

Die Wirkung von N_1 ,n-Butylbiguanid auf den Stoffwechsel der isolierten perfundierten Leber normaler und alloxandiabetischer ketotischer Ratten*, **)

H. D. SÖLING, D. MOSHAGEN, E. SKUTELLA, P. KNEER und W. CREUTZFELDT

Biochem. Laboratorium (Leiter: Doz. Dr. H. D. SÖLING) der Medizinischen Universitätsklinik Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. W. CREUTZFELDT)

Eingegangen am 16. September 1966

The effect of N_1 ,n-butylbiguanide on the metabolism of isolated perfused livers of normal and alloxan-diabetic ketotic rats.

Summary. The effect of N_1 , n-butylbiguanide on the metabolism of isolated perfused livers of normal and alloxan-diabetic ketotic rats was studied. — N_1 ,n-butylbiguanide in a concentration of $2.55 \cdot 10^{-5}$ M in the perfusion medium had the following effects: 1. The amino acid balance of normal and diabetic livers was altered in a positive direction. The continuous net output of α -amino acids seen in control experiments decreased significantly under butylbiguanide and a net uptake of α -amino acids took place. 2. The net output of inorganic phosphate by normal and diabetic livers was significantly diminished by butylbiguanide. 3. The elevated net output of urea by diabetic livers decreased significantly under butylbiguanide. The urea balance of normal livers remained unchanged. 4. The net output of potassium by diabetic livers was significantly diminished by butylbiguanide. 5. The lactate/pyruvate-ratio, which was elevated in experiments with diabetic livers became normalized more rapidly in presence of butylbiguanide. 6. Bile production of normal and diabetic livers was stimulated by butylbiguanide. This stimulation was significant in experiments with diabetic livers. — In experiments with normal and diabetic livers N_1 ,n-butylbiguanide in a concentration of $2.55 \cdot 10^{-5}$ M did not have any significant effect on the glucose balance, the uptake of non-esterified fatty acids, the production of ketone bodies, the liver blood flow, or liver glycogen content. — N_1 ,n-butylbiguanide at a concentration four times greater ($1.02 \cdot 10^{-4}$ M) had the following effects in experiments with normal livers: 1. The positive effect of the smaller biguanide concentration ($2.55 \cdot 10^{-5}$ M) on the amino acid balance could not be demonstrated with the higher concentration. 2. The concentration of lactate in the medium showed a significant increase. 3. The lactate/pyruvate-ratio was significantly higher than in control experiments. — At a concentration of $1.02 \cdot 10^{-4}$ M the equilibration volume for butylbiguanide was greater than the plasma volume. A measurable decrease in the medium concentration of butylbiguanide did not occur during the 3 hours of perfusion with either a low or a high concentration. The biguanide excretion with bile was minimal.

L'action de la N_1 ,n-butylbiguanide sur le métabolisme du foie isolé et perfusé de rats normaux et de rats rendus diabétiques céto-siques par l'alloxane.

Résumé. On a étudié l'action de la N_1 ,n-butylbiguanide sur le métabolisme des foies isolés et perfusés de rats normaux et de rats rendus diabétiques céto-siques par l'alloxane. — A une concentration de $2.55 \cdot 10^{-5}$ mole/l dans le milieu de perfusion, la N_1 ,n-butylbiguanide avait

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg.

** Teilergebnisse wurden auf dem II. Internat. Symposium über Diabetesfragen (1963) vorgetragen (s. MOHNKE, G., ed., II. Internat. Sympos. über Diabetesfragen, S. 221 ff., Karlsburg b. Greifswald).

les effets suivants. — 1. Le bilan des acides aminés des foies normaux et diabétiques était modifié dans un sens positif. La sortie nette et continue des acides α -aminés, que l'on observait dans les expériences de contrôle, diminuait significativement sous l'effet de la butylbiguanide; il se produisait même une nette captation des acides α -aminés. — 2. La quantité nette de phosphate inorganique sortant des foies normaux et diabétiques, était significativement diminuée par la butylbiguanide. — 3. La quantité nette et élevée d'urée sortant des foies diabétiques diminuait significativement sous l'effet de la butylbiguanide. Le bilan de l'urée des foies normaux demeurait inchangé. — 4. La quantité nette de potassium sortant des foies diabétiques était significativement diminuée par la butylbiguanide. — 5. Le rapport lactate/pyruvate, qui était élevé dans les expériences effectuées sur les foies diabétiques, était normalisé plus rapidement en présence de butylbiguanide. — 6. La production de bile des foies normaux et diabétiques était stimulée par la butylbiguanide. Cette stimulation était significative dans les expériences sur les foies diabétiques. — Dans les expériences effectuées sur les foies normaux et diabétiques, la N_1 ,n-butylbiguanide, à une concentration de $2.55 \cdot 10^{-5}$ M, n'avait aucune action significative sur le bilan net du glucose, la captation des acides gras non-estérifiés, la production de corps cétoniques, le débit sanguin hépatique ou le glycogène du foie. — Dans les expériences sur les foies normaux, la N_1 ,n-butylbiguanide, à une concentration quatre fois plus élevée ($1.02 \cdot 10^{-4}$ M) avait les effets suivants: 1. L'effet positif, obtenu avec la concentration la plus faible de biguanide ($2.55 \cdot 10^{-5}$ M) sur le bilan des acides aminés ne pouvait plus être démontré avec la concentration la plus élevée. — 2. La concentration de lactate dans le milieu était significativement augmentée. — 3. Le rapport lactate/pyruvate était significativement plus élevé que dans les expériences de contrôle. — A une concentration de $2.55 \cdot 10^{-5}$ M, la butylbiguanide se trouvait exclusivement dans la fraction plasmatique du milieu de perfusion. — A une concentration de $1.02 \cdot 10^{-4}$ M, l'espace de distribution de la butylbiguanide était plus grand que le volume du plasma. — Pendant les 3 heures de perfusion, il ne s'est pas produit de diminution mesurable dans la concentration de butylbiguanide du milieu, ni avec la concentration faible, ni avec la concentration élevée. — L'élimination de la biguanide par la bile était minime.

Zusammenfassung. An isolierten perfundierten Lebern von normalen und von alloxandiabetischen ketotischen Ratten wurde der Effekt von N_1 ,n-Butylbiguanid auf den Leberstoffwechsel untersucht. — N_1 ,n-Butylbiguanid in einer Konzentration von $2.55 \cdot 10^{-5}$ M im Perfusionsmedium hatte folgende Effekte. — 1. Die Aminosäurebilanz normaler und diabetischer Lebern wurde in positiver Richtung verändert. Die in Kontrollversuchen feststellbare kontinuierliche Nettoabgabe von α -Aminosäuren nahm unter Butylbiguanid signifikant ab oder es kam sogar zu einer Nettoaufnahme von α -Aminosäuren. — 2. Die Nettoabgabe von anorganischem Phosphat durch normale und diabetische Lebern wurde durch Butylbiguanid signifikant vermindert. — 3. Die erhöhte Netto-

harnstoffabgabe diabetischer Lebern wurde durch Butylbiguanid signifikant vermindert. Die Harnstoffbilanz normaler Lebern blieb unbeeinflusst. — 4. Die Nettoabgabe von Kalium durch diabetische Lebern wurde durch Butylbiguanid signifikant vermindert. — 5. Der in Experimenten mit diabetischen Lebern erhöhte Lactat/Pyruvat-Quotient im Perfusionsmedium normalisierte sich bei Butylbiguanidzusatz rascher. — 6. Die Gallebildung normaler und diabetischer Lebern ist unter Butylbiguanid gesteigert. Die Steigerung ist in den Experimenten mit diabetischen Lebern signifikant. — N_1, n -Butylbiguanid in einer Konzentration von $2.55 \cdot 10^{-5}$ M hatte keinen signifikanten Effekt auf die Nettoglucosebilanz, die Aufnahme unveresteter Fettsäuren, die Ketonkörperbildung, die Leberdurchblutung und die Änderungen des Leberglykogengehaltes in Experimenten mit normalen und diabetischen Lebern. — N_1, n -Butylbiguanid in einer 4-fach höheren Konzentration ($1.02 \cdot 10^{-4}$ M) hatte in Experimenten mit normalen Lebern folgende Wirkung: 1. Der positive Effekt der kleineren Biguanidkonzentration

($2.55 \cdot 10^{-5}$ M) auf die Aminosäurebilanz war nicht mehr nachweisbar. — 2. Die Lactatkonzentrationen im Medium waren deutlich erhöht. — 3. Der Lactat/Pyruvat-Quotient im Medium lag deutlich höher als in den Kontrollexperimenten. — Bei einer Butylbiguanidkonzentration von $2.55 \cdot 10^{-5}$ M befand sich das zugegebene Biguanid ausschließlich im Plasmaanteil des Perfusionsmediums. Bei einer Butylbiguanidkonzentration von $1.02 \cdot 10^{-4}$ M war der Verteilungsraum des Butylbiguanids größer, als dem Plasmavolumen entsprach. Weder bei Verwendung der niedrigen, noch bei Verwendung der hohen Biguanidkonzentration trat ein meßbarer Konzentrationsabfall im Medium während der dreistündigen Perfusion ein. Die Biguanidausscheidung mit der Galle war minimal.

Key-words: n-Butylbiguanid, Leberstoffwechsel, Glucoseogenese, Glucosebilanz, Lactat, Pyruvat, Quotient, Aminosäurebilanz, anorganisches Phosphat, Kalium, NEFA-Aufnahme, Ketogenese, Butylbiguanidstoffwechsel, Alloxandibetes.

