

**Über die Reaktion
von $\Delta^{9,12}$ -Linolsäureäthylester in Wasser, 4. Mitt.:**

Bildung wasserlöslicher Fettsäureester-Hydroperoxyde
mit atmungs- und gärungshemmender Wirkung
auf Tumorzellen und Hefe

Von

E. Schauenstein, G. Schatz und G. Benedikt

Aus dem Institut für Physikalische Chemie der Universität Graz

Mit 12 Abbildungen

(Eingegangen am 28. Januar 1961)

Die weitere Untersuchung der „Wasserreaktion“ von Äthyl-*linolat* ergab, daß es sich zweifellos um eine, wenn auch weitgehend modifizierte Autoxydation handelt. Als interessantestes Reaktionsprodukt werden wasserlösliche C_{18} -Monohydroperoxyde gefunden, deren chemische Konstitution von der der bisher bekannten Linolmonohydroperoxyde wesentlich abweichen dürfte.

Wenn die gefundenen Fettsäureester-Hydroperoxyde auch noch nicht in Substanz dargestellt und hinsichtlich ihrer Konstitution aufgeklärt werden konnten, so war es doch bereits möglich, sie als Träger einer bemerkenswerten biologischen Wirkung zu identifizieren: der Hemmung von aerober und anaerober Glykolyse und der Atmung von *Ehrlich-Ascites-Tumorzellen*. Da die aktiven Hydroperoxydgruppen des Präparates durch Katalase nicht angegriffen werden, ist auch ihre Hemmwirkung katalaseresistent. Die Glykolysehemmung setzt sich aus einem verhältnismäßig geringen unspezifischen Lipid-effekt sowie aus einem spezifischen Hydroperoxydeffekt zusammen, der z. B. über eine Hemmung der Triosephosphatdehydrogenase zustande kommen könnte. Die Halbwertsdosis für die gleich starke Atmungs- und Gärungshemmung liegt bei den derzeit zur Verfügung stehenden Mischpräparaten bei 10^{-3} m/l.

Erwartungsgemäß hemmt Präp. LHPO infolge seiner Resistenz gegen Katalase die Gärung der Hefe (Halbwertkonzentration $< 5 \cdot 10^{-4}$ m/l), während H_2O_2 verständlicherweise unwirksam ist.

Ergänzende Versuche mit dem reduzierten Präparat zeigten, daß auch bei Hefe die Hemmwirkung von LHPO aus einem spezifischen Hydroperoxydeffekt und einem schwächeren unspezifischen sogen. Lipideffekt besteht.

Die hier mitgeteilten Ergebnisse lassen als reine in-vitro-Befunde noch keinerlei Rückschlüsse zu, ob Präp. LHPO in gleicher Weise auch im lebenden Organismus wirkt. Diese Frage bildet den Gegenstand umfangreicher Untersuchungen von *M. Ratzenhofer* und *J. Zangger*, worüber in einer gemeinsamen Arbeitsreihe a. a. O. berichtet werden wird.

Einleitung

Eine Reihe vorangegangener Arbeiten befaßte sich mit dem überraschenden Befund, daß beim Dispergieren höher ungesättigter Fettsäuren oder ihrer Derivate in reinem Wasser ein bestimmter Prozentsatz des eingesetzten Präparates wasserlöslich wird¹.

Wiederholt man den Vorgang mit einer bestimmten Menge des Ausgangsstoffes und jedesmaligem Wasserwechsel, so kann praktisch das gesamte Ausgangsmaterial in das wasserlösliche Produkt übergeführt werden. Gearbeitet wurde stets unter Luftzutritt, ohne Zusatz weiterer Stoffe, bei 40° C, also unter durchaus physiologischen Bedingungen.

Die Annahme lag somit nahe, daß es sich hier um einen Vorgang handeln dürfte, der auch im lebenden Organismus ablaufen und von Bedeutung sein könnte. Diese Überlegungen ließen eine eingehendere Untersuchung der Reaktion der obgenannten Stoffklassen in Wasser wünschenswert erscheinen. Weiters erschien es von Interesse zu untersuchen, welche biologischen Eigenschaften das aus diesen Verbindungsklassen gewonnene wasserlösliche Reaktionsprodukt besitzt. Die vorliegende Arbeit berichtet über die in vitro erhaltenen Ergebnisse.

Reaktionsbedingungen

Das Ausgangsmaterial wird in der 50fachen Menge reinsten destillierten Wassers bei 40°C mit 1800 bis 2000 U/min unter Luft gerührt, die erhaltene milchige Emulsion durch entsprechende Filtration geklärt, bis eine optisch völlig blanke, wäßrige Lösung erhalten wird, die das wasserlösliche Reaktionsprodukt enthält, welches bereits nach halbstündigem Rühren nachweisbar ist.

Mit zunehmender Rührdauer (bis zu 10 Stunden) steigt zunächst die Menge des wasserlöslichen Reaktionsproduktes an, worauf es bei weiterer Ver-

¹ *E. Schauenstein, O. Gold* und *B. Pibus*, Mh. Chem. **87**, 144 (1956); *E. Schauenstein* und *J. Biheller*, Mh. Chem. **87**, 158 (1956); **88**, 132 (1958); *E. Schauenstein*, Naturwiss. **43**, 372 (1956); *H. Bayzer, J. Biheller, H. Gaisch* und *E. Schauenstein*, Mh. Chem. **89**, 258 (1958).

Anmerkung bei der Korrektur: In der neuesten Literatur berichten *A. F. Mabrouk* und *L. R. Dugan* [J. Amer. Oil Chem. Soc. **38**, 9 (1961)] über ganz analoge Befunde, wonach beim Dispergieren von Linolsäure in wässr. Salzlösungen eine wasserlösliche, gesättigte, möglicherweise vierfach hydroxylierte Fettsäure entsteht.

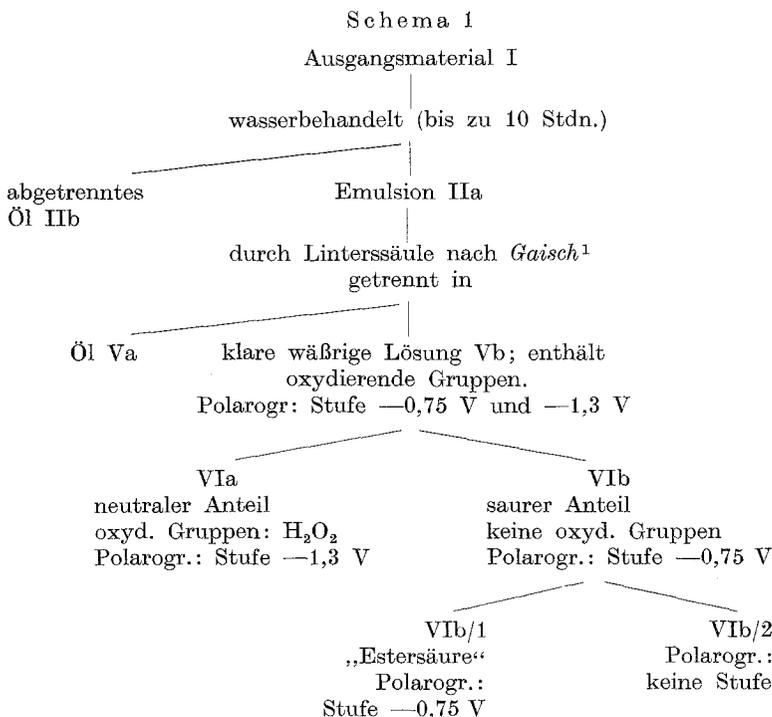
längerung der Rührdauer zu typischen Veränderungen in der Zusammensetzung des Reaktionsproduktes kommt.

Bisherige Ergebnisse über die chemische Zusammensetzung des wasserlöslichen Reaktionsproduktes und den Charakter der „Wasserreaktion“

Als Ausgangspräparat verwendeten wir $\Delta^9,12$ -Linolsäureäthylester, der in reiner Form von der Hormel-Foundation, Austin, USA, mit folgenden Kennzahlen hergestellt wurde:

Jodzahl (*Wij's*): 163,35 (ber.: 164,0); konjug. Diene $\leq 0,1\%$, konjug. Triene und Tetraene: 0.

Die zunächst eingehaltene Versuchsmethodik ist in Schema 1 dargestellt.



