

Summary

Electrical potential measurements of membrane resting and action potentials were made by means of electrolyte-filled glass micro-electrodes on single fibres of the musculus gracilis of the cat using a perfused hind-limb preparation *in situ*. The release of potassium from muscle and the tension developed by the gastrocnemius muscle were simultaneously recorded. The normal resting potential in our series was 91.7 mV (s.d. \pm 6.7 mV). Partial replacement of the chloride by sulfate in the perfusion fluid led to (a) potassium release from the perfused hind-limb, (b) reversible contracture of the gastrocnemius muscle, (c) depression of the membrane resting potential which was proportional to the degree of replacement of chloride by sulfate in the perfusion fluid and (d) to the occurrence of volleys of spontaneous fibrillation potentials some of which had the shape of damped oscillations. These findings are similar to those observed after treatment with veratrine and are interpreted to be due to (1) increase in sodium permeability and (2) disturbance of the Donnan equilibrium for chloride ions.

Über die Wirkung blutzuckersenkender Sulfonylharnstoffe auf das isolierte Rattenzwerchfell

Der Wirkungsmechanismus der blutzuckersenkenden Sulfonylharnstoffe ist nicht geklärt. Besonders über die Wirkung dieser Substanzen auf den Kohlehydratstoffwechsel des Muskels bestehen relativ wenige Untersuchungen. Am isolierten Zwerchfell verursachen Sulfonylharnstoffe je nach den Autoren Verminderung¹ oder Vermehrung² der Glukoseaufnahme aus dem Inkuba-

tionsmedium; die Glykogenbildung ändert sich nicht³. Über Einfluss der Sulfonylharnstoffe auf O₂-Verbrauch und CO₂-Bildung durch das isolierte Zwerchfell wurde unseres Wissens bisher nicht berichtet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Tolbutamid⁴ und Carbutamid⁴ auf das isolierte Rattenzwerchfell untersucht. Durch Vergleich dieser Substanzen mit Insulin sollten weitere Anhaltspunkte über den Wirkungsmechanismus der Sulfonylharnstoffe erhalten werden.

Methodik. Männliche Albinoratten von 60 bis 80 g wurden nach 24stündigem Fasten dekapitiert. Das exzidierte Zwerchfell wurde zweimal in eisgekühltem O₂-gesättigtem Phosphatpuffer (siehe unten) gewaschen, sagittal halbiert, zwischen Filtrierpapier getrocknet und gewogen. Zeitdauer zwischen Dekapitation und Waschung 1 min 10 s \pm 10 s, Aufenthalt in den Waschflüssigkeiten durchschnittlich 3 min, Zeit für Trocknen und Wägen 10 s \pm 3 s. Die Inkubation erfolgte in O₂-Atmosphäre bei 37,5°C in Phosphatpuffer⁵ (ohne Kalzium, Glukosekonzentration 220 mg%), Schüttelfrequenz 150/min. In Doppelansätzen (Kontrolle und Versuch) wurden Zwerchfelhälfen derselben Tiere verglichen. Tolbutamid und Carbutamid wurden in 0,05 ml 1*N* KOH, Insulin⁶ in 0,05 ml 0,01*N* HCl gelöst und dem Inkubationsmedium zugesetzt. Korrektur des pH mittels HCl, bzw. NaOH.

Die Bestimmung des *Glukoseverbrauches* erfolgte aus der Glukosedifferenz⁷ der Inkubationsflüssigkeit vor und nach 30minütiger Inkubation einer Zwerchfelhälfte in

¹ D. W. CLARKE, M. DAVIDSON, E. SCHÖNBAUM und H. SENMAN, Canad. med. Ass. J. 74, 966 (1956).
² N. CANAL, S. GARATTINI und L. TESSARI, Clin. terap. 11, 472 (1956).

³ D. W. CLARKE, M. DAVIDSON, E. SCHÖNBAUM und H. SENMAN, Canad. med. Ass. J. 74, 966 (1956). – J. B. FIELD und M. L. WOODSON, Proc. Soc. exper. Biol. Med. N. Y. 93, 534 (1956). – C. v. HOLT, Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 62, 520 (1956).
⁴ Tolbutamid = 1-*p*-Tolylsulfonyl-3, *n*-butylharnstoff;
Carbutamid = 1-*p*-Sulfanilyl-3, *n*-butylharnstoff.
⁵ H. A. KREBS und K. HENSELEIT, Hoppe-Seylers Z. 210, 32 (1932).
⁶ Kristallisiertes Insulin 'Novo'.
⁷ H. C. HAGEDORN und B. N. JENSEN, Biochem. Z. 135, 46 (1923); 137, 92 (1923).

