

Pharmakologische Wirksamkeit von Fettsäure-Hydroperoxyden

Manche ungesättigte Fettsäuren haben eine darmkontrahierende Wirkung vom Typ der „Slow reacting substance“ (SRS)^{1), 2)}. Nach den Untersuchungen von JACQUES³⁾ erwies sich Arachidonsäure als besonders stark wirksam. Ölsäure wurde dagegen von mehreren Untersuchern wirkungslos gefunden.

Wir wollten durch Vergleich verschiedener, reiner ungesättigter Fettsäuren untersuchen, welchen Einfluß die Zahl und die Stellung der Doppelbindungen auf die pharmakologische Wirksamkeit haben. Die Fettsäure-Präparate wurden, um Oxydationen zu vermeiden, erst kurz vor Versuchsbeginn aus Ampullen entnommen, mit Propylenglykol und Kochsalzlösung verdünnt und neutralisiert. Zu unserer Überraschung kontrahierte weder Linol- noch Linolen- oder Arachidonsäure den als Testobjekt benutzten isolierten Meerschweinchendarm. Erst wenn die Fettsäurelösungen einige Tage lang gestanden hatten, wirkten sie erregend.

Dieses Verhalten ließ vermuten, daß für die Wirksamkeit die Autoxydation eine Rolle spielte. Der Beweis dafür konnte dadurch erbracht werden, daß die Wirkung wieder verloren ging, wenn die Lösungen durch Behandlung mit Triphenylphosphin oder Peroxyden befreit wurden. Auch Ascorbinsäure, Peroxydase und FeCl₂ zerstörten die Wirkung. Wurden frische, unwirksame Fettsäuren mit H₂O₂ behandelt, so entstanden ebenfalls wirksame Präparate.

Danach sind also ungesättigte Fettsäuren erst nach Oxydation als SRS wirksam, und ihre verschiedene Wirkungsstärke beruht lediglich auf der unterschiedlich leicht verlaufenden Autoxydation.

Unser Befund könnte manche Diskrepanzen erklären, die zwischen SRS-artig wirkenden, aus Gewebe gewonnenen, sauren lipoiden Substanzen und ungesättigten Fettsäuren beobachtet wurden, z.B. die gelegentlich beschriebene Labilität von SRS. Die Labilität von Fettsäurehydroperoxyden ist bekannt.

Medizinische Forschungsanstalt der Max-Planck-Gesellschaft, Pharmakologische Abteilung, Göttingen

T. DAKHIL und W. VOGT

Eingegangen am 4. Juli 1961

¹⁾ VOGT, W.: J. Physiology 136, 131 (1956). — ²⁾ SCHÜTZ, R.M., u. W. VOGT: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 240, 504 (1961). — ³⁾ JACQUES, R.: Helv. physiol. pharmacol. Acta 17, 255 (1959).

Der Gehalt an freien Nucleotiden bei verschiedenen Funktionszuständen der Rattenleber

Beim Vergleich des Gehaltes der Rattenleber an freien Nucleotiden im Normalzustand des Organes, im Verlauf von Regenerationsvorgängen, die durch partielle Hepatektomie ausgelöst werden, und während der Malignisierung durch Buttergelb-Fütterung (p-Dimethylaminoazobenzol) ergeben sich bemerkenswerte Unterschiede.

Im Falle der regenerierenden Leber findet sich eine charakteristische Verringerung des Gehaltes an Diphosphopyridinnucleotid und Triphosphopyridinnucleotid. Daneben ist eine Erhöhung der energiereichen Uridinverbindungen nachweisbar (Tabelle).

Der Vergleich der Leber im Laufe der Buttergelb-Fütterung mit normaler Leber ergibt 68 Tage nach Beginn der Zufuhr des Cancerogens eine Abnahme des Gehaltes an Diphosphopyridinnucleotid und Triphosphopyridinnucleotid. Mit anderen Methoden gewonnene Ergebnisse aus der Literatur befinden sich mit unseren Befunden in Übereinstimmung^{1), 2)}. Auch für den morphologisch ausgebildeten Lebertumor nach Buttergelb-Fütterung ist eine Verringerung des Gehaltes an diesen Verbindungen beschrieben^{3), 4), 5)}. Während der malignen Entartung stellen wir in der Leber eine Vermehrung der energiereichen Derivate von Adenosin und Uridin fest (Tabelle).

