

surement of glucose (Sigma Technical Bulletin No. 510) and lactate<sup>5</sup>. Previously described methods were used for the measurements of regeneration of GSH by intact red cells<sup>6</sup> and the stability of GSH in the presence of acetylphenylhydrazine<sup>7</sup>.

**Results and discussion.** The results (table) show that glucose consumption averaged  $4.99 \pm 0.24 \mu\text{M}/\text{h gHb}$  in the cells of red kangaroo compared to  $3.36 \pm 0.29 \mu\text{M}/\text{h gHb}$  in those of grey kangaroos, the difference being statistically significant ( $p < 0.01$ ). Differences in the lactate production by the red cells were also significant between the 2 species ( $p < 0.002$ ).

Metabolism of glucose and reduced glutathione (GSH) in the red blood cells of red and grey kangaroos

	Red kangaroos (N = 5)	Grey kangaroos (N = 5)	P
Glucose consumption ( $\mu\text{M}/\text{h gHb}$ )	$4.99 \pm 0.24$	$3.36 \pm 0.29$	0.01
Lactate production ( $\mu\text{M}/\text{h gHb}$ )	$10.87 \pm 0.72$	$5.88 \pm 0.35$	0.002
GSH regeneration ( $\mu\text{M}/\text{min gHb}$ )	$0.275 \pm 0.029$	$0.038 \pm 0.017$	0.001
GSH stability ( $\mu\text{M}/\text{h gHb}$ )	$0.052 \pm 0.007$	$0.040 \pm 0.008$	NS

Results are means  $\pm$  SEM.

GSH regeneration in the red cells of both the species of kangaroo proceeded linearly; more than 90% of the original GSH was regenerated in less than 30 min in red kangaroo and about 60 min in grey kangaroo. Mean GSH regeneration of  $0.275 \pm 0.029 \mu\text{M}/\text{min gHb}$  in the red cells of red kangaroos was significantly higher ( $p < 0.001$ ) than  $0.038 \pm 0.017 \mu\text{M}/\text{min gHb}$  obtained in grey kangaroos (table). As shown in the table, there was no significant difference in the GSH stability between the 2 species of the kangaroo.

The activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and several other enzymes of glucose metabolism is higher in the red blood cells of grey than those of red kangaroos and yet, as shown in the table, glucose utilization, lactate production, and GSH regeneration rates are significantly lower in the red blood cells of grey than those of red kangaroos. The reason for this paradoxical relationship between enzyme activity and glucose metabolism is not yet clear but it may possibly be related to the level of glycolytic intermediates and/or differences in permeability of the red cells to glucose. Studies in this direction may help understanding the evolutionary interrelationships between the different species of marsupials.

5 E. P. Marbach and M. H. Weil, Clin. Chem. 13, 314 (1967).

6 N. S. Agar, M. A. Gruca and J. D. Harley, Aust. J. expl. Biol. med. Sci. 52, 607 (1974).

7 E. Beutler, in: Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods, p. 112. Grune and Stratton, New York 1971.

## Peroxidase-Isoenzyme in Kressekeimlingen (*Lepidium sativum L.*) und ihre Hemmung durch Silybin, Silydianin und Silychristin

### Peroxidase isoenzymes in cress seedlings (*Lepidium sativum L.*) and their inhibition by silybin, silydianin and silychristin

A. Greimel und H. Koch

Pharmazeutisch-Chemisches Institut der Universität, Währingerstrasse 10, A-1090 Wien (Österreich), 9 Mai 1977

**Summary.** Seedlings of *Lepidium sativum L.* contain 4 peroxidase isoenzymes. Their de-novo-synthesis is significantly depressed in the presence of  $3 \cdot 10^{-8}$  moles/l silybin, silydianin and silychristin in the incubation medium respectively.

In früheren Mitteilungen<sup>1, 2</sup> über unsere Untersuchungen zur Funktion von «Silymarin» in der Pflanze hatten wir berichtet, dass Silybin (I), Silydianin (II) und Silychristin (III), die zusammen das biologisch aktive Prinzip der Früchte der Mariendistel (*Silybum marianum* Gaertn.) darstellen<sup>3</sup>, das Wachstum von Kressekeimlingen in spezifischer Weise beeinflussen. Die Wirkungen von I bis III sind dosisabhängig und lassen sowohl bei der Aktivität der einzelnen Verbindungen als auch bei der Kombination derselben untereinander markante Unterschiede erkennen<sup>1</sup>. Als Ursache für diesen Effekt von I bis III hatten wir eine Interaktion der Wirkstoffe mit dem Metabolismus des primären Phytohormons Indolessigsäure (IAA) in Betracht gezogen<sup>4</sup> und diese Vermutung auch experimentell gestützt<sup>2, 4</sup>. So erweisen sich I-III in vitro als spezifische Inhibitoren der Meerrettich-Peroxidase<sup>2</sup>, eines Enzyms, das mit der Indolessigsäure-Oxidase (IAA-Oxidase) der Pflanzen nahe verwandt ist<sup>5</sup>. Der durch die Inhibition der IAA-Oxidase verminderte Abbau der IAA muss daher zwangsläufig zu einer Verstärkung der speziellen Wirkungen des Phytohormons führen.

