

## 271. Die Erfassung von Bestrahlungsprodukten mittels peroxydatisch wirkender Fermente<sup>1)</sup>

von H. Aebi, R. Gressly, R. Oestreicher und A. Zuppinger

Dem Andenken an unsern Kollegen und Freund, Prof. W. BUSER († am 4. X. 1959), gewidmet.

(7. X. 59)

Die Wirkung ionisierender Strahlen kommt nach heutiger Auffassung dadurch zustande, dass die primär gebildeten Bestrahlungsprodukte eine Reihe chemischer Umsetzungen verursachen. Handelt es sich um wässrige Medien – was für lebende Organismen zutrifft –, kommt es zunächst zur Bildung kurzlebiger Ionen und Radikale. Nach WEISS<sup>2)</sup> ergeben sich zwischen diesen Partikeln zahlreiche Reaktionsmöglichkeiten. Für die in der Folge auftretenden Strahlenwirkungen indirekter Art wird unter anderem  $H_2O_2$  verantwortlich gemacht, welches durch Vereinigung von  $2 H + O_2$  oder durch Rekombination von OH-Radikalen gebildet wird. Von praktischer Bedeutung ist dabei, dass Ionenausbeute und Ausmass der  $H_2O_2$ -Bildung von der Strahlenqualität (Ionisationsdichte), von der Zusammensetzung der Gasphase und von der Beschaffenheit des bestrahlten Systems abhängen. Die oxydierende Wirkung von OH-Radikalen und  $H_2O_2$  kann auf verschiedene Weise zur chemischen Dosimetrie ionisierender Strahlen herangezogen werden. Am verbreitetsten dürfte das «FRICKE-Dosimeter» sein, welches auf der Oxydation von  $Fe^{++} \rightarrow Fe^{+++}$  in saurer Lösung beruht.

Es stellt sich in dieser Hinsicht die Frage, ob nicht auch enzymatische Reaktionen, welche die Übertragung von  $H_2O_2$  und eventuell von Radikalen bewirken, zum Nachweis oder sogar zur Messung derartiger Bestrahlungsprodukte herangezogen werden können. Hierfür kommen in erster Linie Katalase und Peroxydase in Frage. Beide Enzyme besitzen die Fähigkeit, bei gleichzeitiger Anwesenheit von  $H_2O_2$  und einem geeigneten H-Donor peroxydatisch zu wirken. Dabei kommt es zur Oxydation des H-Donors durch die aktive Enzym- $H_2O_2$ -Zwischenverbindung (sog. Komplex I). Da Leberkatalase und Meerrettichperoxydase relativ strahlenresistent sind, steht einer Verwendung dieser Fermente – jedenfalls in dieser Hinsicht – nichts entgegen. Wie aus den hier mitgeteilten Untersuchungen hervorgeht, kann ein solcher Nachweis durch Zugabe eines geeigneten H-Donors zum System erreicht werden. Durch Verwendung einer <sup>14</sup>C-markierten Substanz oder eines Chromogens als H-Donor ist es auf diese Weise möglich, geringe Mengen von peroxydatisch umgesetztem Substrat zu erfassen. Derartige gekoppelte Oxydationsvorgänge haben allerdings den Nachteil, dass stets nur ein gewisser Prozentsatz des gebildeten  $H_2O_2$  peroxydatisch umgesetzt wird. Dem steht der Vorteil gegenüber, dass das entstandene  $H_2O_2$  nicht

<sup>1)</sup> Über einen Teil dieser Versuche ist anlässlich der 53. Tagung des schweizerischen Vereins für Physiologie, physiologische Chemie und Pharmakologie vom 22. 11. 58 in Genf vorgetragen worden; vgl. *Helv. physiol. Acta* **16**, C 66 (1958).

<sup>2)</sup> J. WEISS, *Nature* **153**, 748 (1944); *Adv. in Catalysis* **4**, 343 (1952).

angereichert, sondern sofort zur Bildung des «Indikatorproduktes» ( $^{14}\text{CO}_2$  bzw. Chinonderivat) verbraucht wird.

Es sind in dieser Hinsicht untersucht worden:

1. Leberkatalase +  $^{14}\text{C}$ -Formiat (als H-Donor) = «Reagens». Reaktionsprodukt:  $^{14}\text{CO}_2$  bzw.  $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ .

2. Meerrettichperoxydase + o-Dianisidin (als H-Donor) = «Reagens». Reaktionsprodukt: entspr. Chinon-Derivat.

Durch Variation verschiedener experimenteller Bedingungen ist zunächst versucht worden, die Bedeutung der einzelnen Faktoren abzuklären und eine optimale Ausbeute zu erreichen. Von Interesse ist vor allem die Tatsache, dass bei gleichbleibender Zusammensetzung des Systems und bestimmter Strahlenqualität direkte Proportionalität zwischen Dosis und Wirkung besteht. Schliesslich sind Experimente mit Katalase-Inhibitoren sowie Konkurrenzversuche mit mehreren H-Donoren ausgeführt worden, um weitere Einblicke in die recht komplexen Vorgänge zu erhalten, die sich bei der Röntgenbestrahlung dieser Modellsysteme abspielen.

