

Untersuchungen über bakteriostatische Chinone und andere Antibiotica.

VII. Mitteilung: Quantitative Versuche über die Giftwirkung von Chinonen auf *Planaria gonocephala*, einen Strudelwurm aus der Ordnung der *Tricladida*.¹

Von

O. Hoffmann-Ostenhof, L. Bertalanffy und O. Schreier.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium und dem Zoologischen Institut der Universität Wien.

Mit 5 Abbildungen.

(Eingelangt am 28. März 1947. Vorgelegt in der Sitzung am 12. Juni 1947.)

Wie wir in den früheren Mitteilungen dieser Reihe ausgeführt haben, ist es unser Bestreben, den Wirkmechanismus verschiedener Antibiotica, insbesondere aus der Chinonreihe, aufzuklären. Wir folgten bisher einer Arbeitshypothese von *K. Wallenfels*,² nach welcher die bakteriostatische Wirkung der Chinone auf ihrem Hemmvermögen gegenüber einem oder mehreren Fermentsystemen, welche für den bakteriellen Stoffwechsel unumgänglich notwendig sind, erfolgen soll. Ähnliche Zusammenhänge werden auch bei der antibakteriellen Wirkung der Sulfonamide vermutet.³

Zur Untersuchung dieser Fragen haben wir zuerst einige Enzymsysteme auf ihre Hemmbarkeit durch Chinone untersucht;⁴ die erhaltenen Resultate lassen vermuten, daß die bisher untersuchten Fermente mit der antibakteriellen Wirkung der Substanzen nicht im ursächlichen Zusammenhang stehen. Die Untersuchung weiterer Enzyme ist im Gange.

¹ Eine vorläufige Mitteilung über die hier berichteten Ergebnisse erschien in *Nature (London)* **158**, 948 (1946); die vorliegende Arbeit stellt gleichzeitig einen Teil der Inauguraldissertation von *O. Schreier* dar.

² *Chemie* **58**, 1 (1945).

³ Vgl. z. B. *M. G. Sevag, Advances in Enzymology* **6**, 33 (1946).

⁴ *Mh. Chem.* **76**, 180 (1946); **76**, 319 (1947); *Exper.* **2**, 405 (1946).

Um ein umfassenderes Bild über die antibiotischen Wirkungen der Chinone zu erhalten, haben wir auch begonnen, Versuche mit Modellorganismen durchzuführen.⁵ Wir versprechen uns von diesen Experimenten weitere Aufschlüsse über den Wirkmechanismus, obwohl wir uns bewußt sind, daß die bei anderen Organismen gewonnenen Ergebnisse nur mit größter Vorsicht zu Rückslüssen auf die Verhältnisse bei den Bakterien verwandt werden dürfen.

In dieser Mitteilung wollen wir über Versuche über die Chinonwirkungen auf *Planaria gonocephala*, einen Strudelwurm aus der Ordnung der Tricladida, berichten. *Planaria* hat bereits, insbesondere beim Studium der sog. physiologischen Gradienten nach *Child*, häufig als Modellorganismus Anwendung gefunden. Für die Benützung von *Planaria gonocephala* sprach ihr häufiges Vorkommen und die leichte Beschaffung sowie schließlich auch unsere Absicht, Versuche über die physiologischen Gradienten als Fortsetzung der Arbeiten eines von uns (*L. v. B.*)⁶ an die hier berichteten Experimente anzuschließen. Die sich auf das Problem der Empfindlichkeitsgradienten beziehenden Resultate, welche übrigens in vieler Hinsicht im Widerspruch mit den Anschauungen von *Child* stehen, sollen zu gegebener Zeit in einer zoologischen Fachzeitschrift veröffentlicht werden. In der vorliegenden Veröffentlichung wollen wir uns hauptsächlich auf die biochemische Seite der gemachten Versuche und deren Interpretation beschränken.

Planaria gonocephala hat die Eigenschaft, unter schädigenden Einflüssen, wie höheren Temperaturen, UV-Strahlen und toxischen Stoffen, vor dem Todseintritt graduell zu zerfallen. Es handelt sich hier um einen histolytischen Prozeß; der Zerfall tritt anfangs begrenzt an bevorzugten Körperstellen auf, um sich dann mehr oder minder schnell auf den gesamten Organismus fortzupflanzen. Bei rechtzeitigem Verschwinden des schädigenden Einflusses ist *Planaria* imstande, die bereits zerfallenen Körperteile voll zu regenerieren.

