

Pharmakologische Untersuchungen bei Thiaminmangel I. Änderungen des Katecholamingehalts im Gewebe¹

Während die biochemischen Gesichtspunkte eines Thiaminmangels sehr eingehend untersucht worden sind, blieben bis vor kurzem die pharmakologischen Reaktionen weitgehend unberücksichtigt. BOULLIN² berichtete 1963 über pharmakologische Reaktionen auf Thiaminmangel in Geweben. Ausserdem beschäftigten sich seit 1962 BHAGAT und LOCKETT³⁻⁵ sehr intensiv mit der Pharmakologie von Versuchstieren unter Thiaminmangel. Ihre Untersuchungen gehen aber von dem Gesichtspunkt aus, dass Thiamin im Nervenstoffwechsel, vor allem bei der neuromuskulären Erregungsübertragung (wie dies von VON MURALT⁶⁻⁸ und anderen⁹⁻¹³ angegeben wurde) benötigt wird. Ferner wurde auch die Beobachtung von BIRKS und MACINTOSH¹⁴ berücksichtigt, wonach Thiaminpyrophosphat in die Acetylcholinsynthese einbezogen ist. Aus diesem Grunde konzentrieren sich alle Untersucher vorwiegend auf die cholinergische Übertragung in Geweben mit Thiaminmangel und versuchen die Rolle des Thiamins von diesem Gesichtspunkt her zu beleuchten.

Wir versuchten in den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen, die Bedeutung des Thiamins im adrenergen System zu klären, und verwendeten dazu Ratten, die mit einem Thiaminmangelfutter ernährt wurden.

Es wurden männliche Sprague-Dawley-Albinoratten benutzt mit einem Gewicht von 110–120 g. Die synthetische Thiaminmangel-Grundkost wurde den Tieren ad libitum gegeben. Die Kontrollgruppe erhielt das gleiche Futter, dem jedoch 3 mg Thiamin-HCl/kg zugefügt war, ebenfalls ad libitum. Bei Fütterung der Thiaminmangel-Grundkost zeigten die Ratten nach einiger Zeit folgende Symptome: Anorexie, Gewichtsverlust, verringerte Nahrungsaufnahme, Schwäche, Ataxie und spastische Lähmung. Der Gewichtsverlust begann stets in der dritten Versuchswoche. Eine Vergleichsgruppe erhielt das gleiche Futter wie die Kontrollgruppe, jedoch in beschränkter Menge, im Vergleich zur thiaminarm ernährten Versuchsgruppe. Diese Gruppe wurde als kalorienarm gefütterte Gruppe bezeichnet und zeigte die gleiche Gewichtsentwicklung. Ein deutlicher Gewichtsanstieg war jedoch nach 1 mg/kg Thiamin-HCl s.c. nachweisbar.

Während sich die Symptome einer Polyneuritis entwickelten, konnte auch eine deutliche Bradykardie im EKG festgestellt werden. Es wurde festgestellt, dass Ratten mit einer Herzfrequenz von weniger als 70% gegenüber der Kontrollgruppe an einem akuten Thiaminmangel litten. Diese Tiere wurden dann für die folgenden Untersuchungen ausgesucht. Wurde 1 mg/kg Thiamin-HCl s.c.

injiziert, so normalisierte sich die Herzfrequenz im allgemeinen innerhalb von 40 min: Bei einigen Tieren jedoch war der Zeitraum länger, überschritt aber niemals 2 h.

Mit Hilfe der Methode nach LANGENDORFF wurde die Empfindlichkeit des isolierten Herzens von Ratten unter Thiaminmangel bestimmt. Durchströmung des Herzens erfolgte mit Tyrodelösung unter einem Druck von 50 cm H₂O, durch die 5% CO₂ und 95% O₂ geleitet wurden.

Auf der Figur¹⁵ ist zu erkennen, dass das Herz von Ratten mit Thiaminmangel hochempfindlich auf Tyramin reagiert, dagegen ist die Reaktion auf Noradrenalin nur mässig erhöht. Da Übereinstimmung darüber herrscht, dass die sympathomimetische Wirkung von Tyramin durch die Freisetzung von Katecholaminen aus deren Vorrat im Gewebe erfolgt¹⁶, wurde der Gewebsgehalt an Katecholaminen bei Ratten unter Thiaminmangel bestimmt.