### Experimenteller Teil

1. **Methodisches.** – a) *Bestimmung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit Titansulfat.* Diese Methode wurde vor allem zur Vergleichszwecken herangezogen, z. B. zur Bestimmung der in den bestrahlten Versuchsansätzen (ohne Enzym) vorhandenen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Menge. Das Prinzip dieser von EGERTON<sup>3)</sup> beschriebenen Methode ist folgendes: In Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  kommt es bei saurer Reaktion zur Oxydation von Titan(II)-sulfat, wobei ein gelbes  $(\text{TiO}_2, \text{aq})^{++}$ -Ion gebildet wird. Dieses lässt sich photometrisch messen (z. B. mit Photometer «EPPENDORF»), Filter 436 m $\mu$ ). Bei Verwendung von 3 ml Analysenlösung und 1 ml Titansulfatreagens lassen sich 0,3  $\gamma$ /ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  noch gut erfassen. Zur Herstellung des Reagens werden 200 mg Titan(II)-sulfat in 20 ml konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gelöst und mit Aq. dest. auf 100 ml verdünnt. Diese leicht bläuliche Lösung geht nach Zusatz von einigen Tropfen  $\text{H}_2\text{O}_2$  (stark verdünnt!) in ein gerade erkennbares Gelb über.

b) *Das Indikatorsystem Peroxydase und o-Dianisidin* beruht in seiner Wirkungsweise darauf, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Gegenwart von Peroxydase das Chromogen o-Dianisidin zu einem braunen Farbstoff oxydiert. Die Menge des entstandenen Farbstoffes wird im Photometer bei 436 m $\mu$  gemessen und ist der vorhandenen bzw. gebildeten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Menge proportional. Als Kontrolle dient ein unbestrahlter Ansatz bzw. ein Ansatz ohne  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Zur Eichung der Messwerte werden einige Parallelansätze mit bekannter  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration im Versuch mitgeführt.

*Reagenzien: Substrat-Puffergemisch.* 1 ml 0,5-proz. Lösung von o-Dianisidin (reinst, «FLUKA») in Aceton werden mit 150 ml m/15 Phosphatpuffer pH = 7,0 verdünnt.

*Enzymlösung.* 0,1-proz. wässrige Lösung von Meerrettich-Peroxydase («BOEHRINGER»). Die Eichkurve wurde mit Perhydrol («MERCK») erstellt.

*Die Zusammensetzung der Versuchsansätze* war, sofern nicht anders vermerkt, die folgende:  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Eichkurve: 5,0 ml o-Dianisidin-Puffergemisch; 0,5 ml Peroxydaselösung; 0,8 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung, enthaltend z. B. 0,1–5,0  $\mu\text{Mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 1,7 ml aq. dest. (ad. 8,0 ml).

*Bestrahlungsversuche:* 5,0 ml o-Dianisidin-Puffergemisch; 0,5 ml Peroxydaselösung; 2,5 Aq. dest. ad 8,0 ml.

In beiden Fällen gelangten kleine Kristallisierschalen mit Plexiglasdeckel zur Verwendung. Zur Vornahme der photometrischen Bestimmung wurde ein aliquoter Teil des Ansatzes nach Versuchsablauf in eine Kuvette von 10 mm Schichtdicke übergeführt.

c) *Das Indikatorsystem Katalase und  $^{14}\text{C}$ -Formiat* (s. Tab. I). Wie früher gezeigt worden ist, wird Formiat bei Gegenwart einer geeigneten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Quelle durch Katalase peroxydatisch umgesetzt<sup>4)</sup>). Bei Verwendung von  $^{14}\text{C}$ -Formiat (Radiochemical Centre Amersham) entsteht dabei

<sup>3)</sup> A. EGERTON, *Analyt. chim. Acta* **10**, 422 (1954).

<sup>4)</sup> D. KEILIN & E. F. HARTREE, *Biochem. J.* **59**, 293 (1945).

<sup>5)</sup> EVA FREI & H. AEBI, *Helv.* **41**, 241 (1958).

$^{14}\text{CO}_2$  als Reaktionsprodukt, welches durch Auffangen in Lauge und Überführen in  $\text{BaCO}_3$  bestimmt werden kann.

Zusammensetzung des Standardansatzes: 3,0 ml Phosphatpuffer, m/15, pH 6,8; 0,4 m 0,04-m.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (als Carrier); 0,4 ml 0,2-m. Lösung von  $^{14}\text{C}$ -Formiat; 0,4 ml Lösung von krist. Leberkatalase «BOEHRINGER» (ca. 20  $\gamma$ /ml), 3,8 ml Aq. dest. (ad 8,0 ml).

Es wurden kleine Glasgefäße verwendet (Kristallisierschalen mit 4 cm Durchmesser und 2,5 cm Höhe), welche mit einem Plexiglasdeckel von 3 mm Dicke verschliessbar sind. Mit Hilfe eines kurzen Plexiglasbügels kann im Innern des Gefässes ein kleines Plastic-Näpfchen aufgehängt

Tabelle I. *Oxydation von  $^{14}\text{C}$ -Formiat zu  $^{14}\text{CO}_2$  durch RÖNTGEN-Strahlen bei Gegenwart und in Abwesenheit von Katalase*

Exp. Nr.	Ansatz		Strahlendosis (r)	Oxyd. Formiat ( $\mu\text{Mol}$ )	$Q \frac{\text{enzymat.}}{\text{nicht enzym. Formiatoxydat.}}$
	$^{14}\text{C}$ -Formiat (80 $\mu\text{Mol/A}$ )	Katalase (160 $\gamma$ /A)			
1	+	-	4000	0,10	0,71
	+	*		0,11	
	+	+		0,18	
2	+	-	9000	0,21	0,71
	+	*		0,21	
	+	+		0,36	
3	+	-	15000	0,38	0,67
	+	*		0,36	
	+	+		0,62	

