

# Hämaktivierte Oxidationen mit dem Chlorit-Sauerstoff-Komplex „TCDO“ (OXOFERIN®) – eine Übersicht

Heme-Activated Oxidations by the Chlorite-Oxygen Complex “TCDO” (OXOFERIN®)

Erich F. Elstner

Biochemisches Labor, Institut für Botanik und Mikrobiologie, Technische Universität München, D-8000 München 2, Arcisstraße 21, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **43c**, 893–902 (1988); received March 4, 1988

Chlorooxygen Compounds, Activated Oxygen, Hydrogen Peroxide, Biological Oxidants, Fenton Oxidants

Several chlorooxygen compounds, hydrogen peroxide and reducing molecules in the presence of chelated iron (Fenton systems) are oxidants of biological relevance. These compounds are either produced in living tissues or are in use as disinfectants or drugs. Tetrachlorodecaoxide as the active principle in the drug OXOFERIN® can be differentiated from the above mentioned oxidants by means of simple biochemical test systems where different activators and detector molecules are used.

## Einleitung

Die aerobe Zelle bräuchte keine „antioxidative Strategie“ wenn nicht zahlreiche Oxidantien im Rahmen des regulierten Metabolismus entstehen würden: dazu gehören das Superoxid, Wasserstoffperoxid, die sehr reaktionsfähigen OH· und Alkoxy-Radikale, Peroxyradikale, der reaktionsfreudige Singulett-Sauerstoff sowie Chlorsauerstoffverbindungen wie zum Beispiel das Hypochlorit. Unter bestimmten Bedingungen können auch zelluläre Reduktionsmittel wie zum Beispiel Ascorbinsäure oder Sulfhydrylgruppen in Aminosäuren (Cystein, Glutathion) auto-oxidieren.

Gifte wie das Herbizid Paraquat sind Sauerstoffreduktantien, die an bestimmte Enzymsysteme anknüpfen und Superoxid sowie Wasserstoffperoxid produzieren und dadurch die aerobe Zelle schädigen oder töten [1–6]. Vom oxidierenden Potential bestimmter Chlorsauerstoffverbindungen hat die Hygiene Gebrauch gemacht: die unterchlorige Säure (deren Salze wie z. B. NaOCl) und Chlorate sind in der Hygiene als antiseptische Putz- und Waschmittel seit langer Zeit im Einsatz. Das Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel ist ebenso wie das Kaliumpermanganat als Oxidans in vielen Fällen heute noch als Wundsäuberungsmittel im Gebrauch. Vor einigen

Jahren wurde ein neues Heilmittel, OXOFERIN®, beschrieben, welches einen Chlorsauerstoffkomplex („TCDO“) als aktive Komponente enthält.

In zahlreichen klinischen Studien wurde belegt, daß diese Verbindung den Heilungsprozeß von schwer heilenden Wunden stark beschleunigen kann [7–9]. Wir haben kürzlich gezeigt, daß „TCDO“ nur ein sehr schwaches Oxidationsmittel ist. In Anwesenheit bestimmter Häm-Verbindungen jedoch wandelt sich das „TCDO“ in ein mittelstarkes Oxidans um, das in seiner Oxidationskraft vergleichbar ist mit dem „Compound I“, also einem Peroxidase- oder Katalase-Wasserstoffperoxid-Komplex [10, 11]. In dieser Arbeit soll ein Differenzierungsverfahren beschrieben werden, das es erlaubt, verschiedene angesprochene zelluläre oder synthetische Oxidantien voneinander zu unterscheiden und grob einzuordnen.

## Material und Methoden

Abbaukinetiken von Häm-Verbindungen wurden spektralphotometrisch anhand der Abnahme der  $\gamma$ -(Soret-)Bande der Cytochrome im Kontron 810-Spektralphotometer verfolgt. Die Fragmentierung der Indikatormoleküle Methionin, S-Methyl-2-oxo-4-thiobuttersäure [ $\alpha$ -keto-( $\gamma$ -(Methylthio)-buttersäure, KMB] oder Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) wurde anhand der Ethylenfreisetzung gaschromatographisch verfolgt. Diese Methode wurde kürzlich ausführlich beschrieben [10].

Tetrachlordecaoxid (TCDO) wurde von der Firma Oxo-Chemie, Heidelberg, zur Verfügung gestellt.

**Abkürzungen:** ACC, Aminocyclopropan-1-carboxylsäure; KMB, S-Methyl- $\alpha$ -Keto- $\gamma$ -thiobuttersäure; „TCDO“, Tetrachlordecaoxid (Chlorit-Sauerstoff-Komplex).

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen  
0341–0382/88/1100–0893 \$ 0.130/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Alle anderen Substanzen wurden aus dem Chemikalienhandel bezogen.

Es wurden folgende Testsysteme verwendet:

a) Häminabbau

Phosphatpuffer, pH 7,8	50 mM
Hämin	20 $\mu$ M
TCDO	2 mM
$\text{ClO}_2^-$	2 mM
$\text{H}_2\text{O}_2$	2 mM
$\text{H}_2\text{O}$	ad 2,0 ml

Der Häminabbau wurde anhand der Abnahme der Extinktion bei 384 nm (Soret-Bande) spektralphotometrisch verfolgt.

b) Zum Vergleich der Geschwindigkeiten des Häminabbaus durch TCDO oder  $\text{ClO}_2^-$  wurden TCDO mit Serumalbumin oder  $\text{ClO}_2^-$  mit Serumalbumin unterschiedlich lang (s.u.) inkubiert, sodann mit der ACC-Methode auf gleiche Ethylenbildung überprüft (A), anschließend mit Hämin im Photometer inkubiert (B).

Eichung der Oxidantien:

A) Ethylenbildung aus ACC in 20 min.

