

BBA 75025

DIE WIRKUNG CARDIOTONER STEROIDE AUF DIE ENTERALE
RESORPTION AKTIV TRANSPORTIERTER UND DIFFUNDIERENDER
SUBSTANZEN UND AUF DEREN BEZIEHUNG ZU Na^+ -KONZENTRATION
UND Na^+ -TRANSPORT*,**

FRITZ LAUTERBACH

Biologisches Institut Madaus, Köln-Merheim (Deutschland)

(Eingegangen am 5. August, 1966)

SUMMARY

The effect of cardiotonic steroids on the intestinal absorption of actively transported and diffusing substances and on their relationship to Na^+ concentration and Na^+ transport

1. Isolated small intestines from rats and guinea pigs were perfused with solutions containing various concentrations of Na^+ (method of FISHER AND PARSONS). Increasing amounts of the cardiac glycoside convallatoxin were added to the perfusing solutions in order to differentiate the effects of Na^+ concentration and of Na^+ transport on the absorption of glucose, K^+ and Ca^{2+} .

2. The intestinal transport processes in the rat were resistant to the glycoside up to 0.4 mM convallatoxin.

3. In the guinea pig, increasing concentrations of convallatoxin caused an increasing but proportional inhibition of all absorption processes determined. Therefore, in spite of reducing absolute transport rates the ratios of the absorbed amounts, water: Na^+ : glucose: Ca^{2+} , remained constant. By increasing the Na^+ concentration of the perfusion solution the ratio of the absorbed amounts, substrate/ Na^+ , was diminished.

4. The passive diffusion of urea across the wall of guinea-pig everted gut sac was not influenced by convallatoxin.

5. It is concluded from the experiments that cardiotonic steroids diminish intestinal transport processes by inhibiting the Na^+ transport mechanism and that the ratios of the absorbed amounts, glucose/ Na^+ and $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$, are not influenced by glycoside, but are wholly dependent on the Na^+ concentration in the gut lumen. Attempting a uniform interpretation of these and other authors' observations, a

* Untersuchungen zur Biochemie und Pharmakologie cardiotoner Steroide; 4. Mitteilung.
(3. Mitteilung sehe LAUTERBACH UND VOGEL, *Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol.*, 249 (1964) 374.)

** Über einen Teil der vorgelegten Befunde wurde bereits auf der gemeinsamen Tagung der deutschen, schweizerischen und französischen Biochemiker am 21.9.1963 in Strassburg sowie auf der 28. Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft am 7.10.1964 in Bad Nauheim berichtet¹.

hypothesis is discussed which suggests cyclic permeability changes in substrate-transporting membranes analogous to those found in the excitable tissue membranes.

EINLEITUNG

Die Resorption von Glucose, K^+ und Ca^{2+} durch den *in vitro* perfundierten Dünndarm von Ratte und Meerschweinchen ist abhängig von Na^+ -Ionen. Bei systematischer Untersuchung der Resorption der drei genannten Substanzen (im Folgenden kurz als Substrate bezeichnet) von Na^+ -Resorption (Na^+ -Transport) und Na^+ -Konzentration der Perfusionslösung lassen sich zwei Beziehungen erarbeiten²:

1. Bei konstanter Na^+ -Konzentration der Perfusionslösung sind die individuell schwankenden, resorbierten Substratmengen der gleichzeitig resorbierten Na^+ -Menge streng linear korreliert.

2. Der Regressionskoeffizient wird mit steigender Na^+ -Konzentration der Perfusionslösung kleiner, das heißt bei höherem Na^+ -Angebot wird weniger Substrat pro Mol transportiertes Na^+ resorbiert. Dieses zweite Phänomen hat seine Ursache darin, daß mit steigender Na^+ -Konzentration der Perfusionslösung die Substrat-Resorption in Form einer Sättigungsfunktion, die Na^+ -Resorption aber linear ansteigt.

Da bei konstanter Na^+ -Konzentration der Perfusionslösung der Substrat-Transport offensichtlich mit dem Na^+ -Transport gekoppelt ist (Beziehung 1), ergibt sich die Frage, ob das Verhältnis der resorbierten Mengen Substrat/ Na^+ ebenfalls eine Funktion des Na^+ -Transportes ist, oder ob es direkt oder indirekt von der mucosaseitigen Na^+ -Konzentration eingestellt wird. Da in den zitierten Versuchen mit einer Veränderung der Na^+ -Konzentration der Perfusionslösung unabdingbar eine Veränderung des Na^+ -Transportes verbunden war, konnte eine Klärung dieser Frage nicht erfolgen. Es galt daher den Na^+ -Transport bei konstanter mucosaseitiger Na^+ -Konzentration zu variieren. Unter mehreren Möglichkeiten schien die Perfusion mit steigenden Konzentrationen von Herzglykosiden eine Reihe von Vorteilen zu bieten.

CsÁKY, HARTZOG UND FERNALD³ konnten 1961 zeigen, daß cardiotone Steroide nicht nur die bekannte hemmende Wirkung auf den Na^+ -Transport besitzen⁴, sondern auch die enterale Resorption von Methylglucose beim Frosch inhibieren. Dieser Befund wurde später auf die enterale Resorption von Zuckern, Aminosäuren und Taurocholsäure bei verschiedenen Spezies erweitert⁵⁻⁸. Auch die Rückresorption von Ca^{2+} und Glucose durch perfundierte Froschnieren wird von Convallatoxin beeinträchtigt^{9,10}. Weiterhin liegen zahlreiche Angaben über eine Hemmung der Akkumulation organischer Substrate¹¹⁻¹⁹ sowie Jodidionen²⁰ in den verschiedensten Zellen durch cardiotone Steroide vor. Von verschiedenen Autoren^{11,14,17} konnte außerdem gezeigt werden, daß Herzglykoside nur die in Na^+ -haltigen Inkubationslösungen stattfindende Akkumulation mit Aufbau eines Konzentrationsgradienten blockieren, während der Konzentrationsausgleich im Na^+ -freien Medium unbeeinflußt bleibt.

