

Verträglichkeit von 5-Hydroxymethylfurfural (HMF)

2. Mitteilung: Pharmakologische Wirkungen

Von G. Czok

Mit 2 Abbildungen in 4 Einzeldarstellungen und 6 Tabellen

(Eingegangen am 11. April 1970)

In den vorangegangenen Untersuchungen war 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) in einem chronischen Fütterungsversuch an Ratten und an der Zellkultur getestet worden. Hierbei konnten entweder keine oder nur sehr geringfügige biologische Effekte nachgewiesen werden. Dies war der Anlaß, einige pharmakologische Untersuchungen mit HMF vorzunehmen und dabei insbesondere die akute Toxizität dieser Verbindung, ihre Resorption und Ausscheidung, sowie ihre Wirkung auf bestimmte Organe, und zwar auf das Zentralnervensystem, den Magen-Darm-Kanal und das Leber-Galle-System zu prüfen.

Über die Ergebnisse dieser Untersuchungen soll im folgenden berichtet werden.

Methodik

1. Toxizitätsbestimmungen

Die LD 50 von HMF wurde an Mäusen nach oraler, intraperitonealer und intravenöser Gabe bestimmt. Die Bestimmung der LD 50 erfolgte nach der Methode von LITCHFIELD und WILCOXON (1949).

2. Messung der zentralen Erregbarkeit

Zur Beurteilung der zentralen Erregbarkeit wurde die Spontanaktivität von Mäusen mit der von SCHULER (1960) angegebenen Apparatur bestimmt.

Für diese Versuche wurden 20–25 g schwere männliche Mäuse vom Stamm NMRI verwendet, die eine Standardkost (Altromin) und Wasser ad libitum erhielten. Jeweils 16 Tiere wurden morgens auf die Bewegungsaufnehmer der Meßapparatur gesetzt. Die eine Hälfte diente als Kontrolle, die andere Hälfte als Versuchsgruppe. Die Empfindlichkeit der Bewegungsaufnehmer war so eingestellt, daß gleichzeitig die Fein- und Grobmotorik der Tiere ermittelt werden konnte. Die vorgewählten Empfindlichkeitsschwellen verhielten sich dabei wie 2:3. Nach einer Eingewöhnungszeit von 2 Stunden erhielt die Versuchsgruppe HMF in einer Dosierung von 50, 100 oder 200 mg/kg mittels Schlundsonde, die Kontrolle eine entsprechende Wassermenge. Die Aktivitätswerte für die Fein- und Grobmotorik wurden in halbstündlichen Abständen während einer Gesamtdauer von 2 Stunden ermittelt. Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen wurden kurvenmäßig dargestellt, indem die prozentualen Änderungen der Aktivität, bezogen auf den Ausgangswert (= 100%), als Ordinate gegen die Zeit als Abszisse aufgetragen wurden.

3. Messung der Galleausscheidung bei Ratten

Die Untersuchungen wurden an 200–250 g schweren männlichen Wistar-Ratten vorgenommen.

Den Tieren wurde 14–16 Stunden vor Versuchsbeginn das Futter (Altromin) entzogen, Trinkwasser aber belassen.

Die Messung der Galleausscheidung erfolgte nach der Methode von FROMHERZ (1942) und KALOW (1949), die in folgenden Punkten modifiziert wurde:

In Urethannarkose (1,25 g/kg i. m.) wurde ein dünner Kunststoff-(PVC-)Katheter in den Ductus choledochus eingelegt. Ein zweiter Katheter wurde in den distalen Abschnitt des Duodenum eingebunden. Die Tiere wurden anschließend in einem Wärmeschrank bei einer Temperatur von 30 ° gelagert. Etwa eine Stunde nach Beendigung der Operation wurde mit den Versuchen begonnen. Es wurden dann zunächst während einer Vorperiode von 20 Minuten das ausgeschiedene Gallevolumen und die darin enthaltene Trockensubstanzmenge bestimmt. Anschließend wurde HMF (50, 100, 200 mg/kg) bzw. eine entsprechende Wassermenge (= Kontrolle) den Tieren durch den Duodenalkatheter verabreicht und während 6 weiterer Sammelperioden Gallevolumen und Galletrockensubstanz ermittelt.

