

Alkoholoxydation und Bildung von Acetoacetat in normaler und glykogenarmer intakter Rattenleber

Von

Olof Forsander, Niels Råihä und Heikki Suomalainen

Aus den Forschungslaboratorien des Staatlichen Alkoholmonopols, Helsinki, Finnland

(Der Schriftleitung zugegangen am 27. Mai 1958)

Durch theoretische Berechnungen und durch direkte Experimente an isolierter Katzenleber hat Lundsgaard¹ gezeigt, daß Äthylalkohol in der Leber nur teilweise oxydiert wird. Er nahm an, daß das in der Leber gebildete Oxydationsprodukt, welches ausgeschieden und extrahepatisch zu CO₂ und Wasser weiteroxydiert wird, Essigsäure sei. Himwich et al.² sowie Friedemann und Kimeciak³ konnten allerdings bei Hunden nach Verabreichung von Alkohol keine bemerkenswerte Anreicherung von Essigsäure gegenüber den Kontrollen finden. Die negativen Befunde können zwar darauf beruhen, daß die Essigsäure im Gewebe rasch abgebaut wird⁴. Man könnte sich auch vorstellen, daß Acetaldehyd das teilweise aus der Leber ausgeschiedene Abbauprodukt darstellt. Weil aber Acetaldehyd außerhalb der Leber nicht in größerem Ausmaß oxydiert werden kann⁵, muß man davon ausgehen, daß Alkohol in der Leber bis zur Essigsäure oxydiert wird.

Bei der Perfusion von Hundeleber mit Blut, das Acetaldehyd oder Essigsäure enthielt, hat man gefunden, daß Ketonkörper gebildet werden⁶. Bei Versuchen mit Leberschnitten⁷ wie auch mit intakten Tieren⁸ hat es sich ebenfalls gezeigt, daß Essigsäure die Produktion von Ketonkörpern erhöht. Allerdings werden diese nicht immer aus Essigsäure gebildet, sondern nur dann, wenn die Leber an Glykogen verarmt ist. Blixenkrone-Møller⁹ hat gezeigt, daß ein ziemlich gesetzmäßiger Zusammenhang zwischen dem Glykogengehalt der Leber

¹ E. Lundsgaard, C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim. **22**, 333 [1938].

² H. E. Himwich, L. H. Nahum, N. Rakieten, J. F. Fazekas, D. DuBois, u. E. F. Gildea, J. Amer. med. Assoc. **100**, 651 [1933].

³ E. E. Friedemann u. T. C. Kimeciak, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **40**, 669 [1939].

⁴ D. R. Drury u. A. N. Wick, J. biol. Chemistry **203**, 411 [1953].

⁵ M. Lubin u. W. W. Westerfeld, J. biol. Chemistry **161**, 503 [1945].

⁶ E. Friedemann, Biochem. Z. **55**, 436 [1913].

⁷ M. Jowett u. J. H. Quastel, Biochem. J. **29**, 2159 [1935].

⁸ E. M. MacKay, R. H. Barnes, H. O. Carne u. A. N. Wick, J. biol. Chemistry **135**, 157 [1940].

⁹ N. Blixenkrone-Møller, Ketonstoffernes Stilling og Betydning i det intermediaere Stofskifte, København 1938.

und der Bildung von Ketonkörpern besteht. Masuda¹⁰ fand bei der Perfusion von Hundeleber mit alkoholhaltigem Blut, daß sich Acetessigsäure bildete, wogegen Lundsgaard¹ bei der Perfusion von Katzenleber keine Bildung von Ketonkörpern nachweisen konnte. Obwohl Alkohol sehr wahrscheinlich über Essigsäure oxydiert wird, kann man doch erwarten, daß unter besonderen Umständen Ketonkörper entstehen können.

Helmreich et al.¹¹ fanden mit Laboratoriumsratten einen Zusammenhang zwischen DPNH-Gehalt und Ketonkörperbildung in der Leber. Je weniger DPNH die Leber enthielt, desto größer war die Ketonkörperbildung. Je länger die Tiere hungerten, desto kleiner war der DPNH-Gehalt der Leber und desto größer war die Bildung von Ketonkörpern.