Der erste Nachweis in Lösung gegangener Bestandteile erfolgte durch UV-spektrometrische Untersuchung der blankfiltrierten wäßrigen Phase IIa. Dabei konnte festgestellt werden, daß konjugierte Isomere der Ausgangssubstanz I in IIa in echter wäßriger Lösung vorliegen (vgl. Abb. 1) Nunmehr wurde der Trockenrückstand aus Vb auf seine Absorption im Ultrarot untersucht, wobei eine intensive Bande bei $2,95 \mu$ erkennen ließ, daß im wasserlöslichen Reaktionsprodukt Hydroxylgruppen enthalten sein müssen (Abb. 2). Die weitere Untersuchung ergab nun, daß während

des Rührprozesses eine Verschiebung der Doppelbindungen aus der ursprünglich isolierten in die konjugierte Stellung eintritt¹, sowie Hydroxylgruppen in das Molekül eintreten. Diese lassen sich — abgesehen vom UR-Spektrum — auch durch den Farbttest mit Kaliumperjodat und Stärke, Ferrirhodanid und durch Bestimmung der OH-Zahl nachweisen. Mit der Einführung der polaren Hydroxylgruppen war nun die Wasserlöslichkeit des Reaktionsproduktes geklärt, die nähere chemische Zusammensetzung blieb jedoch noch unbekannt. Als weiterer analytischer Befund sei hier die Identifizierung von Carboxylgruppen im Reaktionsprodukt genannt, die mit UR-Spektrometrie und potentiometrischer Titration möglich war¹.

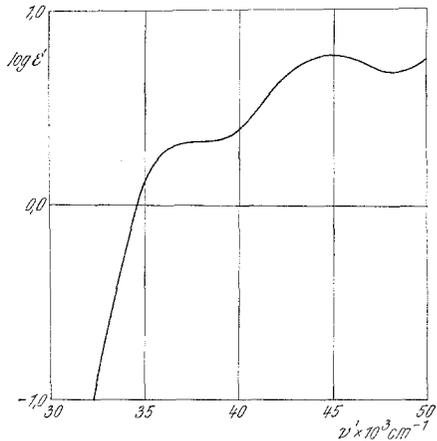


Abb. 1. UV-Absorptionsspektrum der blank filtrierten wäßrigen Phase IIa

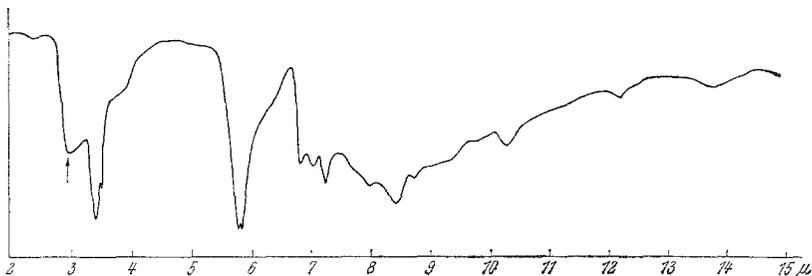


Abb. 2. UR-Absorptionsspektrum des Trockenrückstandes aus Vb

Es zeigte sich, daß die Carboxylgruppen zu Halbestern von Dicarbonsäuren gehören, unter denen die Äthylmonoester von Kork-, Azelain- und Pimelinsäure von *Schlögl*² nachgewiesen werden konnten. Damit war eindeutig geworden, daß es bei der Reaktion in Wasser teilweise zu einer Spaltung des Ausgangsmoleküls gekommen sein mußte. Diese Spaltung konnte nur oxydativer Natur sein. Wenn es sich also bei der Reaktion, die beim Verühren von Äthyllinolat in Wasser einsetzt, um eine Oxydation handelt, so werden die vorhin erwähnten Hydroxylverbindungen nicht, wie wir ursprünglich angenommen hatten¹, durch Addition von OH aus dem Wasser an die Doppelbindungen, sondern sicherlich über intermediäre Per-

² K. *Schlögl*, bisher unveröffentlichte Versuche.

oxyde entstanden sein, die bislang noch nicht nachgewiesen worden waren. Ein weiterer Hinweis auf den oxydativen Charakter der Reaktion ergab sich aus der Anwesenheit oxydierender Bestandteile in Vb, die, wie auf S. 452 ausgeführt werden wird, als Wasserstoffperoxyd identifiziert werden konnten. Tab. 1 stellt die im Gesamtreaktionsprodukt bisher identifizierten funktionellen Gruppen und Substanzen übersichtlich dar.

Tabelle 1

Gruppe	Neutral- anteil	Saure Fraktionen	Nachweismethode
Ester	+	+	UR, Verseifungszahl
Carboxyl	—	+	UR, Titration
Hydroxyl	+	+	UR, KJO ₄ , OH-Zahl
Hydroperoxyd ...	+	—	Polarogr., Peroxydzahl
Konj. C=C	+	+	UV
Substanzen			
H ₂ O ₂	+	—	Polarogr., Peroxydzahl, Katalase
Korksäure	—	+	
Pimelinsäure	—	+	Papierchromatographie
Azelainsäure	—	+	

Der Nachweis von wasserlöslichen Lipoperoxyden gelang an wesentlich länger gerührten Emulsionen (Rührzeit mehrere Tage). Das Schema 2 veranschaulicht den nunmehr gewählten, abgeänderten Aufarbeitungsgang; die hierfür maßgeblichen Gründe werden auf Seite 449 mitgeteilt werden.

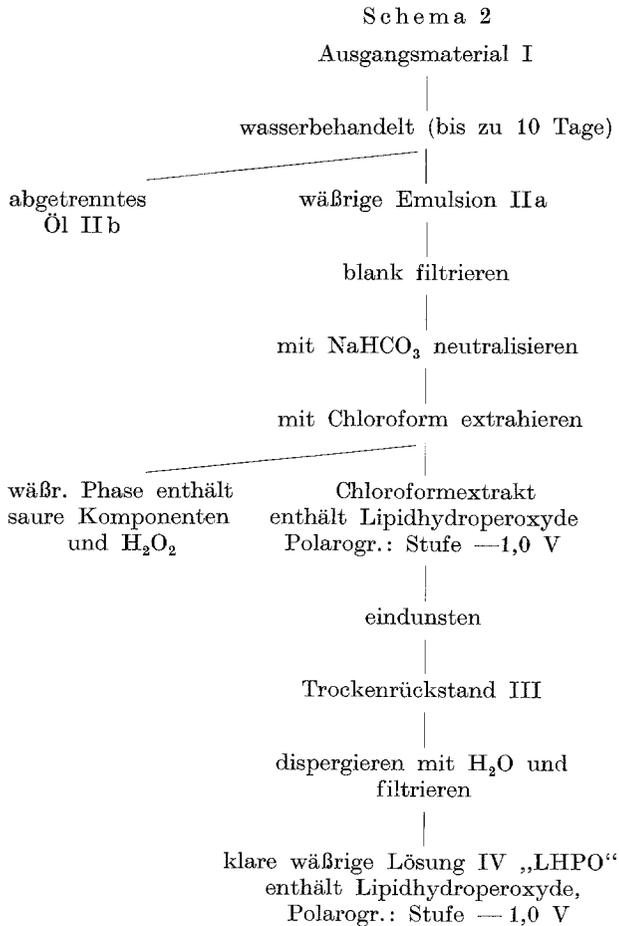
Für den Peroxydnachweis wurde die blank filtrierte wäßrige Phase IIa nach der Methode von *Hartmann*³ mit Ferro-Ion und *Tillmanns* Reagens untersucht, wobei Peroxydgehalte von ca. 30 γ Peroxydsauerstoff/ml festgestellt wurden, mit Titansulfat⁴ dagegen nur ein Bruchteil, etwa 50%, dieses Wertes. Diese Divergenz fand insofern eine Erklärung, als im Filtrat nicht nur Lipoperoxyde, sondern auch überraschenderweise H₂O₂ nachgewiesen werden konnte. Hiezu wurde die zu untersuchende Lösung erschöpfend mit Chloroform extrahiert, die Chloroformextrakte vereinigt, eingengt und nach *Hartmann*³ vermessen. Die restliche wäßrige Lösung wurde nach *Hartmann* und mit Titansulfat geprüft. Es ergab sich, daß die Summe der Peroxydwerte (PO-Werte) des Chloroformauszuges und der restlichen wäßrigen Lösung dem in der ursprünglichen,

³ *J. Glavind* und *S. Hartmann*, Acta chem. scand. **9**, 497 (1955).