Die Vorstellung von WILLIAMS [39, 46], daß die blutzuckersenkenden Biguanide ihren therapeutischen Effekt über eine Steigerung der anaeroben Glykolyse entfalten, war von Anfang an wenig überzeugend, da ein solcher Wirkungsmechanismus nur auf dem Wege über eine allgemeine Stoffwechselschädigung zustande kommen könnte. Tierexperimentelle Befunde, welche die „Glykolysetheorie“ zu stützen schienen, waren mit Biguanidkonzentrationen erzielt worden, die um den Faktor 10^2 bis 10^3 über den therapeutisch erzielten Plasmaspiegel lagen.

In vitro-Untersuchungen mit Biguanidkonzentrationen, die dem Bereich therapeutisch erzielbarer Biguanidplasmaspiegel wesentlich näher lagen, haben in Abwesenheit von Insulin keine eindeutigen Effekte auf den Energiestoffwechsel von Fett- oder Muskelgewebe ergeben (s. Diskussion). Auch die Frage einer Potenzierung der Insulinwirkung auf den Glucosestoffwechsel von Muskel- oder Fettgewebe ist noch völlig offen (s. Diskussion).

Andererseits haben bereits frühere Untersuchungen von WICK et al. [44], die inzwischen durch BECKMANN [2, 4] bestätigt und erweitert wurden, gezeigt, daß oral zugeführte Biguanide über einen längeren Zeitraum in der Leber angereichert werden. Es lag daher nahe, die Wirkung von Biguaniden auf den Stoffwechsel der isolierten perfundierten Leber zu untersuchen. Experimente dieser Art fehlen. Außerdem wurden frühere Untersuchungen, die sich mit der Beeinflussung des Leberstoffwechsels durch Biguanide befaßten, stets mit sehr hohen Dosen durchgeführt [17, 39, 40, 41, 43]. Die im Folgenden mitgeteilten Untersuchungen an isolierten Lebern von normalen und alloxandibetischen ketotischen Ratten wurden deshalb mit einer Biguanidkonzentration (N_1, n -Butylbiguanid) von $2.55 \cdot 10^{-5}$ M durchgeführt. Diese Konzentration liegt nur 5–10 mal höher als die bei Butylbiguanid-behandelten Diabetikern gemessenen Plasmaspiegel [2, 4, 34]. Zum Vergleich wurden auch einige Versuche mit einer 4-fach höheren Butylbiguanidkonzentration ($1.02 \cdot 10^{-4}$ M) durchgeführt.

Methodik

Zur Untersuchung wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten eines Inzuchtstammes der Gesellschaft für Versuchstierzucht, Hannover-Linden, verwendet. Gewicht 190–250 g.

Die Vorbereitung der Tiere, die Erzeugung des Alloxandibetes und der diabetischen Ketose wurden in einer früheren Mitteilung [35] ausführlich beschrieben. Alle Tiere blieben vor Versuchsbeginn 20 Stunden nüchtern.

Soweit nicht anders erwähnt, wurden dem Perfusionsmedium vor Versuchsbeginn $2.55 \cdot 10^{-5}$ Mol/l N_1, n -Butylbiguanid¹ zugesetzt. In 3 Versuchen mit Lebern normaler Tiere enthielt das Medium $1.02 \cdot 10^{-4}$ Mol/l N_1, n -Butylbiguanid. Die Versuche begannen 20 Minuten nach dem Ingangkommen der Leberdurchströmung in der Perfusionsapparatur. Die Versuchsdauer betrug 180 min. Operationstechnik, Perfusionsapparatur und Zusammensetzung des Mediums entsprachen den früheren Angaben [35]. Die Glucoseausgangskonzentration im Medium betrug in allen Versuchen 11.1 mMol/l, die Ausgangskonzentrationen an unveresterten Fettsäuren (NEFA) 2.5–3.5 mval/l.

Die Bestimmung von Glucose, Lactat, Pyruvat, NEFA, Gesamtketonkörpern, α -Amino-N, Harnstoff, anorganischem Phosphat (P_i), Kalium und Leberglykogen erfolgte mit den früher [35] angegebenen Methoden.

Bestimmung der Butylbiguanidkonzentration in Perfusionsplasma und Galle:

Die Methode, die in ähnlicher Weise bereits von BECKMANN [2, 4] angewendet wurde, basiert auf der Tatsache, daß N_1, n -Butylbiguanid bei neutralem pH im UV-Bereich ein Absorptionsmaximum bei 233 m μ hat, das nach Zugabe von Säure verschwindet (s. Abb. 1). Nach SHAPIRO [31] liegen die meisten mono-substituierten Biguanide bei neutralem pH in einer monobasischen Ringform vor. Bei stark saurem pH tritt dagegen im wesentlichen die nicht-geschlossene, dibasische Form auf (s. Abb. 1). Der Übergang von der monobasischen Ringform in die offene dibasische Form dürfte die Ursache des Verlustes der Lichtabsorption bei 233 m μ nach Zugabe von Säure sein.

Während die Messung in wäßrigen Lösungen kein Problem darstellt, bereitet die Bestimmung in biologischem Material gewisse Schwierigkeiten, da bei der Ei-

¹ N_1, n -Butylbiguanid (Silubin®) wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. G. MICHAEL, Chemie Grünenthal GmbH, Stolberg/Rhld. zur Verfügung gestellt. Es liegt als N_1, n -Butylbiguanid-HCl vor.

weißfällung ein mehr oder weniger großer Verlust auftritt. Von den von uns untersuchten Fällungsverfahren (Hitze fällung, Methanolfällung, Äthanol fällung, Fällung mit Bariumhydroxyd und Zinksulfat, 30 min Kochen in 0.05%iger Essigsäurelösung, Trichloressigsäure, 5 N HClO₄) erwies sich die Perchlorsäurefällung als am besten geeignet. Im einzelnen wurde wie folgt vorgegangen: 5 ml Perfusionsplasma wurden mit 1 ml 5 N HClO₄ versetzt und nach beendigter Fällung 10 Min. bei 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 4 N KOH neutralisiert

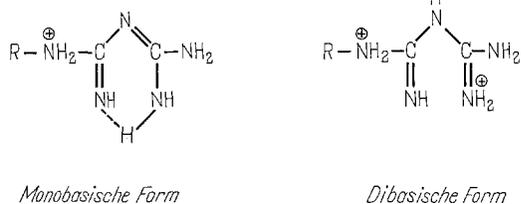


Fig. 1a

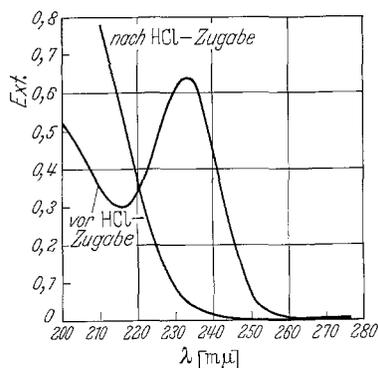


Fig. 1b

Abb. 1. a) Mono- und dibasische Form der Biguanide. b) Übergang der monobasischen in die dibasische Form nach Behandlung von N₁, n-Butylbiguanid mit HCl. Butylbiguanid ($5.02 \cdot 10^{-5}$ M) in H₂O gelöst, hat ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 233 mμ. Nach Zugabe von 0.10 ml 4 N HCl zu 3 ml wäßriger Butylbiguanidlösung verschwindet die Absorption bei 233 mμ nahezu vollständig

gesellschaft Berlin-Duisburg, Säulenhöhe 20 cm, Säulendurchmesser 2 cm). Die Säule wurde mit 200 ml Aqua dest. gewaschen und anschließend das Biguanid mit 80 ml einer 0.425 N NaCl-Lösung von der Säule eluiert. Im Rotationsverdampfer wurde das Eluat vorsichtig auf 1–2 ml eingengt und mit Aqua dest. auf ein Volumen von 6 ml gebracht. 3 ml dieser Lösung wurden in einer Quarzkuvette ($d = 1$ cm) bei 233 mμ im Spektralphotometer PMQ II der Firma Zeiss vor (E_1) und nach (E_2) Zugabe von 0.1 ml einer 4 N HCl gemessen. Aus der Extinktionsdifferenz $E_1 - E_2$ wurde mit Hilfe einer Eichkurve die Biguanidkonzentration ermittelt. — Der Biguanidverlust während der Säulenpassage und während des Einengens ist nicht größer als 10–15%. Die Eiweißfällung bedingt hingegen einen Verlust von ca. 30%. Aus diesem Grunde wurden zur Erstellung einer Eichkurve bekannte Biguanidkonzentrationen zum Perfusionsplasma zugegeben und hiermit die Eichkurve erstellt. Biguanidkonzentrationen unter 1 μg/ml können mit der genannten Methode nicht mehr genau erfaßt werden. Sie ist aber wesentlich empfindlicher als die von FREEDMAN et al. [18] angegebene colorimetrische Methode mit α-Naphtol-Diacetyl-Reagenz.

Zur Bestimmung von N₁,n-Butylbiguanid in Galle wurden 3 ml Galle (Galle aus 2–3 Versuchen wurde gepoolt) auf die Permutitsäule gegeben. Waschen und Eluieren der Säule, sowie der weitere Bestimmungsgang wie bei der Biguanidbestimmung im Plasma beschrieben. Eine Eichkurve wurde mit bekannten Butylbiguanidkonzentrationen in Galle angelegt.

Statistische Methoden:

Abgesehen von Lactat, Pyruvat und Glykogen wurden die Konzentrationsänderungen der verschiedenen Metabolite auf 10 g Feuchtleber bezogen.

In den Tabellen werden die Mittelwerte und die einfache Standardabweichung angegeben. Varianzanalyse mit dem t-Test nach STUDENT. In den Tabellen und Abbildungen bedeutet +, daß die angegebene Konzentration über, –, daß sie unter der Ausgangskonzentration liegt.

