

Aktivierende Wirkung von Luzerne-Extrakten auf die Aktivität von Estradioldipropionat

Von den bisher auf ihre östrogene Aktivität untersuchten Pflanzen weist die Luzerne die grösste Variabilität aus. Informationen über die östrogene Aktivität der Luzerne sind darum in der Literatur sehr verschieden. Es wird geringe Aktivität (CHENG et al.¹, RONNE et al.², NILSSON³, CHURY⁴, ROLINSKI⁵) als auch hohe Aktivität (KITTS et al.⁶, BICKOFF et al.⁷) angegeben. Die Unterschiede der Angaben über die östrogene Wirksamkeit der Luzerne werden verschieden erklärt. BICKOFF et al.⁷ nehmen an, dass hier die Jahreszeit, Kultivierung, Varietät und Bearbeitung des Pflanzenmaterials nach dem Mähen eine Rolle spielen. Es könnte sich aber auch um verschiedene Mengen von Antiöstrogenen in dieser Pflanze handeln, da ADLER⁸ diese Stoffe in Luzerne nachgewiesen hat. Die grossen Unterschiede in der östrogenen Aktivität der Luzerne könnte man aber auch dadurch erklären, dass diese Pflanze Stoffe enthält, die östrogene Aktivität steigern. Für eine solche Annahme sprechen die Angaben von BICKOFF et al.⁷, wonach Luzernemehl, obwohl es selbst östrogen inaktiv war, in einigen Fällen die Wirksamkeit von Coumestrol steigert.

In unserer früheren Arbeit (CHURY⁴) zeigten wir, dass aus der Luzerne durch Extraktion mit 0,1 n HCl bei Zimmertemperatur und nachheriges Verfahren nach ADLER⁸ eine Fraktion erhalten wird, welche nach Fällung mit Bleiazetat und H₂S ein Filtrat ergibt, das nach Abdampfen einen Stoff enthält, der die Samenbläschen angreift. Weitere Untersuchungen zeigten, dass dieses Residuum auch die östrogene Aktivität stark beeinflusst.

Die Versuche wurden an 44 Rattenweibchen von 30–40 g Körpergewicht und Alter von 21–23 Tagen durchgeführt. Die Ratten wurden in Gruppen eingeteilt, und zwar so, dass jede Gruppe 4–5 Tiere aus demselben Wurf enthielt. Die Gesamtzahl der Versuchstiere betrug 20 Ratten, die der Kontrolltiere 24 Ratten. Den Versuchsratten wurde während 2 Tagen 0,1, 0,2 oder 0,5 µg Estradioldipropionat (ESDiP) und 0,5 ml einer Lösung des Stoffes aus Luzerne injiziert. Die Kontrollratten bekamen in derselben Zeit 0,1, 0,2 oder 0,5 µg ESDiP und 0,5 ml physiologischer Lösung, blieben unbehandelt oder es wurde ihnen nur 0,5 ml der Lösung des Stoffes aus Luzerne injiziert. Alle Tiere wurden am dritten Tag getötet, die Uteri wurden auspräpariert und mit Formalin fixiert. Nach der Fixierung wurden sie auf einer Torsionswaage gewogen.

Die Versuchsergebnisse werden in der Tabelle und den Figuren 1 und 2 dargestellt. Die Tabellendaten zeigen, dass der Stoff die Aktivität des Estradioldipropionates

- ¹ E. CHENG, CH. D. STORY, L. C. PAYNE, L. YODER und W. BURROUGHS, *J. Anim. Sci.* 12, 507 (1953).
- ² R. RONNE, E. FENGER und H. J. BENEDIXEN, 7th Nord vet. Congr. Oslo 60, 54 (1954).
- ³ A. NILSSON, *Lantbr-Högsk. Ann.* 26, 19 (1960).
- ⁴ J. CHURY, *Vet. Med.* 6, 597 (1961); *Spisy vys. Sk. vet., Brno* 14, 59 (1966); *Experientia* 23, 285 (1967).
- ⁵ Z. ROLINSKI, *Medycyna vet.* 27, 275 (1965).
- ⁶ W. D. KITTS, E. SWIESTRA, V. C. BRINK und A. J. WOOD, *Can. J. Anim. Sci.* 39, 6 (1959).
- ⁷ E. M. BICKOFF, A. L. LIVINGSTONE, A. N. BOOTH, A. P. HENDRICKSON und G. O. KOHLER, *J. Anim. Sci.* 79, 189 (1960).
- ⁸ J. H. ADLER, *Vet. Rec.* 74, 1148 (1962).

