

Über die Beeinflussung der Ca-Aufnahme in Lipidextrakte aus Mikrosomen und Mitochondrien des Herzens durch Digitoxin

Untersuchungen über die Beeinflussung des Ca-Umsatzes isolierter Herzmuskelpräparate durch positiv inotrop wirkende Digitalis-Konzentrationen ergaben eine Steigerung der ^{45}Ca -Aufnahme ohne Änderung des gesamten Ca-Gehaltes¹⁻⁶. Dieser Befund wurde als Zunahme der austauschbaren myokardialen Ca-Fraktion interpretiert und als mögliche Grundlage der positiv inotropen Digitaliswirkung angesehen^{1,2,5,7,8}. Als Ursache dieser Digitaliswirkung wurde eine Beeinflussung des Ca-Umsatzes im intracellulären Ca-Speicherungssystem diskutiert⁹. Neuerdings konnte tatsächlich in ouabainbehandelten Inkubationsansätzen von isoliertem sarkoplasmatischem Retikulum eine Zunahme der «freien» Ca-Fraktion auf Kosten des gebundenen Ca demonstriert werden¹⁰⁻¹². Dieser Effekt war konzentrationsabhängig, der kardiotoxische Wirksamkeit verschiedener Herzglykoside korreliert und erwies sich als unabhängig vom aktiven Ca-Transportsystem im sarkoplasmatischen Retikulum. Qualitativ ähnliche Befunde konnten auch an Mitochondrien- und Zellmembranfraktionen erhoben werden^{10,12}. Es lag deshalb nahe, eine Interferenz der Herzglykoside mit der Ca-Bindung an celluläre Membranstrukturen zu vermuten. Da das Ca vorwiegend an die Phospholipoidkomponente der Membranen gebunden zu sein scheint¹³, prüften wir die Wirkung von Digitoxin auf die Ca-Aufnahme und den ^{45}Ca -Austausch in Lipidextrakten aus Herzmuskelmitochondrien und -Mikrosomen.

Methode. Meerschweinchen (250–400 g) wurden durch Nackenschlag getötet, die Herzen rasch entnommen und in eiskalter 0,25 M Saccharose-Lösung (pH 7,4; 10 mM Tris-HCl-Puffer) suspendiert. Nach Homogenisation (Ultra-Turax, mittlere Tourenzahl, 4 × 10 sec) unter Eiskühlung und N₂-Atmosphäre wurden verschiedene Zellfraktionen durch Zentrifugation in der Kühlzentrifuge (WKF G50K) bei +2 C getrennt (Kernmembran-Fraktion 600 g × 7,5 min; Mitochondrien 8000 g × 3 min; Mikrosomen 17000 g × 120 min). Die Fraktionen wurden mit Aqua bidest. auf einen Proteingehalt (Biuret-Methode) von 1 mg/ml eingestellt. Die Lipide wurden aus diesen eingestellten Fraktionen nach der Methode von FOLCH et al.¹⁴ extrahiert, indem die Ansätze mit dem 1,5fachen Volumen an Chloroform-Methanol (2:1)-Gemisch 60 min lang unter N₂-Atmosphäre geschüttelt wurden. Nach Trennung der Phasen durch Zentrifugation wurde die Ca-Bindung an die Phospholipide im Chloroformextrakt nach der Methode von NAYLER¹⁵ bestimmt. Hierzu wurden gleiche Volumina des Extraktes mit ^{45}Ca -haltiger Ca-Lösung (1,8 mM Ca, spezifische Aktivität 0,33 mC/mM) 15 min lang kräftig geschüttelt (N₂-Atmosphäre), anschliessend durch Zentrifugation getrennt und die ^{45}Ca -Aktivität in 1 ml der organischen Phase scintillationspektrometrisch (Packard-Tricarb) gemessen. Der Ca-Netto-Gehalt der Ansätze wurde nach der Methode von v. HATTINGBERG et al.¹⁶ fluorometrisch bestimmt.

Ergebnisse. Bei Verwendung lipidfreier Ansätze konnte niemals eine Aufnahme von ^{45}Ca in die organische Phase nachgewiesen werden, dagegen war bei Versuchen mit lipidhaltigen Extrakten immer eine ^{45}Ca -Aufnahme zu beobachten. Unter Kontrollbedingungen liessen sich (sowohl bei Mitochondrien- als auch bei Mikrosomen-Extrakten) ca. 50% des vorhandenen Ca mit radioaktivem Ca austauschen. Digitoxin steigerte die Aufnahme von ^{45}Ca in die Lipidextrakte aus Mitochondrien und Mikrosomen in gleicher Weise wie es in Figur 1 in Prozent der jeweiligen Kontrollwerte dargestellt ist. Eine Konzentration von 10^{-10} g/ml hatte keinen Einfluss auf die ^{45}Ca -Aufnahme, höhere Konzentrationen (10^{-9} – 10^{-6} g/ml) be-

wirkten einheitlich eine Zunahme der ^{45}Ca -Aktivität um 20–30%. Der Ca-Netto-Gehalt, der unter Kontrollbedingungen bei ca. 20 nM/ml lag, wurde durch Digitoxin jedoch nicht signifikant beeinflusst, wie vor allem die rechten Säulen in Figur 2 erkennen lassen, die die Differenzen zwischen den digitalisbehandelten Ansätzen und

