

- 1934 *Münzel, Fritz*, Ein neues Verfahren zur partiellen Verseifung der Ester mehrbasischer Carbonsäuren.
- 1935 *Kaltmann, Helena*, Beiträge zur Analyse der Haarfärbemittel. Über einige neue Molekelverbindungen aromatischer Diamine mit mehrwertigen Phenolen.
- 1936 *Becker, Georg Balh.*, Ein modifizierter *Curtius'scher* Abbau. Der Abbau α , β -ungesättigter Säuren.
- 1937 *Grohmann, Eberhard*, Über die cis- und trans-Dioxy-dihydrochaulmoograsäuren.
- 1940 *Conrad, Livio*, Über den Umsatz aromatischer Isocyansäureester mit Wasser und aromatischen Aminen.
- 1941 *Brandenburger, Hans*, Untersuchungen im Gebiete des Pyridins.

76. Über die Spezifität des Inhibitors bei der Esterase-Hemmung durch Tri-o-kresyl-phosphat

von **Hubert Bloch**.

(1. III. 43.)

In vorangegangenen Untersuchungen über die Wirkungsweise des Tri-o-kresyl-phosphats (o-Tr) konnte als charakteristisches Merkmal die Fähigkeit dieser Substanz festgestellt werden, sowohl im tierischen Organismus als in vitro die Aktivität der Cholin-esterase (ChE) sowie der Serum-lipase (niedere Fettsäure-ester spaltende Esterase) noch in geringen Konzentrationen stark zu hemmen. Ferner konnte gezeigt werden, dass aus einer grösseren Reihe von Fermenten nur diese beiden Esterasen einer solchen Hemmung durch o-Tr unterworfen sind, während die übrigen untersuchten Fermentsysteme, worunter auch zwei weitere Esterasen, vollständig unbeeinflusst blieben¹⁾²⁾³⁾.

Nachdem so festgestellt werden konnte, dass o-Tr gegenüber diesen verschiedenen Fermenten eine grosse Spezifität besitzt, wird in der vorliegenden Mitteilung über Versuche berichtet, in denen die Abhängigkeit des Fermenthemmungsvermögens des Inhibitors von seiner chemischen Konstitution untersucht wurde. Nach der Spezifität auf das Objekt seiner Wirksamkeit wird hier versucht, die Spezifität des Inhibitors in bezug auf seine Konstitution näher zu umschreiben.

Das technische Tri-kresyl-phosphat, das infolge von Verwechslungen immer wieder zu den bekannten Vergiftungsfällen Anlass gibt und deshalb auch erhöhtes toxikologisches Interesse beansprucht, stellt ein Gemisch dar, das ausser den reinen drei isomeren Estern noch reichlich Mischester der drei Kresylradikale mit Phosphorsäure enthält. Aus den eingehenden Untersuchungen von *Gross* und *Grosse*⁴⁾

¹⁾ *H. Bloch*, *Helv. Med. Acta* **8**, Suppl. VII, 15 (1941).

²⁾ *H. Bloch* und *A. Hottinger*, *Z. Vitaminforsch.* **13**, 9 (1943).

³⁾ *A. Hottinger* und *H. Bloch*, *Helv.* **26**, 142 (1943).

⁴⁾ *E. Gross* und *A. Grosse*, *Namyn-Schmiedeberg's A.* **168**, 473 (1932).

ist aber bekannt, dass einzig dem o-Tr toxische Eigenschaften zukommen, während sich Tri-m-kresyl-phosphat (m-Tr) und Tri-p-kresyl-phosphat (p-Tr) in Versuchen am Hund und am Kaninchen als völlig ungiftig erwiesen.

Auf Grund unserer früheren Untersuchungen waren wir nun zur Ansicht gelangt, dass die Fermenthemmung durch o-Tr mit dessen übrigen pharmakologischen Eigenschaften genau parallel geht, wenn wir auch die Frage zunächst nicht zu entscheiden zu vermögen, ob diese Fermentwirkung lediglich eine Folge der Vergiftung darstellt oder selbst als ursächlicher Faktor beim Zustandekommen des Vergiftungsbildes anzusehen ist. In jedem Fall müssen wir aber fordern, dass, entsprechend ihrer alleinigen Giftigkeit, ausschliesslich der ortho-Verbindung eine Ferment-hemmende Wirkung zukommt, wenn diese Fermentwirkung nicht bloss eine zufällige und daher für den Mechanismus der Vergiftung bedeutungslose Koinzidenz darstellt.

