

## SUMMARY

A short review is given on published rotatory dispersion data of 60 trivalent chromium and cobalt coordination compounds. Own measurements are reported on 16 compounds. The most important facts of theory and interpretation are reviewed.

Laboratorium für physikalische Chemie  
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

## 24. Methämoglobinbildung durch RÖNTGEN-Bestrahlung in Hämolysat und intakten Erythrocyten von verschiedenem Katalasegehalt

von J. P. Heiniger und H. Aebi

(4. XII. 62)

Bei Einwirkung ionisierender Strahlen auf verdünnte Lösungen von Oxyhämoglobin entsteht Methämoglobin<sup>1)</sup> 2). Dabei kommt es nicht nur zu einem Valenzwechsel des Eisens ( $\text{Fe}^{\text{II}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$ ), sondern auch zur Oxydation verschiedener Gruppen in der Globinkomponente (z. B.  $-\text{SH}$ )<sup>3)</sup>. Neben Methämoglobin werden auch noch andere Produkte (z. B. Choleglobin) in allerdings wesentlich geringerem Umfang gebildet<sup>4)</sup>. Die grosse biologische Bedeutung der Hämine und deren leichte spektrophotometrische Bestimmbarkeit haben es mit sich gebracht, dass Lösungen von Blutfarbstoff (= Hämolysat) und Suspensionen intakter roter Blutzellen ein bevorzugtes Objekt für strahlenbiologische Modellversuche darstellen. Die meist als Mass genommene Methämoglobinbildung hängt a) von der Konzentration der Lösung (bzw. Suspension), b) von der Art der Verteilung (Hämolysat oder intakte Zellen), c) von der Gegenwart strahlenschutzender wirkender Enzyme (Katalase, evtl. Glutathion-peroxydase) sowie d) einer Reihe weiterer Versuchsfaktoren ab.

Das Ziel dieser Untersuchungen besteht darin, den Einfluss der unter b) und c) erwähnten Faktoren, d. h. Art der Verteilung und Schutzwirkung der Katalase, auf die strahleninduzierte Methämoglobinbildung zu analysieren. Zu diesem Zweck sind Hämolysatproben und Suspensionen intakter Erythrocyten in verschiedenen Versuchsanordnungen vergleichend untersucht worden. Da nach WARBURG *et al.*<sup>5)</sup> das Ausmass der Methämoglobinbildung bei gegebener Strahlendosis vor allem vom Katalasegehalt abhängt, haben wir für diese Experimente einerseits rote Blutzellen von relativ hohem und andererseits solche von extrem geringem Katalasegehalt ausgewählt. Während früher bei Vergleichen dieser Art z. B. Rattenblut und Entenblut verwendet wurde<sup>5) 6)</sup>, sind unsere Versuche fast durchwegs mit Erythrocyten

<sup>1)</sup> H. FRICKE & B. W. PETERSON, *Amer. J. Roentgenology* 77, 611 (1927); H. LASER, *Nature* 74, 753 (1954); 77, 361 (1955).

<sup>2)</sup> E. S. G. BARRON & PH. JOHNSON, *Radiat. Research* 5, 290 (1956).

<sup>3)</sup> A. KAJITA, A. HASHIMOTO, T. OKAZAKI & K. KAZIRO, *J. Biochemistry* 49, 538 (1961).

<sup>4)</sup> K. KAZIRO, G. KIKUCHI, T. OGAWA & M. YAMADA, *J. Biochemistry* 40, 205 (1953).

<sup>5)</sup> O. WARBURG, W. SCHRÖDER & H. W. GATTUNG, *Z. Naturforsch.* 15b, 163 (1960).

<sup>6)</sup> K. KAZIRO, G. KIKUCHI, H. NAKAMURA & M. YOSHIDA, *Chem. Ber.* 85, 886 (1952).

vom Menschen ausgeführt worden. Dies ist dadurch möglich geworden, dass kürzlich 2 Familien mit «Akatalasie», einem seltenen Enzym-Defekt, auch in der Schweiz beobachtet worden sind<sup>7)</sup>.