Tabelle I

Vergleich von Glukoseverbrauch, bzw. Glykogengehalt von Zwerchfelhälfen gleicher Tiere mit und ohne Zusatz von Insulin, Tolbutamid oder Carbutamid.

Zwerchfelhälfen wurden parallel mit und ohne Zusatz inkubiert. Die Absolutwerte der Ansätze mit Präparat wurden auf Absolutwerte der Ansätze ohne Präparat bezogen und die Änderung in Prozent angegeben. (Durchschnittlicher absoluter Glukoseverbrauch von Kontroll-Zwerchfelhälfen: 5,63 mg/g Feuchtgewicht und Stunde. Glykogengehalt der Kontroll-Zwerchfelhälfen durchschnittlich 267 mg/100 g Feuchtgewicht.)

Zusatz zum Inkubationsmedium	Veränderung des Glukoseverbrauches in %			Veränderung der Glykogenkonzentration in %		
	N	Mittelwert und <i>m</i> *	<i>p</i> **	N	Mittelwert und <i>m</i> *	<i>p</i> **
Schwankungsbreite der Methode (<i>K</i>)	10	– 6,2 \pm 2,5		9	– 0,3 \pm 2,4	
Insulin 1 E/ml	17	+ 86,9 \pm 17,7	< 0,001	17	+ 22,1 \pm 5,6	< 0,02; > 0,01
0,1 E/ml	12	+ 49,7 \pm 9,9	< 0,001			
Tolbutamid 2 · 10 ^{–3} mol/l . .	8	+ 66,3 \pm 18,8	< 0,001	12	– 22,1 \pm 4,6	< 0,001
2 · 10 ^{–4} mol/l . .	11	+ 31,5 \pm 11,4	< 0,01; > 0,001			
2 · 10 ^{–5} mol/l . .	7	+ 20,5 \pm 12,6	< 0,03; > 0,02			
Carbutamid 2 · 10 ^{–3} mol/l . .	9	+ 46,2 \pm 12,6	< 0,001			
2 · 10 ^{–4} mol/l . .	16	+ 27,9 \pm 7,9	< 0,01; > 0,001			

* Mittlerer Fehler $m = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{N(N-1)}}$.

** Bezogen auf Kontrollserie für Schwankungsbreite (*K*).

Tabelle II

Vergleich von O₂-Verbrauch und C¹⁴O₂-Abgabe aus vollständig C¹⁴-markierter Glukose durch Zwerchfellhälften gleicher Tiere mit und ohne Zusatz von Insulin oder Tolbutamid.
Zwerchfellhälften wurden parallel mit und ohne Zusatz inkubiert, die Ausätze mit Präparaten auf solche ohne Präparat bezogen und die Änderung in Prozent ausgedrückt. (Absolute Durchschnittswerte: -QO₂ = 8,97; relative spezifische Aktivität 1965 Impulse/min/mg CO₂-C; relative totale Aktivität = 15,9 Impulse/min/mg Trockengewicht und Stunde; Oxydation von vollständig markierter C¹⁴-Glukose zu C¹⁴O₂: etwa 10% der aus dem Inkubationsmedium verbrauchten Glukose.)

Zusatz zum Inkubationsmedium	N	Veränderung des O ₂ -Verbrauches in %		Veränderung der C ¹⁴ O ₂ -Abgabe in %			
				totale Aktivität		spezifische Aktivität	
		Mittelwert u. m*	p**	Mittelwert u. m*	p**	Mittelwert u. m*	p**
Schwankungsbreite der Methode (K)	6	- 3,6 ± 2,1		+ 0,3 ± 9,6		+ 4,3 ± 4,7	
Insulin 1 E/ml	10	+ 7,1 ± 5,7	< 0,2; > 0,1	+ 9,2 ± 6,9	> 0,5	+ 3,8 ± 12,8	> 0,8
Tolbutamid 2 · 10 ⁻³ mol/l	10	± 22,9 ± 7,5	< 0,05; > 0,02	+ 175,8 ± 29,5	< 0,001	+ 108,0 ± 18,7	< 0,01; > 0,001

* Mittlerer Fehler $m = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{N(N-1)}}$

** Bezogen auf Kontrollserie für Schwankungsbreite (K).

0,5 ml Puffer. Berechnung in mg Glukose/h/g Feuchtgewicht.

