Aus der Medizinischen Universitätsklinik
(Ludolf Krehl-Klinik) Heidelberg

Direktor: Professor Dr.med. Karl Matthes

BESTIMMUNG INTRAVITALER REDOXPOTENTIALE UNTER VERSCHIEDENEN BEDINGUNGEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Ruprecht-Karl-Universität
zu Heidelberg

vorgelegt von

Hubert Gottschling
aus Łódź

- 1 9 5 8 -

Dekan: Professor Dr. med. Werner K I N D L E R

Referent: Privatdozent Dr. med. Benno H E S S

Korreferent: Professor Dr. med. Karl M A T T H E S

Meinen Eltern gewidmet

Heidelberg, 22. August 1958.

Hubert.

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einführung 3

1.1. Stoffwechsel und Energetik 3

1.2. Atmung und Glykolyse als Stoffwechselmotoren des Organismus 3

1.3. Biologische Oxydation und ATP-System 4

1.4. Prinzipien der Oxydoreduktion und Zellatmung 4

1.5. Schlüsselstellung des BTS-MS-Systems auf der Seite des Substratgeschehens und des DPN_{ox}-DPN_{red}-Systems auf der Seite der Atmungskette 7

1.6. Beeinflußbarkeit des Substratumwandlungsgeschehens und der Atmungskettenfunktion 9

1.7. Biochemie der α-Liponsäure 10

1.8. Bisherige Erfahrungen mit α-Liponsäure 11

1.9. Themastellung der vorliegenden Arbeit 12

2. Methodik 13

2.1. Bestimmung von BTS- und MS-Konzentrationen 13

2.1.1. Vorbereitungen der zu untersuchenden Personen 13

2.1.2. Blutentnahme und Enteiweißung 13

2.1.3. Physikochemische Grundlagen der Bestimmungsmethoden 14

2.1.4. Biochemische Grundlagen der Bestimmungsmethoden 16

2.1.5. Durchführung der Konzentrations-Bestimmungen 17

2.1.5.1. BTS-Bestimmung 17

2.1.5.2. MS-Bestimmung 18

2.1.6. Ausarbeitung der Berechnungsformel für die BTS- und MS-Konzentration 19

2.1.7. Kritik der Methoden 22

Seite

2.1.7.1. Eignung der Methoden für die vorliegende Aufgabe und ihre Spezifität 20
2.1.7.2. Genauigkeit der Methoden 21

2.2. Ableitung der Formel zur Berechnung des Redoxpotentials und Durchführung der Berechnung an einem Beispiel 24

2.3. Das α-Liponsäure-Präparat und die Durchführung seiner Applikation 31

3. Ergebnisse 33

3.1. BTS- und MS-Konzentrationen bei Gesunden und bei Kranken, die Quotienten [MS]/[BTS] und [BTS]/[MS] und die daraus berechneten Redoxpotentiale 33

3.2. BTS- und MS-Konzentrationen, die Quotienten [MS]/[BTS] und [BTS]/[MS] und die daraus berechneten Redoxpotentiale unter dem Einfluß von α-Liponsäure 37

4. Diskussion 40

5. Zusammenfassung 44

6. Literaturverzeichnis 45

1. Einführung

1.1. Stoffwechsel und Energetik

Eine aufschlußreiche Beurteilung biochemischer Umsetzungen für das Verständnis des organischen Geschehens kann sich nicht auf eine stoffliche Untersuchung beschränken, sondern muß dem Gesichtspunkt der Energetik Raum geben. Der tierische und menschliche Organismus entnimmt die Energie für alle Lebensprozesse den mit der Nahrung zugeführten hochmolekularen chemischen Körpern großer potentieller Energie. Die Energiefreisetzung vollzieht sich Schritt für Schritt durch stufenweise Oxydation der "Brennstoffe" des Stoffwechsels, die durch Hydrolyse der Fette, Eiweißstoffe und Kohlehydrate bereitgestellt werden. Den materiellen Reaktionen des Stoffwechsels entsprechen auf jeder Stufe energetische Verschiebungen, deren quantitative Erfassung notwendig zur vollständigen Beschreibung eines Vorgangs gehört. Insgesamt handelt es sich um ein stationäres System reversibler chemischer Gleichgewichte. Alle einzelnen Gleichgewichte stehen miteinander im Zusammenhang. Die Gleichgewichtslagen werden durch die Zufuhr und Abgabe von Stoffen kinetisch bestimmt.

1.2. Atmung und Glykolyse als Stoffwechselmotoren des Organismus

Der Zelle stehen zwei Mechanismen zur Verfügung, um den Energiebedarf für die organischen Zelleistungen zu decken: die Zellatmung und die Glykolyse. Zellatmung und Glykolyse treiben den Stoffwechselfluß kontinuierlich voran. Die Zellatmung ist die aerobe, die Glykolyse die anaerobe Form der biologischen Oxydation. Bei der Zellatmung führt die Oxydation der Substrate über die Atmungskette zur Reduktion des molekularen Sauerstoffs. Als Endprodukte werden Wasser

und Kohlendioxyd ausgeschieden. Am Schluß der glykolytischen Reaktionskette erscheinen Brenztraubensäure und Milchsäure. Sauerstoff wird nicht verbraucht. Im normalen Stoffwechselgeschehen dominiert weitaus die Zellatmung. Im Gegensatz zur Glykolyse, die nur mit Kohlehydraten gespeist werden kann, gehen in das Oxydationsgeschehen der Zellatmung auch die Metaboliten der Fette und Eiweißstoffe ein. Die Glykolyse vermag nur kurzfristig die Energielieferung zu besorgen. Starke Glykolyse ist stets Ausdruck von Sauerstoffmangel, einer Schädigung der Atmungskette oder anderen pathologischen Bedingungen.

1.3. Biologische Oxydation und ATP-System

Alle energieliefernden Prozesse der biologischen Oxydation führen zur Formierung einer einzigen Standardform chemischer Energie: der energiereichen Phosphatbindung. Sie ist hauptsächlich im Adenosintriphosphat realisiert, das aus Adenosindiphosphat und anorganischem Phosphat synthetisiert wird. Das ATP-System beliefert energetisch alle endergonen Reaktionen, auf denen die Zelleistungen beruhen. Dabei wird das ATP wieder in ADP und anorganisches Phosphat gespalten.

1.4. Prinzipien der Oxydoreduktion und Zellatmung

Die Bedingungen des Organismus sind für die Oxydation der chemisch sehr stabilen Stoffwechselsubstrate nicht hinreichend. Das ist insofern sinnvoll, als sonst dauernd auch unbenötigte Energien freigesetzt würden. Im Oxydationsmechanismus der Atmungskette hat der Organismus dieses Problem auf eine eigentümliche Weise gelöst. Er stellt eine Kette von Reaktionen dar, die bis ins kleinste von dem komplexen, im einzelnen spezifisch selektiv wirkenden Fermentkatalysatorensystem der Zelle geregelt wird. Zutreffende Vorstellungen über das Funktionieren der

Zellatmung zu entwickeln, war man erst in dem Augenblick in der Lage, als die Begriffe der Oxydation und Reduktion allgemein als Elektronenentzug beziehungsweise Elektronenzufuhr formuliert werden konnten. Der Sauerstoff tritt nur am Ende der Atmungskette als Elektronenauffänger in Erscheinung.

Elektronenübertragungen kann es nur geben, wenn ein Elektronenakzeptor vorhanden ist, der die Elektronen, die dem zu oxydierenden Substrat entzogen werden sollen, aufnimmt, der also auf diese Weise selbst reduziert wird. Innerhalb der Atmungskette und der Substratumwandlungen sind alle Reaktionen reversibel. Es handelt sich also stets um zwei Redoxsysteme, zwischen denen ein Elektronentransport getätigt wird. Im stationären Zustand herrscht in den einzelnen Redoxsystemen ein dynamisches Reaktionsgleichgewicht. Ändert sich die Konzentration irgendeines Reaktionsteilnehmers, dann gerät die gestörte Gleichgewichtsdynamik in Fluß, bis das Gleichgewicht wiederhergestellt ist.

Aus dem allgemeinen Oxydations- und Reduktionsbegriff geht hervor, daß diese Vorgänge durch elektronenentziehende und elektronenzuführende Kräfte vorangetrieben werden. Der Ausdruck dieser Kräfte ist ein elektrisches Potential. Jedes Redoxsystem ist durch eine solche elektrische Spannung gekennzeichnet, durch das Redoxpotential. Das Redoxpotential eines Redoxsystems gibt somit an, wie stark die Tendenz der Reaktionspartner zur Elektronenabgabe beziehungsweise zur Elektronenaufnahme ist, das heißt zur Oxydation beziehungsweise Reduktion. Da die Oxydation der Substrate stufenweise Energie freigibt, ist damit das Redoxpotential auch ein Ausdruck für die Änderung der freien Energie in einer Reaktion.

Das Redoxpotential eines Systems nimmt gegenüber dem eines anderen ein bestimmtes Verhältnis ein, das festlegt, in welcher Richtung der Elektronentransport nur möglich ist: nämlich nur von dem Redoxsystem mit dem größeren Energiepotential auf das mit dem kleineren.

Nach Maßgabe dieses Prinzips ist die Atmungskette angeordnet und vollziehen sich alle Metabolitenumwandlungen. Als materielle Elektronenüberträgersysteme der Atmungskette fungieren die Atmungsfermente beziehungsweise bestimmte Cofermente, enzymatische oder anorganische Komplemente, die an verschiedenen Apofermenten reversibel beziehungsweise irreversibel gebunden sind. Als Redoxsysteme transportieren diese Wirkungsgruppen in ständig reversibler Dynamik, hintereinandergeschaltet nach der Größe ihrer Redoxpotentiale, Elektronen von den Substraten bis zum Sauerstoff in folgender Anordnung:

Substrat $\rightleftharpoons$ Pyridinfermente $\rightleftharpoons$ Flavinfermente $\rightleftharpoons$

Cytochrom b $\rightleftharpoons$ Cytochrom c $\rightleftharpoons$ Cytochrom a $\rightleftharpoons$

Cytochrom a_3 $\rightleftharpoons$ H_2O / O_2

Dieses Schema der Atmungskette stellt nur in großen Zügen das Geschehen dar. Im einzelnen spielt sich eine Fülle von Prozessen innerhalb und am Rande dieser Reihe ab. Auch die Koppelung der Atmungskette mit den Phosphorylierungsvorgängen soll in diesem Rahmen nicht ausgeführt werden, obgleich sie, teleologisch betrachtet, der Zweck der Zellatmung ist.

Es sei nur noch einmal kurz darauf hingewiesen, daß neben dieser Atmungskettenphosphorylierung auch die Glykolyse einen biologischen Weg zur Phosphorylierung darstellt, freilich einen sehr viel weniger rentablen: Die Glykolyse bringt über die Substratphosphorylierung je Mol Glucose einen Energiegewinn von 2 Mol ATP gegenüber einem Energieertrag von 38 Mol ATP über die Atmungskettenphosphorylierung eines Mol Glucose.

1.5. Schlüsselstellung des BTS-MS-Systems auf der Seite des Substratgeschehens und des DPN_{ox}-DPN_{red}-Systems auf der Seite der Atmungskette

Die kurze Gegenüberstellung von Glykolyse (Substratphosphorylierung) und Zellatmung (Atmungskettenphosphorylierung) gibt einen Hinweis, der zum speziellen Thema dieser Arbeit hinführen soll. Am Ort der Brenztraubensäure (BTS) treffen Glykolyse und Zellatmung zusammen. Innerhalb der glykolytischen Reihe wird BTS bei Sauerstoffmangel oder nicht intakter Atmungskette durch das reduzierte Diphosphopyridinnucleotid (DPN_{red}), von Milchsäuredehydrogenase (MDH) katalysiert, zu L(+)-Milchsäure (MS) reduziert. Ist Sauerstoff vorhanden, dann kommt es nicht dazu, sondern das DPN_{red} reduziert das Alloxazin der Flavinfermente. BTS geht in die weiteren Substratumwandlungen ein, und es kommt nicht zur Milchsäurebildung.

