

Antirheumatica und Stoffwechsel der Chondroitinschwefelsäure : vorläufige Mitteilung

Autor(en): **Wirz, H. / Exer, B. / Bühler, G.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie Suisse des Sciences Medicales = Bollettino dell' Accademia Svizzera delle Scienze Mediche**

Band (Jahr): **18 (1962)**

PDF erstellt am: **05.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-309114>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Aus den Forschungslaboratorien der J. R. Geigy AG
und dem Institut de Pathologie de l'Université de Genève¹

Antirheumatica und Stoffwechsel der Chondroitinschwefelsäure

Vorläufige Mitteilung²

Von H. Wirz, B. Exer und G. Bühler

Systematische Untersuchungen über Veränderungen in der Zusammensetzung des Bindegewebes unter dem Einfluß von Krankheiten und experimentellen Schäden und andererseits unter dem Einfluß therapeutischer Maßnahmen finden wir erst seit 1949 [1, 2]. So ist bekannt, daß bei verschiedenen entzündlichen Vorgängen der Gehalt an Mucopolysacchariden ansteigt. 1950 zeigte *Layton*, daß markiertes anorganisches Sulfat in vitro [3] und in vivo [4] in die Chondroitinschwefelsäure des Granulationsgewebes eingebaut wird. Cortison hemmt diesen Einbau (*Boström* und *Månsson* [5]), wie es ganz allgemein die entzündliche Reaktion und die Wundheilung hemmt.

Die synthetischen Antiphlogistica wurden für solche Untersuchungen erst in den allerletzten Jahren herangezogen. So beschreiben *Hershberger*, *Hansen* und *Ranney* [6] und kürzlich *du Boistesselin* und *Porcile* [7], daß Phenylbutazon³ ebenso wie die Glucocorticoide den Einbau von markiertem Sulfat in Fremdkörpergranulome hemmt. Noch stärker als Phenylbutazon hemmt Oxyphenbutazon⁴, und auch Salizylsäure zeigt einen deutlich hemmenden Einfluß.

Daraus läßt sich indirekt der Schluß ziehen, daß die untersuchten Antirheumatica die Synthese der Chondroitinschwefelsäure hemmen. Es lassen sich jedoch auch andere Erklärungsmöglichkeiten ausdenken, und darum haben wir durch fraktionierte Aufarbeitung des Gewebes die Chondroitinschwefelsäure rein dargestellt. Damit sind wir in der Lage,

¹ Wir danken Herrn Prof. *E. Rutishauser* für die Unterstützung dieser Arbeit.

² Wissenschaftliche Sitzung der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften, Zürich, 2. Dezember 1961

³ Wirksubstanz von Butazolidin®.

⁴ Wirksubstanz von Tanderil®.

nicht nur die Aktivität des gesamten Granulationsgewebes nach Verabreichung von markiertem Sulfat anzugeben, sondern die spezifische Aktivität der Chondroitinschwefelsäure. Eine ausführliche Publikation ist in Vorbereitung, und es sollen hier nur die wichtigsten Ergebnisse im Sinne einer vorläufigen Mitteilung präsentiert werden.

Die im Lichtmikroskop strukturlose Grundsubstanz des Bindegewebes enthält als charakteristische Bestandteile die Glykoproteide, das sind Eiweiß-Komplexe mit neutralen oder sauren Mucopolysacchariden als prosthetischen Gruppen. Uns interessieren hier in erster Linie die sauren Polysaccharide, insbesondere die sulfatierten. All diese Stoffe bestehen aus unverzweigten Ketten, in denen eine Hexuronsäure mit einem azetylierten Aminozucker abwechselt. Einzig im Falle des Keratosulfats findet sich an Stelle der Uronsäure ein Galactose-Rest. Die Schwefelsäure, sofern sie vorhanden ist, findet sich in Ester-Bindung an Stelle 4 oder 6 des Aminozuckers.

