

DIE UNLÖSLICHEN SUBSTANZEN DES GROSSHIRNS BEI SUKZESSIONER EXTRAKTION*

YASUSHI HAYASHI

Institut der Protein-Chemie, Medizinische Yamaguchi Fakultät, Ube

(Eingegangen am 10. Juni 1953)

Vor kurzem berichteten Palladin et al. (1) über die Extraktion des Hirns mit verschiedenen Lösungsmitteln. Es handelte sich hierbei um die Extrahierbarkeit des Hirns, genau gesagt, um seine unlöslichen Substanzen, mit denen auch wir uns bei der Untersuchung der sukzessiven Extraktion der Gewebs-eiweisse mit physiologischer NaCl-Lösung beschäftigt haben (2). Das Verhältnis der Konzentration der zu extrahierenden Substanz auf einer Stufe der sukzessiven Extraktion zu der in der folgenden Extraktionsstufe, kurz als "Extraktionsrate" bezeichnet, lässt sich nach der folgenden Formel berechnen, insofern weder eine Verteilung zwischen Lösung und Niederschlag noch eine Adsorption am Niederschlag der zu extrahierenden Eiweisse stattfindet:

$$K'_n = 1/(1 + \rho_n), \dots \dots \dots (1)$$

wobei ρ_n die Dichtigkeit des Niederschlages bedeutet. Das Ergebnis der Extraktion von Leber und Niere stimmt befriedigend mit der Theorie überein. Wenn die Formel auf die Extraktion des Hirns angewandt wird, so lässt sich die Extraktionsrate zu 0.495 berechnen, weil die durchschnittliche Dichtigkeit des Niederschlages 1.02 ist. Dagegen ist, wie Tabelle 1 zeigt, die experimentell gefundene (d. h. die aus den Stickstoffkonzentrationen berechnete) Extraktionsrate im Mittel 0.42, also zweifellos kleiner als die aus der Dichtigkeit berechnete.

TABELLE I
Extraktionsrate des Stickstoffs des Hirns und der Lunge

Grosshirn	Nr. der Sukzession			
	1	2	3	4
C _n , mg N/ml.	4.4	1.95	0.62	0.26
K' _n	0.44	0.32	0.42	
P' _n	1.32	0.90	0.04	1.04
Lunge				
C _n , mg N/ml.	5.1	2.5	1.4	0.6
K' _n	0.49	0.54	0.45	
P' _n	0.94	0.98	1.0	1.08

*) Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit wurde zum Teil am 5. Mai 1952 auf der 24. Tagung der Japanischen Biochemischen Gesellschaft in Kobe vorgetragen.

Um diesen Widerspruch zu beheben, ist die vorliegende Untersuchung durchgeführt worden.

Die Theorie der sukzessiven Extraktion von Nakamura et al. (2) beruht auf der Annahme, dass der Niederschlag nur die Substanzen enthält, in die die Gewebseiweisse verteilt werden, oder dass man das Volumen der unlöslichen Substanzen im Niederschlag unberücksichtigt lassen kann. In Wirklichkeit gibt es jedoch im Gewebsbrei indifferente unlösliche Substanzen, die mit der Verteilung oder dem Auflösen der Gewebseiweisse nichts zu tun haben. Wenn das Volumen dieser unlöslichen Substanzen berücksichtigt wird, so ist das wirksame Volumen im Niederschlag, das am Auflösen der Eiweisse beteiligt ist, um das der unlöslichen Substanzen kleiner als das Volumen des Niederschlags im ganzen. Dies entspricht einem Zustande, wo der Niederschlag sich in solch einem wirksamen Volumen konzentriert fände. Wenn das Gewicht und die Dichtigkeit des n-ten Niederschlags je p_n bzw. ρ_n sind und die der unlöslichen Substanzen je S bzw. ρ_s , so wird das Volumen des Niederschlags und der unlöslichen Substanzen p_n/ρ_n bzw. S/ρ_s . Folglich wird die scheinbare Dichtigkeit ρ'_n , die die Extraktionsrate K'_n beeinflusst:

$$\rho'_n = \frac{p_n}{p_n/\rho_n - S/\rho_s} = \frac{p_n \rho_n \rho_s}{p_n \rho_s - S \rho_n} \dots \dots \dots (2)$$

Da annähernd $\rho_n = \rho_s$, so nimmt die Extraktionsrate K'_n die Form an:

$$K'_n = \frac{1}{1 + \rho'_n} = \frac{1 - \sigma_n}{\rho_n + 1 - \sigma_n}, \dots \dots \dots (3)$$

wobei $\sigma_n = S/p_n$.