\* = Hitze-inaktivierte Katalase

werden. Dieses wurde mit 0,3 ml 20-proz.  $\text{NaOH}$  beschickt. Gasphase: Luft. Zirka 15 Min. nach erfolgtem Einfüllen und Verschliessen der Ansätze konnte mit der Bestrahlung begonnen werden. Nach Versuchsende wurde zunächst eine pH-Kontrolle vorgenommen. Zu diesem Zweck wurde ein Tropfen des Ansatzes durch eine feine (verschliessbare) Öffnung im Deckel entnommen. Durch die gleiche Öffnung erfolgte dann ein Zusatz von 1 ml 20-proz. Trichloressigsäurelösung. Damit sollte jede weitere Reaktion abgestoppt und gleichzeitig eine möglichst vollständige Austreibung des gebildeten  $\text{CO}_2$  aus dem angesäuerten Ansatz erreicht werden. Nach nochmaligem Schütteln der Ansätze während 60 Min. erfolgte das Überführen der Lauge aus dem Plastic-näpfchen in die vorbereiteten ERLÉNMEYER-Kölbchen. Diese enthielten 2,0 ml 0,1-m.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,5 ml 2-m.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung und ca. 10 ml aqua dest. Durch Zugabe von 1 ml 1,0-m.  $\text{BaCl}_2$ -Lösung zur heissen Lösung wurde das  $\text{BaCO}_3$  ausgefällt und dieses sodann auf übliche Weise zu  $\text{BaCO}_3$ -Plättchen verarbeitet. Die Aktivität dieser Plättchen wurde im Helium-Durchflusszähler (TRACER-LAB. Co.) gemessen; die resultierenden Aktivitäten wurden hinsichtlich Nulleffekt und Selbstabsorption korrigiert. Die feuchte Verbrennung des  $^{14}\text{C}$ -Formiats ergab eine spezifische Aktivität von 2050 Counts/Min./ $\mu\text{Äq}$ .

Die Katalasefähigkeit der Enzym-Stammlösung wurde nach BONNICHSEN, CHANCE & THEORELL<sup>6)</sup> bestimmt. Zu Vergleichszwecken diente bei einer Reihe von Versuchen auch die photometrische Methode von BERGMAYER<sup>7)</sup>. Bei allen übrigen Aktivitätsbestimmungen wurde die Methode von FEINSTEIN<sup>8)</sup> verwendet. Hinsichtlich technischer Einzelheiten sei auf <sup>9)</sup> verwiesen.

Zur Durchführung der Bestrahlungen stand ein PICKER-Therapiegerät zur Verfügung. Während der Bestrahlung wurden die Proben zum Ausgleich von Feldinhomogenitäten auf einem

<sup>6)</sup> R. BONNICHSEN, B. CHANCE & H. THEORELL, Acta chem. scand. 1 685 (1947).

<sup>7)</sup> H. U. BERGMAYER, Biochem. Z. 327, 255 (1955).

<sup>8)</sup> R. N. FEINSTEIN, J. biol. Chemistry 180, 1197 (1949).

<sup>9)</sup> R. GRESSLY, H. ERLÉNMEYER & H. AEBI, Helv. 42 204 (1959).

Plexiglasgestell rotierend bewegt. Bestrahlungsbedingungen: 250 kV; 15 mA; 1,0 mm Al- + 0,25 mm Cu-Filter; Fokusabstand 26 cm; Dosimetrie mittels VICTOREEN-Kammer; mittlere Dosisleistung ca. 300 r/Min.

2. **Abhängigkeit der Formiatoxydation von verschiedenen Versuchsbedingungen.** – *Formiatkonzentration.* Wird bei sonst gleichbleibender Versuchsanordnung die im Ansatz vorhandene Formiatmenge variiert, so ergibt sich bis zu etwa 10  $\mu\text{Mol/ml}$  eine starke Konzentrationsabhängigkeit der Formiatoxydation. Oberhalb dieses Wertes ist die bei einer bestimmten Strahlendosis resultierende Ausbeute an  $^{14}\text{CO}_2$  von der Formiatkonzentration praktisch unabhängig. Der Verlauf der in Fig. 1a dargestellten Sättigungskurve zeigt, dass eine Formiatkonzentration von 10-millimolar (80  $\mu\text{Mol/Ansatz}$ ) als zweckmässig anzusehen ist. Der Kurvenverlauf entspricht demjenigen, wie er bei der Formiatoxydation durch Leberschnitte oder durch

Fig. 1 a und 1 b: Variation der  $^{14}\text{C}$ -Formiat- bzw. Enzymkonzentration in röntgenbestrahlten Ansätzen

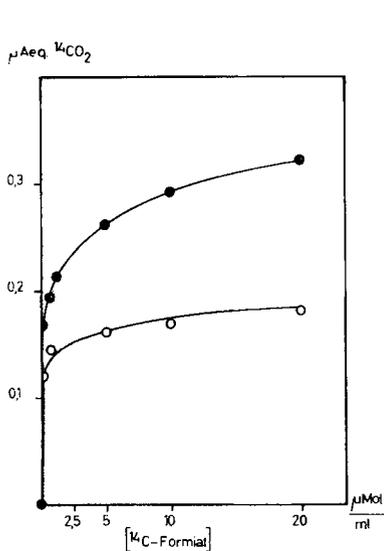


Fig. 1 a

Ordinate:  $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung, in  $\mu\text{Äq./Ansatz}$   
Abszisse: Formiatkonzentration in  $\mu\text{Mol/ml}$   
Ansätze mit krist. Leberkatalase (●) bzw.  
ohne Katalase (○)

Strahlendosis: 9000 r

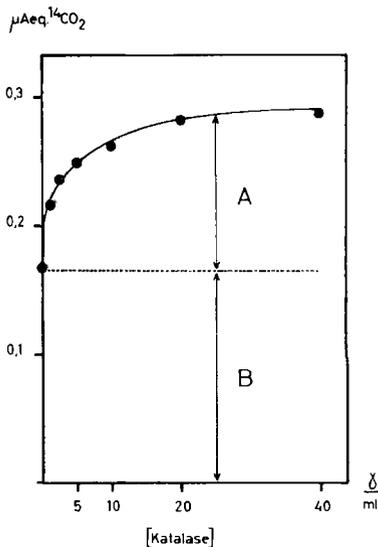


Fig. 1 b.