Die vorliegenden Ergebnisse<sup>8)</sup> bestätigen zunächst die von WARBURG<sup>5)</sup> gemachte Beobachtung bzw. Voraussage, wonach sich Strahlenempfindlichkeit und Katalasegehalt roter Blutzellen entgegengesetzt verhalten. So ist z. B. die strahleninduzierte Methämoglobinbildung in akatalatischen Blutzellen gegenüber der Norm um ein Vielfaches erhöht. Die Methämoglobinbildung ist in diesem Sonderfall durch das bei der Bestrahlung entstandene  $H_2O_2$  völlig erklärbar. Dazu passt auch, dass sie bereits durch kleinste Zusätze von krist. Katalase praktisch völlig unterdrückt werden kann. Versuche an Hämolytat mit und ohne Katalasezusatz, in verschiedener Gasphase ( $O_2$ ,  $N_2$ ,  $N_2O$ ) und in Gegenwart von Effektoren mit «Scavenger»-Wirkung (Thiole; Azid) ergeben indessen hinreichend Anhaltspunkte dafür, dass eine generelle Erklärung der beobachteten Effekte durch  $H_2O_2$ -Bildung allein nicht möglich ist und dass daher die « $H_2O_2$ -Hypothese» einer weiter gefassten Formulierung bedarf.

### Experimenteller Teil

1. *Methodik.* – a) *Blutproben:* Das mittels Venenpunktion entnommene Blut wurde mit Heparin ungerinnbar gemacht und die Erythrocyten durch 2maliges Zentrifugieren und Resuspendieren in 0,95-proz. NaCl gewaschen. Bis zur Ausführung der Bestrahlungsversuche wurden die suspendierten Zellen bei +2° aufbewahrt. Die Darstellung von Hämolytat erfolgte durch Auflösen und Zentrifugation eines dekantierten Zellsedimentes in 0,005M Phosphat-Puffer pH = 7,0.

b) *Bestimmungsmethoden:* Zur Erzielung der gewünschten Konzentration wurde das Hämoglobin (= Hgb) photometrisch als Cyanhämoglobin bestimmt<sup>9)</sup>. Die Katalaseaktivität, gemessen nach der Perborat-Methode von FEINSTEIN<sup>10)</sup>, wurde auf den Hämoglobingehalt der Proben bezogen und ergab für die hier zumeist verwendeten Blutproben folgende Werte:

- |   |   |
|---|---|
| 1) Normalblut vom Menschen (J.P.H.; E.L.) | ca. 2500 mÄq. gespaltenes $H_2O_2$ pro g Hgb. |
| 2) Akatalasieblut (Fall F.V.)             | 6,6 mÄq./g Hgb.                               |
| 3) Akatalasieblut (Fall A.B.)             | 14,8 mÄq./g Hgb.                              |
| 4) Entenblut                              | 3,0 mÄq./g Hgb.                               |

Das gebildete Methämoglobin (MHb) wurde spektrophotometrisch nach der Methode von FLEISCH<sup>11)</sup>, bei den Experimenten mit Azid-Zusatz nach der Methode von MILLS & RANDALL<sup>12)</sup>, gemessen. Bei Experimenten mit intakten Zellen wurden diese zuerst abzentrifugiert und hievon ein Hämolytat dargestellt. Zur Erzielung einheitlicher und vergleichbarer Versuchsbedingungen wurde mit der Bestimmung des Methämoglobins durchwegs erst 1 Std. nach Beendigung des Bestrahlungsversuches begonnen. Die gleichzeitige Verwendung zweier Methoden zur Methämoglobinbestimmung ist darauf zurückzuführen, dass die ursprünglich ausschliesslich verwendete Methode nach FLEISCH in Gegenwart von Azid zu niedrige Werte liefert. Es ist daher bei den Hemmungsversuchen mit Azid ausschliesslich die Methode von MILLS, welche durch Azid nicht gestört wird, benützt worden.

c) *Zusammensetzung der Versuchsansätze:* 1. Hämolytat: Mit 0,005M Phosphat (pH = 7,0) gepuffertes Hämolytat wurde nach entsprechender Verdünnung (meist ca.  $1 \times 10^{-5}$ M Hgb) in 3 ml messenden Ansätzen direkt für die Bestrahlungsversuche verwendet. – 2. Intakte Erythrocyten: Die Stammsuspension wurde mit gepuffelter, isotonischer Kochsalzlösung (0,155M

<sup>7)</sup> H. AEBI, J. P. HEINIGER, R. BÜTLER & A. HÄSSIG, *Experientia* 17, 466 (1961).