1) durch Hämin – TCDO: 1064 pmol  $\pm$  11%

2) durch Hämin –  $\text{ClO}_2^-$ : 1063 pmol  $\pm$  13%

Testsystem: Phosphatpuffer, pH 7,8

ACC	2,5 mM
Hämin	50 $\mu$ M
TCDO	0,5 mM
$\text{ClO}_2^-$	0,5 mM

B) Häminabbau:

Testsystem: Phosphatpuffer, pH 7,8

Hämin	50 $\mu$ M
Serumalbumin	0,025 %
TCDO	0,5 mM
$\text{NaClO}_2$	0,5 mM

Serum und TCDO, Serum und  $\text{ClO}_2^-$ : 10, 30, 120 min oder 18 h Inkubation; danach Messung des Einflusses auf den Häminabbau bzw. die ACC Oxidation.

C) Serotoninoxidation: Verlust der Absorption bei 275 nm.

Testsystem:

Phosphatpuffer, pH 7,8, 100 mM

Serotonin	50 $\mu$ M
TCDO	1,5 mM
Hämin	50 $\mu$ M
$\text{H}_2\text{O}$	ad 3 ml

## Ergebnisse

### 1. Die Oxidation von Häm-Verbindungen

Die Oxidationskraft von TCDO wird durch bestimmte Häm-Verbindungen gewaltig gesteigert. So konnten wir zeigen, daß zum Beispiel Hämoglobin, Peroxidase, Hämin sowie Myoglobin sowohl die oxidative als auch die bakterizide Wirkung von TCDO auf ein Vielfaches stimulieren [12, 13]. Bei diesen *in vitro* Reaktionen werden die zugesetzten Häm-Verbindungen oxidativ abgebaut. Wie in Abb. 1 gezeigt, haben äquimolare Konzentrationen von Chlorat, und Wasserstoffperoxid sehr unterschiedlichen Einfluß auf den Abbau der  $\gamma$ -Bande von Hämin. Während 2 mM Chloratlösung keinen Effekt zeigt, bewirken 2 mM TCDO eine lineare Abbaukinetik und 2 mM Wasserstoffperoxid einen sehr schnellen, nach ungefähr 3 min abklingenden Abbau von Hämin.

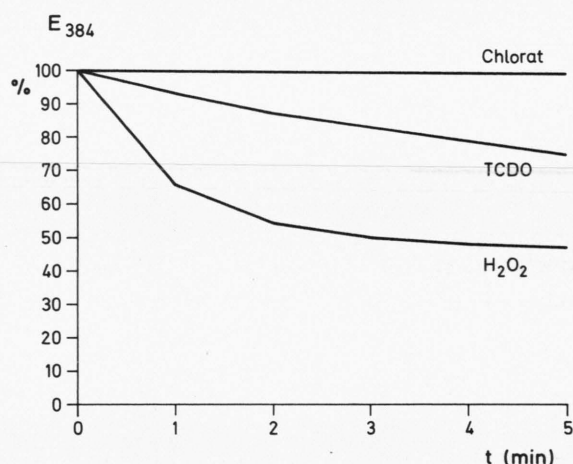


Abb. 1. Vergleich des Häminabbaus durch Chlorat,  $\text{H}_2\text{O}_2$  und TCDO. Testsystem: vgl. Material und Methoden, a).

In Abb. 2 ist gezeigt, daß die TCDO-abhängige Abbaukinetik des Hämins konzentrationsabhängig von TCDO verläuft, wobei sich relevante TCDO-Konzentrationen zwischen 0,2 und 10 mM bewegen.

Innerhalb dieser Konzentrationen verläuft der Abbau bis eine Minute etwa linear (Abb. 3).

Die Abbaukinetik der Häm- $\gamma$ -Bande ist jedoch nicht einheitlich für alle hämhaltigen Verbindungen. Bleibt man innerhalb einer TCDO-Konzentration, welche mit Hämin lineare Abbaukinetiken gewährleisten (zwischen 50 und 2000  $\mu$ M) so ergeben sich für verschiedene Hämverbindungen recht unterschiedli-

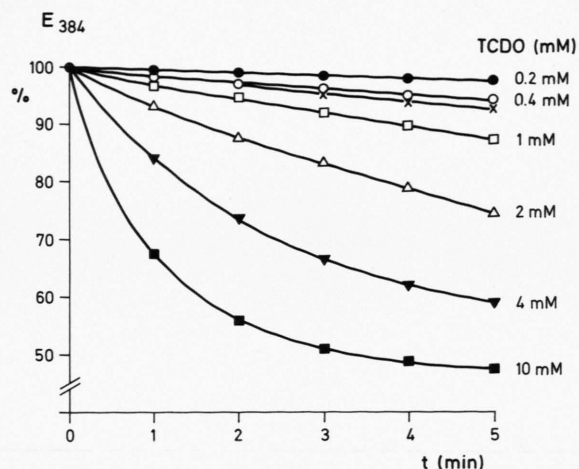


Abb. 2. Abhängigkeit des Häminabbaus von der TCDO-Konzentration. Testsystem: vgl. Material und Methoden, a).

