

## Über die Wirkung von Phenanthrenchinon (9,10) und einer wasserlöslichen Transportform auf Glykolyse und Atmung des Ascites-Tumor

Im Rahmen von Versuchen über die Einwirkung von Chinonen auf Glykolyse und Atmung von Ehrlichs Mäuse-Ascites-Tumor<sup>1,2</sup> wurden unter anderem Phenanthrenchinon (9, 10) und das in Wasser leicht lösliche Hydrobromid des Phenanthrenhydrochinon (9,10)-bisglycyl-esters untersucht. Beide Substanzen erwiesen sich als sehr wirksame Glykolysehemmstoffe; bei Konzentrationen von  $1 \cdot 10^{-5}$  M/l Chinon oder Ester im Aussenmedium fällt die Glykolyse innerhalb kurzer Zeit auf geringe Werte ab.

In Abbildung 1 ist das Verhalten von Atmung und Glykolyse bei einem Versuch mit Phenanthrenchinon dargestellt. Während des Absinkens der Glykolyse wird ein Atmungsanstieg auf das Dreifache des Normalwertes beobachtet (Diagramm a); der gleiche Anstieg wurde auch in Phosphatpuffer mit KOH im Einsatz gemessen. Nach 10 min klingt der Atmungsanstieg bereits wieder ab und die Atmung sinkt unter den Wert der Kontrolle. In nicht glykolysierenden Zellen (Diagramm b) fällt dagegen die endogene Atmung unter der Einwirkung des Chinons ohne vorherigen Anstieg langsam und stetig ab.

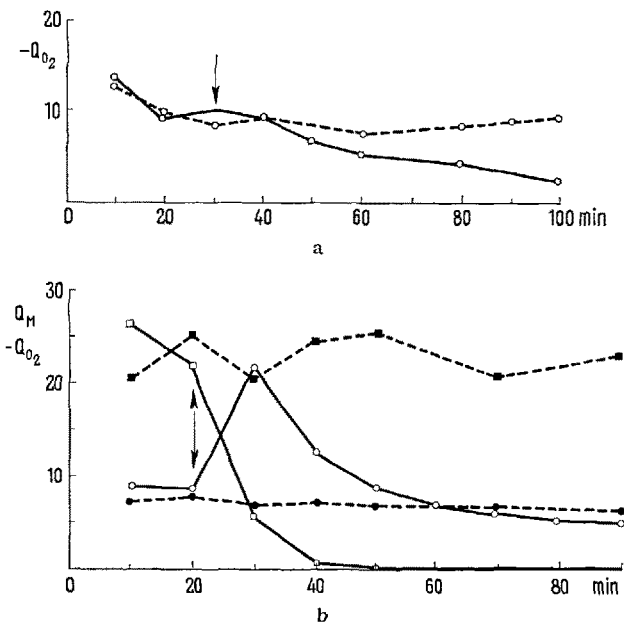


Abb. 1. Einwirkung von Phenanthrenchinon ( $1 \cdot 10^{-5}$  M/l) auf Atmung und Glykolyse

- a) Aerobe Glykolyse und Glukoseatmung
- Glykolyse mit Chinon
  - Glykolyse Kontrolle
  - Atmung mit Chinon
  - Atmung Kontrolle
- b) Endogene Atmung
- mit Chinon
  - - - Kontrolle

60 mg Zellen/Ansatz (Gefäßpaarmethode) in Ringer-Bikarbonat; 4 min mit 5%  $CO_2$ /Luft durchströmt. Chinon wird aus der Birne eingekippt (Pfeil). Temperatur  $37^\circ$

Zur genaueren Untersuchung dieser Vorgänge wurden die Nukleotide Adenosinriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP), Adenosinmonophosphat (AMP) und Diphosphopyridinnukleotid (DPN), das anorganische

Phosphat sowie die Glykolysezwischenprodukte Glukose-6-Phosphat (G-6-P), Hexosediphosphat (HDP) und die Triosephosphate unter verschiedenen Bedingungen und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit dem Chinon bestimmt. Die Bestimmung der Nukleotide und der Zuckerphosphate erfolgte nach der Methode der optischen Tests von Warburg, wobei neutralisierte Perchlorsäure-extrakte aus den Ansätzen untersucht wurden.