Hier führt die Betrachtung auf die bedeutungsvolle Stellung der beiden Stoffe MS und BTS, bedeutungsvoll sowohl für die Erforschung und das Verständnis des normalen intrazellulären Geschehens wie für seine Pathologie, auch in klinisch-diagnostischer Hinsicht. Diese Bedeutung eröffnet sich natürlich erst im Zusammenhang mit der Einsicht in das Zusammenspiel der MS und BTS mit dem Mechanismus der fermentativen Reaktionsfolgen, insbesondere mit den Reaktionen des Diphosphopyridinnucleotids. Die hervorragende Rolle des DPN_{ox}-DPN_{red}-Systems liegt in seiner Schlüsselstellung, die es zwischen den Substratumwandlungen und der Atmungskette einnimmt. Das Schema der Abb. 1 soll einen Ausschnitt aus diesen Zusammenhängen geben. Es zeigt einige der Oxydoreduktionen, die das Redoxsystem DPN_{ox}/DPN_{red} katalysieren kann.

Die vielseitigen Reaktionsmöglichkeiten des DPN_{ox}-DPN_{red}-Systems (wie der Pyridinnucleotide überhaupt) sind darin begründet, daß die Bindungen an eine große Zahl von sub-

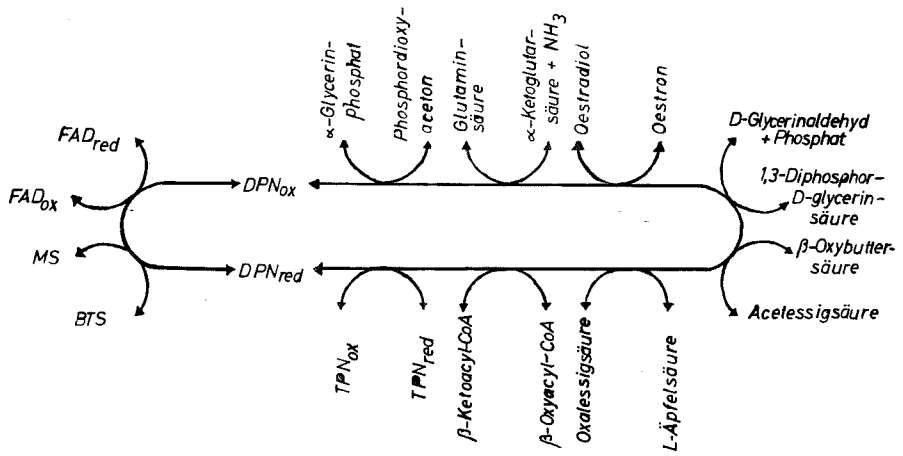


Abb. 1 (abgewandelt nach HESS (14))

stratspezifischen Apofermenten durch hohe Dissoziationskonstanten charakterisiert sind (Größenordnung 10^{-6} Mol/l). Auf diese Weise ist der leichte Wechsel von einem Apoferment zum anderen gewährleistet.

In welchem Maße das Stoff- und Energiewechselgeschehen sich in MS- und BTS-Verhältnissen niederschlägt, sollen noch folgende Hinweise aufzeigen. Schon oben wurde angedeutet, daß sich jede Inhibition der Zellatmung (durch Sauerstoffmangel, Substratmangel, Fermentmangel, Schädigung der Atmungskette an irgendeiner Stelle, Entkoppelung von Atmungskette und Atmungskettenphosphorylierung) als Steigerung der Glykolyse bemerkbar macht. Diese Steigerung

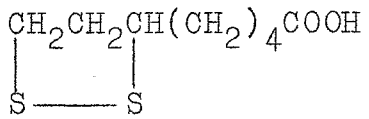
äußert sich primär als Erhöhung des Glucoseverbrauchs auf der einen Seite und als Erhöhung der BTS- und MS-Ausscheidung auf der anderen Seite. Eine besondere Beachtung verdient in diesem Rahmen auch die Entdeckung WARBURGs, daß die Krebszelle in hohem Maße glykolysiert. Schließlich bestimmen alle destruierenden und synthetisierenden Substratumwandlungen, in denen die BTS mitspielt, das BTS-MS-Konzentrationsverhältnis, sodaß es auch bei jeder Störung innerhalb dieses Bereichs zur Ansammlung von BTS kommt.

1.6. Beeinflußbarkeit des Substratumwandlungsgeschehens und der Atmungskettenfunktion

Aus dem bisher Dargestellten geht hervor, daß sich aus dem Zustand des DPN_{ox}-DPN_{red}-Systems und des BTS-MS-Systems die Redoxverhältnisse der Atmungskette und viele Beziehungen des Substratumwandlungsgeschehens ablesen lassen. Umgekehrt wird sich jede physiologische und pathologische Veränderung in irgendeinem Bereich des Stoff- und Energiewechsels der Zelle immer auch im Zustandsbild des DPN_{ox}-DPN_{red}-Systems und des BTS-MS-Systems widerspiegeln. Inwiefern die Redoxverhältnisse des DPN_{ox}-DPN_{red}-Systems beziehungsweise die des BTS-MS-Systems einen Indikator des gesamten Zellstoffwechsels darstellen, wird weiter unten bei der Ableitung der Formel zur Berechnung des Redoxpotentials näher aufgezeigt werden. Das Zustandsbild dieser Systeme quantitativ zu erfassen, ist von eminenter Bedeutung. So auch nur kann man der Verwirklichung der Möglichkeit näherrücken, den Organismus von dieser hervorragenden Stelle her therapeutisch zu beeinflussen. Als Einsatzpunkt einer solchen Einflußnahme können beispielsweise die Stoffwechselvorgänge fungieren, an denen die BTS beteiligt ist. Derartige Umwandlungen sind zum Beispiel die Transaminierung des Alanins zu BTS, die Dephosphorylierung von Phosphoenolbrenztraubensäure und die oxydative Decarboxylierung der BTS zu Acetyl-CoA. Unter den Katalysatoren der oxydativen Decarboxylierung von α-Ketosäuren befindet sich die α-Liponsäure.

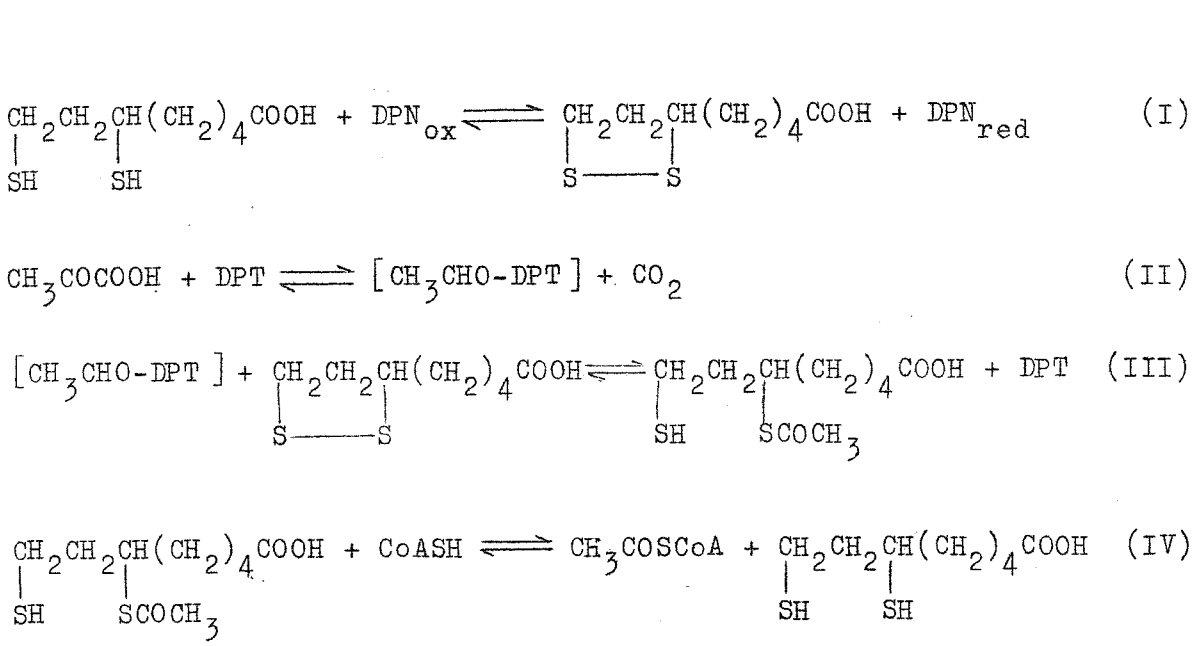
1.7. Biochemie der α-Liponsäure

Liponsäure spielt sowohl im pflanzlichen wie im tierischen Stoffwechsel eine besondere Rolle. 1941 fand V. C. DEWEY (7), daß das Wachstum bestimmter Protozoen von einem essentiellen, in Naturstoffen (tierischen Organen, Hefe, Gras) vorkommenden Faktor abhängt. Folgende Forschungen von V. C. DEWEY und KIDDER (8, 20, 21), GUIRARD und Mitarb. (11), O'KANE und GUNSALUS (25), STOKSTAD und Mitarb. (33), SNELL und BROQUIST (32) führten in den Jahren bis 1950 zur Einsicht, daß die nach den verschiedenen Funktionen benannten Stoffe "Faktor II", "acetatersetzender Faktor", "BTS-Oxydationsfaktor" und "Protogen" identisch sind. 1951 wurde der Stoff von REED und Mitarb. (30) und der LEDERLE-Gruppe (23) kristallisiert aus Leber gewonnen und 1952 seine Struktur aufgedeckt und als α-Liponsäure, Thioctinsäure oder Thioctsäure bezeichnet. Ob es sich um einen auch für höhere Organismen essentiellen Stoff handelt, ist noch nicht aufgewiesen worden. Seine Rolle im Stoffwechsel hat man hauptsächlich an Mikroorganismen studiert. Chemisch handelt es sich um 6,8-Dithiooctansäure (3):



Sie ist die oxydierte Form der Verbindung und stellt mit der hydrierten Form, der 6,8-Dimercaptooctansäure, ein Redoxsystem dar, das im Stoffwechsel mit Hilfe des DPN_{ox}-DPN_{red}-Systems seinen Wasserstoff überträgt (23) (Reaktion I). Die Beteiligung der Thioctsäure an der oxydativen Decarboxylierung der BTS besteht darin, daß sie aus dem Acetaldehyd-Diphosphothiamin-Komplex das dazu notwendige Diphosphothiamin freimacht (Reaktion II und III), wobei sie selbst acetyliert wird. Aus dieser Form entsteht durch Reaktion mit reduziertem CoA Dihydrothioctsäure (Reaktion IV), wodurch sich der Kreis schließt.

Die kurze Darstellung der biochemischen Funktion der α-Liponsäure läßt deutlich werden, daß dieser Stoff aufgrund seiner metabolischen Stellung und seiner Eigenschaft als Redoxsystem gut dazu geeignet ist, zur Untersuchung der Beeinflußbarkeit des Zellstoffwechsels herangezogen zu werden.



1.8. Bisherige Erfahrungen mit α-Liponsäure

Eine umfassende Bibliographie und eine Zusammenstellung wichtiger Forschungsergebnisse über α-Liponsäure ist von der American Cyanamid Company, LEDERLE Laboratories Division (23) herausgegeben worden. Bei deren Durchsicht und in Arbeiten von SUMMERSKILL und Mitarb. (34), RAUSCH (29), BANSI und Mitarb. (1) und CARFAGNO (4) imponiert in erster Linie die Wirkung von α-Liponsäure auf den BTS- und α-Ketoglutarsäure-Spiegel des Blutes im Sinne einer Senkung, besonders bei pathologisch erhöhten Konzentrationen dieser Stoffe (Lebererkrankungen). Dieser Befund kann als Ausdruck intrazellulärer Stoffwechselreaktionen der Thioctinsäure angesehen werden. Die katalytische Wirkungsweise ist am wahrscheinlichsten. Stimulierende Effekte der Thioctinsäure sind umstritten.

