

### Struktur-Wirkungsbeziehungen bei einigen Cardenoliden und Bufadienoliden nach verschiedenartigen Herzschädigungen

Untersuchungen über Struktur-Wirkungsbeziehungen bei Herzglykosiden und Geninen wurden von DE GRAFF, CHEN, ROTHLIN u. a.<sup>1–5</sup> vorwiegend unter dem Gesichtspunkt einer Korrelation zwischen Wirkungsstärke und chemischer Struktur durchgeführt. Die strukturellen Veränderungen am Steroidkern, am Laktonring oder an der Zuckerkette, die zu einem Verlust der spezifischen Herz-wirkung führen, sind heute weitgehend bekannt. KAHN und ACHESON<sup>6</sup> benutzten den Einfluss der Herzglykoside auf den Kationenaustausch menschlicher Erythrocyten und WOLLENBERGER<sup>7</sup> den Einfluss auf den Stoffwechsel als Modell, um eine spezifischere Aussage über struktur-abhängige Unterschiede verschiedener herzwirksamer Stoffe machen zu können. Trotz der genannten Versuche hat bis heute – wie ROTHLIN<sup>8</sup> zusammenfassend bemerkt – die chemische Differenzierung der Glykoside vom experimentellen Gesichtspunkt aus noch wenig Beachtung gefunden; das alte Problem, ob man am Krankenbett immer mit einem Glykosid auskommt oder je nach Pathogenese der Erkrankung verschiedene Glykoside benutzen muss, ist noch ungeklärt.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden am isolierten, spontan schlagenden Meerschweinchen-Vorhofpräparat akute Herzschädigungen ausgelöst, die biochemisch durch die Art ihrer Stoffwechselhemmwirkung, durch ihren Einfluss auf die energiereichen Phosphate (FÖRSTER und WAHLER<sup>9</sup>) oder auf den Kationengehalt des Herzmuskel (FÖRSTER)<sup>10</sup> und durch Untersuchungen von LÜLLMANN<sup>11</sup> auch elektrophysiologisch definiert sind. Diese experimentellen «Insuffizienzformen» des Herzens sollen Modelle für unterschiedliche klinische Herzerkrank-

kungen darstellen, deren biochemische Pathogenese heute noch weitgehend unbekannt ist. Um Strukturbeziehungen zwischen der Anzahl und Stellung der OH-Gruppen am Steroidkern und der Bedeutung des 5- bzw. 6-C-Laktonringes kennenzulernen, untersuchten wir drei Paare einander entsprechender Cardenolide und Bufadienolide<sup>12</sup>. In Vorversuchen wurden deren äquieffektive Konzentrationen am ungeschädigten Vorhofpräparat bestimmt. Die Herzen wurden dann mit 2,4-Dinitrophenol (DNP), Chininsulfat oder Fluoresigsäure (FE) geschädigt. DNP

<sup>1</sup> A. C. DEGRAFF, G. H. PAFF und R. A. LEHMANN, J. Pharmacol. exp. Therap. 72, 211 (1941).

<sup>2</sup> K. K. CHEN, F. G. HENDERSON und R. C. ANDERSON, J. Pharmacol. exp. Therap. 103, 420 (1951).

<sup>3</sup> K. K. CHEN und F. G. HENDERSON, J. Pharmacol. exp. Therap. 111, 365 (1954).

<sup>4</sup> E. ROTHLIN, Proc. of the Rudolf Virchow Med. Soc. in the City of New York 6, 74 (1947).

<sup>5</sup> E. RÖTHLIN, Triangel 1, 1 (1952).

<sup>6</sup> J. B. KAHN, jr., und G. A. ACHESON, J. Pharmacol. exp. Therap. 115, 305 (1955).

<sup>7</sup> A. WOLLENBERGER, *Herzglykoside und oxydativer Myokardstoffwechsel*, Bad Oeynhausen Gespräche III am 31. 10. und 1. 11. 1958 über Herzinsuffizienz und Digitaliswirkungen, p. 121.

<sup>8</sup> E. RÖTHLIN und R. BIRCHER, Ergebn. inn. Med. Kinderheilk., Neue Folge 5, 457 (1954).

<sup>9</sup> W. FÖRSTER und B. E. WAHLER, Arch. exp. Path. Pharmak. 240, 6 (1960).

<sup>10</sup> W. FÖRSTER, in Vorbereitung.

<sup>11</sup> H. LÜLLMANN, Arch. exp. Path. Pharmak. 237, 447 (1959).

<sup>12</sup> Für die Überlassung von Versuchsmustern danke ich herzlich Herrn Prof. K. MEYER, Basel (Bufalin und Desacetylbufotalin), Herrn Priv.-Doz. Dr. TAMM, Basel (12-β-Oxybufalin), Herrn Dr. DÜBLER, Basel, Herrn Dr. BAUMGARTEN, Wernigerode (Digoxigenin und Gitoxigenin) und Herrn Prof. THREN, Dresden (Digoxigenin).