#### Hämin - Abbau (%)

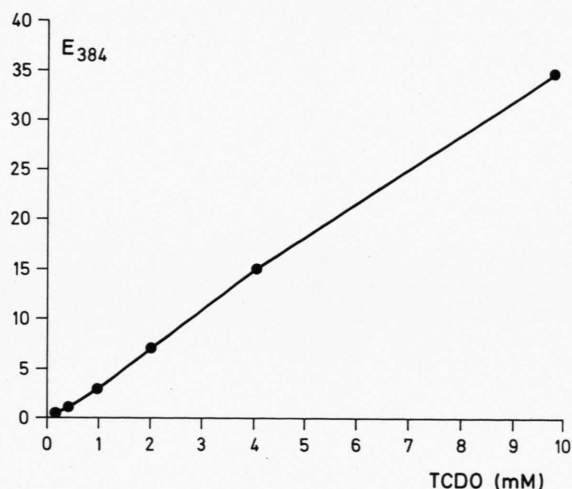


Abb. 3. TCDO-abhängiger Häminabbau nach 1 min Reaktion. Testsystem: vgl. Material und Methoden, a).

che Abbaukinetiken: Am schnellsten wird Myoglobin abgebaut und am langsamsten Katalase. Cytochrom *c*, Hämoglobin und Peroxidase nehmen eine Mittelstellung ein. Das Hämoglobin intakter Erythrozyten wird von TCDO nicht abgebaut. Dieser Befund steht im Einklang mit früheren Ergebnissen, wo berichtet wurde, daß mit intakten Erythrozyten erst eine Hämaktivierung von TCDO eintrat wenn diese durch Detergenzien zerstört wurden [11]. Die

Abbaukinetiken der oben erwähnten Hämverbindungen sind in Abb. 4 zusammengefaßt. Aus dieser Abbildung geht deutlich hervor, daß Vollblut und Katalase nicht durch TCDO abgebaut werden; ferner, daß Hämin die geradlinigsten Abbaukinetiken erfährt. Dies ist einer der Gründe, warum in den nachfolgenden Versuchen Hämin als Aktivator für TCDO eingesetzt wurde.

## 2. Die Ethylenbildung aus verschiedenen Vorläufern

Wie aus Tab. I ersichtlich ist, reagiert TCDO in Anwesenheit von Hämin sehr schnell mit ACC unter Ethylenbildung, während KMB kaum, Methionin keine Spaltung in Ethylen zuläßt. In Anwesenheit von 0,32 mM TCDO und 50 µM Hämin werden in 30 min Reaktionszeit aus 2,5 mM ACC etwa 15 nmol Ethylen entwickelt, aus 2,5 mM KMB etwa 2 nmol und aus Methionin in der gleichen Zeit weniger als 0,1 nmol. Auf dieser Basis wurde ein empfindlicher gaschromatographischer Test für die Erfassung von TCDO aufgebaut, wobei zwischen 0,3 und 50 µM TCDO aus ACC in Anwesenheit von Hämin Ethylenmengen freisetzen, die linear mit der TCDO-Konzentration ansteigen (Elstner *et al.* 1988, im Druck). Die beiden Indikatoren ACC und KMB lassen es jedoch zu, Oxidantien verschiedener Kategorie weiter einzuordnen. Es stellte sich uns die Frage, welcher Natur das Oxidans im TCDO-Häm-Komplex sein könnte: Ist es ein anorganisches Radikal am TCDO oder ist es ein organisches Radikal im Hämin, welches schließlich die Oxidation des Indikator-moleküls unter Ethylenfreisetzung bewirkt?

Wir haben die oben angesprochenen Indikatorreaktionen mit ACC und KMB in Anwesenheit von TCDO und Hämin auf den Effekt von Sulfid geprüft

Tab. I. Vergleich der Ethylenbildung aus KMB, ACC und Methionin in Anwesenheit des Oxidans TCDO/Hämin.

Indikator (2,5 mM)	nmol Ethylen, gebildet in 30 min
ACC	14
KMB	2
Methionin (Met)	0
Ansatz:	
Phosphatpuffer, pH 7,8	100 mM
TCDO	0,32 mM
Hämin	50 µM
ACC, KMB, Met	2,5 mM
H <sub>2</sub> O	ad 2 ml



