

Veränderungen des Glucoseabbaus in Kaninchenaorten unter dem Einfluss von Biguaniden

Die Existenz des Dickens-Horrecker-Abbauweges der Glucose in Arterien gewebe ist seit längerem bekannt (KIRK et al.¹; SBARRA et al.²; BEACONSFIELD³; MANDEL und KEMPF⁴; RITZ⁵), wenn auch auf Grund neuerer Untersuchungen sein Anteil am Gesamtabbau der Glucose verhältnismässig gering ist. In der vorliegenden Arbeit wurde die Beeinflussung des Dickens-Horrecker-Shunts durch Biguanide untersucht.

Material und Methode. Ausgewachsene männliche Kaninchen wurden durch Luftembolie getötet und die Aorten sofort unter sterilen Bedingungen entfernt. Die Intima-Media-Schicht wurde bei Raumtemperatur abpräpariert und Ringe von Aortengewebe (Gewicht pro Ansatz etwa 20 mg; maximale Dicke zwischen 200 und 300 μ bei Gefrierschnittkontrolle) wurden zur Inkubation verwandt. Die Inkubation erfolgte in Packard-Zählgefässen nach 10 min Begasung mit Sauerstoff in 0,5 ml Krebs-Ringer-Lösung bei einem pH von 7,4 mit 2 μ M Glucose, 1000 I.E. K-Penicillin und 100 γ Streptomycin unter sterilen Bedingungen bei 37,0°C in einem Gallenkamp-Schüttelwasserbad. Nach einer Vorinkubationsperiode von 10 min in Sauerstoffatmosphäre wurde radioaktiv markierte Glucose⁶ zugegeben. Das Gefäss wurde mit einem Gummistopfen, in den ein Glasgefäss mit 0,1 ml Hydroxide of Hyamine eingestochen worden war, verschlossen. Der Rand zwischen Gummistopfen und Glasgefäss wurde mit Siegelack abgedichtet. Das Endvolumen betrug 0,55 ml bei einem Totalglucosegehalt von 2,237 μ M (Glucose-1-C¹⁴) bzw. 2,209 μ M (Glucose-6-C¹⁴) sowie einer Aktivität von 0,375 μ C. Nach 3 h wurden 0,1 ml 1 N H₂SO₄ durch den Gummistopfen injiziert und die Reaktion hierdurch beendet. Anschliessend wurde das Gefäss für weitere 30 min im Schüttelwasserbad belassen, um eine quantitative Absorption von CO₂ zu gewährleisten. Nach Entfernung des Gummistopfens wurde das Glasgefäss unmittelbar in ein Packardzählgefäss mit 10 ml Szintillatorflüssigkeit gegeben (0,5% PPO, 0,05% Dimethyl-POPOP in Toluol) und in einem Packard-Tricarb bis zu einer statistischen Fehlergrenze von 1% gezählt. Durch Zugabe eines inneren Standards wurde für Quenching korrigiert.

Ergebnisse und Diskussion. Die CO₂-Bildung aus an C-Atom 1 und 6 markierter Glucose in einem Medium mit 4 μ g und 500 μ g Biguanid (Buformin) ist in Tabelle I und II wiedergegeben.

Über Veränderungen des Glucoseabbaus unter dem Einfluss von Biguaniden wurden verschiedene Beobachtungen gemacht. Unter Verwendung toxischer Dosen (100–500 μ g/ml Inkubationsmedium) werden die oxydativen Vorgänge des Krebszyklus unterdrückt (TYBERGHEIM und WILLIAMS⁷; STEINER und WILLIAMS⁸; KRUGER et al.⁹ und UNGAR et al.¹⁰). Die Hemmung der Endoxydation führt zu einer Steigerung der anaeroben Glycolyse (WILLIAMS et al.¹¹; TYBERGHEIM und WILLIAMS⁷; SÖLING und CREUTZFELD¹²). Mit Konzentrationen, wie sie bei der therapeutischen Anwendung der Biguanide erreicht werden (1–5 μ g/ml), wurde am Fettgewebe die Insulinwirkung in bezug auf die Glucose-1-Oxydation aufgehoben (DITSCHUNEIT et al.¹³). Ähnlich wird auch in Erythrocyten, deren Glucoseabbau vorwiegend über den Dickens-Horrecker-Shunt erfolgt, durch Biguanide eine totale Hemmung der Atmung erreicht (KREBS et al.¹⁴), ein Effekt, der sich durch Methylenblau aufheben lässt. Da in der Gefässwand wahrscheinlich vorwiegend durch den Dickens-Horrecker-Shunt das zur reduktiven Synthese der Fettsäuren notwendige reduzierte Triphosphopyridinnukleotid geliefert wird, ist eine etwaige Beeinflussung dieses Stoffwechselweges in der Gefässwand von ganz besonderem Interesse.

