 5 mg Vitamin C in 100 g Futter versorgten Meerschweinchen erniedrigt. Bei den Gehalten des mikrosomalen Proteins finden sich keine Unterschiede ($p = 0.21$).

2) Ergebnisse Vitamin-C-freier Fütterung nach vollständiger Adaptation an unterschiedlich hohe Vitamin-C-Zufuhr (Tab. 1)

Zweifaktorielle Varianzanalysen zwischen den drei Gruppen, die an 5, 20 und 680 mg Vitamin C in 100 g Futter adaptiert waren (= Kontrollgruppen) und den drei Gruppen, die anschließend 2 Wochen lang Vitamin-C-freies Futter erhielten (= Versuchsgruppen) ergeben:

Bei den Gehalten des mikrosomalen Proteins und den spezifischen Gehalten des

Tab. 1. Gehalte an mikrosomalem Protein und spezifische Gehalte der Cytochrome P-450 und b_5 in der Leber bei unterschiedlich mit Vitamin C versorgten Meerschweinchen

$\left[\frac{\text{mg Vit. C}}{100 \text{ g Futter}} \right]$	n	$\left[\frac{\text{mg micros.Prot.}}{\text{g Leber}} \right]$		$\left[\frac{\text{n mol Cyt P-450}}{\text{mg Protein}} \right]$		$\left[\frac{\text{n mol Cyt b}_5}{\text{mg Protein}} \right]$	
		Mittelwert	Standardabweichung	Mittelwert	Standardabweichung	Mittelwert	Standardabweichung
Nach vollständiger Adaptation:							
5	8	20.34*	2.902	0.623	0.049	0.638	0.087
10	8	24.27*	3.001	0.909*	0.092	0.766*	0.089
20	10	20.97*	3.319	0.952*	0.096	0.823*	0.082
90	6	21.81*	5.720	0.965*	0.067	0.763*	0.077
165	11	20.57*	4.052	1.056*	0.149	0.761*	0.099
680	8	20.84*	2.168	0.973*	0.137	0.725*	0.109
Nach Vitamin-C-freier Fütterung (2 Wochen):							
5	5	25.62	1.623	0.588 ^o	0.070	0.570 ^o	0.153
20	6	23.58 ^o	1.839	0.892 ^o	0.077	0.827 ^o	0.075
680	8	23.02 ^o	2.280	0.650	0.079	0.670 ^o	0.086
Nach 3 intraperitonealen Injektionen von Evipan:							
5	6	27.00 ⁺	2.494	0.965	0.088	0.675 ⁺	0.111
165	6	24.27 ⁺	3.331	1.272 ⁺	0.145	0.758 ⁺	0.086
680	6	23.30 ⁺	4.787	1.273 ⁺	0.132	0.700 ⁺	0.064
Nach Substitution mittels Schlundsonde:							
”5”	5	29.55	0.856	0.936	0.119	0.790	0.068

⁺, * Die Werte sind statistisch nicht unterschiedlich

^o Die Werte unterscheiden sich statistisch nicht von den zugehörigen Kontroll-Tieren

Cytochrom b_5 zeigen sich keine Tendenzen zu Wechselwirkungen (mindestens $p = 0.23$). Vergleiche zwischen den einzelnen Versuchs- und ihren zugehörigen Kontrollgruppen (Scheffe-Teste) zeigen außer einer Zunahme des mikrosomalen Proteins bei den marginal versorgten Meerschweinchen ($p = 0.004$) keine Veränderungen durch die Vitamin-C-freie Fütterung (mindestens $p = 0.16$).

Bei den spezifischen Gehalten des Cytochrom P-450 ergibt sich keine Parallelität ($p = 0.0002$). Paarweise Vergleiche der Versuchs- mit ihren Kontrollgruppen (Scheffe-Teste) ergeben bei den an 5 mg und an 20 mg Vitamin C in 100 g Futter adaptierten Gruppen keine Veränderungen durch Vitamin-C-freie Fütterung (mindestens $p = 0.50$). Bei den hoch versorgten Meerschweinchen führt dagegen die Vitamin-C-freie Fütterung zu einer Abnahme ($p < 0.0001$). Der Gehalt fällt sogar unter das Niveau der vorher an 20 mg Vitamin C adaptierten Tiere ($p = 0.0001$ Scheffe-Test) und nähert sich damit dem der marginal versorgten Meerschweinchen.

