

Weitere Untersuchungen über strukturabhängige Wirkungsunterschiede bei Cardenoliden und Bufadienoliden

In einer vorhergehenden Mitteilung¹ haben wir mit Hilfe eines neuen Testes bei 3 Paaren einander entsprechender Genine von Cardenoliden und Bufadienoliden strukturabhängige Wirkungsunterschiede nachgewiesen. Als Versuchsmodell benutzten wir das spontan schlagende isolierte Meerschweinchen-Aurikelpräparat, das durch 2,4-Dinitrophenol (DNP), Chinin und Fluoracetat geschädigt

worden war. Die Genine, die in Konzentrationen untersucht wurden, die am ungeschädigten Herzen äquieffektiv waren, zeigten in Abhängigkeit von ihrer Struktur nach Schädigung mit Chinin und Fluoracetat, nicht aber nach 2,4-Dinitrophenol, eine unterschiedlich starke Zunahme der Herzleistung.

Mit derselben Methodik untersuchten wir weitere Stoffwechselinhibitoren und andere herzscheidigende Substanzen. Die Ergebnisse sind in den Tabellen I und II zusammengefasst.

¹ W. FÖRSTER, Exper. 17, 220 (1961).

Tab. I

Art der Schädigung	3,14-Dihydroxy-Digoxigenin 3 · 10 ⁻⁷ g/ml	Bufalin 2 · 10 ⁻⁸ g/ml	3,14,12-Trihydroxy-Digoxigenin 2 · 10 ⁻⁶ g/ml	12 β-Hydroxybufalin 5 · 10 ⁻⁷ g/ml	3,14,16-Trihydroxy-Verbindungen Gitoxigenin (3-4) · 10 ⁻⁶ g/ml	Desacetylbufotalin (1,0-1,5) · 10 ⁻⁷ g/ml
Ohne Schädigung						
Zunahme der Herzleistung	54% (n = 104)	53% (n = 109)	45% (n = 128)	50% (n = 92)	46% (n = 78)	53% (n = 75)
Butallylonal (= Pernocton)						
Abnahme der Herzleistung	71%	77%	74%	76%	73%	75%
Zunahme der Herzleistung	82% (15)	73% (14)	72% (14)	87% (14)	50% (14)	76% (14)
Azid						
Abnahme der Herzleistung	73%	72%	70%	73%	76%	75%
Zunahme der Herzleistung	34% (16)	24% (15)	42% (15)	49% (15)	19% (20)	29% (14)
Jodacetat						
Abnahme der Herzleistung	73%	75%	81%	80%	nicht untersucht	nicht untersucht
Zunahme der Herzleistung	— (10)	12% (8)	12% (12)	8% (13)	nicht untersucht	nicht untersucht
Mersalyl						
Abnahme der Herzleistung	78%	80%	83%	79%	nicht untersucht	nicht untersucht
Zunahme der Herzleistung	46% (11)	58% (10)	39% (12)	25% (9)	nicht untersucht	nicht untersucht
Bariumchlorid						
Abnahme der Herzleistung	10%	21%	9%	5%	nicht untersucht	nicht untersucht
Zunahme der Herzleistung	13% (12)	8% (15)	9% (12)	24% (12)	nicht untersucht	nicht untersucht

