

Über die Reaktion von $\Delta^{9,12}$ -Linolsäureester in Wasser, 8. Mitt.:
 n-Amylhydroperoxid, eine Substanz aus dem Präparat LHPO
 mit Hemmwirkungen auf Tumorzellen

Von

H. G. Jaag, M. Taufer und E. Schauenstein

Aus der Lehrkanzel für Biochemie der Universität Graz

Mit einer Abbildung

(Eingegangen am 29. September 1964)

Nachdem in einer früheren Mitteilung¹ über die Isolierung von 4-Hydroxy-octenal aus dem Mischpräparat LHPO berichtet wurde, soll

Tabelle 1a. Befunde an der nativen Substanz 23

IR-Spektrum:	Bande bei	Charakt. f. -OOH	
	1,45 μ		
	2,07 μ		
	(in CCl ₄)		
	2,95 μ	-O-O-H * asso.	
Unverdünnte Substanz	} Dublett 3,4—3,5 μ	-CH ₂ -(Valenz)	
		6,75; 6,85; 6,95 μ	-CH ₂ -(Deform.); Triplett charakt. f. prim. Hydroperoxyde
		7,25 μ	-CH ₃ (Deform.)
		13,75 μ	-(CH ₂)- (Deform.) $n = 4$
Polarogramm:	$E_{1/2} = -1,38$, charakt. f. -OOH (in Benzol—Methanol, LiCl, 0,3 m)		

Peroxidzahl (n. Sully): $\bar{A}G = 104,5$

* Da im nahen IR, im Frequenzgebiet der -OH von Alkoholen, keine Bande auftritt, kann die 2,95 μ -Bande eindeutig nur der -OOH zugeordnet werden.

¹ E. Schauenstein, H. Esterbauer, H. G. Jaag und M. Taufer, Mh. Chem. 95, 180 (1964).

im folgenden das erste aus dem Mischpräparat isolierte Hydroperoxid und seine Wirkungen auf die Tumorzellen beschrieben werden.

Es handelt sich um die in Komponente 2 enthaltene Substanz 23, deren aktiver Sauerstoff rund 20% des gesamten Persauerstoffgehaltes des Mischpräparates ausmacht^{2, 3}.

Über die säulenchromatographische Isolierung der Substanz 23 wurde bereits a. a. O. berichtet⁴. Die analytischen Daten der nativen Substanz und ihrer Derivate sind in der Tab. 1 zusammengestellt⁵.

Daraus ergibt sich, daß Substanz 23 als *n*-Amylhydroperoxid anzusehen ist. Nach Reduktion der —O—O—H-Gruppe muß demnach *n*-Pentanol-(1) entstehen, das in Form seines *NABS*-Esters als gut charakterisierbares Derivat die Daten der Tab. 1b ergibt.

Tabelle 1b. Befunde am Reduktionsprodukt der Substanz 23, nachdem die Hydroxylgruppe mit 4,4'-Nitroazobenzol-carbonsäure* verestert wurde

Schmp.	114 °C			
UV-Spektrum ...	Max. bei 30300 v'; $\epsilon' = 92$, daraus			
MG	336 ± 9, daraus			
MG _{Subst. 23}	99 ± 9			
R_f	0,540 ± 0,010 [f. <i>NABS</i> -Ester von Pentanol-(1)]			
	$R_f = 0,540 \pm 0,015$			
Elementaranalyse %C	H	N	O	
	gef. 63,5	5,67	11,7	19,0
C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄ , ber.	63,3	5,61	12,31	18,75 [<i>NABS</i> -Ester von Pentanol-(1)]

Daraus konnte eindeutig geschlossen werden, daß es sich um ein *n*-Amylhydroperoxid handelt. Wenn sich seine Entstehung — höchstwahrscheinlich aus dem $\Delta^9, 11$ -Linolsäure-13-hydroperoxid — nach der Radikalspaltungstheorie auch gut erklären läßt, so war es bisher als sekundäres Autoxydationsprodukt des Linolsäureesters in Substanz noch nie gefaßt worden.

