

Ratten der anderen Altersgruppen, weil die doppelte Dosis zu Versuchsbeginn appliziert wurde. Nur bei 5 Tage alten Ratten sind die in 3 h ausgeschiedenen Mengen an THAM bei Kontrollen und vorbehandelten Tieren nicht signifikant verschieden. Auch für die Stimulierung des Transports organischer Säuren ist der geringe Aktivierungseffekt in der Neonatalperiode charakteristisch<sup>4</sup>. Bei in vitro Untersuchungen hat HIRSCH<sup>3</sup> nachweisen können, dass die Akkumulationsfähigkeit von Nierenrindenschnitten für die organische Base N-Methylnikotinamid durch die einmalige vorherige Gabe von Uranylnitrat gesteigert werden kann. Dabei sind jedoch Dosierungen erforderlich, in denen Uranylnitrat

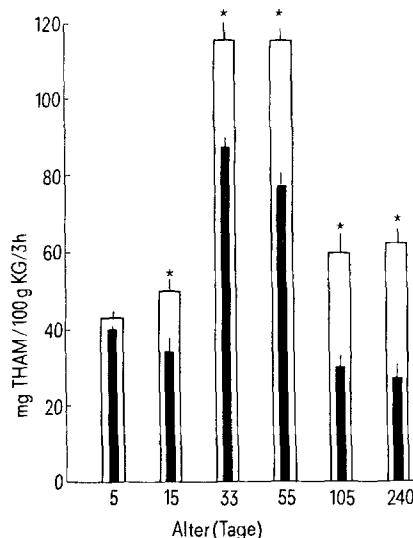
eine ausgeprägte nephrotoxische Wirkung hat. THAM ist eine organische Base, die den Basencarrier in nicht toxisch wirkenden Dosen aktiviert. Ferner wurde mit den vorliegenden Versuchen der Nachweis erbracht, dass neben der Steigerung der renalen Ausscheidungsfähigkeit für organische Säuren auch eine erhöhte Ausscheidungsleistung des Basencarriers erreicht werden kann. Nach den bisher vorliegenden Untersuchungsergebnissen über die Stimulierbarkeit von Ausscheidungsfunktionen der Niere ist es wenig wahrscheinlich, dass die beobachtete Beschleunigung der renalen THAM-Ausscheidung auf andere Weise zustande kommt als durch eine Aktivierung des Carriers. Da nach Gabe von THAM eine Alkalisierung des Harns eintritt, kommt eine Verminderung der Rückdiffusionsrate als Ursache der beschleunigten renalen Ausscheidung dieser Verbindung bei wiederholter Applikation nicht in Betracht. An Nierenrindenschnitten soll untersucht werden, ob eine Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate oder eine Mehrdurchblutung der Niere an der beschleunigten renalen THAM-Ausscheidung Anteil hat.

Mit der Aktivierbarkeit von Carriersystemen für den renalen Transport organischer Säuren und organischer Basen ist die Möglichkeit verbunden, dass bei der wiederholten Gabe von Arzneimitteln eine Änderung ihres pharmakokinetischen Verhaltens eintritt. Bei einer geeigneten Vorbehandlung könnte auch die Elimination von körpereigenen Stoffen beeinflusst werden, wenn deren renaler Transport über solche Carriersysteme erfolgt.

**Summary.** The rate of renal excretion of Tris(hydroxymethyl)aminomethane (THAM) can be accelerated by repeated administration of this organic base. An increase in renal excretion by stimulation of active tubular base transport is possible in young and adult rats.

H. BRÄUNLICH, K. LUTHER und S. RUDOLPH

*Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Holzmarkt, DDR-69 Jena (DDR), 20. März 1974.*



Einfluss einer 4tägigen Vorbehandlung mit THAM auf die renale THAM-Ausscheidung während einer 3stündigen Versuchsperiode. ■, Kontrollen; □, vorbehandelte Tiere. \* Signifikante Unterschiede bei  $p < 0,01$ ;  $n = 12$ .