<sup>8)</sup> Vorläufige Mitteilung: H. AEBI, J. P. HEINIGER & HEDI SUTER, *Experientia* 18, 129 (1962).

<sup>9)</sup> Arbeitsvorschrift des Zentrallaboratoriums des Blutspendedienstes des Schweiz. Roten Kreuzes (= Methode SRK).

<sup>10)</sup> R. N. FEINSTEIN, *J. biol. Chemistry* 180, 1197 (1949).

<sup>11)</sup> H. FLEISCH, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* 17, 318 (1959).

<sup>12)</sup> G. C. MILLS & H. P. RANDALL, *J. biol. Chemistry* 232, 589 (1958).

NaCl + 0,005 M Phosphat pH = 7,0) auf die gewünschte Verdünnung gebracht. Meist wurde mit Suspensionen enthaltend ca.  $0,5 \mu\text{l}$  Zellen/ml gearbeitet, was bei homogener Verteilung des Hämoglobins einer Endkonzentration von ca.  $2,5 \cdot 10^{-6}$  M Hgb entsprechen würde. Zur Bestrahlung gelangten Ansätze zu 6 ml Suspension. – 3. Inkubationsbedingungen: Während die aeroben Bestrahlungsversuche in zylindrischen Glasgefäßen ( $d = 20$  bzw.  $40$  mm) mit Plexiglasdeckelverschluss ausgeführt wurden (vgl. <sup>13</sup>), gelangten die Experimente mit variierter Gasphase ( $\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ) in enghalsigen 25-ml-Rundkolben, wie früher beschrieben, zur Durchführung<sup>14</sup>). – 4. Experimente mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zusatz: Ansätze zu 40 ml Hämolytat wurden unter Umrühren langsam mit  $0,5$  ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $10^{-3}$  M) versetzt. Nach verschiedenen Zeiten wurden aliquote Proben (3 ml) entnommen, das noch freie  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Zugabe eines Katalaseüberschusses (ca.  $100 \gamma$  krist. Katalase) beseitigt und anschliessend das gebildete Methämoglobin bestimmt. Verwendete Reagentien: krist. Katalase aus Rinderleber («BOEHRINGER»), Perhydrol *pro analysi* («MERCK»).

d) *Bestrahlungsbedingungen und Strahlenquelle*: Zur Bestrahlung stand ein Stabilvolt-Therapiegerät (MÜLLER TUT-Röhre) des RÖNTGEN-Instituts der Universität, Inselspital Bern, zur Verfügung. Betriebsbedingungen: 250 kV, 13 mA. Filter: 0,35 mm Cu + 2 mm Al. Dosisleistung ca. 400 r/min. Zum Ausgleich von Feldinhomogenitäten wurden die Bestrahlungsansätze rotierend bewegt. Zur Dosismessung dienten teils VICTOREEN-Ionisationskammern, teils Ferrosulfat-Dosimeter nach FRICKE.

