

Enterohepatischer Kreislauf von 7α-³H-DHEA-¹⁴C-Glukuronosid und 7α-³H-DHEA-³⁵S-Sulfat beim Meerschweinchen¹

Nach i.v. Verabreichung von Dehydroepiandrosteron (DHEA) erscheinen beim Meerschweinchen innerhalb 1 h über 40% der injizierten Verbindung in der Galle, größtenteils in Form des Sulfates und des Glukuronosides². Durch Doppelmarkierung des Steroid- und Säureanteils mit ¹⁴C, ³⁵S bzw. ³H gelang es erstmals, das weitere Schicksal solcher Konjugate im enterohepatischen Kreislauf eindeutig zu verfolgen.

Doppeltmarkiertes Sulfat wurde nach der Methode von Roy³ aus Chlor-³⁵Sulfonsäure und 7α-³H-DHEA in Pyridin hergestellt, während man doppeltmarkiertes Glukuronosid durch Bebrütung von Meerschweinchen-Leberhomogenat mit UDP-¹⁴C-Glukuronsäure und 7α-³H-DHEA gewann. Die chromatographisch reinen Verbindungen wurden dann entweder ins obere Duodenum oder in eine Vena mesenterica injiziert und nach einer gewissen Zeit Teile der Dünndarmwand, Plasma der Vena portae und

der Vena cava inf., Galle oder Urin auf freie Steroide, Steroidsulfate und -glukuronoside untersucht. Nach Entfernung der freien Steroide mittels Methylenchlorid gewann man die gesamten Konjugate aus Galle und Urin durch Extraktion mit Äthylazetat/Tetrahydrofuran (1:1 v/v), aus Plasma und den Organhomogenaten durch Behandlung mit Methanol/Chloroform (1:1 v/v). Die Trennung in Sulfate und Glukuronoside geschah durch Anionen-Austauscherchromatographie an aktiviertem DEAE-Sephadex A-50⁴ sowie zweimalige Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel in Chloroform/Methanol/Ammoniak (20:5:0,2) bzw. (10:10:0,2). Die Impulsraten

¹ Die vorliegende Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.
² P. Knapstein, W. Rindt und G. W. Oertel, XII. Symposium Dt. Endokrin. Ges., 22. April 1966.
³ A. B. Roy, Biochem. J. 62, 41 (1956).
⁴ G. W. Oertel und P. Knapstein, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., im Druck (1966).

Tabelle I. Freie und konjugierte Steroide in einzelnen Proben, 4 h nach Injektion von 7α-³H-DHEA-³⁵S-Sulfat ins obere Duodenum eines Meerschweinchens.

Material	Freie Steroide Ipm ³ H	Sulfokonjugate Ipm _{35S} ³ H	Glukuronoside Ipm _{35S} ³ H	Total % ³ H	Verhältnis Sulfokonjugat/ Glukuronosid	Verhältnis Konjugat/ freies Steroid
Injiziert	—	4030000 = 1,93 2090000	—	100	> 100	> 100
Stück der Dünndarmwand	325	55250 = 2,02 29375	600 = > 100 0	001,510	92,20	180,00
Plasma der Vena portae pro ml	70	1370 = 2,00 685	51 = > 100 0	0,037	27,00	18,00
Peripheres Plasma pro ml	40	806 = 6,50 124	16 = > 100 0	0,021	50,00	20,00
4-Stunden- Galle	6300	194500 = 1,61 121100	5699 = > 100 0	4,902	33,80	30,80
4-Stunden- Urin	6300	71000 = 7,20 9860	3610 = > 100 0	2,010	19,50	11,50

Tabelle II. Freie und konjugierte Steroide, 5 h nach Injektion von 7α-³H-DHEA-¹⁴C-Glukuronosid ins obere Duodenum eines Meerschweinchens