Die Versuchsergebnisse wurden graphisch dargestellt, indem die Gallemenge und Galletrockensubstanz – bezogen auf den Ausgangswert (= 100%) – als Ordinate gegen die Zeit als Abszisse aufgetragen wurden.

4. Messung der Darmmotilität an Mäusen

Die Messung der Darmmotilität wurde an 20–25 g schweren männlichen Mäusen (Stamm NMRI) nach der Methode von WITKIN et al. (1961) vorgenommen.

Die Tiere erhielten vorher eine Standardkost (Altromin) und Wasser ad libitum. 14–16 Stunden vor Versuchsbeginn wurde den Tieren das Futter entzogen. Die Tiere erhielten mittels Schlundsonde zuerst HMF in einer Menge von 50, 100 oder 200 mg/kg bzw. eine entsprechende Wassermenge (= Kontrolle). 30 Minuten später wurde gleichfalls mittels Schlundsonde 0,2 ml Tuschelösung, hergestellt aus 1 Teil Perlтусе und 4 Teilen Wasser, verabreicht. Nach Ablauf weiterer 40 Minuten wurden die Tiere getötet. Es wurde dann der gesamte Magen-Darm-Trakt entnommen, der Tuschetransport im Darm und die Gesamtdarmlänge ermittelt und aus diesen Meßwerten der Tuschetransport in Prozent Darmlänge errechnet.

5. Chemische Bestimmung von HMF

Die Bestimmung von HMF wurde nach der von KEENEY und BASSETTE (5) angegebenen Methode vorgenommen.

Zu jeweils 1 ml der HMF enthaltenden Proben von Serum, Galle, Darminhalt oder Harn wurden 5 ml 0,3 n-Oxalsäure und 5 ml 40%iger Trichloressigsäure zugegeben und filtriert.

4 ml Filtrat wurde dann mit 1 ml 0,05 m Thiobarbitursäure versetzt und in einem Wasserbad bei 40 ° erhitzt. Die entstandene Gelbfärbung wurde anschließend gegen einen in entsprechender Weise hergestellten Reagenzienleerwert in einem Spektralphotometer bei 443 nm gemessen. Aus den erhaltenen Extinktionswerten wurden an Hand einer Eichkurve die HMF-Konzentrationen ermittelt. Die Eichkurve zeigte im Konzentrationsbereich von 0,01 bis 0,05 mg HMF/ml einen linearen Verlauf.

6. Resorptionsversuche mit HMF

Die Resorption von HMF wurde an Mäusen in folgender Weise geprüft:

20 Tiere erhielten nach vorherigem Nahrungsentzug 100 mg/kg HMF mittels Schlundsonde. 5, 15, 30 und 60 Minuten nach Gabe von HMF wurden jeweils 5 Tiere getötet. Es wurde dann der Magendarmkanal entnommen und mit aqu. dest. mehrfach durchgespült. In der Spüfflüssigkeit wurde die HMF-Konzentration ermittelt und daraus die im Magendarmkanal wiedergefundene Menge an HMF errechnet.

7. Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

Zur statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse wurde der t-Test von STUDENT (FISHER 1956) herangezogen. 5-Hydroxymethylfurfural purissimum der Firma K. Roth, Karlsruhe, wurde für die Versuche verwendet. Die gelieferte Substanz wurde einer nochmaligen Reinigung unterworfen, wodurch ein Reinheitsgrad von 99% zu erzielen war.

Ergebnisse

1. Akute Toxizität von HMF

In Untersuchungen an Mäusen wurde die LD 50 von HMF nach intravenöser und intraperitonealer Verabreichung bestimmt. Die dabei erhaltenen Werte sind in der Tab. 1 zusammengestellt.

Tab. 1. LD 50 von HMF bei Mäusen (bestimmt nach LITCHFIELD und WILCOXON)

Applikation	LD 50	95%ige Sicherheitsgrenze
intravenös	0,751 g/kg	0,665–0,849 g/kg
intraperitoneal	0,842 g/kg	0,752–0,943 g/kg

Oral verabreichtes HMF wurde von den Mäusen in Mengen bis zu 1g/kg ohne erkennbare Nebenwirkungen toleriert.

Nach oraler Zufuhr von 2 g/kg HMF zeigten die Tiere deutliche Erregungszustände. Dabei kam es meist zu kurzdauernden tonisch-klonischen Kramp fzuständen, von denen sich die Tiere vollständig erholten.