Glykogen. Je 2 Zwerchfellhälften wurden in je 2 ml Puffer während 30 min inkubiert und zur Mikrobestimmung von Glykogen⁸ rasch in 30% KOH von 100°C verbracht. Berechnung in mg/100 g Feuchtgewicht.

O₂-Aufnahme und C¹⁴O₂-Bildung. Je 2 Zwerchfellhälften wurden in Warburggefäßen in je 2 ml Puffer mit 2 µC vollständig markierter C¹⁴-Glukose⁹ während 60 min inkubiert. Dann erfolgte Einkippen von 0,3 ml 5*n* H₂SO₄ und Absorption des C¹⁴O₂ in 0,2 ml 30% KOH (im Zentralgefäß)¹⁰, anschliessend in einer evakuierten Mikroabsorptionsapparatur Wiederfreisetzung des absorbierten C¹⁴O₂ mittels H₂SO₄ nach Zugabe von inaktivem NaHCO₃ (5 ml 596 mg%ige Lösung) sowie erneute Absorption des CO₂ in Ba(OH)₂. Überschüssiges Ba(OH)₂ wurde zurücktitriert¹¹ und das BaCO₃ als Plättchen unendlicher Schichtdicke in einem Tracerlab-precipitation-Apparat abgenutscht. Die Aktivitätsmessung der mit Methanol gewaschenen und mit Infrarot getrockneten Plättchen erfolgte in einem Tracerlab-windowless-flow-counter bis zu einem Total von 10000 Impulsen. Nach Korrektur für den Nulleffekt wurde die relative totale Aktivität auf 1 mg Gewebstrockengewicht bezogen und die relative spezifische Aktivität als Impulse/mg C des Atmungs-CO₂ ausgedrückt. -QO₂ = µl O₂/mg Trockengewicht und Stunde. Trocknung der Zwerchfelle bei 100°C während 15 h.

Resultate und Diskussion

1. Der Glukosegehalt im Inkubationsmedium nahm nach Zusatz von 2 · 10⁻⁴ und 2 · 10⁻³ mol/l Tolbutamid und Carbutamid 28–66% stärker ab als in Kontrollansätzen. Der Unterschied ist signifikant (*p* < 0,01). Sulfonylharnstoffe bewirken somit gleich wie Insulin¹² eine Vermehrung des Glukoseverbrauches. Damit wird ein früherer Befund² bestätigt.

2. Der Glykogengehalt des Zwerchfells war nach Inkubation mit 2 · 10⁻³ mol/l Tolbutamid niedriger (um 22%) als ohne Tolbutamidzusatz (*p* < 0,01). Insulin hingegen bewirkte die zu erwartende¹³ Zunahme des Muskelglykogens.

3. Zusatz von 2 · 10⁻³ mol/l Tolbutamid führte sowohl zu Erhöhung des O₂-Verbrauches (+ 22%, *p* < 0,02) als auch der C¹⁴O₂-Abgabe aus vollständig markierter C¹⁴-Glukose (relative spezifische Aktivität + 108%; relative totale Aktivität + 176%, *p* < 0,01). Die CO₂-Abgabe war also mehr gesteigert als der O₂-Verbrauch. Dieser Effekt steht im Gegensatz zu dem des Insulins, das wie in früheren *in vitro*-Untersuchungen¹³ nicht zu Steigerung von O₂-Verbrauch und C¹⁴O₂-Abgabe aus C¹⁴-Glukose führte.

Aus diesen Befunden darf geschlossen werden, dass der Wirkungsmechanismus der Sulfonylharnstoffe auf den Kohlehydratstoffwechsel des isolierten Rattenzwerchfells in Steigerung der Glukose-Oxydation besteht. Die Wirkung von endogenem, möglicherweise am Zwerchfell haftendem Insulin wird wahrscheinlich nicht gesteigert, da die beobachteten Wirkungsqualitäten von Insulin und Sulfonylharnstoffen verschieden sind. Auch mit Insulin/Sulfonylharnstoff-Kombinationen konnte keine Zunahme der Insulin-Wirkung (gemessen an der Glykogen-Bildung) am Rattenzwerchfell erreicht werden¹⁴. Unsere Befunde sagen nichts darüber aus, ob Gegenwart von geringen am Muskel haftenden Insulinmengen eine Bedingung für die Steigerung der Glukose-Oxydation durch Sulfonylharnstoffe ist.