Die Ergebnisse der Nukleotidbestimmungen zeigt Abbildung 2. Der ATP-Gehalt glykolysierender Zellen fällt nach  $2\frac{1}{2}$  min Phenanthrenchinoneinwirkung um etwa 40% ab, während ADP um 60% ansteigt (a). Ohne Glukose erfolgt praktisch kein ATP-Abfall und kein ADP-Anstieg (b). Nach 10 min ist im glykolysierenden System ATP nahezu verschwunden<sup>3</sup>, der ADP-Spiegel etwa gleich dem Kontrollwert; AMP ist um 70% angestiegen (c). Ohne Glukose sind die Unterschiede gegenüber den Kontrollen

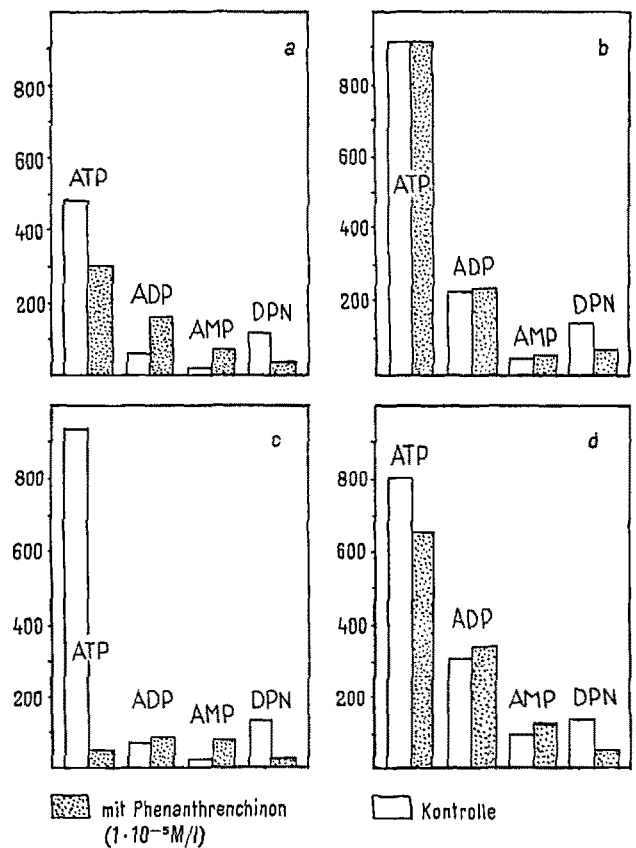


Abb. 2. Nukleotid-Gehalte in  $\gamma/1000$  mg Frischgewicht

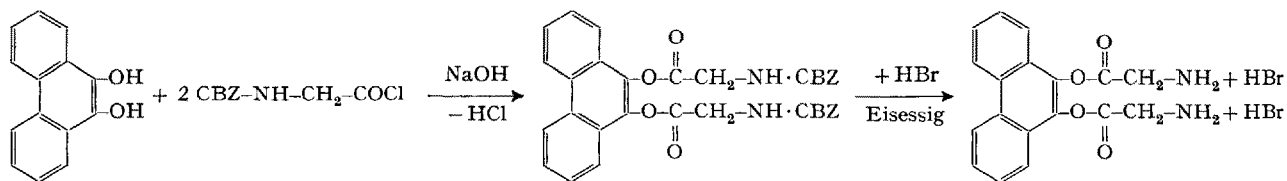
- a) mit Glukose 0,2%; Inkubation  $2\frac{1}{2}$  min  
b) ohne Glukose; Inkubation  $2\frac{1}{2}$  min  
c) mit Glukose 0,2%; Inkubation 10 min  
d) ohne Glukose; Inkubation 10 min

Ca. 1500 mg Zellen/Ansatz in Ringer-Bikarbonat 4 min mit 5%  $CO_2$ /Luft durchströmt, in Erlenmeyer-Kolben geschüttelt. Gesamtvolumen 75 ml; Temperatur  $37^\circ$ . Zellen nach Inkubation 3 min bei  $20^\circ C$  und niedriger Tourenzahl abzentrifugiert, mit 10%  $HClO_4$  extrahiert

<sup>1</sup> H. TIEDEMANN, H. J. RISSE und J. BORN, Z. Naturf. 13b, 657 (1958).