2. Wirkung von HMF auf die zentrale Erregbarkeit

Abb. 1 zeigt den Einfluß von HMF auf die Spontanaktivität von Mäusen, die ein gutes Maß für die zentral-nervöse Erregbarkeit darstellt. Nach den vorliegenden Befunden vermag HMF in Abhängigkeit von der verabreichten Dosis die Spontanaktivität von Mäusen und damit die zentrale Erregbarkeit zu steigern. Der Effekt auf die Feinmotorik ist dabei nur schwach, der auf die Grobmotorik dagegen erheblich stärker ausgeprägt.

Die Gesamtwerte der Spontanaktivität, ausgedrückt durch die Zahl der Kontaktschlüsse in zwei Stunden, nebst Fehlerbreite und den im t-Test ermittelten p-Werten sind auf der Tab. 2 zusammengestellt.

Tab. 2. Spontanaktivität von Mäusen mit gleichzeitiger Unterscheidung von Fein- und Grobmotorik nach oraler Gabe von HMF

Behandlung	Tiergruppen	Feinmotorik Kontakte/2 Std. $\bar{x} \pm s\bar{x}$	p	Grobmotorik Kontakte/2 Std. $\bar{x} - s\bar{x}$	p
ohne (Kontrolle)	3	710 \pm 135	—	486 \pm 94	—
HMF 50 mg/kg	3	979 \pm 184	< 0,20 > 0,10	681 \pm 78	< 0,10 > 0,05
HMF 100 mg/kg	3	2315 \pm 289	< 0,001	910 \pm 138	< 0,05 > 0,02
HMF 200 mg/kg	3	4774 \pm 194	< 0,001	2295 \pm 118	< 0,001

Nach den hier vorgelegten Untersuchungsergebnissen ist nach oraler Verabreichung von HMF eine dosisabhängige Erhöhung der Spontanaktivität von Mäusen,

und zwar sowohl der Feinmotorik als auch der Grobmotorik, nachzuweisen. Die Zunahme der Spontanaktivität ist gegenüber den Kontrollen nach HMF-Gaben von 100 und 200 mg/kg signifikant bzw. hochsignifikant; nach einer HMF-Dosis von 50 mg/kg dagegen noch unterhalb der Signifikanzgrenze. Wie man weiter feststellen kann, erhöht sich die Fein- und Grobmotorik nach HMF gegenüber der Kontrollgruppe im allgemeinen um den gleichen Faktor. Da die absoluten Ausgangswerte für die Grobmotorik regelmäßig um den Faktor 2 oder mehr tiefer lagen als bei der Feinmotorik, war der prozentuale Anstieg der Grobmotorik stärker als für die Feinmotorik (siehe Abb. 1).

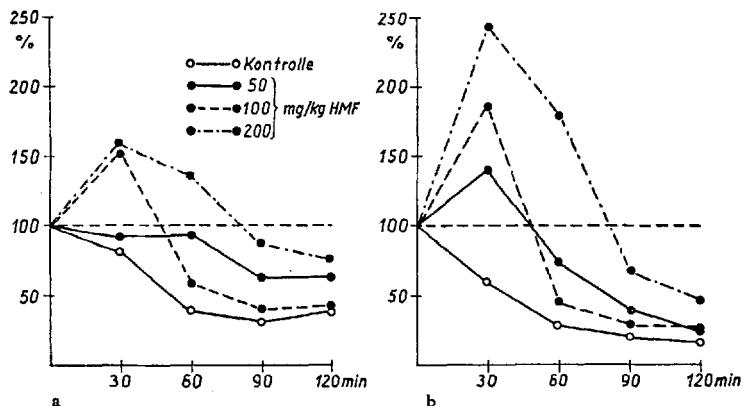


Abb. 1. Wirkung von HMF auf die Spontanaktivität von Mäusen. Meßwerte auf die Vorperiode (= 100%) bezogen. (a = Feinmotorik, b = Grobmotorik)

