

Die Reversibilität der Wirkung von Digitoxin, Strophanthidin und Strophanthidin-3-bromazetat am Papillarmuskel und einer mikrosomalen $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -aktivierbaren ATPase des Meerschweinchens

In einer Reihe von Untersuchungen vertreten REPKE et al. die Ansicht, dass der Digitalisrezeptor mit einer $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -stimulierbaren ATPase in der Zellmembran identisch ist¹⁻⁴. Diese Hypothese basiert auf Beobachtungen an isolierter ATPase verschiedener Organherkunft, deren $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -stimulierbare Aktivität durch Herzglykoside spezifisch gehemmt werden kann. Dieser Hemmeffekt lässt sich der jeweiligen kardiotonen Wirksamkeit verschiedener Substanzen und der Digitalisempfindlichkeit verschiedener Spezies korrelieren⁵⁻¹⁰.

In diesen Untersuchungen wurde jedoch für verschiedene herzwirksame Substanzen immer nur das Ausmass der Hemmung der $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATPase mit der kardiotonen Wirksamkeit dieser Substanzen verglichen. Die bekannten Unterschiede in der Haftung verschiedener Herzglykoside am Herzmuskel wurden an diesem System bisher nicht geprüft. Wir untersuchten deshalb die Reversibilität der ATPase-Hemmung und der inotropen Wirkung für drei derartige Substanzen mit unterschiedlichen pharmakokinetischen Eigenschaften: Die Wirkungen von Digitoxin als stark haftende und Strophanthidin als schwach haftende Substanz wurden verglichen mit dem Effekt von Strophanthidin-3-bromazetat, einem von uns synthetisierten halogenierten Ester des Strophanthidins¹¹, der von HOKIN et al.^{11,12} als irreversibler Hemmstoff der $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -stimulierbaren mikrosomalen ATPase des Meerschweinchens beschrieben wurde.

Methode. Die Messung der inotropen Wirkungen wurde an isolierten Papillarmuskeln des Meerschweinchengerzens vorgenommen. Die Präparate wurden in einem 5 ml fassenden Organbad 45 min in karbogendurchperlter modifizierter Tyrodösung äquilibriert (5,4 mM K^+ , 1,8 mM Ca^{++} ; Badtemperatur 30 °C, Vorspannung 500 mg, Reizfrequenz 60/min). Dann wurden Digitoxin, Strophanthidin oder Strophanthidin-3-bromazetat (jeweils gelöst in Propandiol-1,2) kumulativ hinzugefügt, bis der Maximalwert der positiv inotropen Wirkung erreicht war. Anschliessend wurden diese Substanzen in einem 70 ml fassenden Organbad mit Tyrodösung ausgespült, bis die Ausgangskontraktionsamplitude wieder erreicht war. Die Wirkung auf die $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATPase wurde entsprechend dem Vorgehen von KUPCHAN et al.¹² an einem aus dem Meerschweinchenshirn isolierten Enzympräparat untersucht.

Die Hemmung der ATPase-Aktivität durch die 3 Prüfsubstanzen wurde nach Inkubation (30 min, 37 °C) von 200 µg ATPase in 0,9 ml Imidazol-HCl-Puffer (125 mM, pH 7,1) mit Zusatz von 0,1 ml der Stammlösungen der Substanzen im Vergleich zu Kontrollansätzen ermittelt, denen 0,1 ml Propandiol-1,2 zugesetzt wurde. Die Ansätze wurden nach dieser Vorbehandlung zweimal mit je 12 ml eiskalter Auswaschlösung (Saccharose 250 mM, EDTA 2 mM) versetzt und bei 78 500 g 60 min zentrifugiert. Der Rückstand wurde jeweils in 2 ml Imidazol-HCl-Puffer suspendiert und zur ATPase-Messung verwendet. Die Messung der Gesamtaktivität vorinkubierter gewaschener und nicht gewaschener Ansätze erfolgte bei 37 °C in einem Medium mit 2 mM MgCl_2 , 80 mM NaCl, 16 mM KCl, 80 mM Imidazol-HCl-Puffer (pH 7,1), 2 mM Tris-ATP und einer Proteinkonzentration von 50 µg/ml. Die Basalaktivität wurde in entsprechenden Ansätzen ohne Na^+ und K^+ bestimmt. Die Reaktion wurde durch Zusatz 5%iger Trichloressigsäure beendet. Die Enzymaktivität wurde durch Messung des freigesetzten Phosphats¹³ bestimmt ($\mu\text{mol PO}_4^{2-}/\text{h} \times \text{mg Protein}$) und in Prozent der jeweiligen Kontrollansätze ausgedrückt.