	3,14-Dioxy-Verbindung		3,14,12-Trioxy-Verbindung		3,14,16-Trioxy-Verbindung	
	Digitoxigenin $3 \times 10^{-7}$	Bufalin $2 \times 10^{-8}$	Digoxigenin $2 \times 10^{-6}$	12-β-Oxybufalin $5 \times 10^{-7}$	Gitoxigenin $3 \times 10^{-6}$	Desacetylbufotalin $1 \times 10^{-7}$
	g/ml		g/ml		g/ml	
<i>Ohne Schädigung</i> Zunahme der Herzleistung	61% (9)	54% (12)	50% (11)	55% (11)	52% (11)	45% (12)
	$\leftarrow$	$\rightarrow$	$P < 0,2$			
<i>Schädigung mit 2,4-Dinitrophenol</i> Abnahme der Herzleistung	70% (56%) (11)	72% (88%) (6)	66% (60%) (9)	74% (70%) (8)	74% (79%) (9)	73% (52%) (11)
Zunahme der Herzleistung	$\leftarrow$	$\rightarrow$	$P > 0,2$			
<i>Schädigung mit fluoreszsäurem Na</i> Abnahme der Herzleistung	31% (16%) (11)	43% (11%) (12)	35% (7%) (12)	45% (0%) (12)	22% (27%) (12)	37% (17%) (12)
Zunahme der Herzleistung	$\leftarrow$	$P > 0,05$	$\leftarrow$	$P > 0,05$	$\leftarrow$	$P > 0,05$
<i>Schädigung mit Chininsulfat</i> Abnahme der Herzleistung	78% (7%) (10)	81% (0%) (7)	84% (11%) (22)	80% (32%) (16)	79% (1%) (12)	80% (8%) (14)
Zunahme der Herzleistung	$\leftarrow$	$P > 0,2$	$\leftarrow$	$P < 0,001$	$\leftarrow$	$P < 0,001$
<i>Doppelte Geninkonzentration</i> Abnahme der Herzleistung	80% (22%) (25)	82% (16%) (30)			76% (5%) (42)	80% (19%) (49)
Zunahme der Herzleistung	$\leftarrow$	$P > 0,2$			$\leftarrow$	$P < 0,01$

und Chinin verringerten in Konzentrationen von  $3,75 \times 10^{-6}$  bzw.  $2 \times 10^{-5}$  g/ml die Herzleistung (berechnet in erg/min) um 75–80%. Die Fluoresigsäure dagegen verminderte die Herzleistung trotz hoher Konzentrationen ( $2 \times 10^{-4}$  g/ml) und starker Abnahme des Gehaltes an energiereichen Phosphaten nur wenig (ca. 33%). Nach Geninzugabe stieg zwar bei Fluoresigsäureschädigung die Kontraktionshöhe an, gleichzeitig verminderte sich jedoch die Herzfrequenz so hochgradig, dass die Herzleistung – die im wesentlichen das Produkt aus Hubhöhe und Frequenz darstellt – nicht ansteigt.

Hubhöhe und Frequenz der Vorhofpräparate wurden mit Torsionsmyographen photokymographisch registriert. Der cardiotone Effekt wurde aus der Differenz zwischen der Herzleistung vor Zugabe des Cardenolid (das heisst zur Zeit der maximalen Herzschädigung) und dem Maximum der positiv inotropen Wirkung, ausgedrückt in Prozenten und bezogen auf den Ausgangswert vor der Schädigung, berechnet.

Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle zusammengefasst.

Unabhängig von der Struktur der 6 Cardenolide und Bufadienolide führten äquieffektive Konzentrationen nach Herzschädigung mit 2,4-Dinitrophenol zu einer gleich starken Zunahme der Herzleistung. Nach Schädigung mit Fluoresigsäure dagegen sind die 3,14,12-Trioxoverbindungen stärker wirksam als die 3,14-Dioxy- ( $P > 0,01$ ) und die 3,14,16-Trioxoverbindungen. Zwi-

schen den einander entsprechenden 5- und 6-C-Laktonringderivaten war kein Unterschied nachweisbar. Nach Schädigung mit Chinin erhöhen bei den untersuchten Trioxoderivaten jeweils die Bufadienolide stärker die Herzleistung als die Cardenolide ( $P < 0,01$ ). Ausserdem sind wieder die beiden 3,14,12-Trioxoderivate den 3,14,16-Trioxoverbindungen überlegen ( $P < 0,02$  bzw.  $P < 0,001$ ). Bei den 3,14-substituierten Verbindungen war zwischen 5- und 6-C-Laktonringderivat kein Unterschied nachweisbar ( $P > 0,2$ ). Im Vergleich zu den 3,14,12-Trioxoverbindungen ist nur das Bufalin, nicht aber das Digitoxigenin den entsprechenden 3,14,12-Trioxoverbindungen unterlegen.

Mit der angegebenen Methode ist es möglich, an verschiedenen biochemisch und elektrophysiologisch definierten Herzschädigungsmodellen qualitative Unterschiede im Wirkungsmechanismus von Cardenoliden und Bufadienoliden in Abhängigkeit von Zahl und Stellung der OH-Gruppen und der Struktur des Laktonringes nachzuweisen.