Ergebnisse

I. Untersuchungen mit $2.55 \cdot 10^{-5}$ Mol/l N₁, n-Butylbiguanid im Perfusionsmedium. Das Verhalten der Glucosekonzentration im Medium wird durch den Bi-

Tabelle 1. Änderungen der Glucosekonzentration in mMol/l im Medium bei Perfusion isolierter Lebern von normalen und diabetischen Ratten in Anwesenheit von Butylbiguanid ($2.55 \cdot 10^{-5}$ M). (Die Änderungen sind bezogen auf die Ausgangskonzentrationen bei $t = 0$ und auf 10 g Leber).

Glucose	Zeit in Minuten							n
	0	30	60	90	120	150	180	
Normal ohne BG	0	+ 0.07 ± 0.56	+ 0.28 ± 1.40	+ 0.31 ± 1.51	+ 0.44 ± 1.39	+ 0.32 ± 1.51	+ 0.10 ± 1.26	8
Normal mit BG	0	+ 0.35 ± 0.33	+ 0.49 ± 0.47	+ 0.67 ± 0.51	+ 0.85 ± 0.67	+ 0.87 ± 0.54	+ 0.91 ± 0.70	6
p-Wert						> 0.25	> 0.10	
Diabetisch ohne BG	0	+ 0.27 ± 0.69	+ 0.46 ± 0.81	+ 0.74 ± 1.64	+ 0.63 ± 2.39	+ 1.15 ± 2.50	+ 1.10 ± 3.60	5
Diabetisch mit BG	0	+ 1.15 ± 0.86	+ 1.60 ± 0.91	+ 1.79 ± 1.38	+ 1.59 ± 1.95	+ 1.59 ± 2.41	+ 1.75 ± 2.37	6
p-Wert						> 0.30	> 0.30	

(Glaselektrode). Zur Ausfällung des entstandenen KClO₄ wurde der Ansatz für 1 Stunde in ein Eisbad gebracht. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugation (10 min, 5000 g) entfernt und der Überstand auf einen Kationenaustauscher gebracht (Permutit-G der Permuti-

guanidzusatz nicht signifikant beeinflußt. Unter Butylbiguanid steigt die Glucosekonzentration bei Versuchen mit Lebern normaler Tiere kontinuierlich und stärker an als in den Kontrollexperimenten (s. Tab. 1).

Der Unterschied ist nicht signifikant. Die mittlere Nettoglucoseabgabe *diabetischer* Lebern ist mit und ohne Butylbiguanid stärker als diejenige normaler Lebern. Auch hier fehlt ein signifikanter Effekt von Butylbiguanid (s. Tab. 1).

Die *Glykogenbildung normaler* und *diabetischer* Lebern wird durch Butylbiguanid nicht signifikant beeinflusst (s. Tab. 2).

In den Experimenten mit diabetischen Lebern und Butylbiguanidzusatz lagen die Glykogenwerte im Mittel deutlich höher als in den diabetischen Kontrollexperimenten. Unterschiede im Schweregrad des Diabetes könnten diese Differenz erklären: So betrug die mittlere Ketonkörperausscheidung in der Gruppe der diabetischen Tiere, deren Lebern mit Biguanid-haltigem Medium perfundiert wurden, unmittelbar vor dem Versuch 10.3 mMol/24h im Vergleich zu 5.9 mMol/24h in den diabetischen Kontrollen.

Unterschiede sind in der 150. und 180. Versuchsminute signifikant (s. Tab. 3). In den Experimenten mit *diabetischen* Lebern war hingegen genau das Umgekehrte zu beobachten: Die in Experimenten mit diabetischen Kontrollen erhöhte Anfangskonzentration von Lactat fällt unter Butylbiguanid in gleicher Weise bis zur 90. Versuchsminute ab wie in den Experimenten mit diabetischen Kontrollen. Der in Experimenten mit diabetischen Lebern im Vergleich zu normalen Lebern verzögert einsetzende Anstieg der Lactatkonzentration in der 2. Versuchshälfte [35] erfolgt in Anwesenheit von Butylbiguanid schneller. Der Unterschied ist aber nicht signifikant (s. Tab. 3).

Die *Pyruvatkonzentration* verändert sich in Kontrollexperimenten mit *normalen* Lebern in ähnlicher Weise wie die Lactatkonzentration: Sie fällt in der

Tabelle 2. Änderungen des Glykogengehaltes in g/100 g Feuchtleber bei Perfusion isolierter Lebern von normalen und diabetischen Ratten in Anwesenheit von Butylbiguanid ($2.55 \cdot 10^{-5}$ M)

Glykogen	Zeit in Minuten							n
	0	30	60	90	120	150	180	
Normal ohne BG	0.066 ± 0.039	—	—	—	0.208 ± 0.127	—	0.239 ± 0.170	8
Normal mit BG	0.042 ± 0.010	—	—	—	0.147 ± 0.130	—	0.180 ± 0.108	6
p-Wert					> 0.30		> 0.30	
Diabetisch ohne BG	0.399 ± 0.400	—	—	—	0.707 ± 0.562	—	0.690 ± 0.603	5
Diabetisch mit BG	0.916 ± 0.846	—	—	—	1.217 ± 1.400	—	1.153 ± 1.22	6
p-Wert					> 0.30		> 0.20	

Tabelle 3. Änderungen der Konzentration von Lactat in mMol/l im Medium bei Perfusion isolierter Lebern von normalen und diabetischen Ratten in Anwesenheit von Butylbiguanid ($2.55 \cdot 10^{-5}$ M)

Lactat	Zeit in Minuten							n
	0	30	60	90	120	150	180	
Normal ohne BG	0.730 ± 0.224	0.565 ± 0.123	0.406 ± 0.185	0.366 ± 0.162	0.441 ± 0.232	0.648 ± 0.331	0.932 ± 0.407	8
Normal mit BG	0.847 ± 0.547	0.745 ± 0.425	0.528 ± 0.253	0.372 ± 0.183	0.236 ± 0.107	0.293 ± 0.099	0.459 ± 0.202	6
p-Wert						< 0.02	< 0.02	
Diabetisch ohne BG	1.330 ± 0.690	0.950 ± 0.450	0.650 ± 0.185	0.330 ± 0.082	0.260 ± 0.118	0.270 ± 0.114	0.430 ± 0.186	5
Diabetisch mit BG	1.340 ± 0.457	0.992 ± 0.278	0.375 ± 0.210	0.365 ± 0.185	0.423 ± 0.250	0.415 ± 0.350	0.700 ± 0.432	6
p-Wert			< 0.05				> 0.10	

Die *Lactatkonzentration* zeigt in Versuchen mit *normalen* Lebern mit und ohne Butylbiguanid einen deutlichen Abfall. Ohne Butylbiguanid kommt es von der 90. Minute an zu einem Wiederanstieg der Lactatkonzentration. Bei Versuchsende ist die Ausgangskonzentration überschritten. Unter Butylbiguanid setzt der Wiederanstieg dagegen erst nach der 120. Minute ein. Die Lactatkonzentration liegt bei Versuchsende weit unter der Ausgangskonzentration. Die

ersten Versuchshälfte ab, um in der 2. Versuchshälfte weit über den Ausgangswert anzusteigen. Demgegenüber bleibt die Pyruvatkonzentration unter Butylbiguanid bis zur 120. Minute relativ konstant, um danach deutlich langsamer anzusteigen als in den Kontrollexperimenten (s. Tab. 4). Bei Versuchsende ist der Unterschied signifikant ($p < 0.05$).

In Kontrollexperimenten mit Lebern von *diabetischen* Tieren verhält sich die Pyruvatkonzentration

ebenfalls ähnlich wie die Lactatkonzentration: Ohne Biguanidzusatz erfolgt der Anstieg in der 2. Versuchshälfte im Vergleich zu Experimenten mit normalen Lebern verzögert. Unter Butylbiguanid steigt die Pyruvatkonzentration dagegen auch bei Experi-

fikant beeinflusst (s. Tab. 5). Der in Experimenten mit diabetischen Lebern zu Versuchsbeginn signifikant erhöhte L/P-Q [35] fällt unter Butylbiguanid schneller auf normale Werte ab (s. Tab. 5). Der Unterschied der 60-Minuten-Werte ist signifikant.

Tabelle 4. Änderungen der Konzentration von Pyruvat in mMol/l im Medium bei Perfusion isolierter Lebern von normalen und diabetischen Ratten in Anwesenheit von Butylbiguanid ($2.55 \cdot 10^{-5} M$)

Pyruvat	Zeit in Minuten							n
	0	30	60	90	120	150	180	
Normal ohne BG	0.065 ± 0.022	0.045 ± 0.009	0.042 ± 0.006	0.053 ± 0.017	0.086 ± 0.034	0.117 ± 0.085	0.146 ± 0.058	8
Normal mit BG	0.059 ± 0.054	0.067 ± 0.034	0.070 ± 0.043	0.063 ± 0.036	0.059 ± 0.028	0.073 ± 0.019	0.088 ± 0.033	6
p-Wert								< 0.05
Diabetisch ohne BG	0.047 ± 0.01	0.036 ± 0.006	0.040 ± 0.015	0.025 ± 0.011	0.029 ± 0.012	0.049 ± 0.017	0.077 ± 0.042	5
Diabetisch mit BG	0.048 ± 0.005	0.048 ± 0.010	0.045 ± 0.014	0.064 ± 0.028	0.060 ± 0.029	0.098 ± 0.059	0.135 ± 0.085	6
p-Wert								> 0.10

Tabelle 5. Änderungen des Lactat/Pyruvat-Quotienten (L/P-Q) im Medium bei Perfusion isolierter Lebern von normalen und diabetischen Ratten in Anwesenheit von Butylbiguanid ($2.55 \cdot 10^{-5} M$)