Werden die Ketonkörper nur bei Abwesenheit von DPNH gebildet, dann sollte die durch Alkoholdehydrogenase katalysierte Alkoholoxydation ihrer Bildung entgegenwirken, da diese, sowie auch die Oxydation des gebildeten Acetaldehyds, fortlaufend DPNH entstehen läßt. Man hat angenommen, daß die Geschwindigkeit, mit welcher die Leber DPNH oxydieren kann, sogar den zeitlichen Ablauf der Alkoholoxydation reguliert¹². Die DPNH-Menge in der Leber sollte daher steigen und die Ketonkörperbildung vermindert werden, wenn der Sauerstoffverbrauch infolge der Oxydation des Alkohols verstärkt wird.

Wir haben Untersuchungen über den Einfluß der Alkoholoxydation auf die Acetessigsäurebildung in der intakten Leber an Laboratoriumsratten vorgenommen. Es wurde die Acetessigsäurebildung sowohl in der normalen, wie auch in der glykogenarmen Leber untersucht. Außerdem stellten wir den Sauerstoffverbrauch nebst DPN- und DPNH-Gehalt der Leber fest.

Methodik

Albino-Laboratoriumsratten mit einem Gewicht von 200–300 g erhielten vor den Versuchen eine Standarddiät ad libitum. Vor den Versuchen mit normalen Lebern wurden die Tiere über Nacht ohne Nahrung gelassen. Während dieser Zeit sank das Leberglykogen auf 10–20% des ursprünglichen Gehaltes. Um einen Glykogenmangel in der Leber zu erzielen, hielten wir die Tiere 40 Stdn. lang ohne Futter bei freiem Zugang zu Wasser. Der Glykogengehalt der Leber sank nach dieser Behandlung auf einen sehr niedrigen Wert, im Mittel auf 0,032% vom Frischgewicht. 1–4 Stdn. vor dem Versuch wurden den Tieren 5 ml 35-proz. Äthylalkohol verabreicht, während die Kontrolltiere ebensoviel Wasser erhielten.

Die Blutproben wurden unter schwach nembutaler Anästhesie aus der Vena portae und der Vena hepatica entnommen. Vor der Blutentnahme aus der Vena hepatica wurde die Vena cava inferior unmittelbar vor den Nieren rasch unterbunden, um eine Durchmischung des venösen Blutes aus den unteren Extremitäten mit dem venösen Leberblut möglichst zu vermindern. Nach der Blutentnahme wurde die Leber zur DPN- und DPNH-Bestimmung entfernt.

Der Sauerstoffgehalt des Blutes wurde nach Roughton und Scholander¹³ bestimmt. Die Blutproben wurden unter Paraffin aufbewahrt und innerhalb

¹⁰ N. Masuda, *Biochem. Z.* **45**, 140 [1912].

¹¹ E. Helmreich, H. Holzer, W. Lamprecht u. S. Goldschmidt, *diese Z.* **297**, 113 [1954].

¹² B. Flaschenträger u. E. Lehnartz, *Physiologische Chemie* II/2a, S. 486, Springer Verlag, Heidelberg 1956.

¹³ F. J. W. Roughton u. P. F. Scholander, *J. biol. Chemistry* **148**, 541 [1943].