2. *Bestrahlungsversuche mit Hämolytat*. – a) *Dosisabhängigkeit der Methämoglobinbildung*: In Ansätzen enthaltend 0,85 mg Hgb/ml (=  $1,2 \cdot 10^{-5}$  M) besteht direkte Proportionalität zwischen Strahlendosis und Strahlenwirkung. Erst wenn 70–80% des vorhandenen Hämoglobins in Methämoglobin übergeführt sind, kommt es zu einer graduellen Abflachung der Dosis-Wirkungskurve. Werden Hämolytatproben verschiedener Herkunft miteinander verglichen, stellt man fest, dass deren Strahlenempfindlichkeit unter sonst identischen Versuchsbedingungen stark vom Katalasegehalt abhängt; je geringer die Katalaseaktivität, desto steiler der Verlauf der Dosis-Wirkungskurve. In Tab. 1 sind 4 als Hämolytat bestrahlte Blutproben miteinander verglichen worden. Aus diesen Daten ist ersichtlich, dass sich speziell bei niedrigen Katalasekonzentrationen geringe Aktivitätsunterschiede besonders stark auswirken. So wird z.B. im Hämolytat von Enten-Erythrocyten bei gleicher Dosis bedeutend mehr Methämoglobin gebildet als im Hämolytat von Akatalasie-Fällen, obgleich beide nur den Bruchteil eines Prozentes der normalerweise in menschlichen roten Blutzellen vorhandenen Katalase enthalten (vgl. <sup>7</sup> <sup>15</sup>).

Tabelle 1. *Methämoglobinbildung im Hämolytat von Blutproben mit verschiedenem Katalasegehalt* Hämoglobinkonzentration in allen Ansätzen 0,85 mg/ml (=  $1,2 \cdot 10^{-5}$  M Hgb). Näheres über Herkunft und Bedeutung der angeführten Akatalasie-Fälle siehe <sup>7</sup> <sup>15</sup>).

Material	Katalase- Aktivität Perborat-Einh. g Hgb	Prozentuale Methämoglobin- bildung (M-Hb/total Hgb)				Strahlendosis erforderlich zur Bildung von 50% M-Hb
		2000 r	4000 r	8000 r	20 000 r	
Normale Erythrocyten vom Menschen	2500	< 1	2,5	4,5	19	~ 50 000 r
Akatalasie-Fall A. B. (Graubünden)	15	–	5	10,5	–	22 000 r
Akatalasie-Fall F. V. (Wallis)	6	–	15	29	54	17 000 r
Normale Enten- erythrocyten	3	8,5	25	56	86	7 500 r

b) *Beziehungen zwischen Hämoglobinkonzentration und Methämoglobinbildung*: Bei gleichbleibenden Bestrahlungsbedingungen nimmt die prozentuale Methämoglobinbildung mit steigender

<sup>13</sup>) H. AEBI, R. GRESSLY, R. OESTREICHER & A. ZUPPINGER, *Helv.* 42, 2531 (1959).

<sup>14</sup>) H. AEBI & J. P. HEINIGER, *Helv.* 45, 580 (1962).

<sup>15</sup>) H. AEBI, F. JEUNET, R. RICHTERICH, HEDI SUTER, R. BÜTLER, J. FREI & H. R. MARTI, *Enzymol. biol. clin.* 2, im Druck (1962).

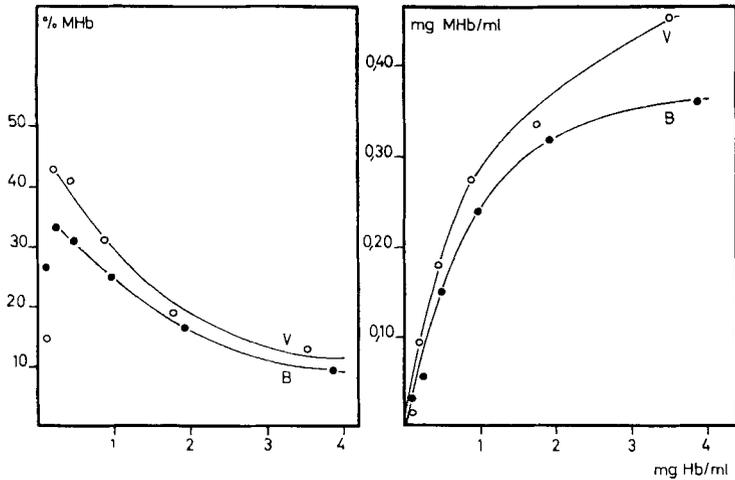


Fig. 1. *Abhängigkeit der relativen und absoluten Methämoglobinbildung von der Konzentration des bestrahlten Hämolysats*

V = Blut von Akatalasie-Fall F.V.; B = Blut von Akatalasie-Fall A.B. Ordinate links: Methämoglobinbildung in % der vorgelegten Hämoglobinmenge; Ordinate rechts: Methämoglobinbildung in mg M-Hb/ml Ansatz. Abszissen: Hämoglobinkonzentration in mg/ml. Strahlendosis: 10000 r (250 kV).