⁴ *W. Lepper*, Chemiker-Ztg. **66**, 314 (1942).

wäßrigen Lösung nach *Hartmann* gemessenen PO-Wert entsprach. Die ursprüngliche, wäßrige Lösung mußte also enthalten:

1. ein nur in Wasser lösliches Peroxyd, das sowohl mit Titansulfat als auch nach der Methode von *Hartmann* positiv reagiert,
2. ein wasser- und lipidlösliches Peroxyd, das nur nach *Hartmann* positiv reagiert.



Das erstgenannte Peroxyd konnte auf Grund des Polarogramms (Stufe bei $-1,3$ V) und der spezifischen Zersetzbarkeit durch Katalase einwandfrei als Wasserstoffperoxyd identifiziert werden. Das unter 2. genannte Lipidperoxyd konnte ebenfalls polarographisch als Lipidhydroperoxyd identifiziert werden, und zwar auf Grund einer Stufe bei $-1,0$ V (Abb. 3).

Will man das vorliegende, reichlich komplexe Stoffgemisch auf biologische Eigenschaften testen, so ergibt sich als erstes die Forderung

nach möglichst weitgehender Fraktionierung und Aussonderung möglichst homogener Fraktionen. Die Auswahl der zu eliminierenden Bestandteile wird einerseits durch die Toxizität der Komponenten bestimmt, andererseits durch das Interesse, das ihrer biologischen Testung zukommt.

In Tierversuchen, die *Mayersbach* mit dem Gesamtprodukt Vb (Schema 1) durchgeführt hatte⁵, ergab sich eindeutig, daß die sauren Bestandteile vor allem auf das Nierenepithel von Mäusen und Ratten ziemlich

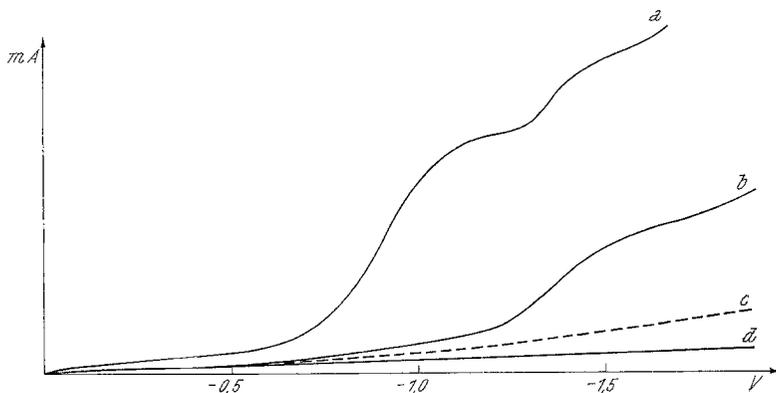


Abb. 3. Polarogramm des Trockenrückstandes III (gem. Schema 2)

Diagr. a: 4,65 mg Präp. LHPO (akt. $O_2 = 80 \gamma$) in 10 ml 0,3 m LiCl-Benzol-Methanol (1:1). Empfindlichkeit 300

Diagr. b: 8,0 mg LHPO, reduziert mit $SnCl_2$ in 10 ml obiger Lösung, Empf. = 300

Diagr. c: 14,9 mg LHPO, hydriert mit *Lindlar*-Katalysator in 10 ml obiger Lösung, Empf. = 300

Diagr. d: Grundstrom des reinen Lösungsmittels, Empf. = 300

toxisch wirken. Andererseits sind die Wirkungen von Fettsäuren auf den Zellstoffwechsel so weitgehend untersucht worden^{6, 7}, daß auch aus diesem Grund eine Eliminierung der sauren Bestandteile wünschenswert erschien. Das gleiche gilt auch für das Wasserstoffperoxyd⁸⁻¹⁰.

Von Interesse dagegen erschien die biologische Untersuchung der neutralen Komponenten, insbesondere der wasserlöslichen Lipidhydroperoxyde; liegt doch hier eine Gruppierung vor, die auf Grund der Befunde mit dem Wasserstoffsperoxyd eine wirksame Beeinflussung des Zellstoffwechsels vermuten läßt.

⁵ *H. Mayersbach*, bisher unveröffentlichte Versuche.

⁶ *F. Samson*, *A. Katz* und *D. Harris*, *Arch. Biochem. Biophys.* **54**, 406 (1955); *K. Sugurawa* et al. *Ref.: C. A.* **53**, 14219a; *S. V. Beck*, *Biochem. J.* **29**, 2424 (1935); *B. Pressman* und *H. Lardy*, *Biochem. Biophys. Acta* **21**, 458 (1956).

⁷ *P. Scholefield*, *Canad. J. Biochem. Physiol.* **34**, 1211 (1956).

⁸ *O. Warburg*, *W. Schröder* und *H. Gattung*, *Z. Naturforschg.* **15b**, 163 (1960).

⁹ *H. Holzer* und *S. Frank*, *Angew. Chem.* **70**, 570 (1958).

¹⁰ *P. Glogner*, *H. Wolf* und *H. Holzer*, *Biochem. Z.* **332**, 407 (1960).

Aus diesen Gründen wurde die Aufarbeitung der 10-Tage-Rühransätze gemäß Schema 2 entsprechend abgeändert. Der wesentliche Unterschied zwischen den in Schema 1 und 2 dargestellten Arbeitsweisen besteht in der Eliminierung der chromatographischen Trennung, wodurch gemäß Schema 2 erreicht wird, daß die gesamten Neutralanteile in den Chloroformextrakt übergehen. Die klar filtrierte Lösung IV enthält durchschnittlich 0,2% Trockenrückstand, der, wie aus den UR-Spektren hervorgeht, nur mehr aus Fettsäureestern besteht (Abb. 4); außerdem sind durch Banden bei 6,05 und 10,25 μ C=C-Bindungen und auf Grund der Bande bei 2,94 μ OH-Gruppen nachweisbar. An der Entstehung der OH-Bande

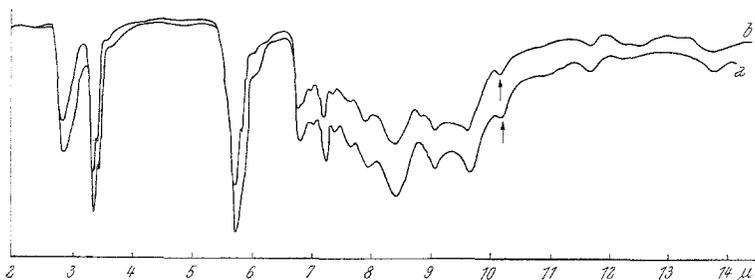


Abb. 4. UR-Absorptionsspektrum des Trockenrückstandes aus IV;
Spektrum a: unbehandelt
Spektrum b: mit SnCl_2 reduziert

bei 2,94 μ sind sicher auch Hydroperoxydgruppen beteiligt, die sich im Polarogramm des Trockenrückstandes von Lösung IV, gelöst in Benzol-Methanol 1:1 mit LiCl (0,3 m) als Leitelektrolyt, in einer charakteristischen Stufe mit $E_{1/2} = -1,0$ V zu erkennen geben (Abb. 3). Der Gehalt des Trockenrückstandes an Peroxydsauerstoff beträgt durchschnittlich 20 γ /mg. Das Durchschnittsmolekulargewicht, bestimmt nach *Rast* (in Menthol), beträgt $340 \pm 10\%$. Unter der Annahme eines Monohydroperoxyds ergibt sich somit sein Anteil am Trockenrückstand aus Lösung IV zu mindestens 40%. Die Bande bei 10,25 μ läßt allgemein auf eine $-\text{CH}=\text{CH}-$ Gruppe schließen, wobei es sich sowohl um eine isolierte, trans-olefinische, als auch um eine in Konjugation stehende C=C-Gruppe handeln könnte. Die Zuordnung wird erleichtert durch das UV-Spektrum, das ein klares Maximum bei 45 800 ν' erkennen läßt (Abb. 5). Wie der Vergleich mit den Spektren von Crotonsäure, Acrylsäure oder Octadecensäure ergibt, ist die genannte Bande mit aller Wahrscheinlichkeit der Gruppierung $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOR}$ zuzuordnen. Für diese Interpretation spricht auch die Tatsache, daß im Polarogramm, anschließend an die bereits erwähnte Hydroperoxydstufe, eine Stufe mit $E_{1/2} = -1,45$ V auftritt, die ohne weiters der oben genannten Gruppierung angehören könnte (Abb. 3).