Überraschend ist die starke Senkung des Gehaltes an Pyridinnucleotiden im Zuge der Cancerisierung vor dem Auftreten morphologischer Veränderungen. Erst vom 100. Tage der Fütterung ab beginnt die morphologisch nachweisbare Entstehung von Leberzellcarcinomen. Der Beginn der Malignisierung ist demnach biochemisch früher nachweisbar als morphologisch.

Auffällig ist ferner während der Malignisierung eine Abnahme des Gehaltes an Adenosinmonophosphat bei gleichzeitiger Vermehrung der energiereichen Adenosin- und Uridinphosphate (Tabelle). Es liegt nahe, daß sowohl im Falle der

regenerierenden als auch der cancerisierten Leber eine Senkung im Gehalt an Pyridinnucleotiden mit der Funktion stofflicher Synthese zusammenhängt. Dabei ist nur im Falle der regenerierenden Leber eine entsprechende Volumenzunahme des Organes nachweisbar. Auch beim embryonalen Wachstum ist der Gehalt der Leber an diesen Verbindungen gering. Er nimmt im Zuge der Entwicklung zu^{6), 7)}.

Als Bezugssystem für quantitative Angaben über den Gehalt einzelner Verbindungen verwenden wir ihren prozentualen Anteil an der Gesamttextinktion des Nucleotidextraktes. Das Feuchtgewicht eines Organes erscheint uns als Bezugssystem für quantitative Aussagen nur bedingt geeignet. Im Falle

Tabelle. Prozentuale Anteile der Nucleotide an der Gesamttextinktion aus 48 g Frischleber

(Es sind nur diejenigen Verbindungen angeführt, bei welchen sich Abweichungen zwischen den einzelnen Versuchen ergeben haben.) In der Tabelle bedeuten: I normale Leber, II Leber 48 Std nach Teilhepatektomie, III Leber 68 Tage Buttergelb-Fütterung.

	I	II	III
Gesamttextinktion bei 260 m μ	3178,2	2619,7	3742,0
Abweichung der E von der Norm in %	—	—17,6	+17,8
Diphosphopyridinnucleotid	4,10	2,55	0,87
Triphosphopyridinnucleotid	0,55	0,27	0,16
Adenosin-5'-monophosphat	8,30	12,43	5,96
Adenosin-5'-diphosphat	20,1	18,0	19,0
Adenosin-5'-triphosphat	11,9	9,6	22,0
Uridin-5'-diphosphat	1,42	2,72	5,85
Uridin-5'-diphosphat-N-acetylglucosamin	4,72	5,63	4,45
Uridin-5'-diphosphatglucose und Uridin-5'-diphosphatgalaktose	5,56	6,55	6,08
Uridin-5'-diphosphatglucuronsäure	2,82	4,02	4,28
Uridin-5'-triphosphat	0,92	1,10	2,50

einer vergleichenden Untersuchung bei verschiedenen Funktionszuständen des gleichen Organes ist das Feuchtgewicht als Ausgangswert nicht verwertbar. Bei der Leberregeneration tritt ein starkes Ödem, d.h. eine Vermehrung des Wassergehaltes, auf. In der toxisch geschädigten Leber findet sich immer eine auch morphologisch nachweisbare Vermehrung der Lipide. Eine aufschlußreichere Angabe hinsichtlich des Gehaltes einzelner Nucleotide liefert ihr Verhältnis zum Gesamtgehalt an Nucleotiden.

Die Isolierung erfolgte jeweils aus 48 g Leberparenchym von weißen Sprague-Dawley-Ratten von etwa 200 g Körpergewicht. Die regenerierenden Lebern wurden 48 Std nach der operativen Entnahme von etwa 60% des Organgewichtes verarbeitet. Zur Gewinnung von 48 g Frischleber nach Hepatektomie waren 28 Tiere erforderlich. In den übrigen Versuchen wurden jeweils 9 Tiere verwertet. Bei der Buttergelb-Fütterung verwendeten wir ein vitaminreiches Gebäck, das 0,05% p-Dimethylaminoazobenzol enthielt und als einzige Nahrung gereicht wurde. Die Isolierung der freien Nucleotide erfolgte durch Ionenaustausch-Chromatographie nach der Methode von HURLBERT u. Mitarb.⁸⁾. Die Grundlagen zur Identifizierung waren die Arbeiten von SCHMITZ, HURLBERT und POTTER⁹⁾.