## Abbau der Soret-Bande durch TCDO

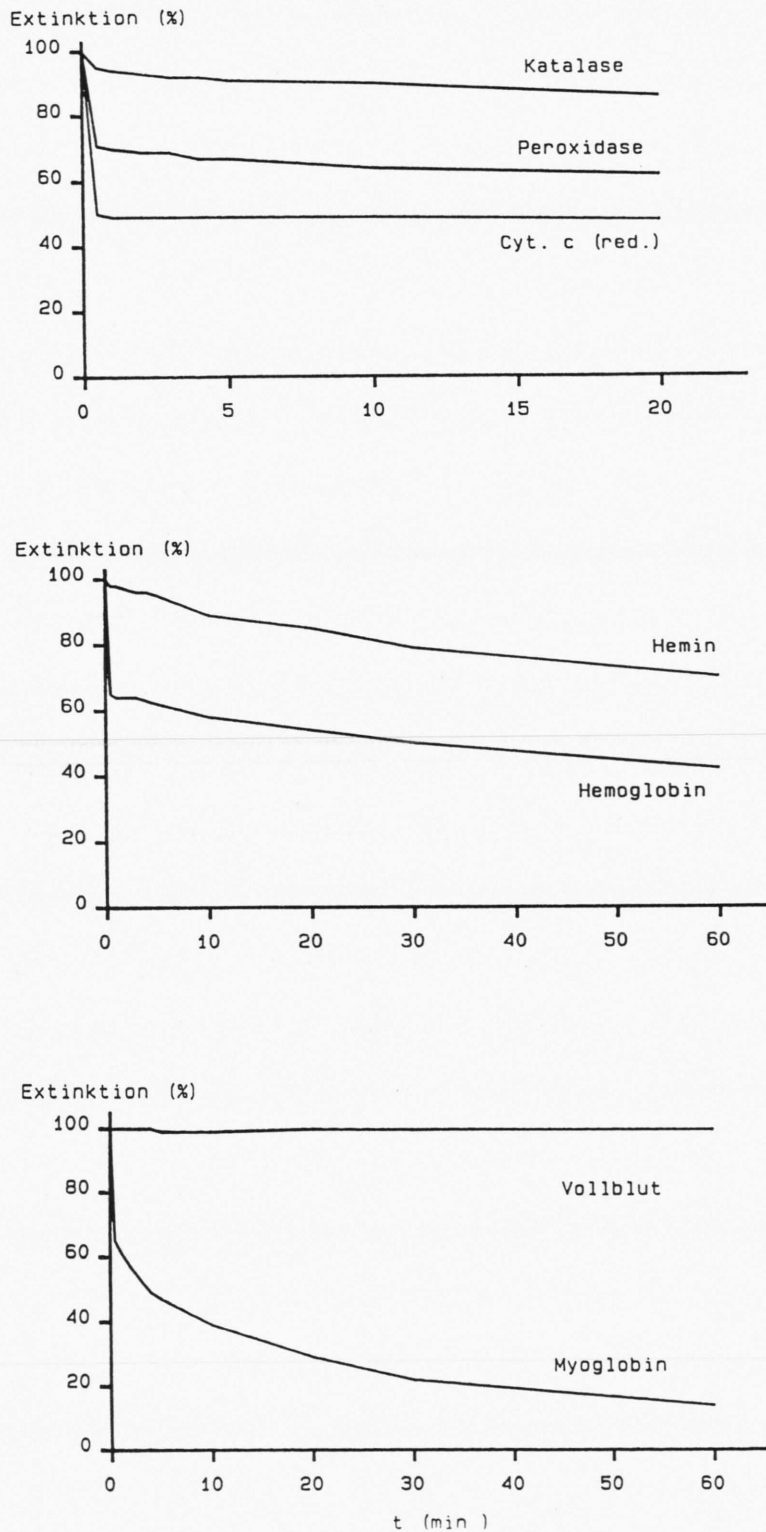


Abb. 4. Abbaugeschwindigkeiten verschiedener Häminverbindungen durch TCDO im Vergleich mit Vollblut. Testsysteme: vgl. Material und Methoden, a).

und folgende Beobachtung gemacht (Tab. II): Das ACC-System zeigt mit TCDO allein oder mit Hämin allein keine Ethenbildung. Hämin und TCDO bilden 15 nmol Ethen aus 2,5 mM ACC-Lösung in 30 min. Ersetzt man das Hämin durch Bisulfit der gleichen Konzentration (50  $\mu\text{M}$ ), oder einer 10fach höheren Menge an Bisulfit, so ergeben sich kaum Erhöhungen der Ethenfreisetzung aus ACC. Kombiniert man Hämin und Bisulfit, so ergibt sich auch hier keine Stimulierung. Anders ist die Situation im KMB-System. Das KMB-System hat mit Hämin niedrigere Ethenfreisetzungsraten als das ACC-System. Ersetzt man im KMB-System jedoch Hämin durch Bisulfit, so zeigen äquimolare Konzentrationen des Aktivators etwa dieselbe Reaktionsbeschleunigung. Kombiniert man nun Hämin und Bisulfit, so ergeben sich überadditionelle Werte der Ethenfreisetzung. Dies bedeutet, daß im KMB-System das Sulfit-Radikal als Oxidans dienen kann, während im ACC-System „kein Oxidans“ entsteht. Da das KMB-System sowohl durch Hämin als auch durch Sulfit aktivierbar ist, haben wir mit Hilfe dieser Indikatorsubstanz äquimolare Mengen an Hypo-

chlorit, Chlorit und TCDO miteinander verglichen (Tab. III).

Ohne Aktivator haben weder Hypochlorit noch Chlorit oder TCDO ethylenfreisetzende Aktivitäten

Tab. III. Aktivierung von TCDO und Chlorit durch Hämin und Sulfit.

Oxidans [0,5 mM]	Aktivator [50 $\mu\text{M}$ ]	Ethylen aus KMB [nmol/30 min]
$\text{ClO}^-$	—	0
$\text{ClO}_2^-$	—	0
TCDO	—	0
—	Hämin	0
—	$\text{HSO}_3^-$	0
$\text{ClO}^-$	Hämin	0
$\text{ClO}^-$	$\text{HSO}_3^-$	0,12
$\text{ClO}_2^-$	Hämin	3,13
$\text{ClO}_2^-$	$\text{HSO}_3^-$	6,84
TCDO	Hämin	4,27
TCDO	$\text{HSO}_3^-$	8,12

Reaktionszeit: 30 min (vgl. Tab. II).

Tab. II. Effekt von Sulfit und Hämin auf die ACC- und KMB-Oxidation durch TCDO.

System	[ $\text{HSO}_3^-$ ]	Indikator	
		ACC nmol/Ansatz $n = 1$ $n = 6$	KMB nmol/Ansatz $n = 1$ $n = 6$
TCDO	—	0,03	0,04
Hämin	—	0	0,01
TCDO + Hämin	—	15,25 $\pm$ 2,01	4,37 $\pm$ 0,62
$\text{HSO}_3^-$	500	0	0,12
	50	0	0,02
TCDO + $\text{HSO}_3^-$	500	0,35 $\pm$ 0,08	62,70 $\pm$ 10,04
	50	0,25 $\pm$ 0,03	7,03 $\pm$ 0,43
Hämin + $\text{HSO}_3^-$	500	0	2,02 $\pm$ 0,05
	50	0	0,16 $\pm$ 0,08
TCDO + Hämin + $\text{SO}_3^{2-}$	500	16,00 $\pm$ 1,73	129,24 $\pm$ 17,6
	50	9,36 $\pm$ 1,34	23,54 $\pm$ 3,25

Ansatz: Phosphatpuffer, pH 7,8

TCDO 100 mM  
Hämin 0,5 mM  
 $\text{HSO}_3^-$  50  $\mu\text{M}$   
KMB/ACC 500/50  $\mu\text{M}$   
2,5 mM

im KMB-System. Durch Häm in kann sowohl TCDO als auch Chlorit aktiviert werden, während Hypochlorit unreaktiv bleibt. Mit Sulfid als Aktivator läßt sich eine ähnliche Beobachtung machen: Während Hypochlorit kaum Reaktivität zeigt, wird in Anwesenheit von Chlorit oder TCDO Ethylen in derselben Größenordnung freigesetzt.

