

## Silymarin – ein Hemmstoff der Meerrettichperoxidase

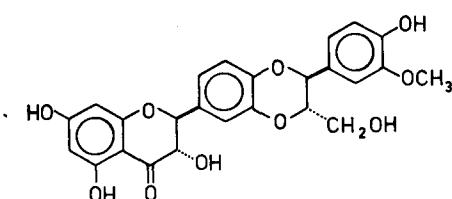
## Silymarin – an inhibitor of horseradish peroxidase

A. Greimel und H. Koch

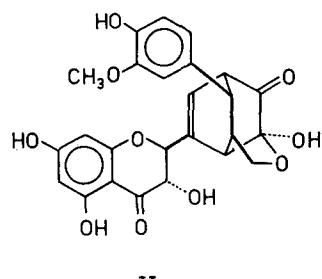
Pharmazeutisch-Chemisches Institut der Universität Wien, Währingerstrasse 10, A-1090 Wien (Österreich),  
17. Februar 1977

**Summary.** Silybin and silychristin non-competitively inhibit the horseradish peroxidase in vitro. Silydianin on the other hand is a competitive inhibitor of the enzyme.

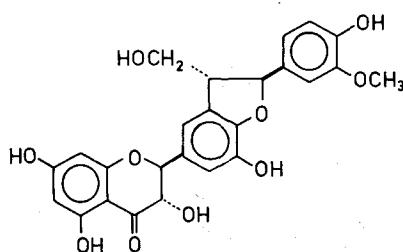
Im Rahmen unserer Untersuchungen zur Funktion von Silymarin<sup>1</sup> in der Pflanze konnten wir zeigen, dass dessen Hauptkomponenten Silybin (I), Silydianin (II) und Silychristin (III) den Sauerstoffhaushalt von pflanzlichen Geweben in signifikanter, dosisabhängiger Weise verändern<sup>2</sup>. Aufgrund dieses Befundes stellten wir die Hypothese auf, dass I-III in Pflanzen mit einem oder mehreren Enzymen des oxydativen Stoffwechsels interferieren. Eine essentielle Rolle im Stoffwechselgeschehen von Pflanzen spielen Peroxidasen. Diese greifen sowohl in den Katabolismus von phenolischen Naturstoffen als auch in den des primären Phytohormons Indolessigsäure (IAA) ein<sup>3</sup>. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, die vermutete Interaktion<sup>2</sup> zwischen den Polyphephenolen I-III und einem der Indolessigsäure-Oxidase (IAA-Oxidase) verwandten Enzym, der Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP)<sup>4</sup>, anhand einer Modellreaktion mit einem einfachen Substrat (Guajacol) weiter abzusichern<sup>5</sup>.



I



II



III

Strukturen von Silybin (I), Silydianin (II) und Silychristin (III).

**Material und Methodik.** Zur Anwendung kamen wasserlösliche Derivate von I-III (Na-Salze der Dihemisuccinate), die sich bei der DC als einheitlich erwiesen<sup>6</sup>, sowie die im Handel erhältliche Meerrettichperoxidase (E.C.1.11.1.7), Reinheitsgrad II (Boehringer, Mannheim). Lösungen des Enzyms (1 mg HRP/ml Puffer) sowie steigende Mengen des Substrates und der Effektoren I-III (Figuren 1-3) wurden mit Puffer (0,1 M K-phosphat, pH 7,0) auf 2,96 ml ergänzt und bei 25°C inkubiert. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 0,04 ml

1. B. Janiak und R. Hänsel, Planta med. 8, 71 (1960). – H. Wagner, L. Hörrammer und R. Münster, Naturwissenschaften 52, 305 (1965). – H. Wagner, P. Diesel und M. Seitz, Arzneimittel-Forsch. 24, 466 (1974). – A. Pelter und R. Hänsel, Chem. Ber. 108, 790 (1975). – R. Hänsel, J. Schultz und A. Pelter, Chem. Ber. 108, 1482 (1975). – H. Wagner, O. Seligmann, M. Seitz, D. Abraham und J. Sonnenbichler, Z. Naturforsch. 31b, 876 (1976).
2. H. Koch, Experientia 31, 281 (1975); 31, 1283 (1975). A. Greimel und H. Koch, Biochem. Physiol. Pflanzen 171, 419, 425 (1977).
3. A. W. Galston, J. Bonner und R. S. Baker, Archs Biochem. Biophys. 42, 456 (1953). – B. Z. Siegel und A. W. Galston, Science 157, 1557 (1967).
4. J. P. Gove und C. M. Hoyle, Pl. Physiol. 56, 684 (1975).
5. E. Lepinois, C. r. Soc. biol. 51, 428 (1899). – A. Bach und S. Zubkowa, Biochem. Z. 125, 282 (1921).
6. Für die freundliche Überlassung der Testsubstanzen danken wir Herrn Dr. K. Görler, in Firma Dr. Madaus & Co., Köln.