Dies gelingt offenbar erst, wenn man die Autoxydation in überschüssiger wäßriger Phase ablaufen läßt, wobei es zur Anreicherung speziell der wasserlöslichen Autoxydationsprodukte (Mischpräp. LHPO) in der Wasserphase kommt.

Das komplex zusammengesetzte Mischpräparat hatte bekanntlich auffallende Hemmeffekte gegenüber *Ehrlich*-Ascites-Tumorzellen

* Abgekürzt *NABS*.

² *E. Schauenstein* und *H. Esterbauer*, Mh. Chem. **94**, 164 (1963).

³ Dieselben, *ibid.* **94**, 998 (1963).

⁴ *W. Klöpffer*, *H. Esterbauer* und *E. Schauenstein*, Fette, Seifen, Anstrichmittel, 1964, im Druck.

⁵ *W. Klöpffer*, Dissertat. Univ. Graz 1963.

(*EATZ*) gezeigt⁶; sie bestanden in einer Hemmung der anaeroben und aeroben Glykolyse, der Atmung, Senkung des *DPN*-Spiegels, sowie des Wachstums vorbehandelter Tumorzellen nach Implantation in gesunde Tiere⁷. Während der Mechanismus der Atmungshemmung bis jetzt noch nicht geklärt werden konnte, gelang der Nachweis, daß die Gärungshemmung in erster Linie durch eine irreversible Inaktivierung der SH-Enzyme Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und Lactat-Dehydrogenase* der Zelle bewirkt wird, während die Senkung des *DPN*-Spiegels für das Ausmaß der Gärungshemmung nur von unwesentlicher Bedeutung ist⁸.

Die geschilderten Hemmeffekte wurden im wesentlichen dem im Mischpräparat enthaltenen aktiven Sauerstoff, d. h. den Hydroperoxiden zugeordnet. Da der aktive Sauerstoff von Substanz 23 rund 20% des aktiven Sauerstoffgehaltes des Mischpräparates ausmacht³, so ist zu erwarten, daß die reine Substanz alle genannten Hemmeffekte zeigt.

Experimentelle Ergebnisse an *EATZ*

Zu den Versuchen wurden gesunde *R*-Albino-Mäuse mit einem Gewicht von 20 bis 30 g verwendet. Es wurden den Tieren jeweils 20 Mio Tumorzellen i. p. verimpft. Die für die Versuche eingesetzten Zellen wurden den Tieren am 8. bis 11. Tag nach der Transplantation steril entnommen. Hämorrhagischer Ascites wurde verworfen. Die Ascites-Zellsuspension wurde abzentrifugiert (600 g), das Serum verworfen, die Zellen 3mal mit eiskalter physiol. Kochsalzlösung gewaschen und schließlich im jeweiligen Puffer suspendiert. In einem aliquoten Teil dieser Zellsuspension wurde im Hämatokriten die Zelldichte bestimmt und durch mehrere Zellzählungen auf Zellen pro ml umgeiecht (45 μ l entsprechen $1,5 \cdot 10^7$ Zellen). Die Zellen wurden mit steigenden Hemmstoffmengen 30 Min. aerob bei 37°C vorinkubiert und anschließend die jeweiligen Stoffwechselforgänge gemessen.

a) Anaerobe Gärung:

Ansatz eines Warburgkolbens.

Hauptraum: 1,0 ml isotoner *Krebs*—*Ringer*-Bicarbonatpuffer mit 45 μ l.

Zellen + 1,0 ml physiol. Kochsalzlösung bzw. Hemmstofflösung.

Seitenarm: 0,5 ml isotoner Glucosepuffer (2%).

Das Ergebnis ist in Kurve a der Abb. 1 dargestellt.

b) Atmung:

Hauptraum: 1,0 ml isotoner *Krebs*—*Ringer*-Phosphatpuffer mit 45 μ l.

Zellen + 1,0 ml physiol. Kochsalzlösung (bzw. Hemmstofflösung).

Seitenarm: 0,5 ml isotoner Glucosepuffer (1,6%).

Einsatz: 0,2 ml 10proz. KOH.

Die Atmungshemmung ist aus Kurve b der Abb. 1 ersichtlich.

* Abgekürzt *GAPDH* bzw. *LDH*.

