

Der Einfluss von 4-Benzylhydroxy-3,5-dijodbenzoesäure auf die oxydative Phosphorylierung von Leber- und Tumormitochondrien

Die Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung durch Nitro- und Halo-Phenole, einschliesslich der jodierten Phenole der Schilddrüse vom Typ des Thyroxin und des Trijodthyronin, ist im letzten Jahrzehnt an isolierten Mitochondrien sehr eingehend untersucht worden. Im intakten Organismus kann man mittels Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung interessanterweise eine beträchtliche Tumorstillstandshemmung erzielen. Der erste experimentelle Beweis dafür wurde am Beispiel des L-3',3,5-Trijodthyronin erbracht^{1,2}. – Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung *in vivo* bedeutet verminderte biologische Utilisierung der Atmungsenergie. Allem Anschein nach sind bösartige Geschwülste wegen ihres raschen Gewebezuwachses, der damit verbundenen erhöhten Syntheseleistungen und Energiebedürfnisse gegen Störungen der oxydativen Phosphorylierung, wie sie durch Entkopplersubstanzen herbeigeführt werden können, besonders empfindlich und reagieren darauf mit einer Wachstumshemmung.

In Fortführung unserer Arbeiten über die Beeinflussung der oxydativen Phosphorylierung durch Entkopplersubstanzen unter besonderer Berücksichtigung des Tumorstoffwechsels untersuchten wir die Wirkung von 4-Benzylhydroxy-3,5-dijodbenzoesäure auf Mitochondrienpräparationen. Diese Verbindung – der Benzyläther des Halo-Phenols *p*-Hydroxy-3,5-dijodbenzoesäure ist als stärkster Antagonist der Thyroidhormone bekannt, wirkt aber gleichzeitig als merklicher Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung^{3,4}.

Auf Grund früherer Beobachtungen, dass Chlorpromazin unterschiedlich auf die oxydative Phosphorylierung isolierter Leber- und Yoshida-Sarkom-Mitochondrien derselben Tiere einwirkt⁵, verwendeten wir für die vorliegenden Versuche ebenfalls Leber- und Walkertumorgewebe der gleichen Tiere.

Auf 10 ca. 200 g schweren männlichen Sprague-Dawley-Ratten wurde das subkutan transplantierte Walker-Carcinosarkom 256 10 Tage gehalten, darauf herauspräpariert und in der gleichen Weise wie die Lebern der Tiere in 0,25M Saccharose/0,001M Äthylendiamintetraessigsäurelösung mit einem Teflonrotor homogenisiert. Die Isolierung der Mitochondrien erfolgte nach der Methode von HOGBOOM, SCHNEIDER und PALLADE⁶. Zur Bestimmung der P/O-Quotienten wurde die Atmung in einer WARBURG-Apparatur gemessen und die Phosphorylierung nach FISKE und SUBBAROW⁷ ermittelt. Die Stammlösungen enthielten pro ml Mitochondriensuspension die Mitochondrien von 1 g Leber bzw. 2 g Tumor.

Die Kurvenpunkte der Figuren 1 und 2 stellen die Mittelwerte aus jeweils 5 Messungen dar (Maßstab zwischen $10^{-5}M$ und $10^{-4}M$ verdoppelt). In der Tabelle

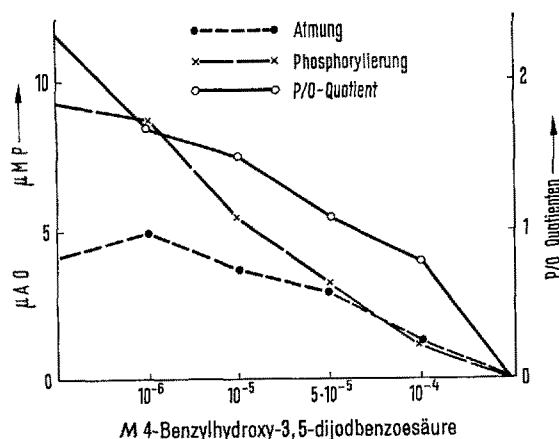


Fig. 1. Die Einwirkung von 4-Benzylhydroxy-3,5-dijodbenzoesäure auf die Atmung, Phosphorylierung und die P/O-Quotienten isolierter Lebermitochondrien. Das Warburg-Medium hatte folgende Zusammensetzung: Tris-Puffer 0,02 M, pH 7,4; Orthophosphat 0,02 M, pH 7,4; Kaliumchlorid 0,02 M; Magnesiumchlorid 0,008 M; Glucose 0,025 M; Glutamat 0,01 M; Adenosintriphosphat 0,001 m; Cytochrom c 0,00001 M; Hexokinase 50 M.K.E.; Saccharose 0,05 M; Mitochondrien von 200 mg Leber; Endvolumen 1 ml; Innenraum 0,1 ml Kaliumhydroxyd; Gasphase Luft; Versuchsdauer 15 min bei 30°C.