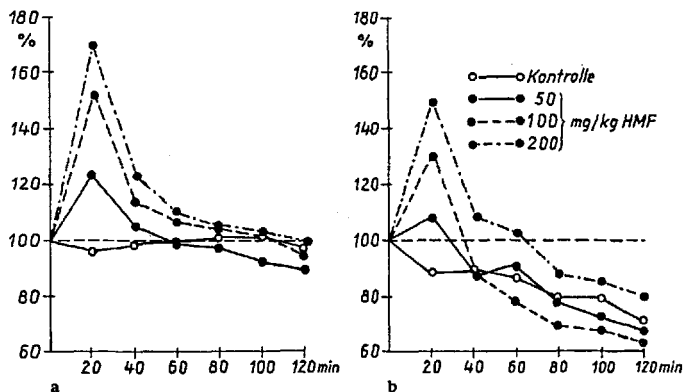


Abb. 2. Wirkung von HMF auf die Galleausscheidung von Ratten. Meßwerte auf die Vorperiode bezogen (= 100%) (a = Gallevolumen, b = Gallefestsubstanz)

3. Wirkung von HMF auf die Galleausscheidung

Abb. 2 zeigt die an Gallefistelratten erhaltenen Ergebnisse, denen HMF in einer Dosierung von 50, 100 oder 200 mg/kg intraduodenal verabreicht wurde. Man beobachtet eine Zunahme des ausgeschiedenen Gallevolumens in Abhängigkeit von der verabreichten HMF-Dosis. Das Wirkungsmaximum wird dabei bereits in der ersten

20-Minuten-Periode erreicht. Anschließend nimmt das Gallevolumen schnell ab und liegt nach 2-3 weiteren Versuchsperioden in Höhe der Kontrollgruppe.

Bei der ausgeschiedenen Gallefestsubstanz ergeben sich im allgemeinen entsprechende prozentuale Änderungen, wie sie beim Gallevolumen festgestellt wurden. Es bestehen dabei aber folgenden Auffälligkeiten: Der in der ersten 20-Minuten-Periode erfolgende Anstieg der Galletrockensubstanz ist wesentlich geringer im Vergleich zum ausgeschiedenen Gallevolumen. Außerdem liegen die bei Versuchsende ermittelten Werte an Galletrockensubstanz sowohl nach Gabe von HMF als auch im Kontrollversuch beträchtlich unter den zu Versuchsbeginn gemessenen Werten. Mit zunehmender Versuchsdauer nimmt also die Gallefestsubstanz fortlaufend ab, d. h., es entwickelt sich eine Hydrocholerese.

In der Tab. 3 finden sich weitere Angaben über die durchschnittliche Galleausscheidung nach Verabreichung von HMF und die Mittelwertsvergleiche mit der Kontrolle nach dem t-Test von STUDENT. Es erfolgte eine Normalisierung der Galleausscheidungswerte in der Weise, daß für jede Meßperiode der Quotient Gallevolumen/Galleffolumen der Vorperiode errechnet wurde.

Tab. 3. Durchschnittliche, normalisierte Galleausscheidung von Ratten nach intraduodenaler Gabe von HMF und Mittelwertsvergleich nach dem t-Test

Behandlung	Galleausscheidung		p
	\bar{x}	$s\bar{x}$	
ohne (Kontrolle)	$0,99 \pm 0,037$		—
HMF 50 mg/kg	$1,01 \pm 0,049$		$< 0,70 > 0,60$
HMF 100 mg/kg	$1,12 \pm 0,052$		$< 0,02 > 0,01$
HMF 200 mg/kg	$1,18 \pm 0,048$		$< 0,01 > 0,001$

Nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen ist das durchschnittlich ausgeschiedene Gallevolumen nach Verabreichung von 200 und 100 mg/kg HMF gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Nach 50 mg/kg HMF besteht dagegen kein Unterschied im Vergleich zur Kontrolle.

4. Wirkung von HMF auf die Darmmotorik

Die Wirkung von HMF auf die Darmmotorik der Maus, die mit der Tuschetransportmethode ermittelt wurde, ist aus der Tab. 4 zu entnehmen.

Tab. 4. Wirkung von HMF auf die Darmmotorik der Maus

Behandlung	Tuschetransport in % Darmlänge		p
	\bar{x}	$s\bar{x}$	
ohne (Kontrolle)	$52,7 \pm 1,06$		—
HMF 50 mg/kg	$58,3 \pm 2,00$		$< 0,02 > 0,01$
HMF 100 mg/kg	$59,7 \pm 2,35$		$< 0,01 > 0,001$
HMF 200 mg/kg	$68,0 \pm 5,00$		$< 0,001$

Nach den Ergebnissen der Tab. 4 vermag HMF in einer Dosierung von 50, 100 und 200 mg/kg offenbar die Darmmotorik der Maus anzuregen. Mit zunehmender Dosis ist eine Verstärkung dieses Effektes nachzuweisen. Der darmstimulierende Effekt von HMF konnte beim Vergleich mit der Kontrolle statistisch gesichert werden.