Es wurden weiterhin Untersuchungen angestellt, ob dieses Verfahren dazu geeignet ist, TCDO und Chlorit biochemisch voneinander zu unterscheiden. Dieser Unterschied ist, wie Abb. 5 anhand der Hämin-Bleichung „geeichter“ äquimolarer Lösungen

zeigt, quantifizierbar: Chlorit reagiert schneller als TCDO.

Wie oben gezeigt wurde, kann TCDO auch in Anwesenheit von Aktivatoren kein Ethylen aus Methionin freisetzen. Wie an anderer Stelle jedoch ausgeführt wurde [1, 10], läßt sich durch starke Oxidantien wie OH-Radikale oder Singulett-Sauerstoff sehr wohl Ethylen aus Methionin freisetzen. Aus diesem Befund kann man schließen, daß der „überzählige“ Sauerstoff im TCDO keinen Singulett-Charakter besitzt und nicht als Oxidans aktiv wird. Die unterschiedliche Oxidationskraft von TCDO und Chlorit ist aus diesem Grunde sicherlich kinetisch und nicht thermodynamisch begründet (vgl. Abb. 5). Aus Tab. 3 läßt sich darüber hinaus entnehmen, daß das oxidative Potential von TCDO nicht identisch ist mit Hypochlorit. Mit Hilfe der Indikatoren KMB, ACC und Methionin läßt sich eine weitere Aussage über TCDO als Oxidans machen: Wenn man Kinetiken der Ethylenfreisetzung aus diesen drei Indikatormolekülen miteinander vergleicht, so stellt man fest, daß Wasserstoffperoxid allein, und  $\text{Fe}^{3+}$  und Ascorbat allein nur wenig Ethylen aus KMB, Methionin oder ACC freisetzt. Gibt man jedoch einen Komplexbildner zu diesem System (EDTA), so schnell die Ethylenfreisetzung aus KMB gewaltig hoch (Tab. IV). Dieser Wert bleibt bei ACC vernachlässigbar, und ist im Methionin-System aber meßbar erhöht. Gibt man zu diesem System noch Wasserstoffperoxid hinzu, so wird die Ethylenfreisetzung aus KMB weiter stimuliert, die aus ACC ist weiterhin vernachlässigbar, während sich jedoch die Ethylenfreisetzung aus Methionin versechsfacht hat. Hier erweist sich KMB als empfindlichster Indikator, Methionin ist deutlich reaktiv, jedoch unempfindlich

Hämin - Abbau (%)

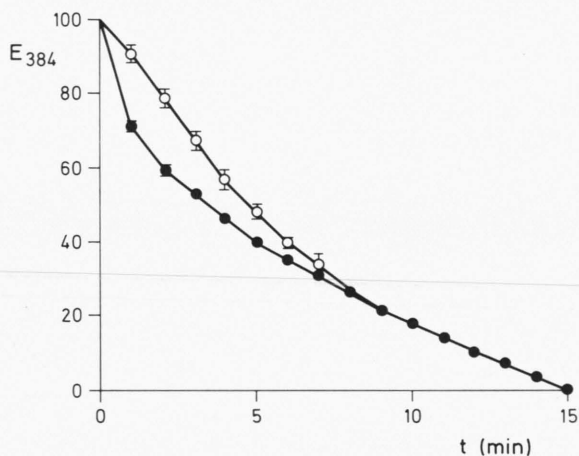


Abb. 5. Vergleich der Geschwindigkeiten des Häminabbaus durch  $\text{ClO}_2^-$  oder TCDO. Testsysteme: vgl. Material und Methoden, b). ○—○: TCDO-Häminabbau; ●—●:  $\text{ClO}_2^-$ -Häminabbau. Standardabweichung: Die Unterschiede der Oxidationsraten zwischen 1 min und 7 min sind hochsignifikant ( $n = 6$ ).

Tab. IV. Vergleich der Ethylenfreisetzung aus Methionin (Met), KMB und ACC mit „Fenton“-Oxidantien (nach Schütz und Elstner 1988 [17]).

Zusätze zum Puffer-Indikator	nmol Ethylen freigesetzt in 30 min aus:		
	KMB	ACC	Met
$\text{H}_2\text{O}_2$	0,01	< 0,01	0,01
$\text{Fe}^{3+}$ + Ascorbat	0,3	< 0,01	0,01
$\text{Fe}^{3+}$ + Ascorbat + EDTA	10,6	< 0,01	0,1
$\text{Fe}^{3+}$ + Ascorbat + EDTA + $\text{H}_2\text{O}_2$	47,3	< 0,01	0,6

Ansatz in 2 ml:	Phosphatpuffer, pH 7,9	100 mM
Indikatoren:	KMB, ACC, Met	2,5 mM
Zusätze:	$\text{H}_2\text{O}_2$	0,5 mM
	$\text{Fe}^{3+}$	50 $\mu\text{M}$
	Ascorbat	50 $\mu\text{M}$
	EDTA	50 $\mu\text{M}$