Zu einer Erklärung der intravitalen Thioctinsäure-Wirkungen reichen die bisher bekannten experimentellen Ergebnisse noch nicht aus, vor allem, weil sie quantitativ zu wenig erfaßt sind. Der oben kurz dargestellte biochemische Wirkungsmechanismus dürfte jedoch im Prinzip auch im Organismus zur Auswirkung kommen.

1.9. Themastellung der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit will unter zwei Gesichtspunkten einen Beitrag zur weiteren Klärung der aufgeworfenen Fragen liefern: Einmal sollte versucht werden, quantitativ den Funktionszustand der Atmungskette in vivo zu erfassen. Dazu bestimmten wir unter verschiedenen Bedingungen die Konzentrationsverhältnisse des BTS-MS-Systems (und somit auch des reagierenden Anteils des DPN_{ox}-DPN_{red}-Systems) und berechneten daraus Zellredoxpotentiale. (BTS und MS wurden im venösen Blut analysiert; Begründung folgt unten.) Zum anderen ging es uns darum, quantitative Daten über die Beeinflußbarkeit des Zellredoxpotentials durch intravenöse Applikation von α-Liponsäure zu ermitteln.

2. Methodik

2.1. Bestimmung von BTS- und MS-Konzentrationen

Den BTS- und MS-Analysen legten wir die enzymatischen und spektrophotometrischen Bestimmungsmethoden zugrunde, wie sie von KUBOWITZ und OTT (22) und HESS für die BTS und von HOHORST (17) und HESS für die L(+)-MS angegeben worden sind.

2.1.1. Vorbereitungen der zu untersuchenden Personen

Es handelte sich in der Hauptsache um stationäre männliche Patienten der Heidelberger Medizinischen Universitätsklinik. Ausnahmen werden bei der Zusammenstellung der Ergebnisse jeweils angegeben werden. Dort sind auch die speziellen Bedingungen der einzelnen Fälle aufgeführt. Im allgemeinen wurden die Blutentnahmen am Morgen und im Laufe des Vormittags durchgeführt. Die Patienten hatten an dem betreffenden Tag noch keine Speisen zu sich genommen und waren auch noch nicht aufgestanden. Ruhe und Nüchternheit sind notwendige Bedingungen, um vergleichbare Verhältnisse zu haben.

2.1.2. Blutentnahme und Enteiweißung

Die Blutproben wurden mit Glasspritzen aus der ungestauten Vene der Ellenbeuge entnommen. Handelte es sich um eine einmalige Entnahme, dann wurde eine einfache Injektionsnadel (Pravaz Nr. 1) verwendet. Sollten innerhalb kürzerer Zeit mehrere Blutproben gewonnen werden, dann wurde eine Kanüle eingelegt, wie sie beim Bromphthaleintest zur Anwendung kommt. Manchmal war diese Kanüle nach etwa einer

Stunde verstopft, sodaß ein erneuter Einstich nötig war. Das entnommene Blut wurde sofort in 6%ige Perchlorsäure (Herstellung: 5 cm^3 70%ige Perchlorsäure, MERCK Nr. 522, mit Wasser *) ad 100 cm^3 gebracht) gegeben und gut damit durchmischt. Die Perchlorsäure befand sich in Zentrifugenröhrchen, die in Eis aufgestellt waren, das, mit Viehsalz versetzt, eine Unterkühlung von etwa -5° C gewährleistete. Es kamen jeweils etwa 5 cm^3 Blut in genau 5 cm^3 Perchlorsäure. Das genaue Blutvolumen wurde über das Gewicht und das spezifische Gewicht des Blutes (s = 1,057 g/cm^3) berechnet. Das Blut-Perchlorsäure-Gemisch wurde dann in der Kühltruhe (- 4° C) bei mindestens 4000 Umdrehungen/min etwa 20 bis 30 min zentrifugiert und der so gewonnene Zentrifugierüberstand dekantiert. Nur an solchem Überstand kam die MS- und BTS-Konzentration zur Bestimmung, der klar und ungefärbt war. Wenn Hämolyse eingetreten war, ergaben sich nämlich nicht reproduzierbare Werte. Die Ursache dafür, daß das Blut ab und zu hämolytisch wurde, lag wahrscheinlich darin, daß die Glasspritzen nicht immer ganz trocken waren.

2.1.3. Physikochemische Grundlagen der Bestimmungsmethoden

Den Bestimmungen liegt die reversible enzymatische Reaktion

$$MS + DPN_{ox} \overset{MDH}{\rightleftharpoons} BTS + DPN_{red}$$

zugrunde. Die Umsetzung von MS und DPN_{ox} zu BTS und DPN_{red} und umgekehrt ist stöchiometrisch: je Mol MS wird also ein Mol DPN_{ox} zu einem Mol DPN_{red} reduziert, je Mol BTS ein Mol DPN_{red} zu einem Mol DPN_{ox} oxydiert. Damit ist die Berechnung der MS- beziehungsweise BTS-Konzentration aus der DPN_{red}-Extinktionsdifferenz ΔE möglich, die spektrophotometrisch im

---

*) Für alle Analysenzwecke wurde bidestilliertes Wasser verwendet, das durch einen gemischten Amberlite-Ionenaustauscher von Anionen und Kationen (einschließlich Schwermetallionen) befreit worden war.

Bereich eines Absorptionsmaximums des DPN_{red} (bei $\lambda = 340$ mμ) gemessen wird: die MS-Konzentration durch Bestimmung der DPN_{red}-Extinktionszunahme, die BTS-Konzentration durch Bestimmung des DPN_{red}-Extinktionsabfalls, verursacht durch die Bildung von DPN_{red} bei der MS-Oxydation beziehungsweise durch den Verbrauch von DPN_{red} bei der BTS-Reduktion. Sowohl die MS- wie die BTS-Bestimmung ist also im Grunde eine Konzentrationsbestimmung des DPN_{red}, was auf spektrophotometrischem Wege geschah.

Die physikochemische Grundlage dieser Methode ist folgende: Unter der Voraussetzung monochromatischen, parallelstrahlenden Lichts und der Homogenität des durchstrahlten, absorbierenden Mediums erfährt die Lichtintensität I in jeder differentialen Schicht eine Minderung dI, die der Schichtdicke dx proportional ist:

$$\frac{dI}{I} = -k' \cdot dx$$

Für den Durchgang durch eine Schicht der endlichen Dicke d ergibt sich somit eine Gesamtschwächung von

$$\int_0^a \frac{dI}{I} = - \int_0^a k' \cdot dx$$

$$\ln I_a - \ln I_o = -k' \cdot d$$

$$\ln \frac{I_a}{I_o} = -k' \cdot d$$

Der Ausdruck $\log \frac{I_o}{I_a}$ ist als Extinktion E definiert. Es ist also:

$$E = \log \frac{I_o}{I_a} = -\log \frac{I_a}{I_o} = -0{,}43439 \cdot \ln \frac{I_a}{I_o} = 0{,}43429 \cdot k' \cdot d = k \cdot d$$

(LAMBERTsches Gesetz)

Der dekadische Extinktionsmodul k ist von der Wellenlänge λ, der Temperatur, dem Druck und von der Spezifität des durchstrahlten Materials abhängig. Handelt es sich bei dem Medium um eine Lösung, dann ist der Extinktionsmodul oft der Konzentration c der Lösung direkt proportional:

$$k = \varepsilon \cdot c \qquad \text{und} \qquad E = \varepsilon \cdot d \cdot c$$

(BEERsches Gesetz)

Man nennt ε (cm^2/Mol) den molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten, sofern c in Mol/cm^3 und d in cm angegeben werden. Das BEERsche Gesetz ist Abweichungen unterworfen bei Änderungen der Dissoziation, bei Komplexbildungen, bei Hydrolyse und Hydratation, es ist aber unabhängig von der Konzentration c und der Schichtdicke d. Hält man die Bedingungen des LAMBERTschen und des BEERschen Gesetzes ein, so besitzt man in ihnen eine spektrophotometrische Methode zur Bestimmung von Konzentrationen durch Extinktionsmessungen:

$$c = \frac{E}{\varepsilon \cdot d}$$

2.1.4. Biochemische Grundlagen der Bestimmungsmethoden

Im Bereich von $p_H = 7$ verläuft die oben angegebene Reaktion in Gegenwart genügend großer Mengen DPN_{red} aufgrund der Gleichgewichtskonstanten

$$K = \frac{[BTS] \cdot [DPN_{red}] \cdot [H^+]}{[MS] \cdot [DPN_{ox}]} = 4 \cdot 10^{-12}$$

(RACKER (27)) fast quantitativ zur MS hin. Der bei diesem Vorgang auftretende Schwund an DPN_{red} repräsentiert also die im Ansatz enthaltene Pyruvatmenge. - Zur MS-Bestimmung müssen Bedingungen geschaffen werden, welche die Reaktion zu einem Endwertverfahren bezüglich des Laktats variieren. Diese Bedin-

gungen sind von HOHORST (17) eingehend diskutiert worden. Wichtig ist, daß die bei der Oxydation des MS entstehende BTS aus der Reaktion gezogen wird. Dazu dient Semicarbazid. Die Reaktion des Semicarbazids mit DPN_{ox} stört die Methode nicht. Störend wirkt dagegen die Reaktion des Semicarbazids mit dem entstehenden DPN_{red}. Diese Fehlerquelle eliminierten wir dadurch, daß wir, da Wasserstoffionen an der Reduktion der BTS beteiligt sind, die Wasserstoffionenkonzentration verminderten (auf $p_H = 9,5$) und die MDH-Konzentration zur Beschleunigung der enzymatischen MS-Oxydation (gegenüber der relativ langsamen Störreaktion) erhöhten.

2.1.5. Durchführung der Konzentrationsbestimmungen

Die Analysen kamen im allgemeinen am Nachmittag des Tages der Blutentnahmen zur Durchführung. Sämtliche Reagenzien wurden in einer Kühltruhe bei -4° C aufbewahrt und in der notwendigen Frequenz immer wieder frisch angesetzt. Die Messungen der Extinktion wurden bei Zimmertemperatur vorgenommen.

2.1.5.1. BTS-Bestimmung

Herstellung der Reagenzien:

a) Phosphatlösung (1,1 m) zur Entfernung des Perchlorats: 19,2 g K_2HPO_4 (MERCK Nr. 5100) werden mit Wasser ad 100 cm^3 aufgefüllt.

b) DPN_{red}-Lösung ($3 \cdot 10^{-3}$ m): 20 mg DPN_{red} (Diphosphopyridinnucleotid, reduziert, di-Natriumsalz, reinst, von der Firma BOEHRINGER, Mannheim) werden in 10 cm^3 Wasser gelöst.

c) MDH-Lösung: Milchsäuredehydrogenase aus Muskel für analytische Zwecke von der Firma BOEHRINGER, Mannheim, in der Konzentration 5 mg/cm^3.

Ansatz:
2 cm^3 Zentrifugierüberstand werden mit 0,7 cm^3 Phosphatlösung versetzt und 15 min eisgekühlt stehen gelassen, dann der Überstand dekantiert. In eine 1 cm-Quarzküvette kommen 2 cm^3 des vom Perchlorat befreiten Überstandes und 0,05 cm^3 DPN_{red}-Lösung. Dann erfolgt die erste Extinktionsmessung *). Zweite Extinktionsmessung 4 min nach Zugabe von 0,02 cm^3 MDH-Lösung. Die Extinktionsdifferenz ΔE wird der Konzentrationsberechnung zugrundegelegt.

2.1.5.2. MS-Bestimmung

Herstellung der Reagenzien:

a) Glykokollpuffer (nach HOHORST (17)): 7,5 g Glykokoll (MERCK Nr. 4201) und 2,2 g Semicarbazid (MERCK Nr. 7722) werden mit Wasser gelöst und mit 4 n NaOH auf p_H = 9,5 gebracht. Dann wird mit Wasser ad 100 cm^3 aufgefüllt.
b) DPN_{ox}-Lösung: 100 mg DPN "BOEHRINGER", reinst, werden in 5 cm^3 Wasser gelöst.
c) MDH-Lösung: Wie zur BTS-Bestimmung.

