

Table II. Zonal composition of calcifying cartilage matrix

	Collagen ^a	Other protein ^b	Muco-polysaccharides ^c	Sialic acid	Mineral ^d	Water
Scapula						
Resting	64.54	2.37	15.81	0.24	< 0.22	4.91
Transforming	50.12	1.75	18.11	0.29	< 0.22	5.45
Transforming-ossifying	41.84	14.12	23.21		< 0.22	6.00
Ossifying	16.92	18.05	24.26	0.59	12.15	6.19
Rib						
Resting	60.55	6.12	17.08	0.46	< 0.22	6.13
Ossifying	15.85	30.94	33.11	0.49	1.62	6.17

Lyophilized material: % of weight. ^a Calculated from Hypro \times 7.14. ^b Calculated from non-collagenous Nitrogen \times 6.25. ^c Calculated from [(Uronic Ac. + Hex.)/2] \times 2.69. ^d Calculated from Phosphorus \times 5.4.

Virtually the same observations can be made for the data obtained from the 2 zones of rib cartilage.

From the analytical data reported in Table I, we have calculated the amount of collagen, non-collagenous protein, mucopolysaccharides and hydroxyapatite present in the matrix of cartilage at the different zones. The new data are collected in Table II. Since in the transition from resting to ossifying cartilage the increase of non-collagenous protein is accompanied by an increase of mucopolysaccharides and sialic acid, one is tempted to correlate the 2 facts. In this case chondromucoproteins and sialoproteins would be the increasing components, as indicated also by the data reported by LINDENBAUM and KUETTNER⁹.

While this manuscript was in preparation¹⁰, a paper appeared by WUTHIER¹¹ who reports a similar loss of collagen in the calcification front of cartilage from foetal calves. In this material he described also a zonal distribution pattern of mucopolysaccharides, which, however, is different from ours. This discrepancy may be a consequence of the drastic washing procedures employed by WUTHIER in his experiments. A significant release of mucopolysaccharides is known to occur in tissues treated with distilled water or saline solutions.

To conclude, the most important events which occur during endochondral calcification of cartilage are a dramatic decrease of collagen and an increase of non-collagenous proteins and mucopolysaccharides. This changes are obviously the expression of changes in turnover of the compounds at the level of the different functional zones of cartilage. Relevant in this connection may be the recent observation that lysosomal enzymes are more active in cartilage before calcification^{12,13}.

In spite of the fact that it is not known to what extent cartilage and bone calcification processes are comparable, it is at least suggestive to recall the fact that a non-collagenous fraction is changing during calcification of osteons^{14,15}.

Résumé. On a étudié la composition chimique de différentes zones fonctionnelles de la matrice du cartilage ossifiable scapulaire et costal. On a constaté qu'en s'approchant du front de calcification, le collagène diminue fortement tandis que les mucopolysaccharides et les protéines non collagènes augmentent.

F. VITTUR, M. C. PUGLIARELLO
and B. DE BERNARD¹⁶

*Istituto di Chimica Biologica dell'Università,
Via Fabio Severo 150, I-34127 Trieste (Italy),
20 July 1970.*

⁹ A. LINDENBAUM and K. E. KUETTNER, *Calc. Tiss. Res.* 1, 153 (1967).

¹⁰ F. VITTUR, M. C. PUGLIARELLO and B. DE BERNARD, VI FEBS Meeting, Madrid, 1969, Abstract 821.

¹¹ R. E. WUTHIER, *Calc. Tiss. Res.* 4, 20 (1969).

¹² A. O. JIBRIL, *Biochim. biophys. Acta* 141, 605 (1967).

¹³ J. L. GRANDA and A. S. POSNER, *J. Bone Jt Surg.* 50A, 1073 (1968).

¹⁴ E. BONUCCI, A. ASCENZI, F. VITTUR, M. C. PUGLIARELLO and B. DE BERNARD, *Calc. Tiss. Res.* 5, 100 (1970).

¹⁵ M. C. PUGLIARELLO, F. VITTUR, B. DE BERNARD, E. BONUCCI and A. ASCENZI, *Calc. Tiss. Res.* 5, 108 (1970).

¹⁶ This investigation was supported by grants from the Italian National Research Council.