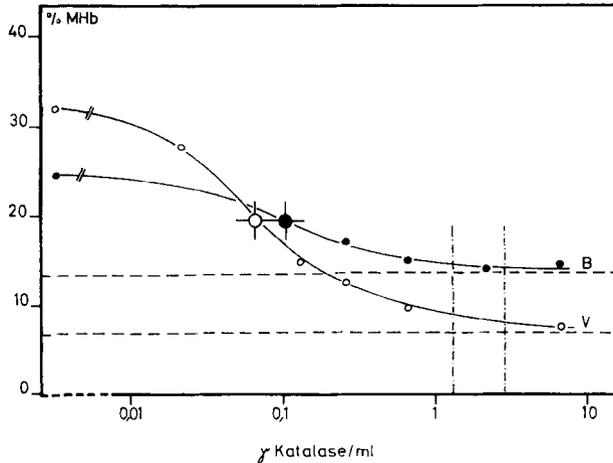


Fig. 2. *Wirkung steigender Mengen zugesetzter Katalase auf die Methämoglobinbildung in Hämolysatproben*

V und B: siehe Legende zu Fig. 1. Vertikale Linien: Katalasegehalt gleichkonzentrierter Hämolysatproben aus normalen Erythrocyten vom Menschen (entspr. 2-4 γ krist. Katalase/ml). Horizontale Linien: Methämoglobinbildung in Hämolysatproben normaler Menschen-Erythrocyten. Ordinate: Methämoglobinbildung in % der vorgelegten Hämoglobinmenge (0,85 mg Hgb/ml). Abszisse: Zugesetzte Mengen an krist. Leberkatalase in γ/ml bei Annahme einer Kat.-Fähigkeit von 40000. Strahlendosis: 10000 r (250 kV).

Hämoglobinkonzentration zunächst zu und nach Überschreiten eines Optimums bei ca. 0,2 mg Hgb/ml wieder ab. Wie aus der Gegenüberstellung in Fig. 1 ersichtlich, steigt die pro Volumeneinheit gebildete Absolutmenge an Methämoglobin im untersuchten Konzentrationsbereich stetig an. Je konzentrierter die Hämoglobinlösung, desto höher die Ausbeute an Bestrahlungsprodukt. Die resultierenden Sättigungskurven zeigen bis etwa 0,5 mg Hgb/ml einen praktisch linearen Verlauf. Ferner geht aus den in Fig. 1 (rechts) dargestellten Kurven hervor, dass sowohl oberer Grenzwert (plafond) als auch Kurvenparameter ( $[\text{Hgb}]$  bei  $\text{M-Hb max} \times \frac{1}{2}$ ) von der Katalase-Aktivität der betreffenden Blutprobe abhängen.

