



# KARL UND VERONICA CARSTENS-STIFTUNG

Fördergemeinschaft: NATUR UND MEDIZIN

Die folgende Information wird Ihnen von der Karl und Veronica Carstens-Stiftung zur Verfügung gestellt. Ziel der Stiftung ist die Integration von Naturheilkunde und Homöopathie in die Schulmedizin. Wir verfolgen dieses Ziel, indem wir Forschung fördern und eigene Projekte verwirklichen, unter anderem durch:

- ▶ [Nachwuchsförderung](#)
- ▶ Europas größte wissenschaftliche [Fachbibliothek](#) für Naturheilkunde und Homöopathie
- ▶ [KVC Verlag](#) – medizinischer Fachbuchverlag für Homöopathie, Naturheilkunde und andere komplementärmedizinische Verfahren

Wir freuen uns über Ihr Interesse an unserer Arbeit.

## Kontakt:

Karl und Veronica Carstens-Stiftung  
Am Deimelsberg 36  
45276 Essen

Telefon: +49 (0)201-56305-0

Fax: +49 (0)201-56305-30

e-Mail: [info@carstens-stiftung.de](mailto:info@carstens-stiftung.de)

Internet: [www.carstens-stiftung.de](http://www.carstens-stiftung.de)

Bitte besuchen Sie auch die Homepage  
unserer Fördergemeinschaft [NATUR UND MEDIZIN](#).

## Untersuchungen zur antifungischen Wirkung von ozonisierter Ölsäure bei Pilzen

*D. Murad, L. Tejmar-Kolar und G. Winkelmann*

Die Bekämpfung von Pilzen stellt trotz vielfältiger Entwicklungen auf dem Sektor der Fungizide und Antimycotika ein ernstes Problem im Pflanzenbau und in der Humanmedizin dar. Wirkungsvolle Substanzen zur Bekämpfung schädlicher Pilze müssen generell für den befallenen Wirtsorganismus unschädlich sein. Sie sollten außerdem ökologisch unbedenklich sein. Ideal wäre eine leicht zu synthetisierende Substanz aus nachwachsenden Rohstoffen, die gut biologisch abbaubar ist. Seit langem ist bekannt, daß ozonisierte Fette und auch ozonisierte Fettsäuren hervorragende antifungische Eigenschaften besitzen, die im vorherigen Bericht in dieser Reihe bereits vorgestellt wurden (Jakobi & Winkelmann 1996, Steidl 1996). Ozonisierte Fette bzw. Fettsäuren erhält man, indem man ungesättigte Fettsäuren bzw. Fette, die ungesättigte Fettsäuren enthalten, mit Ozon behandelt. Dabei wird an die Doppelbindung der Fettsäuren das Ozon addiert. Die so erhaltenen Ozonide wirken auf eukaryontische Zellen sehr unterschiedlich. Vor allem Pilze werden stark inhibiert. Bis jetzt ist der genaue Wirkort in der Zelle nicht bekannt.

Ozonisierte Fette zerfallen in oder an der Zelle in verschiedene Produkte, die dann in den Pilzstoffwechsel eingreifen. Beim Zerfall der Ozonidgruppe entstehen Produkte, die einerseits aus der Freisetzung der Sauerstoffmoleküle ( $O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH\cdot$ ,  $1O_2$ ) und andererseits aus der Spaltung der Fettsäure zu Carbonyloxid-Verbindungen resultieren. Letztere können sich durch Bildung von Aldehyden, Ketonen oder Carbonsäure stabilisieren. Beide Verbindungsklassen können prinzipiell den Pilzstoffwechsel stören. Bisher waren wir davon ausgegangen, daß Sauerstoffradikale den größten bioziden Effekt hervorrufen. Andererseits liegt es nahe, daß Schutzmechanismen der Pilze (Katalasen, Dismutasen, Peroxidasen, Antioxidantien) die toxischen Effekte der kurzlebigen Sauerstoffspezies kompensieren können. Die entstehenden Aldehyde können jedoch auch stark toxische Produkte darstellen, die erstens langlebiger sind und zweitens durch die Zelle schwer zu entgiften sind.