L/P-Q	Zeit in Minuten							n
	0	30	60	90	120	150	180	
Normal ohne BG	11.2 ± 4.0	12.5 ± 4.0	9.7 ± 3.5	6.9 ± 6.1	5.5 ± 1.7	5.5 ± 1.1	6.4 ± 1.6	8
Normal mit BG	14.3 ± 4.5	11.1 ± 5.6	7.5 ± 4.2	5.9 ± 3.2	4.0 ± 3.4	4.0 ± 1.2	5.2 ± 2.8	6
p-Wert								> 0.25
Diabetisch ohne BG	28.3 ± 11.6	26.4 ± 13.5	16.2 ± 7.6	11.4 ± 3.4	9.0 ± 4.4	5.5 ± 2.8	5.6 ± 1.7	5
Diabetisch mit BG	27.5 ± 12.4	20.6 ± 7.4	8.3 ± 3.6	5.7 ± 4.7	7.1 ± 6.8	4.2 ± 2.4	5.2 ± 1.2	6
p-Wert								< 0.05

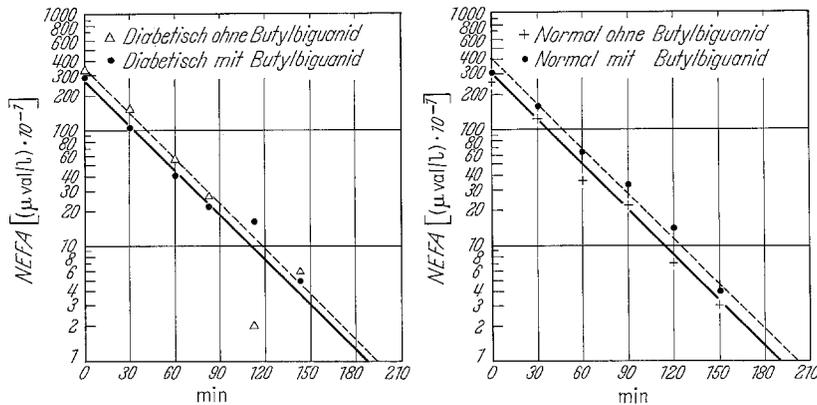


Abb. 2. Änderungen der Konzentrationen der unveresterten Fettsäuren (NEFA) im Perfusionsmedium bei Durchströmung isolierter Lebern von normalen (b) und diabetischen (a) Ratten mit und ohne Zusatz von Butylbiguanid ($2.55 \cdot 10^{-5} M$). Die Änderungen sind auf 10 g Leber bezogen. Jeder Punkt der Kurven entspricht dem Mittelwert aus 6–8 Einzelwerten

menten mit diabetischen Lebern in ähnlicher Weise an wie in Experimenten mit normalen Lebern ohne Butylbiguanidzusatz (s. Tab. 4). Die Einzelwerte streuen aber so stark, daß dieser Effekt nicht signifikant ist.

Die Änderungen des Lactat/Pyruvat-Quotienten (L/P-Q) im Medium werden in Experimenten mit Lebern normaler Tiere durch Butylbiguanid nicht signifi-

Die Kinetik der Aufnahme *unveresteter Fettsäuren* (NEFA), die in Kontrollexperimenten keinen Unterschied zwischen Lebern von normalen und diabetischen Ratten erkennen läßt [35], wurde durch Butylbiguanid nicht signifikant beeinflusst (s. Tab. 6 und Abb. 2).

Auch die Veränderungen der *Gesamtketonkörper-*

Tabelle 6. Änderungen der Konzentration freier Fettsäuren (NEFA) in mval/l im Medium bei Perfusion isolierter Lebern von normalen und diabetischen Ratten in Anwesenheit von Butylbiguanid ($2.55 \cdot 10^{-5} M$). (Die Änderungen sind bezogen auf die Ausgangskonzentrationen bei $t = 0$ und auf 10 g Leber)

NEFA	Zeit in Minuten							n
	0	30	60	90	120	150	180	
Normal ohne BG	0	- 1.36 ± 0.65	- 2.25 ± 0.80	- 2.39 ± 1.06	- 2.54 ± 1.06	- 2.58 ± 1.01	- 2.61 ± 1.06	8
Normal mit BG	0	- 1.47 ± 0.19	- 2.45 ± 0.53	- 2.73 ± 0.64	- 2.91 ± 0.81	- 3.02 ± 0.88	- 3.06 ± 0.80	6
p-Wert							> 0.30	
Diabetisch ohne BG	0	- 1.71 ± 0.30	- 2.71 ± 0.45	- 3.00 ± 0.56	- 3.25 ± 0.56	- 3.21 ± 0.59	- 3.27 ± 0.57	5
Diabetisch mit BG	0	- 1.69 ± 0.58	- 2.41 ± 0.79	- 2.60 ± 0.86	- 2.66 ± 0.99	- 2.77 ± 1.11	- 2.82 ± 1.13	6
p-Wert							> 0.30	

Tabelle 7. Änderungen der Konzentration der Gesamtketonkörper in mMol/l im Medium bei Perfusion isolierter Lebern von normalen und diabetischen Ratten in Anwesenheit von Butylbiguanid ($2.55 \cdot 10^{-5} M$). (Die Änderungen sind bezogen auf die Ausgangskonzentrationen bei $t = 0$ und auf 10 g Leber)

Gesamt-Ketonkörper	Zeit in Minuten							n
	0	30	60	90	120	150	180	
Normal ohne BG	0	+ 2.90 ± 0.57	+ 4.82 ± 0.92	+ 4.75 ± 0.49	+ 4.18 ± 0.87	+ 3.64 ± 0.90	+ 3.26 ± 0.83	8
Normal mit BG	0	+ 3.45 ± 1.95	+ 5.50 ± 1.34	+ 6.00 ± 1.74	+ 5.75 ± 1.74	+ 5.33 ± 1.99	+ 4.76 ± 2.12	6
p-Wert				> 0.20	> 0.10	< 0.05	> 0.10	
Diabetisch ohne BG	0	+ 2.64 ± 1.05	+ 5.13 ± 1.17	+ 5.47 ± 0.99	+ 5.60 ± 1.31	+ 5.05 ± 1.28	+ 4.54 ± 1.38	5
Diabetisch mit BG	0	+ 3.61 ± 1.24	+ 5.68 ± 1.03	+ 6.35 ± 1.28	+ 5.76 ± 2.08	+ 5.34 ± 2.15	+ 4.97 ± 2.14	6
p-Wert				> 0.20			> 0.30	

Tabelle 8. Änderungen der Konzentration des α -Amino-N in mg/l im Medium bei Perfusion isolierter Lebern von normalen und diabetischen Ratten in Anwesenheit von Butylbiguanid ($2.55 \cdot 10^{-5} M$). (Die Änderungen sind bezogen auf die Ausgangskonzentrationen bei $t = 0$ und auf 10 g Leber)

α -Amino-N	Zeit in Minuten							n
	0	30	60	90	120	150	180	
Normal ohne BG	0	+ 4.1 ± 2.7	+ 6.8 ± 3.2	+ 13.5 ± 3.4	+ 15.7 ± 3.1	+ 20.2 ± 6.0	+ 26.3 ± 5.8	8
Normal mit BG	0	- 0.9 ± 4.5	- 2.8 ± 5.1	- 3.9 ± 7.0	- 2.7 ± 5.9	- 0.1 ± 6.0	+ 1.0 ± 5.9	6
p-Wert			< 0.01	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	
Diabetisch ohne BG	0	+ 2.2 ± 1.9	+ 7.7 ± 2.9	+ 9.6 ± 2.8	+ 16.6 ± 5.0	+ 23.6 ± 6.3	+ 32.5 ± 4.8	5
Diabetisch mit BG	0	- 1.8 ± 5.4	- 0.3 ± 5.5	+ 2.2 ± 6.3	+ 5.5 ± 4.4	+ 8.8 ± 5.1	+ 12.7 ± 7.8	6
p-Wert			< 0.02	< 0.02	< 0.01	< 0.01	< 0.001	

konzentration lassen keinen signifikanten Einfluß von Butylbiguanid erkennen (s. Tab. 7).

Lebern normaler Tiere weisen in Versuchen ohne Butylbiguanid einen etwas, aber noch nicht signifikant geringeren Anstieg der Ketonkörperkonzentration auf. In dieser Gruppe lag aber auch die NEFA-Ausgangskonzentration und dementsprechend die NEFA-Aufnahme am tiefsten (s. Tab. 6).

Die α -Amino-N-Bilanz wird bei Anwesenheit von Butylbiguanid im Sinne einer fehlenden bzw. verminderten Nettoabgabe verändert. Während die α -Amino-N-Konzentration ohne Butylbiguanid in Experimenten mit Lebern normaler und diabetischer Ratten einen kontinuierlichen Anstieg zeigt, kommt es unter Butylbiguanid in Versuchen mit normalen Lebern zu keinem Anstieg oder sogar zu einer Netto-

Tabelle 9. Änderungen der Konzentration des Harnstoff-N in mMol/l im Medium bei Perfusion isolierter Lebern von normalen und diabetischen Ratten in Anwesenheit von Butylbiguanid ($2.55 \cdot 10^{-5}$ M). (Die Änderungen sind bezogen auf die Ausgangskonzentrationen bei $t = 0$ und auf 10 g Leber)

Harnstoff-N	Zeit in Minuten							n
	0	30	60	90	120	150	180	
Normal ohne BG	0	+ 0.35 ± 0.16	+ 0.86 ± 0.48	+ 1.15 ± 0.39	+ 1.58 ± 0.30	+ 2.33 ± 0.80	+ 2.62 ± 0.52	8
Normal mit BG	0	+ 0.45 ± 0.09	+ 0.82 ± 0.21	+ 1.26 ± 0.25	+ 1.68 ± 0.36	+ 2.33 ± 0.50	+ 2.68 ± 0.66	6
p-Wert							> 0.30	
Diabetisch ohne BG	0	+ 0.96 ± 0.58	+ 1.61 ± 0.97	+ 2.53 ± 1.20	+ 3.47 ± 1.32	+ 4.06 ± 1.48	+ 5.07 ± 1.51	5
Diabetisch mit BG	0	+ 0.43 ± 0.35	+ 1.09 ± 0.44	+ 1.63 ± 0.54	+ 2.08 ± 0.85	+ 2.69 ± 1.04	+ 3.20 ± 1.10	6
p-Wert							< 0.05	