⁶ E. Schauenstein, G. Schatz und M. Taufer, Z. Krebsforsch. **64**, 465 (1962).

⁷ J. Zangger, M. Ratzenhofer und E. Schauenstein, ibid. **64**, 473 (1962).

⁸ E. Schauenstein, M. Taufer und G. Schatz, Mh. Chem. **93**, 544 (1962).

c) *Aerobe Gärung:*

Direkte Methode: 2-Gefäß-Methode (A + B).

A: Ansatz wie bei der anaeroben Gärung, } Gemessen wird unt. Sauerstoff.
 B: Ansatz wie bei der Atmung. }

Kurve *c* der Abb. 1 gibt den Verlauf der Gärungshemmung wieder.

Läßt man das Hydroperoxid unter Ausschluß des Luftsauerstoffes auf die Zellen einwirken, so ergibt sich eine sehr beträchtliche Wirkungsminderung, wie Kurve *d* der Abb. 1 veranschaulicht.

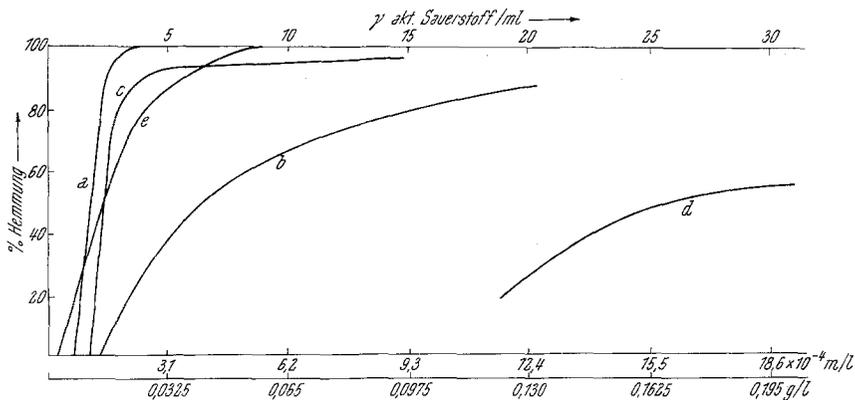


Abb. 1. Kurve *a*: Anaerobe Gärung nach aerober Vorinkubation
 Kurve *b*: Atmung
 Kurve *c*: Aerobe Gärung nach aerober Vorinkubation
 Kurve *d*: Anaerobe Gärung nach anaerober Vorinkubation
 Kurve *e*: Aktivitätsmessung an *GAPDH* und *LDH*

Wirkungsmechanismus der Gärungshemmung

Hiezu wurden *EATZ* mit Substanz 23 inkubiert und die Zellen mit Aceton in der üblichen Weise aufgeschlossen, daraus der Enzymextrakt gewonnen und darin die Aktivität von *GAPDH* und *LDH* bestimmt. Wie aus Kurve *e* der Abb. 1 ersichtlich, ergab sich eine vollkommene Inaktivierung beider Dehydrogenasen bei Konzentrationen von ca. $5 \cdot 10^{-4}$ m/l.

Die Feststellung, daß die Enzymblockaden bei Konzentrationen eintreten, bei denen die Gärung vollständig gehemmt ist, läßt bereits darauf schließen, daß die Enzym-Inaktivierung am Zustandekommen der Gärungshemmung zumindest maßgeblich beteiligt ist.

Einen weiteren Hinweis dafür gab auch das Verhalten des intrazellulären *DPN*-Spiegels gegenüber Substanz 23:

Substanz 23 senkt nach 30 Min. aerober Vorinkubation den *DPN*-Spiegel der Zellen.

Tabelle 2. Hemmung der anaeroben Glykolyse in Abhängigkeit von der *DPN*-Senkung*

Glykolysehemmung	<i>DPN</i> -Abfall
28%	33%
73%	50%
94%	75%

Tabelle 3. Einfluß von Nicotinamid auf die Glykolysehemmung

	Subst. 23	Subst. 23 + Nicotinamid
	0,01 g/l	2 · 10 ⁻² m/l
% Gärungshemmung	56	52
	0,032 g/l	2 · 10 ⁻² m/l
% Gärungshemmung	100	100

Daraus kann geschlossen werden, daß die Glykolysehemmung durch Substanz 23 in erster Linie auf die oben genannte oxydative Enzym-inaktivierung zurückzuführen und die Senkung des *DPN*-Niveaus nicht von entscheidendem Einfluß sein dürfte.