### Differenzierung der biologischen Aktivität von Eledoisin- und Substanz P-Analogen in Affinität und Wirkaktivität am isolierten Meerschweinchen-Ileum und Vergleich mit der Aktivität am Ratten-Colon

Die Wirksamkeit einer Substanz am biologischen Objekt ist Ausdruck ihrer Affinität zum spezifischen Rezeptor und ihrer Fähigkeit, nach Bindung an den Rezeptor eine Reaktion auszulösen (Wirkaktivität, «intrinsic activity»<sup>1,2</sup>, «efficacy»<sup>3</sup>, «intrinsic efficacy»<sup>4,5</sup>). Nach der Methode von FURCHGOTT<sup>4</sup> mittels Ausschluss einer bestimmten Rezeptorfaktion durch irreversible

Antagonisten gelang es, für cholinerge Substanzen und biogene Amine zwischen Affinität und Wirkaktivität zu differenzieren und Dissoziationskonstanten an biologischen Objekten mit Rezeptorreserve<sup>6,7</sup> zu bestimmen<sup>4,8,9</sup>.

Da für Tachykinine gegenwärtig keine spezifischen, irreversiblen Antagonisten bekannt sind, wurde versucht, eine Blockade der Rezeptoren durch die kontinuierliche

Tabelle 1. Vergleich von relativer Wirkaktivität am isolierten Meerschweinchen-Ileum und Maximalkontraktion am isolierten Ratten-Colon

	Relative Wirkaktivität Meerschw.-Ileum	Maximale Kontraktion Ratten-Colon
E-H	100,0	100
SP-H	8,9	68
SP-P	8,6	72

<sup>1</sup> E. J. ARIENS, J. M. VAN ROSSUM und A. M. SIMONIS, Pharmac. Rev. 9, 218 (1957).

<sup>2</sup> J. M. VAN ROSSUM, Arzneimittelforschung 16, 1412 (1966).

<sup>3</sup> R. P. STEPHENSON, Br. J. Pharmac. 11, 379 (1956).

<sup>4</sup> R. F. FURCHGOTT, Adv. Drug Res. 3, 21 (1966).

<sup>5</sup> R. F. FURCHGOTT und P. BURSZTYN, Ann. N.Y. Acad. Sci. 144, 882 (1967).

<sup>6</sup> J. M. VAN ROSSUM und E. J. ARIENS, Archs int. Pharmacodyn. Thér. 136, 385 (1962).

<sup>7</sup> M. NICKERSON, Nature, Lond. 178, 697 (1956).

<sup>8</sup> B. V. RAMA SASTRY und H. C. CHENG, J. Pharmac. exp. Ther. 180, 326 (1972).

<sup>9</sup> D. R. WAUD, J. Pharmac. exp. Ther. 170, 117 (1969).

Tabelle 2. Vergleich von  $ED_{50}$  am isolierten Ratten-Colon und Meerschweinchen-Ileum mit  $K_D$  am Meerschweinchen-Ileum

	$ED_{50}$ Ratten-Colon	$K_D$ Meerschw.-Ileum	$ED_{50}$ Meerschw.-Ileum
E-H	$0,7 \pm 0,1 \times 10^{-7} M$	$1,9 \pm 0,4 \times 10^{-6} M$	$6,6 \pm 1,4 \times 10^{-9} M$
SP-H	$0,8 \pm 0,1 \times 10^{-7} M$	$1,3 \pm 0,2 \times 10^{-7} M$	$5,9 \pm 0,8 \times 10^{-9} M$
SP-P	$3,5 \pm 0,5 \times 10^{-6} M$	$3,1 \pm 0,5 \times 10^{-6} M$	$1,8 \pm 0,3 \times 10^{-7} M$

Anwesenheit der Agonisten selbst zu erreichen und nach der von FURCHGOTT<sup>4</sup> beschriebenen theoretischen Ableitung die Dissoziationskonstante einiger Tachykininsequenzen zu errechnen.

*Methode.* Die Versuche zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurden am isolierten Meerschweinchen-Ileum durchgeführt und isotonische Kontraktionen registriert<sup>10</sup>. Nach Aufzeichnung einer Dosis-Wirkungs-Kurve unter Normalbedingungen wurde der Versuch in Tyrodelösung mit bestimmter Peptidkonzentration fortgesetzt. Die beim Wechseln der Tyrodelösung zu beobachtende Kontraktion reduzierte sich mit jedem Spülvorgang, bis das Organ keine Reaktion mehr zeigte und den Ausgangstonus beibehielt. Unter diesen Bedingungen wurde erneut eine Dosis-Wirkungs-Kurve registriert. Am isolierten Ratten-Colon<sup>10</sup> wurden ebenfalls vollständige Dosis-Wirkungs-Kurven bei isotonischer Kontraktion aufgezeichnet, wobei in jedem Versuch 6-Lys-Eledoisin-Hexapeptid als Standard diente.