Wir haben deshalb das Schwergewicht unserer Untersuchungen auf die toxische Wirkung der Aldehyde gelegt. Die Entstehung und Quantifi-

zierung der Aldehyde aus Fettsäureozoniden ist gut belegt (Cueto et al. 1994). In der vorliegenden Untersuchung wurden Ölsäure und ozonisierte Ölsäure (Ölsäureozonid) den Pilzzellen in Flüssigkultur angeboten. Hierzu wurde eine zellwandlose Mutante *Neurospora crassa* (slime) verwendet, die wegen des Fehlens einer Zellwand durch Ultraschall leicht aufzubrechen ist und außerdem als Einzelzelle wächst. Das Wachstum von *N. crassa* (slime) wurde in unterschiedlichen Kulturmedien und in Abhängigkeit unterschiedlicher Konzentrationen von Ölsäure und Ölsäureozonid untersucht. Die Zellzahl wurde anhand der optischen Dichte über einen Zeitraum von 72 Stunden verfolgt. Abb. 1 zeigt ein typisches Beispiel des Wachstums von *N. crassa* (slime) in Anwesenheit von Ölsäure und Ölsäureozonid. Diese Versuche zeigen, daß Ölsäure das Wachstum von *N. crassa* (slime) um ca. 50% steigert, im Vergleich zum nicht supplementierten Medium. Bei Zugabe von Ölsäureozonid tritt dagegen eine vollständige Hemmung des Pilzwachstums auf.

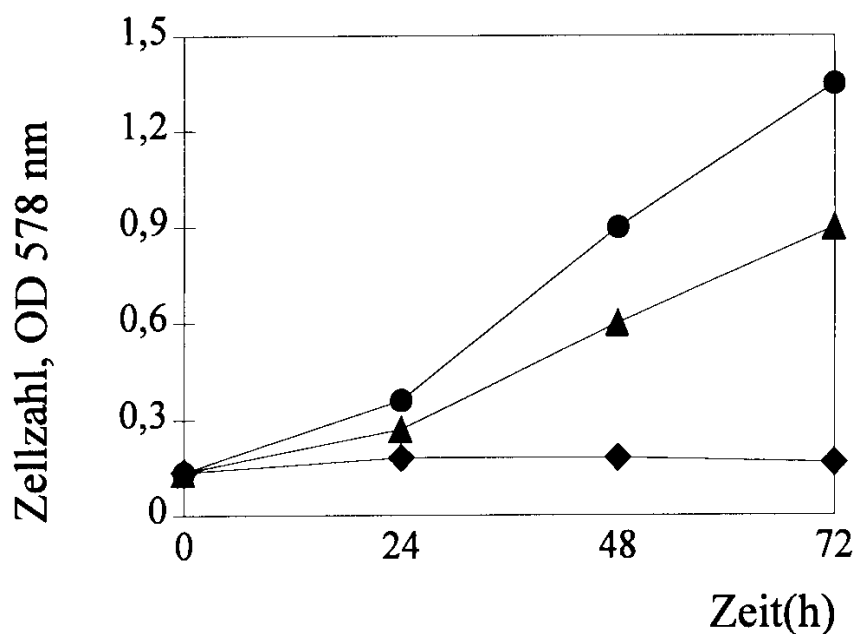


Abb. 1 Wachstum von *Neurospora crassa* (slime) bei 25°C in einem mineralischen Medium unter Zusatz von Ölsäure und ozonisierter Ölsäure.