3) Schlafzeiten nach Evipangaben (Tab. 2 u. 3)

Die Dosis-Wirkungs-Kurve (Tab. 2) diente der Suche nach einer geeigneten Dosis, bei der die Kurve nicht zu steil und die Schlafzeiten nicht zu lang waren. Diese Bedingungen wurden am besten durch 34 mg Evipan/kg Körpergewicht erfüllt (die einfache Varianzanalyse ergibt $p < 0.0001$, die Werte sind alle unterschiedlich).

Tab. 2. Schlafzeiten nach einer einmaligen intraperitonealen Injektion von Evipan bei Meerschweinchen nach Adaptation an 165 mg Vitamin C/100 g Futter

Die mathematische Angleichung ergibt eine exponentielle Kurve: $[\text{Min}] \text{ Schlafzeit} = 5.62^{0.048 \text{ Evipandosis}}$

[mg Evipan kg Körpergew.]	n	[Minuten] Schlafzeit	
		Mittelwert	Standardabweichung
25	4	10.25	0.646
34	4	27.38	2.562
44	4	43.13	5.633
52	4	82.25	3.862
75	4	204.00	14.583

Tab. 3. Schlafzeiten nach der ersten und dritten intraperitonealen Gabe von Evipan bei Meerschweinchen nach Adaptation an unterschiedlich hohe Vitamin-C-Zuführen

[mg Vit. C 100 g Futter]	n	[Minuten] Schlafzeit				
		Nach 1. Evipangabe		Nach 3. Evipangabe		
		Mittelwert	Stand. abw.	n	Mittelwert	Stand. abw.
5	7	35.1	2.36	8	13.5*	2.20
165	10	27.1*	3.08	10	15.1*	3.00
680	8	25.5*	3.30	6	15.5*	3.02

* Diese Werte sind statistisch nicht unterschiedlich

Bei den Schlafzeiten ergibt eine zweifaktorielle Varianzanalyse keine Parallelität ($p < 0.0001$) zwischen den Gruppen, die eine einmalige Injektion mit Evipan erhielten und den Gruppen, die drei Injektionen erhielten (Tab. 3). Paarweise Vergleiche (Scheffe-Test) ergeben bei den marginal versorgten Tieren nach der ersten Evipangabe eine erheblich längere Schlafzeit ($p < 0.0001$); nach mehreren Gaben von Evipan ist die Schlafzeit ebenso kurz wie bei den besser versorgten Meerschweinchen (mindestens $p = 0.35$).

4) Induktion des endoplasmatischen Retikulums durch Evipan (Tab. 1)

Die zweifaktoriellen Varianzanalysen (Tab. 1) zwischen den Gruppen nach dreifacher intraperitonealer Injektion von Evipan und den zugehörigen unbehandelten Tieren (= Werte nach vollständiger Adaptation) ergeben bei allen drei Parametern keine Tendenzen zu Wechselwirkungen (mindestens $p = 0.25$). Das mikrosomale Protein wird in den drei unterschiedlich versorgten Gruppen durch Evipan gesteigert ($p < 0.001$). Die paarweisen Vergleiche (Scheffe-Teste) ergeben dabei keine Unterschiede im Niveau (mindestens $p = 0.20$). Der spezifische Gehalt des Cytochrom b_5 zeigt keinen Einfluß des Evipans ($p = 0.91$).

Der spezifische Gehalt des Cytochrom P-450 wird in allen drei Gruppen durch Evipan induziert ($p < 0.0001$). Paarweise Vergleiche zwischen den induzierten Gruppen (Scheffe-Teste) ergeben bei den marginal versorgten Meerschweinchen eine etwas geringere Induktion (höchstens $p = 0.01$). Bei einer Berechnung pro Gramm Leber (Werte nicht gezeigt) ergeben die entsprechenden Vergleiche jedoch keine Unterschiede (mindestens $p = 0.35$).