Obigem Verhältnisse nach ist es nötig, die Menge der unlöslichen Substanzen oder das Verhältnis σ_n zu ermitteln, um die Extraktionsrate berechnen zu können. Ferner ist aus Gleichung (1) leicht verständlich, dass K' kleiner ausfällt als berechnet, wenn das Volumen der unlöslichen Substanzen gering ist.

Theoretisch betrachtet, kann man aus Gleichung (3) und der gefundenen Extraktionsrate des Stickstoffs den Gehalt an unlöslichen Substanzen berechnen. Da aber die experimentell gefundene Extraktionsrate beträchtlich schwankt, ist es nicht zulässig, sie zur Berechnung zu benutzen. Folglich wurde die Extraktionsrate unter Zusatz einer geeigneten Substanz bestimmt. Für solche Zusätze gelten aber die Bedingungen: 1. dass keine Gegenwirkung zwischen der zugesetzten Substanz und den Gewebsbestandteilen stattfindet, 2. eine möglichst kleine Menge zugesetzt wird, solange ihre Mikrobestimmung möglich ist und 3. dass das Bestimmungsverfahren einfach ist. Es wurden Xylose, p-Nitrophenol (PNP) und Kaliumjodid gewählt.

Die Xylose wurde nach ihrem Reduktionsvermögen bestimmt, sodass die Resultate durch andere reduzierende Substanzen im Gewebsextrakte nicht verschleiert wurden.

p-Nitrophenol reagierte mit den Bestandteilen des Hirns. Da, wie aus Tab. 2 ersichtlich, bei der ersten Extraktion die Konzentration des PNP's ziemlich stark abnimmt, findet es sich wahrscheinlich an den unlöslichen Rückständen des Hirnbreis adsorbiert. Denn, wäre es auf sie mit der Verteilungskonstante K verteilt, so würde die Extraktionsrate K'_n konstant sein nach der Gleichung:

$$K' = \frac{\sigma + (1 - \sigma)k}{\sigma + (2 - \sigma)k} \dots \dots \dots (4)$$

TABELLE II
Extraktionsrate des zugesetzten p-Nitrophenols

Extraktionsstufe	0	1	2	3	4
PNP, mg/dl.	4.63	1.10	0.68	0.52	0.43
K'_n	0.24	0.62	0.76	0.83	
P'_n		1.32	0.91	1.04	1.04

$K'_n = C_{n+1}/C_n$.

$P'_n = P_n/P_{n-1}$.

P_{n-1} : Der bei n-ter Extraktion gebrauchte (n-1)-te Niederschlag.

P_n : Der bei n-ter Extraktion gewonnene Niederschlag.

wobei σ das Volumverhältnis der unlöslichen Substanz im Niederschlag ist. Diese Gleichung (4) leitet man folgendermassen ab: Wenn C'_n die PNP-Konzentration in der unlöslichen Substanz und C_n die in der Flüssigkeit ist, beträgt der PNP-Gehalt $\sigma C'_n$ bzw. $(1 - \sigma) C_n$. Wenn man ein gleiches Volumen physiologischer NaCl-Lösung zur (n+1) ten Extraktion zusetzt, beträgt der Gesamtgehalt $\sigma C'_{n+1} + (2 - \sigma) C_{n+1}$. Beide gleich gesetzt, ergibt sich:

$$\sigma C'_n + (1 - \sigma)c_n = \sigma C'_{n+1} + (2 - \sigma)C_{n+1}$$

Da $K'_n = C_{n+1}/C_n$ und $K = C_n/C'_n$, bekommt man die oben angeführte Gleichung (4). Weil nun aber die Extraktionsrate des PNP's mit der Sukzession der Extraktion zunimmt, kann man erwarten, dass der Prozess der Langmuir'schen Adsorptionsisotherme folgt:

$$\frac{C}{C'} = \frac{1}{Ab} - \frac{C}{A} \dots \dots \dots (5)$$

Wenn das V Volumen des Gewebsbreis mit dem gleichen Volumen physiologischer NaCl-Lösung, die das PNP der C_0 Konzentration enthält, versetzt und homogenisiert wird, enthält das Homogenat das PNP um $C_0 V$, die Flüssigkeit darin um $C_1 (2V - \sigma V)$ und die unlösliche Substanz um $C'_1 \sigma V$. Abzentrifugiert enthält die Flüssigkeit im ersten Niederschlag um $C_1 (Vp'_1 - \sigma V)$ und die unlösliche Substanz um $C'_1 \sigma V$. Wenn der erste Niederschlag mit der gleichen Menge physiologischer NaCl-Lösung ohne PNP versetzt und wieder homogenisiert wird, enthält die Flüssigkeit um $C_2 (2Vp'_1 - \sigma V)$ und die unlösliche Substanz um $C'_2 \sigma V$ usw. Auf solche Weise erhält man:

$$C_0V = C_1(2V - \sigma V) + C'_1\sigma V.$$

$$C_1(Vp'_1 - \sigma V) + C'_1\sigma V = C'_2(2Vp'_1 - \sigma V) + C'_2\sigma V.$$

$$C_2(2Vp'_1p'_2 - \sigma V) + C'_2\sigma V = C'_3(4VP'_1P'_2 - \sigma V) + C'_3\sigma V: \dots\dots\dots$$

wobei p'_n die Ausbeute des Niederschlags ist.

Die Zahlenwerte der Konzentrationen C'_n lassen sich nicht berechnen, solange σ nicht gegeben ist. Wenn man aber σ zu 0.2 setzt und C'_n berechnet, kann die Gültigkeit der Gleichung (5) geprüft werden. In Abb. 1 ist die Abzisse die Konzentration C des PNP's in der Flüssigkeit und die Ordinate das Verhältnis C/C' . Daraus ist das lineare Verhältnis zwischen C und C/C' leicht zu erkennen, und die Adsorption des PNP's lässt sich somit nachprüfen.

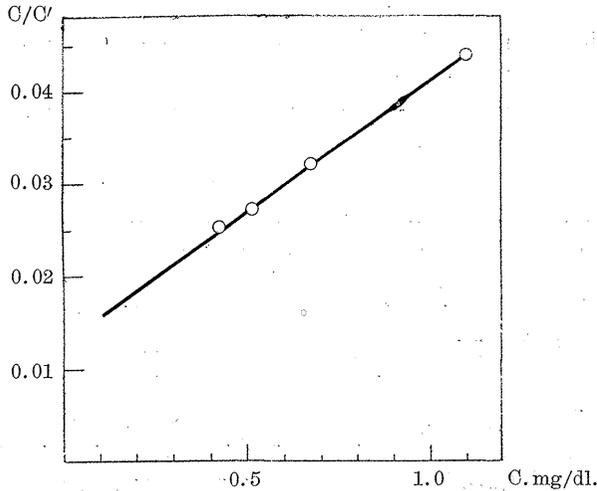


Abb. 1. Adsorption des p-Nitrophenols an den unlöslichen Substanzen des Hirns.

Kaliumjodid. Während das Jod mit Proteinen und Lipiden reagiert, geschieht dies beim Jodid nicht. Wie die in Tab. 3 angeführten Resultate zeigen, ist die Extraktionsrate des Jodids (wie erwartet) fast konstant. Das Verhältnis $\sigma = s/p_n$ berechnet sich zu 0.2 aus den Extraktionsraten K' des Jodids nach den Formeln:

TABELLE III
Extraktionsrate des zugesetzten Jodids

Nr. der Sukzession	0	1	2	3
K'_n	0.57	0.45	0.43	0.45
P'_n		1.4	0.9	1.0
σ	0.25	0.18	0.25	0.18
K'_n , berechnet ¹⁾	0.56	0.46	0.46	0.46

K'_n und P'_n , wie in Tab. 2.