1 Stde. nach der Entnahme analysiert. Acetessigsäure im venösen Leberblut wurde nach Walker¹⁴ kolorimetrisch bestimmt. Die Methode wurde insofern modifiziert, als wir die Zugabe von Heparin unterließen, da es sich zeigte, daß das Heparin mit dem verwendeten Reagenz eine die Bestimmung störende Färbung erzeugt. Weil die Blutproben unmittelbar nach der Entnahme enteiweißt wurden, benötigten wir keine Antikoagulentien. DPN und DPNH in der Leber bestimmten wir nach Holzer et al.¹⁵

Ergebnisse

Eine Analyse des Blutes der Vena hepatica bei den normalen Ratten ohne Alkoholbelastung zeigte, daß kleine Mengen Acetessigsäure in der Leber gebildet wurden (Tab. 1). Bei der Verbrennung von Alkohol steigt die Acetoacetatbildung beträchtlich. Daß die glykogenarme Leber Ketonkörper bildet, ist schon lange bekannt; dies bestätigen auch unsere Versuche mit hungernden Tieren ohne Alkoholgabe. Wenn den hungernden Ratten Alkohol verabreicht wurde, stieg die Acetessigsäurebildung äußerst stark an.

Tab. 1. Bildung von Acetessigsäure in der Leber bei normalen Ratten und bei Tieren, welche 40 Stdn. gehungert hatten; mit und ohne Alkoholgabe.

Behandlung der Versuchstiere	Anzahl Tiere	Acetessigsäure mg %
Normal, ohne Alkohol	9	0,3 ± 0,35
Normal, mit Alkohol	11	1,9 ± 1,41
Hungertiere, ohne Alkohol	2	1,2 ± 0,55
Hungertiere, mit Alkohol	7	4,0 ± 2,01

Der Sauerstoffverbrauch in der Leber bei normalen und hungernden Ratten stieg in beiden Fällen nach der Alkoholgabe (Tab. 2), die normale Leber verbrauchte aber mehr Sauerstoff als die an Glykogen verarmte.

Tab. 2. Sauerstoffgehalt in der Vena hepatica und Vena portae bei normalen Laboratoriumsratten und bei Ratten, welche 40 Stdn. gehungert hatten; mit und ohne Alkoholgabe.

Behandlung der Versuchstiere	Anzahl Tiere	Vena hepatica O ₂ Vol.-%	Vena portae O ₂ Vol.-%	Vena portae-Vena hepatica O ₂ Vol.-%
Normal, ohne Alkohol . .	3	9,6 ± 1,40	11,2 ± 0,91	1,6 ± 0,52
Normal, mit Alkohol . . .	9	7,7 ± 2,93	11,9 ± 1,82	4,2 ± 1,90
Hungertiere, ohne Alkohol	3	8,0 ± 1,82	10,2 ± 1,50	2,2 ± 1,98
Hungertiere, mit Alkohol .	4	9,2 ± 3,56	12,1 ± 2,01	2,9 ± 1,55

Ein Vergleich zwischen dem DPNH-Gehalt der Leber bei normalen Ratten vor und nach der Alkoholgabe zeigt, daß dieser unverändert

¹⁴ P. G. Walker, Biochem. J. 58, 699 [1954].
¹⁵ H. Holzer, S. Goldschmidt, W. Lamprecht u. E. Helmreich, diese Z. 297, 1 [1954].

blieb (Tab. 3). Die DPN-Mengen in den alkoholbelasteten Lebern waren jedoch wesentlich niedriger als in den Kontrollebern. In den glykogenarmen Lebern stieg wiederum die DPNH-Menge während der Oxydation des Alkohols im gleichen Verhältnis, wie die DPN-Menge sank. Man kann sich vorstellen, daß der DPN/DPNH-Quotient sich je nach den Fortschritten der Alkoholoxydation verändert und ein eventueller Sauerstoffmangel immer mehr erkennbar würde. Deshalb untersuchten wir den DPN/DPNH-Quotienten zu verschiedenen Zeiten nach der Alkoholgabe, konnten aber innerhalb der 1—4 Stdn. dauernden Alkoholoxydation keine Veränderung des Quotienten feststellen.

Tab. 3. Gehalte an DPN und DPNH in der Leber, berechnet auf deren Frischgewicht, bei normalen Ratten und bei Tieren, welche 40 Stdn. gehungert hatten; mit und ohne Alkoholgabe.