Ordinate:  $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung in  $\mu\text{Äq./Ansatz}$   
Abszisse: Katalasemenge in  $\gamma/\text{ml}$  (Leberkatalase vom Rind; Katalase-Fähigkeit (40000))

A = enzymatischer,

B = nicht-enzymatischer Anteil der Formiatoxydation

Strahlendosis: 6000 r

das System Katalase + Notatin + Glucose zu beobachten ist<sup>10)11)</sup>. Bei allen wird der halbe Maximalwert bei einer Konzentration von 1–2  $\mu\text{Mol/ml}$  Formiat überschritten. Diese formale Identität des Kurvenverlaufes spricht dafür, dass dieser in allen drei Fällen durch denselben Faktor, wahrscheinlich die Affinität zwischen Katalase und Formiat bestimmt wird.

*Enzymmenge.* Wird zur Ermittlung der optimalen Enzymmenge der Katalasezusatz variiert, so ergibt sich gleichfalls eine Sättigungskurve. Wie aus Fig. 1 b ersichtlich, zeigt diese einen etwas flacheren Verlauf. Ein Grenzwert scheint bei einer Enzymmenge von über 20  $\gamma/\text{ml}$  erreicht zu werden. Demzufolge ist diese Menge bei allen weiteren Versuchen beibehalten worden. Wie aus

<sup>10)</sup> H. AEBI, EVA FREY, R. KNAB & P. SIEGENTHALER, *Helv. physiol. Acta* **15**, 150 (1957).

<sup>11)</sup> H. AEBI & EVA FREY, *Helv.* **41**, 361 (1958).

Fig. 1 b weiter hervorgeht, wird selbst in Ansätzen ohne Katalase  $^{14}\text{C}$ -Formiat in einem gewissen Ausmass zu  $^{14}\text{CO}_2$  oxydiert. Dies entspricht der von HART<sup>12)</sup> gemachten Beobachtung, dass Ameisensäure in wässriger Lösung durch ionisierende Strahlen in  $\text{CO}_2$  übergeführt werden kann. Dieser Grösse kommt somit der Charakter eines Leerwertes zu. Dass es sich bei der in Gegenwart von Katalase erfolgenden zusätzlichen Formiatoxydation nicht um einen katalytischen Effekt (z. B. Häminkatalyse) handelt, sondern um eine echte Fermentwirkung, geht aus den in Tab. I wiedergegebenen Versuchen hervor. Danach erhält man in Ansätzen mit Hitze-inaktivierter Katalase (15 Min. bei 90°) dieselbe  $^{14}\text{CO}_2$ -Ausbeute wie in solchen ohne Enzymzusatz. Unter den hier gewählten Versuchsbedingungen beträgt das Verhältnis zwischen dem enzymatischen (A) und dem nicht-enzymatischen Anteil (B) der Formiatoxydation ca. 0,8:1,0. Diese an sich ungünstige Verhältniszahl scheint von den Versuchsfaktoren nur wenig abhängig zu sein. Versuche, den nicht-enzymatischen Anteil zu reduzieren, haben zu keinem verwertbaren Resultat geführt. Auch unbestrahlte Kontrollansätze weisen eine allerdings geringe Aktivität auf. Somit setzt sich die Totalmenge an oxydiertem Formiat bei Bestrahlung eines Standardansatzes, welcher aktive Katalase enthält, aus drei Anteilen zusammen: 1. einem enzymatischen Anteil, 2. einem nicht-enzymatischen Anteil und 3. einem (unbestrahlten) Reagenzienleerwert.

*Flüssigkeitsvolumen.* Beim Zustandekommen indirekter Strahlenwirkungen spielt der Verdünnungseffekt eine besondere Rolle. Aus Versuchen mit variiertem Flüssigkeitsvolumen geht hervor, dass dies auch hier der Fall ist. So hat die Verdoppelung des Volumens bei gleicher Strahlendosis nahezu eine Verdoppelung der  $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung im Ansatz zur Folge, obgleich dabei Formiat- und Enzym-Konzentration auf die Hälfte reduziert worden sind. Wird z. B. ein Standard-Versuchsansatz (8 ml) mit 9000 r bestrahlt, so werden  $0,34 \mu\text{Äq.}$  Formiat oxydiert. Wenn dasselbe System jedoch im halben Volumen (4 ml) bestrahlt wird, sinkt die Ausbeute auf 0,19 und bei nochmaliger Reduktion des Volumens auf 2 ml gar auf  $0,09 \mu\text{Äq.}$  Formiat. Die Abhängigkeit der  $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung vom Gesamtflüssigkeitsvolumen des Ansatzes erstreckt sich gleichermassen auf den enzymatischen und den nicht-enzymatischen Anteil der Formiatoxydation. Würde die Konzentration eine entscheidende Rolle spielen, so wäre das Gegenteil zu erwarten. Auf Grund dieses Ergebnisses sind alle Bestrahlungsversuche mit relativ grossen Flüssigkeitsvolumina (8 ml/Ansatz) ausgeführt worden.

*Aktuelle Reaktion.* Nach CHANCE<sup>13)</sup> zeigt die Katalase einen auffallend breiten Verlauf der pH-Aktivitätskurve, deren Optimum sich über einen Bereich von pH 4 bis pH 8 erstreckt. Innerhalb dieses Intervalls (pH 4–7) lassen sich auch im Bestrahlungsversuch keine Unterschiede bezüglich  $^{14}\text{CO}_2$ -Ausbeute feststellen.

*Temperatur und Aggregatzustand.* In orientierenden Versuchen hat sich gezeigt, dass die Formiatoxydation durch Strahleneinwirkung temperaturabhängig ist. Gefriert man die fertig gemischten Ansätze vor Beginn der Bestrahlung und führt diese bei einer Temperatur von ca.  $-15^\circ$  aus, so wird gleichfalls eine kleine, aber gut messbare Menge  $^{14}\text{CO}_2$  gebildet. Der Prozentsatz ist im Vergleich zu den unter Standardbedingungen ( $20^\circ$ ) resultierenden Ausbeute schwankend, im Mittel  $1/3$ – $2/3$ . Die experimentelle Abklärung des Faktors Aggregatzustand wird unter anderem dadurch erschwert, dass die Katalase beim Vorgang des Einfrierens bzw. Auftauens eine Aktivitätseinbusse erleidet und sie zudem im gefrorenen Ansatz anscheinend inhomogen verteilt ist.