Die differential quantitative Bestimmung der Katecholamine wurde fluorometrisch durchgeführt, und zwar mit der Trihydroxyindol-Methode durch Kaliumferricyanid-Oxydierung bei einem pH von 6,3 für Noradrenalin und bei pH 3,5 für Adrenalin^{17,18}.

¹ Herrn Professor Dr. F. TH. VON BRÜCKE zum 60. Geburtstag im Januar 1968 gewidmet.

² D. J. BOULLIN, Br. J. Pharmac. 20, 190 (1963).

³ B. BHAGAT und M. F. LOCKETT, J. Pharm. Pharmac. 14, 37 (1962).

⁴ B. BHAGAT und M. F. LOCKETT, J. Endocr. 23, 237 (1961).

⁵ B. BHAGAT und M. F. LOCKETT, J. Pharm. Pharmac. 14, 161 (1962).

⁶ A. VON MURALT, in *Vitamins and Hormones* (Ed. R. S. HARRIS und K. V. THIMAN; Academic Press Inc., N.Y. 1947), vol. 5, p. 93.

⁷ A. VON MURALT, *Experientia* 1, 136 (1945).

⁸ A. VON MURALT, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 98, Art. 2, 499 (1962).

⁹ B. MINZ, C. r. Séanc. Soc. Biol. 127, 1251 (1938).

¹⁰ J. R. COOPER, R. H. ROTH und M. M. KINI, *Nature* 199, 609 (1963).

¹¹ C. J. ARMETT und J. R. COOPER, *Experientia* 21, 605 (1965).

¹² T. HOFFMANN, T. ECKERT und M. MÖBUS, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 335, 156 (1964).

¹³ T. ECKERT und M. MÖBUS, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 338, 286 (1964).

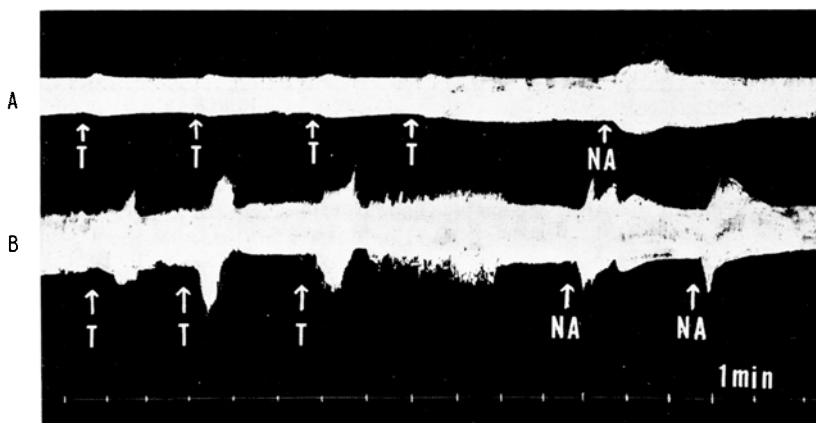
¹⁴ R. I. BIRKS und F. C. MACINTOSH, *Br. med. Bull.* 13, 157 (1957).

¹⁵ Figur 1 wurde bereits im Übersichtsartikel von H. IWATA und S. FUJIMOTO, *Pharmakologische Übersicht von Thiaminmangel-tieren* gebraucht, der auf japanisch in *Igaku no Ayumi* 57, 611; 57, 723 (1966) veröffentlicht wurde.

¹⁶ J. H. BURN und M. J. RAND, *J. Physiol.* 144, 314 (1958).

¹⁷ U. S. VON EULER und U. HAMBERG, *Science* 110, 561 (1949).

¹⁸ H. PERSKY und S. ROSTON, *Science* 118, 381 (1953).



Reaktion des isolierten Herzens von Ratten unter Thiaminmangel auf Noradrenalin und Tyramin. (A) Kontrollratte, 90 g, ♂, Herzfrequenz 450/min. (B) Ratte unter Thiaminmangel, 110 g, ♂, Herzfrequenz 246/min. T, Tyramin (1 µg), NA, Noradrenalin (0,1 µg).

Zuerst wurde aber der Unterschied des gesamten Katecholamingehalts bei pH 6,3 (wobei Noradrenalin als Maßstab gemessen wurde) zwischen der kontroll- und der kalorienarm gefütterten Gruppe untersucht. Dabei wurde keine signifikante Veränderung im Gehalt gefunden (Tabelle I).