1) Berechnet unter der Annahme $\sigma = 0.2$ (s. Text)

$$K'_0 = \frac{p_0}{(p_0 - s)/\rho + p_0} = \frac{1}{(1 - \sigma)/\rho + 1}$$

.....

$$K'_1 = \frac{(p_1 - s)/\rho}{(p_1 - s)/\rho + p_1} = \frac{p'_1 - \sigma}{(p'_1 - \sigma) + \rho}, \dots$$

$$K'_n = \frac{p'_n - \sigma}{p'_n - \sigma + \rho},$$

wobei p_0 das Gewicht des Hirnbreis, also das Volumen der zugesetzten jodhaltigen physiologischen NaCl-Lösung ist, und P_n das Gewicht des n-ten Niederschlags, also das Volumen der zum n-ten Niederschlag zugesetzten physiologischen NaCl-Lösung ohne Jodid darstellt.

Es scheint jedoch nicht richtig, das Verhältnis σ aus den Extraktionsraten zu berechnen, da bereits eine kleine Änderung im K' -Werte eine bedeutende Differenz verursacht. Um σ direkt zu berechnen, hat man das Volumen der unlöslichen Substanz die nach der sukzessiven Extraktion zuletzt zurückbleibt, aus ihrer Dichtigkeit und eventuell ihrem Stickstoffgehalt zu ermitteln. Die Dichtigkeit lässt sich nicht unmittelbar bestimmen. Aber gesetzt, dass durch Trocknen keine Volumänderung stattfindet, oder dass die Dichtigkeit ungefähr 1 sei, so kann man σ folgendermassen berechnen: 100 g Hirnbrei enthält 1.64 g Stickstoff, von diesem bleibt nach sechsmaliger Extraktion durchschnittlich 0.93 g als nicht extrahierbar übrig. Da ferner durchschnittlich 30% des extrahierten Stickstoffs unlöslich war, blieb in summa ungefähr 1.1 g unlöslicher Stickstoff pro 100 g Brei übrig. Folglich wird, da der Stickstoffgehalt pro g getrockneter unlöslicher Substanz 55 mg war, σ zu 0.2.

Aus diesem Werte σ ergibt sich K' als 0.46, ein Wert, der von den in Tab. 1 aufgeführten Extraktionsraten des extrahierbaren Stickstoffs beträchtlich abweicht, sodass die letzteren nicht einfach durch das Verhältnis σ erklärt werden können. Wahrscheinlich liegt der Grund hierfür darin, dass im Extrakte auch die unlösliche Substanz zurückblieb. Deswegen ist es nötig, mit der Hochtourenzentrifuge zu experimentieren. Jedenfalls, wenn auf einer Stufe der Extraktion

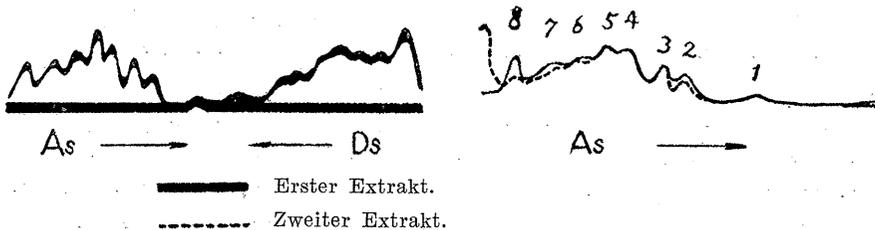


Abb. 2. Elektrophoresediagramme des Hirnextrakts.

TABELLE IV
*Beweglichkeit und relative Konzentration der elektrophoretischen
 Bestandteile des Hirnextraktes*

Nr. Gipfel	Beweglichkeit ¹⁾		Rel. Konzentration	
	Nr. der Sukzession		Nr. der Sukzession	
	1	2	1	2
1	12.5	11.5	3.2	3.2
2	9.6	10.0	7.6	6.0
3	8.2	8.7	8.8	5.7
4	6.8	8.0	19.5	17.9
5	5.6	6.7	19.0	31.9
6	4.0	4.9	18.6	18.1
7	2.6	1.9	15.7	10.9
8	0.1	0.4	7.6	6.8
Voltgradient Volt/cm.	8.0	7.5		

Berechnet mit der aufsteigenden Seite.