- (a) Wachstumsverlauf ohne Zusatz
- (●) Wachstumsverlauf mit 5 µl Ölsäure/ml
- (◆) Wachstumsverlauf mit 5 µl Ölsäureozonid/ml

Die wachstumssteigernde Wirkung der Ölsäure ist darauf zurückzuführen, daß *N. crassa* Ölsäure als C-Quelle verwerten kann und möglicherweise Transportsysteme für Fettsäuren ausbildet. Dieses Verhalten ist von vielen Pilzen (u.a. von *Penicillium roquefortii*) bekannt, die fetthaltige (Milch) Produkte umsetzen, nachdem Lipasen die Fettsäuren aus den Fetten abgespalten haben (Winkelmann, 1992). Um als C-Quelle zu dienen, müssen die Fettsäuren in die Pilzzelle aufgenommen werden. Die beobachtete Toxizität des Ozonids könnte bedeuten, daß möglicherweise *N. crassa* Ölsäure nicht zwischen Ölsäure und Ölsäureozonid unterscheiden kann und so das toxische Ozonid als vermeintliche C-Quelle, wie ein Trojanisches Pferd, in die Zelle aufnimmt. Alternativ könnte das Ozonid vorher gespalten werden und die Spaltprodukte könnten nach Aufnahme in die Zellen ihre toxische Wirkung entfalten.

Um die Aufnahme von Ölsäureozonid in die Zellen, bzw. den Einbau in Zellkompartimente zu überprüfen, wurden *N. crassa* (slime) Zellen mit radioaktiv markiertem Ölsäureozonid inkubiert, das durch Behandlung von Tritium-markierter Ölsäure mit einem Ozongenerator hergestellt wurde. Die radioaktive Markierung bestand aus zwei Tritium-Atomen an C-9 und C-10 der Ölsäure, die nach Ozonierung und Aufspaltung des Ozonids zu gleichen Teilen auf die aldehydischen Spaltprodukte übergehen (Abb. 2).

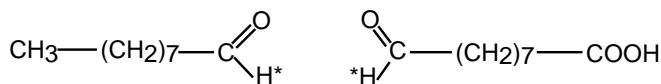
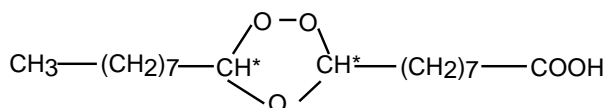
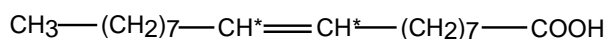


Abb. 2 Ölsäure, Ölsäureozonid und aldehydische Spaltprodukte.  
Die Tritiummarkierung ist mit \* gekennzeichnet.

Die Zellen wurden nach 2,5 Stunden abzentrifugiert, gewaschen und durch Ultraschall aufgebrochen. Die Zellfragmente, bestehend aus den unterschiedlichen Zellorganellen, wurden anschließend mittels fraktionierter Zentrifugation getrennt und deren Radioaktivität gemessen. Anhand dieser Radioaktivitätsverteilung kann so der Zielort des Ozonids und daraus u.U.

der Wirkmechanismus abgeleitet werden. Die erhaltene Radioaktivitätsverteilung ist in Abb. 3 prozentual dargestellt.

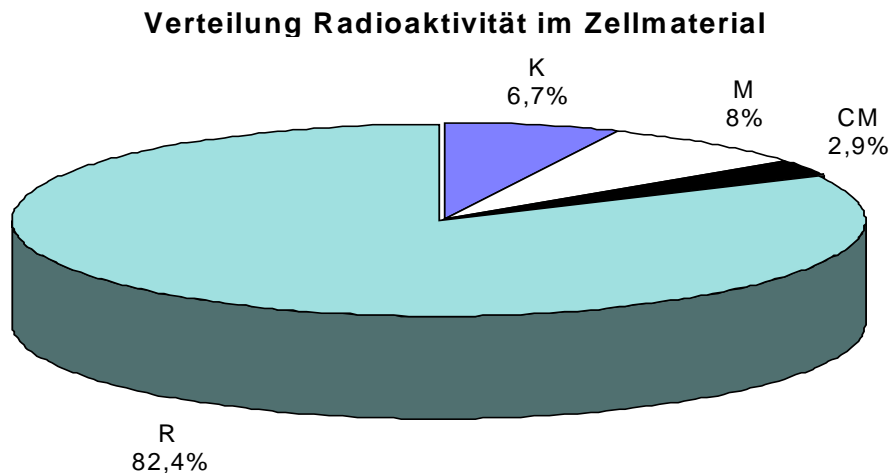


Abb. 3 Verteilung der Radioaktivität nach Aufnahme von  $^3\text{H}$ -markiertem Ölsäureozonid in *N. crassa* slime