Pathologisches Institut und Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität, München

HEINRICH WRBA, HELMUT SCHÖNENBERGER, EUGEN BAMANN und RUDOLF LANG

Eingegangen am 6. Juli 1961

¹⁾ CARRUTHERS, C., V. SUNTZEFF u. P.N. HARRIS: Cancer Res. 14, 845—847 (1954). — ²⁾ KENSLER, C.J., K. SUGIURA u. C.P. RHOADS: Science 91, 623 (1940). — ³⁾ CARRUTHERS, C., u. V. SUNTZEFF: Arch. Biochem. 45, 140—148 (1953). — ⁴⁾ GLOCK, G.E., u. P. MCLEAN: Biochem. J. 65, 413—416 (1957). — ⁵⁾ JEDEIKIN, L.A., u. WEINHOUSE: J. Biol. Chem. 213, 271—280 (1955). — ⁶⁾ BRANSTER, M.J., u. R.K. MORTON: Biochem. J. 63, 640—646 (1956). — ⁷⁾ BERNHEIM, F., u. A. v. FELSOVANYI: Science 91, 76 (1940). — ⁸⁾ HURLBERT, R.B., H. SCHMITZ, A.F. BRUMM u. VAN R. POTTER: J. Biol. Chem. 209, 23 (1954). — ⁹⁾ SCHMITZ, H., R.B. HURLBERT u. VAN R. POTTER: J. Biol. Chem. 209, 41 (1954).

Über den Einfluß von Chlorprothixen auf Leukämie-Stämme VÜFB

In unseren Versuchen über den Einfluß verschiedener Substanzen auf transplantierbare Leukämien von Mäusen C 57 Black [Stammzellenleukämie (L-VÜFB) und lymphatische Leukämie (LA-VÜFB)] untersuchten wir außer anderen

Substanzen auch den Einfluß von Chlorprothixen (2-Chlor-9,3-dimethylaminopropyliden-thioxanthin-HCl). Die pharmakologischen Eigenschaften der genannten Verbindung sind aus der Beschreibung PELLMONTs¹⁾ bekannt.

In orientierenden Versuchen stellten wir fest, daß Chlorprothixen, in der Gesamtdosis 22,5 mg/kg subcutan in fünf Teildosen verabreicht, im roten und weißen Blutbild normaler Mäuse C57 Black keine Änderungen verursacht; sein Einfluß macht sich ferner weder am Gewicht noch bei der cytologischen Untersuchung der parenchymatösen Organe bemerkbar.

In Versuchen an leukämischen Mäusen — insgesamt 250 Mäuse C57 Black — begannen wir, den Mäusen Chlorprothixen in physiologischer Lösung 24 Std nach intraperitonealer Inokulation der Suspension leukämischer Zellen zu injizieren. Die Gesamtdosen von Chlorprothixen wurden den mit der Leukämie LA-VÜFB inokulierten Mäusen in sechs täglichen Teildosen subcutan injiziert. Mäuse mit dieser lymphatischen Leukämie erhielten insgesamt 11,2 mg/kg und 22,5 mg/kg Chlorprothixen. Mäusen mit Stammzellenleukämie (L-VÜFB) injizierten wir auf dieselbe Weise die Gesamtdosen

Tabelle. Wirkung von Chlorprothixen*) auf Mäuse mit Stammzellenleukämie (L) und lymphatischer Leukämie (LA)

	LA ♂ Chlp/K**)	LA ♀ Chlp/K	L ♂ Chlp/K	L ♀ Chlp/K
Überlebenszeit	11 / 9,5 +	9,7 / 9,5 +	13,3 / 12 ±	12,5 / 11,4 ±
Lebergewicht, g-%	6,4 / 7,5	6,5 / 7,4	7,3 / 8,0 +	6,6 / 7,7 +
Milzgewicht, g-%	2,3 / 4,3 ±	2,3 / 4,2 +	1,2 / 1,6	0,9 / 1,4 +
Leuk.zahl in 1000	18 / 41 +	24 / 28	32 / 41	19 / 34
Zahl leuk. Zellen	0 / 1	0,2 / 4,5 +	0 / 0,3 +	0 / 0

*) Gesamtdosis bei LA 22,5 mg/kg, bei L 27,5 mg/kg.