Vermehrung der Glukose-Oxydation am isolierten Rattenzwerchfell beruht also wahrscheinlich auf einem Mechanismus, der von den zur Zeit postulierten Wirkungsmechanismen der Sulfonylharnstoffe (Hemmung von Glukoseabgabe durch die Leber und von Insulinase, Steigerung von Insulin-Empfindlichkeit und -Sekretion) verschieden ist.

⁸ O. WALAAS und E. WALAAS, J. biol. Chem. 187, 769 (1950).
⁹ Radiochemical Centre, Amersham, England.
¹⁰ S. S. CHERNICK, E. J. MASARO und I. L. CHAIKOFF, Proc. Soc. exper. Biol. Med. N. Y. 73, 348 (1950).
¹¹ R. C. ANDERSON, Y. DELABARRE und A. A. BOTHNER-BY, Analyt. Chem. 24, 1299 (1952).
¹² W. C. STADIE, Physiol. Rev. 34, 52 (1954).

¹³ W. C. STADIE, Physiol. Rev. 34, 52 (1954). – A. BELOFF-CHAIN, R. CATANZARO, E. B. CHAIN, I. MASI, F. POCCHIARI und C. ROSSI, Proc. roy. Soc. [B] 143, 481 (1955).
¹⁴ J. B. FIELD und M. L. WOODSON, Proc. Soc. exper. Biol. Med. N. Y. 93, 534 (1956). – W. C. STADIE, Physiol. Rev. 34, 52 (1954). – A. BELOFF-CHAIN, R. CATANZARO, E. B. CHAIN, I. MASI, F. POCCHIARI und C. ROSSI, Proc. roy. Soc. [B] 143, 481 (1955).

Am eviscerierten (und damit pankreatektomierten) Tier¹⁵ bewirken Sulfonharnstoffe im Gegensatz zu unseren Versuchen keine Steigerung der Glukose-Oxydation. Möglicherweise fehlen hier Faktoren, welche für die Sulfonharnstoffwirkung auf den Muskel nötig und am Zwerchfell von Normaltieren vorhanden sind. Untersuchungen, ob die Gegenwart von Insulin oder andere Faktoren Voraussetzung für die gefundene Wirkung der Sulfonharnstoffe am isolierten Rattenzwerchfell ist, sind im Gange.

A. PLETSCHER und K. F. GEY

Medizinische Forschungsabteilung der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel, 18. Juni 1957.

Summary

The action of blood sugar depressing sulfonyleureas on glucose and oxygen uptake, as well as on glycogen content and formation of $C^{14}O_2$ from uniformly labelled C^{14} -glucose was investigated in rat hemidiaphragms incubated in phosphate buffer. The following results were obtained: (1) Tolbutamide and Carbutamide increased the glucose uptake. (2) Tolbutamide decreased the glycogen-content. (3) Oxygen uptake as well as formation of $C^{14}O_2$ were increased by Tolbutamide. (4) The action of Tolbutamide and insuline was equal with respect to glucose uptake but different as regarding the glycogen content, oxygen uptake and CO_2 -formation.

It is concluded that sulfonyleureas increase glucose oxidation in the rat hemidiaphragm probably without increasing insulin sensitivity. To our knowledge this mechanism of action has hitherto not been described.

¹⁵ A. WICK, B. BRITTON und R. GRABOWSKI, *Metabolism* 5, 739 (1956).

Photolyse ultraviolette et photoréactivation des bactéries – aspects de dépolymérisation et repolymérisation des acides nucléiques bactériens

Causes physicochimiques du défaut de photoréactivation différée

L'irradiation ultraviolette réalisée notamment par des longueurs d'onde de 2537 Å correspondant à la bande d'absorption des acides nucléiques, provoque l'inhibition de la croissance des bactéries. Cette inhibition est susceptible d'être annulée par photoréactivation due à l'irradiation des mêmes bacilles par des rayons du spectre visible à longueur d'onde comprise entre 3600 et 4900 Å¹.