Figur 1 zeigt die für die Untersuchungen eingesetzten Tachykininsequenzen, über deren biologische Aktivität am isolierten Meerschweinchen-Ileum bereits berichtet wurde und für die ein Angriff an identischen Rezeptoren anzunehmen ist<sup>11</sup>.

*Ergebnisse und Diskussion.* Die in Figur 2A dargestellten Dosis-Wirkungs-Kurven von E-H in Tyrode mit verschiedenen Konzentrationen des gleichen Peptids zeigen zunächst eine Parallelverschiebung nach rechts, ehe es zur Abnahme der Maximalkontraktion kommt. SP-O ist beim Vergleich der  $ED_{50}$  4-5mal wirksamer als das Eledoisin-Analoge. Enthält die Tyrodelösung dieses

Peptid, führen gleiche Dosen zu stärkerer Verschiebung und stärkerer Abnahme der Maximalkontraktion (Figur 2B). Im Gegensatz zu E-H zeigte SP-P bei geringerer Verschiebung schon eine Abnahme der Maximalkontraktion (Figur 2C). Das gleiche war bei SP-H zu beobachten.

Die Kurven der Figur 2 sehen damit jenen sehr ähnlich, die durch stufenweise Rezeptorblockade mit irreversiblen Antagonisten erhalten wurden<sup>4, 5, 12</sup>. Die stärkere Beeinflussung bei Erhöhung der Dosis eines Peptids und bei gesteigerter biologischer Aktivität lassen annehmen, dass sich bei kontinuierlicher Anwesenheit des Peptids in Abhängigkeit von der Dosis und der Affinität ein Gleichgewicht einstellt und ein bestimmter Teil der Rezeptoren blockiert wird. Es liegt deshalb nahe, eine Bestimmung der Dissoziationskonstanten vorzunehmen, analog wie es für die Methode mit irreversiblen Antagonisten beschrieben wurde<sup>4</sup>.

Beim Vergleich der Normalkurve und einer Kurve mit eindeutig erniedrigtem Maximum ergibt auch hier ein plot von  $1/A$  gegen  $1/A'$  eine Gerade ( $A$  und  $A'$  sind äquivalente Konzentrationen ohne und mit Peptid in der Tyrode).

<sup>10</sup> P. OEHME, J. BERGMANN, M. FALCK, J. G. REICH, W.-E. VOGT, H. NIEDRICH, J. PIRWITZ, CH. BERSECK und F. JUNG, Acta biol. med. germ. 25, 613 (1970).

<sup>11</sup> J. BERGMANN, M. BIENERT, B. MEHLIS, H. NIEDRICH und P. OEHME, Experientia 30, 401 (1974).

<sup>12</sup> D. MACKAY, J. Pharm. Pharmac. 18, 201 (1966).

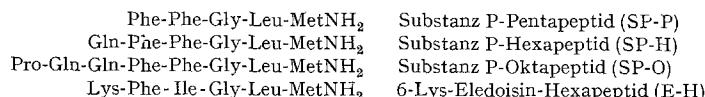


Fig. 1. Sequenzen der untersuchten Peptide.