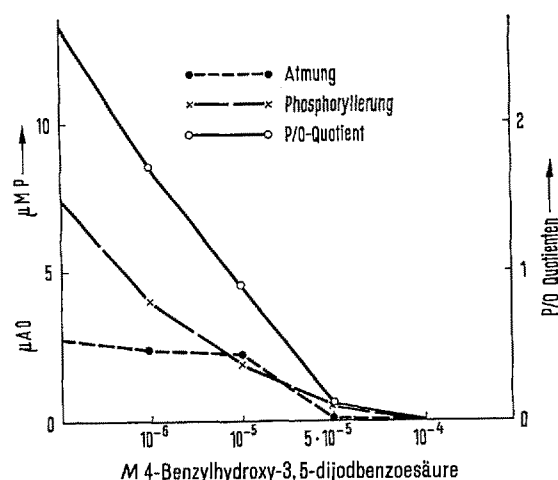


Fig. 2. Einwirkung von 4-Benzylhydroxy-3,5-dijodbenzoesäure auf die Atmung, Phosphorylierung und die P/O-Quotienten isolierter Mitochondrien des Walker-Carcinosarkoms 256. Das Warburg-Medium enthielt auch obige Substanzen, aber die Mitochondrien von 400 mg Tumor, zusätzlich 0,001 M Nicotinamid-adenin-dinukleotid und 0,01 M Natriumfluorid.

Tabelle der P/O-Quotienten

4-Benzylhydroxy-3,5-dijodbenzoesäure	ohne	$10^{-6}M$	$10^{-5}M$	$5 \cdot 10^{-5}M$	$10^{-4}M$
Lebermitochondrien	2,3 ± 0,24	1,8 ± 0,25	1,5 ± 0,39	1,1 ± 0,26	0,8 ± 0,28
Tumormitochondrien	2,7 ± 0,14	1,7 ± 0,01	0,9 ± 0,01	0,1 ± 0,0	0,0

¹ G. BACIGALUPO, Vopr. Onkol. 5, 171 (1959).

² G. BACIGALUPO, W. LÜHRS und E. HEISE, Acta biol. med. germ. 2, 455 (1959).

³ S. H. MUDD, J. H. PARK und F. LIPMAN, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 41, 571 (1955).

⁴ H. WAND und G. BACIGALUPO, Nature, im Druck (1964).

⁵ G. BACIGALUPO, K. RIECHE und H. WAND, in Bericht über den III. Intern. Kongress für Chemotherapie (Verlag G. Thieme, Stuttgart 1964), Beitrag E-34, p. 419.

⁶ G. H. HOGBOOM, W. C. SCHNEIDER und G. E. PALLADE, J. biol. Chem. 172, 619 (1948).

⁷ C. H. FISKE und Y. SUBBAROW, in S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN, Methods in Enzymology (Academic Press, New York 1957), Bd. 3, p. 843.

haben wir die P/O-Quotienten der Leber- und Tumormitochondrien und ihre Streubreite aufgeführt.

Vergleicht man die P/O-Quotienten, so kann man bemerken, dass bei zunehmender Konzentration von 4-Benzylhydroxy-3, 5-dijodbenzoesäure die P/O-Quotienten der Tumormitochondrien sich wesentlich schneller verringern als die der Lebermitochondrien. Die P/O-Quotienten der Tumormitochondrien betragen bei einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-6} M$ nur noch 0,1 und bei $10^{-4} M$ sind sie gleich Null, dagegen liegen die P/O-Quotienten der Lebermitochondrien bei einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-6} M$ und bei $10^{-4} M$ noch über bzw. knapp unter 1.

Diese Ergebnisse, die die früher mit Chlorpromazin gemachten Erfahrungen prinzipiell bestätigen, lassen den Schluss zu, dass der oxydative Energiestoffwechsel von

Tumorgewebe durch Chemotherapeutika selektiv beeinflusst werden kann.

Summary. The effects of 4-benzylhydroxy-3, 5-diiodobenzoic acid on isolated mitochondria of WALKER carcinosarcoma 256 and liver tissue of the same animals were compared. It was shown that, by the same concentrations of the uncoupling halo-phenol, the oxidative phosphorylation of tumor mitochondria was impaired in a higher degree than that of liver mitochondria.

G. BACIGALUPO und H. WAND

Abteilung für experimentelle und klinische Chemotherapie, Robert-Rössle-Klinik, Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Berlin-Buch (DDR), 27. Mai 1964.