Benutzt: Phosphatpuffer von pH 7.8 und Ionenstärke 0.05.

1) -10^{-5} cm²/Volt, Sek.

nur die Flüssigkeit, die im vorigen Niederschlag enthalten war, extrahiert wird, wie angenommen, so würde sich aus jeder sukzessiven Extraktion ein ständiger Wert von der relativen Konzentration ihrer Bestandteile ergeben. In Abb. 2 sind die Elektrophoresediagramme und in Tab. 4 die elektrophoretischen Bestandteile des ersten und zweiten Extrakts ihrer Beweglichkeit und relativen Konzentration nach dargestellt. Aus den Ergebnissen ist leicht ersichtlich, dass die relativen Konzentrationen praktisch fast konstant bleiben. Demnach kann gefolgert werden, dass die sukzessive Extraktion des Hirnbreis nur die Extraktion der im vorigen Niederschlag zurückgebliebenen Flüssigkeit ist.

Der nicht extrahierbare Stickstoff des Grosshirns und der Lunge beträgt 70 bzw. 65% des gesamten Stickstoffgehalts. Da der Gesamtstickstoffgehalt von Grosshirn und Lunge 1.6 bzw. 1.9 g pro 100 g Gewebe betragen, ist der unlösliche, nicht extrahierbare Stickstoff der Lunge ungefähr gleich oder etwas grösser als der des Grosshirns. Dessenungeachtet sind die Extraktionsraten von Grosshirn und Lunge 0.42 bzw. 0.48, zeigen also eine beträchtliche Differenz: die der Lunge stimmt mit der Dichtigkeit (1.02) wie erwartet gut überein. Dies mag darauf beruhen, dass die unlösliche Substanz des Grosshirns und der Lunge von ungleichem Stickstoffgehalt ist. Die des Grosshirns enthält Lipide, so dass der Stickstoffgehalt, wie oben erwähnt, verhältnismässig niedrig ist. Dagegen besteht die der Lunge hauptsächlich aus Eiweiss von 16% Stickstoffgehalt, so dass die Lunge 8% oder 6 Volumprozent unlösliche Eiweisse enthalten muss, gesetzt, dass das spezifische Volumen des Eiweisses 0.73 ist. Bei oben genannten Versuchsbedingungen dürften Fehler bis zu 5% wohl gestattet sein. Hieraus

folgt, dass die unlösliche Substanz der Lunge keinen Einfluss auf die Extraktionsrate hat, was mit den experimentellen Resultaten gut übereinstimmt.

Volumänderung der unlöslichen Substanz des Grosshirns

Wenn 100 g Hirnbrei mit dem gleichen Volumen physiologischer NaCl-Lösung in einer Folge nacheinander extrahiert wird, erhält man durchschnittlich die in Tab. 5 eingetragenen Mengen Niederschlags. Da die experimentellen Data ziemliche Schwankungen zeigten, sind die angeführten Zahlenwerte zwar nur ungefähr zutreffend, doch vermag man aus ihnen die Verhältnisse wohl zu begreifen.

TABELLE V
Niederschlagsmenge (g) bei 100 g Gewebe
(Die Volumveränderung der Niederschläge)

Extraktionsstufe	1	2	3	4	5
Hirn	150	140	140	140	
Lunge	95	95	95	95	
Lymphknoten	75	78	85	30	30
Leber	75	55	45	45	45
Niere	85	70	50	60	60