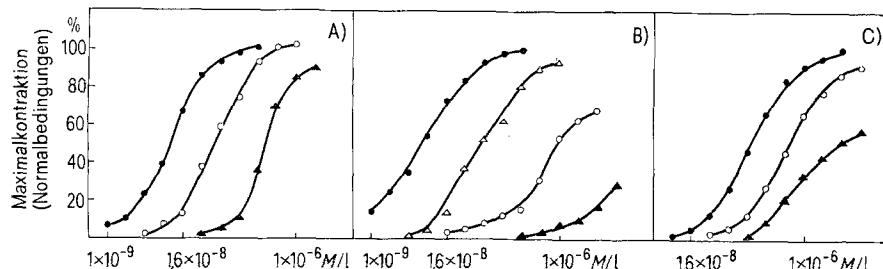


Fig. 2. A) Dosis-Wirkungs-Kurven von E-H unter Normalbedingungen (●), in E-H-Tyrode  $3,2 \times 10^{-8} M$  (○),  $1,28 \times 10^{-7} M$  (▲). B) Dosis-Wirkungs-Kurven von E-H unter Normalbedingungen (●), in SP-O-Tyrode  $8 \times 10^{-9} M$  (△),  $3,2 \times 10^{-8} M$  (○),  $1,28 \times 10^{-7} M$  (▲). C) Dosis-Wirkungs-Kurven von SP-P unter Normalbedingungen (●), in E-H-Tyrode  $3,2 \times 10^{-8} M$  (○),  $1,28 \times 10^{-7} M$  (▲).

Aus der Beziehung  $K_D = \text{Steigung} - 1/\text{Abstand auf der Ordinate}$  kann die Dissoziationskonstante, aus  $y = 1/(1 + K_D/A)$  die Rezeptorbesetzung und aus  $\epsilon_A/\epsilon_B = y_B/y_A$  können relative Wirkaktivitäten für die Verbindungen *A* und *B* berechnet werden<sup>4,5</sup>.

Aus Tabelle I geht hervor, dass die untersuchten SP-Sequenzen am Ratten-Colon als Partialagonisten wirken. Am Meerschweinchen-Ileum, wo alle drei Peptide eine identische Maximalkontraktionshöhe erreichen, eine Differenzierung aus der Dosis-Wirkungs-Kurve also unmöglich ist, ergab die Ermittlung relativer Wirkaktivitäten jedoch Übereinstimmung mit den Ergebnissen am Ratten-Colon, d. h. erheblich geringere Werte für die SP-Sequenzen. Dieser Befund wäre durch das Vorhandensein einer grösseren Rezeptorreserve im Meerschweinchen-Ileum zu erklären. Tabelle II zeigt, dass der  $K_D$ -Wert in jedem Falle grösser als die  $ED_{50}$  und nur für die SP-Sequenzen mit der  $ED_{50}$  am Ratten-Colon vergleichbar ist.

C-terminale Pentapeptidsequenzen von Eledoisin und Substanz P, die sich nur durch eine Aminosäure unterscheiden, zeigen eine nahezu identische Wirkung<sup>11,13</sup>. Die Verlängerung der Kette um eine Aminosäure bedingt erhebliche Zunahme der biologischen Aktivität. Bei identischer Wirkaktivität von SP-H und SP-P ist diese Zunahme und damit der Beitrag von Glutamin auf eine Affinitätssteigerung zurückzuführen. Die relative biologische Aktivität (Vergleich der  $ED_{50}$ ) liegt damit auch im gleichen Bereich wie die relative Affinität (Vergleich der  $K_D$ -Werte).

Die Wirkungssteigerung durch Lysin in Position 6 des E-H gegenüber SP-P ist am Meerschweinchen-Ileum dagegen hauptsächlich durch Erhöhung der Wirkaktivität bedingt. Demzufolge findet sich auch keine Übereinstimmung zwischen relativer Aktivität (SP-P 3,5% der biologischen Aktivität des E-H) und relativer Affinität (61%). Die Bestimmung der relativen Aktivität durch Vergleich der  $ED_{50}$  lässt in solchen Fällen also nicht auf relative Affinitäten von Analogen schliessen.

Die fehlende Übereinstimmung zwischen  $ED_{50}$  am Ratten-Colon und  $K_D$  am Meerschweinchen-Ileum für E-H könnte ebenfalls mit höherer Wirkaktivität am Ratten-Colon gegenüber den SP-Sequenzen erklärt

werden. Da für Tachykinine gegenwärtig keine irreversiblen Antagonisten bekannt sind, ist es nicht möglich, durch Vergleich verschiedener Methoden den Beweis zu führen, dass Rezeptorblockade durch Agonisten selbst eine exakte Bestimmung der Dissoziationskonstanten erlaubt. Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren jedoch, dass es auch bei Peptiden von ausserordentlicher Bedeutung ist, zwischen Affinität und Wirkaktivität zu differenzieren. Das ist auf der einen Seite für Untersuchungen des Wirkungsmechanismus wichtig, zum anderen kann die Aussage bei Struktur-Wirkungs-Analysen erheblich erweitert werden, indem der Beitrag einzelner Aminosäuren für die Gesamtwirkung einer Veränderung der Affinität, der Wirkaktivität oder beider Parameter zugeordnet werden kann. Diese ersten Befunde bedürfen noch einer weitergehenden Bestätigung an anderen Modellen<sup>14</sup>.