**3. Einfluss der Strahlendosis.** – *System Katalase-Formiat.* Bei Bestrahlung eines Standardansatzes mit einer beliebigen r-Dosis resultiert eine bestimmte, reproduzierbare Menge von  $^{14}\text{CO}_2$ , z. B. bei 6000 r (250 kV, 15,0 mA, 0,25 Cu + 1,0 Al)  $0,25 \mu\text{Äq.}$  Wird die Strahlendosis variiert, ergibt sich, dass die gebildete  $^{14}\text{CO}_2$ -Menge der Dosis direkt proportional ist. Wie Fig. 2a zeigt, trifft dies für den ganzen experimentellen Bereich zu, und zwar für die enzymatische und die nicht-enzymatische Komponente der Formiatoxydation. Aus den in Fig. 2a dargestellten Dosis-Wirkungskurven lassen sich folgende Ausbeuten errechnen: a)  $0,42 \mu\text{Mol}$  total oxydiertes  $^{14}\text{C}$ -Formiat pro  $10^4$  r und b)  $0,23 \mu\text{Mol}$  nicht-enzymatisch oxydiertes Formiat pro  $10^4$  r. Aus diesen Zahlen geht hervor, dass der prozentuale Anteil an oxydiertem Formiat bezogen auf die im Ansatz vorhandene Gesamtmenge ( $80 \mu\text{Mol}$ ) recht klein ist. Er beträgt bei einer Dosis von 1000 r ca.  $1\%$  und bei  $10^4$  r ca.  $5\%$ . Bei diesen Experimenten ist  $^{14}\text{C}$ -Formiat von mittlerer spezifischer

<sup>12)</sup> E. J. HART, J. phys. Chemistry **56**, 594 (1952).

<sup>13)</sup> B. CHANCE, J. biol. Chemistry **194**, 471 (1952).

Aktivität verwendet worden. Wir haben daher – um Messproben von genügend hoher Aktivität zu erhalten – meist mit Strahlendosen von ca. 6000 r gearbeitet.

Es sei hier noch auf die Frage der Stabilität der Katalase in verdünnter Lösung, bestrahlt und unbestrahlt, eingegangen. Vergleichende Aktivitätsbestimmungen nach FEINSTEIN<sup>8)</sup> in aliquoten Teilen unbestrahlter Kontrollansätze haben ergeben, dass es unter den gewählten Versuchsbedingungen mit der Zeit zu einer Abnahme der Katalaseaktivität kommt. Diese Aktivitätsabnahme beträgt z. B. nach 1 Std. 16%. Vergleicht man zum gleichen Zeitpunkt die Katalaseaktivität bestrahlter Ansätze mit derjenigen unbestrahlter Kontrollen von gleicher Zusammensetzung, ist z. B. bei einer Dosis von 10000 r ein weiterer Aktivitätsabfall von 25% zu beobachten.

Fig. 2a und 2b: Dosis-Wirkungskurven für das System Katalase-<sup>14</sup>C-Formiat (Fig. 2a) und für das System Peroxydase-Dianisidin (Fig. 2b)

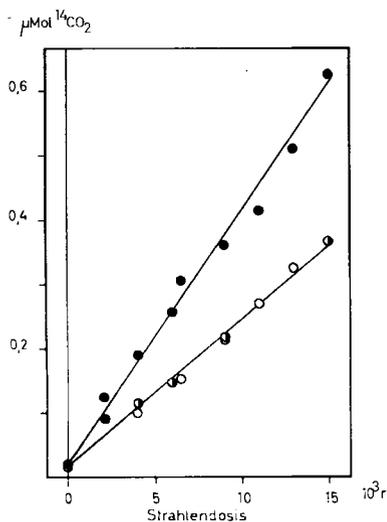


Fig. 2a

Ordinate: <sup>14</sup>C<sub>2</sub>-Bildung in µÄq./Ansatz  
Abszisse: Strahlendosis in r

- Ansätze mit: <sup>14</sup>C-Formiat + aktive Katalase
- Ansätze mit: <sup>14</sup>C-Formiat + Hitze-inaktivierte Katalase
- Ansätze mit: <sup>14</sup>C-Formiat ohne Enzymzusatz

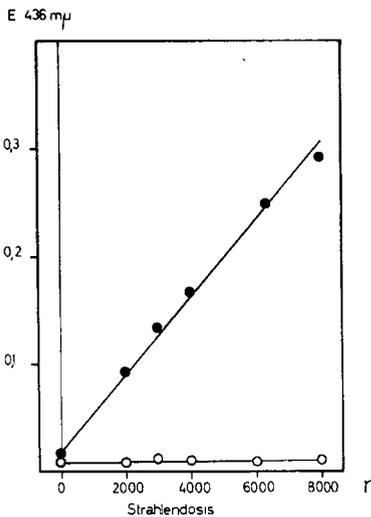


Fig. 2b

Ordinate: Extinktion (E 436 mµ) Abszisse: Röntgendosis in r

- Ansätze mit: o-Dianisidin + Peroxydase
- Ansätze mit: o-Dianisidin ohne Enzymzusatz