5) Ergebnisse marginaler Versorgung mit Vitamin C via Schlundsonde (Tab. 1)

Die einfaktoriellen Varianzanalysen zwischen den Tieren, die via Schlundsonde versorgt wurden (= Versuchsgruppe) und den beiden Gruppen, die an 5 und 680 mg Vitamin C in 100 g Futter adaptiert waren (= Referenzgruppen) ergeben bei allen drei Parametern unterschiedliche Grundgesamtheiten (Cyt. b_5 $p = 0.03$, bei den anderen $p < 0.0001$). Die paarweisen Vergleiche (Scheffe-Teste) ergeben beim mikrosomalen Protein in der Versuchsgruppe einen höheren Gehalt als bei den beiden Referenzgruppen (stets $p < 0.0001$). Die spezifischen Gehalte der Cytochrome b_5 und P-450 sind in der Versuchsgruppe höher als bei der marginal versorgten Referenzgruppe ($p = 0.03$ bzw. $p < 0.001$) und unterscheiden sich nicht von denen der hoch versorgten Meerschweinchen (mindestens $p = 0.51$).

B. Nieren-Rinde

1) Ergebnisse bei vollständiger Adaptation an unterschiedlich hohe Vitamin-C-Zufuhren (Tab. 4)

Einfaktorielle Varianzanalysen der 6 unterschiedlich hoch versorgten Gruppen ergeben Unterschiede bei den Gewebegehalten der Cytochrome b_5 ($p < 0.0001$) und P-454 ($p = 0.0001$). Sie sind bei den marginal versorgten Meerschweinchen erniedrigt. Das mikrosomale Protein nimmt mit niedrigerer Vitamin-C-Zufuhr ab ($p = 0.02$).

Tab. 4. Gehalte an mikrosomalem Protein und Gewebegehalte der Cytochrome P-454 und b_5 in der Nierenrinde bei unterschiedlich mit Vitamin C versorgten Meerschweinchen

$\left[\frac{\text{mg Vit. C}}{100 \text{ g Futter}} \right]$	n	$\left[\frac{\text{mg micros.Prot.}}{\text{g Niere}} \right]$	$\left[\frac{\text{n mol Cyt P-454}}{\text{g Niere}} \right]$	$\left[\frac{\text{n mol Cyt b}_5}{\text{g Niere}} \right]$			
		Mittelwert	Standardabweichung	Mittelwert	Standardabweichung	Mittelwert	Standardabweichung
Nach vollständiger Adaptation (7–8 Wochen):							
5	7	7.57	1.599	0.45	0.061	0.86	0.124
10	7	8.66	0.716	0.67*	0.146	1.22*	0.175
20	7	8.02	0.866	0.57*	0.117	1.07*	0.103
90	9	8.63	1.016	0.73*	0.194	1.21*	0.286
165	6	9.32	0.812	0.88*	0.188	1.60*	0.216
680	7	9.40	1.126	0.72*	0.143	1.18*	0.156
Nach unvollständiger Adaptation (3,5 Wochen):							
5	6	6.59	0.330	0.46 ^o	0.143	1.64*	0.353
20	6	7.32	0.897	1.12*	0.285	1.52*	0.284
680	9	7.07	1.061	1.23*	0.207	1.47*	0.262
Nach Vitamin-C-freier Fütterung (2 Wochen):							
5	6	10.91	0.711	0.67*	0.141	1.22*	0.098
20	5	7.88 ^o	0.576	0.62 ^o *	0.146	1.21*	0.155
680	5	9.71 ^o	1.068	0.65 ^o *	0.124	1.29*	0.245
Nach Substitution mittels Schlundsonde:							
"5"	4	11.69	1.765	1.39	0.577	2.39	0.574

* Die Werte sind statistisch nicht unterschiedlich

^o Die Werte unterscheiden sich nicht von den zugehörigen Kontroll-Tieren

2) Ergebnisse bei unvollständiger Adaptation an unterschiedlich hohe Vitamin-C-Zufuhren (Tab. 4)