Material	Freie Steroide Ipm ³ H	Sulfokonjugate Ipm _{14C} ³ H	Glukuronoside Ipm _{14C} ³ H	Total % ³ H	Verhältnis Sulfokonjugat/ Glukuronosid	Verhältnis Konjugat/ freies Steroid
Injiziert	—	—	2684000 = 2,02 1330000	100	0,00	> 100
Stück der Dünndarmwand	8050	6420 = > 100 0	19250 = 2,33 8262	1,250	0,340	3,12
Plasma der vena portae pro ml	11	96 = > 100 0	62 = 6,20 10	0,006	1,55	12,00
Peripheres Plasma pro ml	8	50 = > 100 0	30 = 7,50 4	0,003	2,00	7,00
5-Stunden- Galle	5320	45840 = > 100 0	7520 = 18,50 406	2,050	6,06	5,02
5-Stunden- Urin	520	6000 = > 100 0	2996 = 13,60 220	0,336	2,01	17,30

beider Isotope wurden simultan im «Packard»-Tricarbszintillationspektrometer, Mod. 314-EX, bestimmt⁵.

Von dem in das Duodenum injizierten DHEA-Sulfat wurden innerhalb von 4 h 7% resorbiert und wieder ausgeschieden. Durch Verwendung des doppeltmarkierten Konjugates konnte nachgewiesen werden, daß C₁₉-Steroidsulfat ohne nennenswerte Hydrolyse sowohl die Darmwand als auch die Leber passiert (Tabelle I), wie aus einem praktisch unveränderten ³H/³⁵S-Quotienten des Sulfates in der Galle und einem verschwindend geringen Anteil freier Steroide in der Darmwand hervorgeht. Ein Teil der im Darm resorbierten und durch die Vena portae der Leber zugeführten Sulfokonjugate gelangt über den peripheren Blutkreislauf in den Urin, jedoch mit deutlichem ³⁵S-Verlust, der auf eine Resulfurylierung deutet. Da frühere Experimente gezeigt hatten, daß in der Leber das Sulfat kaum, wohl aber das Sulfatid hydrolysiert werden kann^{6,7}, handelt es sich bei dem in die Peripherie gelangten Sulfokonjugat wohl vornehmlich um Steroidsulfatid, welches sich auf dem Wege vom Darm zur Leber gebildet hatte, um dort teilweise hydrolysiert und resulfuryliert zu werden. Das in eine Vena mesenterica injizierte DHEA-sulfat erschien ohne ³⁵S-Verlust im Urin. Ein geringer ³H-Verlust des Sulfates in der Galle läßt sich durch 7 α -Hydroxylierung der Steroidkomponente in der Leber erklären.

Bei Injektion von DHEA-glukuronosid in das Duodenum fand man innerhalb von 5 h eine Resorption und Wiederausscheidung von 2,5% des vorgelegten Substrates (Tabelle II). Der größte Teil wurde im Verlaufe der Resorption in der Darmwand hydrolysiert und anschließend rekongugiert. Hier entstand mehr Sulfat als Glukuronosid, während nur 2% ohne Hydrolyse in den enterohepatischen Kreislauf und in die Galle gelangten. In der Darm-

wand konnten signifikante Mengen freier und sulfokongugierter Steroide nachgewiesen werden. Das Verhältnis Sulfat/Glukuronosid betrug in der Galle 6,06. Der ursprüngliche ³H/¹⁴C-Quotient des injizierten Glukuronosides von 2,02 stieg in der Galle auf über 100 (³H von Sulfat plus Glukuronosid). Etwa 50% des in eine Vena mesenterica injizierten DHEA-glukuronosides wurden innerhalb von 20 min. ohne Hydrolyse wieder mit der Galle ausgeschieden; 6% der ³H-Aktivität waren nach 3,5 h in den Urin gelangt, wovon sich rund 1/3 als Glukuronosid mit wenig erhöhtem ³H/¹⁴C-Quotienten, 2/3 als nur ³H-markiertes Sulfat isolieren ließen.