Der Wirkungsmechanismus der Atmungshemmung konnte bisher noch nicht geklärt werden, doch wäre auch hier eine Oxydation der funktionellen SH-Gruppe des Coenzym A, ferner aber auch eine Schädigung der Cytochrome¹⁰ in Betracht zu ziehen.

Aufschlußreich ist der Vergleich der Hemmaktivitäten des Mischpräparates LHPO⁶, der daraus abgetrennten, das Hydroperoxid 23 enthaltenden Hauptfraktion A und schließlich des reinen Hydroperoxids 23.

Bezieht man die Hemmaktivitäten auf die Gewichtseinheit Substanz, bzw. aktiven Sauerstoffes, so erhält man folgende Zahlen:

Tabelle 4. Gärungshemmung

	100% Hemmung	
	ab	ab
Mischpräparat LHPO ⁶	0,3 g/l	6 γ O/ml
Hauptfraktion A	0,125 g/l	5 γ O/ml
Hydroperoxid 23	0,0325 g/l	5 γ O/ml

Die Werte der Spalte 2 der Tab. 4 demonstrieren zunächst qualitativ die schrittweise Anreicherung der Substanz 23. Weiters entsprechen die

* Die Methode der *DPN*-Bestimmung wurde bereits ausführlich beschrieben⁹.

⁹ E. Schauenstein, G. Schatz und G. Benedikt, Mh. Chem. **92**, 442 (1961).

¹⁰ A. Tappel, D. Brown, H. Zalkin und P. Maier, J. Amer. Oil Chemist's Soc. **38**, 5 (1961).

auf Gramm bezogenen Dosen von Fraktion A und Hydroperoxid 23 tatsächlich dem gewichtsmäßigen Anteil des Hydroperoxids an der Hauptfraktion. Die Werte der Spalte 3 zeigen, daß die gärungshemmende Wirkung des Mischpräparates tatsächlich ein Peroxideffekt ist, wobei allerdings über die Beteiligung der einzelnen Hydroperoxide zunächst noch nichts ausgesagt werden kann.

Tabelle 5. Atmungshemmung

	90 % Hemmung	
	ab	ab
Mischpräparat LHPO ⁶	0,4—0,5 g/l	9—10 γ O/ml
Hauptfraktion A	0,2 g/l	8 γ O/ml
Hydroperoxid 23	0,13 g/l	20 γ O/ml

Diese Werte zeigen nunmehr, daß in Fraktion A auch nicht peroxidische atmungshemmaktive Stoffe vorhanden sein müssen, deren Wirkung in Fraktion A neben der Hydroperoxidwirkung zum Ausdruck kommt.

Zu einer ersten Orientierung über das Verhalten von Substanz 23 in vivo wurde die Substanz an gesunde Mäuse intraperitoneal injiziert. Dabei wurde festgestellt, daß eine tägliche Dosis von 650 γ durch 10 Tage hindurch ohne ersichtliche Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes der Tiere verabreicht werden konnte.

Ferner wurde zur Stabilitätskontrolle bei anderen Tieren 10 Min. nach Verabreichung der genannten Dosis der Bauchraum des lebenden Tieres punktiert, wobei 0,2 bis 0,4 ml Flüssigkeit erhalten werden konnten, deren Gehalt an aktivem Sauerstoff nach der Methode von *L. Hartman*¹¹ ermittelt wurde. Es ergab sich, daß rund 20%¹² der verabreichten Menge im Punktat wiedergefunden werden konnten.

Versuche über eine therapeutische Verwertbarkeit dieser Befunde sind im Gange.

Unsere Untersuchungen wurden teilweise von einer Forschungsbeihilfe CA 06617-01 des Public Health Service, National Cancer Institute, unterstützt.

¹¹ *L. Hartman*, *J. Sci. Food Agric.* **5**, 476 (1954).

¹² *L. Auböck*, Dissertat. Univ. Graz.