Zweifaktorielle Varianzanalysen zwischen den drei Gruppen, die vollständig an 5, 20 und 680 mg Vitamin C in 100 g Futter adaptiert waren und den entsprechenden nur teiladaptierten Gruppen ergeben bei den Gewebegehalten der beiden Cytochrome keine Parallelität (höchstens $p = 0.022$). Die Gehalte des Cytochrom b_5 sind in den drei Gruppen nach Teiladaptation angestiegen ($p < 0.0001$) und auf gleichem Niveau ($p = 0.68$). Beim Cytochrom P-454 zeigen nur die Tiere erhöhte Gehalte, die an 20 und 680 mg Vitamin C in 100 g Futter teiladaptiert sind ($p < 0.0001$). Dieses Überspringen bei unvollständiger Adaptation dürfte zu einem erheblichen Anteil auf dem gleichzeitigen Unterschwingen des mikrosomalen Proteins beruhen. Es zeigt keine Tendenz zu Wechselwirkungen ($p = 0.115$) und bei allen drei teiladaptierten Gruppen niedrigere Werte ($p = 0.0004$).

3) Ergebnisse Vitamin-C-freier Fütterung nach vollständiger Adaptation an unterschiedlich hohe Vitamin-C-Zufuhr (Tab. 4)

Zweifaktorielle Varianzanalysen zwischen den drei Gruppen, die an 5, 20 und 680 mg Vitamin C in 100 g Futter adaptiert waren (= Kontrollgruppen) und den drei Gruppen, die anschließend zwei Wochen lang Vitamin-C-freies Futter erhielten (= Versuchsgruppen) ergeben:

Beim Gewebegehalt des Cytochrom b_5 zeigen sich keine deutlichen Tendenzen zu Wechselwirkungen ($p = 0.077$), sie nehmen durch Vitamin-C-freie Fütterung etwas zu ($p = 0.0003$).

Die Gewebegehalte des Cytochrom P-454 und das mikrosomale Protein zeigen keine Parallelität (höchstens $p = 0.025$). Beim Protein ergibt sich nur bei den marginal versorgten Tieren nach Vitamin-C-freier Fütterung ein höherer Gehalt. Bei Cytochrom P-454 sind die Gewebegehalte in den drei Vitamin-C-frei gefütterten Gruppen nicht unterschiedlich ($p = 0.093$). Bei den Tieren, die an 20 und 680 mg Vitamin C in 100 g Futter adaptiert waren, findet sich kein Einfluß der Vitamin-C-freien Fütterung, bei den marginal versorgten Tieren ist der Gewebegehalt erhöht.

4) Ergebnisse marginaler Versorgung mit Vitamin C via Schlundsonde (Tab. 4)

Die einfaktoriellen Varianzanalysen zwischen den Tieren, die via Schlundsonde versorgt wurden (= Versuchsgruppe) und den Gruppen, die an 5 und 165 mg Vitamin C in 100 g Futter adaptiert waren (= Referenzgruppen), ergeben bei allen drei Parametern Unterschiede (höchstens $p = 0.002$). Beim Cytochrom b_5 zeigen die paarweisen Vergleiche (Scheffe-Teste) bei der Versuchsgruppe den höchsten Gewebegehalt, einen mittleren bei der höher versorgten und den niedrigsten bei der marginal versorgten Referenzgruppe (höchstens $p = 0.005$). Beim Cytochrom P-454 und beim mikrosomalen Protein sind die Gehalte in der Versuchsgruppe höher als bei der marginalen Referenzgruppe ($p = 0.0007$ bzw. $p = 0.002$) und unterscheiden sich nicht von denen der höher versorgten Meerschweinchen ($p = 0.13$ bzw. $p = 0.063$), zum Teil aufgrund der hohen Schwankungen.