*System Peroxydase-Dianisidin.* Da dieses System in der klinischen Chemie bereits routinemässig Verwendung findet, ist auf eine Untersuchung der einzelnen Versuchsfaktoren verzichtet worden. Die hier gewählten Konzentrationsverhältnisse entsprechen etwa denen, wie sie zur enzymatischen Glucose-Bestimmung<sup>14)</sup> gebraucht werden. Wird eine Serie von Parallelansätzen, enthaltend Peroxydase und Dianisidin, unter sonst gleichen Bedingungen verschieden lang bestrahlt, so resultiert auch hier direkte Proportionalität zwischen applizierter Strahlendosis und Extinktion. Wie aus Tab. II hervorgeht, beträgt die bei 436 mµ gemessene Extinktionszunahme pro 1000 r im Mittel  $\Delta E = 0,036$ . Hinsichtlich Blindwert ergibt sich hier insofern ein anderes Verhalten, als o-Dianisidin-Lösung bei Abwesenheit von Peroxydase nach Bestrahlung keine feststellbare Extinktionszunahme zeigt (vgl. Fig. 2b). Wird hingegen Hitze-inaktivierte Peroxydase zugesetzt, so kommt es im Bestrahlungsversuch gleichfalls zu einer Oxydation von o-Dianisidin. Auch hier resultiert direkte Proportionalität zwischen Dosis und Wirkung. Die

<sup>14)</sup> J. D. TELLER, Abstr. Amer. Chem. Soc. 130th Meeting 69 C (1956); A. HUGGETT & D. A. NIXON, Biochem. J. 66, 12 (1957).

Umsätze betragen 60–80% im Vergleich zu den Ansätzen mit aktivem Enzym. Um eine Vorstellung von der Grössenordnung der zur Oxydation erforderlichen  $H_2O_2$ -Menge zu erhalten, ist die bei der Bestrahlung gemessene Oxydation von *o*-Dianisidin mit derjenigen verglichen worden, wie sie nach  $H_2O_2$ -Zusatz beobachtet werden kann. Eine derartige  $H_2O_2$ -Eichkurve verläuft im Bereich von 0,01 bis 0,5  $\mu$ Mol  $H_2O_2$ /Ansatz praktisch linear. Dabei ist pro 0,1  $\mu$ Mol  $H_2O_2$  eine Extinktionszunahme von  $\Delta E = 0,11$  zu beobachten.

Tabelle II. Oxydation von *o*-Dianisidin durch RÖNTGEN-Strahlen bei Gegenwart und Abwesenheit von Peroxydase

Dosis (r)	Ansatz: Peroxydase (0,5 mg/Ans.)	Extinktion (E 436 m $\mu$ )			$\mu$ Mol $H_2O_2$	
		Ablesung	Differenz	$\Delta E/1000$ r	Umrechnung	$\Delta/1000$ r
0	—	0,008	—	—	—	—
	*	0,016	—	—	—	—
	+	0,016	—	—	—	—
2000	—	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000
	*	0,060	0,044	0,022	0,042	0,021
	+	0,093	0,077	0,038	0,074	0,037
8000	—	0,012	0,004	0,001	0,004	0,001
	*	0,180	0,164	0,021	0,156	0,020
	+	0,293	0,277	0,034	0,266	0,033

\* = Hitze-inaktivierte Peroxydase (30 Min. bei 100°)

**4. Beeinflussung der Formiatoxydation durch Effektoren.** – Um weiteren Aufschluss über die Art der Strahlenwirkung auf das System Katalase-Formiat zu erhalten, sind verschiedene Inhibitoren bzw. Effektoren auf ihre Wirkung gegenüber dem enzymatischen und nicht-enzymatischen Anteil der Formiatoxydation geprüft worden.

*Wirkung von Na-Azid.* Als einer der stärksten Katalase-Inhibitoren bewirkt Azid auch hier eine Einschränkung der Formiatoxydation. Wie aus Fig. 3a ersichtlich, genügt bereits eine Azidkonzentration von  $10^{-4}$ -m., um den enzymatischen Anteil der  $^{14}CO_2$ -Bildung aus Formiat praktisch vollständig zu unterdrücken. Misst man die verbleibende Katalaseaktivität nach FEINSTEIN<sup>8)</sup>, so ergibt sich ein gleichsinniges Verhalten. Obwohl es sich beim enzymatischen Anteil der durch Strahleneinwirkung bedingten Formiatoxydation um den Ausdruck einer peroxydatischen Aktivität dieses Fermentes handelt, zeigen die  $I_{50}$ -Werte eine recht gute Übereinstimmung mit der Azidwirkung auf die  $H_2O_2$ -Spaltung. Der  $I_{50}$ -Wert beträgt im Bestrahlungsversuch  $1,2 \cdot 10^{-6}$ -m. und im Aktivitätstest nach FEINSTEIN<sup>8)</sup>  $I_{50} = 2,1 \cdot 10^{-6}$ -m. Der nicht-enzymatische Anteil der Formiatoxydation wird durch die hier verwendeten Azidmengen nicht beeinflusst.

*Beeinflussung durch Äthanol.* Wie in Fig. 3b dargestellt, bewirkt auch Äthanol eine Hemmung der  $^{14}CO_2$ -Bildung. Im Gegensatz zur Azidwirkung erstreckt sich diese auf beide Komponenten der Formiatoxydation. Der enzymatische Anteil wird indessen weit stärker gehemmt. Bereits bei einer Äthanolkonzentration von 0,5–1,0% ist eine enzymatische Oxydation nicht mehr sicher nachweisbar, während der nicht-enzymatische Anteil nur auf rund die Hälfte reduziert wird. Da eine Äthanolkonzentration von 1% auf die  $H_2O_2$ -spaltende Wirkung der Katalase ohne Einfluss ist<sup>15)</sup>, kommt eine unspezifische Fermentinaktivierung hierfür nicht in Frage. Vielmehr dürfte Äthylalkohol als weiterer möglicher H-Donor dem  $^{14}C$ -Formiat gegenüber als Konkurrent auftreten.

*Thiolverbindungen.* Im Hinblick auf die Bedeutung verschiedener SH-Verbindungen als Strahlenschutzsubstanzen sind einige dieser Stoffe auf ihre Effektorenwirkung im System Katalase-Formiat getestet worden. Die Wirkung von Cystein und von Cysteamin auf den enzymatischen und den nicht-enzymatischen Anteil der Formiatoxydation ist verschieden. Die Messung des enzymatischen Anteiles kann deshalb keine Auskunft über das während der Bestrahlung

<sup>15)</sup> R. GRESSLY, Med. Diss. Universität Bern 1959.