Ansatz:
1 cm^3 Zentrifugierüberstand wird mit 1 cm^3 Wasser verdünnt. In eine 1 cm-Quarzküvette kommen 2 cm^3 Glykokollpuffer, 0,2 cm^3 DPN_{ox}-Lösung und 0,2 cm^3 des verdünnten, zu analysierenden Zentrifugierüberstandes. Dann wird durch Zugabe von 0,02 cm^3 MDH-Lösung die Reaktion ausgelöst und gegen einen Reagenzien-Blindwert nach etwa 1/2 h die Extinktion gemessen. Aufhören der Extinktionszunahme bei Zwischenablesungen zeigte uns die Beendung der Reaktion an.

---

*) Für die Extinktionsmessungen stand das Spektrophotometer BECKMAN Modell DU zur Verfügung.

2.1.6. Ausarbeitung der Berechnungsformel für die BTS- und MS-Konzentration

BTS-Bestimmung:
Die Extinktion wurde bei $\lambda = 340$ mμ gemessen. Der Berechnung der Konzentration aus der Extinktionsdifferenz wird der molare dekadische Extinktionskoeffizient

$$\varepsilon = 6{,}22 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$$

zugrundegelegt. Die Konzentration in der Küvette beträgt demnach

$$c = \frac{\Delta E}{\varepsilon \cdot d} = \frac{1}{6{,}22} \cdot 10^{-6} \cdot \Delta E \text{ Mol/cm}^3 = 0{,}1608 \cdot \Delta E \ \mu\text{Mol/cm}^3$$

Durch Berücksichtigung der Verdünnungen ergibt sich als Berechnungsformel für die Konzentration der BTS im Blut:

$$c_{BTS} = 0{,}1608 \cdot \Delta E \cdot \frac{V_K \cdot V_{Bl+P} \cdot V_{v\ddot{U}}}{V_{Bl} \cdot V_{\ddot{U}} \cdot V_E} \ \mu\text{Mol/cm}^3$$

Die Abkürzungen haben folgende Bedeutungen: V_K = Volumen des Küvetteninhalts, V_{Bl} = Volumen der Blutmenge, V_{Bl+P} = Volumen von Blutmenge und Perchlorsäure, $V_{\ddot{U}}$ = Volumen des eingesetzten Zentrifugierüberstandes, $V_{v\ddot{U}}$ = Volumen des durch Phosphatlösung verdünnten Zentrifugierüberstandes, V_E = Volumen der in die Küvette angesetzten Probe.

Berechnungsbeispiel:
$\Delta E = 0{,}151$, $V_K = 2{,}07$ cm^3, $V_{v\ddot{U}} = 2{,}7$ cm^3, $V_{\ddot{U}} = 2$ cm^3, $V_{Bl} = 4{,}89$ cm^3, $V_{Bl+P} = 9{,}89$ cm^3, $V_E = 2$ cm^3.

$$c_{BTS} = 0{,}1608 \cdot 0{,}151 \cdot \frac{2{,}07 \cdot 9{,}89 \cdot 2{,}7}{4{,}89 \cdot 2 \cdot 2} = 0{,}0687 \ \mu\text{Mol BTS/cm}^3 \text{ Blut}$$

MS-Bestimmung:
Es ergibt sich die gleiche Formel für die MS-Konzentration im Blut:

$$c_{MS} = 0{,}1608 \cdot \Delta E \cdot \frac{V_K \cdot V_{Bl+P} \cdot V_{v\ddot{U}}}{V_{Bl} \cdot V_{\ddot{U}} \cdot V_E} \ \mu Mol/cm^3$$

Hier bedeutet $V_{v\ddot{U}}$ das Volumen des mit Wasser verdünnten Zentrifugierüberstandes.

Berechnungsbeispiel:
$\Delta E = 0{,}146$, $V_{K_3} = 2{,}42\ cm^3$, $V_{v\ddot{U}} = 2\ cm^3$, $V_{\ddot{U}} = 1\ cm^3$, $V_{Bl} = 4{,}4\ cm^3$, $V_{Bl+P} = 9{,}4\ cm^3$, $V_E = 0{,}2\ cm^3$.

$$c_{MS} = 0{,}1608 \cdot 0{,}146 \cdot \frac{2{,}42 \cdot 9{,}4 \cdot 2}{4{,}4 \cdot 1 \cdot 0{,}2} = 1{,}215\ \mu Mol\ MS/cm^3\ Blut.$$

2.1.7. Kritik der Methoden

2.1.7.1. Eignung der Methoden für die vorliegende Aufgabe und ihre Spezifität

Da es uns um die Berechnung von Zellredoxpotentialen geht, müssen wir diskutieren, inwiefern die mit den beschriebenen Methoden bestimmten BTS- und MS-Konzentrationen im Blut intrazelluläre Verhältnisse wiedergeben. Die Indikatorfunktion des BTS-MS-Systems für die intrazelluläre Stoff- und Energiewechsellage beruht auf seinen besonderen Eigenschaften.
Die "molare Wirksamkeit" (WARBURG) (Synonyma: Wechselzahl, Umsatzzahl, turnover number) der MDH bezüglich des BTS-MS-Systems ist relativ hoch:

$$\varphi = \frac{\text{Mole umgesetzes Substrat}}{\text{Mole Enzym} \cdot \text{min}} = 31000$$

bei $p_H = 8{,}15$ und 20° C (KUBOWITZ und OTT (22)). Das bedeutet, daß jede Beeinflussung des BTS-MS-Indikatorsystems binnen sehr kurzer Zeit mitgeteilt wird. Diese Mitteilung aus dem Zellinneren ist aufgrund einer Eigenschaft des BTS-MS-Systems im Blut erfaßbar: BTS und MS diffundieren (im Gegensatz zu den Cofermenten) äußerst rasch durch die Zellwände (HESS, persönliche Mitteilung). Der schnelle Austausch von BTS und MS

zwischen intra- und extrazellulärem Raum bedeutet, daß im Blut bestimmte BTS- und MS-Konzentrationen auch die intrazellulären Konzentrationsverhältnisse der beiden Stoffe identisch repräsentieren.

Die Methode zeichnet sich ferner durch die strenge Substratspezifität der MDH aus. MDH setzt zwar zahlreiche α-Oxysäuren (zum Beispiel α-Oxybuttersäure), α-Ketosäuren und α,γ-Diketosäuren um (28), was jedoch für die Blutverhältnisse keine Rolle spielt (HESS (13), KUBOWITZ und OTT (22)).

Pyridinnucleotide finden sich im Serum nicht, allerdings in den Erythrozyten (HESS (13)). Deshalb mußten hämolytische Blutproben verworfen werden.

2.1.7.2. Genauigkeit der Methoden

Um die Genauigkeit der Methoden zu prüfen, wandten wir sie auf Testlösungen an und untersuchten, wieviel von der theoretisch eingegebenen Menge wiedergefunden wird.

BTS-Bestimmung:
Herstellung der Testlösung: 12,5 mg Natriumpyruvat werden mit Wasser ad 1000 cm^3 aufgefüllt. Die Konzentration entspricht 10 γ BTS/cm^3.
Es wurden 10 Bestimmungen mit einer theoretischen Eingabe von 7,407 γ BTS (x_o) gemacht. Wiedergefundene Mengen (x_i), deren Mittelwert ($\bar{x}$) und die Streuung s *) sind der folgenden Zusammenstellung zu entnehmen (Tabelle 1).

---

*) Berechnungsformel für s nach WEBER (36):

$$s = \pm\sqrt{\frac{1}{n-1}\left(\sum_{i=1}^{n}\left[x_i-x_o\right]^2 - n\left[\bar{x}-x_o\right]^2\right)}$$

Nr.	Wiedergef. BTS in γ x_i	$x_i - x_o$
1	7,24	-0,167
2	7,47	+0,063
3	7,03	-0,377
4	7,59	+0,183
5	7,32	-0,087
6	7,24	-0,167
7	7,47	+0,063
8	7,06	-0,347
9	7,30	-0,107
10	7,59	+0,183

x_o = 7,407 γ

$\bar{x}$ = 7,331 γ

s = ±0,1983

= ±2,68 % von x_o

Tabelle 1

MS-Bestimmung:

Herstellung der Testlösung: 106,59 mg L,D-Lithiumlactat werden mit Wasser ad 500 cm^3 aufgefüllt. Die Konzentration entspricht 100 γ L(+)-MS/cm^3.

Die Tabelle 2 gibt Auskunft über die Genauigkeit der Methode. Unter dem arithmetischen Mittelwert $\bar{x}$ der wiedergefundenen Mengen x_i steht in Klammern der jeweils größte und kleinste Wert der x_i. Die Eichkurve (Abb. 2) zeigt, daß bei Testmengen >30 γ pro Ansatz die Linearität zwischen den eingegebenen Testmengen und den Extinktionswerten nicht mehr erfüllt ist. Wir nehmen an, daß unter diesen Bedingungen die Fermentmengen nicht ausreichen. Für die Untersuchungen spielt diese Abweichung keine Rolle, da niemals so hohe MS-Mengen im Ansatz vorkommen.

Theoretische MS-Menge in γ x_o	Zahl der Bestimmungen	Mittel der wiedergefundenen MS in γ $\bar{x}$	Streuung s
5	5	4,97 (5,08/4,85)	±0,100
10	9	10,23 (11,2/9,1)	±0,682
15	6	15,15 (15,96/14,55)	±0,525
20	7	19,60 (20,3/18,9)	±0,571
30	10	30,67 (31,7/29,62)	±0,820
40	4	36,90 (38,7/35,4)	±1,795

Tabelle 2

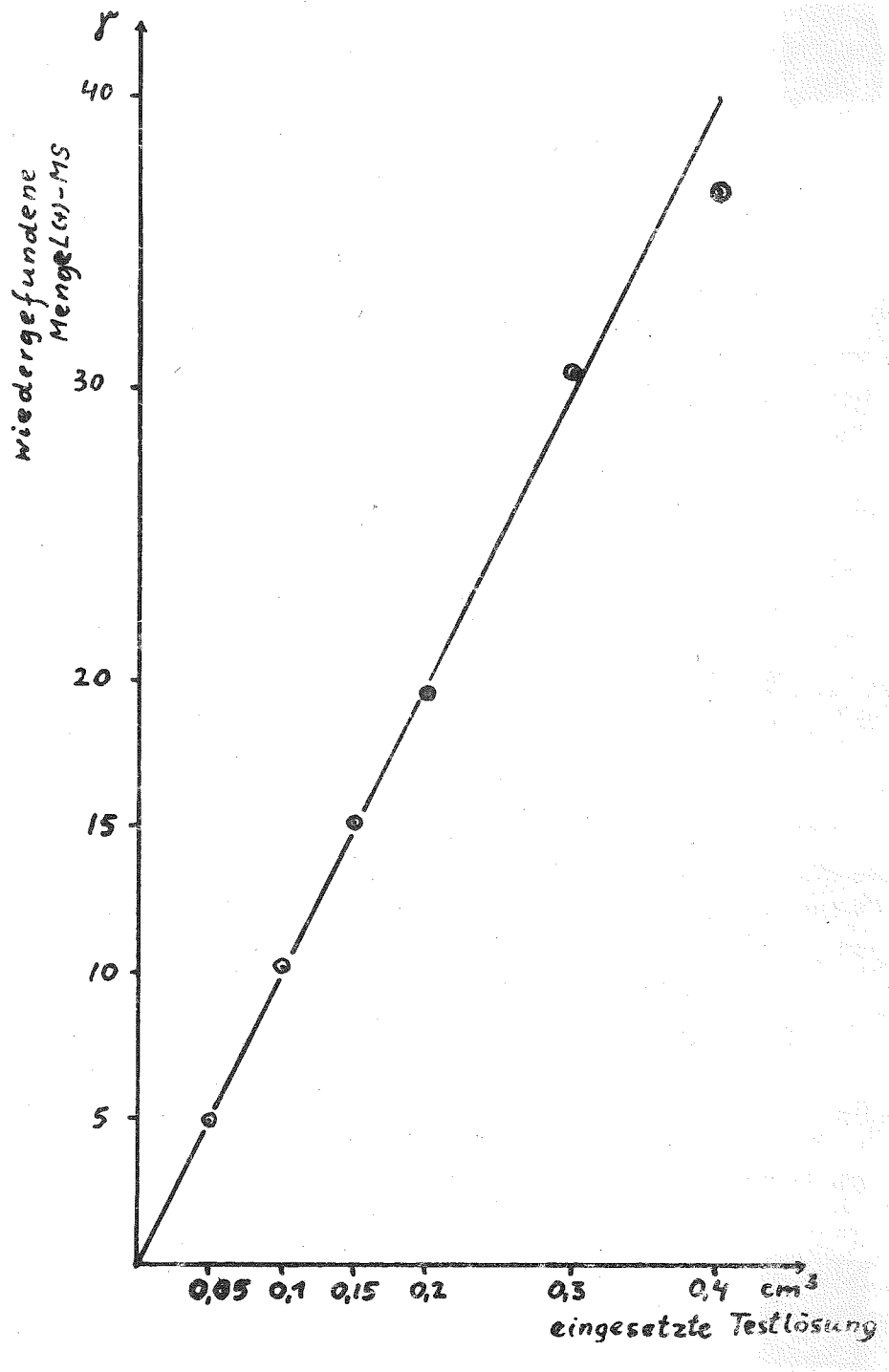


Abb. 2. Eichkurve für die L(+)-MS-Bestimmung an einer Testlösung (100 γ L(+)-MS/cm³)