Auf Grund der bekannten Befunde konnte daher erwartet werden, daß bei Perfusion isolierter Dünndärme nicht nur die Na^+ -, sondern auch die Substratresorption beeinflußt werden würde. Im Folgenden wird über Versuche berichtet, in denen sowohl die Na^+ - als auch die Glykosid-Konzentration der Perfusionslösungen variiert und unter den verschiedenen Bedingungen Na^+ - und Substrat-Transporte gleich-

zeitig gemessen wurden. Die Ergebnisse werden dann hinsichtlich des Angriffspunktes der Glykoside im Mechanismus der Substrat-Transporte sowie des Mechanismus der Wirkung des Na^+ auf die Substrat-Transporte diskutiert.

METHODEN UND MATERIALIEN

Die Versuche wurden in gleicher Weise wie in der vorhergehenden Arbeit durchgeführt²; im Folgenden brauchen daher nur die Prinzipien der Methodik wiederholt zu werden. Die Perfusion der Dünndärme von Ratten und Meerschweinchen erfolgte in der Apparatur nach FISHER UND PARSONS²¹. Das abtropfende Resorbat wurde in einer feuchten Kammer gesammelt. Die Perfusionslösung hatte folgende Grundzusammensetzung (mM): 110.6 NaCl; 7.0 KCl; 3.0 CaCl_2 ; 1.0 MgSO_4 ; 0.9 Natriumphosphat-puffer (pH 7.4); 29.4 Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-puffer (pH 7.4); 27.8 Glucose. Variation der Na^+ -Konzentration erfolgte durch Austausch eines Teiles des NaCl gegen Mannit unter Wahrung der Isotonie. Versuche mit schwer wasserlöslichen Herzglykosiden* erforderten einen Zusatz von 4% Äthanol zu den fertigen Perfusionslösungen; aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde fast allen Perfusionslösungen diese Äthanol-Menge zugesetzt. Convallatoxin wurde von der chemischen Abteilung der Fa. Dr. Madaus und Co. zur Verfügung gestellt. Na^+ , K^+ und Ca^{2+} wurden flammenphotometrisch, Glucose enzymatisch bestimmt. Die resorbierten Substanzmengen wurden auf 1 cm Darm und 1 h Perfusionsdauer berechnet.

Versuche am everted sac erfolgten nach der Methode von WILSON UND WISEMAN²²: Die 5 cm langen Säckchen wurden mit 1 ml Lösung gefüllt und in 20 ml Lösung bei 37° in O_2 -Atmosphäre im Warburg-Thermostaten 45 min lang bewegt. Als Inkubationsmedium diente die für die Perfusionsversuche verwendete Lösung; Medien mit 10 mM Na^+ bzw. 158 mM Na^+ wurden hieraus durch Austausch von NaCl gegen Mannit bzw. Na_2SO_4 hergestellt. 15 mM Harnstoff und gegebenenfalls 27.8 mM Glucose sowie 400 μM Convallatoxin wurden nur dem mucosaseitigen Medium zugesetzt, ansonsten waren äußeres und inneres Medium identisch. Die Harnstoff-Bestimmung erfolgte mit Urease nach CONWAY UND O'MALLEY²³.

ERGEBNISSE

Speziesdifferenzen in der Wirkung cardiotoner Steroide auf enterale Transportprozesse

Bei Perfusion der Dünndärme von Ratten und Meerschweinchen mit Lösungen steigenden Glykosidgehalts werden ausgeprägte Speziesdifferenzen beobachtet. Die enteralen Transportprozesse der Ratte sind weitgehend glykosidresistent. Bei sämtlichen geprüften Na^+ -Konzentrationen der Perfusionslösung (10, 38 und 108 mM) wurden bis zu einer Convallatoxin-Konzentration von 400 μM keine signifikanten Differenzen zu den aus glykosidfreien Lösungen resorbierten Na^+ - und Glucose-Mengen beobachtet. Auch die Resorption von K^+ , Ca^{2+} und Wasser blieb unbeeinflußt.

Das Meerschweinchen besitzt im Gegensatz zur Ratte ausgesprochen glykosidempfindliche enterale Transportmechanismen (Abb. 1). Von 25 auf 400 μM steigende

* Über diese Versuche wird im Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol. berichtet.

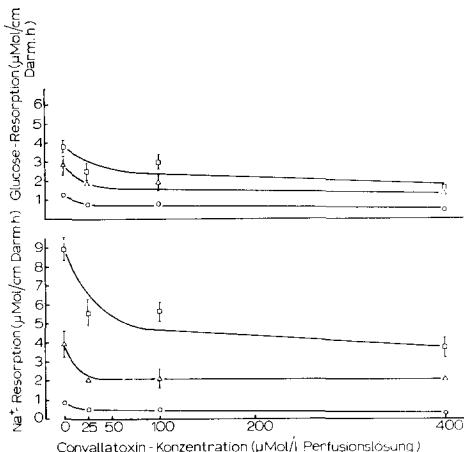


Abb. 1. Wirkung von Convallatoxin auf die Resorption von Na^+ und Glucose durch den Dünndarm des Meerschweinchens. Perfusion *in vitro* bei 37.5° für 45 min. Na^+ -Konzentration der Perfusionslösungen: ○, 10; △, 38; □, 108 mM; weitere Bestandteile siehe METHODIK. Sofern die mittleren Fehler nicht eingezeichnet sind, sind sie kleiner als die Durchmesser der Symbole.