Steigerung der ¹⁴CO₂-Bildung aus ¹⁴C-Glukose bei der Ratte durch das orale Antidiabetikum Butylbiguanid-hydrochlorid¹

Über den Mechanismus der blutzuckersenkenden Wirkung der Biguanide gibt es mehrere, z.T. widersprüchliche Vorstellungen (vgl. hierzu die Übersichten²⁻⁶). Manche Autoren⁷⁻¹⁰ beobachteten eine Stimulierung der peripheren Glukoseutilisation durch Biguanide, andere¹¹⁻¹⁵ eine Hemmung der Glukoneogenese in der Leber. Kürzlich berichteten SEARLE et al.^{16,17} über eine Zunahme der Glukoseoxidation bei stoffwechselgesunden und diabetischen Menschen nach Biguanid-Applikation.

Wir untersuchten, ob sich eine gleichartige Steigerung der Glukoseutilisation auch im Tierexperiment nachweisen lässt.

Methodik. 7 männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 120–160 g (Züchter: Hagemann, Börsingfeld) erhielten nach 24 h Nahrungsentzug 0,1 µC uniform markierte ¹⁴C-D-Glukose (spez. Aktivität: 1,1 mC/mg, The Radiochemical Center, Amersham), gelöst in 1 ml 0,9% Kochsalzlösung, i.p. appliziert. Unmittelbar vor der

Glukose-Injektion bekamen die Ratten a) 250 mg/kg Butylbiguanid-hydrochlorid¹⁸ oral, b) 0,9% Kochsalzlösung oral oder c) 2 IE/kg Insulin s.c. (Alt-Insulin, Fa. Hoechst). Dieselben Tiere erhielten alle 3 Substanzen in Abständen von jeweils 3–5 Tagen, wobei die Reihenfolge der Substanzgabe randomisiert war. Nach der Applikation von ¹⁴C-Glukose wurde die Expirationskohlenensäure quantitativ in Messgläsern für den Szintillationszähler¹⁹ absorbiert. Die Radioaktivität wurde nach Zusatz von 10 ml Szintillator (0,4% PPO und 0,01% POPOP in Toluol) zur Absorptionslösung in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler mit externem Standard (Tri-Carb Modell 3214, Fa. Packard) gemessen.

Ergebnisse und Diskussion. An 24 h hungernden Ratten lassen sich nach i.p. Injektion von uniform markierter ¹⁴C-Glukose innerhalb von 2 h durchschnittlich 20% und nach 8 h 49% der applizierten Radioaktivität in der Ausatemungsluft nachweisen (Tabelle I). Dieses Ergebnis steht in relativ guter Übereinstimmung mit den Befunden anderer Autoren^{20–28}. Eine subkutane Injektion von 2 IE/kg Insulin bewirkt eine Zunahme des Anteils der applizierten Radioaktivität, der zu ¹⁴CO₂ oxidiert wird. Sie ist in den ersten beiden Stunden besonders ausgeprägt. Eine gesteigerte Bildung von ¹⁴CO₂ aus ¹⁴C-Glukose nach Gabe von Insulin wurde von anderen Untersuchern

gleichfalls an der Ratte^{22, 27} und am Kaninchen²⁸ beobachtet. Sie lässt sich jedoch nicht immer nachweisen^{27, 29}. Auch Butylbiguanid in einer der Blutzuckerwirkung von Insulin ungefähr äquivalenten Dosis (Tabelle II) bewirkt eine Zunahme der ¹⁴CO₂-Bildung. Innerhalb von 8 h werden unter der Einwirkung von Butylbiguanid 57% der applizierten ¹⁴C-Glukose zu ¹⁴CO₂ oxidiert.

Nach STONER et al.³⁰ lässt sich die kumulative Ausscheidung von ¹⁴CO₂ nach i.v. Applikation von ¹⁴C-Glukose durch die Funktion

$$A = \alpha_p A_0 \left(1 - e^{-k_p t} - \frac{k_p}{k_4 - k_p} (e^{-k_p t} - e^{-k_4 t}) \right)$$

beschreiben. Hierbei ist A die bis zum Zeitpunkt *t* insgesamt ausgeschiedene ¹⁴CO₂-Menge in Prozent der applizierten ¹⁴C-Glukose-Dosis *A*₀ (*A*₀ = 100%), $\alpha_p A_0$ der Grenzwert der kumulativ ausgeschiedenen ¹⁴CO₂-Menge für *t*_∞ (in Prozent der applizierten ¹⁴C-Glukose-Dosis), *k_p* die Geschwindigkeitskonstante des Übertritts von ¹⁴C-Glukose zum Oxidationsort und *k₄* die Geschwindigkeitskonstante der ¹⁴CO₂-Elimination.