In dieser Arbeit führen wir den Nachweis, dass unser Testobjekt<sup>6</sup>, Keimlinge der Gartenkresse (*Lepidium sativum L.*), mehrere Peroxidase-Isoenzyme enthält und dass die De-novo-Synthese derselben durch die Testsubstanzen I-III signifikant herabgesetzt wird.

**Material und Methodik.** Testsubstanzen und Testsystem. Zur Anwendung kamen stabile, wasserlösliche Derivate von I bis III (Na-Salze der Dihemisuccinate)<sup>7</sup>. Als Testobjekt wurden Keimlinge von *Lepidium sativum L.*, Sorte «cresson frisé», benutzt. Eine genaue Beschreibung dieses Testsystems findet sich an anderer Stelle<sup>6</sup>. Folgende

1 H. Koch, Experientia 31, 281, 1283 (1975).

2 A. Greimel und H. Koch, Experientia 33, 1417 (1977); Biochem. Physiol. Pflanzen 171, 419, 425 (1977).

3 H. Wagner, P. Diesel und M. Seitz, Arzneimittel-Forsch. 24, 466 (1974).

4 A. Greimel, Dissertation, Universität Wien, 1976.

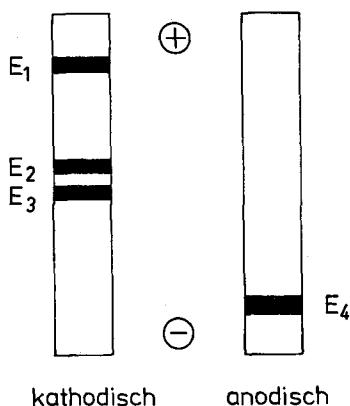
5 J. P. Gove und C. M. Hoyle, Pl. Physiol. 56, 684 (1975).

6 H. Koch, Sci. Pharm., Wien 39, 209 (1971).

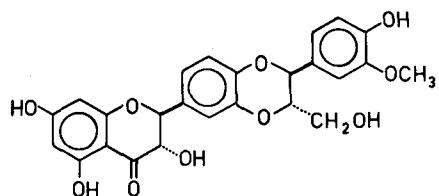
7 Herrn Dr. K. Görler in Firma Dr. Madaus & Co., Köln, danken wir für die freundliche Überlassung der Testsubstanzen.

## Peroxidaseaktivität in Kressekeimlingen in den Stadien A und B

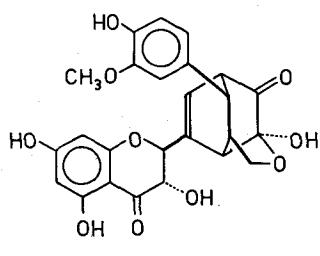
Entwicklungsstadium	Enzymaktivität (Δ E/min/mg Protein)	Hemmung (%)
A	0,70	-
B <sub>0</sub>	4,03	0
B <sub>I</sub>	2,27	43,7
B <sub>II</sub>	2,57	36,2
B <sub>III</sub>	3,17	21,3



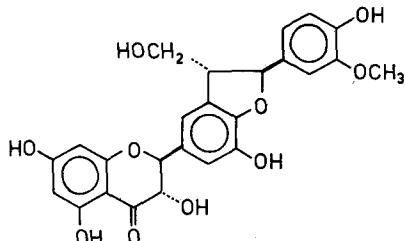
Strukturen von Silybin (I), Silydianin (II) und Silychristin (III). Peroxidase-Isoenzymmuster von Kressekeimlingen (*Lepidium sativum L.*).



I



II



III

Strukturen von Silybin (I), Silydianin (II) und Silychristin (III).