2.2. Ableitung der Formel zur Berechnung des Redoxpotentials und Durchführung der Berechnung an einem Beispiel

Für eine quantitative Beschreibung der Oxydations-Reduktions-Vorgänge ist es nötig, ein Maß für die Tendenz zum Elektronentransport zu finden. Wie oben angedeutet, ist der Elektronenverschiebungsvorgang als Wirkung eines elektrischen Potentials zu verstehen. Zur Ableitung einer Gleichung, mit deren Hilfe solche Potentiale auch in vivo berechnet werden können, ist es angebracht, zunächst von einfachen, experimentell reproduzierbaren Verhältnissen auszugehen.

Schaltet man zwei in ihren Konzentrationen verschiedene, sonst aber bekannte Gemische eines Systems Ox/Red unter Abschluß von Sauerstoff und Wasserstoff (die als Elektroden funktionieren könnten) gegeneinander, so hat man völlige Reversibilität in diesem Modell erreicht. Ließe man den Redoxvorgang ablaufen, so wäre die gesamte freie Energie dieses Systems als elektrische Arbeit gewinnbar - in homogener Lösung würde sie gänzlich in Wärme umgewandelt. Daraus folgt, daß die so gewinnbare elektrische Energie in eindeutiger Abhängigkeit vom Konzentrations- beziehungsweise (bei nicht hochverdünnten Lösungen) Aktivitätsverhältnis [Ox]/[Red] steht. In Bezug auf die Zelle kann der Zustand hochverdünnter Lösungen angenommen werden, weshalb stets die Konzentrationsverhältnisse eingesetzt werden können.

Bei der quantitativen Erfassung dieser Zusammenhänge dient eine definierte Wasserstoffelektrode als Bezugssystem, die Wasserstoffnormalelektrode: eine platinierte Platinelektrode, die unter einem Wasserstoffdruck von 1 Atmosphäre steht und in eine wäßrige Säure der H^+-Aktivität 1 (also $p_H = 0$) eintaucht. Die Beziehungen von Redoxsystemen untereinander lassen sich aus dem Vergleich ihrer jeweiligen Potentiale gegenüber der Wasserstoffnormalelektrode ablesen.

Die Ableitung einer allgemeinen Gleichung für Redoxpotentiale soll nun dargestellt werden. Gehen n Grammäquivalente

der oxydierten Stufe Ox eines Systems in die reduzierte Stufe Red über (Reduktionsvorgang), so ist die dem Elektronentransport entsprechende elektrische Energieverschiebung dem thermodynamischen Energiepotential gleichzusetzen:

$$n \cdot E_h \cdot F = -\Delta G$$

Dabei ist n die Zahl der bei dem Redoxvorgang übertragenen Elektronen, F die Elektrizitätsmenge eines Grammäquivalents und E_h das elektrische Potential. ΔG, das thermodynamische Energiepotential, ist eine konzentrationsabhängige Größe, denn jede Reaktion geht mit einer Änderung der Konzentrationen der beteiligten Stoffe einher. In der allgemeinen Reaktion

$$A + B \longrightarrow C + D$$

seien a_1, b_1, c_1, d_1 die Anfangskonzentrationen und a_2, b_2, c_2, d_2 die Endkonzentrationen. Der Übergang von der Anfangsstufe 1 in die Endstufe 2 ist für jeden Stoff mit einer Konzentrationsarbeit verknüpft:

$$-R \cdot T \cdot \ln \frac{a_1}{a_2} \qquad -R \cdot T \cdot \ln \frac{b_1}{b_2}$$

$$+R \cdot T \cdot \ln \frac{c_1}{c_2} \qquad +R \cdot T \cdot \ln \frac{d_1}{d_2}$$

Deren Summe stellt das thermodynamische Potential ΔG der Reaktion dar:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \left(\ln \frac{a_1}{a_2} + \ln \frac{b_1}{b_2} - \ln \frac{c_1}{c_2} - \ln \frac{d_1}{d_2}\right)$$

$$= -R \cdot T \cdot \ln \frac{a_1 \cdot b_1 \cdot c_2 \cdot d_2}{a_2 \cdot b_2 \cdot c_1 \cdot d_1}$$

Handelt es sich bei dem Endzustand 2 um das Reaktionsgleichgewicht, dann hat der Quotient der Endkonzentrationen den

Wert der Gleichgewichtskonstanten:

$$\frac{c_2 \cdot d_2}{a_2 \cdot b_2} = K$$

Durch Einsetzen ergibt sich:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K \cdot \frac{a_1 \cdot b_1}{c_1 \cdot d_1}$$

Falls nun $\frac{c_1 \cdot d_1}{a_1 \cdot b_1} = X$ gesetzt wird, erhält man:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln \frac{K}{X}$$

$X = K$ bedeutet statisches Gleichgewicht, ΔG wird Null. Für $X \neq K$ resultiert ein energieliefernder oder ein energieverbrauchender Vorgang, falls Ausgangs- beziehungsweise Endmaterial dem System zugeführt beziehungsweise entzogen wird.

Wird $X = 1$ konstant auf dem Stande molarer Konzentrationen gehalten, dann hat man unter Standardbedingungen ($T = 25^{\circ}$ C $= 298{,}15^{\circ}$ K und $p_H = 0$) in dem Ausdruck

$$\Delta G_o = -R \cdot T \cdot \ln K$$

das thermodynamische Normalpotential oder die Grundreaktionsarbeit. Beim Abweichen von $X = 1$ (aber $X \neq K$) liefert die Gleichung

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K + R \cdot T \cdot \ln X = \Delta G_o + R \cdot T \cdot \ln X$$

als Summe von Normalpotential und Restreaktionsarbeit das thermodynamische Gesamtenergiepotential ΔG. Diese freie Energie ist also bestimmbar über ΔG_o aus K und dem aktuellen Konzentrationsverhältnis X. K und damit ΔG_o, die von der Temperatur und der Ionenstärke abhängig sind, lassen sich nach bestimmten thermodynamischen Gleichungen auch für alle anderen Bedingungen (als $T = 25^{\circ}$ C und $p_H = 0$) gewinnen.

Die Gleichung für das elektrische Energiepotential erhält jetzt die Gestalt

$$n \cdot E_h \cdot F = -\Delta G_o - R \cdot T \cdot \ln X$$

In dem oben angegebenen Modell ist das wirksame Konzentrationsverhältnis

$$X = \frac{[Red]}{[Ox]}$$

Damit ergibt sich für das auf die Wasserstoffnormalelektrode bezogene Redoxpotential des Systems folgende Gleichung:

$$E_h = \frac{-\Delta G_o}{n \cdot F} + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln \frac{[Ox]}{[Red]}$$

Beim Konzentrationsverhältnis $\frac{[Ox]}{[Red]} = 1$ hat das zweite Glied der Gleichung den Wert Null, und das Potential stellt nun wiederum das auf die Wasserstoffnormalelektrode bezogene, für das reversible Redoxsystem charakteristische Normalredoxpotential unter Standardbedingungen dar:

$$E_o = \frac{-\Delta G_o}{n \cdot F}$$

Die Redoxsysteme haben ein umso positiveres Normalredoxpotential, je mehr sie in der Lage sind, oxydierend zu wirken. Umgekehrt verhält sich ein Redoxsystem nur dann als Oxydationsmittel einem anderen Redoxsystem gegenüber, wenn ihm ein positiveres Normalpotential eignet als diesem. Das Normalredoxpotential ist also ein relatives Maß für die Tendenz eines Redoxsystems, oxydierend Elektronen zu entziehen.

Innerhalb einer Oxydationskette, wie sie sowohl die Atmungskette als auch die glykolytische Reihe darstellen, ist jedes reversible Redoxsystem seinem Normalredoxpotential gemäß angeordnet. Die Stellung der Redoxsysteme der Fermentwirkungsgruppen und der Substrate in der Normalredoxpotential-

skala, die vom Wasserstoff bis zum Sauerstoff eine Spannung von 1,23 Volt umfaßt, entscheidet also darüber, welche Redoxschritte im einzelnen möglich sind.

Die Bedeutung der Fermentproteine (Apofermente) bekommt insofern auch von dieser Seite des Geschehens einen besonderen Aspekt, als die Kombination eines Wirkungsgruppensystems mit einem Fermenteiweiß befähigt ist, das Potential des freien Redoxsystems zu beeinflussen. Die Katalysatorfunktion in der Oxydationskette kann ein System auch nur dann erfüllen, wenn es von einem anderen System mit höherem Normalpotential (am Ende der Atmungskette also vom Sauerstoff) reoxydiert werden kann. So gründet die vollständige Katalysatorfunktion in einer Oszillation des Systems zwischen dem oxydierten und dem reduzierten Zustand an thermodynamisch möglichen Stellen der Oxydationskette.

Da innerhalb des Gesamtgeschehens des Stoff- und Energiewechsels der Zelle neben gewissen konstanten Bedingungen (zum Beispiel Temperatur, Wasserstoffionenkonzentration) auch dauernd wechselnde Bedingungen, besonders durch Stoffzufuhr, Stoffabgabe, Funktionszustände und Leistungen verursacht, herrschen, ist das Normalverhältnis des Quotienten $\frac{[Ox]}{[Red]} = 1$ der Redoxsysteme eigentlich nie erfüllt. Es kommt also darauf an, das jeweils aktuelle Redoxverhältnis zu berücksichtigen, wenn man das Eintreten einer bestimmten Reaktion absehen will. Die Zelle ist als eine Mannigfaltigkeit von Redoxsystemen zu betrachten. Aufgrund der charakteristischen E_o-Werte der einzelnen Systeme legt stets das eine System das andere hinsichtlich des Quotienten [Ox]/[Red] fest. Das heißt: in dieser Mannigfaltigkeit von reversiblen Redoxsystemen liegt stets n u r e i n G e s a m t r e d o x - p o t e n t i a l E_h v o r, und zu diesem E_h-Wert ist der Grad der Oxydation beziehungsweise Reduktion, also das Verhältnis [Ox]/[Red], der einzelnen Systeme durch die Relevanz ihrer E_o-Werte definiert. Mit anderen Worten: das Redoxverhältnis der einzelnen reversiblen Redoxsysteme wird bestimmt vom Abstand ihrer E_o-Werte von dem einen Zellredoxpotential E_h, das nach der Gleichung

$$E_h = E_o + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln \frac{[Ox]}{[Red]}$$

aus E_o und dem aktuellen Konzentrationsverhältnis [Ox]/[Red] eines jeden einzelnen Redoxsystems berechnet werden kann.