Bis heute ist nämlich noch nicht endgültig geklärt, welche Rolle die lokale Synthese der Fettsäuren in der Gefässwand bei der Entstehung der Arteriosklerose spielt.

Tabelle I. CO₂-Bildung* aus C₁- und C₆-markierter Glucose mit 4 μ g Biguanid im Inkubationsmedium

Versuchsnummer	Biguanid		Kontrolle	
	Glucose-1-C ¹⁴	Glucose-6-C ¹⁴	Glucose-1-C ¹⁴	Glucose-6-C ¹⁴
1	303,0	76	215	51,8
2	225,5	41,3	164,3	54,2
3	198,0	55,3	151	58
4	108,0	87,5	130,5	51
5	182,0	25,8	238	41,4
MW \pm (SEM)	203,3 \pm 31,5	57,2 \pm 11,2	180 \pm 20,2	51,3 \pm 2,76
C ₁ /C ₆	203,3 : 57,2 = 3,5		180 : 51,3 = 3,5	

* ausgedrückt als 10⁻¹² M/mg Trockengewicht (3 h).

Tabelle II. CO₂-Bildung* aus C₁- und C₆-markierter Glucose mit 500 μ g Biguanid im Inkubationsmedium

Versuchsnummer	Biguanid		Kontrolle	
	Glucose-1-C ¹⁴	Glucose-6-C ¹⁴	Glucose-1-C ¹⁴	Glucose-6-C ¹⁴
6	162	149	280	165
7	105	78	382	212
8	117	67,2	478	112
9	162	54,2	302	72,2
10	109	—	218	40
11	182	114	233	61
MW \pm (SEM)	140,5 \pm 14,1	91,88 \pm 17,3	315,5 \pm 41,0	110,4 \pm 27,3
C ₁ /C ₆	140,5 : 91,88 = 1,53		315,5 : 110,3 = 2,86	

* ausgedrückt als 10⁻¹² M/mg Trockengewicht (3 h).

¹ J. E. KIRK, J. WANG und N. BRANDSTRUP, J. Geront. 14, 25 (1959).

² A. J. SBARRA, R. F. GILFILAN und W. A. BARDWILL, Biochem. biophys. Res. Commun. 3, 311 (1960).

³ P. BEACONSFIELD, Experientia 18, 274 (1962).

⁴ P. MANDEL und E. KEMPF, J. Atheroscler. Res. 3, 233 (1963).

⁵ E. RITZ, J. Atheroscler. Res., in Vorbereitung.

⁶ D-Glucose-(1-C 14) und D-Glucose-(6-C 14), Buchler & Co., Braunschweig.

⁷ J. M. TYBERGHEIM und R. H. WILLIAMS, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 96, 29 (1957).

⁸ D. F. STEINER und R. H. WILLIAMS, Biochim. biophys. Acta 30, 329 (1958).

⁹ F. A. KRUGER, T. G. SKILLMANN und G. S. HAMWI, Diabetes 9, 17 (1960).

¹⁰ G. UNGAR, S. PSYCHOYOS und H. A. HALL, Metabolism 9, 36 (1960).

¹¹ R. S. WILLIAMS, J. M. TYBERGHEIM, P. M. HEYDE und R. L. NIELSEN, Metabolism 6, 311 (1957).