In Tabelle II ist der Noradrenalin- und Adrenaliningehalt verschiedener Organgewebe angegeben. Daraus ist ersichtlich, dass der Katecholamingehalt des Herzens (Vorhof und ebenso Ventrikel), der Hirnrinde und der Milz in

der Gruppe unter Thiaminmangel auffallend erhöht war, dagegen im Hirnstamm und in den Nebennieren unverändert blieb. Es ist noch zu erwähnen, dass im Vorhof nur der Noradrenalinwert gesteigert war, während in der Kammer auch der Gehalt an Adrenalin zusammen mit dem von Noradrenalin zugenommen hat.

Die Organgewichte von Milz und Testes waren in der Gruppe unter Thiaminmangel reduziert, dagegen war in der Gruppe mit beschränkter Kalorienaufnahme eine Organgewichtsreduktion der Milz, Testes und Leber nachweisbar.

Um die Wirkung einer Thiamininjektion auf den erhöhten Katecholamingehalt im Organgewebe von Ratten unter Thiaminmangel zu bestimmen, wurde 4 mg/kg Thiamin-HCl s.c. verabreicht. Fünf Stunden nach der Injektion, wobei die zugenommene Brenztraubensäure im Gewebe bei Thiaminmangelratten schon herabgesetzt war (Tabelle III), wurde der Katecholamingehalt verschiedener Organe bestimmt.

Tabelle II zeigt keine Änderung des Katecholamingehaltes im Gewebe nach Thiamininjektion. Aus diesem Befund wird gefolgert, dass der erhöhte Katecholamingehalt nicht durch die Zunahme von Brenztraubensäure im Gewebe entstanden ist.

Über den Katecholamingehalt bei Thiaminmangelratten ist schon einmal von GOODALL¹⁹ berichtet worden; er hat eine Verminderung von Adrenalin in der Neben-

Tabelle I. Katecholamingehalt in Geweben von Ratten unter beschränkter Kalorienzufuhr (µg/g)

		Kontrolle ^a	Beschränkte Kalorienzufuhr
Herz	Vorhof	1,31 ± 0,14 (6)	1,08 ± 0,21 (6)
	Ventrikel	0,34 ± 0,12 (3)	0,62 ± 0,14 (4)
Gehirn	Rinde	0,26 ± 0,04 (4)	0,34 ± 0,05 (6)
	Stamm	0,58 ± 0,09 (4)	0,49 ± 0,09 (6)
Nebenniere		1063,0 ± 107,9 (6)	877,4 ± 76,4 (5)
Milz		0,40 ± 0,03 (6)	0,60 ± 0,09 (6)

^a 3 mg Thiamin-HCl in 1 kg Thiaminmangel-Grundfutter. Ziffer: Mittelwert ± mittlerer Fehler. Anzahl der Gruppen in Klammern. Pro Gruppe 3–4 Ratten.

¹⁹ C.Mc GOODALL, Acta physiol. scand. 24, Suppl. 85 (1951).

Tabelle II. Katecholamingehalt in Geweben von Ratten unter Thiaminmangel (µg/g)

		Kontrolle ^a		Thiaminmangelfutter		Thiamininjektion ^b	
		Noradrenalin	Adrenalin	Noradrenalin	Adrenalin	Noradrenalin	Adrenalin
Herz	Vorhof	1,31 ± 0,14 (7)	0,39 ± 0,19 (7)	2,65 ± 0,37 (6) ^c	0,43 ± 0,17 (6)	2,49 ± 0,46 (5)	0,48 ± 0,19 (5)
	Ventrikel	0,21 ± 0,09 (7)	0,07 ± 0,02 (7)	0,51 ± 0,15 (6) ^c	0,29 ± 0,14 (6) ^c	0,48 ± 0,19 (6)	0,26 ± 0,11 (6)
Gehirn	Rinde	0,26 ± 0,04 (7)	0	0,49 ± 0,07 (5) ^c	0	0,47 ± 0,09 (5)	0
	Stamm	0,58 ± 0,09 (7)	0	0,64 ± 0,09 (5)	0	0,65 ± 0,11 (5)	0
Nebenniere		508,7 ± 49,3 (7)	62,37 ± 5,95 (7)	517,6 ± 44,7 (5)	69,85 ± 7,85 (5)	509,4 ± 67,2 (5)	59,9 ± 6,85 (5)
Milz		0,40 ± 0,03 (7)	0	1,21 ± 0,13 (5) ^c	0	1,23 ± 0,12 (5)	0

^a 3 mg Thiamin-HCl in 1 kg Thiaminmangel-Grundfutter. ^b Thiamin-HCl 4 mg/kg s.c. ^c Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ($P < 0,05$). Ziffer: Mittelwert ± mittlerer Fehler. Anzahl der Gruppen in Klammern. Pro Gruppe 3–4 Ratten.