Bei der Chondroitinschwefelsäure sind heute 3 verschiedene Typen bekannt. Typ A und C sind Isomere, die sich durch die Stellung der Schwefelsäure unterscheiden, während beim Chondroitinsulfat B das Galactosamin mit der Iduronsäure (statt Glucuronsäure) abwechselt. In unsern Versuchen wurde nur auf eine saubere Abtrennung der sulfatierten Polysaccharide Wert gelegt und keine Auftrennung in diese 3 Typen versucht. Die Ergebnisse beziehen sich somit auf die Summe der drei Chondroitinschwefelsäuren und (im Knorpel) zusätzlich auf das Keratosulfat.

Methodik

Als Modell eines entzündlichen Gewebes wurde der Granulombeutel der Ratte verwendet. Die Methode stammt von *Selye* [8]; sie besteht darin, daß man Ratten 25 ml Luft und 1 ml verdünntes Crotonöl unter die Rückenhaut spritzt. Unter dem Reiz des Crotonöls kapselt sich das Luftkissen bald ab, und es entsteht ein Sack aus Granulationsgewebe, der sich mehr oder weniger sauber von der Umgebung abtrennen läßt. Im Laufe von 14 Tagen wird die Wand dieses Sackes einige Millimeter dick; die eingeschlossene Luft wird zum größten Teil durch ein meist hämorrhagisches Exsudat ersetzt.

Bei uns verwendet *Wilhelmi* [9, 10] diese Methode routinemäßig zur Prüfung von Antiphlogistica. Als Kriterien für die antiphlogistische Wirkung dienen das Gewicht des herauspräparierten und entleerten Sackes und die Menge des Exsudats. Es zeigt sich, daß die bekannten synthetischen Antiphlogistica, aber auch die antirheumatisch wirksamen Corticoide das Wachstum des Granulationsgewebes und die Bildung von

Exsudat deutlich hemmen. Auch für die vorliegenden Versuche wurden die Granulombeutel von *Wilhelmi* angelegt. Die Tiere der Versuchsserien wurden während der gesamten Versuchsdauer von 14 Tagen mit den Antirheumatica behandelt. Am 13. Tag erhielten sie eine einmalige i.p. Dosis von anorganischem Sulfat ($17 \mu\text{c S}^{35}$) und wurden 18 bis 20 Stunden später getötet.

Die Granulombeutel wurden herauspräpariert, einzeln gewogen und gemeinsam, als Pool, mit Papain verdaut. Da die weitere Aufarbeitung in erster Linie das Ziel verfolgte, die spezifische Aktivität der Chondroitinschwefelsäure zu bestimmen, konnte das Hauptgewicht auf eine möglichst reine Isolierung der Chondroitinschwefelsäure gelegt und ein kleiner Verlust dieser Substanz in Kauf genommen werden. Auf das Isolierungsverfahren soll hier nicht im einzelnen eingegangen werden. Das Endprodukt wurde in Wasser gelöst und in aliquoten Teilen einerseits die Radioaktivität, andererseits die Glucuronsäure als charakteristischer Bestandteil der Chondroitinschwefelsäure bestimmt. Die spezifische Aktivität wurde also nicht auf den Sulfatgehalt der Chondroitinschwefelsäure bezogen, was an sich logischer wäre, sondern aus technischen Gründen auf die Glucuronsäure, einen ebenso konstanten Bestandteil des Chondroitinsulfats.

Ergebnisse

Obwohl die Gesamtgewichte des entzündlichen Granulomgewebes unter Phenylbutazon – noch stärker übrigens unter Oxyphenbutazon – und unter Prednison regelmäßig deutlich vermindert sind, lassen sich in der chemischen Zusammensetzung, wie sie sich durch die fraktionierte Auf-

Tabelle 1

Die Polysaccharid-Fractionen im Granulationsgewebe nach Behandlung mit Phenylbutazon und Prednison

	Summe der Polysaccharide in μmol Glucuron pro Gramm Frischgewicht*	Summe der sauren PS in μmol Glucuron pro Gramm Frischgewicht	Anteil in % der sulfatierten PS an den sauren PS
Kontrollen	9,8	7,5	53
Phenylbutazon 100 mg/kg	8,9	7,2	76
Prednison 5 mg/kg	9,2	6,6	68
Phenylbutazon 50 mg/kg + Pred 2,5 mg/kg	8,4	5,9	72

* Bei dieser Glucuronbestimmung werden auch die neutralen Polysaccharide erfaßt. Ihr wahrer Gehalt ist jedoch ein mehrfaches der Differenz aus Kolonne 1 und 2, da die neutralen PS (Hexosen) eine geringere Farbentwicklung aufweisen als die sauren PS (Ursonsäuren).