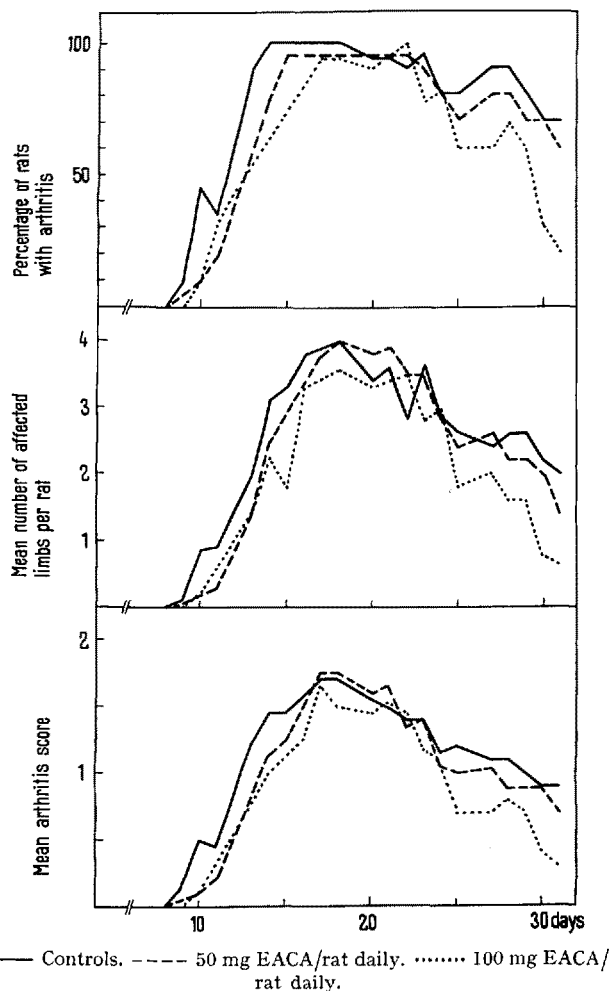
The Effect of ϵ -Aminocaproic Acid on Adjuvant Arthritis in Rats

ϵ -Aminocaproic acid (EACA) is known, and clinically used, as an inhibitor of the activation of profibrinolysin¹⁻⁴, but its immunologic properties have hitherto received only slight attention. EACA inhibits the tuberculin reaction of the skin⁵ and lengthens the survival time of homografts^{6,7}. Antigen-antibody reactions *in vitro* may also be inhibited by EACA⁸, and the acid suppresses experimental allergic encephalomyelitis in rabbits⁹. The present study is concerned with the effect of EACA on adjuvant arthritis.

White adult male laboratory rats weighing 240-300 g were used as the test animals. Arthritis was induced by two simultaneous injections (0.05 + 0.05 ml) of heat-killed, dried *Mycobacterium phlei* suspended in paraffin oil at a concentration of 6 mg/ml. Injections were made intradermally in the tail, one-third from the proximum. Daily subcutaneous injections of EACA (Epsikapron®, Kabi, 100 mg/ml), were started three days before the administration of the adjuvant, and continued to the end of the experiment. The control rats were injected with 1.0 ml of physiologic saline. The development of arthritis was observed from day to day, and the degree of arthritis was scored from 0 to 3 according to the swelling and erythema in the joints, each limb separately. The mean score for each day was calculated from the scores of the maximally affected limb in every rat. The mean number of affected limbs per rat, and the mean number of rats with arthritis were also calculated. Rats which failed to develop arthritis were included in the calculations. Half the animals were bled and killed on the 24th day after the injection of the adjuvant, and the rest on the 31st day. Blood specimens

were centrifuged, the sera removed and stored at $-20^{\circ}C$ for serologic studies. These will be reported later.

The results of the current study (Figure and Table) showed that EACA could not completely inhibit the



Development of adjuvant arthritis in rats during treatment with EACA.

¹ N. ALKJAERSIG, A. P. FLETCHER, and S. SHERRY, *J. biol. Chem.* **234**, 832 (1959).

² S. OKAMOTO, *Keio J. Med.* **8**, 211 (1959).

³ A. EDLEN, *Svenska Läkartidn.* **60**, 259 (1963).

⁴ J. H. LEWIS, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **114**, 777 (1963).

⁵ E. D. LOWNEY, *J. inv. Derm.* **42**, 243 (1964).

⁶ A. BERTELLI and G. FRONTINO, *Nature* **197**, 510 (1963).

⁷ R. W. GILLETTE, A. FINDLEY, and H. CONWAY, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **112**, 964 (1963).

⁸ W. A. ATCHLEY and N. V. BHAGAVAN, *Science* **138**, 528 (1962).

⁹ R. WÜTHRICH, H. P. RIEDER, and G. RITZEL, *Exper.* **19**, 421 (1963).