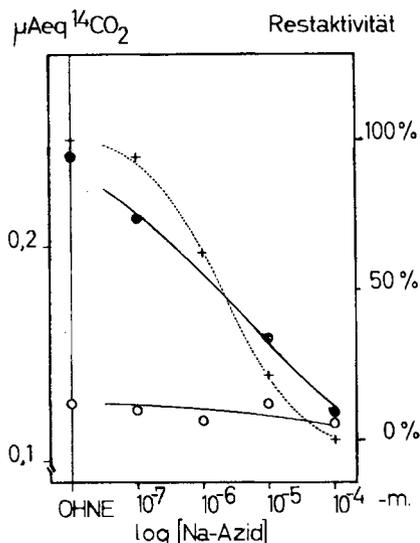
Fig. 3a und 3b: Effekt von Na-Azid (Fig. 3a) und Äthanol (Fig. 3b) auf die  $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung im System Katalase-Formiat

Fig. 3a

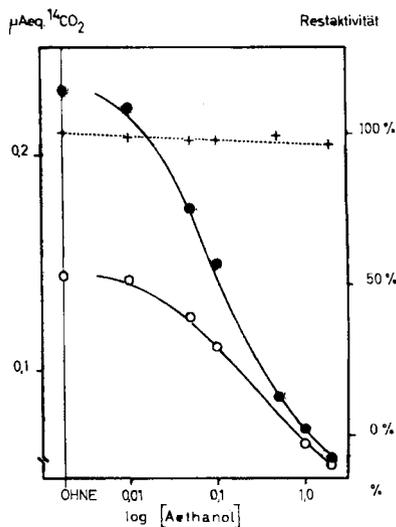


Fig. 3b

Ordinate: links:  $\mu\text{Äq. }^{14}\text{CO}_2/\text{Ansatz}$ rechts: verbleibende Katalase-Aktivität in % (bestimmt nach FEINSTEIN<sup>8</sup>)

Abszisse: Effektorenkonzentration

- Komplettes System Katalase +  $^{14}\text{C}$ -Formiat
  - Ansätze ohne Enzym
  - + Katalase-Aktivität
- Strahlendosis: 6000 r

Tabelle III. Einfluss von Cysteamin auf die Formiatoxydation im System Katalase- $^{14}\text{C}$ -Formiat

Cysteamin- zusatz mg/Ansatz	$^{14}\text{CO}_2$ -Bildung in $\mu\text{Äq.}/\text{Ansatz}$			
	bestrahlt (8000 r)		unbestrahlt	
	mit aktiver Katalase	ohne Katalase	mit aktiver Katalase	ohne Katalase
—	0,33	0,18	0,04	0,03
1	0,60	0,08	0,60	0,03
10	1,14	0,03	1,04	0,03
20	1,08	0,02	1,12	0,02
40	0,38	0,03	0,43	0,02

produzierte  $\text{H}_2\text{O}_2$  geben, weil bei der Thiooxydation selbst Peroxyd gebildet wird. Dass dieses für gekoppelte Oxydationsvorgänge, z. B. zur Formiatoxydation verwendet werden kann, ist früher gezeigt worden<sup>11</sup>). In Bestätigung dieser Befunde bewirken bereits geringe Thiolzusätze in bestrahlten Proben eine starke Erhöhung der  $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung. Von Interesse ist dagegen, dass die Formiatoxydation im Bestrahlungsversuch bereits bei sehr geringen Thiolkonzentrationen ein Maximum durchläuft und bei fortschreitender Erhöhung der Thiolkonzentration eine graduelle Abnahme der Formiatoxydation zu beobachten ist. Betrachtet man dagegen das Verhalten des nicht-enzymatischen Anteiles (Ansätze ohne aktive Katalase), so kommt es bereits bei Thiol-

konzentrationen von 1 bis 2  $\mu\text{Mol/ml}$  zu einer starken Abnahme der  $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung aus Formiat (vgl. Tab. III). Sie beträgt bei 1,6  $\mu\text{Mol/ml}$  Cystein noch die Hälfte des Ausgangswertes und nähert sich asymptotisch einem Mindestwert, der grössenordnungsmässig dem Reagenzien-Leerwert entspricht. Auf das unterschiedliche Verhalten, welches die getesteten Thiolverbindungen in dieser Hinsicht zeigen, soll an anderer Stelle eingetreten werden.

### Diskussion

Peroxydase stellt zusammen mit dem Chromogen o-Dianisidin ein Indikatorsystem dar, welches sich zum Nachweis kleiner Mengen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  eignet. Es findet speziell in der klinisch-chemischen Analyse zum Nachweis von Stoffen Verwendung, welche in Gegenwart eines Hilfs-Fermentes (Notatin)  $\text{H}_2\text{O}_2$  bilden (z. B. enzymatische Glucosebestimmung, vgl. <sup>14</sup>). Wie aus diesen Experimenten hervorgeht, kann dieses Ferment bei zweckmässiger Versuchsanordnung auch zur Erfassung von Bestrahlungsprodukten eingesetzt werden. Von den beiden hier geprüften Indikatorsystemen dürfte das System Peroxydase-o-Dianisidin eher Aussicht auf praktische Verwendung haben, einerseits wegen der einfacheren Messbarkeit des Oxydations- bzw. Bestrahlungsproduktes im optischen Test, andererseits weil bei Abwesenheit des Enzyms nur ein relativ geringer Blindwert resultiert. Besonders dann, wenn wesentlich empfindlichere Chromogene zur Verfügung stehen, dürfte die Sichtbarkeit des bei der Strahleneinwirkung gebildeten Produktes in der Praxis von Vorteil sein.