**) Angegeben sind die Zahlen bei Einwirkung von Chlorprothixen (Chlp) und die der Kontrollen (K). Deutliche Wirkung ist durch + gekennzeichnet.

13 mg/kg und 27,5 mg/kg. Die Teildosen wurden in 0,2 ml physiologischer Lösung injiziert. Dasselbe Volumen physiologischer Lösung injizierten wir den leukämischen Kontrolltieren subcutan. Bei einem Teil der Versuchs- und Kontrolltiere wurde am 7. Versuchstag das weiße Blutbild untersucht und Leber und Milz der leukämischen Tiere gewogen. Die Präparate dieser Organe wurden cytologisch untersucht. Bei den übrigen Mäusen, d.h. bei acht in jeder Versuchs- und Kontrollgruppe, wurde die Überlebenszeit untersucht.

Die Ergebnisse des Einflusses höherer Chlorprothixendosen auf leukämische Mäuse sind in der Tabelle zusammengestellt (+ = signifikante Veränderungen, ± = statistisch nicht signifikante Veränderungen, — = keine Veränderung; die Versuchsergebnisse wurden nach dem Beta-Test bewertet). Aus der Tabelle geht hervor, daß eine höhere Chlorprothixendosis die Überlebenszeit männlicher Mäuse mit der Leukämie LA-VÜFB signifikant verlängert. (Durchschnittliche Überlebenszeit der Kontrolle 9 Tage, Versuchsgruppe 11 Tage.) Das Durchschnittsgewicht der leukämischen Milzen wird bei beiden Geschlechtern herabgesetzt (Kontrolle 4,2 g-%, Versuch 2,3 g-%), auch im peripheren Blut liegen wesentlich weniger leukämische Zellen und bei den männlichen Tieren weniger Leukocyten als bei der Kontrollgruppe vor. Mäuse mit Stammzellenleukämie (L-VÜFB) sind gegenüber einer höheren Chlorprothixendosis weniger sensitiv als Mäuse mit lymphatischer Leukämie. Die Verlängerung der Überlebenszeit ist nicht signifikant. Das Gewicht der leukämischen Leber wird unter der Einwirkung von Chlorprothixen bei beiden Geschlechtern herabgesetzt. (Kontrolle 7,8 g-%, Versuch 6,4 g-%); das Gewicht der leukämischen Milzen ist bei den Weibchen wesentlich niedriger (Kontrolle 1,4 g-%, Versuch 0,9 g-%). Im peripheren Blut der Männchen nimmt die Zahl der pathologischen Stammzellen ab. Die cytologischen Untersuchungen der leukämischen Organe zeigten im Vergleich mit den Kontrollen nur eine geringe Abnahme der pathologischen Zellen bei den Versuchstieren. Niedrigere Chlorprothixendosen übten keinen Einfluß auf den Verlauf der Leukämien aus.

Aus dem Angeführten geht hervor, daß Chlorprothixen den Verlauf der beiden Leukämien LA-VÜFB und L-VÜFB mehr oder weniger verlangsamt. Ferner schwächt es einige leukämische Veränderungen ab. Die Frage des Wirkungsmechanis-

mus und der therapeutischen Verwendung von Chlorprothixen bleibt vorläufig ungeklärt.

Forschungsinstitut für Pharmazie und Biochemie, Praha 3, Kouřimská 17 (Direktor: Dr.-Ing. O. NĚMEČEK)

V. PUJMAN, J. METYŠOVÁ, S. ČERNOCHOVÁ
und H. HAMPEJZOVÁ

Eingegangen am 23. Mai 1961

1) PELLMONT, B., F. A. STEINER, H. BESENDORF, H. P. BÄCHTOLD u. E. LÄUPPI: Helv. physiol. Acta 18, 241 (1960).