Als weiterer Beweis sowie zur quantitativen Bestimmung wurde der Trockenrückstand aus Lösung IV nach vorheriger Reduktion der Hydroperoxydgruppen mit SnCl_2 ¹¹ mit dem Katalysator nach *Lindlar* hydriert,

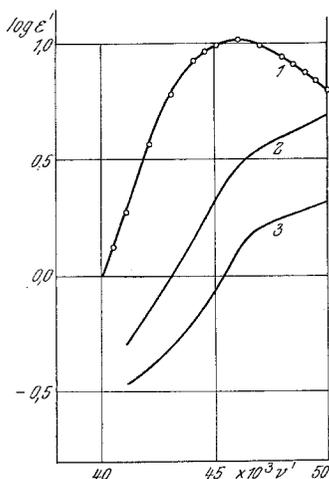


Abb. 5. UV-Absorptionsspektrum des Trockenrückstandes aus IV in Äthanol

Spektrum 1: voll ausgezogene Kurve: Präparat LHPO
 o o o o o o: nach Reduktion mit SnCl_2
 Spektrum 2: LHPO, hydriert mit *Lindlar*-Katalysator
 Spektrum 3: LHPO, hydriert mit *Adams*-Katalysator

welcher bekanntlich isoliert-ständige Doppelbindungen nicht hydriert¹². Es ergab sich ein Wasserstoffverbrauch von durchschnittlich 20 ml H_2/g . Nach vollzogener Hydrierung sind sowohl die Bande $10,25 \mu$ im UR-Spektrum (vgl. Abb. 6) und das UV-Maximum $45\ 800 \nu'$ (vgl. Abb. 5) als auch die polarographische Stufe bei $E_{1/2} = -1,45 \text{ V}$ nicht mehr feststellbar (vgl. Abb. 3). Daraus kann gefolgert werden, daß der Trockenrückstand aus Lösung IV etwa 25% einer Komponente enthält, die die Gruppierung $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOR}$ aufweist. Das nach der Reduktion des Hydroperoxyds und Hydrierung mit *Lindlar*-Katalysator erhaltene Produkt wurde nun noch mit Platinoxid nach *Adams* hydriert. Es ergab sich ein Wasserstoffverbrauch von 39 ml/g.

Zusammenfassend läßt sich bisher über die Zusammensetzung von Trockenrückstand aus Lösung IV folgendes sagen:

1. Das Durchschnittsmolekulargewicht beträgt $340 \pm 10\%$.
2. Das Präp. besteht somit durchschnittlich aus C_{18} -Fettsäureestern.

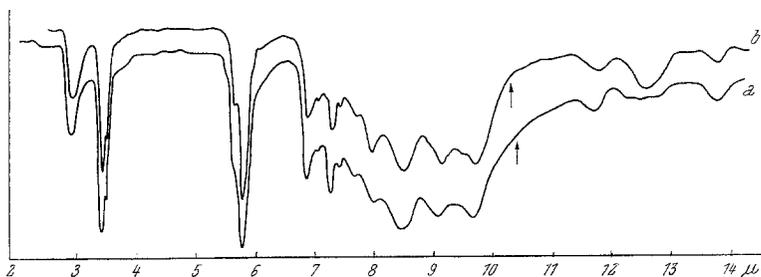


Abb. 6. UR-Absorptionsspektrum des Trockenrückstandes aus IV:
 Spektrum a: Nach Hydrierung mit *Lindlar*-Katalysator
 Spektrum b: Nach Hydrierung mit *Adams*-Katalysator

- 3 Der Gehalt an Hydroperoxydsauerstoff beträgt durchschnittlich $2 \cdot 10^{-2} \text{ g/g}$; dem entspräche, umgerechnet auf C_{18} -Monohydroperoxyd, ein Gehalt von rund 40%.

¹¹ O. Privett, W. Lundberg et al., J. Amer. Oil Chem. Soc. **30**, 61 (1953).

¹² C. Lindlar, Helv. Chim. Acta **35**, 446 (1952).

4. Eine Komponente mit der Gruppierung $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOR}$ ist wahrscheinlich zu rund 25% anwesend.
5. Aus der Intensität der OH-Bande bei $2,94 \mu$ im Vergleich zur CH_2 -Bande bei $3,41 \mu$ kann auf die Anwesenheit von Hydroxylgruppen geschlossen werden.

Aus dem Gesagten ergibt sich somit, daß die im Trockenrückstand aus Lösung IV enthaltenen Fettsäureester-Hydroperoxyde eine grundsätzlich andere chemische Konstitution aufweisen müssen als die bisher bekanntgewordenen Linolsäuremonohydroperoxyde¹³. Die hiermit erstmalig gefundenen Esterhydroperoxyde erwiesen sich als recht labile Stoffe, die sich in ihrem Löslichkeitsverhalten nur sehr wenig von den übrigen Bestandteilen des genannten Trockenrückstandes unterscheiden, weshalb ihre Abtrennung bisher nicht gelungen ist.

Aller Wahrscheinlichkeit nach handelt es sich also um bisher noch nicht bekannte wasserlösliche C_{18} -Hydroperoxyde, deren Einfluß auf den Zellstoffwechsel im folgenden beschrieben werden soll.

Biologische Wirkungen des wasserlöslichen Reaktionsproduktes

1. Präparat Vb, VIa, VIb

Die ersten orientierenden Versuche wurden mit Präparaten durchgeführt, die nach 10stdg. Rühren gemäß Schema 1 gewonnen worden waren. Wie bereits berichtet¹⁴, zeigen die eingangs genannten 3 Präparate bei *Ehrlich*-Ascites-Tumorzellen eine eindeutige Hemmung der aeroben und anaeroben Glykose und der Atmung. Weiters konnte festgestellt werden, daß die oxydierenden Gruppen, die in Präp. V b und VI a anwesend sind, am Hemmeffekt maßgeblich beteiligt sein müssen.

Für diese und alle weiteren Versuche wurde zunächst der Gehalt der Präp. Vb und VIa an aktivem Sauerstoff kolorimetrisch mit schwefelsaurer Titansulfat-Lösung ermittelt und daraus die maximal freisetzbare Menge Sauerstoff in μl errechnet, hierauf Katalase zugesetzt und die entwickelte Gasmenge gemessen.

Versuchsbedingungen (*Warburg*-Apparatur): $t = 37^\circ \text{C}$, Gesamtvolumen 5,5 ml, 0,5 ml Suspension von Katalase (Boehringer) im Ansatz, Versuchsraum Luft, Mittelwerte aus je drei Bestimmungen. Die Brauchbarkeit der Methode wurde mit gestellten H_2O_2 -Lösungen überprüft.

Dabei zeigte sich eindeutig, daß der gesamte in Präp. Vb und VIa enthaltene aktive Sauerstoff durch Katalase als gasförmiger O_2 (ber. 33,0 μl , gef. 32,5 μl , d. s. 98,5% d. Th.) in Freiheit gesetzt werden kann. Da

¹³ Zusammenfassende Darstellung: *W. Franke*, *Ergebn. Enzymforsch.* **12**, 89 (1951).

¹⁴ *E. Schauenstein* und *G. Schatz*, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **61**, 1068 (1959).

lich als Autoxydation anzusehen ist, daß aber die in großem Überschuß anwesende wäßrige Phase wesentliche Modifizierungen bedingt. Soweit uns bekannt, ist das Auftreten von Wasserstoffperoxyd bei Autoxydation höher ungesättigter Fettsäuren bisher noch nie exakt bewiesen worden. Wohl äußerten *Michelin* und *Pschennowa*¹⁵ diesbezüglich Vermutungen, jedoch lediglich auf Grund der positiven Reaktion mit Titansulfat, die für H_2O_2 keineswegs spezifisch ist.

Die beträchtlichen cytotoxischen und radiomimetischen Wirkungen des Wasserstoffperoxyds sind bereits seit längerem bekannt und ausführlich untersucht worden^{16, 17}.