Nun haben wir bereits in unseren ersten orientierenden Versuchen¹⁾ die drei Isomeren in reiner Form getrennt untersucht und dabei festgestellt, dass in vitro ausser dem o-Tr auch m-Tr die ChE aus Pferdeserum zu hemmen vermochte, während bei p-Tr eine solche Wirkung nicht festgestellt werden konnte. Diese Versuche mussten nun in verschiedenen Richtungen erweitert werden. Zunächst war es nötig, in vitro abgestufte, äquimolare Mengen der verschiedenen Substanzen zu prüfen, um die minimalen Wirkungs Dosen zu ermitteln. Ferner mussten gleiche Fermente verschiedener Herkunft geprüft werden, da schon mehrfach gezeigt werden konnte, dass ein und derselbe Inhibitor das gleiche Ferment je nach dessen Herkunft ganz unterschiedlich stark zu hemmen vermag²⁾³⁾. Und schliesslich musste die Prüfung auf die Wirksamkeit der Substanzen im Tierversuch ausgedehnt werden, da eine Wirkung in vitro nicht mit einer solchen am lebenden Tier übereinzustimmen braucht. Diese letzte Gruppe von Versuchen war ganz besonders angezeigt im Hinblick auf den Umstand, dass m-Tr, im Gegensatz zu seiner Ungiftigkeit, in vitro trotzdem eine Fermenthemmung auszuüben vermochte.

Ausser den drei isomeren Tri-kresyl-phosphaten zogen wir noch zwei weitere verwandte Substanzen mit in die Untersuchungen ein: o-Kresol (o-Kr) und Tri-o-chlor-phenyl-phosphat (o-Cl). o-Tr könnte im Organismus durch Phosphatasen gespalten werden, wodurch o-Kresol frei und für die Wirkung verantwortlich gemacht werden könnte (vgl. hierzu die Untersuchungen von *F. v. Brücke*⁴⁾ an Di-kresyl-phosphat). Diese Möglichkeit musste ausgeschlossen werden

¹⁾ *H. Bloch*, *Helv. Med. Acta* **8**, Suppl. VII, 15 (1941).

²⁾ *E. A. Zeller*, *Helv.* **25**, 1099 (1942).

³⁾ *A. Hottlinger* und *H. Bloch*, *Helv.* **26**, 142 (1943).

⁴⁾ *F. v. Brücke*, *Bioch. Z.* **253**, 470 (1932).

können. Das Tri-o-chlor-phenyl-phosphat¹⁾ ist eine dem o-Tr isostere Verbindung. Im Anschluss an frühere Arbeiten, in denen wir die physiologische Wirkung isosterer Verbindungen an verschiedenen Objekten vergleichend untersuchten²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾, war die Prüfung von o-Cl deshalb besonders interessant, weil die Spezifität der Fermentinhibitoren im allgemeinen gross ist und sich somit Gelegenheit bot, an einem empfindlichen Testobjekt genaue quantitative Daten zu ermitteln.

Methodik.

Die Methodik der ChE- und Lipasebestimmung ist dieselbe wie in den früheren Versuchen (Manometrische Bestimmung im *Warburg-Apparat*). Um Wiederholungen zu vermeiden, sei deshalb für Einzelheiten auf die vorangegangenen Mitteilungen verwiesen. Als Versuchstiere dienten wiederum Kaninchen. Den unter sich annähernd gleich schweren Tieren wurden die zu prüfenden Substanzen in 5 cm³ Olivenöl gelöst mit der Schlundsonde verfüttert, nachdem zuvor an mindestens vier verschiedenen, über eine Woche verteilten Tagen die normalen Fermentwerte im Serum der betreffenden Tiere ermittelt worden waren. Auch in diesen Versuchsreihen bestätigte sich die Tatsache wieder, dass die ChE-Werte des Serums von einem Tier zum andern geringgradig variieren, dass sie aber bei ein und demselben Tier über längere Zeitspannen bemerkenswert konstant bleiben. Anders verhält sich die Serum-lipase. Hier können die Unterschiede von einem Tier zum andern ganz beträchtlich sein (bis zu zehnfach höheren Werten), und auch beim gleichen Tier ist die Konstanz über längere Zeit keine absolute, sondern die Werte sind Schwankungen unterworfen, die ohne erkenntliche äussere Ursachen auftreten. Solche spontanen Schwankungen wirken naturgemäss sehr störend bei täglich vorgenommenen fortlaufenden Bestimmungen über den Einfluss einer dem Tier verabreichten Substanz, sodass sich im vorliegenden Fall die Lipase-Bestimmungen weniger eigneten und ihnen nurmehr ein bedingter Wert zukommt.