Convallatoxin-Konzentrationen vermindern bei allen drei Na^+ -Konzentrationen die Na^+ - und Glucose-, sowie die K^+ - und Wasser-Resorption zunächst rasch, später langsamer, auf ein Drittel bis die Hälfte der aus glykosidfreien Lösungen resorbierten Mengen. In gleicher Weise wirkte Digitoxin. Die Beziehungen zwischen Na^+ - und Substratresorption unter den Bedingungen eines durch Glykosid-Zusatz variierten Na^+ -Transportes konnten daher nur am Meerschweinchen studiert werden.

Das Verhältnis der resorbierten Mengen Substrat/ Na^+ unter der Einwirkung von Convallatoxin

Zur Ermittlung der Beziehungen zwischen Substrat- und Na^+ -Transport unter den Bedingungen variierender mucosaseitiger Na^+ -Konzentration und variierenden Na^+ -Transportes wurden zunächst Dünndärme des Meerschweinchens mit Lösungen perfundiert, die 10, 38 bzw. 108 mM Na^+ und entweder kein Glykosid oder 25, 100 bzw. 400 μM Convallatoxin enthielten. Die Perfusionsdauer betrug 45 min, der Äthanol-Gehalt 4%. Bei allen drei Na^+ -Konzentrationen wird aus glykosidhaltigen Lösungen nicht nur weniger Na^+ , sondern auch weniger Glucose und Ca^{2+} resorbiert. Bei Darstellung der Ergebnisse in einem Diagramm, welches die resorbierten Mengen Glucose bzw. Ca^{2+} auf der Ordinate, die resorbierten Mengen Na^+ auf der Abszisse wiedergibt, ordnen sich die Punkte der im Mittel resorbierten Mengen um drei Geraden (Abb. 2 und 3). Dabei sind die bei einer bestimmten Na^+ -Konzentration der Perfusionslösung gemessenen Werte unabhängig vom Glykosid-Gehalt dieser Lösung jeweils einer Geraden zuzuordnen. Dies bedeutet, daß unter der Einwirkung von Convallatoxin die Hemmung der Glucose- und Ca^{2+} -Resorption proportional zur Hemmung der Na^+ -Resorption erfolgt; das Verhältnis der resorbierten Mengen Glucose bzw. $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ bleibt praktisch konstant.

Werden die resorbierten Mengen Wasser, Glucose und Ca^{2+} auf die gleichzeitig resorbtierte Na^+ -Menge bezogen und diese gleich 100 gesetzt, so ergibt sich mithin folgendes Bild (Tabelle I): Für eine bestimmte Na^+ -Konzentration der Perfusions-

TABELLE I
RESORPTION VON WASSER, Na^+ , GLUCOSE, Ca^{2+} UND K^+ AM DÜNNDARM DES MEERSCHWEINCHENS AUS LÖSUNGEN VERSCHIEDENER Na^+ - UND CONVALA-

TOXIN-KONZENTRATION

Zusammensetzung der Perfusionslösungen sehe METHODIK. Perfusionsdauer: 45 min; Äthanol-Konzentration: 4% (v/v). Angegeben sind die Mittelwerte \pm mittl. Fehler des Mittelwertes der resorbierten Mengen $\cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{Darm} \cdot \text{h}^{-1}$. In der Spalte 'relative Mengen' sind die resorbierten $\mu\text{Mole Glu-$

$\text{ose}, \text{Ca}^{2+}$ und K^+ bzw. ml Wasser auf die gleichzeitig resorbierten und gleich 100 gesetzten $\mu\text{Mole Na}^+$ bezogen.

Versuchsbedingungen	Anzahl der	Resorbierte Mengen absolut		Resorbierte Mengen relativ ($\text{Na}^+ = 100$)			
		Conval-	Wasser	Na^+	Glucose	Ca^{2+}	K^+
			$(\mu\text{L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	$(\mu\text{Mol} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$			
		(μM)					
10	0	7	34.0 \pm 4.8	0.84 \pm 0.066	1.24 \pm 0.14	0.154 \pm 0.019	0.295 \pm 0.034
	25	6	16.5 \pm 1.4	0.54 \pm 0.087	0.76 \pm 0.05	0.074 \pm 0.009	0.162 \pm 0.018
	400	6	13.3 \pm 2.8	0.30 \pm 0.043	0.44 \pm 0.09	0.063 \pm 0.010	0.158 \pm 0.030
38	0	7	60.3 \pm 12.7	3.91 \pm 0.67	2.83 \pm 0.47	0.301 \pm 0.052	0.502 \pm 0.094
	25	7	27.4 \pm 2.9	2.03 \pm 0.22	1.84 \pm 0.24	0.129 \pm 0.014	0.275 \pm 0.031
	400	10	37.2 \pm 6.6	2.04 \pm 0.28	1.29 \pm 0.22	0.155 \pm 0.024	0.489 \pm 0.068
108	0	6	75.3 \pm 4.0	8.88 \pm 0.60	3.80 \pm 0.25	0.377 \pm 0.065	0.499 \pm 0.029
	25	6	49.5 \pm 7.8	5.56 \pm 0.67	2.50 \pm 0.45	0.236 \pm 0.053	0.418 \pm 0.059
	400	8	33.9 \pm 5.7	3.72 \pm 0.54	1.38 \pm 0.26	0.174 \pm 0.037	0.433 \pm 0.062
						0.91	37.1
						4.7	11.6

TABELLE II
RESORPTION VON WASSER, Na^+ , GLUCOSE, Ca^{2+} UND K^+ AM DÜNNHARM DES MEERSCHWEINCHENS AUS LÖSUNGEN VERSCHIEDENER Na^+ - UND CONVALLATOXIN-KONZENTRATION

Variation der Perfusionssbedingungen gegenüber den Versuchen in Tabelle I hinsichtlich Zeitdauer, Äthanol-Zusatz, Puffer und Na^+ -Ersatz. Zusammensetzung der Perfusionsslösungen siehe METHODIK. Angegeben sind die Mittelwerte der resorbierten Mengen, cm^{-1} Darm $\cdot \text{h}^{-1}$ sowie in Klammern der jeweils gemessene größte und kleinste Wert. Berechnung der relativen Mengen wie in Tabelle I.