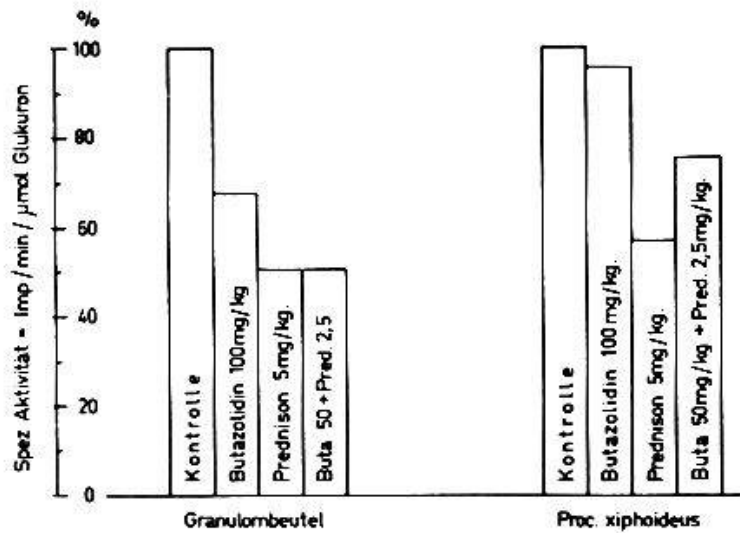


Abb. 1. Hemmung des Sulfat-Einbaus in die Chondroitinschwefelsäure.

arbeitung ergibt, keine signifikanten Unterschiede erkennen (Tab. 1). Deutlich reduziert ist dagegen die spezifische Aktivität der verschiedenen Fraktionen und ganz besonders der Chondroitinschwefelsäure (Abb. 1). Die Hemmung ist in diesem Beispiel unter Prednisonbehandlung etwas stärker ausgefallen als unter Phenylbutazon. In andern Fällen ist diese Relation umgekehrt. Auffallend ist jedoch, daß Phenylbutazon den Einbau von radioaktivem Sulfat in den normalen Knorpel überhaupt nicht hemmt, im Gegensatz zum Prednison, das hier praktisch den gleichen Effekt hat wie im entzündlichen Gewebe. Hier mag die Dosierung eine gewisse Rolle spielen; jedenfalls muß die Frage noch genauer abgeklärt werden. Immerhin haben auch *Hershberger* u. Mitarb. [6] ein ähnliches Verhalten an der normalen Haut beschrieben, es ist daher denkbar, daß es sich hier doch um einen prinzipiellen Unterschied handeln könnte. Die Corticoide und die Pyrazolidine zeigen ja eine Reihe frappanter Ähnlichkeiten in bezug auf Wirkungen und Nebenwirkungen, daneben aber auch einige klare Unterschiede, und zu diesen mag auch eine verschiedenartige Beeinflussung von normalem und entzündlichem Gewebe zählen.

Diskussion

Als konstante Wirkung von Phenylbutazon und Prednison finden wir eine Verlangsamung der Gewichtszunahme des gesamten Granulationsgewebes, aber keine deutliche Abweichung in der Zusammensetzung der untersuchten Bestandteile. Pro Gramm Granulationsgewebe ist der Gehalt an Polysacchariden in den Fraktionen nicht verändert. Dagegen ist die spezifische Aktivität der Chondroitinschwefelsäure nach Verabreichung von markiertem Sulfat eindeutig vermindert. Die Synthese des Chondroitinsulfats wird also verlangsamt und damit offenbar auch das