Tabelle III. Brenztraubensäuregehalt in Geweben von Ratten unter Thiaminmangel (µg/g)

		Kontrolle ^a	Thiaminmangelfutter	Thiamininjektion ^b
Herz	Ventrikel	17,28 ± 3,67 (7)	26,37 ± 0,84 (7) ^c	18,91 ± 1,86 (7) ^d
Gehirn	Rinde	7,82 ± 0,61 (4)	9,93 ± 1,06 (4) ^c	8,35 ± 0,72 (5) ^d
	Stamm	11,24 ± 0,83 (4)	14,26 ± 1,20 (4)	10,56 ± 1,92 (5)
	Kleinhirn	10,25 ± 2,38 (4)	15,96 ± 2,38 (4) ^c	11,96 ± 0,94 (5) ^d
Milz		20,93 ± 1,57 (5)	33,98 ± 4,79 (5) ^c	45,29 ± 8,65 (5) ^{c,d}
Leber		14,65 ± 1,93 (5)	24,39 ± 1,90 (5) ^c	16,95 ± 2,16 (5) ^d

^a 3 mg Thiamin-HCl in 1 kg Thiaminmangel-Grundfutter. ^b Thiamin-HCl 4 mg/kg s.c. ^c Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ($P < 0,05$). ^d Signifikanter Unterschied zur Thiaminmangelfutter-Gruppe ($P < 0,05$). Ziffer: Mittelwert ± mittlerer Fehler. Anzahl der Gruppen in Klammern.

niere und eine Zunahme von Katecholamin im Herzen beobachtet. LINÉ², WIDHALM und HERTTING²⁰ berichteten über Katecholamingehalt bei Thiaminmangeltauben, wobei sie auch Untersuchungen am Gehirn durchgeführt haben. Aber es gibt noch keine Berichte über genauere Analysen des Katecholamingehalts in den anderen Organen bei Thiaminmangeltieren. Der Mechanismus des erhöhten Katecholamingehalts in Organen unter Thiaminmangel bleibt noch unverständlich und bedarf weiterer Klärung.

Aus den dargelegten Beobachtungen dürfen folgende Schlüsse gezogen werden: (1) Bei Ratten unter Thiaminmangel wurde ein erhöhter Katecholamingehalt im Vorhof, Ventrikel, ferner in der Grosshirnrinde und Milz festgestellt, jedoch nicht im Hirnstamm und den Nebennieren. (2) Die verstärkte Reaktion des Herzens unter Thiaminmangel auf Tyramin ist höchstwahrscheinlich durch den hohen Katecholamingehalt bedingt, der durch den Thiaminmangel hervorgerufen wurde. (3) Der erhöhte Katecholamingehalt bei Thiaminmangelratten ist nicht durch die Zunahme von Brenztraubensäure im Gewebe entstanden.

Summary. (1) The increased tissue catecholamine level of the thiamine deficient rat was shown in the atrium, the ventricle, the brain cortex and in the spleen but not in the brain stem and the adrenal gland. (2) The increased response to tyramine of the thiamine deficient heart is most probably due to the high catecholamine level caused by thiamine deficiency. (3) The increased catecholamine content in the thiamine deficient rat does not result from the increased pyruvic acid.

H. IWATA, S. FUJIMOTO,
T. NISHIKAWA und K. HANO

Pharmakologisches Institut der Pharmazeutischen Fakultät, Osaka-Universität, Toyonaka, Osaka-fu (Japan), 23. September 1967.

²⁰ O. LINÉ, S. WIDHALM und G. HERTTING, *Int. J. Neuropharmac.* 6, 337 (1967).

The Influence of Partial Synchronization of Cell Growth on the Inhibition of L1210 Cell Viability by Mouse Thymus DNA

Several laboratories have reported inhibition of cell viability and tumor growth by exogenous DNA¹⁻⁹. Only specific kinds of DNA were found to be capable of acting against certain cell lines. The lethal effects of DNA could be reduced or even prevented by altering the incubation conditions^{3,4,10}. The present investigation suggests that the life cycle of the L1210 cell is another variable which regulates the inhibition of cell viability by mouse thymus DNA.