Versuchsbedin- gungen	Anzahl der Versuche	Resorbierbare Mengen absolut		Resorbierbare Mengen relativ ($\text{Na}^+ = 100$)						
		Na^+ (μM)	Wasser ($\mu\text{Mol} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Glucose ($\mu\text{Mol} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Ca^{2+} ($\mu\text{Mol} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)					
38*,†	0	2	50.5 (50.0– 51.0)	3.04 (3.01– 3.06)	2.00 (1.95–2.05)	0.359 (0.353–0.364)	1.7	65.8	11.8	
100	2	32.5 (30.0– 35.0)	2.06 (1.90– 2.22)	1.33 (1.21–1.45)	0.361 (0.321–0.400)	1.6	64.6	17.5		
38*	0	4	90.0 (50.0–117.0)	4.88 (3.20– 6.33)	4.11 (3.27–5.46)	0.261 (0.184–0.355)	0.633 (0.389–0.850)	1.8	84.2	5.4
100	2	13.5 (11.0– 16.0)	0.87 (0.75– 0.99)	0.69 (0.50–0.88)	0.060 (0.058–0.062)	0.175 (0.141–0.209)	1.6	79.3	6.9	
108*	0	3	99.0 (76.0–143.0)	11.48 (9.02–16.39)	4.92 (3.52–6.99)	0.306 (0.245–0.420)	0.750 (0.560–1.040)	0.86	42.9	2.7
100	2	33.0 (29.0– 37.0)	3.70 (3.12– 4.27)	1.33 (1.12–1.53)	0.070 (0.024–0.116)	0.403 (0.360–0.445)	0.89	36.0	1.9	
112**	0	3	51.3 (36.0– 73.0)	5.38 (3.67– 7.96)	3.47 (2.38–4.65)	0.368 (0.290–0.542)	0.298 (0.203–0.416)	0.95	64.5	6.8
100	3	43.7 (28.0– 61.0)	4.65 (2.93– 6.39)	3.24 (1.94–4.47)	0.268 (0.164–0.359)	0.316 (0.220–0.450)	0.94	69.7	5.8	
400	2	33.0 (27.0– 39.0)	3.37 (2.74– 4.00)	2.05 (1.55–2.54)	0.209 (0.186–0.232)	0.357 (0.277–0.437)	0.98	60.8	6.2	

* Perfusionssdauer: 90 min; Äthanol-Konzentration 4% (v/v).

** Perfusionssdauer: 45 min; kein Äthanol-Zusatz.

† Kein Mannit, dafür 196 mM Harrstoff, kein Tris-puffer, dafür 24 mM NaHCO_3 , Gasphase 5% CO_2 –95% O_2 .

lösung ist das Verhältnis der resorbierten Mengen Na^+ :Wasser:Glucose: Ca^{2+} eine nur gering variiierende Zahlenfolge. Während mit steigender Glykosid-Konzentration der Perfusionslösung die resorbierten Mengen gerichtet um 50 bis 70% abnehmen, schwanken die Verhältniszahlen zufällig und nur um etwa 10%. Wird die Na^+ -Konzentration der Perfusionslösung verändert, stellt sich eine neue Verhältnisreihe der resorbierten Mengen ein. Mit steigender Na^+ -Konzentration nehmen dabei die auf Na^+ bezogenen relativen Mengen ab. In jedem Falle ist die Relation unabhängig von der Glykosid-Konzentration und damit unabhängig von der absoluten Größe des Na^+ -Transportes.

Die Konstanz der relativ resorbierten Mengen trotz glykosidbedingter Hem-

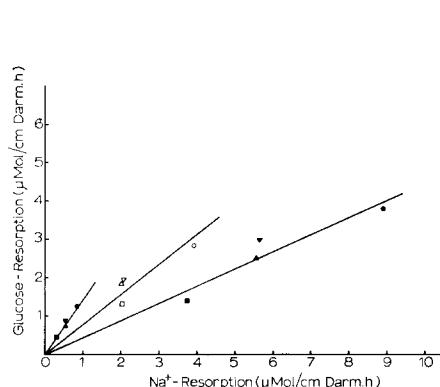


Abb. 2. Verhältnis der resorbierten Mengen Glucose/ Na^+ bei verschiedenen Na^+ - und Convallatoxin-Konzentrationen der Perfusionslösung. Meerschweinchen-Dünndarm *in vitro*, Perfusion bei 37,5° für 45 min. Convallatoxin-Konzentrationen: ○, △, □, 25; △, 100; □, 400 μM . Schwarze Symbole, 10 bzw. 108 mM Na^+ ; weiße Symbole, 38 mM Na^+ .

Abb. 3. Verhältnis der resorbierten Mengen $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ bei verschiedenen Na^+ - und Convallatoxin-Konzentrationen der Perfusionslösung. Versuchsbedingungen und Symbole wie in Abb. 2.

mung der Transporte wurde auch beobachtet, wenn die allgemeinen Versuchsbedingungen verändert wurden (siehe Tabelle II): Bei Verlängerung der Versuchsdauer auf 90 min, Perfusion mit äthanolfreien Lösungen oder Ersatz des Tris- durch Bicarbonat-Puffer und des zum isotonen Ausgleich dienenden Mannit durch Harnstoff werden für die auf Na^+ bezogenen relativen Mengen gegenüber der ersten Versuchsserie gelegentlich etwas andere Werte gefunden. Die neue Sequenz unterliegt jedoch wiederum trotz starker Abnahme der absolut resorbierten Mengen bei Glykosid-Zusatz nur geringen Schwankungen.