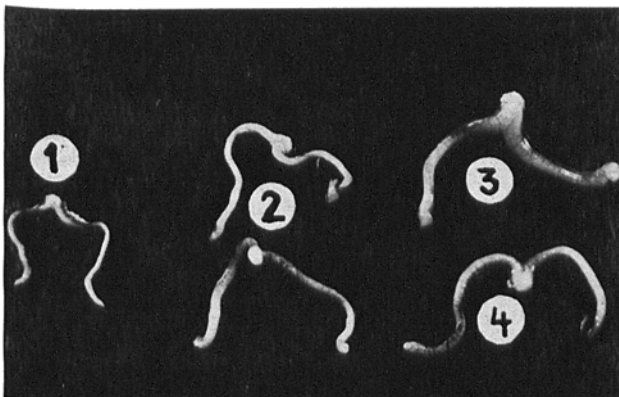


Fig. 1. Veränderungen der Uteri nach Gaben von Estradioldipropionat. Kontrollratten. (1) Olivenöl, (2) 0,1 µg Estradioldipropionat, (3) 0,5 µg Estradioldipropionat, (4) 0,2 µg Estradioldipropionat.

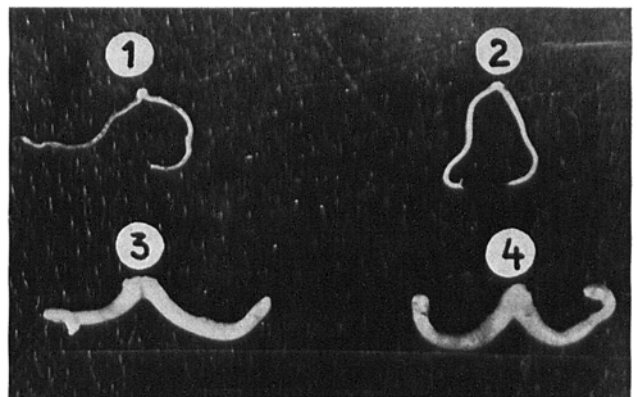


Fig. 2. Veränderungen der Uteri bei Versuchsratten. (1) unbehandelt, (2) mit 0,5 ml Lösung des Stoffes aus Luzerne injiziert, (3) 0,1 µg Estradioldipropionat + 0,5 ml Lösung des Stoffes aus Luzerne, (4) 0,2 µg Estradiolbenzoat + 0,5 ml Lösung des Stoffes aus Luzerne.

Differenzen und deren statistische Signifikanz sind nur für die Versuchsratten und die entsprechenden Kontrollratten angegeben

Gruppe	Uterusgewicht mg	s ± Differenz × ± S.D.	P
Kontrolle, unbehandelt	20	2,8 mg	
Kontrolle, 0,1 µg ESDiP (2 Tage)	27,2	3,8 mg	
Kontrolle, 0,2 µg ESDiP (2 Tage)	73,3	25,9 mg	
Kontrolle, 0,5 µg ESDiP (2 Tage)	87,8	27,1 mg	
Kontrolle, 0,5 ml Stoff aus Luzerne	22,2	0,7 mg	
Versuch, 0,1 µg ESDiP und 0,5 ml Stoff aus Luzerne	62,4	15,3 mg	35,2 ± 7,8
Versuch, 0,1 µg ESDiP und 0,5 ml Stoff aus Luzerne	125,9	24,7 mg	103,7 ± 11,2
Versuch, 0,2 µg ESDiP und 0,5 ml Stoff aus Luzerne	134,8	24,2 mg	61,5 ± 15,9
Versuch, 0,5 µg ESDiP und 0,5 ml Stoff aus Luzerne	144,4	29,2 mg	56,6 ± 17,8

stark erhöht. Die aktivierende Wirkung des Stoffes ist der Menge des verabreichten Östrogens direkt proportional. Der Stoff selbst ist nicht östrogen aktiv. Unsere Befunde klären die älteren Angaben von BICKOFF et al.⁷, dass Luzernemehl manchmal die Aktivität der Östrogene potenzieren kann. Sie ähneln auch den früheren Befunden von IWANOFF⁸, der feststellte, dass verschiedene Pflanzen Substanzen enthalten, welche die Aktivität von Östrogenen steigern. Zu solchen Pflanzen muss nun auch die Luzerne gerechnet werden.

Summary. In the residuum from 0.1*n* HCl extract of alfalfa obtained by precipitation with lead acetate and

H₂S and evaporation to dryness, a substance is present which potentiates the activity of oestradioldipropionate. This potentiation of oestrogen activity is directly proportional to the amount of applied oestrogen.

J. CHURY

Biologisches Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät, Brno (CSSR), 22. Juni 1967.

⁸ N. IWANOFF, *Acta vet. hung.* 6, 55 (1956).