Le processus d'inhibition de la croissance bactérienne sous l'action des rayons UV. s'accompagne d'une diminution de la teneur² en acide désoxyribonucléique par mg de bactérie, tandis qu'il y a augmentation de la teneur en fraction acidosoluble, c'est-à-dire des constituants de nature purique, pyrimidique, du P organique

acidosoluble, de ribose et désoxyribose³. Cette réduction de la teneur en acide nucléique a été interprétée comme correspondant à l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques dans les microorganismes irradiés². L'accumulation des constituants de poids moléculaire peu élevé dans la substance des bactéries irradiées a, pour sa part, été interprétée comme l'expression d'un arrêt d'intégration des précurseurs dans la structure de la macromolécule de l'acide désoxyribonucléique³.

La photoréactivation par action sur les bactéries soumises à l'effet des radiations UV., de la lumière visible va de pair avec le retour à la teneur initiale en acide désoxyribonucléique, ce qui a été interprété comme un retour à la synthèse de l'acide désoxyribonucléique². La photorestauration après irradiation par UV. des microorganismes peut être complète si elle est tentée immédiatement après les UV. Cependant les microorganismes perdent complètement l'aptitude à la photoréactivation lorsqu'ils sont conservés à l'abri de la lumière pendant une durée de 2 à 3 h⁴. Ce phénomène n'a pas trouvé d'explication et nous avons abordé son étude.

Les phénomènes étudiés semble-t-il peuvent être expliqués d'une façon différente. On peut en effet supposer que la dissipation de l'énergie radiante UV. acquise peut conduire à une dépolymérisation des acides nucléiques⁵ et à une accumulation des fragments issus de cette structure. La photoréactivation résultant de l'action des rayons à longueur d'onde supérieure et à énergie par quantum moindre, pourrait causer la repolymérisation de ces fragments et par conséquent le retour à la teneur initiale en acide désoxyribonucléique bactérien. En effet, dans ces molécules complexes, les constituants des liaisons chimiques rompues par suite de l'irradiation peuvent, du fait de leur poids moléculaire encore considérable, être maintenus suffisamment rapprochés pour rendre possible des recombinaisons⁶ sous l'influence d'un apport énergétique modéré venant par exemple de la photoréactivation. Nous avons été amenés à supposer que le défaut de la photoréactivation, après un certain temps de séjour des bactéries irradiées dans le milieu de culture ou milieu tampon à l'abri de la lumière, pourrait être imputable au départ des fragments de l'acide nucléique de la substance bactérienne, et à leur diffusion vers la phase aqueuse du milieu ambiant. En ce cas, le retour au taux initial de l'acide désoxyribonucléique n'aurait plus été possible.

La dépolymérisation de l'acide désoxyribonucléique de la substance bactérienne doit conduire à une accumulation des fragments à poids moléculaire peu élevé, porteurs des groupements fonctionnels. Ainsi la densité des groupements fonctionnels et par conséquent de la charge par unité de surface de la substance bactérienne doit augmenter aussi longtemps que les fragments provenant de la dépolymérisation des acides désoxyribonucléiques bactériens sont présents dans la substance du microorganisme irradié par les UV. Si, après un certain temps de séjour des bactéries irradiées par les UV. dans le milieu de culture ou milieu tampon à l'abri de la lumière, une diffusion de ces fragments, comme nous l'avons supposé, a lieu – la densité de charge par unité de surface devrait nécessairement se trouver réduite. On devrait en ce cas pouvoir retrouver dans le

¹ A. KELNER, *Proc. nat. Acad. Sci.* 35, 73 (1949). – A. KELNER, W. D. BELLAMY, G. E. STAPLETON et M. R. ZELLE, *Bact.* 19, 22 (1955). – A. KELNER, *J. Bacteriol.* 58, 511 (1949); *J. gen. Physiol.* 34, 835 (1951).

² A. KELNER, *J. Bact.* 65, 252 (1953).

³ D. KNAZIR et M. ERRERA, *Biochim. biophys. Acta* 14, 62 (1954).

⁴ A. KELNER, *Bull. N. Y. Acad. Med.* 26, 189 (1950).

⁵ A. HOLLAENDER, J. P. GREENSTEIN et W. V. JENRETTE, *J. nat. Cancer Inst.* 2, 23 (1941).

⁶ Mc. D. LAREN, *Advanc. Enzymol.* 9, 76 (1949).