Die Resorption des K^+ lässt sich in dieses Schema nicht einordnen. Wie aus den Tabellen I und II ersichtlich ist, sinkt zwar mit steigender Convallatoxin-Konzentration in den meisten Versuchsreihen die absolut resorbtierte K^+ -Menge ebenfalls ab. Bezogen auf Na^+ nimmt die relativ resorbtierte K^+ -Menge jedoch kontinuierlich zu. Dieses abweichende Verhalten dürfte auf den bekannten Verlust von zelleigenem K^+ unter der Wirkung cardiotoner Steroide zurückzuführen sein. Die im Resorbat gefundene K^+ -Menge beträgt weniger als 10% des K^+ -Gehaltes des perfundierten Darmstückes.

TABELLE III

PENETRATION VON HARNSTOFF UND RESORPTION VON GLUCOSE AM EVERTED SAC DES MEERSCHWEINCHEN-DARMES

Angebot von 15 mM Harnstoff und ggf. 27.8 mM Glucose sowie 400 μ M Convallatoxin nur von der Mucosaseite. Tabelliert ist die Konzentration an Harnstoff und Glucose im serosaseitigen Medium nach 45 min Inkubationsdauer in Prozenten der Konzentration der mucosaseitigen Lösung.

<i>Inkubationslösung</i>	<i>Harnstoff-Penetration in</i>		<i>Glucose-Resorption (%)</i>
	<i>Na⁺ (mM)</i>	<i>Convallatoxin (μM)</i>	
	10	0	43.9
		400	40.5 39.0
	108	0	41.0
		400	44.5 39.7
	158	0	40.3
		400	36.1 40.9

Wirkung von Convallatoxin auf die Harnstoff-Diffusion

Als Ursache der beobachteten Wirkungen von Convallatoxin auf die enteralen Transporte könnten glykosidbedingte Änderungen der passiven Permeabilität des Darmes postuliert werden. Am everted sac des Meerschweinchens wurde deshalb geprüft, ob die Diffusionsgeschwindigkeit von Harnstoff durch Convallatoxin verändert wird. Tabelle III zeigt, daß Convallatoxin auf diesen passiven Prozeß keinerlei Einfluß hat. Unter allen Versuchsbedingungen werden sowohl in glykosidfreien als auch in Convallatoxin-haltigen Medien nach 45 min im Inneren des Säckchens rund 40% der Harnstoff-Konzentration der Außenlösung erreicht. Aus Tabelle III ist weiterhin ersichtlich, daß die Diffusionsgeschwindigkeit des Harnstoffs auch unabhängig von der Na⁺-Konzentration der Inkubationslösung ist. Demgegenüber wird der Transport von Glucose auch an diesem Objekt durch Erhöhung der Na⁺-Konzentration gefördert und durch Zusatz von Convallatoxin gehemmt.

DISKUSSION

Zum Mechanismus der Wirkung cardiotoner Steroide auf Transportprozesse

Am Dünndarm des Meerschweinchens werden sowohl der Transport von Na⁺ als auch der von Glucose, K⁺ und Ca²⁺ durch Convallatoxin gehemmt. Am Dünndarm der Ratte werden sämtliche Transporte bis zu einer Glykosid-Konzentration von $4 \cdot 10^{-4}$ M unverändert gefunden. Erst bei Verdoppelung dieser Konzentration wurden mitunter schwache Hemmungseffekte beobachtet. Ähnliche Befunde, allerdings ohne gleichzeitige Messung des Na⁺-Transportes, wurden für die Akkumulation von Aminosäuren in Rattengeweben durch FOX und Mitarbeiter¹⁴ an Nierenrindenschnitten und von PARRISH und KIPNIS¹⁷ am Diaphragma *in vitro* erhoben. Auch an diesen Organen mußten sehr hohe Glykosid-Konzentrationen von $8 \cdot 10^{-4}$ bzw. $1 \cdot 10^{-3}$ M zur Hemmung eingesetzt werden.

Die Empfindlichkeit des Na^+ -abhängigen Transportes von Zuckern, Aminosäuren und Ca^{2+} gegen Herzglykoside zeigt demnach die gleichen tierartlichen Unterschiede, welche für den Ionentransport und die Na^+/K^+ -aktivierte Membran-ATPase (EC 3.6.1.3) der Erythrozyten²⁴ sowie den Jodid-Transport²⁰ und die Na^+/K^+ -aktivierte Membran-ATPase der Schilddrüse²⁵ beschrieben wurden. Diese Parallelität dürfte eine starke Stütze für die von CSÁKY²⁶ vertretene Auffassung sein, daß eine intakte Na^+ -Pumpe für den Bergauf-Transport der Substanzen essentiell ist und cardiotone Steroide auf den Transport dieser Substanzen indirekt über eine Hemmung der Na^+ -Pumpe wirken.

Nach Untersuchungen von SMITH⁷, CSÁKY UND HARA²⁶ und SCHULTZ UND ZALUSKY²⁷ muß die Na^+ -Pumpe auf der blutseitigen Membran der Mucosazelle lokalisiert werden, da schwer permeable Glykoside nur bei Angebot von der Serosaseite des Darms transporthemmend wirken. In den Befunden der vorliegenden Arbeit konnte wegen der Benutzung einer feuchten Kammer Convallatoxin nur von der Lumenseite her angeboten werden. Das Glykosid tritt jedoch in das Resorbat über und wirkt demnach auch auf die blutseitige Membran ein. Je nach Glykosid- und Na^+ -Konzentration der Perfusionslösung betragen die Convallatoxin-Konzentrationen im Resorbat bei der Ratte 4-14%, beim Meerschweinchen 18-45% der Konzentration im Darmlumen. Beim Meerschweinchen waren die Streuungen der serosaseitigen Glykosid-Konzentrationen beträchtlich; aus diesem Grunde war auch eine Auswertung der Abhängigkeit der Stärke der Glykosid-Wirkung von der Na^+ -Konzentration nicht sicher möglich.