Ergebnisse.

1. *In vitro*-Versuche: Die fünf geprüften Substanzen wurden auf ihre hemmende Wirkung gegenüber der ChE und der Lipase aus Menschen- und Kaninchenserum vergleichend untersucht. Die Resultate sind in Tabelle 1 zusammengestellt. In dieser Tabelle ist das

¹⁾ Tri-o-chlor-phenyl-phosphat wurde mir in freundlicher Weise von Herrn Prof. Dr. H. Erlenmeyer zur Verfügung gestellt, wofür ich ihm auch an dieser Stelle bestens danke.

²⁾ H. Bloch, *Naunyn-Schmiedeberg's A.* **193**, 292 (1939).

³⁾ H. Bloch und H. Erlenmeyer, *Helv.* **25**, 694 (1942).

⁴⁾ H. Bloch und H. Erlenmeyer, *Helv.* **25**, 1063 (1942).

⁵⁾ H. Erlenmeyer, H. Bloch und H. Kiefer, *Helv.* **25**, 1066 (1942).

Hemmvermögen der verschiedenen Substanzen in Prozenten ausgedrückt (Totale Hemmung = 100 %), wobei diese Prozentwerte die Mittelwerte aus je fünf Bestimmungen darstellen. Sie stützen sich auf die nach 60 Minuten abgelesenen Endwerte (Leerwerte und Eigenhydrolyse subtrahiert). Dabei ist zu bemerken, dass der Spaltungsverlauf der einzelnen Bestimmung mit geringfügigen Abweichungen linear war.

Tabelle 1.

Inhibitor	Ferment	% Hemmung ¹⁾	Ferment	% Hemmung ¹⁾
o-Tr 0,00135-m.	ChE aus MS	96,5	Lipase aus MS	95
m-Tr 0,00135-m.	..	36	..	34
p-Tr 0,00135-m.	..	0	..	0
o-Kr 0,00135-m.	..	0	..	0
o-Cl 0,00135-m.	..	100	..	75
o-Tr 0,00027-m.	..	76	..	71
m-Tr 0,00027-m.	..	25,5	..	24
o-Cl 0,00027-m.	..	92,5	..	56
o-Tr 0,000054-m.	..	29	..	28
m-Tr 0,000054-m.	..	0	..	0
o-Cl 0,000054-m.	..	77,5	..	24
o-Tr 0,00135-m.	ChE aus KS	29	Lipase aus KS	21
m-Tr 0,00135-m.	..	18	..	0
p-Tr 0,00135-m.	..	0	..	0
o-Kr 0,00135-m.	..	0	..	0
o-Cl 0,00135-m.	..	100	..	28
o-Tr 0,00027-m.	..	19	..	13
m-Tr 0,00027-m.	..	0	..	0
o-Cl 0,00027-m.	..	90	..	21
o-Tr 0,000054-m.	..	0	..	0
o-Cl 0,000054-m.	..	52	..	0

Das Hemmvermögen von Tri-o-, Tri-m-, Tri-p-kresyl-phosphat, o-Kresol und Tri-o-chlor-phenyl-phosphat auf die ChE und Lipase aus Menschen- und Kaninchenserum.

Es ergibt sich aus dieser Tabelle, dass in vitro die ChE aus Menschen Serum ausser durch o-Tr auch noch — allerdings in viel schwächerem Masse — durch m-Tr gehemmt wird, während p-Tr in gleicher Konzentration den fermentativen Abbau des Acetyl-cholins völlig unbeeinflusst lässt. Ebenso wenig vermag o-Kr eine hemmende Wirkung auszuüben, woraus geschlossen werden darf, dass die Wirksamkeit von o-Tr nicht auf abgespaltenes o-Kr zurückgeführt werden kann. Hingegen zeigte es sich, dass das dem o-Tr isostere o-Cl jenes in bezug auf seine Wirksamkeit in vitro noch übertrifft.