Legt man diese Funktion zugrunde und bestimmt ihre Konstanten getrennt für jedes einzelne Tier, indem man zuerst *k₄* und die Fläche *F* unter der differentiellen Kurve

Tabelle I. Kumulative ¹⁴CO₂-Ausscheidung bei Ratten nach i.p. Injektion von ¹⁴C-Glukose und s.c. Applikation von Insulin (2 IE/kg) oder oraler Gabe von Butylbiguanid (250 mg/kg)

	Applizierte Radioaktivität (%) in der Ausatemungsluft nach							
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h
Kontrolle	6,3 ± 1,2	19,6 ± 1,1	30,2 ± 1,3	37,6 ± 1,7	41,7 ± 2,1	44,7 ± 2,3	47,0 ± 2,5	48,9 ± 2,6
Insulin	15,2 ± 1,9	31,0 ± 1,9	39,6 ± 2,1	43,7 ± 2,0	45,9 ± 2,1	47,9 ± 2,2	49,6 ± 2,4	51,5 ± 2,5
Butylbiguanid	12,0 ± 2,1	30,2 ± 2,4	41,3 ± 2,1	47,2 ± 1,9	51,1 ± 1,9	53,7 ± 1,9	55,3 ± 1,9	56,9 ± 1,9

Mittelwerte ± S.E.M. von 7 Ratten.

¹ Die Ergebnisse wurden auszugsweise vorgetragen anlässlich der 4. Tagung der Europäischen Gesellschaft für Diabetologie, Löwen 1968.

² H. HALLER und S. E. STRAUZENBERG, *Orale Diabetestherapie* (VEB Thieme, Leipzig 1966).

³ H. D. SÖLING und H. DITSCHUNEIT, in *Handbuch des Diabetes mellitus* (Ed. E. F. PFEIFFER; Pathophysiologie und Klinik, J. F. Lehmanns Verlag, München 1969), vol. 1, p. 685.

⁴ J. STERNE, in *Oral Hypoglycaemic Agents* (Ed. G. D. CAMPBELL; Academic Press, London, New York 1969), p. 195.

⁵ H. MEHNERT und H. S. SADOW, in *Oral Hypoglycaemic Agents* (Ed. G. D. CAMPBELL; Academic Press, London, New York 1969), p. 247.

⁶ R. BECKMANN, *Arzneimittel-Forsch.* 19, 628 (1969).

⁷ L. L. MADISON und R. H. UNGER, *Diabetes* 9, 202 (1960).

⁸ G. L. SCHLESS, *Metabolism* 13, 934 (1964).

⁹ W. J. H. BUTTERFIELD, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 148, 724 (1968).

¹⁰ W. J. H. BUTTERFIELD, in II. Internationales Biguanid-Symposium, Düsseldorf 1967 (Eds. K. OBERDISSE, H. DAWEKE und G. MICHAEL; Thieme Verlag, Stuttgart 1968), p. 33.

¹¹ F. MEYER, M. IPAKCHI und H. CLAUSER, *Nature, Lond.* 213, 203 (1967).

¹² R. A. ALTSCHULD und F. A. KRUGER, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 148, 612 (1968).

¹³ B. R. BOSHELL, R. F. RODDAM und G. L. McADAMS, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 148, 756 (1968).

¹⁴ J. LYGSGØE und J. TRAP-JENSEN, *Br. med. J.* 1969/2, 224.

¹⁵ R. HAECKEL und H. HAECKEL, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 351, 288 (1970).

¹⁶ G. L. SEARLE und R. R. CAVALIERI, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 148, 734 (1968).

¹⁷ G. L. SEARLE, R. GULLI und R. R. CAVALIERI, *Metabolism* 18, 148 (1969).

¹⁸ 1-Butyl-biguanid-hydrochlorid =

$$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$$

= Silubin®. Hersteller Chemie Grünenthal GmbH, Stolberg/Rhld., im folgenden als Butylbiguanid bezeichnet.

¹⁹ M. BAGGIOLINI, *Experientia* 21, 731 (1965).