Mit der Vorstellung eines Angriffs der Glykoside an der enteralen Na^+ -Pumpe stehen die Befunde in Einklang, daß die Diffusion von Harnstoff am everted sac durch Convallatoxin nicht beeinflußt wird. Dagegen berichtet CSÁKY²⁸ über die Hemmung der Äthanol- und Antipyrin-Resorption aus dem *in situ* perfundierten Meerschweinchendarm durch Ouabain und Digitoxin. Die Ursache dieser Diskrepanz ist unklar. T.Z. CSÁKY* hat in eigenen Experimenten Harnstoff als unbefriedigendes Mittel zum Studium von Veränderungen der passiven Permeabilität befunden, schließt aber auch die Möglichkeit eines Einflusses von solvent drag auf die Äthanol-Resorption nicht aus. Weitere Versuche mit anderen diffundierenden Substanzen sind hier notwendig.

Zum Mechanismus der Wirkung des Na^+ auf Substrattransporte

Am *in vitro* perfundierten Dünndarm unterliegen die resorbtierten Mengen Na^+ , Glucose, Ca^{2+} und K^+ trotz konstanter Versuchsbedingungen individuellen Schwankungen. Dabei streuen die Werte für die einzelnen Substanzen nicht unabhängig voneinander, sondern sind jeweils der gleichzeitig resorbtierten Na^+ -Menge korrielt. Die Steilheit der solcherart entstehenden Regressionsgeraden steigt mit sinkender Na^+ -Konzentration der Perfusionslösung an². Wird die vom Meerschweinchendünndarm resorbtierte Na^+ -Menge durch steigende Convallatoxin-Konzentrationen vermindert, so werden die gleichzeitig resorbtierten Mengen Glucose bzw. Ca^{2+} proportional eingeschränkt. Das Verhältnis der resorbtierten Mengen $\text{Glucose}/\text{Na}^+$ und $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ und damit die Steigung der Geraden bleiben unverändert. Der unter Convallatoxin-Wirkung stehende Darm verhält sich demnach wie ein Darm, welcher bei Perfusion

* Persönliche Mitteilung.

mit glykosidfreien Lösungen aus irgendeinem Grunde besonders geringe Resorptionsleistungen erbringt. Die einleitend gestellte Frage nach dem bestimmenden Parameter für das Verhältnis von Substrat/ Na^+ -Transport muß daher in dem Sinne beantwortet werden, daß es nicht vom Na^+ -Transport, sondern von der mucosaseitigen Na^+ -Konzentration determiniert wird. Die resorbierten Substratmengen sind demnach sowohl eine Funktion des Na^+ -Transportes als auch der extrazellulären, mucosaseitigen Na^+ -Konzentration. Verschiedene Befunde anderer Autoren erlauben indes nicht, in der extrazellulären Na^+ -Konzentration die stets allein bestimmende Größe für das Verhältnis von Substrat/ Na^+ -Transport zu sehen. RUMMEL UND STUPP^{29,30} fanden am Rattendarm *in vitro* eine starke Einschränkung der Na^+ -Resorption, aber praktisch keine Änderung der Glucose-Resorption durch Mersalyl und Hydrochlorothiazid. An der perfundierten Froschniere kann ebenfalls bei konstanter tubulärer Na^+ -Konzentration das Verhältnis der resorbierten Mengen Glucose/ Na^+ durch K^+ -Mangel, Fursemid oder Mersalyl³¹ bzw. durch Ersatz von Chlorid-durch Sulfat-Ionen³² verschoben werden. Andererseits ist eine Steuerung des Substrat/ Na^+ -Quotienten allein durch die intrazelluläre Na^+ -Konzentration ebenfalls nicht denkbar. In den Versuchen mit Convallatoxin-haltigen Lösungen wird sie sicher verändert. Das ist nicht nur in Analogie zum Ionengehalt anderer Gewebe unter Glykosid-Einwirkung, sondern auch aus der ansteigenden K^+ -Konzentration im Resorbat zu schließen. Trotzdem wird eine Veränderung der Substrat/ Na^+ -Quotienten nicht beobachtet. Eine weitere Komplikation erfahren die Beziehungen zwischen Na^+ - und Substrat-Transport durch Befunde von SCHULTZ UND ZALUSKY²⁷ sowie von BARRY, SMYTH UND WRIGHT³³, wonach nicht nur Na^+ den Zucker-Transport, sondern umgekehrt Zucker den Na^+ -Transport fördert. Auf der Suche nach einer Hypothese, die mit allen Befunden vereinbar ist, scheint es nicht uninteressant auf gewisse Parallelen zwischen Erregungsprozessen und Transportvorgängen hinzuweisen: Sowohl für die Erregung von Nerv und Muskel als auch für den Substrat-Transport sind extrazelluläre Na^+ -Ionen essentiell; mit steigender extrazellulärer Na^+ -Konzentration steigen sowohl das Aktionspotential als auch der Substrat-Transport an; eine hohe extrazelluläre K^+ -Konzentration führt zur Unerregbarkeit und hemmt den enteralen Substrat-Transport^{34,35}.

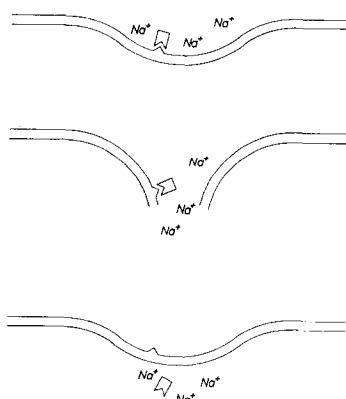


Abb. 4. Schematische Skizze der Vorstellung einer substrattransportierenden Membran mit der Fähigkeit zu Permeabilitätsänderungen. Einzelheiten siehe Text.