Tabelle 10. Änderungen der Konzentration an anorganischem Phosphat (P_i) in mMol/l im Medium bei Perfusion isolierter Lebern von normalen und diabetischen Ratten in Anwesenheit von Butylbiguanid ($2.55 \cdot 10^{-5}$ M). (Die Änderungen sind bezogen auf die Ausgangskonzentrationen bei $t = 0$ und auf 10 g Leber)

P _i	Zeit in Minuten							n
	0	30	60	90	120	150	180	
Normal ohne BG	0	+ 0.32 ± 0.11	+ 0.47 ± 0.27	—	+ 0.68 ± 0.14	—	+ 0.98 ± 0.29	8
Normal mit BG	0	+ 0.13 ± 0.10	+ 0.19 ± 0.14	—	+ 0.33 ± 0.24	—	+ 0.58 ± 0.26	6
p-Wert			< 0.05		< 0.01		< 0.02	
Diabetisch ohne BG	0	+ 0.30 ± 0.05	+ 0.62 ± 0.10	—	+ 0.80 ± 0.22	—	+ 1.18 ± 0.28	5
Diabetisch mit BG	0	+ 0.17 ± 0.09	+ 0.26 ± 0.14	—	+ 0.51 ± 0.19	—	+ 0.74 ± 0.16	6
p-Wert		< 0.02	< 0.001		< 0.05		< 0.05	

Tabelle 11. Änderungen der Kaliumkonzentration in mval/l im Medium bei Perfusion isolierter Lebern von normalen und diabetischen Ratten in Anwesenheit von Butylbiguanid ($2.55 \cdot 10^{-5}$ M). (Die Änderungen sind bezogen auf die Ausgangskonzentrationen bei $t = 0$ und auf 10 g Leber)

Kalium	Zeit in Minuten							n
	0	30	60	90	120	150	180	
Normal ohne BG	0	+ 0.13 ± 0.32	+ 0.66 ± 0.60	+ 1.35 ± 0.64	+ 1.80 ± 0.73	+ 2.33 ± 0.74	+ 2.59 ± 1.03	8
Normal mit BG	0	+ 0.04 ± 0.18	+ 0.54 ± 0.54	+ 1.00 ± 0.31	+ 1.31 ± 0.60	+ 2.08 ± 0.73	+ 2.61 ± 0.56	6
p-Wert							> 0.30	
Diabetisch ohne BG	0	+ 0.52 ± 0.25	+ 0.90 ± 0.35	+ 2.24 ± 0.81	+ 2.90 ± 0.65	+ 3.31 ± 0.77	+ 3.60 ± 0.80	5
Diabetisch mit BG	0	+ 0.55 ± 0.57	+ 0.61 ± 0.34	+ 0.85 ± 0.51	+ 1.35 ± 0.73	+ 1.90 ± 0.39	+ 2.36 ± 0.44	6
p-Wert				< 0.05	< 0.05	< 0.01	< 0.02	

Aufnahme. Der Unterschied ist statistisch signifikant. (s. Tab. 8). Unter Butylbiguanid läßt sich in Experimenten mit *diabetischen* Lebern zwar noch ein Anstieg der α -Amino-N-Konzentration nachweisen, dieser ist jedoch signifikant geringer als ohne Butylbiguanid-Zusatz (s. Tab. 8).

Die Netto-Harnstoff-Abgabe normaler Lebern wird durch Butylbiguanid nicht beeinflusst (s. Tab. 9). Die

Netto-Harnstoffabgabe durch diabetische Lebern, die ohne Butylbiguanid signifikant größer ist als diejenige normaler Lebern [35], ist dagegen unter Butylbiguanid signifikant vermindert (s. Abb. 3 und Tab. 9).

Die Netto-Abgabe von *anorganischem Phosphat* durch *normale* und *diabetische* Lebern erfolgt in Anwesenheit von Butylbiguanid signifikant verzögert (s. Tab. 10).

Tabelle 12. Verhalten des Galleflusses in ml/10 g Leber bei Perfusion isolierter Lebern von normalen und diabetischen Ratten in Anwesenheit von Butylbiguanid (2.55 · 10⁻⁵ M)

Gallefluß	Zeit in Minuten							n
	0	30	60	90	120	150	180	
Normal ohne BG			0.77 ± 0.31		1.22 ± 0.50		1.60 ± 0.73	8
Normal mit BG			1.06 ± 0.25		1.61 ± 0.46		2.04 ± 0.64	6
p-Wert			> 0.05		> 0.05		> 0.10	
Diabetisch ohne BG			0.50 ± 0.01		0.90 ± 0.10		1.20 ± 0.30	5
Diabetisch mit BG			0.87 ± 0.39		1.47 ± 0.49		2.07 ± 0.81	6
p-Wert			< 0.05		< 0.02		< 0.05	

Tabelle 13. Änderungen des Leberdurchflusses in ml/10 g Leber/min bei Perfusion isolierter Lebern von normalen und diabetischen Ratten in Anwesenheit von Butylbiguanid (2.55 · 10⁻⁵ M)

Leberdurchfluß	Zeit in Minuten							n
	0	30	60	90	120	150	180	
Normal ohne BG	21.0 ± 3.3	24.6 ± 6.4	27.6 ± 6.9	28.1 ± 7.0	27.5 ± 7.7	24.1 ± 4.8	23.6 ± 3.5	8
Normal mit BG	+ 26.5 ± 4.7	31.5 ± 8.4	32.3 ± 5.3	31.7 ± 4.6	31.7 ± 7.2	32.1 ± 3.8	25.2 ± 10.5	6
p-Wert	> 0.05			> 0.25			> 0.30	
Diabetisch ohne BG	23.0 ± 7.0	28.1 ± 11.0	30.2 ± 10.0	31.0 ± 9.1	30.9 ± 9.2	31.0 ± 9.0	29.1 ± 11.2	5
Diabetisch mit BG	29.6 ± 4.2	33.8 ± 5.1	35.5 ± 5.1	35.9 ± 7.9	35.8 ± 10.1	35.0 ± 8.7	34.2 ± 7.0	6
p-Wert	> 0.10			> 0.30			> 0.30	

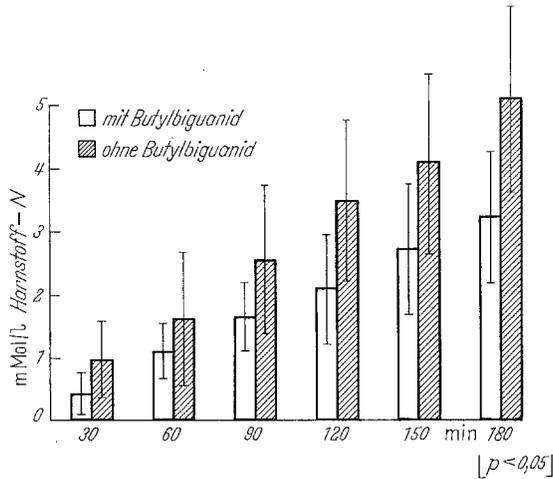


Abb. 3. Nettoabgabe von Harnstoff-N durch isolierte perfundierte Lebern von alloxandiabetischen ketotischen Ratten ohne und mit Zusatz von N₁, n-Butylbiguanid zum Perfusionsplasma (2.55 · 10⁻⁵ M). (Mittelwerte mit Standardabweichungen). Die Änderungen sind auf 10 g Leber bezogen

Eine ähnliche Konstellation findet man bei Betrachtung der Netto-Kalium-Abgabe: Während die Netto-Abgabe von Kalium durch normale Lebern keine Beeinflussung durch Butylbiguanid erkennen läßt, erfolgt die Netto-Kalium-Abgabe diabetischer Lebern unter Butylbiguanid signifikant verzögert (s. Tab. 11).

Die Galle-Produktion normaler und diabetischer Lebern ist unter Butylbiguanid im Mittel deutlich gesteigert (s. Tab. 12). Der Unterschied ist aber nur in den Experimenten mit diabetischen Lebern signifikant.

Der Blutfluß durch normale und diabetische Lebern wird durch Butylbiguanid nicht signifikant beeinflusst (s. Tab. 13).

II. Untersuchungen mit einer Butylbiguanid-Konzentration von 1.02 · 10⁻⁴ Mol/l N₁,n-Butylbiguanid im Perfusions-Medium. In drei Experimenten mit Lebern normaler Ratten wurde die Butylbiguanid-Konzentration auf 1.02 · 10⁻⁴ M erhöht. Die Ergebnisse sind Tabelle 14 und Abb. 6 zu entnehmen. Im Gegensatz zu den mit 2.55 · 10⁻⁵ M Butylbiguanid durchgeführten Versuchen ließ sich bei Verwendung der höheren Butylbiguanid-Konzentration ein Effekt auf die α-Amino-N-Bilanz nicht mehr nachweisen (s. Abb. 6 und Tab. 14). Gleichzeitig lagen die Medium-Konzentrationen von Lactat sowie der Lactat-Pyruvat-Quotient deutlich höher (s. Tab. 14 bzw. Abb. 4). Dieser Befund, der bei Verwendung der niedrigeren Biguanid-Konzentration (2.55 · 10⁻⁵ M) nicht nachweisbar war, ließ sich in jedem einzelnen der drei Versuche feststellen. Die übrigen Parameter wiesen keine verwertbare Abweichung auf.