Das Redoxpotential ist auch von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig. Unter sonst konstanten Bedingungen steigt das Redoxpotential mit der Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration. - Ebenso beeinflußt auch die Temperatur das Redoxpotential.

Da keine diesbezüglichen exakten Bestimmungen für die Zelle vorliegen, haben wir das Zellredoxpotential für sogenannte physiologische Standardbedingungen berechnet (28) und erhalten auf diese Weise vergleichbare Werte.

An einem Beispiel soll nun die Berechnung des Zellredoxpotentials ausgeführt werden. Wir legen den Fall Nr. 1 aus der Tabelle 3 zugrunde (siehe unten).

Die Berechnungsformel lautet:

$$E'_h = E'_o + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln \frac{[Ox]}{[Red]}$$

E'_o ist das Normalpotential unter physiologischen Standardbedingungen: $T = 25^o\ C = 298{,}15^o\ K$ und $p_H = 7$. E'_h ist das entsprechende Gesamtpotential. Das BTS-MS-System hat das Normalpotential $E'_o = -0{,}190$ Volt (28). Die Werte der anderen Größen sind: $R = 8{,}3128$ Joule/^{o}K (9), $F = 96490$ Amp.sec (9), $n = 2$. Unter Umrechnung auf BRIGGSsche Logarithmen ergibt sich:

$$E'_h = -0{,}190 + \frac{8{,}3128 \cdot 298{,}15}{2 \cdot 96490} \cdot 2{,}3026 \cdot \log \frac{[BTS]}{[MS]} \text{Volt}$$

$$E'_h = -0{,}190 + 0{,}02956 \cdot \log \frac{[BTS]}{[MS]} \text{Volt}$$

Das Konzentrationsverhältnis beträgt beim Fall Nr. 1:

$$[BTS]/[MS] = 0{,}0771$$

Demnach errechnet sich für das Potential folgender Wert:

$E_h' = -0,190 + 0,02956 \cdot \log 0,0771$

$\log 0,0771 = 0,8871 - 2 = -1,1129$

$E_h' = -0,190 - 0,02956 \cdot 1,1129 = -0,190 - 0,0329$

$\underline{\underline{E_h' = -0,2229 \text{ Volt}}}$

Geht man vom DPN_{ox}-DPN_{red}-System aus, so kommt man zu demselben Ergebnis. Für dieses System ist $E_o' = -0,320$ Volt. Das Verhältnis $[DPN_{ox}]/[DPN_{red}]$ berechnet sich aufgrund der Gleichgewichtskonstanten (RACKER (27))

$$K = \frac{[BTS] \cdot [DPN_{red}] \cdot [H^+]}{[MS] \cdot [DPN_{ox}]} = 4 \cdot 10^{-12}$$

zu folgendem Wert:

$$\frac{[DPN_{ox}]}{[DPN_{red}]} = \frac{[BTS] \cdot [H^+]}{K \cdot [MS]} = 0,25 \cdot 0,0771 \cdot 10^{-7} \cdot 10^{12} = 1927,5$$

Demnach beträgt das Zellredoxpotential:

$E_h' = -0,320 + 0,02956 \cdot \log 1927,5$

$\log 1927,5 = 3,285$

$E_h' = -0,320 + 0,02957 \cdot 3,285 = -0,320 + 0,0971$

$\underline{\underline{E_h' = -0,2229 \text{ Volt}}}$

2.3. Das α-Liponsäure-Präparat und die Durchführung seiner Applikation

Das α-Liponsäure-Präparat wurde uns von der LEDERLE G.m.b.H., München, zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um Ampullen mit 1 cm^3 Inhalt, entsprechend 11 mg "SODIUM DL-6-DIHYDRO-THIOCTATE". Durch einen Spot-Test nach FEIGL (10) konnten wir die Gruppe ≡C-SH in dem Präparat nachweisen. Bei der Aufnahme des Spektrums des Präparats (siehe Abb. 3) zeigte sich jedoch ein mehr dem Spektrum der α-Liponsäure (Disulfid) ähnliches Bild mit einem Plateau im Wellenlängenbereich von 330 bis 350 mμ (19). Wir nehmen deshalb an, daß es sich bei dem Präparat um eine Mischung aus der oxydierten und der reduzierten Form der α-Liponsäure handelt.

Bei der Applikation des Präparats gingen wir folgendermaßen vor. Zunächst wurde die Blutentnahme in Ruhe und Nüchternheit vorgenommen. Dann wurde das Präparat intravenös langsam injiziert. Und zwar erhielten die Patienten mit der Nr. ≤ 20 1 Ampulle, die der Nr. ≥ 21 2 Ampullen. Blutentnahmen folgten dann 15, 30, 60 und 90 min nach der α-Liponsäure-Injektion. Beim Patienten mit der Nr. 12 wurde auch eine Blutprobe 5 min nach der Injektion abgenommen.

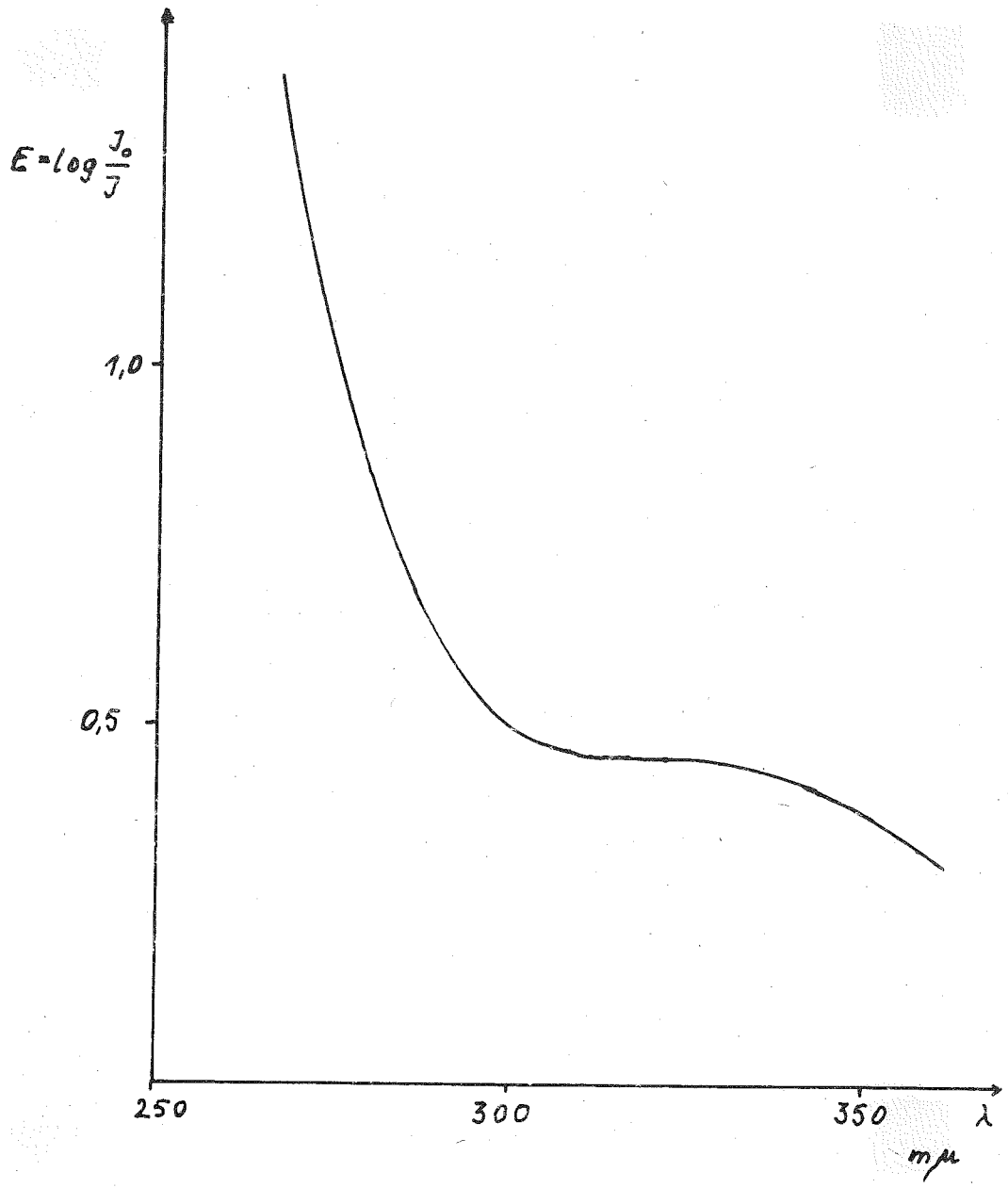


Abb. 3. Spektrum des α-Liponsäurepräparats

3. Ergebnisse

3.1. BTS- und MS-Konzentrationen bei Gesunden und Kranken, die Quotienten [MS]/[BTS] und [BTS]/[MS] und die daraus berechneten Redoxpotentiale

In der Tabelle 3 sind Bedingungen und Ergebnisse unserer Untersuchungen zusammengestellt. In der dritten Rubrik bedeuten R Ruhe und N Nüchternheit. Die Konzentrationsangaben für BTS, MS und die Summe beider haben die Dimension µMol/l, die Redoxspannung E_h' ist in mVolt angegeben.

Ergänzend zu den Angaben in der Tabelle ist noch Folgendes zu sagen. Beim Fall Nr. 1 handelt es sich um eine gesunde männliche Versuchsperson. Sie kam morgens um 7.00 Uhr nüchtern in die Klinik und lag bis 9.30 Uhr in völliger Ruhe auf einem Bett. Dann wurde der Versuch durchgeführt. - Der Patient mit der Nr. 2 hatte 4 Tage vorher einen Suizidversuch mit 30 Schlaftabletten gemacht. Er war sonst gesund. Wir glauben, daß von der Vergiftung keine pathologischen Verhältnisse mehr vorlagen. Zu anderen Versuchszwecken bekam der Patient dann eine Glukose-Infusion. Nr. 2a und Nr. 2b geben die Messungen 5 min und 1 h nach Beginn der Infusion wieder. - Beim Fall Nr. 3 war ebenfalls seit 15 min eine Glucose-Infusion zu anderen Versuchszwecken in Gang. - Beim Fall Nr. 4 handelt es sich um eine gesunde weibliche Versuchsperson unter den angegebenen Bedingungen. - Der Patient mit der Nr. 15 hatte 3 Tage vorher einen Suizidversuch mit E 606 gemacht. Zur Zeit des Versuchs war er noch stark benommen. - Beim Fall Nr. 18 lief für andere Versuchszwecke seit 10 min eine Glucose-Infusion, beim Fall Nr. 19 seit 1,5 h. - Der Fall Nr. 25 war eine etwa 60jährige Patientin, die schon seit 2 Tagen aufgrund eines Suizidversuchs mit einem Schlafmittel besinnungslos war und deren Lebensfunktionen sich in einem sehr schlechten Zustand befanden.