<sup>2</sup> H. TIEDEMANN und J. BORN, Biochim. biophys. Acta 27, 656 (1958). – H. TIEDEMANN und J. BORN, Z. Naturf. 13b, 268 (1958).

<sup>3</sup> Bei Versuch I, II und IV ist die Summe ATP + ADP + AMP in den Ansätzen mit Chinon gleich der Summe in den Kontrollen. Wo die Differenz bei Versuch c herrührt, bleibt noch ungeklärt.



ohne Chinon auch nach 10 min nicht gross (d)<sup>4</sup>. DPN fällt schon nach 2 1/2 min (auch ohne Glukose) stark ab.

In glykolysierenden Ansätzen kommt es zu einer starken Anhäufung von HDP (um das Zehnfache) und Triosephosphaten (um das Vier- bis Fünffache), während G-6-P nur verdoppelt wird. Gleichzeitig verschwindet das anorganische Phosphat zu 80%.

Das Absinken des DPN bei allen Versuchen lässt vermuten, dass hier der Angriff des Chinons erfolgt. In glykolysierenden Zellen wird die Reaktionskette durch den DPN-Mangel auf der Stufe der Glycerinaldehydphosphatdehydrierung gebremst. Da jedoch die phosphorylierenden Reaktionen der Glykolyse (Hexokinase- und Phosphofruktokinase-Reaktion) nicht oder nur wenig gehemmt sind, wird ein grosser Teil des anorganischen Phosphates und das endständige Phosphat von ATP in den Hexose- und Triosephosphaten festgelegt. Ausserdem wird auch vom ADP über eine Myokinase-Reaktion Phosphat an die Glykolyse abgegeben. Hierfür spricht, dass die ADP-Erhöhung nach längerer Inkubation wieder zurückgeht (Abb. 2, c).

Mit diesem Mechanismus steht in Übereinstimmung, dass in nicht glykolysierenden Zellen nur ein geringer ATP-Abfall beobachtet wird und die ADP-Konzentration nicht ansteigt (Abb. 2, b). In glykolysierenden Zellen kann die oben beschriebene Atmungssteigerung durch die Erhöhung der ADP-Konzentration erklärt werden, da ADP nach CHANCE<sup>6</sup> die Atmungskontrolle ausübt.

In intakten Zellen wird Phenanthrenchinon offenbar über einen anderen Mechanismus wirksam als Menadion (2-Methyl-1,4-Naphthochinon) in Homogenaten bei Überschuss von DPN. Bei Versuchen mit Homogenaten wurden die Enzyme Hexokinase und Phosphohexokinase am stärksten gehemmt<sup>1,6</sup>. Von HOLZER *et al.*<sup>7</sup> konnte die Hemmwirkung von Äthyleniminochinonen ebenfalls mit einer DPN-Abnahme in Zusammenhang gebracht werden.

Bei Gefässpaarversuchen mit *Ascites*serum als Inkubationsmedium zeigte sich Phenanthrenchinon und auch der Bisglycylester im Gegensatz zum Menadion ebenso wirksam wie in Ringer-Bikarbonat-Lösung. Anscheinend tritt die allgemeine Reaktion mit Proteinen (Oxydation von SH-Gruppen, Anlagerung) gegenüber der spezifischen Reaktion auf den Stoffwechsel zurück. Da die Chinone in den Zellen akkumuliert werden, hängt die Hemmwirkung aber von der Zellkonzentration im Versuchsansatz ab.