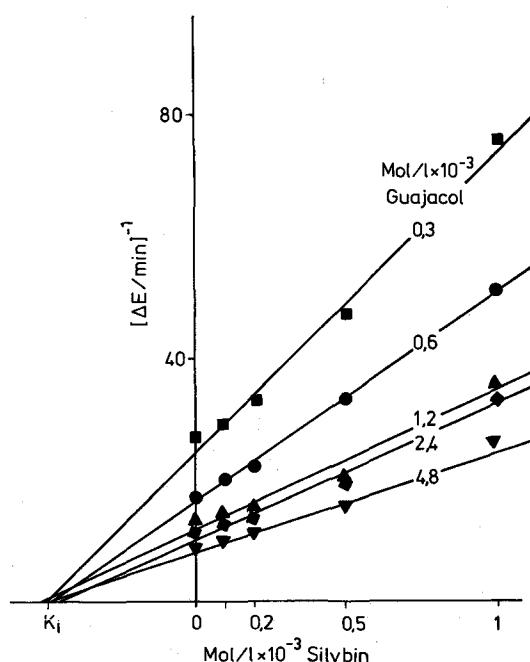


Fig. 1. Dixon-Transformation der Messdaten nach Einfluss von Silybin (I) auf das Standardsystem.

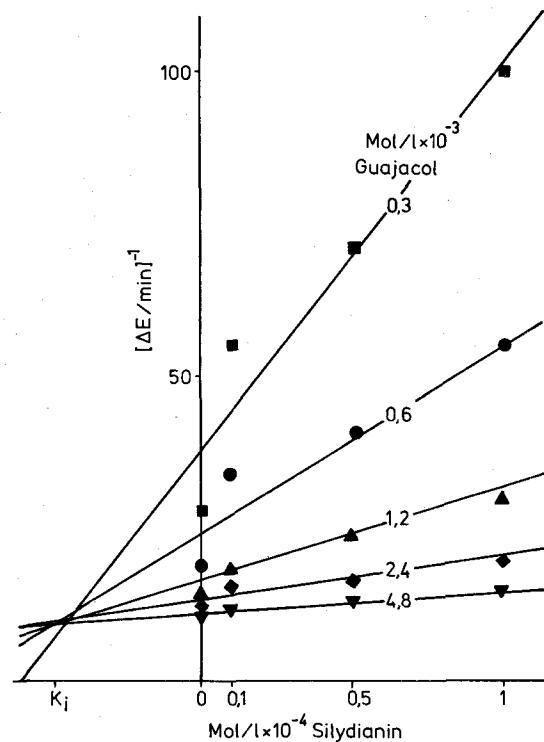


Fig. 2. Dixon-Transformation der Messdaten nach Einfluss von Silydianin (II) auf das Standardsystem.

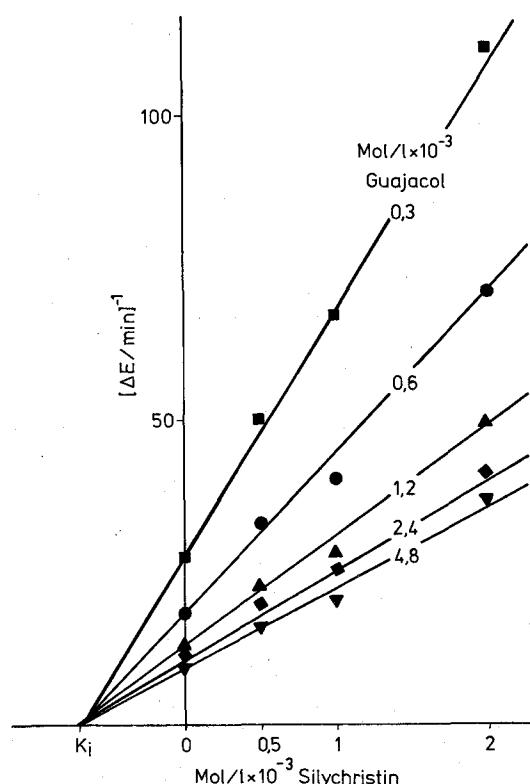


Fig. 3. Dixon-Transformation der Messdaten nach Einfluss von Silychristin (III) auf das Standardsystem.