Der Einfluß des Nikotinsäureamides auf die Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen und röntgenganzkörper-bestrahlten Mäusen

Von WARBURG^{1), 2)} ist darauf hingewiesen worden, daß die besondere Strahlenempfindlichkeit der Tumorzelle auf ihren geringen Katalasegehalt zurückzuführen ist. Das unter der Bestrahlung sich bildende H₂O₂ ist dann das eigentliche schädigende Agens. MAASS und RATHGEN³⁾ zeigen, daß die Hemmung der Glycolyse bestrahlter Tumoren auf einer Verminderung der stationären DPN-Konzentration beruht. Schließlich beweisen HOLZER und FRANK⁴⁾, daß die nach Applikation von H₂O₂ auftretende Glycolysehemmung parallel geht mit einer Verminderung der DPN-Konzentration. Letztere wird durch Gabe von Nikotinsäureamid wieder normalisiert.

Wir prüfen im folgenden, ob Nikotinsäureamid (NSA) auf Grund dessen eine Strahlenschutzsubstanz darstellt, d.h. sowohl am Tumor als auch am Normalgewebe. Wird der von uns verwendete Ehrlich-Ascites in Nährlösung⁵⁾ in einer Konzentration von 130 000 bis 190 000 Zellen/cm³ röntgenbestrahlt (150 kV, 20 mA, HWS: 0,4 mm Cu, Dosisleistung 1278r/min), so zeigt er bei 20 kr nach Transplantation eine Angangsrate von 56,8%. Setzen wir der Zellsuspension 0,4% NSA zu und bestrahlen anschließend, so beträgt die Angangsrate 98%. Der Schutzeffekt entspricht vollkommen dem Schutz nach Cysteamin bzw. Serotonin und ist signifikant (χ^2 -Test: $P < 0,001$)⁶⁾.

Diese Befunde bestätigen die vorausgehenden und zitierten Beobachtungen. Es stellt sich die Frage, ob die Wirkung des NSA wirklich so spezifisch für das Tumorgewebe ist. Das wäre für den Strahlentherapeuten von großem Interesse; denn wir hätten damit ein strahlensensibles Stoffwechselgeschehen, das die Tumorzelle deutlich von der Normalzelle trennt. Untersuchungen, ob NSA auch Warmblüter oder Säugetiere schützen kann, liegen bisher nicht vor. Wir führen daher entsprechende Versuche durch. Material und Methode entsprechen unseren früheren Angaben⁷⁾, die Auswertung erfolgt mit der Probit-Analyse⁸⁾. Fig. 1 gibt das Ergebnis wieder. Für die Kontrolle werden insgesamt 1059 Mäuse verwendet und im NSA-Versuch, in dem die Tiere 2×10 mg NSA/20 g Maus im Abstand von 15 Std i.p. erhalten, das letzte Mal 20 min vor der Bestrahlung, 300 Mäuse.

Es ergeben sich folgende Regressionsgleichungen und Werte für die Strahlen-DI 50:

$$\begin{aligned} \text{Kontrolle: } Y &= 19,63x - 50,11; & \text{DI } 50 &= 641,8 \pm 5,8 r \\ \text{NSA: } Y &= 19,67x - 49,39; & \text{DI } 50 &= 582,2 \pm 1,7 r \end{aligned}$$

Der Unterschied der Mittelwerte zwischen Kontrolle und NSA-Gruppe ist signifikant (P : 0,01 bis 0,001). Wir möchten annehmen, daß etwas zuviel NSA appliziert wurde und daß es sich um keine echte Zunahme der Strahlenempfindlichkeit handelt. Dafür spricht auch die Parallelität der Regressionsgeraden, deren Verlauf nicht voneinander abweicht ($P > 0,9$).

Zusammenfassend ergibt sich, daß NSA für Tumorgewebe ein Strahlenschutzstoff ist, dagegen nicht für Normalgewebe.

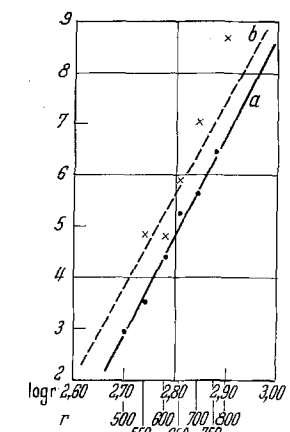


Fig. 1. Probitsatz der Letalfälle in Probit-Einheiten (Ordinate) als Funktion von $\log r$ (r = Dosis). a Kontrolle (●), b NSA (×)