Methodik.

Die Versuche wurden mit Tieren durchgeführt, die während der Sommermonate aus dem bei Wien-Hütteldorf in den Wienfluß mündenden Halterbach gesammelt wurden. Das in Glasflaschen aufbewahrte Material wurde auf schnellstem Wege ins Laboratorium gebracht und dort in ein Aquarium verpflanzt, das mit einer Fließwasseranlage und einem Durchlüfter versehen war. Die Würmer vertrugen den Milieuwechsel recht gut.

⁵ O. Hoffmann-Ostenhof und G. Reitmaier, Mh. Chem. 78, 277 (1948); O. Hoffmann-Ostenhof, P. Wertheimer und K. Gratzl, Exper. 3, 327 (1947).

⁶ L. v. Bertalanffy, Biol. gen. 15, 295 (1942); vgl. dazu auch L. v. Bertalanffy, Theoretische Biologie, Bd. 2. Berlin. 1942.

Auf die Gleichwertigkeit der für die Versuche verwendeten Tiere wurde besonders geachtet. Das frisch eingebrachte Material wurde gesichtet, Würmer mit frischen oder vernarbenen Verletzungen, Regeneraten, Mißbildungen und auch solche mit abnormalen Farben oder Verhalten wurden ausgeschieden. Eine weitere Sichtung erfolgte durch Messung der Tiere. Würmer, welche die Durchschnittslänge von 18 mm um 1 mm über- oder unterschritten, wurden ebenfalls ausgeschieden. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines Millimeterpapiers, das unter eine Glasschale, in welcher sich die Tiere befanden, gelegt wurde. Eine Wägung wurde nicht vorgenommen, da damit unkontrollierbare Schädigungen verbunden wären und anderseits für die Wirkung der toxischen Substanzen wohl vor allem die Körperoberfläche und erst in zweiter Linie das Gewicht maßgebend ist.

Zur Fütterung wurden feingeschnittene *Tubifex* verwendet; 48 Stunden vor der experimentellen Verarbeitung wurde kein Futter mehr gegeben, um eine erhöhte Funktion des Verdauungsapparats zu vermeiden.

Die Versuche wurden gewöhnlich bei Zimmertemperatur (zirka 20°) vorgenommen. Da die Wassertemperatur im Vorratsaquarium sehr konstant 10° betrug, wurde, um eine Schockwirkung zu vermeiden, das Wasser in der Schale, in der die für die Experimente ausgesuchten Tiere waren, langsam auf die Versuchstemperatur erwärmt.

Die Chinonlösungen verschiedener molarer Konzentration wurden mit Leitungswasser angesetzt. Destilliertes Wasser wird von *Planaria* sehr schlecht vertragen.

Zur Ausführung der Experimente wurden die Tiere einzeln in Petrischalen gegeben, das restliche Wasser vorsichtig mit Filtrerpapier entfernt und die Versuchslösung eingegossen. Zur Beobachtung diente ein Mikroskop bei 45facher Vergrößerung. Rasch ablaufende Versuche wurden ständig verfolgt, bei Versuchen von längerer Zeitspanne genügte eine Kontrolle der Tiere in größeren Zeitabständen. Die Experimente wurden bei diffusem Tageslicht oder, wenn längere Dauer es erforderlich machte, bei elektrischer Beleuchtung durchgeführt. Direkte Bestrahlung wurde jedenfalls vermieden, weil von manchen Chinonen eine Verstärkung ihrer Wirkung durch das Licht bekannt ist, anderseits auch direktes Licht einen schädigenden Einfluß auf die Tiere auszuüben imstande ist.