²⁰ D. B. ZILVERSMIT, I. L. CHAIKOFF, D. D. FELLER und E. J. MASORO, *J. biol. Chem.* 176, 389 (1948).

²¹ D. D. FELLER, E. H. STRISOWER und I. L. CHAIKOFF, *J. biol. Chem.* 187, 571 (1950).

²² W. L. MILLER, J. J. KRAKE und M. J. VAN DER BROOK, *J. Pharm. exp. Ther.* 119, 513 (1957).

²³ M. M. ASHBY, D. F. HEATH und H. B. STONER, *J. Physiol., Lond.* 179, 193 (1965).

²⁴ C. v. HOLT, H. SCHMIDT und H. FELDMANN, *Biochem. Z.* 334, 545 (1961).

²⁵ C. v. HOLT, M. v. HOLT und H. BÖHM, *Biochem. biophys. Acta* 125, 11 (1966).

²⁶ C. v. HOLT und H. SCHMIDT, *Biochem. Z.* 334, 516 (1961).

²⁷ E. W. LEVIN und S. WEINHOUSE, *J. biol. Chem.* 232, 749 (1958).

²⁸ A. N. WICK und D. R. DRURY, *Am. J. Physiol.* 167, 359 (1951).

²⁹ R. VRBA, *Biochem. J.* 99, 367 (1966).

³⁰ H. B. STONER, D. F. HEATH und O. M. COLLINS, *Biochem. J.* 76, 135 (1960).

Tabelle II. Wirkung von Insulin und Butylbiguanid auf die Konzentration von Glukose im Blut bei 18 h hungernden männlichen Wistar-Ratten (Körpergewicht: 125–160 g). Die Blutzuckerbestimmung erfolgte im Blut aus der Schwanzvene nach Hagedorn-Jensen

Substanz	Dosis	Blutglukose vor Substanzgabe (mg/100 ml)	Veränderung der Blutglukose in % des Ausgangswerts nach		
			1 h	2 h	4 h
Insulin	2 IE/kg s.c.	112 ± 3	−49 ± 3	−41 ± 5	−35 ± 7
Butylbiguanid	250 mg/kg oral	101 ± 5	−42 ± 6	−52 ± 9	−60 ± 10

Mittelwerte ± S.E.M. von je 10 Tieren.

und danach aus k_4 und F die Konstante k_p ermittelt^{31, 32}, so erhält man folgende Durchschnittswerte (± S.E.M.):

	$\alpha_p A_o$ (%)	k_p (h ^{−1})	k_4 (h ^{−1})
Kontrolle	51,9 ± 2,86	1,67 ± 0,26	0,42 ± 0,022
Insulin	50,8 ± 1,97	4,89 ± 0,82	0,52 ± 0,028
Buformin	58,4 ± 1,48	2,09 ± 0,41	0,54 ± 0,042

Die Varianzanalyse (2fach) ergibt signifikante Unterschiede für $\alpha_p A_o$ ($p < 0,05$) zwischen der Behandlung mit Butylbiguanid einerseits sowie der Behandlung mit Insulin und dem Kontrollversuch andererseits und für k_4 ($p < 0,05$) zwischen Kontrollversuch und Insulin- bzw. Butylbiguanid-Behandlung. Für k_p konnte wegen der relativ grossen Streuung keine Varianzanalyse durchgeführt werden. Im Wilcoxon-Wilcox-Test berechnet sich für k_p ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen Insulin-Injektion einerseits und Butylbiguanid-Gabe sowie Kontrollversuch andererseits. Ein repräsentatives Beispiel für die Auswertbarkeit unserer experimentellen Daten mit Hilfe der Funktion von STONER et al.³⁰ ist in der Figur wiedergegeben. Die Übereinstimmung der Messwerte mit dem theoretischen Kurvenverlauf ist befriedigend.

Ebenso wie wir fanden kürzlich auch LOSERT et al.³³ an der Ratte nach Injektion von Butylbiguanid eine gesteigerte Bildung von ¹⁴CO₂ aus ¹⁴C-Glukose. Dagegen konnten WILLIAMS et al.³⁴ an Meerschweinchen nach s.c.

Injektion von 20 mg/kg Phenformin und 1 μ C ¹⁴C-Glukose keine Zunahme der ¹⁴CO₂-Bildung nachweisen. Dies war aber auch nicht zu erwarten, da die Autoren toxische Biguanid-Dosen verwendeten, die allenfalls zu einer Hemmung der Glukoseoxidation hätten führen können^{2–6}.