Auch das peroxydfrfreie VIb-Präp. zeigt eine schwache Hemmung der Atmung und Gärung der *Ehrlich*-Tumorzellen, ein Effekt, der mit dem für Fettsäuren und andere oberflächenaktive Stoffe bereits bekannten unspezifischen Hemmeffekt^{7, 18} identisch sein dürfte. Da auch Präp. Vb und VIa oberflächenaktive Fettsäureketten enthalten, zeigen auch sie diesen Effekt, der jedoch gegenüber der starken Hemmaktivität des gleichzeitig anwesenden H_2O_2 quantitativ kaum ins Gewicht fällt.

Da es sich bei den Hemmwirkungen der Präp. Vb, VIb und VIa (H_2O_2 -Wirkung und unspezifische Wirkung oberflächenaktiver Stoffe) um bereits bekannte Effekte handelt und außerdem toxische Wirkung der sauren Komponenten beobachtet worden waren⁵, wurde die Untersuchung der genannten Präparate nicht mehr fortgesetzt.

Wie bereits erwähnt, treten bei wesentlich längerem Rühren wasserlösliche Lipidhydroperoxyde auf, deren biologische Untersuchung von beträchtlichem Interesse erschien. Wir verwendeten daher nunmehr für die weiteren Versuche die wasserlöslichen Reaktionsprodukte aus 10-Tage-Rühransätzen, nachdem das H_2O_2 und die sauren Bestandteile, wie auf S. 449 beschrieben, abgetrennt worden waren. Zum Einsatz kam somit die in Schema 2 mit IV bezeichnete klare Lösung, für die auch die Kurzbezeichnung „LHPO“ eingeführt wurde, um den darin anwesenden Lipidhydroperoxyden Rechnung zu tragen.

2. Klare wäßrige Lösung „LHPO“

Zunächst wurde das Verhalten gegenüber Katalase geprüft: 5,0 ml einer LHPO-Lösung mit 39 γ aktivem O_2/l gab in der *Warburg*-Apparatur bei 25° C mit 0,5 ml Katalase-Lösung (Versuchsraum Luft) nur 2 ml Gas, während sich 149 ml O_2 berechnen ließen.

¹⁵ *D. Michelin* und *K. Pschennowa*, *Biokhimiya* **11**, 437 (1946); **13**, 76 (1948).

¹⁶ *O. Warburg*, *W. Schröder*, *H. Gewitz* und *W. Völker*, *Z. Naturforschg.* **13b**, 591 (1958).

¹⁷ *F. Dickey* et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **35**, 581 (1949); *P. Dustin jr.* und *C. Gompel*, *C. R. soc. biol.* **143**, 874 (1949).

¹⁸ *P. Scholefield*, *Canad. J. Biochem. Physiol.* **34**, 1227 (1956).

Zum grundsätzlichen Unterschied von H_2O_2 wird also der aktive Sauerstoff von LHPO durch Katalase nicht in Freiheit gesetzt, d. h. daß die wasserlöslichen Lipid-Hydroperoxyde durch Katalase nicht spaltbar sind.

Dann wurde der Einfluß von LHPO auf die Atmung und Gärung der Ehrlich-Ascites-Tumorzellen untersucht, wobei die Kurve 1 der Abb. 8 erhalten wurde.

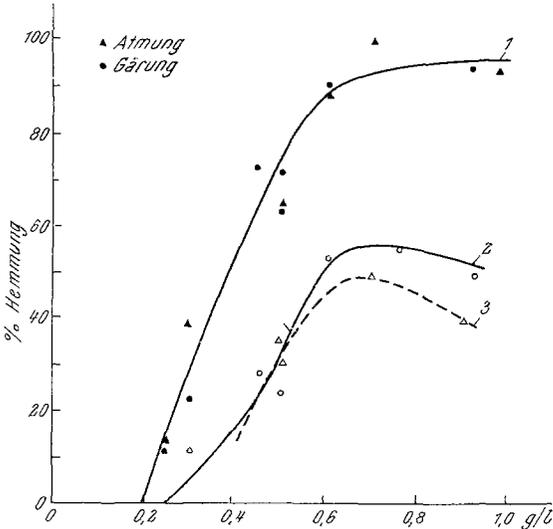


Abb. 8. Dosis-Effekt-Kurven:

Kurve 1: Hemmung der anaeroben Gärung und der Atmung von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen durch P äp. LHPO

Kurve 2: Gärungshemmung } durch das mit $SuCl_2$ reduz. Präparat

Kurve 3: Atmungshemmung }

isotonem glucosefreiem Puffer mit $45 \mu l$ Zellen vor dem Angleichen der Warburg-Gefäße; Gasraum: Luft, Temp. $37^\circ C$, ausgewertete Zeit: 20. bis 80. Minute.

Das Diagramm zeigt, daß durch LHPO Atmung und anaerobe Glykolyse gleich stark gehemmt werden. Die Halbwertsdosis liegt bei $0,38 g/l$, das entspricht einer rund 10^{-3} molaren Lösung*. Die Feststellung einer gleich starken Hemmung von Atmung und Gärung ist insofern bemerkenswert, als sich damit LHPO in seiner Wirkungsweise nicht nur von den Präparaten von Shuster¹⁹, sondern vor allem auch von H_2O_2 ⁹, E 39²⁰ und Röntgenstrahlen¹⁶ grundsätzlich unterscheidet. Hierauf wird später noch ausführlich zurückzukommen sein.

¹⁹ C. Shuster, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **90**, 423 (1955).

²⁰ H. Holzer, E. Holzer und G. Schultz, Biochem. Z. **326**, 385 (1955).

* Bezogen auf die als Wirkungsträger erkannten C_{18} -Hydroperoxyde, ergibt sich eine Halbwertskonzentration von 4 bis $5 \cdot 10^{-4} m/l$.

Versuchsbedingungen:
Ansatz im Warburg-Kolben:

a) Anaerobe Glykolyse:
1,0 ml doppelt konzentrierter Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer (pH = 7,4, mit 1% Glucose) und 1,0 ml Wasser (bzw. Hemmstofflösung), 0,5 ml isotoner glucosefreier Puffer mit $45 \mu l$ ($= 1,5 \cdot 10^7$ Zellen) im Seitenarm. Start der Reaktion durch Zukippen der Zellen. Gasphase: 95% N_2 + 5% CO_2 , Temp. $37^\circ C$, ausgewertete Zeit: 20. bis 50. Minute.

b) Atmung: 1,0 ml doppelt konzentrierter Krebs-Ringer-Phosphatpuffer (bei Messung der Glucose-Atmung mit 1% Glucose) und 1,0 ml Wasser bzw. Hemmstofflösung, 0,2 ml KOH im Einsatz. Zugabe von 0,5 ml

Um den Einfluß eines Katalasezusatzes auf die festgestellten Hemmaktivitäten zu untersuchen, wurden zu 0,5 g/l LHPO (mit einer Gärungshemmung von 79%) 100 γ Katalase/2,5 ml Gesamtvolumen zugesetzt und 72% Gärungshemmung gemessen. Daraus ergibt sich, daß der Katalasezusatz die Hemmwirkung nicht verringert, in Übereinstimmung mit dem auf S. 454 mitgeteilten Befund, wonach Katalase die Lipidhydroperoxyde in Lösung IV nicht zu zersetzen vermag.

Der unmittelbare Beweis dafür aber, daß die wasserlöslichen Lipidhydroperoxyde der wesentliche Träger der Hemmwirkung auf die Atmung und Gärung der Tumorzellen sind, konnte schließlich durch selektive Reduktion der LHPO und nachträgliche Messung der Hemmaktivitäten erbracht werden.