Das Indikatorsystem Katalase-Formiat ist an sich für dosimetrische Zwecke weit weniger geeignet. Demgegenüber sind aber die damit ausgeführten Experimente für die Deutung der Wirkungsweise dieses Fermentes von Interesse. Es kann zwar nicht mit Sicherheit gesagt werden, in welchem Verhältnis das bei der Bestrahlung gebildete  $\text{H}_2\text{O}_2$  entweder von der Katalase sofort in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{O}_2$  gespalten oder zur gekoppelten Oxydation des Formiats verwendet wird. Da es auch nicht zugänglich erscheint, die beim System Notatin-Katalase-Formiat gemachten Beobachtungen (vgl. <sup>5</sup>) zu übertragen, ist es zurzeit nicht möglich, Aussagen über die Natur der enzymatischen und nicht-enzymatischen Komponente der Formiatoxydation zu machen. Wenn auch die Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei Bestrahlung wässriger Lösungen erwiesen ist, so muss der in Gegenwart von aktiver Katalase beobachtete Mehrumsatz an Formiat nicht unbedingt auf peroxydatisch umgesetztes  $\text{H}_2\text{O}_2$  zurückzuführen sein. Auf Grund der von GEORGE<sup>16</sup>) vertretenen Anschauungen über die Wirkungsweise der Katalase ist auch eine enzymatische Beschleunigung des Umsatzes freier OH-Radikale denkbar.

Die hier gegebenen Daten sind zunächst lediglich als relative Vergleichswerte anzusehen. Es können daher nur grob angenäherte Angaben über die Ionenausbeute der in dieser Arbeit untersuchten strahlenchemischen Umsetzungen gemacht werden. Extrapoliert man die gemessenen Umsätze an oxydiertem o-Dianisidin bzw. Formiat auf 1000 r und 1 l, so ergeben sich die folgenden Quotienten: a) System Peroxydase-Dianisidin 3,1  $\mu\text{Äq. H}_2\text{O}_2$ ; b) System Katalase-Formiat total 5,2  $\mu\text{Äq. H}_2\text{O}_2$  (wovon 2,9  $\mu\text{Äq.}$  nicht-enzymatisch). Bei Verwendung eines Umrechnungsfaktors von 0,34 (vgl. LEA<sup>17</sup>)) ergibt sich als Mass für die Ionenausbeute ein Quotient M/N von 1,1 im Falle der Oxydation von o-Dianisidin und von 1,8 bei der Formiatoxydation. Diese Ionenausbeuten für die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung durch konventionelle RÖNTGEN-Strahlen ent-

<sup>16</sup>) P. GEORGE, *Biochem. J.* **43**, 287 (1948).

<sup>17</sup>) D. E. LEA, *Actions of Radiations on Living Cells* (1946).

sprechen grössenordnungsmässig denjenigen, wie sie in anderen Systemen (z. B. reines Wasser + O<sub>2</sub>) beobachtet worden sind (vgl. <sup>18</sup>)).

Abschliessend sei auf den biologischen Aspekt der mit Katalase ausgeführten Experimente eingegangen. Bekanntlich ist die Katalase neben ihrer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-spaltenden Wirkung befähigt, unter Verwendung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auch gekoppelte Oxydationen auszuführen. Den Anschauungen von THEORELL und CHANCE folgend, neigt man sogar dazu, in dieser peroxydaseartigen Wirkung die Hauptrolle der Organkatalasen zu erblicken. Hierzu wird das erforderliche H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> teils von Flavinenzymen (z. B. Xanthinoxidase, D-Aminosäureoxydase) und von oxydierten Thiolverbindungen geliefert<sup>10</sup>). Von WARBURG *et al.*<sup>19</sup>) ist die Auffassung vertreten worden, dass die Wirkung von RÖNTGEN-Strahlen auf die Glykolyse von Zellkulturen als ausschliesslicher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Effekt zu betrachten ist und dass die Strahlenempfindlichkeit eines Gewebes vor allem durch den Katalasegehalt bestimmt wird. Wenn man nun die bei der Bestrahlung wässriger Medien und Gewebe gebildeten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen mit denen vergleicht, wie sie bei peroxydatischen Umsetzungen z. B. in der Leber verbraucht werden, dann ergibt sich, dass zur Stützung der obenerwähnten Hypothese weitere Annahmen erforderlich wären (z. B. verschiedene Lokalisation des «normalerweise» und des bei der Bestrahlung gebildeten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Die peroxydatischen Umsetzungen, die sich *in vitro* auch mit strahlengebildetem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (oder Partikeln mit gleicher Wirkung) ausführen lassen, zeigen jedenfalls, dass auch in strahlenbiologischer Hinsicht nicht nur die katalatische, sondern auch die peroxydatische Aktivität dieses Fermentes von Bedeutung ist.

Die Ausführung dieser Untersuchungen erfolgte mit Mitteln der *Kommission für Atomwissenschaft*, welcher hiermit bestens gedankt sei. Fr. S. BAILLODS danken wir für wertvolle technische Mitarbeit.

#### SUMMARY

1. For the detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formed by X-rays in aqueous solution two enzyme systems have been used: a) liver-catalase and <sup>14</sup>C labelled formate, <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> being the reaction product; b) horseradish-peroxidase and o-dianisidine, the oxidation of which can be followed colorimetrically.

2. Liver-catalase and horseradish-peroxidase are resistant enough to yield amounts of reaction products directly proportional to the X-ray dose up to 15000 r.

3. The influence of experimental conditions and of inhibitors on the enzymatic component in radiation induced formate oxidation has been investigated and is discussed in view of the biological role of catalase.

Medizinisch-chemisches Institut  
und Röntgeninstitut der Universität Bern

<sup>18</sup>) M. EBERT in BACQ & ALEXANDER, Radiobiology Symposium, Liège 1954.

<sup>19</sup>) O. WARBURG, W. SCHRÖDER, H. GEWITZ & W. VÖLKER, Naturwissenschaften **45**, 192 (1958).