Entwicklungsstadien der Keimlinge werden unterschieden: A = Anzuchtstadium (30 h in aqua font. bei 26 °C), B = embryonales Wachstum (auf A folgende 24 h in 0,02 M Phosphatpuffer pH = 6), und zwar ohne Zusatz (B<sub>0</sub>, Kontrolle) bzw. unter Zusatz von jeweils 3 · 10<sup>-3</sup> Mol/l der Testsubstanzen I (B<sub>I</sub>), II (B<sub>II</sub>) und III (B<sub>III</sub>). Enzympräparation. Die von Samenschale und anhaftendem Schleim befreiten Keimlinge (Stadium A) bzw. die in den zu testenden Medien (B<sub>I</sub>–B<sub>III</sub>) und im Kontrollmedium (B<sub>0</sub>) angezogenen Keimlinge (Versuchsmenge etwa 1 g) wurden in 6 ml 0,1 M Phosphatpuffer, pH = 7, unter Eiskühlung homogenisiert, filtriert und bei 50 000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 4 °C 20 h lang gegen 0,01 M Puffer dialysiert und das Dialysat zur Aktivitätsmessung, Proteinbestimmung<sup>8</sup> und Disk-Elektrophorese benutzt.

Aktivitätsmessung. 1 ml Guajacollösung (1,5 · 10<sup>-2</sup> Mol/l), 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,5 · 10<sup>-2</sup> Mol/l) und 0,9 M Phosphatpuffer, pH = 7, wurden bei 30 °C mit 0,1 ml Dialysat versetzt. Die Extinktion wurde 3 min lang bei 436 nm gegen Luft aufgezeichnet und daraus die mittlere Extinktionszunahme (ΔE/min) berechnet. Die erhaltenen Werte wurden auf den jeweiligen Proteingehalt des Dialysates bezogen (ΔE/min/mg Protein).

Diskelektrophorese. Die Dialysate wurden in Minicon-Einheiten 25fach konzentriert und auf Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Gerät: Modell 1200 der Fa. Canalco, Rockville, Maryland, USA<sup>9</sup>. Die Auftrennung erfolgte nach Maurer<sup>10</sup> mit Gelsystem Nr. 1 (4 mA/Röhrchen, Laufzeit 1,5 h) für anodisch und mit Gelsystem Nr. 5 (1,5 mA; Laufzeit 3,5 h) für kathodisch wandernde Isoenzyme. Jedes Gelröhrchen (Länge 70 mm, Durchmesser 6 mm) wurde mit 1 ml Trenngel und mit 0,3 ml Sammelgel beschickt. Das Enzymkonzentrat wurde direkt auf das Sammelgel aufgetragen (25 µl/Röhrchen) und mit Elektrodenpuffer überschichtet. Detektion. Die Trenngelen wurden nach Siegel et al.<sup>11</sup> in einem Gemisch aus 5 ml Guajacollösung, 5 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 5 ml Phosphatpuffer 20 min inkubiert, wobei die Isoenzyme als rotbraune Bänder sichtbar wurden.

Resultat. Die pflanzliche Peroxidase (E.C. 1.11.1.7) tritt auch im vorliegendem Testobjekt in multipler Form auf. Auf Grund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit und Laufrichtung können 3 kathodisch (E<sub>1</sub>–E<sub>3</sub>) und 1 anodisch migrierendes Isoenzym (E<sub>4</sub>) nachgewiesen werden (Figur).

Die Zymogramme der Stadien A und B erscheinen qualitativ gleichartig. Eine semiquantitative Auswertung ergab lediglich, dass die Aktivität der Isoenzyme E<sub>2</sub>–E<sub>4</sub> mit fortschreitender Entwicklung der Keimlinge stark zunimmt. Die Gesamtkaktivität der Peroxidase ist in den mit den Testsubstanzen I–III behandelten Keimlingen deutlich niedriger als in den unbehandelten Kontrollen (Tabelle). Da im vorliegenden Fall die Enzymaktivität, bezogen auf den Proteingehalt, in den mit I–III behandelten Keimlingen signifikant absinkt, ist der Schluss zulässig, dass die Silymarinkomponenten nicht nur, wie bereits früher festgestellt<sup>2</sup>, als Inhibitoren der Peroxidase wirksam sind, sondern dass sie auch in einer noch nicht geklärten Weise die De-novo-Synthese des Enzyms in der Pflanze beeinträchtigen.

8 O. Folin und V. Ciocalteu, J. biol. Chem. 73, 627 (1927).

9 Frau Dr. H. Puxkandl, II. Med. Univ. Klinik, Wien, danken wir für die Bereitstellung des Elektrophoresegerätes.

10 R. H. Maurer, Diskelektrophorese, Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Elektrophorese. Walter de Gruyter & Co., Berlin 1968.

11 B. Z. Siegel und A. W. Galston, Science 157, 1557 (1967).