## nmol Ethen

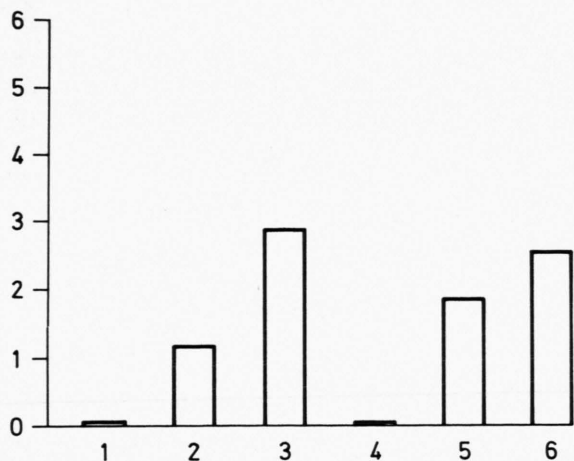


Abb. 6. Effekt von TCDO auf die KMB-Oxidation durch  $\text{Fe}^{2+}$ -EDTA. Reaktionssysteme: 1 = 1,25 mM KMB; 2 = 1 + 1,25  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$ ; 3 = 2 + 250  $\mu\text{M}$  EDTA; 4 = 1 + 0,4 mM TCDO; 5 = 2 + 0,4 mM TCDO; 6 = 3 + 0,4 mM TCDO. 30-min-Reaktion im Dunkel.

und ACC setzt mit diesen „Fentonoxidantien“ kein Ethen frei. Um die Aktivität von TCDO auf diese Testsysteme näher zu untersuchen, wurde das KMB-System verwendet. Wie aus Abb. 6 hervorgeht, hat TCDO keinen Effekt auf die Ethenfreisetzung aus KMB in Anwesenheit von  $\text{Fe}^{2+}$  oder Eisen-EDTA. Aus diesem Ergebnis läßt sich schließen, daß TCDO an der Bildung von starken Oxidantien wie dem OH-Radikal oder dem Perferryl-Ion nicht beteiligt ist.

### 3. Die Sauerstoff-Freisetzung aus TCDO

Wie bereits früher berichtet [12, 13] wird im Zuge der Hämoxidation durch TCDO aus dem TCDO Sauerstoff freigesetzt. In Tab. 5 wird die Abnahme der Soret-Bande bestimmter Hämverbindungen mit der Menge des freigesetzten Sauerstoffs verglichen. Man sieht, daß die Hämoxidation nicht mit der Sauerstoff-Freisetzung korreliert. Hervorstechend ist auch, daß zum Beispiel Myoglobin sehr schnell oxidiert wird, während nur wenig Sauerstoff freigesetzt wird im Vergleich zum Hämoglobin, das langsamer oxidiert wird, aber mehr Sauerstoff freisetzt. Am stärksten ist dieser Unterschied zu beobachten beim Cytochrom *c*. Dieser Befund ist vielleicht damit erklärbar, daß bei der Sauerstoff-Freisetzung aus TCDO das Verhältnis aus Häm-Aktivator und

TCDO sehr kritisch ist. Wie in Abb. 7 dargestellt, scheint es ein optimales Mischungsverhältnis zwischen Häm-Aktivator und TCDO bezüglich der Sauerstoff-Freisetzung zu geben. Es deutet sich ein optimales Mischungsverhältnis von 50  $\mu\text{M}$  Häm-

Tab. V. Vergleich zwischen Häminabbau und Sauerstoff-Freisetzung in verschiedenen Aktivator/TCDO-Systemen.

Aktivator	a) % Abnahme der Soret-Bande in 5 min	b) $\mu\text{mol O}_2/\text{ml}$ freigesetzt in 5 min
Hämoglobin	38	71
Methämoglobin	—	60
Peroxidase	33	25
Myoglobin	53	25
Hämin	5	16
Cytochrom <i>c</i>	51	10

a) Aktivatoren wurden in Konzentrationen eingesetzt, die eine Extinktion in der Soret-Region von ca. 1 ergaben; 85  $\mu\text{M}$  TCDO.

b) 10  $\mu\text{M}$  Hämaktivator und 10 mM TCDO wurden verwendet (aus Hollfelder 1987; Schütz und Elstner 1988).

### nmol $\text{O}_2$ / $\mu\text{mol}$ TCDO freigesetzt

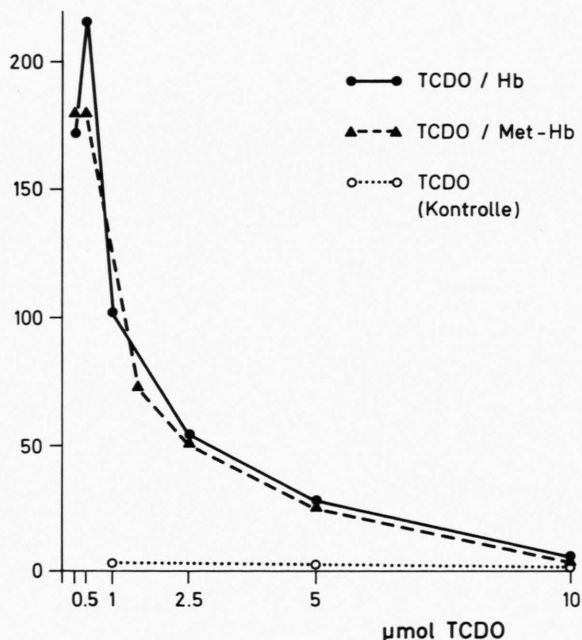


Abb. 7. Der Einfluß des TCDO/Hämoprotein-Mischungsverhältnisses auf die Sauerstoffentwicklung aus TCDO. Reaktionssystem: wie in Abb. 1, 50  $\mu\text{M}$  Hb oder Met Hb (nach Hollfelder 1987, zit. [13]).

globin oder Methämoglobin und  $5 \times 10^{-4}$  M TCDO an. Unter diesen Bedingungen werden ungefähr 200 nmol Sauerstoff aus einem  $\mu\text{mol}$  TCDO freigesetzt, was ca. 20% des Sauerstoffanteils im TCDO Molekül entspricht.