Summary. By infusing doubly labelled conjugates into the duodenum or into a mesenteric vein it could be demonstrated that DHEA-sulfate passes the intestinal wall as well as the liver nearly without hydrolysis. However, most of the glucuronoside is hydrolysed in the intestine and rekonjugated as sulfate.

P. Knapstein und G. W. Oertel

Endokrinologische Abteilung des Hygiene-Institutes
der Universität des Saarlandes
Homburg (Saar, Deutschland), 13. Mai 1966.

⁵ Packard Instrument Co., La Grange, Ill., USA, Box 428, Instruction Manual.

⁶ G. W. Oertel und P. Knapstein, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., im Druck (1966).

⁷ W. Rindt, K. Weinandt und G. W. Oertel: XII. Symposium Dt. Endokrin. Ges., 22. April 1966.

Der Einfluss von Papaverin auf Funktionen der Blutplättchen

Bei Untersuchungen über die Wirkung von Pharmaka auf Blutplättchen fanden wir, dass einige Plättchenfunktionen, welche für die Hämostase von besonderer Bedeutung sind, durch das spasmolytisch wirkende Opiumalkaloid Papaverin gehemmt werden. Im einzelnen prüften wir die Adhäsivität an Glasoberflächen, die durch Adenosindiphosphat (ADP) bewirkte Aggregation und die durch Thrombin ausgelöste visköse Metamorphose menschlicher Blutplättchen. Ferner wurde die durch Thrombin und andere proteolytische Fermente bewirkte Freisetzung von Serotonin, Histamin und ATP aus Kaninchenblutplättchen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die geprüften Plättchenreaktionen bei Anwesenheit von Papaverin in Konzentrationen von 10⁻⁵–10⁻⁴ M deutlich gehemmt oder völlig verhindert werden.

Während sich die Zahl der Plättchen bei Passage der Suspension (0,3 · 10⁹ Plättchen/ml Tyrodelösung) durch drei Glasfritten G 2 (Schott & Gen., Jena) um 50–60% verringerte, trat bei Anwesenheit von 10⁻⁴ M Papaverin unter den gleichen Versuchsbedingungen nur eine Verminderung um 10–15% der ursprünglichen Plättchenzahl ein. Die durch Zugabe von 400 ng ADP/ml bewirkte Aggregation der Blutplättchen im Hirudinplasma (Methodik nach ¹) konnte durch vorherige Zugabe von 5 · 10⁻⁵ M

Papaverin völlig verhindert werden. Bei Beobachtung der Plättchen unter dem Phasenkontrastmikroskop und bei fortlaufender Messung der Lichtdurchlässigkeit der Plättchensuspension (Methodik nach ²) zeigte sich, dass die durch Thrombin ausgelöste Agglomeration und visköse Metamorphose der Blutplättchen in hitzedebriniertem Plasma oder in Tyrodelösung bei Gegenwart von Papaverin deutlich gehemmt wird (Versuchsbeispiel siehe Figur 1).

Die Aminfreisetzung und die Änderung des ATP-Gehaltes unter der Einwirkung von proteolytischen Fermenten und bestimmten Schlangengiften wurde an Kaninchenblutplättchen geprüft (Methodik ^{3–5}). Das Ergebnis der Untersuchungen mit Thrombin ist in der Figur 2 zusammengefasst. In gleicher Weise wurde auch die durch Trypsin, Subtilisin und die wirksame Komponente des *Crotalus terrificus*-Giftes ausgelöste Freisetzung⁵

¹ F. Markwardt und A. Hoffmann, Naturwissenschaften 51, 388 (1964).

² F. Markwardt, Thrombos. Diath. haemorrh. 5, 576 (1961).

³ F. Markwardt und W. Barthel, Arch. exp. Path. Pharmac. 249, 176 (1964).

⁴ F. Markwardt, W. Barthel, A. Hoffmann und E. Wittwer, Arch. exp. Path. Pharmac. 251, 255 (1965).

⁵ F. Markwardt, W. Barthel, E. Glusa und A. Hoffmann, Arch. exp. Path. Pharmac. 252, 297 (1966).