- K: Kerne und große Zellpartikel
- M: Mitochondrien
- CM: Cytoplasmamembran
- R: cytoplasmatisches Retikulum und Cytoplasma

Daraus kann geschlossen werden, daß ozonisierte Ölsäure (oder ihre aldehydischen Spaltprodukte) in die Pilzzellen gelangen. Der Transportweg könnte dem der nicht-ozonisierten Ölsäure gleichen, was hier jedoch nicht näher untersucht werden konnte. Aufgrund ihrer langen C-Ketten von 18 C-Atomen sind Ölsäure und Ölsäureozonid unpolare Verbindungen. Entsprechend dieser Eigenschaft könnte man erwarten, daß diese Verbindungen leicht an lipophile Außenbereiche der Zelle, wie z.B. die Cytoplasmamembran, binden. Die eingebaute Radioaktivität befindet sich jedoch zum größten Teil (82%) in der wasserlöslichen Fraktion innerhalb des Cytoplasmas. Lipophile Bereiche der Zelle, wie Cytoplasmamembran und die membranreichen Mitochondrien, enthalten dagegen zusammen nur etwa 11% der in die Zelle aufgenommenen Radioaktivität. Es findet also keine nennenswerte Adsorption der Markierung an die Membranen statt. Die Cytoplasmamembran bietet offenbar auch keinen Schutz gegen das Ozonid. Nach diesen Versuchen ist anzunehmen, daß das Ozonid, das ja eine chemisch instabile Verbindung ist, relativ schnell in wasserlösliche Verbindungen zerfällt. Die Zerfalls- bzw. Abbauprodukte des Tritium-markierten

Ölsäureozonids müssen eine Kettenlänge von 9 Kohlenstoffatomen haben, da die Ozonidgruppe die Sollbruchstelle definiert. Nach der Ozonidspaltung sollten demnach Nonanal und Nonansäuresemialdehyd entstehen (Abb 2). Durch eine kürzere C-Kette sind diese Verbindungen hydrophiler als das langkettige Ozonid. Das würde erklären, warum die Radioaktivität sich hauptsächlich im wasserlöslichen Anteil des Cytoplasmas wiederfindet.

Die Analytik der entstehenden aldehydischen Spaltprodukte ist in den Mengen, wie sie in der Zelle entstehen, nicht einfach. Die HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ist eine hochauflösende quantitative Methode zur Detektion von Molekülen, die gute Absorptionen im Bereich des UV/VIS-Lichtes besitzen. Zur Detektion langkettiger Verbindungen wie Fettsäuren oder ihrer Ozonide ist diese Methode jedoch nach unseren Erfahrungen nicht optimal, da die Verbindungen nur sehr schwach im UV-Bereich absorbieren und dementsprechend nur bei sehr hohen Konzentrationen Signale geben. Die Methode ist also nicht sensitiv genug, um die eingesetzten Ozonid-Konzentrationen nachzuweisen. Zudem zerfallen die Ozonide sehr leicht bei den in der HPLC herrschenden Bedingungen.