**Summary.** By damaging isolated auricles of guinea pigs with 2,4-dinitrophenol, fluoroacetic acid or quinine, it was possible to obtain qualitative differences of effect depending upon the chemical structure of the cardenolids and bufadienolids.

W. FÖRSTER

Pharmakologisches Institut der Medizinischen Akademie Magdeburg (Deutschland), 10. November 1960.

### The Incorporation of 8-<sup>14</sup>C-Adenine and 8-<sup>14</sup>C-Guanine into PNA of *Rhodospirillum rubrum*

A number of investigations have been carried out to determine the ability of micro-organisms, which do not require preformed purines for growth, to incorporate <sup>14</sup>C-adenine and <sup>14</sup>C-guanine into the purine bases of PNA. The results have revealed that they can be divided into two main groups: a) those which incorporate guanine into PNA-adenine and guanine, and adenine exclusively or mainly into PNA-adenine, and b) those which incorporate guanine exclusively or mainly into guanine, and adenine into both PNA purines (see e.g. BROWN<sup>1</sup>, GOODWIN<sup>2</sup>; an example of a) is *Mycococcus pyogenes* v. *aureus* and of b) *Aerobacter aerogenes*. The photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* had not previously been examined in this respect, so as part of our studies on purine metabolism in this organism we undertook such an investigation.

*R. rubrum* was cultured anaerobically in the light under our standard conditions (GOODWIN and OSMAN<sup>3</sup>) and the 8-<sup>14</sup>C-purine added to 48 h cultures. The cells were harvested 6 h later, washed repeatedly with 80–90% ethanol, ethanol-ether (1:1) and finally ether, and extracted twice with 10% aqueous NaCl (7 ml/1 g dry weight cells) under reflux at 100° for 1 h. The pooled extract was cooled to 0° and the crude PNA precipitated by addition of 2 vol of absolute ethanol previously cooled to 0°. Purified PNA was then obtained via its Ba salt by the method of MAGASANIK<sup>4</sup>. It was then hydrolysed with N HCl in a sealed glass tube and the products of the reaction (adenine, guanine, cytidylic acid and uridylic acid) separated on paper using the t-butanol/HCl/H<sub>2</sub>O solvent of SMITH and MARKHAM<sup>5</sup>. The purine spots were eluted with 0.1 N HCl and the amount present determined spectrophotometrically; the eluates were then assayed for <sup>14</sup>C with a conventional end-window counter.

### Results.

**Ratio of guanine to adenine in *R. rubrum* PNA.** Ten determinations on four different samples of purified *R. rubrum* PNA gave a mean value of 1.23 (range 1.15–1.34) for the molar ratio of guanine to adenine. This should be compared with values for the RNA of other bacteria, for example, 1.54, 1.47, and 1.14 for *S. marcescens*, *Mycobact. phlei* and *Escherichia coli*, respectively (ELSON and CHARGAFF<sup>6</sup>).

**Incorporation of 8-<sup>14</sup>C-adenine and 8-<sup>14</sup>C-guanine into *R. rubrum* PNA.** Representative results for 8-<sup>14</sup>C-adenine and 8-<sup>14</sup>C-guanine incorporation into *R. rubrum* PNA are given in the Table. From these results it is clear that *R. rubrum* falls into class b) discussed above, because it incorporates adenine into both PNA-purines, and guanine almost exclusively into PNA-guanine. This would suggest that if the generally accepted pathway for purine interconversions in micro-organisms (GOODWIN<sup>2</sup>) is also applicable to *R. rubrum*, then the enzyme carrying out the reductive deamination of guanylic acid (GMP to inosinic acid (IMP) is absent.

There is a very active adenine deaminase present in *R. rubrum* which, on a millimolar scale, converts adenine quantitatively into hypoxanthine which is itself not utilized by the organism (GOODWIN and PASSORN<sup>7</sup>). This

<sup>1</sup> G. B. BROWN, in *The Nucleic Acids* (Ed. E. CHARGAFF and J. N. DAVIDSON, Academic Press, New York 1955), Vol. II.

<sup>2</sup> T. W. GOODWIN, *Recent Advances in Biochemistry* (Churchill, London 1960).

<sup>3</sup> T. W. GOODWIN and H. G. OSMAN, Biochem. J. 53, 541 (1953).

<sup>4</sup> B. MAGASANIK, in *The Nucleic Acids* (Ed. E. CHARGAFF and J. N. DAVIDSON, Academic Press, New York 1955), Vol. I.

<sup>5</sup> J. D. SMITH and R. MARKHAM, Biochem. J. 46, 509 (1950).

<sup>6</sup> D. ELSON and E. CHARGAFF, Biochim. biophys. Acta 17, 367 (1955).

<sup>7</sup> T. W. GOODWIN and P. N. A. PASSORN, Nature (Lond.), in press (1961).