Die Erscheinungen an erregbaren Membranen werden auf plötzliche, reversible Permeabilitätsänderungen zurückgeführt. Verallgemeinernde Hypothesen, welche biologischen Membranen grundsätzlich die Fähigkeit zur Struktur- und Permeabilitätsänderung durch die Annahme kontraktiler Proteine bzw. variabler Lipoidmicellen zuschreiben, wurden von GOLDACRE³⁶ und BURGEN³⁷ bzw. von KAVANAU³⁸ vertreten. In Fortführung solcher Parallelen und Hypothesen ließe sich eine Modellvorstellung der Beziehungen zwischen Substrat-Transport und Na⁺-Ionen entwickeln, wenn man folgende Annahmen macht (Abb. 4 ist eine schematische Skizze dieser Vorstellung):

1. Die Außenseite der Zellmembran besitzt spezifische Haftstellen für das Substrat.

2. Die Zellmembran ist nicht starr, sondern zu lokalisierten, temporären und reversiblen Permeabilitätsänderungen mit der Verlagerung von Membranmaterial fähig. Während dieses Prozesses gelangt die Haftstelle mit dem Substrat ins Zellinnere.

3. Mit diesem 'Elementarprozeß' des Transportes ist der Einstrom von Na⁺-Ionen verbunden. Die Menge des einströmenden Na⁺ ist unter gleichbleibenden Versuchsbedingungen konstant, aber abhängig von der extrazellulären Na⁺-Konzentration.

4. Die Wahrscheinlichkeit des Eintretens des Elementarprozesses ist einerseits abhängig von der Besetzung der Haftstelle mit Substrat, andererseits auch eine Na⁺-abhängige Funktion, wobei die extra- und/oder intrazelluläre Na⁺-Konzentration oder auch der Konzentrationsgradient des Na⁺ die bestimmende Größe sein könnte.

Diese Vorstellung würde die Konstanz des Verhältnisses der resorbierten Mengen Substrat/Na⁺ unter unveränderten Versuchsbedingungen durch die Konstanz der im Elementarprozeß geförderten Menge erklären. Sie erhielt die Annahme gemeinsamer Orte für den Eintritt von Na⁺ und Substrat in die Zelle aufrecht, vermiede dabei jedoch die Schwierigkeit, an dem von CRANE³⁹ postulierten Carrier-Na⁺-Zucker-Komplex mit wechselnden Stöchiometrien rechnen zu müssen. Sie ermöglichte eine exchange-diffusion bzw. einen countertransport durch die Annahme der Verdrängung des Substratmoleküls von der ins Zellinnere verlagerten Haftstelle durch ein gleiches Molekül bzw. ein ähnliches Molekül. Eine intrazelluläre Akkumulation (uphill-transport) ließe sich durch die bereits früher von uns erwogene Hypothese erklären¹, daß der Na⁺-Transport durch die Zelle von einem Wasser-Transport begleitet ist, der zu einer ständigen Verdünnung der Substratkonzentration an der Innenseite der lumenseitigen Membran führt. WHITE, ROLF UND TOSTESON⁴⁰ haben an der Niere den parallelen Verlauf der Markierung des Gewebes mit Na⁺ und THO bewiesen. Die Vorstellung würde weiterhin die Abhängigkeit der maximal transportierbaren Substrat- und Na⁺-Menge als Folge der Frequenz der Elementarprozesse deuten. Die Erniedrigung der K_m -Werte der intrazellulären Substrat-Akkumulation bei Erhöhung der extrazellulären Na⁺-Konzentration, die von CRANE und Mitarbeitern^{39,41} beschrieben wurde, ist etwas schwieriger vorzustellen. Eine Deutung für dieses Phänomen ließe sich aus der Überlegung ableiten, daß eine Erhöhung der Frequenz der Elementarprozesse durch eine erhöhte Na⁺-Konzentration reaktionskinetisch zu einer Erhöhung der Carrier-Konzentration führen muß.

DANK

Für stetige Förderung und anregende Diskussion danke ich Herrn Prof. Dr.

G. VOGEL. Die Geschicklichkeit und der Eifer von Frl. C. GERBER, Frl. D. NITZ und Frl. K. PRESCHER bei Durchführung der Versuche werden dankbar anerkannt.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Isolierte Dünndärme von Ratte und Meerschweinchen (Apparatur nach FISHER UND PARSONS) wurden mit Lösungen steigenden Na^+ -Gehalts perfundiert. Um zwischen der Wirkung von Na^+ -Konzentration und Na^+ -Transport auf die Beziehungen zwischen der Resorption von Glucose, K^+ und Ca^{2+} einerseits und der Resorption von Na^+ andererseits zu differenzieren, wurden den Lösungen außerdem steigende Mengen des Herzglykosids Convallatoxin zugesetzt.

2. Die enteralen Transportprozesse der Ratte sind bis zu einer Konzentration von 0.4 mM Convallatoxin glykosidresistent.

3. Beim Meerschweinchen bewirkt Convallatoxin in steigenden Konzentrationen eine zunehmende, aber stets proportional gleiche Hemmung aller Resorptionswerte. Das Verhältnis der resorbierten Mengen Wasser: Na^+ :Glucose: Ca^{2+} bleibt auch bei einer glykosidbedingten Verminderung des Na^+ -Transportes konstant. Durch Erniedrigung der Na^+ -Konzentration der Perfusionslösung wird ein neues Verhältnis eingestellt, welches zu ungünstigen des Na^+ verschoben ist.