Besonders deutlich werden die quantitativen Verhältnisse dann, wenn man die Hemmungswerte abgestufter Dosen der drei ver-

¹⁾ Mittelwerte aus je 5 Bestimmungen.

schiedenen Substanzen in ein Koordinatensystem einträgt (Fig. 1). Aus dieser Figur geht hervor, dass sich die Abnahme des Hemmvermögens

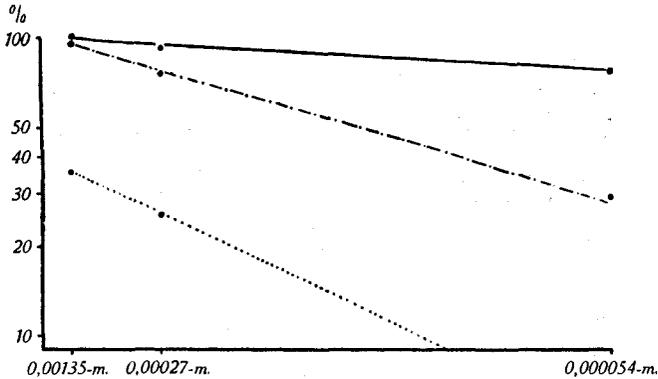


Fig. 1.

Abnahme des Hemmvermögens von Tri-o-kresyl-phosphat (strichpunktiierte Kurve), von Tri-m-kresyl-phosphat (punktiierte Kurve) und von Tri-o-chlor-phenyl-phosphat (ausgezogene Kurve) bei fortschreitender Konzentrationsabnahme des Inhibitors.

der einzelnen Substanzen mit fortschreitender Verdünnung durch die allgemeine Formel

$$\log y = -ax + b$$

ausdrücken lässt, wobei a und b charakteristische, für jede Substanz verschiedene Konstanten darstellen. Diese gleiche Gesetzmässigkeit gilt auch für das Hemmvermögen abgestufter Dosen der untersuchten Substanzen gegenüber der Serum-lipase, sowie gegen ChE und Lipase aus Kaninchenserum. Jedoch waren auch hier wieder, wie schon früher, quantitative Unterschiede im Hemmvermögen je nach der Provenienz des Ferments zu beobachten.

2. Tierversuche: Die Substanzen wurden in einer einmaligen Dosis von 0,15 g/kg an Kaninchen verfüttert und in fortlaufend entnommenen Serumproben die Aktivität von ChE und Lipase bestimmt. Ein typischer Versuch dieser Art ist in Fig. 2 dargestellt. Es zeigte sich, dass ausser dem o-Tr, dessen blockierende Wirkung auf die ChE sich neuerdings bestätigen liess, weder m-Tr noch p-Tr dieses Fermentsystem am lebenden Tier irgendwie zu beeinflussen vermögen, was im übrigen der Ungiftigkeit dieser Substanzen entspricht. Die leicht hemmende Wirkung, welche m-Tr in vitro besitzt, ist am Tier nicht nachzuweisen. Ebenso wenig wie in vitro vermag im Tierversuch o-Kr einen Einfluss auf die ChE auszuüben. Hingegen geht aus Fig. 2 sehr deutlich hervor, dass das dem o-Tr isostere o-Cl auch im lebenden Organismus eine dem o-Tr ähnliche, wenn auch schwächere Wirksamkeit besitzt. Es ist bemerkenswert, dass o-Cl, welches in vitro das o-Tr an Aktivität übertrifft, in vivo dieser

Substanz unterlegen ist, eine Beobachtung, die sich vielfach auch an andern physiologisch wirksamen Stoffen machen lässt.

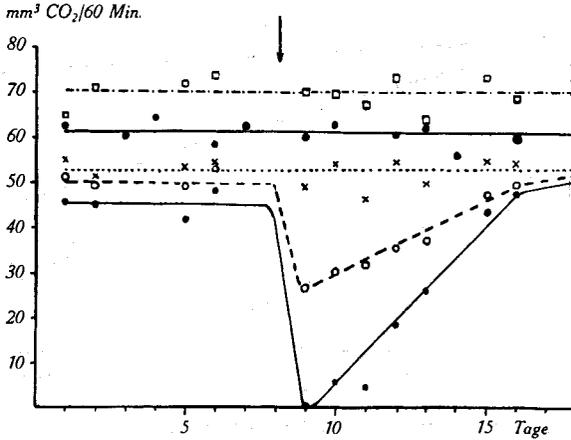


Fig. 2.