Tabelle 14. Änderungen der Konzentrationen verschiedener Stoffwechselfparameter sowie des Leberdurchflusses und des Gallenflusses bei Perfusion isolierter Lebern von normalen Ratten in Anwesenheit von $1.02 \cdot 10^{-4}$ M (!) Butylbiguanid. (Die Konzentrationsänderungen von Glucose, NEFA, Gesamtketonkörpern, α -Amino-N, Harnstoff-N, anorg. Phosphat und Kalium sind bezogen auf die Ausgangskonzentrationen bei $t = 0$ und auf 10 g Leber). Die aufgeführten Daten sind Mittelwerte aus drei Versuchen.

Untersuchter Parameter	Zeit in Minuten							
	0	30	60	90	120	150	180	n
Glucose (mMol/l)	0	+ 0.12	+ 0.59	+ 1.09	+ 0.92	+ 0.67	+ 0.23	
Lactat (mMol/l)	1.360	1.320	1.325	1.000	0.842	1.208	1.380	
Pyruvat (mMol/l)	0.0509	0.0554	0.0574	0.1117	0.1095	0.1740	0.1460	
L/P-Q	26.9	24.1	23.1	9.0	17.7	7.0	9.5	
NEFA (mval/l)	0	- 1.59	- 2.68	- 2.88	- 3.06	- 3.11	- 3.12	
Gesamtketonkörper (mMol/l)	0	+ 3.45	+ 5.40	+ 5.68	+ 5.35	+ 4.70	+ 4.31	
α -Amino-N (mg/l)	0	+ 3.03	+ 8.30	+ 10.46	+ 14.40	+ 18.10	+ 22.60	
Harnstoff-N (mMol/l)	0	+ 0.31	+ 0.50	+ 1.13	+ 1.60	+ 2.04	+ 2.32	
Anorg. Phosphat (mMol/l)	0	+ 0.02	+ 0.26	-	+ 0.32	-	+ 0.56	
Leberglykogengehalt (g/100 g Feuchteleber)	0.131				0.136		0.141	
Kalium (mval/l)	0	+ 0.27	+ 0.58	+ 0.78	+ 1.10	+ 1.73	+ 2.40	
Leberdurchfluß (ml/10g/min)	26.6	28.6	29.4	30.4	27.8	26.6	22.1	
Gallenfluß (ml/10g)			0.72		1.31		1.81	

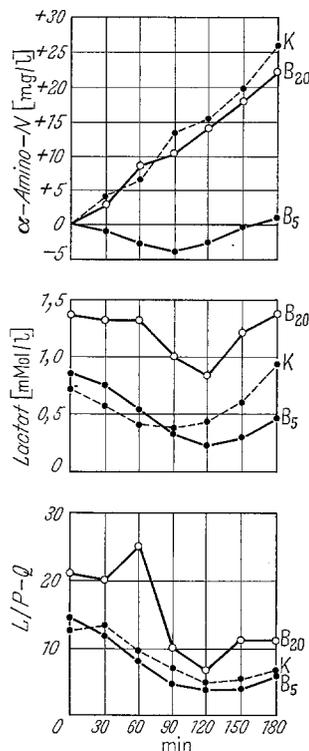


Abb. 4. Änderungen der Konzentrationen von α -Amino-N und Lactat im Perfusionsplasma bzw. Perfusionsmedium sowie des Lactat/Pyruvat-Quotienten unter dem Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von N_1, n -Butylbiguanid im Perfusionsmedium. (K = Kontrollversuche ohne Butylbiguanidzusatz; $B_5 = 2.55 \cdot 10^{-5}$ M Butylbiguanid; $B_{20} = 1.02 \cdot 10^{-4}$ M Butylbiguanid). Die perfundierten Lebern stammten von normalen, 20 Stunden nüchternen Ratten. (Die dargestellten Kurven sind Mittelwertskurven; s. auch Tab. 3, 5, 8 und 13)

III. Der Stoffwechsel von N_1,n -Butylbiguanid bei Perfusion isolierter Rattenlebern. Weder bei Verwendung der hohen, noch bei Verwendung der niedrigen Biguanid-Konzentration ergab sich ein meßbarer Verlust von Biguanid während der dreistündigen Perfusion: In den Experimenten mit niedriger Biguanid-Konzentration ($2.55 \cdot 10^{-5}$ M) betrug die Konzentration im Perfusionsplasma zu Versuchsbeginn (normale und diabetische Lebern) $3.52 \cdot 10^{-5}$ M, bei Versuchsende $3.57 \cdot 10^{-5}$ M. In den Versuchen mit der 4-fach höheren Butylbiguanidkonzentration lag die Ausgangskonzentration bei $1.07 \cdot 10^{-4}$ M, die Konzentration am Versuchsende bei $0.98 \cdot 10^{-4}$ M (Perfusionsplasma). Die Unterschiede liegen im Bereich der Fehlerbreite der Biguanidbestimmungsmethode.

Bei einer eingewogenen Butylbiguanidmenge von $2.55 \cdot 10^{-5}$ Mol/l Perfusionsmedium werden im Perfusionsplasma ca. $3.55 \cdot 10^{-5}$ Mol/l gefunden. Das bedeutet, daß Butylbiguanid kaum in größerem Umfang in die Rindererythrocyten gelangt sein kann. Bei einer Konzentration von $1.02 \cdot 10^{-4}$ Mol/l Perfusionsmedium muß dagegen der Verteilungsraum für Butylbiguanid größer sein, da auch im Plasmaanteil des Perfusionsmediums nur $1.07 \cdot 10^{-4}$ Mol/l gefunden wurden.

Die nach 3-stündiger Perfusion aus dem Medium säulenchromatographisch isolierte Substanz wies vor und nach Säurezugabe das gleiche UV-Spektrum auf wie zu Versuchsbeginn (s. Abb. 5).

Da die UV-Absorption aus der bereits erwähnten monobasischen Ringform resultiert (s. Methodik), schließt die fehlende Veränderung des UV-Spektrums nicht aus,

daß während der Perfusion ein Teil des n -Butylbiguanids in das von BECKMANN [2, 4] bei Ratten beschriebene 3-Hydroxybutylbiguanid-Derivat umgewandelt worden ist.

Die Biguanidausscheidung mit der Galle war sehr gering: Sie betrug bei Verwendung der niedrigeren Butylbiguanid-Konzentration im Mittel $2.14 \mu\text{Mol/ml}$ Galle, in den Experimenten mit der höheren Butylbiguanidkonzentration $7.28 \mu\text{Mol/ml}$ Galle. Nach dem oben Gesagten läßt sich nicht ausschließen, daß es sich bei dem ausgeschiedenen Biguanid — zumindest teilweise — um 3-Hydroxybutylbiguanid gehandelt hat.

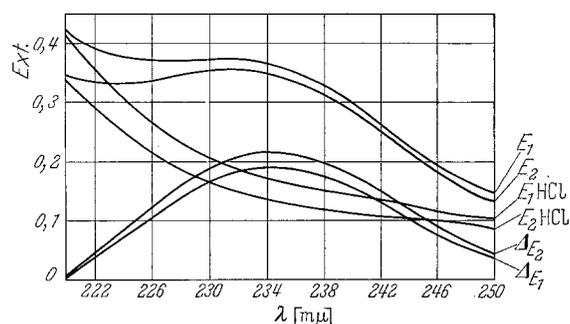


Abb. 5. Verhalten der UV-Absorption des aus dem Perfusionsplasma isolierten Biguanids vor (E_1) und nach (E_2) Leberperfusion über 3 Stunden. E_1 bzw. E_2 = Absorption vor Zusatz von HCl, $E_1 \text{ HCl}$ bzw. $E_2 \text{ HCl}$ = Absorption nach Zusatz von HCl. ΔE_1 bzw. ΔE_2 = Differenzkurve aus den Absorptionen vor und nach HCl-Zugabe. Die vor Beginn der Perfusion eingesetzte Konzentration an N_1, n -Butylbiguanid betrug $2.55 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

Diskussion

Unter unseren experimentellen Bedingungen lassen sich eindeutige Wirkungen von N_1, n -Butylbiguanid auf den Stoffwechsel isolierter perfundierter Lebern von normalen und alloxan-diabetischen ketotischen Ratten nachweisen. Dabei sind folgende Punkte hervorzuheben:

1. Bei Verwendung einer Butylbiguanidkonzentration von $2.55 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ kam es zu einer signifikanten Verbesserung der Nettobilanzen von anorganischem Phosphat und α -Aminosäuren in Versuchen mit normalen und diabetischen Lebern. Demgegenüber war eine Verminderung der Abgabe von Harnstoff und Kalium sowie ein beschleunigter Abfall des L/P-Quotienten nur in Experimenten mit Lebern diabetischer Tiere nachweisbar.

2. Während die bei einer Butylbiguanidkonzentration von $2.55 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ feststellbaren Änderungen alle in Richtung einer Verbesserung des aeroben Stoffwechsels verliefen, führte bereits eine Konzentrationssteigerung auf $1.02 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ zu einem Anstieg des L/P-Quotienten. Gleichzeitig blieb unter der höheren Dosierung der positive Effekt auf die Aminosäurebilanz aus.

Der positive Effekt auf die Phosphatbilanz (Butylbiguanidkonzentration $2.55 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) scheint im Widerspruch zu früheren Befunden von SHEPHERD und McDONALD [32] zu stehen. Diese Autoren stellten in

vivo bei DBI-behandelten Kaninchen einen Anstieg der Serumkonzentrationen des anorganischen Phosphats fest. Demgegenüber ist zu betonen, daß im Serum biguanidbehandelter Diabetiker entweder keine Veränderung des anorganischen Phosphatspiegels [29] oder sogar eine Abnahme [19] gefunden wurde, so daß es sich bei dem Ergebnis von SHEPHERD und McDONALD um die Folge der relativ hohen Dosierung gehandelt haben dürfte, die mit dem eigentlichen Mechanismus der Blutzuckersenkung in keinem Zusammenhang steht.

