Biologische Wirkungen photochemischer Wasserstoffperoxydbildung

1. Mitt.: Cytotoxische Effekte von Anthrachinonsulfonsäuren in bestrahlten Suspensionen von *Proteus vulgaris*

Von H. BERG und H.-E. JACOB

Aus der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Institut für Mikrobiologie
und experimentelle Therapie Jena (Direktor Prof. Dr. med. H. KNÖLL)

(Z. Naturforschg. 17 b, 306—309 [1962]; eingegangen am 18. November 1961)

Die photochemische H_2O_2 -Bildung wird als eine weitere Möglichkeit geprüft, um cytotoxische Effekte in der Mikrobiologie hervorzurufen. Suspensionen von *Proteus vulgaris* (SG 2), die Anthrachinonsulfonsäuren in einer Konzentration von $6 \cdot 10^{-4} m$ enthalten, werden mit Licht der Wellenlängen $> 360 m\mu$ bestrahlt und einerseits die resultierende H_2O_2 -Konzentration gemessen, andererseits die Keimzahlen zu verschiedenen Zeiten bestimmt. Unter vorliegenden Bedingungen wird eine so starke Wirkung erzielt, daß bei Versuchsende ein Bruchteil der eingesetzten Bakterien vermehrungsfähig bleibt. Aus dem Vergleich mit zugesetztem H_2O_2 wird gefolgert, daß sich die oxydationsfreudigen Radikale $\dot{O}H$ und $\dot{H}O_2$ maßgeblich an der cytotoxischen Wirkung beteiligen.

Durch grundlegende Untersuchungen der Warburg-Schule¹ wurde gezeigt, daß in der Hauptsache strahlenchemisch gebildetes Wasserstoffperoxyd für die Glykolysehemmung² von Ascites-Tumorzellen verantwortlich zu machen ist.

Einen zweiten Weg zur Erzeugung von Wasserstoffperoxyd in Zellsuspensionen gehen GLOGNER, WOLF und HOLZER³ sowie TIEDEMANN und Mitarbb.⁴, indem sie ein organisches Redoxsystem (mit positivem Redoxpotential unter „physiologischen Standardbedingungen“ z. B. Methylenblau, Naphthochinon, Phenanthrenchinon) als Wasserstoffakzeptor für die Zell-Dehydrasen zusetzen und kontinuierlich oder plötzlich durch Luftsauerstoff reoxydieren lassen. Das dabei entstehende H_2O_2 zeigte bei Ascites-Tumorzellen die erwartete Glykolysehemmung.

Nunmehr soll über einen dritten Weg: die Bildung von H_2O_2 aus einem photochemischen Kreisprozeß⁵ und die Wirkung, zunächst in einer Bakteriensuspension, berichtet werden.

Der Suspension wird ein photoreduzierbares organisches Redoxsystem (mit negativem Redoxpotential unter „physiologischen Standardbedingungen“) zugesetzt und entsprechend seiner langwelligen Absorption ($n \rightarrow \pi^*$ Übergang) belichtet. Die

entstehende reduzierte Form (Hydrochinon, Leukoverbindung) wird bekanntlich⁶ durch anwesenden Gelöstsauerstoff unter Bildung von H_2O_2 reoxydiert nach folgendem Brutto-Schema:

worin bedeuten:

Q	oxydierte Form (Chinon),
QH ₂	reduzierte Form (Hydrochinon),
Q*	angeregtes Chinon,
DH ₂	Wasserstoffdonator.

Aus Gründen der Stabilität und schnellen Photo-reduktion wurde für Q in vorliegender Mitteilung hauptsächlich Anthrachinon-2-sulfonsäure (A_2Q) verwendet. Das physiologische Standardpotential E liegt bei $-0,25 V$, das Halbstufenpotential ($\pi_{1/2}$) bei $-0,52 V$ gegen NCE in Phosphatpuffer. Als DH_2 können Alkohole, Zucker, Aminosäuren, Proteine und sogar Wasser fungieren.

Die gemeinsame Wirkung von Photosensibilisator, Licht und Sauerstoff bezeichnete RAAB⁷ als photodynamischen Effekt.

¹ a) O. WARBURG, K. GAWERN u. A.W. GEISSLER, Z. Naturforschg. 12 b, 393 [1957]. b) O. WARBURG, W. SCHRÖDER, H. GEWITZ u. W. VÖLKER, Naturwissenschaften 45, 192 [1958]. c) O. WARBURG, Naturwissenschaften 46, 25 [1959].

² H. HOLZER u. S. FRANK, Angew. Chem. 70, 570 [1958].

³ P. GLOGNER, H. P. WOLF u. H. HOLZER, Biochem. Z. 332, 407 [1960].