¹² D. H. SÖLING und W. CREUTZFELD, Int. Biguanid-Symp. 1960 (Georg Thieme Verlag, Stuttgart).

¹³ H. DITSCHUNEIT, E. F. PFEIFFER und H. G. ROSENBECK, Klin. Wschr. 39, 71 (1961).

¹⁴ R. KREBS, H. DITSCHUNEIT und W. FRITSCHKE, Gastroenterologia, Basel, Suppl. Vol. 104, 204 (1965).

Unsere Ergebnisse zeigen zunächst eine erhebliche Resistenz des oxydativen Glucoseabbaus gegen die depressorische Wirkung «toxischer» Biguaniddosen. Mit 4 µg/ml Inkubationsmedium wurde keine signifikante Verminderung, mit 500 µg/ml eine deutliche, jedoch nicht völlige Hemmung der CO₂-Bildung beobachtet. Die CO₂-Bildung aus C-1-Stellung am Glucosemolekül wurde stärker erniedrigt als aus C-6-Stellung, was auf eine relativ stärkere Beeinflussung des Dickens-Horrecker-Shunts schliessen lässt. Mit Konzentrationen, wie sie bei der therapeutischen Anwendung der Biguanide üblich sind (1–5 µg/ml) liessen sich keine signifikanten Veränderungen der CO₂-Bildung beobachten.

Nach unseren Untersuchungen ist es unwahrscheinlich, dass eine Beeinflussung der Arteriosklerose Biguanid-behandelter Diabetiker auf dem Wege der Fettsäuresynthese in der Gefässwand stattfindet¹⁵.

Summary. The influence of biguanides on glucoseoxidation was studied in intima-preparations of rabbit aortae. With high doses (500 µg/ml) an inhibition of CO₂-formation predominantly from position C-1 of glucose was found. With 4 µg/ml there was no significant change of CO₂-formation from glucose.

E. RITZ, R. SANWALD und P. WAHL

Medizinische Universitätsklinik (Ludolf-Krehl-Klinik),
69 Heidelberg (Deutschland), 28. Dezember 1967.

¹⁵ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Untersuchungen zur Verbreitung von Indolglucosinolaten in Cruciferen

GMELIN und VIRTANEN¹ hatten 1961 als erste die Existenz von Indolglucosinolaten (Glucobrassicin und Neoglucobrassicin) in Brassica-Arten nachgewiesen. Inzwischen fand man diese Verbindungen in weiteren Vertretern der Cruciferen, Resedaceen, Capparidaceen und Tovariaceen^{2,3}. Dagegen fehlen Indolglucosinolate in Caricaceen, Tropaeolaceen, Limnathaceen und Moringaceen^{3,4}.

Im Verlauf unserer Untersuchungen zur Verbreitung der Indolglucosinolate häuften sich Hinweise, dass diese Verbindungen vor allem für die jungen, speziell etiolierten Keimlinge typisch sind, während ihre Syntheserate und ihr Gehalt mit zunehmendem Alter der Pflanze abnehmen. Die zunächst als Hauptglucosinolat vorhandenen Indolderivate werden dann durch die bekannten, artspezifischen Spektren der Glucosinolatzusammensetzung abgelöst. Erst im Verlauf der Ontogenie kommt es zu einer fortschreitenden Chemodifferenzierung der jeweiligen Spezies (siehe auch ⁵).

Es galt zu überprüfen, inwieweit diese zunächst an einigen Arten gemachten Beobachtungen verallgemeinert werden dürfen. Dazu wurden jeweils 0,4 bis 0,8 g FG etiolierte Keimlinge von 50 Arten der Familie Cruciferae in S-35-Sulfat (0,5 µC/ml; trägerfrei) bzw. 2-C-14-Indol (0,4 µC/ml; 1 µC/0,5 Mol) flottierend im Dunkeln bei 24°C inkubiert. Auf 20 h Inkubationszeit folgte eine weitere Umsetzungszeit von 24 h. Anschliessend wurden die Keimlinge nach GMELIN und VIRTANEN¹ extrahiert, die Extrakte auf ein konstantes Volumen von 2 ml eingengt und aliquote Mengen einer papierchromatographischen Auftrennung unterworfen.