$\text{H}_2\text{O}_2$  (Extinktion 0,400 bei 240 nm). Der zeitliche Verlauf der Extinktionszunahme, bei 436 nm gegen Luft gemessen, wurde 3 min lang aufgezeichnet und daraus die mittlere Extinktion ( $\Delta E/\text{min}$ ) berechnet. Zur Bestimmung des Wirkungstyps sowie zur Ableitung der enzymkinetischen Parameter wurden die Messdaten nach Lineweaver und Burk<sup>7</sup> bzw. nach Dixon<sup>8</sup> transformiert und die optimal angepassten Geraden durch Regressionsrechnung ermittelt. Die rechnerische Auswertung erfolgte mit dem Rechner CYBER 73 des Interfakultären Rechenzentrums der Universität Wien nach eigenen Programmen<sup>9</sup>.

**Ergebnis.** Die Oxydation von Guajacol in Gegenwart von HRP und  $\text{H}_2\text{O}_2$  folgt der Michaelis-Menten-Kinetik<sup>10</sup>. Bei konstanter  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration wurde  $K_m = 6,3 \cdot 10^{-4}$  Mol/l und  $V_{\max} = 0,114 \Delta E/\text{min}$  ermittelt.

Die Tatsache, dass bei steigenden Konzentrationen von I der  $K_m$ -Wert bei  $6,7 \cdot 10^{-4}$  Mol/l ( $s = 0,44$ ) liegt, deutet auf einen 'nichtkompetitiven' Hemmungsmechanismus hin.  $K_i$  beträgt  $4,8 \cdot 10^{-5}$  Mol/l ( $s = 0,41$ ) (Figur 1). Die Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) der Regressionsgeraden sind in beiden Darstellungsarten  $\geq 0,983$ .

Steigende Konzentrationen von II rufen ebenfalls eine Hemmung der HRP hervor, wobei die Wirkung von II um rund eine Zehnerpotenz stärker ist als die von I. Da  $V_{\max} = 0,119 \Delta E/\text{min}$  ( $s = 0,907$ ) sich praktisch nicht ändert und die Geraden ( $r \geq 0,874$ ) sich in einem Punkt im zweiten Quadranten des Koordinatensystems schneiden, ist die Hemmung durch II kompetitiver Natur (Figur 2).  $K_i = 4,8 \cdot 10^{-5}$  Mol/l ( $s = 0,85$ ).

Die durch III verursachte Hemmung der HRP ist nichtkompetitiv und liegt in der Größenordnung von I (Figur 3).  $K_m = 7,3 \cdot 10^{-4}$  Mol/l ( $s = 0,086$ ) und  $K_i = 7,1 \cdot 10^{-4}$  Mol/l ( $s = 0,36$ ). Die Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) der Geraden sind in beiden Darstellungen  $\geq 0,993$ . Diese in vitro gewonnenen Befunde zeigen, dass die Silymarinkomponenten I-III die HRP deutlich und dosisabhängig hemmen. Eine analoge Wechselwirkung mit der IAA-Oxidase in vivo liegt somit auf der Hand. Wir konnten inzwischen auch auf andere Weise zeigen, dass I-III auf den Abbau der IAA Einfluss zu nehmen vermögen<sup>9</sup>.

Darüber hinaus steht dieses Ergebnis in guter Übereinstimmung mit unseren früheren Befunden: An einem pflanzlichen Testsystem<sup>11</sup> hatten wir bei I und III einen gleichaltrigen, bei II jedoch einen andersartigen Hemmungstypus beobachtet<sup>2</sup>. Die Feststellung, dass I-III im pflanzlichen Organismus auf molekularer Ebene unterschiedlich wirken, erhält durch die enzymologischen Untersuchungen eine zusätzliche Stütze. Der Einfluss von I-III auf die Pflanze ist hochspezifisch und kann nur mit der unterschiedlichen Molekülgometrie der betreffenden Verbindungen erklärt werden.

7 H. Lineweaver und D. Burk, J. Am. chem. Soc. 56, 658 (1934).

8 M. Dixon, Biochem. J. 55, 170 (1953).

9 A. Greimel, Dissertation Univ. Wien (1976).

10 L. Michaelis und M. L. Menten, Biochem. Z. 49, 333 (1913).

11 H. Koch, Sci. Pharm. 39, 209 (1971).