#### 4. Die Oxidation anderer Biomoleküle

Über die Reaktionsmechanismen der Oxidation von KMB und ACC wissen wir, daß die Oxidation von KMB unter Ethylenfreisetzung am Schwefelatom ansetzt und die Oxidation von ACC unter Ethylenfreisetzung an der Aminogruppe des Dreierings erfolgt. Aus diesem Grund haben wir eine Reihe von Biomolekülen ausgewählt, die Aminogruppen enthalten und ihre oxidative Veränderung durch TCDO in Anwesenheit von Häm untersucht.

##### a) Effekte auf die Desoxyribonukleinsäure

Wie von Hollfelder 1987 [13] dargestellt ist, verändert sich das gelelektrophoretische Muster von DNA nach Inkubation mit TCDO oder TCDO in Anwesenheit von Häm nicht. Dies mag ein Hinweis darauf sein, daß weder Veränderungen an Basen noch Strangbrüche an der DNS durch TCDO Häm hervorgerufen werden.

##### b) Die Oxidation von Aminogruppen im Casein (aus [13])

Wie aus Tab. V hervorgeht, verändern sich die freien Aminogruppen im Protein Casein nach Trypsinabbau dergestalt, daß 70% der im Casein enthaltenen Aminogruppen „freigesetzt“ werden. Inkubation mit TCDO oder Häm allein verändert diese Menge wenig. Die Inkubation mit TCDO in Anwesenheit von Häm jedoch bewirkt eine deutliche Abnahme der freien Aminogruppen. Dieses steht im Einklang mit dem Befund der ACC-Oxidation [10].

Tab. VI. Veränderung des Gehalts „freier“ Aminogruppen<sup>a</sup> in Casein nach TCDO-Behandlung oder Trypsin-Abbau.

Behandlung	Abweichung im Gehalt der freien Aminogruppen (%) in Casein
–	0
Trypsin	+71
Häm (10 $\mu\text{M}$ )	+ 2,5
TCDO (6 mM)	+ 5,3
TCDO + Häm	–14,4

<sup>a</sup> Nach zit. [13].

##### c) Die Oxidation von Serotonin

Wie in Abb. 9 dargestellt, wird Serotonin in Anwesenheit von TCDO und Häm nach einer kurzen lag-Phase von ca. 3 min abgebaut. In Abwesenheit von entweder Häm oder TCDO ist keine spektral-photometrische Änderung einer Serotoninlösung von 50  $\mu\text{M}$  erkennbar. Diese Befunde deuten darauf hin, daß der TCDO-Häm-Komplex bestimmte Verbindungen mit freien Aminogruppen oxidiert. Diese Effekte mögen direkte Beziehungen zur Bakterizidie von TCDO-Häm haben. Wie an dieser Stelle nicht näher ausgeführt werden soll, aber an anderer Stelle bereits berichtet wurde [13], kann TCDO nicht nur durch Sulfid oder Häm, sondern auch durch UV-Licht ( $\lambda \leq 366$  nm) aktiviert werden.

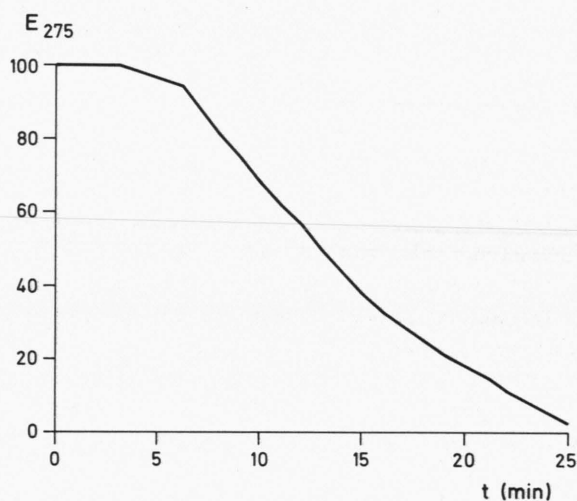


Abb. 8. Die Oxidation von Serotonin durch TCDO-Häm. Testsystem: vgl. Material und Methoden, c).

Ähnlich wie Häm, so haben UV und TCDO einen überadditiven Stimulierungseffekt auf die bakteriziden Eigenschaften von TCDO. Obgleich TCDO und Sulfid schnelle Oxidationen von KMB bewirken, so zeigt dieses Gemisch jedoch keine bakteriziden Eigenschaften (Hollfelder 1986, unveröffentlichte Ergebnisse, TU München). Diesen Befund könnte man so deuten, daß Oxidantien, welche Aminogruppen angreifen, bakterizid sind, jedoch Oxidantien, welche KMB spalten, also an der Schwefelgruppe angreifen, nicht unbedingt bakterizide Eigenschaften aufweisen müssen.