⁴ a) H. TIEDEMANN, H.-J. RISSE u. J. BORN, Z. Naturforschg. 13 b, 657 [1958]. b) H. TIEDEMANN u. H. J. RISSE, Z. Naturforschg. 16 b, 120 [1961].

⁵ H. BERG, Habil.-Schrift, Jena 1960.

⁶ a) TH. JAMES, I. M. SNELL u. A. WEISSENBERGER, J. Amer. chem. Soc. 60, 98, 2084 [1938]. b) D. H. PORTER, D.A.S. 1 079 604 ref. C 131, 16 859 [1960].

⁷ O. RAAB, Z. Biol. 39, 524 [1900].

Methodik und Präparate

1. Die Bestrahlung

Die Bakteriensuspensionen befanden sich in Uviolglasgefäßen, die 20 cm von der Reflektorlampe (Berliner Glühlampenwerk) im temperierten Wasserbad bestrahlt wurden.

Die Wolframlampe besaß eine mittlere Bestrahlungsleistung von $0,13 \text{ W cm}^{-2}$, wobei das Maximum im Gebiet von 500–600 m μ lag; wogegen der Anteil von Wellenlängen unter 360 m μ zu vernachlässigen war.

2. Die Anzucht der Bakterien und die Keimzahlbestimmung

Die Bakterien (*Proteus vulgaris*, SG 2) wurden auf Fleischwasseragar 16 Stdn. bei 37 °C bebrütet, abgeschwemmt, 2-mal gewaschen und mit Hilfe von Trübungsmessungen eine Suspension in m/45-Phosphatpuffer (pH 6,4) hergestellt, die etwa 1500 Keime in ml enthielt.

Die zu bestimmten Zeiten entnommenen Proben wurden auf 2-proz. Fleischwasseragar in meist 5 Parallelen nach Vortrocknung der Platten aufgespatelt und nach 20 Stdn. Bebrütung die entstandenen Kolonien ausgezählt. Die Werte zu Versuchsbeginn dienten als Grundlage für die Verwendung von Trübungsmessungen zum Einstellen der Bakteriensuspension.

3. Die Präparate

Anthrachinon-2-sulfonsaures-Na der Fa. Merck, Darmstadt, wurde in Wasser gelöst und besaß in der Bakteriensuspension eine Konzentration von $6 \cdot 10^{-4}$ molar. In der gleichen Konzentration verwendeten wir auch Anthrachinon-2.6-sulfonsaures-Na (The British Drug Houses Ltd.).

Das Katalasepräparat verdanken wir Herrn Dr. SCHÜTTE (Institut für Biochemie der Pflanzen, Halle). Die Stammlösung enthielt 0,07 mg Katalase pro ml. In den zu den entsprechenden Versuchen verwendeten Bakteriensuspensionen befanden sich im ml 0,00032 mg Katalase.

Abb. 1. Polarographische Verfolgung der H_2O_2 -Bildung durch Bestrahlung von A_2Q ($6 \cdot 10^{-4} \text{ m.}$) in Phosphatpuffer pH 7 nach 0–1–2–3 Stdn. (v. r. n. l.). Aufnahmebedingungen: Polarograph LP 55, $S=1:20$, $\Delta\pi=0,2 \text{ V}$, ab $-0,4 \text{ V}$ bis $-1,8 \text{ V}$; N_2 -Entlüftung, gegen Bodenquecksilber.

Wasserstoffperoxyd wurde nach Verdünnen einer 30-proz. Lösung (Fa. Union Chimique Belge, S.A.) verwendet.

Die Konzentration des Wasserstoffsperoxydes wurde polarographisch (Polarograph LP 55, Bezugselektrode: Bodenquecksilber) unter Verwendung einer Eichlösung bestimmt. Die Stufe des Wasserstoffperoxydes überlagert sich der des Anthrachinonsulfonats (Abb. 1).

Die H_2O_2 -Zusätze zur Bakteriensuspension (S. 308) erfolgten nach 20, 50, 80, 110 und 140 Min.; die dadurch entstandenen H_2O_2 -Konzentrationen waren $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ m.}$; $5,2 \cdot 10^{-5} \text{ m.}$; $9,2 \cdot 10^{-5} \text{ m.}$; $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ m.}$ und $2,1 \cdot 10^{-4} \text{ molar}$.

Ergebnisse

1. Vorversuche zur photochemischen H_2O_2 -Bildung

Zunächst wurde unter verschiedenen Bedingungen die H_2O_2 -Bildung nach Gln. (1–3) studiert. Wie aus der Tab. 1 ersichtlich wird mit Isopropanol als Wasserstoffdonator nach 3 Stdn. Bestrahlung eine H_2O_2 -Konzentration $> 10^{-3} \text{ m.}$ erreicht, während in rein wäßriger Lösung nur $\frac{1}{10}$ davon entsteht. Befinden sich zusätzlich Bakterien oder Proteine in der Lösung, so ist die Ausbeute an H_2O_2 niedriger, da es bei der Oxydation z. B. von Aminosäuren⁸ verbraucht wird.