Diskussion

Leber und Nierenrinde unterscheiden sich, wohl aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktionen im Organismus nicht nur in der mengenmäßigen Ausstattung ihrer Zellen mit endoplasmatischem Retikulum, sondern auch im relativen Gewebegehalt der beiden mikrosomalen Cytochrome. Überschlagsrechnungen bei hoch mit Vitamin C sub-

stituierten Meerschweinchen ergeben bei der Nierenrinde – im Vergleich zur Leber – etwa ein Zehntel des Gewebegehaltes an Cytochrom b_5 und nur etwa ein Dreißigstel des dem Cytochrom P-450 äquivalenten Cytochrom P-454. Die Veränderungen der Gehalte dieser Parameter sind in den beiden Organen vornehmlich während der Adaptationsphase an hohe Substitutionen zum Teil unterschiedlich, vermutlich wiederum aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktion und der daraus resultierenden unterschiedlichen hormonellen Stimulierbarkeit.

Bei der Adaptation an marginale Versorgung erfolgt in Leber (8) und Nierenrinde ein schneller, persistierender Abfall des Cytochroms der Monooxygenase und ein lange anhaltendes Unterschwingen des mikrosomalen Proteins. Dies steht in Einklang mit Untersuchungen in der Leber von Ratten (2, 15, 23), die gezeigt haben, daß der turnover des Cytochrom P-450 viel kürzer ist, als der des gesamten mikrosomalen Proteins. Nach vollständiger Adaptation sind beide Cytochrome in beiden Organen vermindert, das mikrosomale Protein jedoch nur in der Nierenrinde. Bei Adaptation an hohe Substitution ist das erhebliche Unterschwingen des mikrosomalen Proteins in der Nierenrinde bemerkenswert. Denn die Meerschweinchen waren zu Versuchsbeginn (9) an mittlere Mengen von Vitamin C gewöhnt (90–170 mg Vitamin C in 100 g Futter), so daß eher ein langsamer Anstieg wie in der Leber zu erwarten wäre.

Die Ergebnisse einer 14tägigen Vitamin-C-freien Fütterung bei vorher vollständig an sehr hohe Substitution adaptierten Meerschweinchen zeigen, daß einige der von uns früher bei unvollständig adaptierten Tieren beschriebenen Abnahmen (5, 6) nicht zutreffen, sondern nur scheinbar erfolgten, weil bei den Kontrolltieren aufgrund eines Überschwingens während der Adaptationsphase erhöhte Werte vorlagen. Bei vorher vollständig adaptierten Versuchstieren ergeben sich in bezug auf voll adaptierte Kontrollen keine Abnahmen des mikrosomalen Proteins und des spezifischen Gehaltes an Cytochrom b_5 in der Leber (5) und keine Abnahmen der Gehalte beider mikrosomalen Cytochrome in der Nierenrinde (6). Unser alter Befund, daß der spezifische Gehalt des Cytochrom P-450 in der Leber bereits in den ersten zwei Wochen Vitamin-C-freier Fütterung erheblich abnimmt, wird dagegen im Prinzip bestätigt. Er trifft jedoch nicht generell, sondern nur bei vorher reichlich mit Vitamin C substituierten Meerschweinchen zu. Bei vorher an mittlere oder geringe Versorgung adaptierten Tieren findet sich in diesem Zeitraum kein entsprechender Abfall.

Die Abnahme des Cytochrom P-450 in der Leber dürfte mit der bereits beschriebenen Reduktion des mitochondrialen Kompartiments bei Vitamin-C-freier Fütterung vorher hoch substituierten Meerschweinchen (10) verknüpft sein. Dieses Kompartiment ist nur bei hoch versorgten Tieren vergrößert, so daß bei vorher an niedrige Substitution adaptierten Tieren keine entsprechende Verminderung eintritt. Aus diesen Befunden ergibt sich, daß zumindest in der Leber die Folgen einer Vitamin-C-freien Fütterung von der vorausgegangenen Substitution abhängen. Die krassen Folgen bei vorheriger hoher Versorgung beruhen vermutlich darauf, daß die Adaptation an die entsprechend hohen Ascorbinsäurespiegel zu einer so intensiven Stimulierung des Stoffwechsels führt, daß der Organismus nicht in der Lage ist, die Folgen des steilen Abfalls der Ascorbinsäurespiegel genügend schnell zu kompensieren. Diese hohe Anfälligkeit, die sich bereits bei einer Verminderung der Substitution zeigt (8), wirft die Frage auf, ob eine maximale Versorgung mit Vitamin C sinnvoll bzw. physiologisch optimal ist.