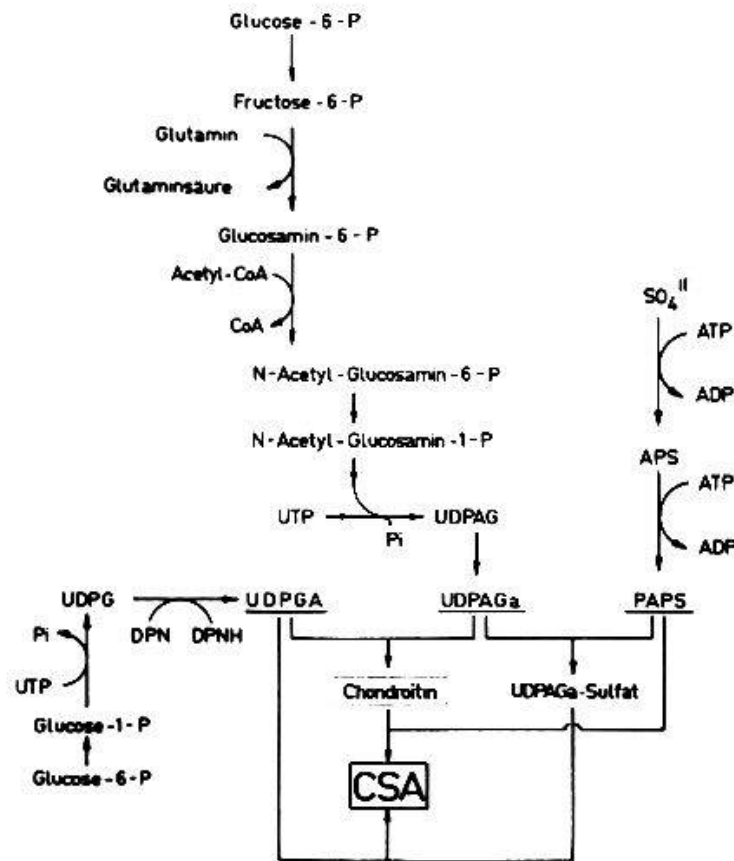


Abb. 2. Biosynthese der Chondroitinschwefelsäure. UTP = Uridin-triphosphat; UDP = Uridin-diphosphat; UDPAGa = Uridin-diphosphat-N-acetyl-galactosamin; UDPGA = Uridin-diphosphat-glucuronsäure; APS = Adenosin-5'-phosphosulfat; PAPS = Adenosin-3'-phosphat-5'-phosphosulfat = aktives Sulfat; CSA = Chondroitinschwefelsäure; UDPG = Uridin-diphosphat-glucose; UDPAG = Uridin-diphosphat-N-acetylglucosamin.

Wachstum des gesamten Granulationsgewebes. Wenn ein wesentlicher Bestandteil fehlt, dann wird offenbar nicht ein defizitäres Gebilde weitergebaut, sondern der Aufbau des gesamten Gewebes verzögert.

Die möglichen Angriffspunkte von Butazolidin und Prednison können an Hand des Schemas (Abb. 2) diskutiert werden: Die Chondroitinschwefelsäure CSA wird an Ort und Stelle synthetisiert aus den drei wichtigen Komponenten Glucuronsäure (GA), Acetyl-Galactosamin (AGa) und Sulfat (S). Diese Komponenten können allerdings nicht in freier Form reagieren, sondern müssen in «aktivierter» Form als Nucleotide vorliegen: Uridindiphosphat (UDP) und Adenosin-3',5'-diphosphat (PAP), ein Isomeres des ADP. Wir wissen heute noch nicht, ob zunächst aus Glucuronsäure und Acetylglucosamin das Chondroitin entsteht, das erst nachträglich mit der aktivierten Schwefelsäure verestert wird, oder ob zuerst der Acetyl-Glucosamin-Schwefelsäureester gebildet wird, der sich dann mit Glucuronsäure zum Chondroitinsulfat zusammenschließt. Beide Wege scheinen gangbar zu sein.