Lösung	$\cdot 10^{-4} - \text{m.}$	c_0	c_1	c_2	c_3
$\text{A}_2\text{Q} + \text{Isopr. (5\%)}$		0	5	9	14
$\text{A}_2\text{Q} + \text{Isopr. (5\%)}$ + Bakterien		0	4,5	7,5	11
$\text{A}_2\text{Q} + \text{H}_2\text{O}$		0	0,7	0,9	1,15
$\text{A}_2\text{Q} + \text{H}_2\text{O} +$ Bakterien		0	0,65	0,87	1,1
$\text{A}_2\text{Q} + \text{H}_2\text{O} +$ Serumalbumin (0,6 mg/ml)		0	0,3	0,45	0,6

Tab. 1. H_2O_2 -Bildung unter verschiedenen Bedingungen nach 1–2–3 Stdn. Bestrahlung.

Die Stabilität von zugesetztem H_2O_2 wurde im Dunkeln und bei Bestrahlung in getrennten Versuchsreihen geprüft. Danach ist es in der Versuchsdauer von 3 Stdn. praktisch stabil außerhalb der Meßzelle, während sein Zerfall in Gegenwart von Quecksilber durch Extrapolation der Stufenhöhe auf den Beginn

⁸ a) L. WEIL u. A. R. BUCHERT, Arch. Biochem. Biophysics **34**, 1 [1951]. b) R. PRAUS, J. PROTIVA u. J. DYR, Coll. czechoslov. chem. Comm. **24**, 1091 [1959].

der Entlüftung (5 – 10 Min. Dauer) berücksichtigt werden muß.

2. Bestrahlung von Bakterien-suspensionen

Kontrollversuche zeigten, daß die Bestrahlung allein ebenso wie das Chinon (Suspension im Dunkeln aufbewahrt) während der Versuchsdauer keine Verringerung der Keimzahl zur Folge hatte. Mitunter konnte in diesen Proben eine geringfügige Zunahme der Bakterienzahl festgestellt werden. Ursache dafür können Restteilungen sein.

Die Bestrahlung von Bakteriensuspensionen mit A_2Q führte zu einer Abnahme der Zahl der vermehrungsfähigen Keime, abhängig vom Abstand der Lichtquelle, Temperatur und dem p_H -Wert. Nach einer Latenzzeit von etwa einer halben Stde., die wohl z. T. durch die Katalase der Bakterien bedingt ist, nimmt die Wirkung des photochemisch entstandenen H_2O_2 zu und erreicht nach zwei Stdn. ihr volles Ausmaß. Die Verminderung der relativen Keimzahl bei verschiedenen Bestrahlungsbedingungen

Abb. 2. Abnahme der Zahl der vermehrungsfähigen Bakterien (bei 35 °C, p_H 6,4). 1. Bei 50 cm Lampenabstand (Mittelwert aus 4 Versuchen). 2. Bei 20 cm Lampenabstand (Mittelwert aus 20 Versuchen).

zeigt Abb. 2; nach 3 Stdn. waren bei einem Bestrahlungsabstand von 20 cm * $\sim 90\%$ der Keime nicht mehr vermehrungsfähig.

3. Vergleichende Wachstums-hemmung durch H_2O_2 -Zugabe

Um zu entscheiden, ob der cytotoxische Effekt allein vom H_2O_2 ausgeht, wurden entsprechende Zusätze zu Bakteriensuspensionen gegeben und diese bestrahlt oder im Dunkeln aufbewahrt.

Die Zugaben wurden so gewählt, daß die Verminderung der Keimzahl etwa der in der Suspension mit A_2Q entsprach. Die Ergebnisse im Vergleich zur bestrahlten chinonhaltigen Bakteriensuspension enthält Tab. 2.

- Um eine vergleichbare Wirkung wie bei der Bestrahlung von A_2Q zu bekommen, muß bei einer Versuchsdauer von 3 Stdn. die H_2O_2 -Zusatzkonzentration einen beträchtlich höheren Wert erreichen, wie sie im Falle der Chinonbestrahlung nachgewiesen wurde.
- Die cytotoxische Wirkung des zugesetzten H_2O_2 war bei Bestrahlung wesentlich besser als im Dunkeln.

4. Beeinflussung durch Zusätze zur Bakteriensuspension

Durch Zusatz von Katalaselösung in der oben angegebenen Konzentration konnte die cytotoxische Wirkung völlig aufgehoben werden. Zugabe von Glutamat zur Bakteriensuspension hatte eine Verzögerung der Keimzahlabnahme zur Folge. In der nicht belichteten Kontrollprobe stieg jedoch mitunter die Keimzahl etwas an, was auf Restteilungen zurückgeführt werden kann.