Behandlung der Versuchstiere	Anzahl Tiere	DPN µg/g	DPNH µg/g	DPN +DPNH µg/g	DPN/DPNH
Normal, ohne Alkohol . .	7	223±73	125±51	350	1,8
Normal, mit Alkohol . . .	10	155±39	125±56	280	1,2
Hungertiere, ohne Alkohol . .	4	138±26	87±30	225	1,6
Hungertiere, mit Alkohol . . .	7	118±45	109±44	227	1,1

Diskussion

Die Resultate der Versuche zeigen, daß bei der Alkoholbelastung in der intakten Rattenleber Acetessigsäure entsteht und daß die gebildete Menge in der glykogenarmen Leber größer ist als in der normalen. Die gleichen Regeln gelten für die Ketonkörperbildung aus Essigsäure und Fett. Diese Versuche beweisen nicht direkt, daß Acetessigsäure aus Alkohol entsteht; da aber bekannt ist, daß Alkoholgaben die Bildung von Ketonkörpern aus anderen Stoffen vermindern¹⁶, ist mit aller Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß die von uns beobachtete vermehrte Acetessigsäure aus dem Alkohol — wohl über Essigsäure und Acetyl-CoA — gebildet wird. Eine Berechnung über die Oxydationsgeschwindigkeit des Alkohols und das Blutminutenvolumen in der Leber ergibt, daß, wenn der gesamte in der Rattenleber oxydierte Alkohol zu Ketonkörpern umgesetzt würde, deren Konzentration in der Vena hepatica einen Wert von 10—15 mg pro 100 ml Blut erreichen würde. Da die Konzentration der Acetessigsäure im Blut im Mittel 36% der gesamten Ketonkörperkonzentration ausmacht¹⁷, findet man, daß in der glykogenarmen Leber ein großer Teil des abgebauten Alkohols in Ketonkörper übergegangen ist.

¹⁶ O. Neubauer, Münchener med. Wschr. **53**, 791 [1906]; A. Warming-Larsen, Acta med. scand. **132**, 458 [1949].

¹⁷ L. A. Crandall, J. biol. Chemistry **135**, 139 [1940].

Helmreich et al.¹¹ haben gefunden, daß nach einer längeren Fastenzeit der DPN/DPNH-Quotient in der Rattenleber ansteigt; dies beruht zu einem großen Teil darauf, daß der DPNH-Gehalt gesunken ist. Bei unseren Versuchen aber sind nach einem kürzeren Fasten sowohl die DPN- wie auch die DPNH-Gehalte gesunken, und auch der Quotient sank ab. Nach Alkoholgabe sank der DPN/DPNH-Quotient sowohl in der glykogenarmen wie auch in der normalen Leber. In der normalen Leber beruhte dies aber nicht darauf, daß der DPNH-Gehalt gestiegen wäre, sondern daß die DPN-Menge ansehnlich gesunken ist. In der glykogenarmen Leber stieg die DPNH-Menge in gleichem Maße wie die DPN-Menge sank.

Man könnte erwarten, daß der Sauerstoffverbrauch der Leber — der sich im Sauerstoffgehalt des venösen Leberblutes und im DPN/DPNH-Quotienten widerspiegelt — in einiger Beziehung zur Oxydationsgeschwindigkeit des Alkohols stehen würde, so daß in derjenigen Leber, die rascher Alkohol oxydiert, auch mehr Sauerstoff verbraucht oder mehr DPNH angelagert und mehr DPN reduziert wird. Es ist bekannt, daß ein hungerndes Tier langsamer Alkohol oxydiert als unter normalen Verhältnissen. In welchem Ausmaße aber der steigende Sauerstoffverbrauch in der normalen Rattenleber und die steigende DPNH-Bildung in glykogenarmer Leber einander kompensieren, kann aus diesen Versuchen nicht berechnet werden. Der Unterschied zwischen dem Sauerstoffgehalt in der Vena portae und in der Vena hepatica mit und ohne Alkoholoxydation kann aber nicht auf einer Veränderung der Blutströmungsgeschwindigkeit beruhen, weil diese nicht durch Alkohol beeinflusst wird¹⁹.