Ergebnisse. Die Dosiswirkungskurven am Meerschweinchens-Papillarmuskel ergaben einen maximalen positiv inotropen Effekt (piE) für Digitoxin bei $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ ($97 \pm 11\%$ piE, $n = 10$), für Strophanthidin bei $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ ($83 \pm 12\%$ piE, $n = 8$) und für Strophanthidin-3-bromazetat bei $4 \times 10^{-5} \text{ M}$ ($89 \pm 11\%$ piE, $n = 7$). Die Auswaschkurven dieser inotropen Wirkungen verliefen unterschiedlich schnell: Digitoxin wies den langsamsten, Strophanthidin den schnellsten Wirkungsverlust auf, Strophanthidin-3-bromazetat nahm eine intermediaire Stellung ein (Figur). Die Hemmung der $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATPase wurde durch höhere, deutlich hemmende Konzentrationen dieser 3 Substanzen vorgenommen. Äquivalente Effekte (61–64% Hemmung) wurden erzielt mit Digitoxin 10^{-4} M , Strophanthidin $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ und Strophanthidin-3-bromazetat 10^{-4} M (Figur). Digitoxin und Strophanthidin hatten dabei keinen sicheren Einfluss auf die Basalaktivität, Strophanthidin-3-bromazetat bewirkte eine deutliche Verminderung (um $47 \pm 17\%$, $n = 6$).

Die Auswaschversuche ergaben eine nahezu vollständige Aufhebung des durch Digitoxin oder Strophanthidin bedingten Hemmeffektes auf die $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATPase, während die Hemmung durch Strophanthidin-3-bromazetat unter denselben Bedingungen nicht beseitigt wurde (Figur).

Diskussion. Diese Befunde lassen ein deutlich unterschiedliches Verhalten im zeitlichen Kurvenverlauf der untersuchten Substanzen am Papillarmuskel und an der $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATPase während des Auswaschens erkennen. Während die Strophanthidin- und Digitoxinwirkung in beiden Systemen aufgehoben werden kann, ist eine deutliche Diskrepanz mit Strophanthidin-3-bromazetat festzustellen: Der Effekt am Herzmuskel klingt wesentlich rascher ab als die Wirkung von Digitoxin, die Hemmung der ATPase wurde dagegen durch zweistündiges Waschen nicht beseitigt, während die Digitoxinwirkung auch an diesem System nahezu vollständig ausgewaschen werden kann. Dieser Befund bestätigt die Auffassung von KUPCHAN et al.¹², wonach Strophanthidin-3-bromazetat ein irreversibler Hemmer der $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATPase sein soll. Es zeigt sich somit ein deutlicher Unterschied in der Wirkungsdauer der untersuchten Substanzen am Herzmuskel und an der mikrosomalen $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATPase aus Meerschweinchenshirn. Ausserdem ist das Verhältnis der äqui-

¹ H. J. PORTIUS und K. REPKE, Arch. exp. Path. Pharmak. 243, 335 (1962).

² K. REPKE und H. J. PORTIUS, Experientia 19, 452 (1963).

³ K. REPKE, Internist 7, 418 (1966).

⁴ K. REPKE, 2nd Internat. Pharmacol. Meeting (Pergamon Press, 65, 1965).

⁵ I. HERRMANN, H. J. PORTIUS und K. REPKE, Arch. exp. Path. Pharmak. 247, 1 (1964).

⁶ K. REPKE und H. J. PORTIUS, Arch. exp. Path. Pharmak. 241, 535 (1961).

⁷ K. REPKE und H. J. PORTIUS, Arch. exp. Path. Pharmak. 245, 59 (1963).

⁸ I. M. GLYNN, Pharmac. Rev. 16, 381 (1964).

⁹ H. DRANSFIELD, K. GREEFF und V. CAUTIUS, Arch. exp. Path. Pharmak. 254, 225 (1966).

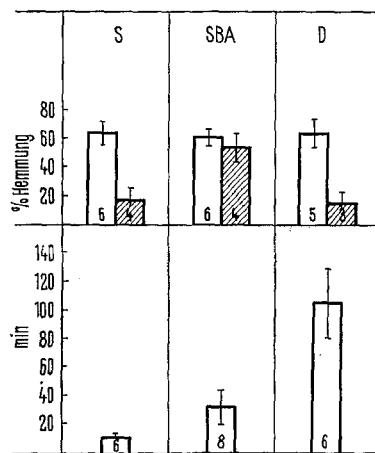
¹⁰ K. GREEFF und E. SCHLIEPER, Archs int. Pharmacodyn. Thér. 166, 350 (1967).

¹¹ L. E. HOKIN, M. MOKOTOFF und S. M. KUPCHAN, Proc. natn. Acad. Sci. 55, 797 (1966).

¹² S. M. KUPCHAN, M. MOKOTOFF, R. S. SANDHU und L. E. HOKIN, J. med. Chem. 10, 1025 (1967).

¹³ K. LOHMANN und P. LANGEN, Biochem. Z. 328, 1 (1956).

effektiven Konzentrationen der drei untersuchten Substanzen für beide Systeme verschieden. Für die inotrope Wirkung ergibt sich eine Relation für Digitoxin:Stroph-



Oben. Prozentuale Hemmung der Aktivität des $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -stimulierten Anteils einer mikrosomalen ATPase aus dem Meerschweinchenhirn durch Strophanthidin (S) $2 \times 10^{-4} M$, Strophanthidin-3-bromazetat (SBA) $10^{-4} M$ und Digitoxin (D) $10^{-4} M$ (Dreifachbestimmung). Helle Säulen: Hemmung nach 20 min Einwirkung dieser Substanzen. Dunkle Säulen: Hemmung nach 2ständigem Auswaschen der Substanzen.