5. Resorption, Blutspiegel und Ausscheidung von HMF

In der Tab. 5 sind die im Magendarmkanal von Mäusen wiedergefundenen Mengen von HMF wiedergegeben, die zu verschiedenen Zeiten nach HMF-Applikation ermittelt wurden.

Tab. 5. Wiedergefundenes HMF im Magendarmkanal von Mäusen nach oraler Gabe von 100 mg/kg HMF (Mittelwerte aus 5 Einzelversuchen)

Zeit nach Gabe von HMF	im Magendarmkanal mg/kg	HMF-wiedergefunden	
		Schwankungsbereich	Dosis %
5 Minuten	17,3	10,8—21,5	17,3
15 Minuten	6,5	4,2— 9,4	6,5
30 Minuten	4,8	3,2— 7,9	4,8
60 Minuten	1,3	0,5— 2,3	1,3

Bei Ratten, die 100 mg/kg HMF oral mittels Schlundsonde erhalten hatten, konnten 15, 30 und 60 Minuten nach der Zufuhr von HMF im Blutplasma keine meßbaren Mengen von HMF nachgewiesen werden.

Im Harn schieden Mäuse und Ratten nur geringe Mengen an HMF aus, wenn ihnen 100 mg/kg HMF verabreicht worden war. Die während einer 4-stündigen Harnsammelperiode ermittelten Mengen an HMF betrugen bei Mäusen im Mittel 0,36% und bei Ratten 0,6% der verabreichten Dosis. In den Untersuchungen an Ratten war außerdem noch festzustellen, daß unter dem Einfluß von HMF eine leichte Diuresesteigerung auftrat.

Nach i. v. Injektion von HMF sanken die Plasmakonzentrationen von HMF sehr schnell ab, wie aus Tab. 6 zu entnehmen ist.

Nach den vorstehenden Untersuchungsergebnissen erhält man nach i. v. Injektion von HMF einen exponentiellen Abfall der HMF-Plasmakonzentrationen, für den sich eine Halbwertszeit von etwa 6 Minuten errechnen läßt.

Tab. 6. HMF-Plasmawerte von Ratten (Mittelwerte aus 3 Versuchen)
nach i. v. Injektion von 100 mg/kg HMF

Zeit nach Injektion	HMF-Plasmaspiegel	
	Schwankungsbereich	Mittelwert
5 Minuten	1,42—1,57 mg %	1,51 mg %
10 Minuten	0,54—0,99 „	0,80 „
15 Minuten	0,19—0,42 „	0,32 „
20 Minuten	0,16—0,21 „	0,19 „
30 Minuten	0,09—0,15 „	0,11 „
60 Minuten	0,05—0,07 „	0,06 „

Nach i. v. Injektion war die im Harn ausgeschiedene Menge an HMF bei Mäusen etwa gleich groß wie nach oraler Gabe, sie betrug im Mittel 0,31 % der verabreichten HMF-Dosis.

In Untersuchungen an Gallefistelratten konnte ferner nachgewiesen werden, daß i. v. verabreichtes HMF in geringem Umfang auch über die Galle ausgeschieden wurde. Die an jeweils 3 Ratten ermittelte Galleausscheidung von HMF betrug 30 Minuten nach HMF-Injektion (100 mg/kg) im Mittel 0,16 % der verabreichten Dosis (Schwankung: 0,14-0,18 %) und 60 Minuten nach i. v. Injektion 0,27 % (Schwankung: 0,25-0,29 %).

Diskussion

Nach den hier vorgelegten Untersuchungsergebnissen besitzt HMF bei parenteraler Zufuhr nur eine schwache Toxizität. Das gleiche gilt auch für die orale Toxizität von HMF, das sogar in Mengen von 2 g/kg von den Tieren vertragen wurde.