Physiological Activities of Gluconyl Peptides

In an earlier communication^{1, 2} in vivo reactions of D-gluconyl-L-tyrosine were reported: thrombolysis and increased vascular permeability. Other gluconyl peptides have now been found to be effective. By the method used previously² they were prepared with L-alanine, L-leucine, L-norleucine, L-glutamic acid, L-lysine, and ϵ -aminocaproic acid. There was considerable variation in amount of product, the maximum yield being obtained with ϵ -aminocaproic acid. Aqueous solutions of the compounds were injected i.v. into dogs in which blood clots had been induced in femoral arteries³. Gluconyl- ϵ -aminocaproic acid proved to be the most potent agent, 20 mg in 1 ml bringing about lysis of blood clots in dogs weighing 12–13 kg 15 min after systemic administration.

In vitro, none of the gluconyl peptides were able to lyse fibrin; however, they were found to inhibit the formation of fibrin from fibrinogen and thrombin. Gluconyl compound, 1 U of human thrombin, and 0.3 mg of bovine fibrinogen, all dissolved in 0.2 ml of saline, were allowed to react at room temperature. Clotting was prevented by 0.05 mg of gluconyl- ϵ -aminocaproic acid, 0.2 mg of gluconyl-leucine, and 0.4 mg of gluconyl-tyrosine respectively. In each instance the anticoagulant effect was overcome by the incorporation of 0.065 mg of ϵ -aminocaproic acid or 0.5 mg of sodium ascorbate in the reaction mixture, though there was a delay in clot formation as compared with thrombin-fibrinogen controls.

Red blood cells proved to be suitable for an in vitro study of the permeability effect. One-tenth ml of 1% suspensions of sheep cells, mouse cells, and human cells respectively were mixed with 0.1 ml of dilutions of gluconyl- ϵ -aminocaproic acid in saline and incubated in a 37°C water bath for 60 min. Complete lysis of sheep and mouse red blood cells required 0.2 mg of the gluconyl compound, of human red blood cells 0.5 mg. This was consistent with cells from different individuals. Lysis of human red blood cells was entirely prevented with 0.5 mg of sodium ascorbate or 0.26 mg of ϵ -aminocaproic acid but not with 10 times as much glycine or alanine or lysine.

This finding led to an exploration of the effect of gluconyl peptides on bacterial cells. Several such compounds proved to be bactericidal for a variety of organisms suspended in distilled water without added nutrients. The antibacterial effect was also investigated in the presence of heart infusion broth, which was inoculated with 5×10^6 organisms of a strain of *Staphylococcus albus* and incubated at 37°C over night. Growth was observed when 0.2 ml of the broth

was added to 1 mg of gluconyl- ϵ -aminocaproic acid in 0.1 ml of distilled water. One mg with 0.1 ml of broth prevented the bacteria from multiplying, while 5 mg with the same amount of broth was bactericidal. To inhibit bacterial reproduction with gluconyl-leucine and gluconyl-lysine, 2 mg of the respective compound were required with 0.1 ml of broth. The bacteriostatic activity of any of the 3 gluconyl peptides was overcome with 1.3 mg of ϵ -aminocaproic acid but not with 10 times as much alanine or lysine nor with sodium ascorbate, which was shown itself to be antibacterial in the concentration needed in the tests.

A summary of the 3 in vitro tests is presented in the accompanying Table.

The results here reported may serve to shed some light on the mode of action of gluconyl peptides. Both fibrin and the outer layer of cell membranes are glycoproteins. Lysis could be due to the replacement of their carbohydrate moieties by gluconyl groups, made possible through the action of specific enzymes. Of the 2 antagonists studied, ϵ -aminocaproic acid is generally recognized as an effective anti-fibrinolytic and anti-inflammatory

Physiological activities of gluconyl- ϵ -aminocaproic acid, counteracted by ϵ -aminocaproic acid and sodium ascorbate

	Anti-coagulant	Haemolytic	Bacteriostatic
Activity units ^a of gluconyl- ϵ -aminocaproic acid	0.02	0.16	0.32
Counteractivity units ^b of ϵ -aminocaproic acid	0.05	0.20	1.00
Counteractivity units ^b of sodium ascorbate	0.23	0.23	—

^a Smallest amounts in ml of $10^{-2}M$ concentrations bringing about effects listed under conditions described in the text. ^b Smallest amounts in ml of $10^{-2}M$ concentrations nullifying 1 activity unit.

¹ P. H. KOPFER, *Nature* 217, 1417 (1966).

² M. IACOBELLIS, *Archs Biochem. Biophys.* 59, 199 (1955).

³ M. J. TSAPOGAS and P. T. FLUTE, *Br. med. Bull.* 20, 223 (1964).