Beobachtet wurde insbesondere das Allgemeinverhalten der Tiere, der Beginn des histolytischen Zerfalls und sein Fortschreiten sowie der Todeseintritt. Die Feststellung des Todeseintritts ist verhältnismäßig schwierig, da die Kennzeichen dafür je nach den Versuchsbedingungen verschieden sind. Der Todeseintritt wurde angenommen:

- a) in stark wirkenden Versuchslösungen, in welchen kein Zerfall erfolgt, sobald am Tierkörper keine Bewegung mehr feststellbar war — weder eine des Gesamtkörpers noch eine des herausgetretenen Pharynx —

und eine solche auch nach vorsichtiger Reizung mit einer stumpfen Nadel nicht erfolgte;

b) in mittelstarken Lösungen tritt ein mehr oder weniger vollkommener Zerfall ein, der auch den Pharynx zum Teil erfaßt. Der Tod wird durch Aufhören der Pharynxschluckbewegungen und eine kennzeichnende Schrumpfung des Pharynx markiert;

c) in schwach wirkenden Versuchslösungen zerfallen Körper und Pharynx vollkommen. Tod ist hier anzunehmen, wenn sich der Pharynx auf Reizung nicht mehr bewegt. Die Reizung darf nicht mit der stumpfen Nadel, sondern durch Schwenken der Schale vorgenommen werden.

d) in extrem schwachen Lösungen lebt das Körperhinterende oft länger als der Pharynx. Tod wurde angenommen, sobald das Hinterende auch nach Reizung keine Bewegungen mehr ausführt.

Die Feststellung des Todeseintritts wurde auch dadurch erschwert, daß sich der Pharynx während der Versuche öfters vom Körper ablöste. In diesen Fällen war der Versuch zu wiederholen. Außerdem wurde nicht selten beobachtet, daß in vorgeschriftenen Versuchsstadien wurmartige Tiere den Planarienkörper durch den Pharynx verlassen oder sich durch heftige Bewegung in den Geweben des Pharynx und seiner nächsten Umgebung bemerkbar machen. Bei oberflächlicher Betrachtung hat es dann den Anschein, als ob das Versuchstier noch lebe. Es dürfte sich um kleine Fadenwürmer handeln, wie sie auch Steinmann⁷ als Parasiten im Rüssel von Süßwassertrikladen erwähnt. Ihre systematische Zugehörigkeit wurde von uns nicht bestimmt. Bemerkenswert ist die Resistenz dieser Parasiten gegenüber Chinonen.

Für jeden Versuch unter geänderten Bedingungen wurden mindestens zehn Tiere verwendet und das durchschnittliche Verhalten verwertet. Jedes der untersuchten Chinone wurde in mindestens vier verschiedenen molaren Verdünnungen angewendet, um eine gut gekennzeichnete Dosis-Wirkungsbeziehung zu erhalten. Die Versuche wurden nach spätestens zwölf Stunden abgebrochen, da bei längerer Dauer zu befürchten war, daß außer der toxischen Wirkung der Chinone sich noch unkontrollierbare schädigende Einflüsse bemerkbar machen könnten. Verdünnungen, bei denen der Todeseintritt nach dieser Zeit nicht stattgefunden hatte, wurden als subletale Konzentrationen betrachtet.

Ergebnisse und Diskussion.

Die Giftigkeit der untersuchten Substanzen auf *Planaria gonocephala* nimmt in der folgenden Reihenfolge ab: Naphthazarin, α -Naphthochinon, Methylnaphthazarin, p-Benzochinon, Toluchinon, β -Naphtho-

⁷ P. Steinmann und E. Bresslau, Die Strudelwürmer (Turbellaria). Leipzig, 1913.