Der DPN-Schwund in der normalen Leber im Gegensatz zu der glykogenarmen Leber bei der Alkoholoxydation lenkt die Aufmerksamkeit in Richtung auf einen qualitativen Unterschied beim Alkoholabbau. In welchen Stoffwechselvorgängen dieser Unterschied liegen würde, ist bis auf weiteres noch unklar. Es ist zu erwähnen, daß Walkenstein und Weinhouse²⁰ fanden, daß bei der Oxydation von Aldehyden mit Mitochondrien aus Rattenleber DPN oder ATP benötigt wird, damit der Abbauprozess ablaufen kann. Weil DPN und ATP miteinander im Gleichgewicht stehen²¹, kann unter gewissen Verhältnissen das Gleichgewicht so verschoben werden, daß ein Verbrauch an DPN resultiert. Frunder et al.²² haben gefunden, daß bei der intraperitonealen Injektion von Kohlenstofftetrachlorid bei der Maus der Gehalt an DPN

¹⁸ L. F. Leloir u. J. M. Munoz, *Biochem. J.* **32**, 299 [1938]; A. Mirsky u. N. Nelson, *Amer. J. Physiol.* **127**, 308 [1939]; J. J. Vitale, J. DiGiorgio, H. McGrath, J. Nay u. D. M. Hegsted, *J. biol. Chemistry* **204**, 257 [1953].

¹⁹ C. M. Smythe, H. O. Heinemann u. S. E. Bradley, *Amer. J. Physiol.* **172**, 737 [1953].

²⁰ S. S. Walkenstein u. S. Weinhouse, *J. biol. Chemistry* **200**, 515 [1953].

²¹ A. Kornberg, *J. biol. Chemistry* **182**, 779 [1950].

²² H. Frunder, H. Börnig, G. Richter u. K. Stade, *diese Z.* **307**, 161 [1957].

und DPNH in der Leber vermindert wird. Weil Kohlenstofftetrachlorid und Alkohol in bezug auf den Stoffwechsel der Leber — wenigstens in einigem — den gleichen Einfluß haben, kann man sich vorstellen, daß die CoenzymI-Verluste in beiden Fällen eine Erscheinung derselben Art darstellen.

Zusammenfassung

Die Acetessigsäurebildung aus Äthylalkohol durch Perfusionsversuche an intakter, normaler und glykogenarmer Rattenleber wurde untersucht. In beiden Fällen entstand Acetessigsäure, doch bildete die glykogenarme Leber mehr als die normale. Der DPN/DPNH-Quotient sank im gleichen Verhältnis sowohl in der normalen wie auch in der glykogenarmen Leber während der Alkoholbelastung, verglichen mit dem Quotienten ohne Alkoholgabe. Bei der normalen Rattenleber beruht die Verminderung des Quotienten darauf, daß die DPN-Menge sinkt, während die DPNH-Menge unverändert bleibt, bei der Leber hungernder Tiere hingegen vermindert sich die DPN-Menge im gleichen Maße, wie die DPNH-Menge steigt. Als Folge des Alkoholabbaues steigt der Sauerstoffverbrauch. Die Steigerung ist bei der normalen Leber größer als bei der glykogenarmen.

Summary

The formation of acetoacetic acid from ethanol has been investigated in perfusion experiments with intact, normal and glycogen-poor rat livers. In both cases acetoacetic acid was formed but in the case of the glycogen-poor liver the formation was greater. The DPN/DPNH quotient sank in the same relationship in the normal and glycogen-poor livers during the alcohol addition compared to the quotient which exists in the absence of alcohol. In the case of the normal rat liver the decrease in the quotient resulted from a decrease in DPN, the DPNH remaining unchanged. In the case of the starved rat livers, however, DPN decreased in the same amount as the DPNH increased. As a result of the alcohol degradation the consumption of oxygen increased. This increase was greater in the normal than in the glycogen-poor liver.