4. Die passive Diffusion von Harnstoff wird nach Versuchen am everted sac des Meerschweinchens durch Convallatoxin nicht beeinflußt.

5. Aus den Versuchen wird geschlossen, daß cardiotone Steroide enterale Transportprozesse über eine Hemmung des Na^+ -Transport-Mechanismus vermindern, das Verhältnis der resorbierten Menge Glucose/ Na^+ bzw. $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ aber eine glykosidunabhängige Funktion der lumenseitigen Na^+ -Konzentration ist. Zur einheitlichen Deutung dieser Befunde sowie von Ergebnissen anderer Autoren wird eine Hypothese diskutiert, die in Analogie zu erregbaren Membranen auch substrattransportierenden Membranen cyclische Permeabilitätsänderungen zuschreibt.

LITERATUR

- 1 F. LAUTERBACH, *Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol.*, 250 (1965) 232.
- 2 F. LAUTERBACH, *Biochim. Biophys. Acta*, 135 (1967) 256.
- 3 T. Z. CSÁKY, H. G. HARTZOG III UND G. W. FERNALD, *Am. J. Physiol.*, 200 (1961) 459.
- 4 H.-J. SCHATZMANN, *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, II (1953) 346.
- 5 T. Z. CSÁKY, *Biochim. Biophys. Acta*, 74 (1963) 160.
- 6 T. Z. CSÁKY UND U. V. LASSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 82 (1964) 215.
- 7 M. W. SMITH, *J. Physiol. London*, 175 (1964) 38.
- 8 T. M. PARKINSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 86 (1964) 425.
- 9 G. VOGEL, W. KRÖGER UND U. TERVOORLEN, *Arch. Ges. Physiol.*, 277 (1963) 502.
- 10 G. VOGEL UND U. TERVOORLEN, *Arch. Ges. Physiol.*, 280 (1964) 46.
- 11 R. K. CRANE, D. MILLER UND I. BIHLER, IN A. KLEINZELLER AND A. KOTYK, *Symposium on Membrane Transport and Metabolism*, Academic Press, London, 1961, p. 439.
- 12 I. H. ROSENBERG, A. L. COLEMAN UND L. E. ROSENBERG, *Biochim. Biophys. Acta*, 102 (1965) 161.
- 13 A. KLEINZELLER UND A. KOTYK, *Biochim. Biophys. Acta*, 54 (1961) 367.
- 14 M. FOX, S. THIER, L. ROSENBERG UND S. SEGAL, *Biochim. Biophys. Acta*, 79 (1964) 167.
- 15 O. GONDA UND J. H. QUASTEL, *Biochem. J.*, 84 (1962) 394.
- 16 S. K. SHARMA, R. M. JOHNSTONE UND J. H. QUASTEL, *Biochem. J.*, 92 (1964) 564.
- 17 J. E. PARRISH UND D. M. KIPNIS, *J. Clin. Invest.*, 43 (1964) 1994.
- 18 A. A. YUNIS, G. ARIMURA UND D. M. KIPNIS, *J. Lab. Clin. Med.*, 60 (1962) 1028.
- 19 J. BITTNER UND E. HEINZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 74 (1963) 392.
- 20 J. WOLFF, *Biochim. Biophys. Acta*, 38 (1960) 316.

- 21 R. B. FISHER UND D. S. PARSONS, *J. Physiol. London*, 110 (1949) 36.
22 T. H. WILSON UND G. WISEMAN, *J. Physiol. London*, 123 (1954) 116.
23 E. CONWAY UND E. O'MALLEY, *Biochem. J.*, 36 (1942) 655.
24 H. GROBECKER, U. PIECHOWSKI UND K. GREEFF, *Med. Exptl.*, 9 (1963) 273.
25 J. WOLFF UND N. S. HALMI, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 847.
26 T. Z. CSÁKY UND Y. HARA, *Am. J. Physiol.*, 209 (1965) 467.
27 S. G. SCHULTZ UND R. ZALUSKY, *J. Gen. Physiol.*, 47 (1964) 1043.
28 T. Z. CSÁKY, in W. WILBRANDT UND P. LINDGREN, *New Aspects of Cardiac Glycosides*, Proc. First Intern. Pharmacological Meeting, Stockholm, 1961, Vol. 3, Pergamon, Oxford, 1963, p. 225.
29 W. RUMMEL UND H. F. STUPP, *Experientia*, 18 (1962) 303.
30 W. RUMMEL UND H. F. STUPP, *Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol.*, 248 (1964) 552.
31 G. VOGEL, U. TERVOOREN UND I. STOECKERT, *Arch. Ges. Physiol.*, 288 (1966) 359.
32 G. VOGEL UND W. KRÖGER, *Arch. Ges. Physiol.*, 288 (1966) 342.
33 R. J. C. BARRY, D. H. SMYTH UND E. M. WRIGHT, *J. Physiol. London*, 181 (1965) 410.
34 E. RIKLIS UND J. H. QUASTEL, *Can. J. Biochem.*, 36 (1958) 347.
35 W. RUMMEL UND H. F. STUPP, *Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol.*, 240 (1960) 79.
36 R. J. GOLDACRE, *Intern. Rev. Cytol.*, 1 (1952) 135.
37 A. S. V. BURGEN, *Can. J. Biochem.*, 35 (1957) 569.
38 J. L. KAVANAU, *Nature*, 198 (1963) 525.
39 R. K. CRANE, G. FORSTNER UND A. EICHHOLZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 109 (1965) 467.
40 H. L. WHITE, D. ROLF UND D. C. TOSTESON, *Am. J. Physiol.*, 200 (1961) 591.
41 I. LYON UND R. K. CRANE, *Biochim. Biophys. Acta*, 112 (1966) 278.

Biochim. Biophys. Acta, 135 (1967) 273-285