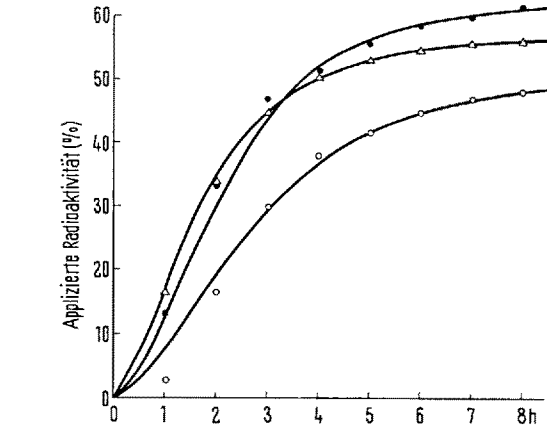
Auf Grund unserer Versuchsanordnung können wir ebenso wie andere Untersucher^{23, 27, 28, 33} keine Aussage darüber machen, um welchen Betrag sich die Umsatzgeschwindigkeit der Glukose sowie der Anteil der Glukoseoxidation an der Gesamtkohlendioxidbildung unter der Einwirkung von Insulin und Butylbiguanid ändern. Unsere Versuche zeigen lediglich, dass Butylbiguanid die Bildung von ¹⁴CO₂ aus uniform ¹⁴C-markierter Glukose in gleicher Weise beeinflusst wie Insulin und somit eine Hemmung der Glukoseoxidation, welche in vitro unter der Einwirkung von Biguaniden auftritt, in vivo wenig wahrscheinlich ist.

Auch im Hinblick auf die Relevanz dieser tierexperimentellen Ergebnisse für den Mechanismus der blutzuckersenkenden Wirkung von Butylbiguanid beim Menschen möchten wir wegen der unterschiedlichen Konzentrationen des Biguanids im Plasma beim Menschen^{35, 36} und bei der Ratte³⁷ zurückhaltend sein³⁸.

Summary. Comparative investigations were carried out in rats to determine the effect of butylbiguanide and of insulin on the oxidation of uniform ¹⁴C-labelled glucose. The administration of equally hypoglycaemic active doses of butylbiguanide (250 mg per kg orally) or of insulin (2 IU s.c.), together with 0.1 μ C ¹⁴C-glucose, caused similar increases in the elimination rate of ¹⁴CO₂.

R. BECKMANN, W. LINTZ
und J. NIJSSEN

Forschungslaboratorien der Chemie Grünenthal GmbH,
D-519 Stolberg/Rheinland (Deutschland), 24. Juli 1970.



Wirkung von Butylbiguanid (250 mg/kg, oral) (●) und Insulin (2 IE/kg, s.c.) (Δ) auf die ¹⁴CO₂-Bildung aus uniform markierter ¹⁴C-Glukose (0,1 μ C/Ratte) (Kontrollversuch: ○). Die ausgezogenen Kurven wurden nach STONER et al.³⁰ berechnet.

³¹ P. BÜNGER, W. DILLER, J. FÜHR und E. KRÜGER-THIEMER, Arzneimittel-Forsch. 11, 247 (1961).
³² E. KRÜGER-THIEMER, Jber. Tuberk.-ForschInst. Borstel 5, 316 (1961).
³³ W. LOSERT, E. SCHILLINGER, O. LOGE und W. KRAAZ, Vortrag. 5. Kongress der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, Bonn – Bad Godesberg 1970.
³⁴ R. H. WILLIAMS, J. M. TYBERGHEIN, P. M. HYDE und R. L. NIELSEN, Metabolism 6, 311 (1957).
³⁵ R. BECKMANN, Ann. N.Y. Acad. Sci. 148, 820 (1968).
³⁶ P. BOTTERMANN, A. SOUVATZOGLOU und U. SCHWEIGART, in II. Internationales Biguanid-Symposium, Düsseldorf 1967 (Eds. K. OBERDISSE, H. DAWEKE und G. MICHAEL; Thieme Verlag, Stuttgart 1968), p. 14.
³⁷ R. BECKMANN, Arch. int. Pharmacodyn. 160, 161 (1966).
³⁸ Für geschickte technische Assistenz danken wir Herrn W. HOFFMANN.