Eine alternative Methode zur Untersuchung des Zerfalls von Ozoniden stellt die Dünnschichtchromatographie (DC) dar. Dabei werden Substanzen auf einer stationären Phase mit einer geeigneten mobilen Phase anhand ihrer Polarität aufgetrennt. Die zu untersuchenden Substanzen können durch Anfärben detektiert werden. Die DC erlaubt eine schnelle qualitative und semi-quantitative Detektion der Ozonid-Spaltprodukte. Es wurden verschiedene DC-Testverfahren zur Analyse der Ozonide und ihrer Abbauprodukte entwickelt. Die Rf-Werte der C18-Verbindungen, wie Ölsäure bzw Ölsäure-Ozonid betragen 0,36, der Rf-Wert der C9-Verbindung Nonanal beträgt 0,67. Bei dem gewählten DC-System handelt es sich um eine „Reversed Phase“-Chromatographie. Dabei legen Moleküle mit kürzerer Kettenlänge eine längere Laufstrecke zurück als langkettige Moleküle.

Unsere Untersuchungen mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie ergaben, daß nach 1 Stunde Inkubation mit Ölsäureozonid bereits Abbauprodukte mit dem Rf-Wert 0,67 erschienen. Dieses entspricht der Laufstrecke von Nonanal und damit Bruchstücken des Ozonids mit der Kettenlänge von 9 C-Atomen. Produkte des gleichen Rf-Wertes kann man ebenfalls beim Zerfall außerhalb der Zellen von *N. crassa* (slime) detektieren. Dies ist ein Hinweis darauf, daß der Zerfall von Ozoniden sowohl im Medium als auch innerhalb der Zelle stattfindet. Auch die Isolierung der Produkte (in vitro und in vivo) ist aus der DC möglich. Die genaue chemische Iden-

tifizierung aller Produkte soll mit weiteren chemisch analytischen Methoden (GC-MS, Elektrospray MS, <sup>3</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR) vorangetrieben werden.

Als Ergebnis der biologischen Versuche zur Ozonidaufnahme und ihrer intrazellulären Spaltung ist festzuhalten, daß innerhalb von 30-60 min Inkubation der Zellen mit Ölsäureozonid Spaltprodukte in der DC nachzuweisen sind, die mit Nonanal gleiche Retentionszeiten besitzen. Außerdem konnten wir zeigen, daß zugesetztes Nonanal auf die Zellen stärker toxisch wirkt als das Ölsäureozonid selbst. Das läßt den Schluß zu, daß Aldehyde möglicherweise die entscheidenden toxischen Produkte bei der Wirkung von Fettsäureozoniden in Pilzzellen sind. Diese Befunde korrelieren gut mit neueren Ergebnissen zur Detektion von Nonanal in bronchoalveolären Lipiden nach Ozonbehandlung (Pryor et al. 1996).

## Literatur

- Cueto R, Squadrito GI, Pryor WA. Quantifying aldehydes and distinguishing aldehydic product profiles from autoxidation and ozonization of unsaturated fatty acids. *Methods in Enzymology*, 233, 174 (1994).
- Jakobi M, Winkelmann G. Untersuchungen zur Wirkungsweise langkettiger Ozonide bei Pilzen In: Jahrbuch 3, Karl und Veronica Carstens-Stiftung im Stifterverband für die Deutsche Wissenschaft (H. Albrecht und M. Frühwald, Hrsg.) 1996, S. 100.
- Pryor, WA, Bermudez E, Cueto R, Squadrito GL, *Fund. Appl. Toxicol.* 34, 148-156 (1996).
- Steidl, G. Untersuchungen zur Wirkung langkettiger Ozonide auf eukaryontische (humane) Zellen, Pilz- und Tumorzellen. In: Jahrbuch 3, Karl und Veronica Carstens-Stiftung im Stifterverband für die Deutsche Wissenschaft (H. Albrecht und M. Frühwald, Hrsg.) 1996. S.164.
- Winkelmann, G. *Microbial Degradation of Natural Products*, VCH, Weinheim (1992)

Prof. Dr. G. Winkelmann, Dipl.-Biol. Dinah Murad und Dr. Liane Tejmar-Kolar  
Mikrobiologie & Biotechnologie, Universität Tübingen  
Auf der Morgenstelle 28, D-72076 Tübingen