Hiezu wurde Lösung IV nach *Privett* und *Lundberg*¹¹ mit SnCl_2 in salzsaurer Lösung reduziert, wobei die OOH-Gruppen in Hydroxylgruppen umgewandelt werden, ohne daß sonstige chemische Veränderungen eintreten, wie unter anderem auch aus dem Ultrarotspektrum hervorgeht (Abb. 4, Kurve b). Die OOH- und die OH-Gruppen besitzen im 3 μ -Gebiet die gleiche Absorptionsbande, so daß verständlich wird, daß LHPO und reduzierte Lösung in diesem Gebiet gleiche Absorption aufweisen. Das reduzierte Präparat unterscheidet sich also, soweit die bisherigen Messungen erkennen ließen, vom Ausgangspräparat LHPO nur dadurch, daß es statt der Hydroperoxydgruppen Hydroxylgruppen enthält. Da beide Gruppen auch annähernd gleiche Hydrophilie aufweisen, war diese Änderung für die durch Oberflächeneffekte bedingte biologische Wirkung der Präparate ohne wesentlichen Belang. Damit konnte die Wirkung der Hydroperoxydgruppen durch Differenzmessung ausreichend exakt ermittelt werden. Die Kurven 2 und 3 der Abb. 8 zeigen die ermittelten Dosis-Effekt-Kurven.

Man ersieht daraus eindeutig, daß die Hydroperoxydgruppen die eigentlichen Wirkungsträger im Präp. LHPO sein müssen.

Die auch nach der Reduktion verbleibende geringfügige Hemmwirkung beruht offensichtlich auf dem bereits erwähnten unspezifischen Effekt oberflächenaktiver Fettsäureketten, der auch in den Präp. Vb, VIb, VIa aufgetreten war und natürlich auch bei Lösung IV vorhanden sein muß.

Weiters folgt aus Abb. 8, daß die Hydroperoxydgruppen tatsächlich die Atmung und Gärung gleich stark hemmen.

Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus von Präparat LHPO

Die bisher geschilderten Untersuchungen ergaben, daß LHPO den Zellstoffwechsel zum größten Teil über die Hydroperoxydgruppen hemmt und diese Hemmung durch Katalase nicht beeinflußt wird. Diese Tatsache erscheint verständlich, nachdem gezeigt werden konnte, daß die Hydroperoxydgruppen von LHPO durch Katalase nicht zersetzt werden.

Es ergab sich ferner, daß die Hydroperoxydgruppen von LHPO Atmung und Gärung gleich stark hemmen. Allein aus dieser bemerkenswerten Tatsache kann geschlossen werden, daß der Wirkungsmechanismus von dem des H_2O_2 verschieden sein muß; denn bei H_2O_2 setzt die Atmungshemmung erst bei Konzentrationen ein, die die anaerobe Glykolyse schon nahezu vollständig gehemmt haben²¹. H_2O_2 ist ein spezifisches Glykolysegift, von dem man annehmen muß, daß der wesentliche Teil der Atmungshemmung indirekt durch vollständige Glykolysehemmung bewirkt wird. In Übereinstimmung damit beobachtete man diese Verhältnisse an Ascites- und Hefezellen auch bei allen bisher bekannten reinen Glykolyse-Hemmfaktoren, wie Monojodacetat^{20, 22}, Menadion²³ und Äthyleniminochinonen²⁰. Hiezu muß noch erwähnt werden, daß die genannten Faktoren keineswegs alle an der gleichen Stelle der Glykolysekette angreifen.

Da nun LHPO Atmung und Gärung gleich stark hemmt, kann es sich um kein reines Glykolysegift handeln; es muß vielmehr ein grundsätzlich verschiedener Wirkungsmechanismus vorliegen.

Nach *Holzer* und Mitarbeitern hemmt H_2O_2 die Glykolyse von Ascites-Tumorzellen über eine Verringerung des intrazellulären Diphosphopyridinnucleotid-spiegels⁹. Da Nicotinsäureamid den Abbau von DPN hemmt, gleichzeitig aber auch seine Synthese fördert, wird verständlich, daß die durch H_2O_2 bewirkte Gärungshemmung durch Zugabe von Nicotinsäureamid wieder aufgehoben werden kann. Dies konnten wir auch für den von uns untersuchten Tumorstamm bestätigen.

Wird demnach eine Glykolysehemmung durch Zusatz von Nicotinamid nicht aufgehoben, dann kann sie nicht durch eine Verringerung von DPN bewirkt worden sein, wie z. B. bei Monojodacetat als Hemmstoff gefunden werden konnte⁹.

Die durch LHPO bewirkte Glykolysehemmung wird nun durch Zusatz von Nicotinsäureamid tatsächlich nicht beeinflusst: Eine Lösung von 0,5 g/l LHPO (Gärungshemmung 81%) zeigte nach Zusatz von Nicotinsäureamid ($2 \cdot 10^{-2}$ m/l, Gesamtvolumen 2,5 ml) eine Gärungshemmung von 80%. Dies macht es außerordentlich unwahrscheinlich, daß LHPO über eine Senkung des DPN-Spiegels die Gärung hemmt, was anschließend durch direkte enzymatische Messungen eindeutig geklärt werden konnte. Hiezu wurde zunächst an Ascites-Tumorzellen eine Eichkurve mit H_2O_2 als Vergleichsbasis erstellt.

Im wesentlichen wurde dabei nach den Angaben von *Holzer*²⁴ gearbeitet und die Volumina für unsere Versuchsbedingungen geringfügig modifiziert:

²¹ G. Schatz, Dissertation Universität Graz (1960).

²² H. Holzer et al., *Biochem. Z.* **327**, 195 (1955).

²³ H. Tiedemann, H. Risse und J. Born, *Z. Naturforschg.* **13b**, 157 (1958); L. Kiesow, *Z. Naturforschg.* **14b**, 490 (1959).

²⁴ H. Holzer, P. Glogner und G. Sedlmayr, *Biochem. Z.* **330**, 59 (1958).

Der vierzehnfache Inhalt eines Warburg-Kolbens wurde 30 Min. bei 37° C im Brutschrank streng anaerob unter gelegentlichem Umschütteln inkubiert. Darauf wurden 5 ml entnommen und dann in zwei Parallelbestimmungen im Warburg-Apparat die anaerobe Glykolyse gemessen. Von den verbleibenden $12 \cdot 2,5 \text{ ml} = 30 \text{ ml}$ Lösung wurden die darin enthaltenen 540 μl Zellen abzentrifugiert und zweimal mit isotoner Kochsalzlösung gewaschen. Durch Zusatz von 2 ml 6proz. HClO_4 wurde enteiweißt, das Sediment abzentrifugiert und der Überstand mit KOH neutralisiert. Nachdem auf ein Endvolumen von 3 ml aufgefüllt worden war, wurde der KClO_4 -Niederschlag abzentrifugiert und 2 ml der überstehenden klaren Lösung in den optischen Test eingesetzt.

Optischer Test: 0,1 ml 96% Äthanol, 0,04 ml 1 m Semicarbazid-HCl, 0,02 ml 2 n NaOH 2,0 ml Testlösung, 3,34 ml Glykokoll-Na-Pyrophosphatpuffer, pH = 8,7 (0,2 m). Vermessen wird die Extinktion bei 366 $\mu\mu$ gegen Wasser vor und nach Zusatz von 0,01 ml (ca. 0,03 mg Enzymprotein) Alkoholdehydrogenase (Fa. Boehringer). Die Extinktionsänderung ist proportional der ursprünglich vorhandenen

DPN-Menge. Für die Absolutberechnung der DPN-Mengen wurde der von Bücher²⁵ angegebene Extinktionskoeffizient verwendet. Die lineare Abhängigkeit der Extinktionsänderung von der eingesetzten DPN-Menge wurde mit einem DPN-Präparat kontrolliert.

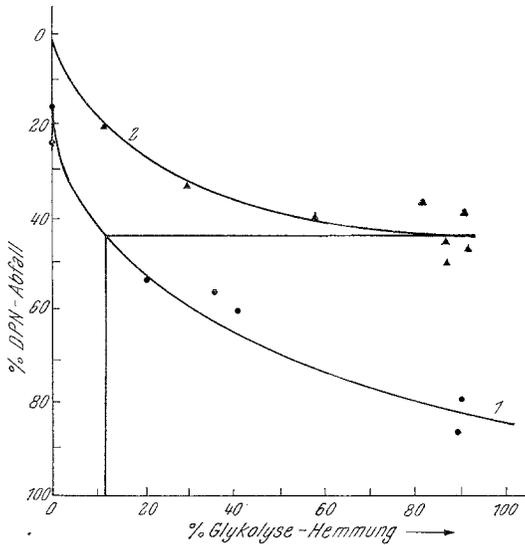


Abb. 9. Hemmung der anaeroben Gärung von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen in Abhängigkeit vom DPN-Abfall: Kurve 1: mit Präp. LHPO Kurve 2: mit H_2O_2

Abb. 9 zeigt die Abhängigkeit der Glykolysehemmung vom DPN-Abfall, wobei sich der von Holzer⁹ ermittelte Wert der dargestellten Kurve ausgezeichnet einfügt. Da Röntgenstrahlen die Glykolyse über intermediär gebildetes Wasserstoffperoxyd hemmen, ist in diesem Zusammenhang eine von Maass und Mitarbeitern²⁶ an Yoshida-Ascites-Zellen für Röntgenstrahlen erstellte Kurve von Interesse, die erwartungsgemäß im wesentlichen den gleichen Verlauf zeigt. Die Kurve 1 der Abb. 9 ergibt somit, daß der intrazelluläre DPN-Spiegel um mindestens 40 bis 50% sinken muß, um eine deutlich meßbare Hemmung der Glykolyse zu bewirken. Kurve 2

²⁵ Informationsblatt (1955) der Fa. C. F. Boehringer.