Tab. II

Art der Schädigung	3,14-Dihydroxy-Digoxigenin 3 · 10 ⁻⁷ g/ml	Bufalin 2 · 10 ⁻⁸ g/ml	3,14,12-Trihydroxy-Digoxigenin 2 · 10 ⁻⁶ g/ml	12 β-Hydroxybufalin 5 · 10 ⁻⁷ g/ml	3,14,16-Trihydroxy-Verbindungen Gitoxigenin (3-4) · 10 ⁻⁶ g/ml	Desacetylbufotalin (1,0-1,5) · 10 ⁻⁷ g/ml
Fluorid						
Abnahme der Herzleistung	39%	43%	45%	64%	nicht untersucht	nicht untersucht
Zunahme der Herzleistung	49% (12)	24% (12)	41% (9)	59% (13)	nicht untersucht	nicht untersucht
N-Äthylmaleinimid	← P < 0,01 →		← P > 0,05 →			
Abnahme der Herzleistung	35%	31%	17%	31%	31%	29%
Zunahme der Herzleistung	6% (23)	21% (23)	10% (12)	14% (12)	5% (11)	11% (11)
Jodacetamid	← P < 0,01 →		← P > 0,2 →		← P > 0,2 →	
Jodacetamid-Eigenwirkung						
Zunahme der Herzleistung	37%	43%	68%	52%	48%	46%
Geninwirkung	← P > 0,05 →					
Zunahme der Herzleistung	-1% (13)	9% (13)	21% (14)	17% (14)	-7% (17)	12% (11)
Phenylbutazon (Butazolidin)						
Butazolidin 1,5 · 10 ⁻⁴ g/ml						
Abnahme der Herzleistung	77%	77%	80%	82%	79%	80%
Zunahme der Herzleistung	51% (16)	31% (17)	52% (17)	83% (17)	43% (13)	73% (15)
Butazolidin 3 · 10 ⁻⁴ g/ml	← P < 0,02 →		← P < 0,05 →		← P < 0,02 →	
Abnahme der Herzleistung	83%	80%	82%	83%	79%	80%
Zunahme der Herzleistung	27% (10)	29% (10)	33% (10)	54% (16)	29% (8)	34% (8)
	← P > 0,2 →		← P < 0,01 →		← P > 0,2 →	

Die untersuchten 6 Genine zeigen untereinander gegenüber einer Herzschiädigung mit Barbiturat, Azid, Jodacetat, Mersalyl und Bariumchlorid (Tabelle I) kein unterschiedliches Verhalten. Die Zunahme der Herzleistung ist je nach Schädigungssubstanz verschieden, am stärksten nach Barbiturat, am schwächsten nach Jodacetat und Bariumchlorid.

Demgegenüber sind zwischen den einzelnen Geninen nach Schädigung mit Fluorid, N-Äthylmaleinimid, Jodacetamid und Phenylbutazon (Tabelle II) deutliche strukturabhängige Wirkungsunterschiede nachweisbar. Bei Fluorid und N-Äthylmaleinimid beziehen sie sich vorwiegend auf die 3,14-Dihydroxy-Verbindungen. Nach Fluorid ist Digitoxigenin stärker wirksam als Bufalin ($P < 0,01$), nach N-Äthylmaleinimid wirkt Bufalin stärker als Digitoxigenin ($P > 0,001$). Bei Fluoridgabe ist ausserdem 12 β -Hydroxybufalin signifikant stärker wirksam als Bufalin ($P < 0,001$). Nach Jodacetamid, das in der untersuchten Konzentration einen positiv inotropen Eigeneffekt besitzt – erst höhere Konzentrationen vermindern die Herzleistung – wirken die drei Bufadienolide gleich stark; bei den Cardenoliden ist Digoxigenin dem Gitoxigenin ($P < 0,01$) und dem Digitoxigenin ($P = 0,05$) überlegen. Nach Schädigung mit Phenylbutazon haben bei den Di- und Trihydroxyverbindungen die Cumalin- und Butenolidrinderivate einen unterschiedlichen Effekt. Digitoxigenin ist dem Bufalin ($P < 0,02$), 12 β -Hydroxybufalin und Desacetylbufotalin sind ihren entsprechenden Butenolid-Derivaten überlegen ($P < 0,01$ bzw. $P < 0,02$).

Da bei der vorliegenden Versuchsanordnung der Unterschied in der Wirkung der Genine auch auf einer unterschiedlichen Beeinflussung der Spontanfrequenz beruhen könnte, wurden die Veränderungen der Herzfrequenz und Kontraktionsstärke getrennt berechnet. Strukturabhängige unterschiedliche Effekte der Genine auf die Herz-

frequenz waren nur bei Fluoracetat- ($P > 0,001$) und bei Fluoridgabe ($P < 0,001$) nachweisbar. Der in der früheren Mitteilung berichtete Unterschied nach Fluoracetatschädigung zwischen den 3,14,12-Trihydroxy-Derivaten und den beiden anderen Geninpaaren ist ausschliesslich auf eine unterschiedlich starke Herzfrequenzbeeinflussung zurückzuführen. Legt man der Auswertung nur die Kontraktionsamplituden zugrunde, wirken alle 6 Genine gleich stark. Nach Fluorid dagegen verstärkt die unterschiedliche Beeinflussung der Herzfrequenz die Wirkungsunterschiede zwischen den Geninen.