Der Vergleich der Ergebnisse nach Versorgung mit 5 mg Vitamin C in 100 g Futter und einer akkumulativen Zufuhr der gleichen Menge via Schlundsonde zeigt, in Leber und Nierenrinde gleichartig, daß es bei marginaler Substitution nicht gleichgültig ist, in welcher Weise das Vitamin zugeführt wird. Die akkumulative Versorgung ist offen-

sichtlich effektiver. Anscheinend reicht es aus, daß die Ascorbinsäurespiegel vorübergehend, kurz nach der akkumulierten Applikation des Vitamins mittels Sonde, über das Niveau ansteigen, das bei kontinuierlicher Zufuhr über das Futter erreicht wird. Der Befund weist sehr deutlich auf eine indirekte, induktive Wirkung des Vitamins.

Die Untersuchungen zum Einfluß von Evipan bei marginal versorgten Meerschweinchen zeigen, daß der um ungefähr 35 % verminderte Gehalt an Cytochrom P-450 in der Leber zu einer etwa entsprechend verlängerten Schlafzeit führt. Die Befunde, daß sowohl das gesamte mikrosomale Protein als auch der spezifische Gehalt an Cytochrom P-450 und die entsprechenden Schlafzeiten durch mehrfache Gaben von Evipan auf das gleiche Niveau induziert werden, wie bei höher mit Vitamin C substituierten Tieren, zeigen, daß die Reduktion dieses Stoffwechsels nicht irreversibel ist. Ob das Barbiturat hierbei den turnover des Cytochroms (15) in gleichem Ausmaß steigert, wie bei den besser versorgten Tieren, muß allerdings dahingestellt bleiben. Die Ergebnisse demonstrieren außerdem, daß die Abnahme des Cytochrom P-450 bei marginaler Substitution keine direkte Folge der niedrigen Ascorbinsäurespiegel sein kann. Die Abnahme dürfte in die Reihe der bereits beschriebenen Anzeichen eines verlangsamten Stoffwechsels (9) einzuordnen sein und wie diese eine geringe hormonelle Stimulierung des Stoffwechsels widerspiegeln.

Danksagung

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft vielmals für die Förderung dieser Untersuchungen durch eine Sachbeihilfe.

Literatur

1. Beisenherz G, Bolze HJ, Bücher T, Czock R, Garbade KH, Meyer-Arendt E, Pfeleiderer G (1953) Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. *Z Naturforsch* 8:555–577
2. Bock KW, Siekevitz P (1970) Turnover of heme and protein moieties of rat liver microsomal cytochrome b_5 . *Biochem Biophys Res Commun* 41:374–380
3. Bode CH, Goebell H, Stähler E (1968) Zur Eliminierung von Trübungsfehlern bei der Eiweißbestimmung mit der Biuretmethode. *Z Klin Chem Biochem* 6:418–422
4. Chance B, Pappenheimer AW (1954) Kinetic and spectrophotometric studies of cytochrome b_5 in midgut homogenates of cecropia. *J Biol Chem* 209:931–943. (1954) Kinetics of cytochrome b_5 in rat liver microsomes. *ibid* 209:945–951
5. Degkwitz E, Höchli-Kaufmann L, Luft D, Staudinger HJ (1972) Abnahme der Cytochromgehalte und Veränderungen der Kinetik der Monooxygenase in Lebermikrosomen von Meerschweinchen bei verschiedenen Stadien des Ascorbinsäuremangels. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 353:1023–1033
6. Degkwitz E, Walsch S, Dubberstein M (1974) Influence of L-Ascorbate on the concentrations of microsomal cytochrome P-450 and cytochrome b_5 in adrenals, kidneys and spleen of guinea pigs. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 355:1152–1158
7. Degkwitz E, Bödeker RH (1989) Indications for adaptation to differently high vitamin C supplies in guinea pigs. 1. Development of ascorbic acid levels after altered dosing. *This Journal* 28:327–337
8. Degkwitz E, Bödeker RH (1989) Indications for adaptation to differently high vitamin C supplies in guinea pigs. 2. Development of hepatic amounts of microsomal protein and cytochromes (P-450, b_5) after altered dosing. *This Journal* 28:338–344
9. Degkwitz E, Bödeker RH (1990) Characterization of guinea pigs adapted to differently high vitamin C supplies. 1. Blood levels of cholesterol, glucose, triacylglycerides and hemoglobin. *This Journal* 29:21–26