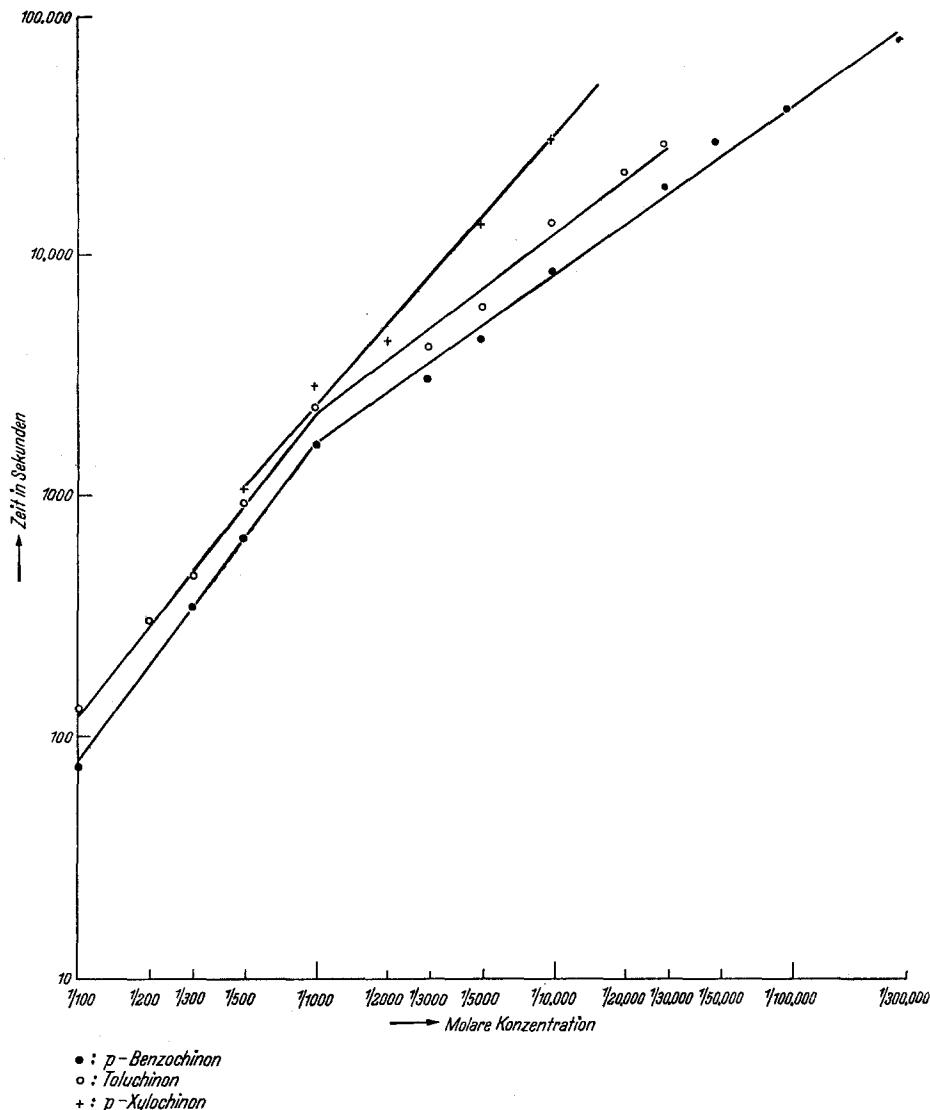


Abb. 1.

chinon, 2,6-Dimethoxy-benzochinon, p-Xylochinon, 4-Methoxy-tolu-chinon, Isonaphthazarin, Lawson. Da die Dosis-Wirkungskurven nicht völlig parallel gehen, sind einige kleine Abweichungen von dieser Reihung bei extremen Konzentrationen bemerkbar. Die Dosis-Wirkungsbeziehungen lassen sich am besten durch graphische Darstellung verbildlichen (vgl. Abb. 1 bis 4). In einem doppeltlogarithmischen Koordinatensystem

werden die Konzentration als Abszisse und die Zeit als Ordinate gewählt und die Todeszeiten bei den verschiedenen Konzentrationen eingetragen. Mit Ausnahme von zwei Fällen (p-Benzochinon und Toluchinon), die weiter unten noch ausführlicher besprochen werden sollen, ergaben die so erhaltenen Kurven mit guter Annäherung einfache Gerade.

Es ist interessant, einen Vergleich zwischen der toxischen Wirkung der Chinone auf *Planaria gonocephala* mit den Effekten, die mit denselben

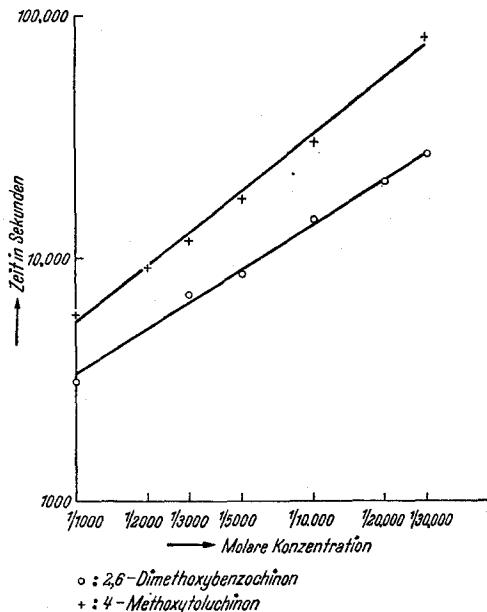


Abb. 2.