Nach den bisherigen Erfahrungen können als empfindlichste Schädigungssubstanzen zum Nachweis von Struktur-Wirkungsbeziehungen bei Geninen Chinin und Phenylbutazon empfohlen werden. Beide Verbindungen ermöglichen eine Differenzierung des Einflusses der Hydroxylgruppen und des Lactonringes. Untersuchungen mit Geninen, die verschiedene Substituenten an C₁₀ und weitere Hydroxylgruppen besitzen, werden durchgeführt.

Die vorliegenden Befunde gestatten auch ein gewisses Werturteil über die optimal wirksame Konstitution. In der Mehrzahl der Versuche waren die Bufadienolide den Cardenoliden und die 3,14,12-Trihydroxy- den Dihydroxy- und 3,14,16-Trihydroxy-Verbindungen überlegen.

Summary. By means of guinea-pig auricle preparations, which were damaged in some way, it was demonstrated that bufadienolids compensate different model 'insufficiencies' more efficaciously than cardenolids; and 3,14,12-trihydroxygenins more efficaciously than 3,14-dihydroxygenins, and even better than 3,14,16-trihydroxygenins.

W. FÖRSTER

Institut für Pharmakologie, Medizinische Akademie, Magdeburg (Deutschland), 19. April 1961.

Malignancy *in vivo* of Chick Embryo Cells Infected with Rous Sarcoma Virus *in vitro*¹

Chick embryo cells infected with Rous sarcoma virus (RSV) *in vitro* form foci of altered cells^{2,3} which continue to multiply and release virus and form a new, stable, transformed cell type^{4,5}. It was of interest to determine if such cells possessed properties of malignancy *in vivo* independent of their capacity to release RSV which would produce tumors on release into the host tissues of the chicken. It was important therefore to determine the origin of cells in a Rous sarcoma induced by the injection of chick embryo cells which had been exposed to virus *in vitro* and developed the transformation characteristic of virus infection²⁻⁵. It has been shown by KOSIN and ISHIZAKI⁶ that populations of chicken cells can be identified as of male or female origin by their content of sex chromatin, and recent studies by THIEDE⁷ have demonstrated that by growing human embryonic cells in monolayers on glass coverslips *in vitro* the sex chromatin becomes prominent and permits a ready identification of the sex of the donor embryo by the technique of BARR and BERTRAM⁸. It was decided, therefore, to apply this technique to determine the origin of cells in Rous sarcomas which had been induced in chicks by the injection of cells transformed by virus *in vitro*.

Tumors were induced in the wing web of 2-month-old, white Leghorn cockerels and pullets by the injection into the wing web of 200 000 pock forming units of Rous sarcoma virus⁹ or of 4.8×10^6 chick embryo cells which

had been infected *in vitro* with the virus by the methods described by TEMIN and RUBIN³. Microscopic examination revealed that over 50% of these cells had undergone the characteristic morphologic transformation induced by the virus^{3,5} and could be demonstrated to be releasing virus by the infective center assay technique of RUBIN⁵. The tumors produced by the injection of transformed cells appeared earlier and grew more rapidly than those induced by the virus. When the tumors reached a size of approximately 1 to 2 cm in diameter, they were removed from the wing web and the mucinous tumor mass was carefully dissected from the adjacent normal tissue. This tumor mass was digested with trypsin and cell suspensions prepared for cultivation by the methods described³. When a good monolayer of cells had grown out on the Petri dishes, the cells were removed with 0.05% trypsin and 600 000 cells inoculated into each of several test tubes containing coverslips and 2 ml of culture medium³. Aliquots of the transformed cells used for inoculation of the

¹ This study was supported by a grant from the National Cancer Institute of the National Institute of Health.

² R. A. MANAKER and V. GROUPE, *Virology* 2, 840 (1956).

³ H. M. TEMIN and H. RUBIN, *Virology* 6, 669 (1958).

⁴ H. M. TEMIN and H. RUBIN, *Virology* 8, 209 (1959).

⁵ H. RUBIN, *Virology* 10, 29 (1960).

⁶ I. L. KOSIN and H. ISHIZAKI, *Science* 130, 43 (1959).

⁷ H. A. THIEDE, to be published.

⁸ M. L. BARR and E. G. BERTRAM, *Nature* 163, 677 (1949).

⁹ R. M. DOUGHERTY, J. A. STEWART, and H. R. MORGAN, *Virology* 11, 349 (1960).