Das Verhalten der Serum-Cholin-esterase bei den Kaninchen 32—36. Beim Pfeil wurden den Tieren je 0,15 g/kg der verschiedenen geprüften Substanzen verfüttert.

- Obere ausgezogene Kurve = o-Kresol;
- Untere ausgezogene Kurve = Tri-o-kresyl-phosphat;
- Punktierter Kurve = Tri-m-kresyl-phosphat;
- Strichpunktierter Kurve = Tri-p-kresyl-phosphat;
- Gestrichelte Kurve = Tri-o-chlor-phenyl-phosphat.

Qualitativ genau gleich wie die ChE verhält sich die Serumlipase. Auch hier bleiben die Fermentwerte der mit m-Tr, p-Tr und o-Kr behandelten Tiere über die ganze Beobachtungszeit konstant, während o-Tr die Lipase in der angewandten Dosierung total, o-Cl zu 70 % hemmt, und die Normalwerte innert etwa zehn Tagen wieder erreicht sind. Der Kurvenverlauf ist absolut analog demjenigen der ChE-Werte, weshalb wir auf eine spezielle Wiedergabe verzichten (vgl. auch¹⁾).

Diskussion.

Nachdem im allgemeinen in der Fermentforschung die Frage nach der Spezifität der Fermente in bezug auf ihr Substrat im Vordergrund der Betrachtung steht, war es interessant, an diesem Beispiel die Spezifität eines Fermentinhibitors näher zu untersuchen, womit wir an frühere Versuche anschliessen²⁾. Dass das dem o-Tr isostere o-Cl auch eine qualitativ gleiche Wirkung besitzt, entspricht der Erwartung. Worauf hingegen die quantitativen Unterschiede beruhen, lässt sich zunächst nicht sagen. Hier scheinen noch weitere, bisher

¹⁾ A. Hottlinger und H. Bloch, Helv. **26**, 142 (1943).

²⁾ H. Bloch, Naunyn-Schmiedeberg's A. **193**, 292 (1939).

nicht erkannte Faktoren wesentlich mitzuspielen, und es lässt sich vorerst über die die quantitativen Wirkungsunterschiede zweier isosterer Fermentinhibitoren bedingenden Umstände nichts Sicheres voraussagen. Zum gleichen Schluss gelangt auf Grund ähnlicher Versuche mit ganz andern Stoffpaaren auch *Zeller*¹⁾. Wie wenig einfach die Verhältnisse liegen, erhellt schon daraus, dass das quantitative Wirkungsverhältnis von o-Tr zu o-Cl in vitro genau umgekehrt ist als in vivo.

Dass aber lediglich dem o-Tr die beschriebene Wirkung zukommt, während m-Tr und p-Tr völlig wirkungslos sind, ist ein neues Beispiel dafür, dass stellungsisomere Substanzen vom lebenden Organismus bzw. von organischen Systemen, als gänzlich verschiedene Stoffe differenziert werden. *Landsteiner*²⁾ hat z. B. an Hand serologischer Immunreaktionen festgestellt, dass die drei isomeren Amino-benzoesäuren serologisch streng spezifisch getrennt werden können, während auf der andern Seite aus den Versuchen von *Erlenmeyer* und *Berger*³⁾ hervorgeht, dass in analoger Versuchsanordnung isostere Substanzen gleichartige Wirkung besitzen können.

Zusammenfassung

1. Die hemmende Wirkung auf ChE und Serum-lipase am lebenden Kaninchen besitzt von den drei isomeren Tri-kresyl-phosphaten nur das Tri-o-kresyl-phosphat. Die meta- und die para-Verbindung sind vollständig wirkungslos, während in vitro Tri-m-kresylphosphat noch eine schwache Wirksamkeit besitzt.

2. Diese Fermentwirkung kann nicht auf die Wirksamkeit von abgespaltenem o-Kresol zurückgeführt werden.

3. Das dem Tri-o-kresyl-phosphat isostere Tri-o-chlor-phenyl-phosphat besitzt sowohl in vitro als im Tierversuch eine der Wirkung des Tri-o-kresyl-phosphats ähnliche Aktivität.

Basel, Hygienisches Institut der Universität.

¹⁾ *E. A. Zeller*, *Helv.* **25**, 1099 (1942).

²⁾ *K. Landsteiner*, Die Spezifität der serologischen Reaktionen. J. Springer, Berlin, 1933.

³⁾ Übersicht bei *E. Berger*, *Klin. Wschr.* **14**, 1377 (1935).