Als Angriffspunkte für die Antirheumatica werden die folgenden Möglichkeiten diskutiert: Nach *Bollet* [11] wird die Bereitstellung von Acetylgalactosamin verlangsamt, indem die Synthese von Glucosamin-6-phosphat aus Fructose-6-phosphat gehemmt wird. Diese Hemmung konnte er *in vitro* und *in vivo* für Phenylbutazon, Salizylsäure und Gold demonstrieren. Cortisol ist *in vitro* unwirksam, soll jedoch *in vivo* den Gehalt des betreffenden Fermentes herabsetzen. *Whitehouse* und *Boström* [12] postulieren eine Hemmung der Synthese von aktivem Sulfat durch intrazelluläre Entkoppelung der oxydativen Phosphorylierung und damit Hemmung der ATP-Synthese. *Greiling* [13] schließlich nimmt an, daß verschiedene Antirheumatica das aktivierte Sulfat abfangen und dieses der Synthese von Chondroitinsulfat entziehen. Diese sehr interessante Hypothese beruht in erster Linie auf Versuchen *in vitro*. *In vivo* konnte *Greiling* [14] nach Anwendung von Salizylamid eine Abnahme des anorganischen Sulfats im Serum und das Auftreten eines Salizylamid-Schwefelsäureesters im Harn nachweisen. Wenn ihm dies bei andern Antirheumatica nicht gelungen ist, so spricht dies nicht gegen seine Hypothese. Es darf angenommen werden, daß die intermediär entstehenden Schwefelsäureester durch die Gewebssulfatasen sofort wieder gespalten werden. Auch so geht das aktive Sulfat der Chondroitinschwefelsäure-Synthese verloren; außerdem könnte das Antirheumaticum sofort wieder als Akzeptor des aktiven Sulfats auftreten. Wir hätten es also mit einer Art katalytischen Wirkung der Antirheumatica zu tun.

Zusammenfassung

Im entzündlichen Granulationsgewebe (Granulombeutel) der Ratte wurde durch fraktionierte Aufarbeitung der Gehalt an neutralen und sauren Mucopolysacchariden bestimmt. Besonderer Wert wurde auf die Isolierung der sulfatierten Fraktion (Chondroitinschwefelsäure) gelegt.

Unter der Behandlung mit Phenylbutazon und Prednison verändert sich der Gehalt an den verschiedenen Fraktionen nicht signifikant, obwohl das Gesamtgewicht der Granulombeutel vermindert ist. Dagegen ist nach Verabreichung von markiertem anorganischem Sulfat die spezifische Radioaktivität der Chondroitinschwefelsäure unter der Wirkung von Phenylbutazon und Prednison deutlich herabgesetzt. Es wird daraus geschlossen, daß die beiden Stoffe durch eine Hemmung der Chondroitinschwefelsäure-Synthese das Wachstum des entzündlichen Gewebes verlangsamen.

Im normalen Knorpel bewirkt Prednison, nicht aber Phenylbutazon eine Verminderung der spezifischen Aktivität der Chondroitinschwefelsäure.

Résumé

La teneur en mucopolysaccharides neutres et acides a été déterminée dans le tissu de granulation inflammatoire (poche de granulome). La fraction sulfatée (acide chondroïtine-sulfurique) a été purifiée (avec un soin particulier).

Sous l'effet de la phénylbutazone et de la prednisone, il n'y a pas de changement significatif dans la teneur en polysaccharides des différentes fractions bien que le poids total du granulome soit diminué. Par contre, après application de sulfate inorganique marqué, la radioactivité spécifique de l'acide chondroïtine sulfurique est fortement diminuée par la phénylbutazone et la prednisone. On peut en déduire que ces deux substances ralentissent la croissance du tissu inflammatoire par inhibition de la synthèse de l'acide chondroïtine-sulfurique.

Dans le cartilage normal, la prednisone provoque une diminution de l'activité spécifique de l'acide chondroïtine-sulfurique, tandis que la phénylbutazone n'a aucun effet similaire.

Riassunto

È stato determinato il tenore in mucopolisaccharidi neutri e acidi nel tenuto granuloso (granuloma pouch) del ratto. Speciale attenzione fu data all'isolamento della frazione solfatata (acidi condroitinsolforici).