Da unter physiologischen Verhältnissen, wie WARBURG<sup>8</sup> erstmalig fand, nur Tumorzellen (und Netzhaut) stark glykolysieren, könnte auf Grund des dargelegten Mechanismus eventuell eine gewisse Selektivität für Tumorzellen vorhanden sein. Doch hängt diese natürlich noch von anderen Faktoren wie der Verteilung im Organismus und der Aufnahmegeschwindigkeit in die verschiedenen Zellarten ab. Eine chemotherapeutische Wirkung von Phenanthrenchinon auf Mäusetumoren wurde von POWELL<sup>9</sup> sowie von LEITER *et al.*<sup>10</sup> beobachtet. LEHMANN<sup>11</sup> fand bei Tubifex-Eiern eine sehr starke antimittotische Wirksamkeit.

Der bisher noch nicht dargestellte Bisglycylester wurde durch Umsetzung von Phenanthrenhydrochinon (9,10) mit Carboxybenzyl (CBZ)-glycylchlorid und Abspaltung des CBZ-Restes mit 1 *n* HBr in Eisessig dargestellt.

Die mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgesellschaft ausgeführten Untersuchungen werden fortgesetzt.

H. TIEDEMANN und H. J. RISSE

Heiligenberg-Institut (Abt. O. Mangold) und Chemisches Laboratorium der Universität Freiburg i. Br., 12. Januar 1960.

### Summary

Phenanthrenchinon (9,10) and hydrochinon-bis-glycyl-ester prepared as water-soluble 'transportform', are strong inhibitors of glycolysis. Glycolysing cells are depleted from ATP in a few minutes.

<sup>4</sup> Inwieweit durch Phenanthrenchinon die oxydative Phosphorylierung entkoppelt wird, bedarf weiterer Untersuchungen.

<sup>5</sup> B. CHANCE, Int. Symp. Enz. Chemistry, Tokyo (1957), p. 9.

<sup>6</sup> O. MEYERHOF und L. O. RANDALL, Arch. Biochem. 17, 171 (1948).

<sup>7</sup> H. HOLZER, P. GLOGNER und G. SEDLMAYER, Biochem. Z. 330, 59 (1958).

<sup>8</sup> O. WARBURG, Über den Stoffwechsel der Tumoren (Berlin 1926).

<sup>9</sup> A. K. POWELL, Brit. J. Cancer 5, 264 (1951).

<sup>10</sup> J. LEITER, J. L. HARTWELL, J. S. KAHLER, I. KLINE und M. J. SHEAR, J. nat. Cancer Inst. 14, 365 (1953).

<sup>11</sup> F. E. LEHMANN, Exper. 3, 223 (1947). – Schweiz. Z. Path. Bakt. 14, 487 (1951).

## Effect of the Glucagon on the Plasma Insulin-Activity after Hypophysectomy

It is unquestionable that the hypophysis plays an important part as regards the insulenic effect of plasma. RANDLE<sup>1</sup> has pointed out the existence of very high values for the insulenic effect of the plasma in acromegaly, and CANDELA *et al.*<sup>2</sup> and other authors have confirmed this. On the other hand, RANDLE and YOUNG<sup>3</sup> have demonstrated that the plasma of hypophysectomized rats does not show any insulenic effects; and RANDLE<sup>4</sup> has observed that the insulenic effect of the plasma is very low in cases of hypopituitarism (human).

The experiments reported here were aimed at ascertaining whether the disappearance of the insulenic effect of the plasma has a constant course, in alloxan and pancreatectomized diabetes, and whether the treatment with glucagon has some influence on the disappearance of the plasma insulin effect following hypophysectomy.

**Methods.** The plasma insulin effect is determined in the following cases:

1. Normal rats (both sexes). 2. Alloxan diabetes. 3. Pancreatectomized diabetes. 4. Hypophysectomized rats. 5. Hypophysectomized rats treated with glucagon.

<sup>1</sup> P. J. RANDLE, Lancet 1954, 441.

<sup>2</sup> J. L. R-CANDELA, Y. VALLADARES, and R. R-CANDELA, Rev. esp. Enf. del Aparato Dig. y de la Nutr. 15, 48 (1956).

<sup>3</sup> P. J. RANDLE and F. G. YOUNG, J. Endocrin. 13, 335 (1956).

<sup>4</sup> P. J. RANDLE, Lancet 1954, 809.