Tabelle 3

Nr.	Alter Jahre	Diagnose	Bedingungen	BTS	MS	Summe MS+BTS	Quotient MS/BTS	Quotient BTS/MS	E'_h
1	23	normal	R, N	39,5	512,5	552,0	12,97	0,0771	-222,9
2	19	normal	R, N (4 Tg. vorher Schlafmittelvergiftung	76,6	755,0	831,6	9,85	0,1016	-219,3
2a	(derselbe Pat.)		5 min nach Beginn einer Glucose-Infusion (10 %)	65,8	810,0	875,8	12,32	0,0811	-222,3
2b	(derselbe Pat.)		1 h nach Beginn der Glucose-Infusion	63,5	1215,0	1278,5	19,14	0,0523	-227,9
3	59	Chron. myel. Leukämie	R, 15 min nach Beginn einer Glucose-Infusion	40,2	1067,0	1107,2	26,54	0,0377	-232,1
4	24	normal	Versuchsperson nach Mittagessen und längerem Gehen	119,8	2030,0	2149,8	16,94	0,0590	-226,3
5	17	Subakute Polyarthritis	R, N; 4 Monate mit Butazolidin-Präparaten therapiert	76,7	996,0	1072,7	12,98	0,0770	-223,0
5a	(derselbe Pat.)		R, N; 2 Monate vorher, Krankheitsbild schwerer	96,6	1742,0	1838,6	18,03	0,0555	-227,1
6	19	Polyarthritis	R, N; akutes Krankheitsbild	79,5	1602,0	1681,5	20,16	0,0496	-228,6

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Nr.	Alter Jahre	Diagnose	Bedingungen	BTS	MS	Summe MS+BTS	Quotient MS/BTS	Quotient BTS/MS	E'_h
7	35	Polyarthritis	R, N; Krankheitsbild abgeklungen	71,2	996,0	1067,2	13,99	0,0715	-223,9
8	33	Morb. Werlhof	R, N	61,7	902,0	963,7	14,61	0,0685	-224,4
9	55	Mult. Sklerose	R, N	52,5	816,0	868,5	15,55	0,0644	-225,2
10	49	Hyperthyreose	R, N	79,9	1021,0	1100,9	12,78	0,0783	-222,7
11	69	Leberzirrhose	R, N	69,7	950,0	1019,7	13,63	0,0734	-223,6
11a	(derselbe Pat.)		R, N; 2 Tage später	76,4	1111,0	1187,4	14,54	0,0687	-224,4
12	44	Hämochromatose (schwer)	R, N	64,6	965,5	1030,1	14,95	0,0670	-224,7
13	66	Bronchialkarzinom	R, N	62,0	620,0	682,0	10,00	0,1000	-219,6
14	65	Bronchialkarzinom	R, N	55,4	900,0	955,4	16,25	0,0615	-225,8
15	68	Vergiftung mit E 606	R, N; Suizidversuch vor 3 Tagen	86,5	1198,0	1284,5	13,85	0,0722	-223,8
16	30	posthepatitisches Syndrom	R, N	81,2	1080,0	1161,2	13,30	0,0752	-223,2
17	66	Hepatitis	R, N	61,6	1255,0	1316,6	20,39	0,0491	-228,6
18	57	Diabetes mellitus, Magengeschwür	R, 10 min nach Beginn einer Glucose-Infusion (10 %)	62,0	1445,0	1507,0	23,31	0,0429	-230,4

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Nr.	Alter Jahre	Diagnose	Bedingungen	BTS	MS	Summe MS+BTS	Quotient MS/BTS	Quotient BTS/MS	E'_h
19	52	Diabetes mellitus	R, 90 min nach Beginn einer Glucose-Infusion	32,1	1145,0	1177,1	35,67	0,0280	-236,0
20	61	Cor pulmonale, Emphysem-bronchitis	R, N; Atemnot	117,3	1558,0	1675,3	13,28	0,0754	-223,2
21	21	Asthma bron.	R, N	46,0	824,0	870,0	17,91	0,0557	-227,0
22	45	Asthma bron.	R, N	106,5	1600,0	1706,5	15,02	0,0655	-225,0
23	60	Cor pulmonale, chron. Lungen-emphysem	R, N	78,5	1590,0	1668,5	20,25	0,0494	-228,6
24	45	Pleuraschwarte Thoraxprel-lung	R, N	54,4	1145,0	1199,4	21,05	0,0475	-229,1
25	60 (?)	Schlafmittel-vergiftung	24 h im Kollaps, künstliche Beatmung, Infusion (Glucose 5 %, Tutofusin), Noradre-nalin i.m.	121,0	4330,0	4341,0	34,88	0,0287	-235,6

3.2. BTS- und MS-Konzentrationen, die Quotienten [MS]/[BTS] und [BTS]/[MS] und die daraus berechneten Redoxpotentiale unter dem Einfluß von α-Liponsäure

In der Tabelle 4 sind die Ergebnisse aufgeführt, die nach α-Liponsäure-Injektion gemessen und berechnet wurden. Die laufende Nr. verweist auf die gleiche Nr. in der Tabelle 3, aus der Diagnose und Bedingungen der Fälle entnommen werden können, bei denen die α-Liponsäure-Belastung vorgenommen wurde. Die Dimensionen der Angaben stimmen mit denen der Tabelle 3 überein.

Tabelle 4

Nr.	Min. post Inj.	BTS	MS	Summe BTS+MS	Quotient MS/BTS	Quotient BTS/MS	E'_h
1	0	39,5	512,5	552,0	12,97	0,0771	-222,9
	15	33,8	517,0	550,8	15,30	0,0654	-225,0
	30	31,9	729,0	760,9	22,85	0,0438	-230,0
	60	29,7	589,0	618,7	19,83	0,0504	-228,3
	90	29,5	461,0	490,5	15,63	0,0640	-225,3
5	0	76,7	996,0	1072,7	12,98	0,0770	-222,9
	15	65,0	535,0	600,0	8,23	0,1215	-217,1
	30	60,6	527,0	587,6	8,70	0,1150	-217,8
	60	54,4	574,0	628,4	10,55	0,0948	-220,2
	90	48,5	580,0	628,5	11,96	0,0836	-221,7
7	0	71,2	996,0	1067,2	13,99	0,0715	-223,8
	15	44,0	669,0	713,0	15,20	0,0673	-224,6
	30	35,1	463,0	498,1	13,19	0,0762	-223,0
	60	34,3	506,0	540,3	14,75	0,0678	-224,5
	90	34,2	539,0	573,2	15,76	0,0635	-225,4

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Nr.	Min. post Inj.	BTS	MS	Summe BTS+MS	Quotient MS/BTS	Quotient BTS/MS	E'_h
10	0	79,9	1021,0	1100,9	12,78	0,0783	-222,7
	15	84,2	1055,0	1139,2	12,53	0,0798	-222,4
	30	75,5	1147,0	1222,5	15,19	0,0658	-225,0
	60	58,0	1100,0	1158,0	18,97	0,0527	-227,8
	90	55,1	1152,0	1207,1	20,91	0,0478	-229,0
11a	0	76,4	1111,0	1187,4	14,54	0,0687	-224,4
	15	68,2	1282,0	1350,2	18,80	0,0532	-227,6
	30	62,2	1379,0	1441,2	22,17	0,0451	-229,7
	60	57,5	1297,0	1354,5	22,56	0,0443	-230,0
	90	66,0	1068,0	1134,0	16,18	0,0618	-225,7
12	0	64,6	965,5	1030,1	14,95	0,0669	-224,7
	5	55,4	930,0	985,4	16,79	0,0595	-226,2
	15	46,5	865,0	911,5	18,60	0,0538	-227,4
	30	40,0	850,0	890,0	21,25	0,0471	-229,2
	60	30,7	721,0	751,7	23,49	0,0426	-230,5
	90	20,5	725,5	746,0	35,39	0,0283	-235,7
13	0	62,0	620,0	682,0	10,00	0,1000	-219,6
	15	53,0	501,0	554,0	9,45	0,1058	-218,8
	30	48,5	286,0	334,5	5,90	0,1696	-212,8
	60	42,1	454,0	496,1	10,78	0,0927	-220,6
	90	37,2	501,0	538,2	13,47	0,0743	-223,4
14	0	55,4	900,0	954,4	16,25	0,0616	-225,8
	15	49,5	622,0	671,5	12,57	0,0796	-222,5
	30	46,5	602,0	648,5	12,95	0,0772	-222,9
	60	50,4	639,0	689,4	12,68	0,0789	-222,6
	90	50,0	655,0	705,0	13,10	0,0763	-223,0
15	0	86,5	1198,0	1284,5	13,85	0,0722	-223,7
	15	70,9	1147,0	1217,9	16,18	0,0619	-225,7
	30	58,0	839,5	897,0	14,47	0,0691	-224,3
	60	42,8	668,0	710,5	15,61	0,0641	-225,2
	90	52,1	693,5	745,6	13,31	0,0751	-223,2

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Nr.	Min. post Inj.	BTS	MS	Summe BTS+MS	Quotient MS/BTS	Quotient BTS/MS	E'_h
16	0	81,2	1080,0	1161,2	13,30	0,0752	-223,2
	15	70,0	917,0	987,0	13,10	0,0763	-223,0
	30	68,7	861,0	929,7	12,53	0,0798	-222,4
	60	70,9	860,0	930,9	12,13	0,0824	-222,0
	90	71,9	880,0	951,9	12,24	0,0817	-222,2
21	0	46,0	824,0	870,0	17,91	0,0558	-227,0
	15	61,5	607,0	668,5	9,87	0,1013	-219,4
	30	57,5	624,0	681,5	10,85	0,0922	-220,6
	60	60,0	812,0	872,0	13,53	0,0739	-223,4
	90	59,8	675,0	734,8	11,29	0,0886	-221,1
24	0	54,4	1145,0	1199,4	21,05	0,0475	-229,1
	15	44,4	564,0	608,4	12,70	0,0787	-222,6
	30	42,5	556,0	598,5	13,08	0,0764	-223,0
	60	37,8	480,5	518,3	12,71	0,0787	-222,6
	90	36,4	1000,0	1036,4	27,47	0,0364	-232,5

4. Diskussion

Bei der Betrachtung unserer Untersuchungsergebnisse erscheint uns die Stabilität des Zellredoxpotentials bemerkenswert. Obwohl die Konzentrationsverhältnisse in den betrachteten Redoxsystemen, die den Ausgangspunkt für die Berechnung des Zellredoxpotentials abgeben, aufgrund der verschiedenen Bedingungen und unter dem Einfluß der α-Liponsäure erheblichen Schwankungen unterworfen sind, weichen alle berechneten Potentiale E_h' nur sehr geringfügig voneinander ab. Beachtet muß werden, daß es sich bei dem berechneten Redoxpotential um eine statistische Größe über den gesamten Organismus handelt - in gewisser Weise dem Grundumsatz ähnlich. Im Vergleich dazu scheint uns aber das Zellredoxpotential eine tieferdringende Aussagekraft für die Stoffwechsellage zu besitzen als der Grundumsatzwert, da das Potential E_h', aus in-vivo-Messungen gewonnen, ein direkter Parameter der Energetik des Stoffwechsels ist. Man ist nach den erzielten Ergebnissen geneigt, im Zellredoxpotential so etwas wie eine "statistische Naturkonstante" des Organismus zu sehen. Ändert sich die Stoffwechsellage in einem solchen Maße, daß der Wert dieser "Naturkonstanten" über einen gewissen Toleranzbereich hinaus verlassen wird, so ist das mit dem Leben nicht mehr zu vereinbaren. Einen Hinweis in diese Richtung zeigt der Fall Nr. 25.

Auch der Einfluß der α-Liponsäure, der in den Konzentrationsverhältnissen des BTS-MS-Systems und des DPN_{ox}-DPN_{red}-Systems beträchtliche Änderungen bewirkt, ist im Zellredoxpotential nur geringfügig zu spüren. Die Wirkung der α-Liponsäure auf den Brenztraubensäurespiegel im Blut fügt sich völlig in die aus der Literatur bisher bekannten Befunde ein.