*Summary.* Isolated guinea-pig ileum was treated with various agonist concentrations, resulting in partial or complete receptor blockade. This situation is similar to that observed for treatment with irreversible inhibitors. Dissociation constants may be obtained, according to the theory of FURCHGOTT, if eledoisin- or substance P-sequences are added to the organ bath without removing the agonist. In this way the contributions of affinity and intrinsic activity can be dissociated.

J. BERGMANN, P. OEHME, M. BIENERT und H. NIEDRICH<sup>14</sup>

*Bereich molekular- und zellbiologische Wirkstoffforschung des Zentralinstituts für Molekularbiologie der Akademie der Wissenschaften der DDR, Wilhelmstrasse 4, DDR-1136 Berlin-Friedrichsfelde, 16. April 1974.*

<sup>13</sup> P. OEHME, J. BERGMANN, H. G. MÜLLER, R. GRUPE, H. NIEDRICH, W.-E. VOGT, F. JUNG, *Acta biol. med. germ.* 28, 121 (1972).

<sup>14</sup> Für die ausgezeichnete Assistenz sei den Mitarbeiterinnen M. EICHSTÄDT und M. RUDEL herzlich gedankt.

## Die Wirkung von Silymarin-N-methylglucamin-Salz auf den mikrosomalen Gehalt von Cytochrom P450 der Rattenleber bei akuter Thioacetamidintoxikation

Die antihepatotoxische Wirkung von Silymarin (aus *Silybum marianum* (L.) Gaertn.) bei der akuten Thioacetamidintoxikation der Ratte ist sowohl durch Normalisierung erhöhter leberspezifischer Enzymaktivitäten des Serums<sup>1</sup> als auch durch therapeutische Beeinflussung von Regulationsstörungen des Lipidstoffwechsels<sup>2</sup> nachgewiesen. Charakteristisch für die Intoxikation mit Thioacetamid<sup>3</sup> oder mit anderen Hepatotoxika wie Tetrachlorkohlenstoff<sup>4</sup> oder Galaktosamin<sup>5</sup> ist die Abnahme des mikrosomalen Gehalts von Cytochrom P450, bedingt durch eine frühzeitige Schädigung der Struktur und Funktion des endoplasmatischen Reticulums der Leberzelle. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Wirkung von Silymarin-N-methylglucamin-Salz, eines mässig wasserlöslichen Derivates von Silymarin, auf die durch Thioacetamid verursachte Veränderung des mikrosomalen Cytochrom P450-Gehalts untersucht.

60 min vor i.p. Applikation von 300 mg Thioacetamid/kg KG an ca. 200 g schwere, männliche Ratten wurden einem Teil der Tiere (Versuchskollektiv) 400 mg Silymarin-N-methylglucamin-Salz/kg KG in 4%ig. Polyvinylpyrrolidonlösung i.p. verabreicht. Ein weiterer Teil der Tiere (Kontrollkollektiv) sowie ein unvergiftetes Basis Kollektiv erhielten gleiche Volumina der Solventien. 24 h nach Verabreichung des Toxikons wurden die Tiere getötet,

<sup>1</sup> H. SCHRIEWER, R. BADDE, G. ROTH und H. M. RAUEN, *Arzneimittel-Forsch.* 23, 160 (1973).

<sup>2</sup> H. SCHRIEWER, J. LOHMANN und H. M. RAUEN, in Vorbereitung.

<sup>3</sup> E. A. BARKER und E. A. SMUCKLER, *Molec. Pharmac.* 8, 318 (1972).

<sup>4</sup> N. HENI, *Experientia* 27, 293 (1971).

<sup>5</sup> H. GALLENKAMP, D. BRACHTEL und E. RICHTER, *Acta hepato-gastroenterol.* 21, 101 (1974).