²⁶ H. Maass, G. Rathgen, H. Künkel und G. Schubert, Z. Naturforschg. 13b, 735 (1958).

der Abb. 9 wurde an Ascites-Zellen in gleicher Weise mit LHPO erhalten. Es zeigt sich, daß auch LHPO eine Senkung des intrazellulären DPN-Spiegels bewirkt. Nach der Feststellung, daß Nicotinamid die durch LHPO bewirkte Gärungshemmung nicht beeinflußt, mag dies zunächst unverständlich erscheinen. Der quantitative Vergleich mit der mit H_2O_2 erhaltenen Kurve 1 macht den Befund jedoch plausibel: Kurve 2 ergibt nämlich, daß in diesem Fall bei einer Senkung des DPN-Spiegels um 40% die Glykolyse bereits nahezu vollständig gehemmt ist. Daraus kann gefolgert werden, daß der Hemmeffekt von LHPO tatsächlich praktisch zur Gänze über einen anderen Wirkungsmechanismus ablaufen muß.

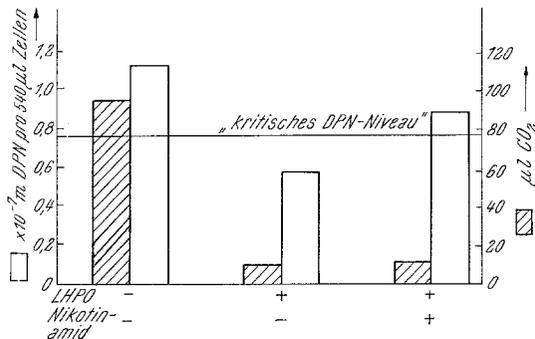


Abb. 10. DPN-Niveaus und Glykolysehemmung bei Ehrlich-Ascites-Tumorzellen unter Einfluß von Präp. LHPO und Nicotinamid

Dies konnte auch durch folgenden Versuch deutlich gemacht werden: Die Versuche mit H_2O_2 (Abb. 9, Kurve 1) ergaben, daß der DPN-Spiegel um mindestens 40 bis 50% absinken muß, damit die Glykolyse merklich gehemmt wird; dieser Wert sei hier als „kritisches DPN-Niveau“ bezeichnet. Auch unter dem Einfluß von Präp. LHPO sinkt der DPN-Spiegel unter dieses „kritische Niveau“, wie die Kurve 2 der Abb. 9 zeigt. Durch Nicotinamid läßt sich, wie bei den Versuchen mit H_2O_2 , diese DPN-Senkung verhindern, wie Abb. 10 veranschaulicht. In diesem Fall wird aber die bestehende Glykolysehemmung, im Gegensatz zu den Versuchen mit H_2O_2 , nicht wesentlich verringert. Auch diese Tatsache, daß man also den DPN-Spiegel der gehemmten Zellen durch Nicotinamid wieder über das „kritische Niveau“ heben kann, ohne daß die Glykolysehemmung wesentlich verringert wird, zeigt, daß die DPN-Senkung bei der Wirkung von LHPO nur eine unwesentliche Nebenerscheinung ist, die auch durch allgemeine Abbauvorgänge in der geschädigten Zelle bewirkt werden könnte¹⁹.

Zusammenfassend stehen also als Erklärungsmöglichkeit für die beobachtete Glykolysehemmung durch LHPO folgende Effekte zur Diskussion:

Effekt I: Senkung des intrazellulären DPN-Niveaus (wie bei H_2O_2). Dieser Effekt, der von einem ganz bestimmten Teil des Moleküls, nämlich den Hydroperoxydgruppen, hervorgerufen wird, könnte zwar im

Prinzip die Glykolyse der Tumorzellen hemmen. Tatsächlich kommen hier jedoch noch zwei weitere Effekte hinzu, die wesentlich stärker sind und den sehr geringen Effekt der DPN-Senkung praktisch verdecken:

Effekt II: Der „Lipideffekt“: Die Hydroperoxydgruppen sind in LHPO an eine relativ große Fettsäurekette gebunden, die selbst durch Oberflächeneffekte glykolysehemmend wirkt. Das Ausmaß dieses unspezifischen „Lipideffektes“ kann aus Abb. 8 abgelesen werden, da im reduzierten LHPO nach Zerstörung der Hydroperoxydgruppen nur noch der reine Lipideffekt übrig bleiben muß.

Effekt III: Ein weiterer Effekt der Hydroperoxydgruppen von LHPO, der aber mit dem DPN-System nichts zu tun hat. Wie Abb. 8 zeigt, entfalten die in LHPO anwesenden Hydroperoxydgruppen zusätzlich zum Lipideffekt starke Hemmwirkungen. Diese können durch Nicotinamid nicht aufgehoben werden und können daher auch nicht auf einem DPN-Abfall beruhen. Der Mechanismus dieses von der Wirkung des Wasserstoffperoxyds völlig verschiedenen Hemmeffektes soll nun kurz diskutiert werden.

Effekt I erweist sich neben den viel stärkeren Effekten II und III als praktisch bedeutungslos. Zur Diskussion des neu entdeckten Hydroperoxyd-effektes III wird man vor allem die oxydierende Wirkung der Hydroperoxydgruppen von LHPO in Betracht ziehen müssen. Beschränkt man sich zunächst auf die Hemmung der Gärung, so wäre eine Oxydation von Ferment-SH-Gruppen (Triosephosphatdehydrogenase!) eine plausible Erklärungsmöglichkeit. Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß LHPO krist. Triosephosphatdehydrogenase vollständig inaktiviert. Halbwerts-konz.: $1,8 \cdot 10^{-5}$ m/l²⁷,*.

Daß die vorliegenden Lipidhydroperoxyde tatsächlich SH-Gruppen schnell und vollständig oxydieren, wurde mit Cystein bewiesen. Die Oxydation der SH-Gruppen wurde dabei an Hand der Abnahme der positiven Reaktion mit Nitroprussidnatrium kolorimetrisch gemessen. Bei der Reaktion wurde im Gegensatz zu den biologischen Bedingungen das Cystein im Überschuß verwendet, um eine Weiteroxydation der Disulfidgruppen zu verhindern. Nach 45 Min. waren bei unseren Versuchsbedingungen bereits weit mehr als die Hälfte der ursprünglich anwesenden Hydroperoxydgruppen reduziert worden, was indirekt über die Oxydation der SH-Gruppen gemessen werden konnte (Abb. 11). Im Vergleich zu H₂O₂ erfolgte die Oxydation durch das LHPO-Präp. etwas schneller.

Versuchsbedingungen: Farbreaktion mit Nitroprussidnatrium in alkal. Lösung²⁸; 1 ml einer ca. 0,01 m Cystein-Lösung wird mit 5 ml Glykokollpuffer

²⁷ M. Taufer, Dissertation Universität Graz.

²⁸ Houben-Weyl, Methoden Organ. Chem. 2, 586 (4. Aufl.).