Die Verbesserung der Aminosäurebilanz entspricht der von MÜTING [27] bei biguanidbehandelten Diabetikern nachgewiesenen Verminderung der Aminoacidurie und der Serumamino säurekonzentrationen. Aufgrund unserer Befunde ist zu vermuten, daß der von MÜTING beobachtete Effekt — zumindest teilweise — über eine Wirkung der Biguanide auf den Leberstoffwechsel zustande gekommen ist. Von LIPPMANN et al. [21] ist auch an eviscerierten, funktionell hepatektomierten Tieren eine gesteigerte Aminosäureaufnahme unter der Wirkung von — allerdings relativ hochdosierten — Biguanidgaben beschrieben worden. Dieser Effekt könnte ebenfalls an der Verbesserung der Aminosäurebilanz beim biguanidbehandelten Diabetiker beteiligt sein.

Die Tatsache, daß die Steigerung der Aminosäureaufnahme in unseren Versuchen entweder mit keiner Veränderung (normale Lebern) oder sogar mit einer Verminderung (diabetische Lebern) der Harnstoffabgabe einhergeht, beweist, daß die Verbesserung der Aminosäurebilanz nicht Folge eines gesteigerten Aminosäureverbrauchs für Desaminierungsreaktionen sein kann. Die Verbesserung der Aminosäurebilanz dürfte daher nicht Ausdruck einer gesteigerten Gluconeogenese, sondern am ehesten Folge einer gesteigerten Proteinsynthese sein.

Bereits früher ist eine Verminderung der Gluconeogenese durch Guanidinderivate beschrieben worden [6, 28, 40, 45]. Die Experimente sind aber einerseits mit relativ hohen Dosen, die Nierenschäden bewirkten [45], andererseits nur an nicht-diabetischen Tieren durchgeführt worden. Unter unseren Versuchsbedingungen war eine Beeinflussung der Harnstoffbildung normale Lebern nicht nachweisbar. Warum nur die gesteigerte Harnstoffbildung der diabetischen Lebern durch Butylbiguanid vermindert wurde, muß offen bleiben. Unter gleichen experimentellen Bedingungen konnten wir auch mit Insulin nur eine Verminderung der Harnstoffbildung durch isolierte diabetische, nicht dagegen durch normale Lebern feststellen [36]. Der Insulineffekt war allerdings geringer als derjenige von Butylbiguanid. Es sei aber an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen, daß sich eine Verminderung der hepatischen Nettoglucoseabgabe, wie sie z. B. von BERINGER et al. [5] beim hungernden Diabetiker unter Biguanidbehandlung beobachtet wurde, in unseren Experimenten *nicht* nachweisen ließ.

Die Verbesserung der Kaliumbilanz isolierter diabetischer Lebern durch Butylbiguanid dürfte Folge einer allgemeinen Verbesserung des oxydativen Stoffwechsels sein — wie er auch in der rascheren Normalisierung des L/P-Quotienten zum Ausdruck kommt. Auch Insulin verbesserte unter den gleichen Bedingungen nur die Kaliumbilanz der diabetischen, nicht dagegen der normalen isolierten Leber [36]. Die unter Butylbiguanid feststellbare Verbesserung der Aminosäurebilanz war unter Insulin ebenfalls zu beobachten. Unter den Bedingungen der Leberperfusion lassen sich also einige Parallelen zwischen der Wirkung von Insulin und der Wirkung niedriger Butylbiguanidkonzentrationen feststellen. Es ist unwahrscheinlich, daß Butylbiguanid die Wirkung von in der Leber oder im Perfusionsmedium vorhandenem Insulin verstärkt, da Insulin durch die Leber außerordentlich schnell inaktiviert wird [20, 22, 24, 25, 26]. Die Bedeutung einer von der isolierten Leber abgegebenen insulinähnlichen Substanz [33] für das Zustandekommen des Biguanideffektes auf den Stoffwechsel der isolierten Leber muß offengelassen werden. Daß blutzuckerwirksame Biguanide den Energiestoffwechsel beeinflussen können, ohne gleichzeitig zu einer Hemmung der Zellatmung und einer Steigerung der anaeroben Glykolyse zu führen, war schon aufgrund der klinischen Erfahrungen zu erwarten, da eine Steigerung der Blutlactatkonzentration nur in Einzelfällen zu beobachten war [11, 16, 37]. Wir selbst konnten bei einer neueren klinischen Untersuchung an 30 Diabetikern während einer mehr als 3 Monate dauernden Behandlung bei 14-tägiger Kontrolle der Blutlactat- und Blutpyruvat Spiegel keinen meßbaren Anstieg der Lactatkonzentration und vor allem des Lactat/Pyruvat-Quotienten im Vergleich zu den Werten einer 6-wöchigen Kontrollperiode ohne antidiabetische Medikation feststellen [1].

Die „Glykolyse-Theorie“ der Biguanidwirkung basiert in erster Linie auf Experimenten, die mit relativ hohen Biguaniddosen durchgeführt wurden. In solchen Experimenten offenbart sich aber mehr der relativ geringe Unterschied zwischen kurativer und toxischer Dosis als der Mechanismus, der unter klinischen Bedingungen zur Blutzuckersenkung führt. Wir haben schon früher [37] durch in vivo-Experimente an Meerschweinchen nachweisen können, daß die Blutzuckersenkung bereits bei Biguaniddosen einsetzt, die noch nicht zu einer signifikanten Erhöhung des Lactat/Pyruvat-Quotienten im Blut führen, daß aber bereits eine geringe Steigerung der Dosierung zu einem deutlichen Anstieg des L/P-Quotienten führte. Die Experimente an der isolierten Leber bestätigen dies: Während bei einer Konzentration von $2.55 \cdot 10^{-5}$ M eher Zeichen einer gesteigerten oxydativen Phosphorylierung nachweisbar sind, genügt bereits eine Erhöhung auf $1.02 \cdot 10^{-4}$ M, um den Effekt auf die Aminosäurebilanz aufzuheben und den L/P-Quotienten deutlich zu erhöhen. Diese relativ geringe „therapeutische Breite“ läßt sich auch am Fettgewebe nach-

weisen: Während eine DBI-Konzentration² von $1.04 \cdot 10^{-5}$ M im Medium zu keiner Hemmung der durch Insulin gesteigerten Stoffwechselaktivität von isoliertem Nebenhodenfettgewebe führt, setzt bereits bei einer Konzentrationssteigerung auf $2.10 \cdot 10^{-5}$ M eine deutliche Hemmung der O_2 -Aufnahme, der Glucoseaufnahme und der Glykogenbildung bei gleichzeitigem Anstieg der Lactatabgabe und des L/P-Quotienten ein [38].

Obwohl genügend Befunde vorliegen, die der „Glykolysetheorie“ ihre Berechtigung nehmen, fehlt andererseits bis heute eine befriedigende Erklärung für den Wirkungsmechanismus. Für eine Wirkung der Biguanide am Fettgewebe spricht wenig:

Der Effekt niedriger Biguanidkonzentrationen auf Glucoseaufnahme und Glucoseoxydation war nicht signifikant [14, 23, 30]. Auch die Vorstellung, daß Biguanide die Wirkung niedriger Insulinkonzentrationen auf die Glucoseoxydation am Fettgewebe steigern könnten [14], bedarf einer eindeutigen experimentellen Sicherung. Von einigen Autoren [3, 8, 9, 10] wird ein Effekt auf die Muskulatur in Erwägung gezogen, wobei in erster Linie an eine Steigerung der Wirkung niedriger Insulinkonzentrationen auf die Glucoseaufnahme gedacht wird. Zwar ist sowohl von CREUTZFELDT, DEUTICKE und SÖLING [12] als auch von LIPPMANN [21] eine Steigerung der Wirkung niedriger Insulindosen auf die Glucoseaufnahme durch eviscerierte Tiere nachgewiesen worden, dagegen konnte ein von BOLINGER et al. [7] am isolierten Rattendiaphragma beschriebener potenzierender Biguanideffekt auf die Glucoseaufnahmesteigerung durch Insulin von DAWEKE und BACH [14] nicht bestätigt werden.

Die von uns erhobenen Befunde haben ergeben, daß im therapeutischen Bereich liegende Biguanidkonzentrationen in der Leber Stoffwechselwirkungen ausüben können. Aus Untersuchungen von WICK et al. [4] sowie von BECKMANN [2, 4] geht hervor, daß oral verabreichtes Biguanid in großer Konzentration in die Leber gelangt. Die relativ hohe Konzentration bleibt über 1–2 Stunden bestehen. Erst anschließend verteilt sich das Biguanid im übrigen Organismus. Die pharmakokinetischen Voraussetzungen einer Biguanidwirkung auf den Leberstoffwechsel wären also vorhanden. Die hier von uns vorgelegten Befunde reichen aber noch nicht aus, um aus ihnen eine vollständige Erklärung des Mechanismus der Blutzuckersenkung beim biguanidbehandelten Diabetiker abzuleiten. Von CZYZYK und LADECKI [13] ist beobachtet worden, daß bereits kurzfristige Biguanidbehandlung beim Menschen zu einer Erniedrigung der oralen Glucosetoleranzkurve, nicht dagegen zur Beeinflussung der intravenösen Glucosetoleranzkurve (CONARD-Test) führte. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß auch beim Menschen der Biguanidwirkung auf den Leberstoffwechsel Bedeutung zukommt.

² DBI = N_1, β -Phenylaethylbiguanid.