Substanzen auf andere biologische Systeme erzielt wurden,⁸ vorzunehmen. Es fällt auf, daß die nach Oxford gegenüber *Staphylococcus aureus* so stark wirksamen Methoxyderivate des p-Benzochinons gegenüber *Planaria* nur relativ wenig toxisch sind. Auffallend ist die starke Wirksamkeit der Naphthazarine, diese Körper gehören allerdings auch zu den stärksten Bacteriostaticis. Die Allgemeinreihung stimmt jedenfalls in keiner Weise mit der bei Bakterien gefundenen überein, eine Tatsache, auf die wir noch bei der Besprechung der möglichen Wirkungsmechanismen zurückkommen werden.

⁸ A. E. Oxford, Chem. Industry 61, 189 (1942); E. F. Moeller, zit. nach K. Wallenfels, Chemie 58, 1 (1945); O. Hoffmann-Ostenhof und G. Reitmaier, Mh. Chem. 78, 277 (1948); O. Hoffmann-Ostenhof, P. Wertheimer und K. Gratzl, Exper. 3, 327 (1947).

In fast allen untersuchten Konzentrationen war Zerfall zu beobachten. Eine Ausnahme fanden wir nur bei den höchsten herstellbaren Konzentrationen von p-Benzochinon und Toluchinon, also im Bereich von $1/100$ - bis $1/1000$ -molar, wo Todeseintritt ohne vorhergehenden Zerfall zu

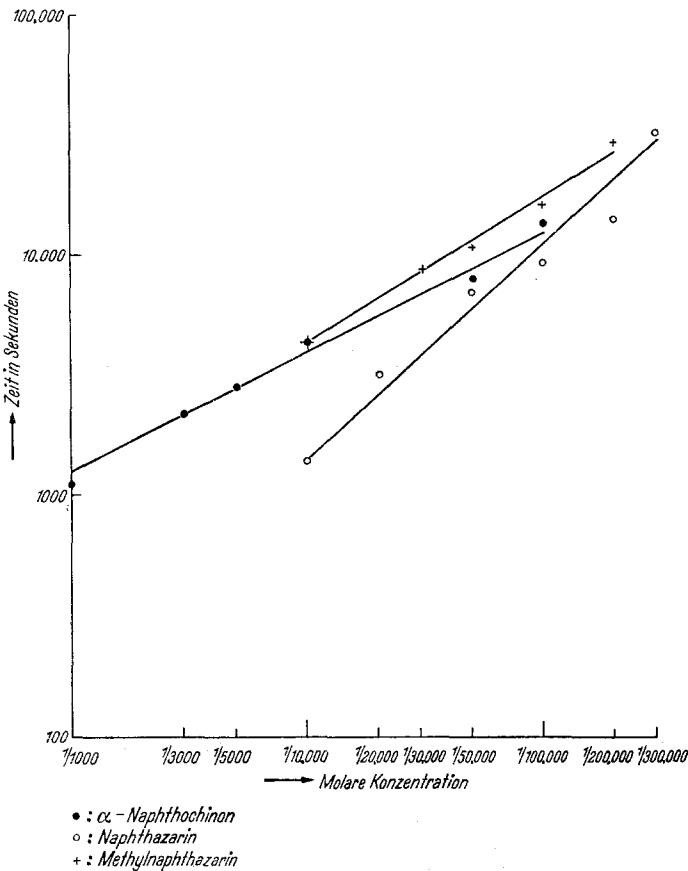


Abb. 3.

beobachteten war; die Tiere starben in kürzester Zeit nach einigen krampfartigen Bewegungen. Es ist bemerkenswert, daß bei diesen beiden Stoffen in der Dosis-Wirkungskurve ein deutlicher Knick etwa bei $1/1000$ -molarer Konzentration erscheint. Wir deuten diesen Knick als einen Wechsel von einem Wirkungsmechanismus zu einem anderen. Für die Wirkung bei den hohen Konzentrationen dürfte mit einiger Wahrscheinlichkeit eine gerbungssartige Proteinreaktion verantwortlich sein. Ähnliche Erscheinungen bei hohen Chinonkonzentrationen haben Meier und All-

göwer⁹ bei ihren Versuchen über die antimitotische Wirkung der Chinone auf Hühnerherzfibroblasten erhalten. Durch die geringe Löslichkeit war bei allen anderen untersuchten Substanzen die Herstellung so hoch konzentrierter Lösungen nicht möglich, so daß nicht festgestellt werden konnte, ob derartige Erscheinungen auch bei den übrigen Chinonen vorkommen.