Bestrahlungs-zeit [Stdn.]	Bestrahlung mit A_2Q		H_2O_2 -Zusätze		
	gebildetes H_2O_2 ($\cdot 10^{-4} \cdot m \cdot$)	relative Keimzahl ¹ [%]	Konzentration H_2O_2 [$\cdot 10^{-4} \cdot m \cdot$]	relative Keimzahl ²	
				bei Bestrahlung [%]	im Dunkeln [%]
0	0	100	0	100	100
1	0,65	77	0,5	88	96
2	0,87	36	0,9	50	73
3	1,1	8	2,1	13	40

Tab. 2. H_2O_2 -Konzentration und Keimzahl (35 °C). ¹ Mittel aus 20 Versuchen. ² Mittel aus 7 Versuchen.

* Für den Hauptteil der Versuche wurde dieser Abstand eingehalten.

Diskussion

Der photodynamische Effekt von Anthrachinon und seinen Sulfonsäuren beruht in erster Linie auf deren ausgeprägter Fähigkeit zur H_2O_2 -Bildung. Eine Schädigung der Zelle infolge photosensibilisierter selektiver Oxydation von Aminosäuren (Histidin, Tyrosin, Tryptophan und Cystin) u. a. Zellbestandteile, wie sie von PRAUS, PROTIVA und DYR^{8b} erwähnt wird, dürfte kaum ins Gewicht fallen, da durch Katalasezusatz die Wirkung aufgehoben werden kann.

Das photochemisch gebildete Wasserstoffperoxyd hat in der Bakteriensuspension anscheinend eine beträchtlich höhere Wirkung als das zugesetzte. Wir schließen daraus, daß die Zwischenprodukte der Bildung (und des Zerfalls) von H_2O_2 die schädigenden Agenzien sind. Wenn wir die jüngsten Ergebnisse der Radikalchemie⁹ für vorliegenden Fall in Betracht ziehen, so sind zunächst Gl. (2) und (3) für den Bildungsprozeß aufzuteilen in:

Das relativ langlebige Radikal $\dot{\text{H}}\text{O}_2$ entsteht ebenfalls durch Bestrahlung von H_2O_2 :

und ist zu folgenden Weiterreaktionen fähig:

Das kurzlebige $\dot{\text{O}}\text{H}$ -Radikal entsteht auch mit Was-

ser als Donator:

und kann in der Dunkelreaktion

kombinieren und weiter nach Gl. (5) in $\dot{\text{H}}\text{O}_2$ übergehen.

Auch die Ergebnisse von WARBURG (vergl. Tab. in l. c.^{1b}) lassen eine Mitwirkung von Radikalen vermuten, weil zum Hervorrufen des gleichen schädigenden Effektes eine größere Menge Peroxyd zugegeben werden mußte als durch die Bestrahlung entstanden war. — Da sich in unseren Versuchen bestrahltes H_2O_2 als wirksamer erweist als unbestrahltes (Tab. 2), dürften auch hierfür Radikale nach Gl. (4) und (5) verantwortlich zu machen sein.

In diesem Zusammenhang muß auch der Hinweis von TIEDEMANN und RISSE⁴ erwähnt werden. Sie ziehen bei der Autoxydation des Hydrochinons, die ebenfalls nach einem Radikalmechanismus verläuft, eine direkte Oxydation von Zellbestandteilen durch reaktionsfähige Radikale in Betracht. Aus unseren bisherigen Ergebnissen läßt sich eine Mitwirkung von Semichinon-Radikalen allerdings nicht erkennen, da Katalase auf sie keinen Einfluß haben dürfte.

Wenn wir nunmehr annehmen müssen, daß beim Auslösen des cytotoxischen Effektes $\dot{\text{O}}\text{H}$ - und $\dot{\text{H}}\text{O}_2$ -Radikale maßgeblich beteiligt sind, so drängt sich im Hinblick auf die Wirkung der Katalase die Vermutung auf, daß sie nicht nur H_2O_2 spaltet, sondern bereits die Radikalwirkung hemmt.

Die Ergebnisse über die cytotoxische Wirkung auf andere Bakterienstämme sowie Ascites-Tumorzellen sollen in den folgenden Mitteilungen dargestellt werden.

Für förderndes Interesse danken wir Herrn Prof. Dr. H. KNÖLL, für die technische Mitarbeit Frau HAMANN und Frl. ZEH.

⁹ The Fifth International Symposium on Free Radicals, Verlag Almqvist und Wiksell, Uppsala 1961.

⁹ H. R. PETRI, Naturwiss. Rdsch. 14, 26 [1961].