Literatur

- [1] APPELS, A., R. KATTERMANN und H.D. SÖLING: Unveröffentlichte Untersuchungen (1966).
- [2] BECKMANN, R.: Über das Verhalten von Biguaniden im Organismus. Presented at the 5th Congress of the International Diabetes Federation, Toronto 1964.
- [3] — Zum Wirkungsmechanismus der Biguanide. Dtsch. med. Wschr. **90**, 1589 (1965).
- [4] — Zum biologischen Abbau von 1-Butyl-Biguanid-(¹⁴C)-Hydrochlorid (Silubin-(¹⁴C)). Arch. int. Pharmacodyn. **160**, 161 (1966).
- [5] BERINGER, A., K. HUPKA, K. MÖSSLACHER, K. MOSER und R. WENGER: Zur Beeinflussung des menschlichen Diabetes mit Insulin, blutzuckersenkenden Sulfonamiden sowie den Biguaniden. Wien. med. Wschr. **108**, 639 (1958).
- [6] BLATHERWICK, N.R., M. SAHYUN und E. HILL: Some effects of Synthalin on metabolism. J. biol. Chem. **75**, 671 (1927).
- [7] BOLINGER, R.E., W.P. MCKEE and J.W. DAVIS: Comparative effects of DBI and Insulin on glucose uptake of rat diaphragm. Metabolism **9**, 30 (1960).
- [8] BUTTERFIELD, W. J., I.K. FRY and E. HOLLING: Effects of insulin, Tolbutamide and Phenethylbiguanidine on peripheral glucose uptake in man. Diabetes **7**, 449 (1958).
- [9] BUTTERFIELD, W. J. H., I.K. FRY and M. J. WHICHELOW: The hypoglycaemic action of phenformin, studies in diabetics after short term therapy. Lancet **1961 II**, 563.
- [10] —, and M. J. WHICHELOW: The hypoglycaemic action of Phenformin. Effect of Phenformin on glucose metabolism in peripheral tissues. Diabetes **11**, 281 (1962).
- [11] CRAIG, J.W., M. MILLER, H. WOODWARD jr. and E. MERIK: Influence of Phenethylbiguanide on lactic, pyruvic and citric acids in diabetic patients. Diabetes **9**, 186 (1960).
- [12] CREUTZFELDT, W., U. DEUTICKE und H.D. SÖLING: Potenzierung der Wirkung von exogenem Insulin durch N-(4-Methylbenzolsulfonyl)-N₁-butylcarbamid und N₁,n-Butylbiguanid beim eviscerierten Tier. Klin. Wschr. **39**, 790 (1961).
- [13] CZYZYK, A., und J. LAWECKI: Untersuchungen über den Einfluß von Phenyläthylbiguanid auf den Verlauf von Belastungsproben mit Insulin, Tolbutamid und Glucose bei Diabetes mellitus. Diabetologia **2**, 62 (1966).
- [14] DAWEKE, H., and I. BACH: Experimental studies on the mode of action of Biguanides. Metabolism **12**, 319 (1963).
- [15] EGDAHL, R.H., and H. GOLDBERG: Pancreatic and hepatic influences on serum insulin-like activity in the dog. Surg. Gynec. and Obstet. **114**, 202 (1962).
- [16] FAJANS, St. S., J. A. MOORHOUSE, H. DOORENBOS, L. H. LOUIS and J. W. CONN: Metabolic effects of phenethylbiguanide in normal subjects and in diabetic patients. Diabetes **9**, 194 (1960).
- [17] FORBATH, N., and D. W. CLARKE: The effect of phenethylbiguanide upon the metabolism of the isolated rat diaphragm. Canad. J. Biochem. **37**, 881 (1959).
- [18] FREEDMAN, L., and M. BLITZ: Determination of Phenformin in biologic fluids and tissues. J. Lab. clin. Med. **58**, 622 (1961).
- [19] GOTO, Y., Y. UJIE, A. TAKANAMI, A. KUWANO and T. UCHIYAMA: Effects of BZ 55 and DBI on blood-ATP, inorganic phosphorus and capillary venous blood sugar difference. Tôhoku J. exp. Med. **69**, 131 (1959).
- [20] LASCH, F., und G. SCHNEIDER: Experimentelle Untersuchungen über die Bedeutung des Insulin und der Insulininhibitoren für die Insulinwirkung, besonders bei portaler Verabreichung. Wien. Z. inn. Med. **40**, 222 (1959).
- [21] LIPPMANN, H. G.: Verteilungsräume für Glucose, Glucoseanaloge, α -Aminostickstoff und freie Fettsäuren unter der Wirkung von N₁, n-Butylbiguanid am eviscerierten, nephrektomierten Tier. Acta biol. med. german. **12**, 104 (1964).
- [22] MADISON, L. L., and L. KAPLAN: The hepatic binding of ¹³¹I-labeled insulin in human subjects during a single transhepatic circulation. Proc. Centr. Soc. Clin. Research **31** (1959).
- [23] MEHNERT, H.: Experimentelle und klinische Untersuchungen zu Wirkungsmechanismus und Indikationsbereich blutzuckersenkender Biguanidderivate. Habilitationsschrift, München 1963.
- [24] MIRSKY, A.: The metabolism of insulin. Diabetes **13**, 225 (1964).
- [25] MORTIMORE, G.E., and F. TIETZE: Studies on the mechanism of capture and degradation of Insulin-I¹³¹ by the cyclically perfused rat liver. Ann. N.Y. Acad. Sci. **82**, 329 (1959).
- [26] — — Metabolism of Insulin-I¹³¹; studies in isolated, perfused rat liver and hind-limb preparations. Diabetes, **8**, 307 (1959).
- [27] MÜTTING, D.: Untersuchungen über die Wirkung eines Biguanids auf den Eiweißstoffwechsel und die Entgiftungsfunktionen der Leber bei Diabetes mellitus. Dtsch. med. Wschr. **89**, 1583 (1964).
- [28] NIELSEN, R.L., H.E. SWANSON, D.C. TANNER and R.H. WILLIAMS: Presented at 39th meeting of the endocrine society, June 1957, zit. nach Volk, B.W. und M.G. Goldner, Diabetes **9**, 174 (1960).
- [29] ODELL, W.D., D.C. TANNER, D.F. STEINER and R.H. WILLIAMS: Phenethyl-, amyl-, and isoamylbiguanide in the treatment of diabetes mellitus. Arch. intern. Med. **102**, 520 (1958).
- [30] SCHÄFER, G., und H. MEHNERT: Vergleichende Untersuchungen zur Wirkung von Biguaniden auf die Glucoseoxydation am epididymalen Fettanhang der Ratte und am subcutanen Fettgewebe des Menschen. Klin. Wschr. **40**, 654 (1962).
- [31] SHAPIRO, L.S.: Chemical properties of DBI and other hypoglycaemic biguanides. Symposium on "A new hypoglycaemic Agent", Phenformin (DBI) Houston (Texas) 1959.
- [32] SHEPHERD, H.G. JR., and H.J. McDONALD: Effect of phenethylbiguanide on serum inorganic phosphate. Proc. Soc. exp. Biol. **102**, 390 (1959).
- [33] SISS, E., A. TEINZER, E. STRUCK und O. WIELAND: Bildung eines insulinartigen Wirkstoffes durch die isolierte Rattenleber. Diabetologia **1**, 21 (1965).
- [34] SÖLING, H.D.: Unveröffentlichte Versuche (1964).
- [35] — R. KOSCHEL, W. DRÄGERT, P. KNEER und W. CREUTZFELDT: Die Wirkung von Insulin auf den Stoffwechsel der isolierten perfundierten Leber normaler und alloxandiabetischer Ratten. — I. Der Stoffwechsel isolierter perfundierter Lebern normaler und alloxandiabetischer Ratten unter verschiedenen experimentellen Bedingungen. Diabetologia **2**, 20 (1966).
- [36] — P. KNEER, W. DRÄGERT und W. CREUTZFELDT: Die Wirkung von Insulin auf den Stoffwechsel der isolierten perfundierten Leber normaler und alloxandiabetischer Ratten. — II. Stoffwechseländerungen unter dem Einfluß intraportaler Insulininfusionen. Diabetologia **2**, 32 (1966).
- [37] — H. WERCHAU und W. CREUTZFELDT: Untersuchungen zur Stoffwechselwirkung von blutzuckersenkenden Biguaniden bei verschiedenen Tierspezies. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **244**, 290 (1963).
- [38] — R. ZAHLTEN, M. BÖTTCHER and B. WILLMS: Effects of 1- β -phenethylbiguanide (DBI) on the metabolism of the isolated rat fat pad. Diabetologia (im Druck).

- [39] STEINER, D.F., and R.H. WILLIAMS: Respiratory inhibition and hypoglycemia by biguanides and decamethylenediguanidine. *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 325 (1958).
- [40] TYBERGHEIM, J.M., and R.H. WILLIAMS: Metabolic effects of phenethylbiguanide: A new hypoglycemic compound. *Proc. Soc. exp. Biol.* **96**, 29 (1957).
- [41] UNGAR, G.: Pharmacology and Toxicology of phenethylbiguanide (DBI). Symposium on "A new hypoglycemic agent, Phenformin (DBI)", Houston (Texas) 1959.
- [42] WICK, A.N., I.L. FAYMON and C.I. STEWART: Beta-Phenethylbiguanide degradation products and their biological activity (Abstract). *Biochem. Pharmacol.* **8**, 121 (1961).
- [43] — E.R. LARSON and G.S. SERIF: A site of action of phenethylbiguanide-A hypoglycemic compound. *J. biol. Chem.* **233**, 296 (1958).
- [44] —, and C.J. STEWART: Tissue distribution of administered DBI and its relationship to DBI action. *Clin. Res. Proc.* **7**, 111 (1959).
- [45] WILLIAMS, R.H., J.M. TYBERGHEIM, P.M. HYDE and R.L. NIELSEN: Studies related to the hypoglycemic action of phenethylbiguanide. *Metabolism* **6**, 311 (1957).
- [46] — D.C. TANNER and W.D. ODELL: Hypoglycemic action of phenethyl-, amyl-, and isoamyl-diguanide. *Diabetes* **7**, 87 (1958).

Priv.-Doz. Dr. H. D. SÖLING
Biochem. Laboratorium der Med.
Univ. Klinik
3400 Göttingen
Humboldt-Allee 1