An dieser Stelle sei auf eine kürzlich erschienene Arbeit von HOLZER, SCHULTZ und LYNEN (18) hingewiesen, die experimentell zeigen konnten, daß Redoxsysteme, die mit Hilfe

des DPN_{ox}-DPN_{red}-Systems oxydierend Elektronen übertragen, mit diesem und der Atmungskette in einem kinetischen Gleichgewicht stehen. Sie untersuchten das Acetaldehyd-Äthanol-System unter aeroben und anaeroben Bedingungen an Hefe. Aufgrund ihrer Befunde sahen sie sich berechtigt, in vivo gewonnene quantitative Aussagen über den Quotienten DPN_{ox}/DPN_{red} (soweit dieses System reaktionsfähig ist) und damit über den Funktionszustand der Atmungskette zu machen. Sie legten ihren Schlüssen auf das DPN_{ox}-DPN_{red}-System die "wahre Gleichgewichtskonstante" $K = 1{,}15 \cdot 10^{-11}$ zugrunde. Ausgehend von einem Acetaldehyd-Äthanol-Verhältnis von 1/76, das sie unter aeroben Bedingungen gemessen hatten, schlossen sie über die Gleichung

$$K = 1{,}15 \cdot 10^{-11} = \frac{[DPNH]_f \cdot [AcA]_f \cdot [H^+]}{[DPN]_f \cdot [Alk]_f}$$

bei $p_H = 6$ auf das Verhältnis

$$DPNH_{frei}/DPN_{frei} = 1/1100$$

Wir setzten diese Werte einmal in unsere Gleichung für das Redoxpotential ein und erhielten, ausgehend vom Substratverhältnis,

$$E_h' = -259{,}6 \text{ mVolt} \qquad (E_o' = -0{,}204 \text{ Volt } (16))$$

und, ausgehend vom DPN_{ox}-DPN_{red}-Verhältnis (bei $p_H = 7$),

$$E_h' = 259{,}2 \text{ mVolt} \qquad (E_o' = -0{,}320 \text{ Volt } (16))$$

Also auch von den an Hefe erhobenen Befunden dieser Autoren her bestätigt sich die Höhe des von uns berechneten Redoxpotentials.

Rückschlüsse vom BTS-MS-Konzentrationsverhältnis im menschlichen Blut auf das DPN_{ox}-DPN_{red}-Verhältnis finden sich auch in der Arbeit von CZOK (6); Redoxpotentiale werden aller-

dings nicht berechnet. Berücksichtigt man die sehr viel größere Variabilität in den Bedingungen unserer Fälle, so kann man durchaus sagen, daß sich unsere Ergebnisse gut mit den Befunden von CZOK in Einklang bringen lassen.

Ein besonderes Ergebnis stellen die Messungen am Fall Nr. 2, 2a, 2b und an den anderen Fällen unter Glucose-Zufuhr (Nr. 3, Nr. 18, Nr. 19) dar. Die Glucose-Belastung verursacht ein Absinken der BTS-Konzentration und gleichzeitig eine Erhöhung der MS-Konzentration. Dieser Effekt ist wahrscheinlich so zu erklären, daß durch die Tätigkeit des oxydierenden Gärungsfermentes die Konzentration des DPN_{red} ansteigt; die Folge davon ist eine vermehrte BTS-Reduktion zu MS aufgrund der Gleichgewichtskonstanten zwischen dem BTS-MS-System und dem DPN_{ox}-DPN_{red}-System. Der vorliegende Befund ist eine interessante Parallele am Menschen zu den von LAMPRECHT und Mitarb. und von DICKENS und Mitarb. (siehe Literaturnachtrag) berichteten Ergebnissen über das DPN_{ox}-DPN_{red}-System unter dem Einfluß der diabetischen Stoffwechsellage in der Rattenleber.

Der Einblick in das zelluläre Redoxpotential, gewonnen aus intravital gemessenen Substratkonzentrationen im Blut, scheint uns auch für klinische Betrachtungen von außerordentlicher Bedeutung zu sein. Die gute Übereinstimmung der Höhe des von uns aus Blutkonzentrationen von BTS und MS berechneten Zellredoxpotentials mit jener, die aus Substratverhältnissen in Hefezellen berechnet wurde, bedeutet auch einen Hinweis auf die Brauchbarkeit der Methode. Es ist also nicht nötig, zelluläres Material in vivo für solche Untersuchungen gewinnen zu müssen (etwa durch Leberpunktion), sondern es reicht aus, wenn man sich die günstigen Eigenschaften unseres Systems (seine Ubiquität, die hohe Diffusionsgeschwindigkeit, die hohe Geschwindigkeitskonstante der Fermentwirkung im Bereich von 10^6 $sec^{-1} \cdot Mol^{-1}$ (HESS, persönliche Mitteilung) zunutze macht und aus dem Blut den Einblick in den zellulären Status gewinnt. Hinsichtlich der Einstellgeschwindigkeit ist bedeutungsvoll, daß die Reaktion über

die Atmungskette nicht limitiert wird, dagegen ist von der Seite anderer Substrate her eine gewisse Schwerfälligkeit der Gleichgewichtseinstellung zu erwarten (HESS, persönliche Mitteilung).

Für weitere Untersuchungen wäre es notwendig, den Charakter der Stabilität des Zellredoxpotentials und seine Variationsmöglichkeiten in den engen Grenzen und damit seine effektive Bedeutung im Stoffwechsel herauszuarbeiten. Interessante Ansatzpunkte dafür scheinen uns im Rahmen der Beobachtung halbdiabetischer Stoffwechsellagen vorzuliegen. Es wäre weiter nach dem Mechanismus (Pufferwirkung ?) zu fragen, der für die "Konstanz" des Zellredoxpotentials verantwortlich ist. Ebenso sollte versucht werden, von anderen Substratsystemen her umfassendere Berechnungen von Zellredoxpotentialen vorzunehmen. Und schließlich ist es von Interesse, ob sich die Charakterisierung des Redoxpotentials als statistischer Größe weiter aufschließen läßt, etwa durch Untersuchung bestimmter Organe in dieser Hinsicht.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden quantitative enzymatische Bestimmungen von MS und BTS im menschlichen Blut unter den verschiedensten Bedingungen vorgenommen. Der Einfluß intravenöser α-Liponsäure-Injektionen auf den BTS- und MS-Spiegel wird untersucht.

Aus den Verhältnissen [BTS]/[MS] wird erstmalig das Zellredoxpotential berechnet. Das Potential beträgt -222,5 mVolt (höchster Wert -236,0 mVolt, niedrigster Wert -219,3 mVolt). Es zeigt sich, daß das Redoxpotential über einen weiten Konzentrationsbereich des Systems konstant ist. Weder Glucose noch Liponsäure noch sonstige untersuchte Bedingungen ändern das Potential über den angegebenen Bereich hinaus. Das Potential stimmt größenordnungsmäßig mit dem von anderer Seite an Hefe gemessenen Potential überein.

Die Bedeutung des Redoxpotentials als Parameter der Energetik des zellulären Stoffwechsels (im Einzeller und im hochdifferenzierten Organismus) wird neben anderen Aspekten der Arbeit diskutiert.

6. Literaturverzeichnis

(1) BANSI, H.-W., und Mitarb.: persönliche Mitteilung.

(2) "Biochemica BOEHRINGER", Mannheim, 1957.

(3) BULLOCK, M.W., und Mitarb.: J. Am. Chem. Soc. 74, 3455 (1952).

(4) CARFAGNO, S.C., und Mitarb.: New Engl. J. of Med. 249, 303 (1953).

(5) CLARK, W. M.: Topics in Physical Chemistry, Baltimore, U.S.A., 1948.

(6) CZOK, R.: Inaugural-Dissertation, Marburg, 1957.

(7) DEWEY, V.C.: Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 46, 482 (1941).

(8) DEWEY, V.C.: Biol. Bull. 87, 107 (1944).

(9) EUCKEN-WICKE: Grundriß der physikalischen Chemie, Leipzig, 1958.

(10) FEIGL, F.: Spot Tests, Amsterdam, 1954.

(11) GUIRARD, G. M., und Mitarb.: Arch. Biochem. 9, 361 (1948).

(12) HENGLEY, K. S., und Mitarb.: J. Lab. and Clin. Med. 47, 978 (1956).

(13) HESS, B.: Klin. Wschr. 33, 91 (1955) und 33, 540 (1955).

(14) HESS, B.: Zwischenstoffwechsel in Thannhausers Lehrbuch des Stoffwechsels und der Stoffwechselkrankheiten, Hrgb. N. ZÖLLNER, Stuttgart, 1957.

(15) HESS, B.: Biochem. Z. 328, 110 (1956).

(16) HOFFMANN-OSTENHOF, O.: Enzymologie, Wien, 1954.

(17) HOHORST, H. J.: Biochem. Z. 328, 509 (1957).

(18) HOLZER, H., G. SCHULTZ und T. LYNEN: Biochem. Z. 328, 252 (1956).

(19) KIDDER, G.W.: (Chairman of the) Symposium on Metabolic Role of Lipoic Acid, Fed. Proc. 13, Nr. 3 (1954).

(20) KIDDER, G. W., and V. C. DEWEY: Arch. Biochem. 8, 293 (1944).

(21) KIDDER, G. W., and V. C. DEWEY: Arch. Biochem. 20, 75 (1949).

(22) KUBOWITZ, F., und P. OTT: Biochem. Z. 314, 94 (1943).

(23) LEDERLE Laboratories Division, Mitteilungen der American Cyanamid Company, New York, 1957.

(24) NETTER, H.: Biologische Physikochemie, Potsdam, 1951.

(25) O'KANE, D. J., und Mitarb.: J. Bact. 56, 499 (1948).

(26) PATTERSON, E. L., und Mitarb.: J. Am. Chem. Soc. 73, 5919 (1951).

(27) RACKER, E.: Physiol. Rev. 35, 1 (1955).

(28) RAUEN, H. M. (Hrgb.): Biochemisches Taschenbuch, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1956.

(29) RAUSCH, F.: Arzneim.-Forsch. 5, 32 (1955).

(30) REED, L. J., und Mitarb.: Science 114, 93 (1951).

(31) SCHREIER, K.: Die Brenztraubensäure und ihr Stoffwechsel (Habilitationsschrift Heidelberg), 1956.

(32) SNELL, E. E., and H. P. BROQUIST: Arch. Biochem. 23, 326 (1949).

(33) STOKSTAD, E. L. R., und Mitarb.: Arch. Biochem. 20, 75 (1949).

(34) SUMMERSKILL, W. H. J., und Mitarb.: Am. J. Med. 22, 59 (1957).

(35) WARBURG, O.: Wasserstoffübertragende Fermente, Berlin, 1948.

(36) WEBER, E.: Grundriß der biologischen Statistik, Jena, 1957.

Nachtrag:

DICKENS, F., und Mitarb.: Symposium on Regulation of Cell Metabolism, The CIBA Foundation, 1958.

HOLZER, H., und Mitarb.: am gleichen Ort.

Dem Direktor der Medizinischen Universitätsklinik (Ludolf Krehl-Klinik), Herrn Professor Dr. med. Karl M A T T H E S, danke ich für die Möglichkeit, den experimentellen Teil dieser Arbeit in seiner Klinik durchführen zu dürfen, und Herrn Privatdozent Dr. med. Benno H E S S für die Überlassung des Themas und mannigfache Unterstützung und Beratung bei der Ausarbeitung.

L e b e n s l a u f

Am 31. März 1931 wurde ich in Łódź (Polen) als Sohn des Albert Gottschling und seiner Ehefrau Amanda Gottschling geb. Frank geboren. Dort besuchte ich auch von 1938 bis 1942 die Grundschule und anschließend bis zum Winter 1944 die Oberschule in Pabianice bei Łódź. Dann wurde meine Schulausbildung durch die Kriegsereignisse für anderthalb Jahre unterbrochen. Nach der Flucht aus einem Łódźer Konzentrationslager zu Ostern 1946 ging ich in Stadthagen (Niedersachsen) weiter zur Oberschule, wo ich im Februar 1951 die Reifeprüfung ablegte. Vom Sommersemester 1951 an studierte ich an der Universität Göttingen zunächst zwei Semester Physik und Mathematik und anschließend Medizin. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich an der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen nach dem Wintersemester 1953/54. Nach drei weiteren Semestern klinischer Medizin in Göttingen setzte ich seit dem Wintersemester 1955/56 mein Medizinstudium an der Universität Heidelberg fort und legte nach dem Sommersemester 1957 hier das medizinische Staatsexamen ab (beendet am 27. Februar 1958). Seit dem Wintersemester 1957/58 studiere ich an der Universität Heidelberg Philosophie. Im September 1958 will ich in die U.S.A. fahren, um dort zwei bis drei Jahre lang auf dem Gebiet der Biologie wissenschaftlich zu arbeiten.

Heidelberg, im August 1958