Die Niederschlagsmengen sind im Gewicht bestimmt. Während die Gewichtsabnahme des Niederschlags tatsächlich auf der Abnahme der Substanzen, von einigen Ausnahmen abgesehen, beruhen dürfte, muss die Gewichtszunahme der Volumzunahme des Niederschlags zugeschrieben werden. Demnach kann man folgern, dass die Hirnsubstanz bei der Homogenisierung ihr Volumen ca. 1.5 mal vergrößert. Diese Volumzunahme der Hirnsubstanz hängt vermutlich davon ab, dass letztere sich eigentlich im Hirn wohlgeordnet findet und durch die Homogenisierung zerkleinert und zerstreut wird. Bei den Lymphknoten verhält es sich ganz anders, da das Volumen erst bei der zweiten und dritten Extraktion zuzunehmen und dann plötzlich abzunehmen pflegt, als ob etwas aufschwölle und platze. Auch in dieser Hinsicht ist es nötig, die Versuche mit der hochtourigen Zentrifuge auszuführen.

Zur Methodik

Die experimentelle Methode ist der von Nakamura et al. (2) angegebenen ähnlich. Eine Grosshirnhemisphäre des Rindes wurde mit physiologischer NaCl-Lösung zwei- bis dreimal gewaschen und die Meningen mit dem Blutgefäss möglichst beseitigt. Eine Rinderlunge wurde gewaschen und mit ungefähr 3 Liter physiologischer NaCl-Lösung sofort nach dem Schlachten irrigiert. Die Lunge wurde zwar etwas blass, aber das Blut konnte nicht vollständig ausgewaschen werden. Das Hirn wurde zuerst zerschnitten und die Lunge gehackt, dann 10

Minuten mit dem gekühlten Homogenisator (blade homogenizer) homogenisiert. Der Gewebsbrei wurde mit einer gleichen Menge physiologischer NaCl-Lösung versetzt und nochmals homogenisiert. Das Homogenat wurde abgewogen und 30 Minuten lang bei 3,000 T. p. M. zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit der gleichen Menge physiologischer NaCl-Lösung homogenisiert, abzentrifugiert usw. Beim Hinzufügen des Zusatz-Stoffes wurde eine passende Menge desselben nur der physiologischen NaCl-Lösung bei der ersten Extraktion zugesetzt.

Die Dichtigkeit wurde mit dem Pyknometer bestimmt. Der gesamte Stickstoffgehalt wurde nach der gewöhnlichen Halbmikro-Kjeldahl-Methode bestimmt. Die Filtration des Extraktes wurde über Nacht mit Toyo Filtrierpapier Nr. 4 im Eisschrank durchgeführt.

Die Bestimmung des zugesetzten Jodids wurde nach Ogata und Hayashi (3) ausgeführt, die des p-Nitrophenols anschliessend an Morimoto (4) folgendermassen: 1 ml Extrakt wurde mit 9 ml 10%-iger Trichloressigsäure versetzt und filtriert. Das Filtrat wurde mit 4 ml gesättigter Natriumbicarbonatlösung versetzt und die auftretende gelbe Farbe mit Elektrophotometer bestimmt.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die "Extraktionsrate" des Stickstoffs ist beim Grosshirn kleiner als die angesichts der Dichtigkeit des Niederschlags erwartete. Der Grund hierfür findet sich im unwirksamen Volumen der unlöslichen Substanz.

2. Wenn mit einer gleichen Menge physiologischer NaCl-Lösung homogenisiert wird, nimmt das Volumen des Hirnbreis um 50% zu.

3. p-Nitrophenol wird an der Hirnsubstanz adsorbiert.

4. Elektrophoresediagramme des Hirnexttrakts wurden gegeben.

Herrn Prof. Dr. S. Nakamura spreche ich hier meinen besten Dank für seine freundliche Leitung bei dieser Arbeit aus.

L I T E R A T U R

- 1) PALLADIN, A. V. UND GORYUKHINA, T. A.: *Fiziol. Zhur.*, **33**, 727, 1947; cit. nach *C. A.*, **44**, 8976, 1950.
- 2) NAKAMURA, S., HAYASHI, Y. TAKAHASHI, M. UND ZAIZEN, T.: *J. Biochem.*, (Japan), **41**, 1, 1954
- 3) OGATA, H. UND HAYASHI, Y.: *Bull. Yamaguchi Med. School.* **1**, 154, 1953
- 4) MORIMOTO, K.: *J. Biochem.* (Japan), **26**, 259, 1937,