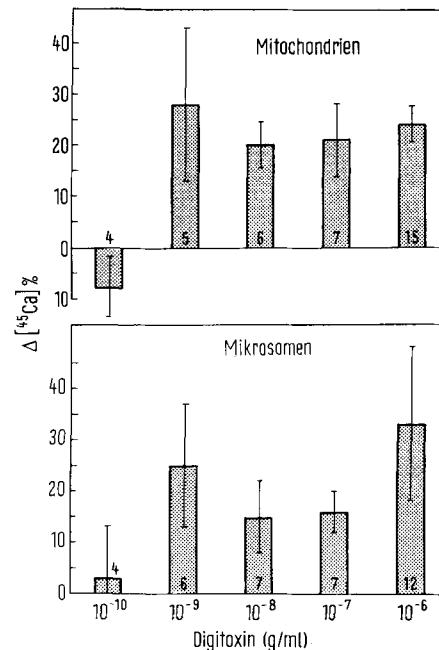


Fig. 1. Prozentuale Änderung der ^{45}Ca -Aufnahme in Lipidextrakte aus Mitochondrien und Mikrosomen des Meerschweinchenherzens unter dem Einfluss verschiedener Digitoxinkonzentrationen. Dargestellt sind Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung aus der in den Säulen angegebenen Anzahl von Einzelversuchen.

- ¹ W. KLAUS und G. KUSCHINSKY, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 244, 237 (1962).
- ² H. LÜLLMANN und W. C. HOLLAND, J. Pharmac. exp. Ther. 137, 186 (1962).
- ³ E. F. GERSMEYER und W. C. HOLLAND, Am. J. Physiol. 205, 795 (1963a).
- ⁴ E. F. GERSMEYER und W. C. HOLLAND, Circulation Res. 12, 620 (1963b).
- ⁵ W. KLAUS, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 246, 226 (1963).
- ⁶ W. C. HOLLAND, Am. J. Physiol. 217, 1214 (1966).
- ⁷ W. KLAUS, Z. naturwiss.-med. Grundlagenforsch. 2, 43 (1964).
- ⁸ W. KLAUS, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 263, 24 (1969).
- ⁹ W. KLAUS, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 251, 147 (1965).
- ¹⁰ W. KLAUS und K. S. LEE, J. Pharmac. exp. Ther. 166, 68 (1969).
- ¹¹ W. KLAUS, in *Factors Influencing Myocardial Contractility* (Ed. R. D. TANZ, F. KAVALER and J. ROBERTS; Academic Press, New York 1967), p. 533.
- ¹² W. KLAUS, in *Internationales Symposium über Herzinsuffizienz, Hinterzarten 1967* (Thieme Verlag, Stuttgart 1968), p. 546.
- ¹³ A. W. CUTHERBERT, Pharmac. Rev. 19, 59 (1967).
- ¹⁴ J. FOLCH, M. LEES und G. A. SLOANE STANLEY, J. biol. Chem. 226, 497 (1957).
- ¹⁵ W. G. NAYLER, Am. Heart J. 71, 363 (1966).
- ¹⁶ H. M. v. HATTINGBERG, W. KLAUS, H. LÜLLMANN und S. ZEPF, Experientia 22, 553 (1966).

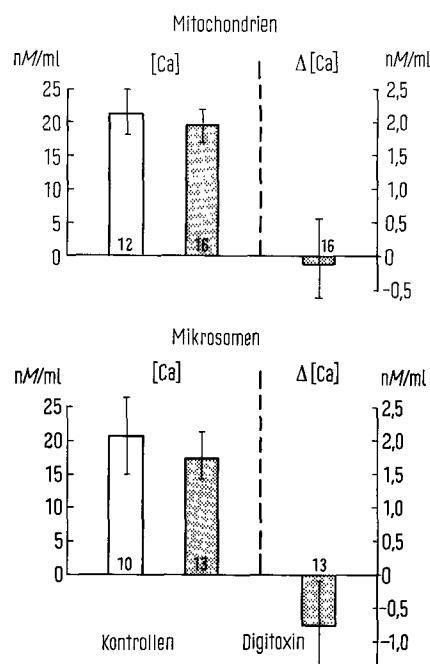


Fig. 2. Ca-Gehalt der Mitochondrien- und Mikrosomenextrakte nach Äquilibrierung mit ^{45}Ca -haltiger Lösung (1,8 mM Ca). Die hellen Säulen stellen die Kontrollwerte dar, die dunklen Säulen die Werte der digitoxinbehandelten Ansätze. Hierbei wurden die Ergebnisse von Versuchen mit verschiedenen Digitoxinkonzentrationen (10^{-9} bis 10^{-6} g/ml) zusammengefasst, da keine konzentrationsabhängigen Unterschiede bestanden. In den rechten Säulen sind die durch Digitoxin bedingten Änderungen gegenüber den dazugehörigen Kontrollwerten dargestellt.