DBA₂ mouse thymus DNA was isolated and treated with RNase following the method of SZYBALSKA and SZYBALSKI¹¹. In some cases H³-DNA was prepared, after mice had been injected each with 25 μ curies of H³-thymidine¹².

L1210 leukemia cells were grown in spinner flasks containing medium RPMI No. 1634 + 5% fetal calf serum. Partial synchronization of the L1210 culture was induced by lowering the cell population to $1.5\text{--}2.5 \times 10^5$ cells/ml and then incubating the culture for 6 h at 37°C with 10^{-6} M 5-fluorodeoxyuridine (FUDR). After incubation with FUDR, 10^{-4} M thymidine was added to the culture¹³. Cells were removed either from partially synchronized cultures at 6.33, 10.5 and 14 h or from asynchronous cultures. The cells were washed and incubated at 37°C in 4 ml of phosphate-buffered saline (pH 7.5) containing 5.5 mM glucose and 0.2 mM spermine tetrahydrochloride¹¹. The cell concentration was around 1.2×10^6 cells/ml. The cells were treated for 30 min with or without DNA (approximately 58 μ g of DNA/ 10^6 cells) and then washed and reincubated in DNA-free, phosphate-buffered saline + glucose. Cell counts were taken at various time intervals, and cell viability was determined by means of trypan blue staining³.

Uptake of DNA was measured by exposing cells to H³-DNA for 30 min. Aliquots were removed at 0 and 30 min, and were washed thrice¹². Radioactivity was determined by means of a Packard liquid scintillation counter.

L1210 DNA was isolated from partially synchronized cells by the method of SCHNEIDER¹⁴ and was analyzed by means of the diphenylamine test¹⁴.

Figure 1a demonstrates that the DNA content of the partially synchronized L1210 cells nearly doubled 2 h after addition of thymidine to a FUDR-treated culture. Figure 1b represents the growth curves of partially synchronized cultures. One treatment, first with FUDR and then with thymidine, induced at least 2 cycles of partial synchrony. Each cycle was about 15 h long, compared to the normal doubling time of 14 h. If the S phase (length of time for DNA synthesis) occurred 6–8 h after addition of FUDR, and the M phase (length of mitosis) lasted from 11–15 h, then the G₂ phase (length of time between DNA synthesis and mitosis) must have taken place at 8–11 h.

Figure 2a demonstrates the inhibition of cell viability caused by mouse thymus DNA at various phases of cell growth. The degree of inhibition was measured as the % change between the number of viable DNA-treated cells and the number of viable control cells at 90 and 120 min after removal of the DNA. In each group data obtained at both of these times were combined, since within this time interval there was hardly any change in

¹ J. L. GLICK and A. P. SALIM, *Nature* 213, 676 (1967).

² J. L. GLICK and A. R. GOLDBERG, *Science* 149, 997 (1965).

³ J. L. GLICK and A. R. GOLDBERG, *Trans. N.Y. Acad. Sci.* 28, 741 (1966).

⁴ J. L. GLICK, *Cancer Res.* 27, 175 (1967).

⁵ J. L. GLICK, *Cancer Res.*, in press.

⁶ R. M. HALPERN, B. C. HALPERN, G. CILIV and R. A. SMITH, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24, 559 (1966).

⁷ G. I. FLOERSHEIM, *Experientia* 18, 328 (1962).

⁸ A. G. SMITH, *Cancer Res.* 24, 603 (1964).

⁹ A. G. SMITH and H. R. CRESS, *Lab. Invest.* 10, 898 (1961).

¹⁰ J. L. GLICK, *Expl Cell Res.* 45, 690 (1967).

¹¹ E. H. SZYBALSKA and W. SZYBALSKI, *Proc. natn. Acad. Sci., U.S.A.* 48, 2026 (1962).

¹² J. L. GLICK, *Cancer Res.*, in press.

¹³ E. W. TAYLOR, *Expl Cell Res.* 40, 316 (1965).

¹⁴ W. SCHNEIDER, in *Methods in Enzymology* (Ed. S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN; Academic Press Inc., New York 1957), vol. 3, p. 680.