Von besonderem Interesse ist außerdem die Feststellung, daß HMF nach oraler Verabreichung in Mengen von 50, 100 und 200 mg/kg bestimmte pharmakologische Wirkungen zu entfalten vermag. Es wurde dabei eine Steigerung der Spontanaktivität von Mäusen, eine Zunahme der Galleausscheidung bei Ratten und eine erhöhte Darmmotorik von Mäusen gefunden. Diese Effekte zeigten eine deutliche Dosisabhängigkeit und waren im Fall der Spontanaktivität und der Galleausscheidung bereits in den ersten 20 bis 30 Minuten nach HMF-Gabe am stärksten ausgeprägt. Hiernach ließ sich zunächst eine schnelle Resorption von HMF vermuten, was jedoch durch die Ergebnisse der Resorptionsversuche nicht belegt werden konnte.

So wurde nach oraler Zufuhr von HMF zwar ein schnelles Verschwinden dieser Substanz aus dem Magendarmkanal nachgewiesen, gegen eine stärkere Resorption sprach dabei aber der Befund, daß gleichzeitig weder im Blut noch im Harn HMF in größerer Menge nachweisbar war.

Die hier erhobenen Befunde sind daher vielleicht am besten mit der Vorstellung vereinbar, daß HMF als reaktionsfähige Substanz bereits im Darm in andere biologisch aktive Stoffe umgewandelt wird, die dann nach Resorption die verschiedenen Organwirkungen entfalten.

Durch weitere Untersuchungen soll die hier diskutierte Vorstellung überprüft werden.

Zusammenfassung

In tierexperimentellen Untersuchungen wurde 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) hinsichtlich seiner pharmakologischen Wirksamkeit geprüft, wobei die folgenden Ergebnisse erhalten wurden:

Die an Mäusen festgestellten LD 50 von HMF betrug nach i. v. Injektion 0,751 g/kg, nach i. p. Injektion 0,842 g/kg. Per os zugeführte HMF hatte dagegen bis zu einer Menge von 2 g/kg keine letale Wirkung.

Durch orale Gaben von 50, 100 und 200 mg/kg HMF war eine dosisabhängige Steigerung der Spontanaktivität und Darmmotorik von Mäusen sowie eine Zunahme der Galleausscheidung von Ratten zu erzielen. Oral verabreichtes HMF war innerhalb kurzer Zeit aus dem Magendarmkanal verschwunden. Dabei konnte HMF im Blut und Harn höchstens in Spuren nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Befunde wird vermutet, daß HMF bereits im Magendarmkanal in andere biologisch wirksame Substanzen umgewandelt wird, die dann nach Resorption die festgestellten Organwirkungen entfalten.

Summary

Some pharmacological effects were studied with HMF in a series of animal experiments.

The LD 50 in mice was 0,751 g/kg body weight after i. v. administration and 0,842 g/kg after i. p. administration. No letal effects were seen however on oral administration up to 2 g/kg. 50, 100 and 200 mg/kg HMF given orally caused a dosage dependent vise in the spontaneous activity and in the intestinal motility of mice as well as an increase in the bile flow of rats. HMF disappeared very quickly from the intestinal tract.

In spite of this only traces could be recovered from the blood and urines. This seems to indicate that HMF is converted into biological active substances before absorption and that these substances are responsible for the biological effects.

Literatur

1. FISHER, R. A., Statistische Methoden für die Wissenschaft, (Edinburg 1956). — 2. FROMHERZ, K., Arch. exp. Path. Pharmak., **200**, 571 (1942). — 3. KALOW, W., Arch. exp. Path. Pharmak., **206**, 35 (1949). — 4. LITCHFIELD, J. T. und F. WILCOXON, J. Pharmacol. exp. Ther. **96**, 99 (1949). — 5. KEENEY, M. und R. BASSETTE, J. Dairy Sci. **42**, 945 (1959). — 6. SCHULER, E., Arzneimittelforschg. **10**, 959 (1960). — 7. WITKIN, L. B., C. F. HEUNBER, F. GALDI, E. O. KEETE, P. SPITALETTA und A. I. PLUMMER, J. Pharmacol. exp. Ther. **133**, 400 (1961).

Anschrift des Verfassers:

Privatdozent Dr. G. CZOK, Pharmakologisches Institut der Universität Hamburg
2000 Hamburg 20, Martinstraße 52