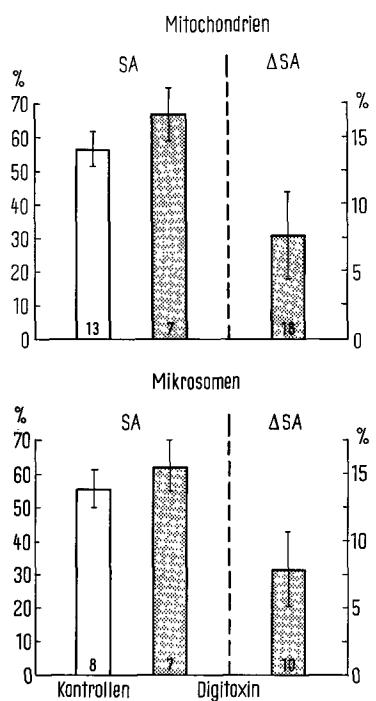


Fig. 3. Spezifische Aktivität (SA) des lipidgebundenen Ca in Mitochondrien- und Mikrosomenextrakten in Prozent der spezifischen Aktivität des Äquilibrierungsmediums. Weitere Erläuterungen s. Legende zu Figur 2.

den dazugehörigen Kontrollwerten angeben. Infolgedessen errechnete sich für die digitoxin-behandelten Ansätze eine Zunahme der spezifischen Aktivität um rund 8% gegenüber den Kontrollwerten (Figur 3). Dies wird vor allem wiederum deutlich durch die im rechten Teil der Figur 3 dargestellten Differenzen zwischen zusammengehörenden Ansätzen beider Gruppen.

Diskussion. Eine Beteiligung der Membranlipide bei der Regulation der Aufnahme und Verteilung des cellulären Ca wurde in neuerer Zeit postuliert und für die Erklärung inotroper Effekte am Herzen herangezogen¹⁷. Tatsächlich wurde eine Hemmung des Ca-Austausches an Lipidextrakten durch negativ inotrope Einflüsse, zum Beispiel β -Blocker¹⁸ und Lokalanästhetika¹⁹ und eine Förderung durch positiv inotrop wirkende Substanzen, zum Beispiel Katecholamine²⁰ beobachtet. Wie die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Befunde zeigen, steigert auch Digitoxin die Aufnahme von ^{45}Ca in Lipid-Extrakte. Dieser Effekt ist an Mitochondrien- und Mikrosomen-Extrakten in gleicher Weise festzustellen. Da die gleichzeitig gemessene Ca-Konzentration der Extrakte unverändert blieb, kann die erhöhte ^{45}Ca -Aufnahme nicht auf einer Vermehrung der Ca-Bindungsstellen in der Lipidfraktion beruhen. Als Erklärung muss deshalb ein vermehrter Austausch des lipidgebundenen Kalziums unter dem Einfluss von Digitoxin angenommen werden, was auch im Verhalten der spezifischen Aktivität zum Ausdruck kommt. Digitoxin scheint demnach durch eine bisher noch ungeklärte Reaktion mit den extrahierten Lipiden das gebundene Ca in eine leichter austauschbare Form zu bringen. Dieser Effekt kann als eine Herabsetzung der Intensität der Ca-Bindung an die Lipide beschrieben werden. Wenn dieser in vitro-Effekt gleichermaßen auch an den Membranlipiden in der intakten Herzmuskelzelle stattfindet, könnte dies die früher beobachtete Zunahme der austauschbaren myokardialen Ca-Fraktion unter dem Einfluss von Digitalis erklären. Aus der Änderung der Ca-Bindung könnte eine bessere Verfügbarkeit des gebundenen cellulären Ca für Ca-abhängige Zellfunktionen, wie zum Beispiel die Muskelkontraktion, resultieren²¹.

Summary. Lipids were isolated by chloroform-methanol extraction from mitochondrial and microsomal fractions of guinea-pig hearts. In the presence of digitoxin (10^{-9} – 10^{-6} g/ml) 15–30% more radioactive Ca was taken up by the lipid extracts than under control conditions, but the total amount of Ca in this phase remained unchanged. Thus, digitoxin produced an increase in the specific activity of the lipid-bound Ca which may be explained by an increased exchangeability of this Ca fraction. This effect of digitoxin might result in an improved availability of the lipid-bound Ca for Ca-dependent functions (e.g. contraction) of the heart muscle cell.

H. G. ALPERMANN, H. G. GERBER,
W. KLAUS und R. KREBS

Pharmakologisches Institut der Universität,
D-6500 Mainz (Deutschland), 14. Oktober 1969.

¹⁷ W. G. NAYLER, Am. Heart J. 73, 379 (1967).

¹⁸ W. G. NAYLER, J. Pharmac. exp. Ther. 165, 225 (1969).

¹⁹ M. B. FEINSTEIN, J. gen. Physiol. 48, 357 (1964).

²⁰ W. G. NAYLER, J. Pharmac. exp. Ther. 153, 479 (1966).

²¹ Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.