Der Nachweis der Indolglucosinolate erfolgte durch vergleichende Papierchromatographie in 2 Systemen (Butanol, Eisessig, Wasser 4:1:2; Isopropanol, Ammoniak, Wasser 8:1:1) in Verbindung mit spezifischen Farbreaktionen⁶, in Zweifelsfällen auch durch Spaltung der entstandenen Produkte mit Myrosinase und Nachweis der Umsetzungsprodukte (S-35-Rhodanid, C-14-Hydroxymethylindol, C-14-Diindolylmethan bzw. C-14-Ascorbigen¹). Ein Vergleich der jeweiligen Syntheserate der Indolglucosinolate mit der Rate anderer Senfölglicoside war durch quantitative Bestimmung der Einbaurate von S-35-Sulfat in die einzelnen Komponenten möglich.

Die Verbreitung von Glucobrassicin und Neoglucobrassicin innerhalb der untersuchten Arten ist in der Tabelle zusammengefasst.

Generell werden die bisher erzielten Ergebnisse durch die neuen Untersuchungen bestätigt. In fast allen jungen etiolierten Keimlingen der Cruciferen waren Glucobrassicin bzw. Neoglucobrassicin in nachweisbaren Mengen vorhanden.

Eine interessante Ausnahme ist zweifellos *Camelina sativa*, die auch bei hohen Aufnahmeraten von S-35-Sulfat bzw. hoher Syntheserate von C-14-Tryptophan aus dem gefütterten C-14-Indol keine nachweisbaren Mengen an Glucobrassicin bzw. Neoglucobrassicin enthält. Dies ist auch nach einer Verlängerung der Umsetzungszeit auf 72 h nicht der Fall, so dass zumindest dem jungen, etiolierten Keimling dieser Spezies die Fähigkeit zur Synthese von Indolglucosinolaten zu fehlen scheint. Da gleichzeitig hohe Einbauraten von S-35-Sulfat in indolfreie Glucosinolate nachweisbar sind, scheint diese Spezies hinsichtlich ihres Glucosinolathaushalts eine ausgezeichnete Stellung einzunehmen.

Dies ist zweifellos nicht der Fall bei einigen *Draba*-Arten, deren methanolische Extrakte ebenfalls negative Farbreaktionen auf Indolglucosinolate geben. Im Gegensatz zu *Camelina* zeigen diese hohe S-35- bzw. C-14-Markierungsraten im Rf-Bereich des Glucobrassicins. Es muss daher angenommen werden, dass auch hier Indolglucosinolate die primären Senfölglicoside des jungen Keimlings sind, dass aber die vorhandenen Mengen für eine Farbreaktion nicht ausreichen.

Damit erwies sich, mit Ausnahme von *Camelina sativa*, in 49 aus 50 untersuchten Arten Glucobrassicin als das durch die höchste Syntheserate im jungen etiolierten Keimling ausgezeichnete Glucosinolat. Alle weiteren durch S-35-Markierung und Umsetzung mit Myrosinase gekennzeichneten Senfölglicoside sind zumindest in diesem Entwicklungsstadium von geringerer Bedeutung.

Ob die im Verlauf der Ontogenie einsetzende Chemodifferenzierung und die damit erfolgende Synthese neuer

¹ R. GMELIN und A. I. VIRTANEN, Suomal. Tiedekad. Toim. A II, No. 107, 25 (1961).

² M. KUTACEK, Fiziologiya Rast. 11, 867 (1964).

³ H. SCHRAUDOLF, Experientia 21, 520 (1965).

⁴ H. SCHRAUDOLF, Experientia 23, 103 (1967).

⁵ E. JOSEFSON, Phytochemistry 6, 1617 (1967).

⁶ H. SCHRAUDOLF und F. BERGMANN, Planta 67, 75 (1965).