* Hierüber wird M. Taufer demnächst ausführlich berichten.

von pH 10,4, 1 ml 1 m KCN-Lösung in Glykokollpuffer und 2 ml Nitroprussidnatrium-Lösung (0,6 g in 10 ml Wasser) versetzt. Auf 50 ml auffüllen und sofort kolorimetrieren. Die entstandene gefärbte Verbindung besitzt ein

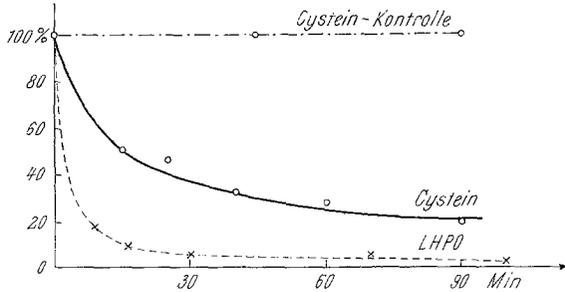


Abb. 11. Oxydation der SH-Gruppen von l-Cystein durch Präp. LHPO und H_2O_2

Extinktionsmaximum bei 530 $m\mu$. Daher wurden alle Messungen mit Schichtdicke 1 cm bei dieser Wellenlänge durchgeführt. Die erhaltene Eichkurve bringt Abb. 12.

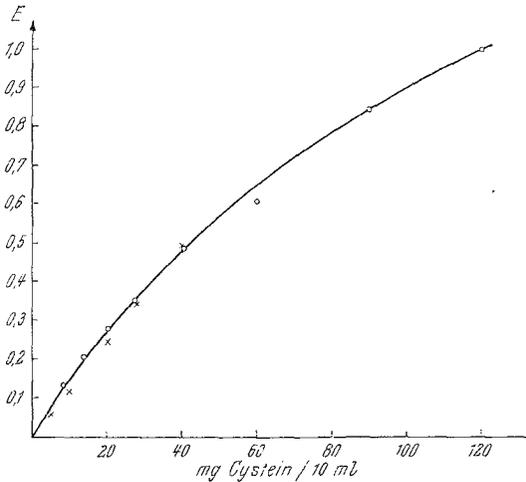


Abb. 12. Zusammenhang zwischen der bei 530 $m\mu$ gemessenen Extinktion alkalischer Cystein-Nitroprussidnatrium-Mischungen und dem Cysteingehalt der Mischungen

Grundsätzlich ist es also möglich, daß die Hemmwirkung von LHPO auf die Gärung von Aszites-Tumorzellen mit einer Inaktivierung des oxydationsempfindlichen SH-Enzyms Triosephosphatdehydrogenase zu erklären sein wird.

Schließlich könnte man auch die von der Glykolysehemmung offenbar getrennte Atmungshemmung durch eine Oxydation von SH-Gruppen durch LHPO erklären. Hier kommt vor allem die funktionelle SH-Gruppe

des Coenzym A in Betracht, deren Oxydation zu einer Hemmung des Zitronensäurezyklus führen müßte. Aber auch der zweite Hauptweg der Zellatmung, der sogen. Glucosephosphat-Shunt, wäre über die neuerdings in der Glucose-6-phosphatdehydrogenase entdeckte funktionelle SH-Gruppe²⁹ blockierbar. Infolge der wesentlich komplizierteren Verhältnisse bei der Zellatmung wird man jedoch hier auch noch andere Möglichkeiten in Betracht ziehen müssen.

Wirkung von Präp. LHPO auf Hefezellen

Schließlich erschien es interessant, die Wirkungen des wasserlöslichen LHPO-Präparates auf Hefe zu untersuchen.

Bekanntlich entspricht dieser Mikroorganismus in seinen wichtigsten Stoffwechselreaktionen den tierischen Zellen und wird als partieller Anaerobier geradezu als Modell für die Tumorzelle angesehen³⁰. Im wesentlichen Unterschied aber zu den *Ehrlich*-Ascites-Tumorzellen weist die Hefezelle einen beträchtlichen Gehalt an Katalase auf³¹. Dies zeigte sich auch bei dem von uns verwendeten Stamm bei Inkubation der Zellen mit H_2O_2 und Messung des freigesetzten Sauerstoffes.

Tabelle 3. Von Hefezellen zersetztes Wasserstoffperoxyd
Normaler Gärtest. Gasraum Luft, Medium glucosefrei, Zusatz von
 $3,6 \cdot 10^{-6}$ Mol $H_2O_2 = 46 \mu l O_2$.

	20 Min.	%	40 Min.	%
Entwickelte Menge O_2 in μl	35	76	44	96

Da somit das H_2O_2 bei seinem Eindringen in die Zelle fortlaufend zersetzt wird, wird die für die Hemmwirkung erforderliche Schwellenkonzentration nicht erreicht und daher kann auch H_2O_2 die Glykolyse der Hefe nicht hemmen, wovon wir uns bis zu Konzentrationen von $4 \cdot 10^{-3}$ m/l H_2O_2 überzeugten.

Auch die enorme Resistenz der Hefezelle gegenüber Röntgenstrahlen³² würde damit verständlich, wenn man, in Analogie zu den Asciteszellen, annimmt, daß die Strahlen die Glykolyse über intermediär gebildetes H_2O_2 hemmen. Der hohe Katalasegehalt der Hefezelle bewirkt eine Zerstörung des gebildeten H_2O_2 und verhindert damit eine strahlenbedingte Hemmung der Gärung.

²⁹ *H. Scharfschwerdt und S. Rapoport, Naturwiss. 47, 204 (1960).*

³⁰ *L. Kiesow, Z. Naturforschg. 14b, 224 (1959).*

³¹ *J. Takalay, U. S. P. 2 786 038, März 1957; M. Frazer, J. Gen. Physiol. 38, 515 (1955).*

³² *H. Engelhardt, K. Schneewis und H. Bülow, Z. Naturforschg. 14b, 152 (1959).*

Dagegen dürfte vom Präp. LHPO sehr wohl eine Hemmwirkung erwartet werden, nachdem im vorangegangenen Abschnitt gezeigt worden war, daß Hydroperoxydgruppe und Hemmaktivität gegenüber Katalase resistent sind.

Die folgende Tab. 4, die Mittelwerte aus je drei Bestimmungen enthält, ergibt, daß diese Erwartung durchaus zutrifft:

Tabelle 4

	0,15 g/l LHPO	0,15 g/l LHPO reduz.	0,33 g/l LHPO	0,33 g/l LHPO reduz.
Gärungshemmung	67	19	96	50

Verwendet wurde handelsübliche Backhefe der Fa. Reininghaus, Graz. Messung der anaeroben Gärung: Je Kölbchen 2,5 ml doppelt konzentrierte Nährlösung nach *Braun-Flexner* (pH = 4,0), 2,0 ml Wasser oder Zusätze. Endkonzentration an Hefe: 0,06% (Naßgewicht). Endkonzentration an Glucose 1,1%, Temp. 37° C, Versuchsdauer: 20 bis 120 Min. Für einige Versuche wurden 0,3 m Phosphatpuffer vom pH = 5,5 gewählt. Die Zahlen der Spalten 2 und 4 der Tab. 4 zeigen, daß Präp. LHPO die Gärung der Hefe wirksamer hemmt als die der Tumorzellen; die Halbwertskonzentration liegt hier unter ca. $4 \cdot 10^{-4}$ m/l. Zur Kontrolle wurde auch die Wirksamkeit des mit SnCl₂ reduzierten Präparates geprüft (vgl. die Zahlen der Spalten 3 und 5 der Tab. 4); in vollständiger Analogie zu den Befunden mit Tumorzellen tritt auch hier eine, wenn auch viel schwächere Hemmaktivität in Erscheinung, die wieder dem sogen. Lipideffekt (Effekt II, s. S. 459) zuzuordnen ist.

Dieser lag auch der seinerzeit mit den Präparaten V b und VI a (Schema 1) bei Hefe festgestellten Hemmwirkung zugrunde^{14, 33}.

Ob der mit einem organischen Hydroperoxyd bei Hefe erstmalig erzielte Hemmeffekt dem gleichen Wirkungsmechanismus folgt, wie bei den vorstehend untersuchten Tumorzellen, ist wahrscheinlich, derzeit aber noch nicht experimentell erwiesen.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Rockefeller-Foundation, New York, der Österreichischen Akademie der Wissenschaften und des Österreichischen Krebsforschungsinstitutes, Wien, sowie der Nitritfabrik GmbH & Co., Feldkirchen bei München, durchgeführt, wofür den genannten Institutionen und Stellen hiermit verbindlichst gedankt werden soll.

³³ E. Schauenstein und G. Schatz, Mh. Chem. **90**, 118 (1959).