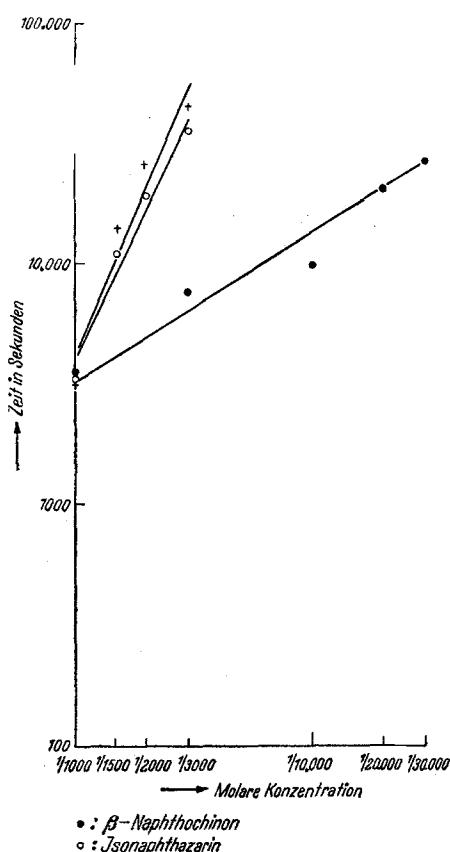


Abb. 4.

Isotherme legt die Vermutung nahe, daß als Primärprozeß eine Adsorption stattfindet. Da seit den Versuchen von *Herzog* und *Betzel*¹⁰ häufig die toxischen Wirkungen von Lösungen mit Hilfe der Adsorptionsisotherme gedeutet werden, ohne daß die meisten Untersucher über die Bedingungen, unter welchen diese Annahme erlaubt ist, Klarheit schaffen, halten wir es für angezeigt, diese prinzipielle Frage kurz zu erörtern.

⁹ R. Meier und M. Allgöwer, Exper. 1, 57 (1945).

¹⁰ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 74, 221 (1911).

Die Wirkung der schwächeren Konzentrationen ist schwerer zu deuten. Wir nehmen an, daß die Chinone auf ein oder mehrere für den Stoffwechsel der Tiere lebenswichtige Enzymsysteme hemmend einwirken, und zwar greifen sie vermutlich in den Atemstoffwechsel ein. Über Chinonhemmungen verschiedener Desmolasen ist schon einiges bekanntgeworden; leider sind diese Erscheinungen noch nicht genügend exakt bearbeitet, um nähere Rückschlüsse zu erlauben.

Der Verlauf der Dosis-Wirkungskurven als Gerade läßt sich mathematisch durch die Gleichung

$$\log t = \log b + a \log \frac{1}{c},$$

oder $t c^a = b$

wiedergeben, wobei t die Zeit, c die Konzentration und a und b Konstanten sind. Die formale Übereinstimmung dieser Gleichung mit der Adsorptions-

Unter der Annahme, daß die Lebensdauer der Individuen umgekehrt proportional der adsorbierten Menge toxischer Substanz ist, sind folgende Voraussetzungen zur Annahme der Adsorption entsprechend der Adsorptionsisotherme notwendig:

- Die Oberflächen der zu vergleichenden Organismen müssen annähernd gleich groß sein.
- Die Adsorptionsgeschwindigkeit muß gegenüber der Versuchsdauer sehr groß sein.
- Die Konzentration der Lösung darf durch die Adsorption nicht merklich geändert werden.
- Der adsorbierte Stoff soll entweder chemisch überhaupt nicht oder durch eine Reaktion verändert werden, deren Geschwindigkeit gegenüber der Adsorptionsgeschwindigkeit gering ist, wobei die Menge umgesetzter Substanz klein gegenüber der gesamten adsorbierten Substanzmenge sein soll.