Mediante il trattamento con Fenilbutazone e Prednisone, il tenore in polisaccaridi delle differenti frazioni non cambia in un modo significativo, benchè il peso totale del granuloma sia diminuito. Tuttavia, dopo l'applicazione di solfato inorganico marcato, la radioattività specifica dell'acido condroitinsolforico è fortemente ridotta sotto l'effetto del Fenilbutazone e del Prednisone.

Si può quindi concludere che queste due sostanze rallentano la crescita del tessuto granuloso mediante l'inibizione della sintesi dell'acido condroitinsolforico.

Nella cartilagine normale, il Prednisone determina ugualmente una diminuzione dell'attività specifica dell'acido condroitinsolforico, mentre che il Fenilbutazone non produce alcun effetto simile.

Summary

In the granuloma pouch of the rat the contents of neutral and acid muco-polysaccharides has been determined. Special care was taken to isolate the sulfate containing polysaccharides (chondroitine sulfuric acids).

After treatment with Phenylbutazone and Prednisone the contents of the different fractions does not change significantly, although the total weight of the granuloma pouch is reduced. On the other hand, after application of labelled inorganic sulfate, the specific activity of chondroitine sulfuric acid is considerably diminished after treatment with Phenylbutazone and Prednisone. It is concluded that these two substances slow down the growth of the inflammatory tissue by inhibiting the synthesis of chondroitine sulfuric acid.

In the normal cartilage, Prednisone also causes a decrease of the specific activity of chondroitine sulfuric acid, whereas Phenylbutazone does not produce such an effect.

1. *Altshuler C.H. and Angevine D.M.:* Histochemical studies on pathogenesis of fibrinoid. *Amer. J. Path.* **25**, 1061–1077 (1949).
2. *Bunting H.:* Distribution of acid mucopolysaccharides in mammalian tissues as revealed by histochemical methods. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **52**, 977–982 (1950).
3. *Layton L.L.:* In vitro sulfate fixation by granulation tissue and injured muscle tissue from healing wounds. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **73**, 570–572 (1950).
4. *Layton L.L.:* Quantitative differential fixation of sulfate by tissues maintained in vitro; sulfate fixation as function of age for embryonic tissues. *Cancer* **3**, 725–734 (1950).
5. *Boström H. and Månsson B.:* Factors influencing the exchange of the sulphate group of the chondroitin sulphuric acid of cartilage in vitro. *Ark. Kemi* **6**, 23–37 (1953).
6. *Hershberger L.G., Hansen L. and Ranney R.E.:* Growth and S^{35} uptake of cotton granulomas in rats. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **101**, 328–330 (1959).
7. *du Boistesselin R. et Porcile E.:* Utilisation du radiosulfate pour l'étude des propriétés anti-inflammatoires d'un médicament. *Thérapie* 1962 (im Druck).
8. *Selye H.:* On the mechanism through which hydrocortison affects the resistance of tissues to injury. *J. Amer. med. Ass.* **152**, 1207–1213 (1953).
9. *Wilhelmi G.:* Über die kombinierte Anwendung von Butazolidin (Phenylbutazon) und einigen Corticosteroiden bei experimentellen Entzündungen. *Schweiz. med. Wschr.* **88**, 185–188 (1958).
10. *Wilhelmi G.:* Die pharmakologischen Eigenschaften der Metaboliten von 1,2-Diphenyl-3,5-dioxo-4-n-butyl-pyrazolidin. *Arzneimittel-Forsch.* **10**, 129–133 (1960).
11. *Bollet A.J.:* Effects of antirheumatic agents on connective tissue metabolism. *Atti del X congresso della lega internazionale contro il reumatismo. Rom* 1961, Bd. II 1354–1355.
12. *Whitehouse M.W. and Boström H.:* Studies on the action of some anti-inflammatory agents in inhibiting the biosynthesis of mucopolysaccharide sulphates. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 135–150 (1961).
13. *Greiling H. und Schuler B.:* Die Beeinflussung des Stoffwechsels der Chondroitinschwefelsäure durch antirheumatisch wirksame Substanzen. *Atti del X congresso della lega internazionale contro il reumatismo, Rom* 1961, Bd. II 1368–1369.
14. *Greiling H.:* Persönliche Mitteilung.