## Diskussion

Der Wirkstoff „Tetrachlordecaoxid (TCDO)“ reagiert mit bestimmten biologisch wichtigen Molekülen nur sehr langsam. Nach Aktivierung durch Hämverbindungen oder durch Bisulfit lassen sich die Reaktionen sehr stark stimulieren. Dabei werden Indikatormoleküle wie die S-Methyl- $\alpha$ -Keto- $\gamma$ -thio-buttersäure (KMB) oder Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) unterschiedlich schnell fragmentiert, wobei Ethylen nachgewiesen werden kann. Es konnte gezeigt werden (Abb. 3 und 4), daß die Hämverbindungen, welche TCDO aktivieren können, unterschiedlich schnell oxidiert werden, wobei aus dem TCDO-Molekül Sauerstoff freigesetzt wird. In diesen Oxidationseigenschaften unterscheidet sich TCDO qualitativ von Hypochlorit, Chlorat und Wasserstoffperoxid und quantitativ von Chlorit. Während also Hypochlorit, Chlorat und Wasserstoffperoxid entweder gar nicht oder unter anderen Bedingungen aktivierbar sind, unterscheiden sich TCDO und Chlorit in den untersuchten biochemischen Modellreaktionen in der Reaktionskinetik. Dies ist verständlich, wenn man davon ausgeht, daß die Chloritmatrix im TCDO durch den überzähligen Sauerstoff „gebunden“ wird, was logischerweise kinetische Unterschiede in der Reaktivität zur Folge hat.

Thermodynamische Unterschiede sind nicht angezeigt, da der Sauerstoff im TCDO-Molekül keinen Singulett-Charakter aufweist, wie an der mangelnden Oxidation von Methionin zu Ethylen gezeigt werden konnte [10]. Die unterschiedliche Reaktivität von Methionin, KMB und ACC mit bestimmten Oxidantien kann auch zur Differenzierung verschiedener Aktivierungsreaktionen herangezogen werden. Während Methionin gewisse Reaktivität mit Oxidantien des Fentontyps aufweist, reagiert ACC mit diesen Oxidantien überhaupt nicht. Im Gegen-

satz dazu scheint ACC jedoch ein sehr sensibler Indikator für Oxidantien vom Typ „Compound I“, also aktivierter Häm-Verbindungen zu sein.

Aus diesen Untersuchungen geht ebenfalls hervor, daß TCDO im Blut oder mit intakten Erythrozyten keine Hämoglobinoxidation, das heißt auch keine Methämoglobinbildung bewirken kann (vgl. Abb. 4 und zit. [11]). Die hämkatalysierte Sauerstoff-Freisetzung aus TCDO und die Oxidation von Serotonin könnten gemeinsam für einen bedeutenden physiologischen Befund verantwortlich sein, nämlich die Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks im hypoxischen Wundbereich. Wie von Hinz [8] berichtet, läßt sich in hypoxischen Wundbereichen durch Oxoferinbehandlung eine Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks bewirken. Dieser Sauerstoffpartialdruck ist sicher nicht allein auf die Sauerstoff-Freisetzung aus TCDO zurückzuführen. Aus der Oxidation von Cytochrom c nahmen wir früher an, daß ein „Sauerstoffesparereffekt“ der mitochondrialen Respiration vorliegen könnte [14]. Diese Hypothese konnte bis jetzt jedoch nicht eindeutig bewiesen werden. Ein weiterer Ansatzpunkt wäre die Beeinflussung der Serotoninkonzentration im Wundbereich. Es ist bekannt [15], daß Serotonin von Thrombozyten abgegeben wird und einen gefäßverengenden Effekt in bestimmten Geweben bewirkt. Wenn nun das freigesetzte Serotonin durch TCDO in Anwesenheit von Hämoglobin oxidiert wird, so würde diesem gefäßverengenden Effekt des Serotonins entgegengearbeitet werden. Erste experimentelle Hinweise auf einen solchen Effekt bestehen (Wolin *et al.* 1987, unveröffentlichte Ergebnisse). Somit scheint das aktivierte TCDO neben seinem direkten bakteriziden Effekt und der eindeutig erwiesenen Makrophagenaktivierung [16] auch über die Oxidation bestimmter Aminoverbindungen im Wundgewebe einen positiven Einfluß auf die Wundheilung zu besitzen.

- [1] E. F. Elstner, Metabolism of Activated Oxygen Species, *Biochemistry of Plants*, **Vol. 11**, S. 253–315, Academic Press, San Diego 1987.
- [2] M. Saran, in: *Reaktive Sauerstoffspezies in der Medizin – Grundlagen und Klinik* (E. F. Elstner, W. Bors und W. Wilmanns, Hrsg.), S. 25–44, Springer Verlag, Heidelberg 1987.
- [3] B. Halliwell und J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford 1985.
- [4] E. F. Elstner, *Med. Welt* **35**, 728–735 (1984).
- [5] H. Sies, *Angew. Chemie* **98**, 1061–1075 (1986).
- [6] W. Bors, in: [2], S. 161–183.
- [7] F. W. Kühne, in: [2], S. 5–15.
- [8] J. Hinz, in: [2], S. 227–237.
- [9] H. H. Kühne, A. Thiede und M. Erttmann, in: [2], S. 213–226.
- [10] R. J. Youngman, G. Wagner, F. W. Kühne und E. F. Elstner, *Z. Naturforsch.* **40c**, 409–414 (1985).
- [11] R. J. Youngman, G. Wagner, F. W. Kühne und E. F. Elstner, *Free Rad. Res. Comms.* **1, 5**, 311–319 (1986).
- [12] E. F. Elstner, F. Goetz, K. Hollfelder, H. Heinisch, K. H. Schleifer und F. W. Kühne, in: *Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry, Biology and Medicine* (G. Rotilio, Hrsg.), S. 551–554, Elsevier Science Publ., Amsterdam 1986.
- [13] K. Hollfelder, Dissertation, TU München 1987.
- [14] E. F. Elstner, *FAC Band 6-1*, 1987.
- [15] W. Forth, D. Henschler und W. Rummel, *Lehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*, B. I. Wissenschaftsverlag, Mannheim 1980.
- [16] K. W. Stahl und P. Poindron, *Cancer Immunol. and Immunother.* **25**, 62–67 (1987).
- [17] W. Schütz und E. F. Elstner, unveröffentl. Ergebnisse, Manuskript in Vorbereitung (1988).