Die Bedingungen a und b dürften in unserem Fall ideal erfüllt sein; was c betrifft, so entsprechen unsere Versuche bei höheren oder mittleren Konzentrationen ebenfalls dieser Voraussetzung; bei extremen Verdünnungen ist es unmöglich, die Konzentration zu bestimmen. Die Erfüllung der Bedingung d ist nicht nachprüfbar, da wir, wie oben ausgeführt, uns über den Charakter der anzunehmenden Sekundärreaktion noch nicht im klaren sind. Die Bedingung wäre ideal erfüllt, wenn die Chinone als „Antikatalysatoren“ fungieren würden, also bei der Reaktion keine Veränderung erleiden.

In zwei Fällen, beim Isonaphthazarin und beim Lawson, finden wir den „Adsorptionsexponenten“ a größer als 1, was im allgemeinen gegen die Annahme einer Adsorption sprechen sollte. Das Verhalten dieser beiden Stoffe kann vielleicht durch ihre Fähigkeit, in zwei tautomeren

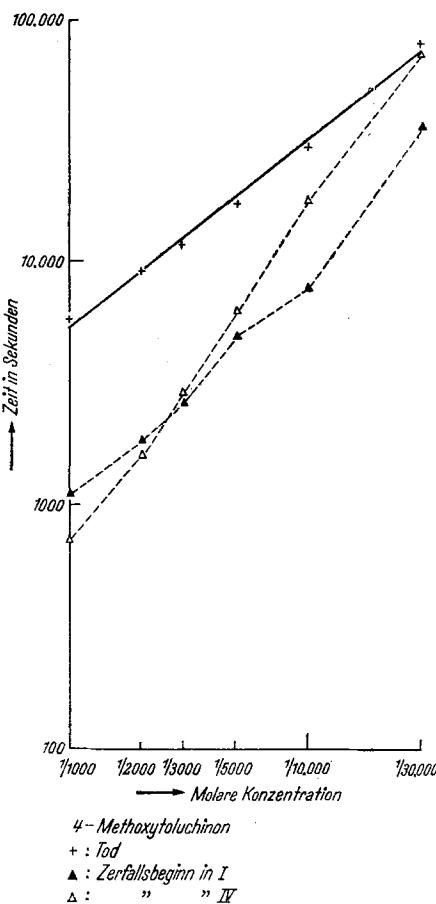


Abb. 5.

Formen (als para- wie als ortho-Chinone) zu reagieren, erklärt werden. Man könnte sich vorstellen, daß bei Konzentrationsänderung auch eine Änderung im Adsorptionsgleichgewicht dieser beiden Formen eintritt.

Zusammengefaßt darf gesagt werden, daß die in unserem Falle vorliegenden Verhältnisse sehr für die Annahme einer Adsorption als Primärreaktion sprechen. Es muß aber betont werden, daß vermutlich erst die angenommene Sekundärreaktion die Schädigungen mit sich bringt, die den Zerfall des Planarienkörpers und den schließlichen Todeseintritt zur Folge haben.

Die Gesetzmäßigkeiten des Zerfalls der Tiere und die theoretische Deutung der erhaltenen Beziehungen sollen der anfangs erwähnten späteren Veröffentlichung vorbehalten werden; hier sei nur kurz erwähnt, daß auch der Zerfall nach einer von der Konzentration abhängigen Gesetzmäßigkeit vor sich geht; bei höheren Konzentrationen beginnt er im allgemeinen in der Vorderregion, bei größerer Verdünnung am Hinterende. Zur Illustration dieser Verhältnisse dient Abb 5.

In ergänzenden Versuchen wollten wir die Frage klären, ob der Angriffspunkt der Chinone derselbe sei wie derjenige anderer Gifte, insbesondere aus der Reihe der Narkotica. Für diese Substanzen wird als Wirkungsmechanismus angenommen, daß sie durch ihre hohe Oberflächenaktivität physiologisch wichtige Reaktionen verhindern, indem sie die beteiligten Stoffe von dem Reaktionsort, den Phasengrenzen, verdrängen. Hierfür sind einige Beispiele bekannt; so werden physiologische Verbrennungsprozesse durch Narkose gehemmt, Vitalfärbungen lassen sich „wegnarkotisieren“ u. a. m. Es erschien uns nun interessant, ob die Narkotica auch imstande seien, die Wirkung der Chinone zu blockieren, in welchem Falle die Chinonwirkung eine Verzögerung erfahren müßte.