10. Degkwitz E, Bödeker RH (Manuskript eingereicht) Charakterisierung von Meerschweinchen nach Adaptation an unterschiedlich hohe Vitamin-C-Zuführen. 2. Mitochondriale Cytochrome in Leber und Muskulatur
11. Degkwitz E, Bödeker RH (Manuskript eingereicht) Charakterisierung von Meerschweinchen nach Adaptation an unterschiedlich hohe Vitamin-C-Zuführen. 4. Blutspiegel der Schilddrüsen-Hormone
12. Degkwitz E (1991) Neue Aspekte zur „Vitamin“-C-Forschung. *der kinderarzt* 22:2031–2039
13. Goglia F, Liverine G, Lanni A, Bottiglieri S, Barletta A (1985) Alteration in hepatic mitochondrial compartment of cold acclimated rats. *Exp Biol* 44:41–56
14. Gram TE, Litterst CL, Sikic BI, Mimnaugh EG (1976) Differential influence of physiological, pharmacological and pathological alterations on hepatic and extrahepatic drug metabolism. In: V. Ullrich et al. (1977) *International Symposium „Microsomes and drug oxidations“ third 1976 Berlin*, proceedings of the third international Symposium July 1976. Pergamon Press Oxford New York
15. Greim H, Schenkman M, Remmer H (1970) The influence of phenobarbital on the turnover of hepatic microsomal cytochrome b_5 and cytochrome P-450 hemes in the rat. *Biochem Biophys Acta* 201:20–25
16. Klingenberg M (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 75:376–386
17. Leber HW, Degkwitz E, Staudinger Hj (1969) Untersuchungen zum Einfluß der Ascorbinsäure auf die Aktivität und die Biosynthese mischfunktioneller Oxygenasen sowie den Gehalt an Hämoproteiden in der Mikrosomenfraktion der Meerschweinchenleber. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 350:439–445
18. Leber HW, Degkwitz E, Staudinger Hj (1970) Einfluß von Ascorbinsäure auf die Induktion der Monooxygenase in den Lebermikrosomen. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 351:995–1001
19. Luft D, Degkwitz E, Höchli-Kaufmann L, Staudinger Hj (1972) Einfluß von δ -Aminolävulinsäure auf den Gehalt an Cytochrom P-450 in der Leber ascorbinsäurefrei ernährter Meerschweinchen. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 353:1420–1422
20. Modirzadeh J, Kamin H (1965) Reduction of microsomal cytochromes by pyridine nucleotides. *Biochem Biophys Acta* 99:205–226
21. Omura T, Sato R (1963) Fractional solubilization of haemoproteins and partial purification of carbon monoxide-binding cytochrome from liver microsomes. *Biochem Biophys Acta* 71:224–226
22. Omura T, Sato R (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem* 239:2370–2378
23. Omura T, Siekevitz P, Palade GE (1967) Turnover of constituents of the endoplasmic reticulum membranes of rat hepatocytes. *J Biol Chem* 242:2389–2396
24. Smuckler EA, Arcasoy M (1969) Structural and functional changes of the endoplasmic reticulum of hepatic parenchymal cells. *Int Rev Exp Pathol* 7:305–422
25. Walsch S, Degkwitz E (1980) Influence of L-ascorbate deficiency on the metabolism of hepatic microsomal cytochrome P-450 in guinea pigs. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 361:79–83
26. Walsch S, Degkwitz E (1980) Activity of microsomal heme oxygenase in liver and spleen of ascorbic acid-deficient guinea pigs. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 361:1243–1249
27. Zannoni VG, Sato PH (1975) Effects of ascorbic acid on microsomal drug metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 258:119–131

Für die Verfasser:

E. Degkwitz, Biochemisches Institut, Universität Gießen, 35387 Gießen