Unten. Zeitdauer des Auswaschens von 90% des maximalen positiven inotropen Effektes am Papillarmuskel des Meerschweinchens. Einzelheiten siehe Text.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung der Mittelwerte aus der jeweils in den Säulen angeführten Zahl von Versuchen.

anthidin:Strophanthidin-3-bromazetat wie 1:10:20, für die Hemmwirkung auf die ATPase dagegen wie 1:2:1. Diese Beobachtungen lassen eine gewisse Vorsicht beim Vergleich kardiotoner Effekte mit der Wirkung auf isolierte Membran-ATPase angebracht erscheinen, entweder weil gewisse Eigenschaften der Membran-ATPase verschiedener Organherkunft verschieden sind (trotz prinzipiell gleichartiger Hemmwirkung der Herzglykoside), oder weil die Wirkung auf isolierte ATPase nicht vergleichbar ist mit der Wirkung auf die Funktion des intakten Organs¹⁴.

Summary. The reversibility of the inhibitory action of strophanthidin, strophanthidin-3-bromoacetate, and digitoxin on the $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATPase activity (microsomal fraction, guinea-pig brain) was compared with the rate of decline of their positive inotropic effects (papillary muscle, guinea-pig heart) after exposure to drug-free solution. The actions of strophanthidin and digitoxin were easily reduced on both systems. Strophanthidin-3-bromoacetate, however, was found to have an irreversible blocking effect on the transport ATPase, whereas its inotropic action could be rapidly abolished.

U. FRICKE¹⁵ und W. KLAUS

Pharmakologisches Institut der Universität,
6500 Mainz (Deutschland), 21. März 1969.

¹⁴ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

¹⁵ Teilergebnisse der Dissertation von U. FRICKE, Mainz.

Proteolytic Enzymes in the Salivary Gland of *Chironomus tentans*

The larval salivary glands of *Chironomus* and other Diptera undergo autolysis early in metamorphosis. This is accompanied by specific alterations of the pattern of chromosomal puff activity, thus providing a unique system for studying nucleocytoplasmic interactions during a characteristic step of insect development¹. We found that a change in the pattern of proteolytic enzymes, including an increase in the activity of an acid protease, is among the cytoplasmic events preceding glandular regression in *Ch. tentans*. A decline in glandular proteolytic activity², or no proteolytic activity at all³ had been found by previous investigators.

Methods. *Ch. tentans* larvae were raised in the laboratory and staged as described previously⁴. Glands were collected in 0.1 M ice-cold NaCl solution and disrupted by treatment on ice for 1 min with a Branson sonifier (special microtip) at setting 2. Proteolytic enzyme activity was assayed using a modification of ANSON's method with urea-denatured hemoglobin as substrate^{5,6}. Product released by the enzyme was estimated using the method of LOWRY et al.⁷. The assay was performed in a total volume of 1 ml, containing 0.1 ml sonicate, 0.5 ml hemoglobin solution, and 0.4 ml buffer; incubation time was 3 h. Under these conditions measured activities increased linearly with enzyme concentration and duration of incubation for a period of 6 h. In controls either 0.1 M NaCl solution was substituted for the sonicate, or the addition of sonicate was immediately followed by the addition of TCA.

Results and discussion. Proteolytic enzyme activity is present in glands of larvae of all developmental stages tested. The pH optimum of the proteolytic activity differs, however, at different developmental stages (Figure 1). In old prepupae protease activity has its maximum at pH 3.5. In glands of intermolt larvae, on the other hand, the optimum is at pH 5.5, with only a slight shoulder at pH 3.5. Mixtures of prepupal and larval sonicates display pH profiles with distinct peaks at pH 3.5 and at pH 5.5.

Since it had been suggested that the salivary gland takes up some of its enzymes from the hemolymph rather than synthesizing them itself (cf. ²), protease activity was also assayed on hemolymph samples from larvae and prepupae. The assay was performed in a total volume of 0.2 ml, containing 0.005 ml hemolymph, 0.095 ml buffer and 0.1 ml hemoglobin solution. Larval hemolymph shows no indication that the larval glandular protease

¹ U. CLEVER, Am. Zoologist 6, 33 (1966).

² H. LAUFER, Am. Zoologist 8, 257 (1968).

³ W. BAUDISCH, in 100 Jahre Landwirtschaftliche Institute der Universität Halle (Halle 1963).

⁴ U. CLEVER, Chromosoma 13, 385 (1962).

⁵ M. L. ANSON, J. Gen. Physiol. 20, 565 (1936).

⁶ R. UMANA and A. L. DOUNCE, Expl Cell Res. 35, 277 (1964).

⁷ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, L. A. FARR and R. J. RANDALL, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).