Als Narkoticum wurde das für Versuchszwecke sehr gebräuchliche Chloreton (Trichlorbutylalkohol) gewählt. Eine $1/_{500}$ -molare Lösung erwies sich als geeignet, weil sie bei deutlicher Narkosewirkung sonst keine merkbaren Schädigungen der Versuchstiere verursachte. Der Versuch wurde wie üblich mit zehn Tieren durchgeführt, welche zunächst 10 Minuten lang in der Chloretonlösung belassen wurden, um dem Narkoticum Gelegenheit zu geben, im Organismus „seinen Posten zu beziehen“. Hierauf wurden die Tiere in eine vorbereitete Lösung von $1/_{5000}$ -molarem p-Benzochinon und $1/_{500}$ -molarem Chloreton übertragen. Der allgemeine Versuchsverlauf unterschied sich nicht von dem in $1/_{5000}$ -molarem p-Benzochinon allein. Hingegen lassen die erhaltenen Zeitwerte für Zerfallsbeginn und Todeseintritt erkennen, daß nicht nur die Wirkung des p-Benzochinons nicht verzögert wird, sondern daß der durch das Benzochinon bewirkte Effekt durch den Einfluß des Chloretons noch beträchtlich verstärkt wird. Diese Verhältnisse werden in Tabelle 1 verdeutlicht.

Tabelle 1. Vergleich der Wirkungen einer reinen Benzochinonlösung mit denjenigen einer Benzochinon-Chloretton-Mischlösung.

Lösung	Mittelwert des Todes-eintritts nach Sek.	Mittelwert des Zerfalls-beginns nach Sek.
p-Benzochinon $1/_{5000}$ -molar	4590	582
Dasselbe + Chloretton $1/_{500}$ -molar....	3264	321

Diese Ergebnisse geben Grund zur Annahme, daß die Wirkungen der Chinone nicht an den gleichen Stellen der Zelle ansetzen wie diejenigen der Narkotica.

Orientierende Versuche wurden auch zur Feststellung des Temperaturkoeffizienten der toxischen Wirkung der Chinone auf *Planaria* durchgeführt. Eine Versuchsreihe bei 10° , 20° und 30° ergab eine allerdings nicht proportionale Verkürzung der Reaktionszeit in den wärmeren Lösungen. Der Koeffizient beträgt für die Erhöhung der Temperatur von 10° auf 20° 1,6, für das nächst höhere Temperaturintervall dagegen 2,2. Diese Unregelmäßigkeit ist vielleicht darauf zurückzuführen, daß die immerhin beträchtliche Wärme von 30° die Widerstandskraft der Versuchstiere noch zusätzlich schwächt, wohingegen die Temperaturen von 10° und 20° dem natürlichen Lebensraum der Tiere weitgehendst entsprechen. Rückschlüsse auf die Gültigkeit der *van't Hoff'schen* Regel können aus diesen Versuchen jedenfalls noch kaum gezogen werden.

Zusammenfassung.

Es werden die Effekte verschiedener bakteriostatisch wirksamer Chinone auf den Strudelwurm *Planaria gonocephala* beschrieben. Eine quantitative Untersuchung der Verhältnisse ergibt, daß die Wirkungsreihe der Substanzen gegenüber *Planaria* nicht identisch mit denjenigen gegenüber Bakterien ist. Die mathematische Interpretation der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen ergibt eine Formel, welche formal mit der Adsorptionsisotherme übereinstimmt. Diese Tatsache gibt Anlaß zur Vermutung, daß als Primärprozeß eine Adsorption stattfindet, der dann vermutlich als sekundäre Reaktion eine Hemmung eines zellwichtigen Fermentsystems folgt. In hochkonzentrierten Lösungen von p-Benzochinon und Toluchinon scheint dagegen eine gerbungähnliche Proteinreaktion den vorherrschenden Wirkungsmechanismus darzustellen. Versuche mit Mischlösungen von Chloretton und Benzochinon lassen den Schluß zu, daß der Angriffspunkt der Chinone ein anderer ist als derjenige der Narkotica.

Erkenntnisse, welche die Regelmäßigkeiten des Zerfalls der Versuchstiere in den Lösungen betreffen und mit der Theorie der physiologischen Gradienten von *Child* in einem gewissen Widerspruch stehen, sollen einer gesonderten Veröffentlichung in einer zoologischen Fachzeitschrift vorbehalten bleiben.