c) *Einfluss zugesetzter Katalase auf die Methämoglobinbildung*: Die Gegenwart zusätzlicher Mengen von krist. Katalase ist bei *a priori* katalasereichen Hämolysatproben (z. B. normalen Erythrocyten des Menschen) ohne Einfluss. Demgegenüber lässt sich die Methämoglobinbildung in katalasefreien bzw. -armen Hämolysatproben durch Katalasezusatz deutlich vermindern. In Fig. 2 wird gezeigt, dass bereits 0,02  $\gamma$  krist. Katalase eine signifikante Herabsetzung der Ausbeute bewirkt. Dieser Effekt ist indessen von beschränktem Ausmass, indem bei Erhöhung der Katalasekonzentration auf über 1  $\gamma$ /ml keine weitere Wirkung mehr beobachtet werden kann. Dieser Grenzwert von 1  $\gamma$ /ml liegt noch bedeutend unterhalb derjenigen Katalaseaktivität, wie sie im gleichkonzentrierten Hämolysat normaler Erythrocyten vom Menschen vorhanden ist (2–4  $\gamma$  krist. Katalase/ml). Die S-Form der Kurven, wie sie sich bei steigenden Katalasezusätzen ergeben, ist um so ausgeprägter, je geringer die Katalase-Restaktivität der verwendeten Blutzellen. Da zum vorneherein nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, ob das Ausmass der Methämoglobinbildung nicht auch durch Spuren von Schwermetall-Ionen beeinflusst wird, haben wir einige Experimente mit Zusatz von Äthylendiamin-Tetraessigsäure ausgeführt. Aus diesen geht hervor, dass  $10^{-4}\text{M}$  Komplexon ohne Einfluss auf die Methämoglobinbildung bestrahlter Hämolysatproben (Blut F. V.) ist.

d) *Azid als Effektor der strahleninduzierten Methämoglobinbildung*: Von Azid, einem sehr wirksamen Katalase-Inhibitor ist theoretisch, im Vergleich zu den Experimenten mit Katalasezusatz, eine entgegengesetzte Wirkung zu erwarten. In einem geeigneten Konzentrationsbereich (z. B.  $10^{-4}\text{M}$  Azid) ist dies bei Hämolysatproben von relativ hohem Katalasegehalt (z. B. normales Menschenblut) tatsächlich der Fall. Wie aus Tab. 2 hervorgeht, lässt sich das Ausmass der Methämoglobinbildung in Hämolysatproben normaler Erythrocyten vom Menschen durch  $10^{-6}$ – $10^{-3}\text{M}$  Azid stark steigern. Auch bei Akatalasie-Hämolysatproben ist ein derartiger Steigerungseffekt noch andeutungsweise vorhanden. Dieser Befund spricht dafür, dass es sich bei der in den Akatalasiezellen enthaltenen Rest-Aktivitäten um Azid-hemmbar, d. h. echte Katalase handelt.

Tabelle 2. *Einfluss eines Azidzusatzes auf die Methämoglobinbildung in bestrahlten Hämolysat-Proben*

Hämoglobinkonzentration: 0,50 mg Hgb/ml Ansatz. Strahlendosis 8000 r. Angegeben sind je-weilen die gebildete Menge Methämoglobin in mg/ml sowie die prozentuale Umwandlung bezogen auf die Anfangskonzentration an Hämoglobin. Methämoglobinbestimmung nach MILLS *et al.*<sup>12)</sup>.

Azid Endkonzentration	Hämolysat aus normalen Erythrocyten		Hämolysat aus Akatalasie-Erythrocyten (Fall A. B.)	
	mg MHB/ml	%	mg MHB/ml	%
ohne	0,128	d. s. 26%	0,249	d. s. 47%
$10^{-6}\text{M}$	0,138	d. s. 28%	0,270	d. s. 51%
$10^{-5}\text{M}$	0,195	d. s. 39%	0,270	d. s. 51%
$10^{-4}\text{M}$	0,240	d. s. 48%	0,307	d. s. 58%
$10^{-3}\text{M}$	0,281	d. s. 56%	0,310	d. s. 58%

e) *Bestrahlungsversuche in verschiedener Gasphase*: Die Methämoglobinbildung in katalasefreien und Katalase im Überschuss enthaltenden Hämolysatproben wird durch die Gasphase stark beeinflusst. Sie ist unter allen getesteten Versuchsbedingungen in  $\text{N}_2\text{O}$  mit Abstand am höchsten. Lachgas zeichnet sich somit auch in dieser Hinsicht durch bemerkenswerte strahlen-

Tabelle 3. *Methämoglobinbildung bei Bestrahlung unter verschiedenen Gasen*

Katalasefreie bzw. -arme HämolySATproben enthaltend 0,9 mg Hgb/ml wurden als solche und nach Zugabe eines Katalaseüberschusses (25  $\gamma$  krist. Katalase/ml) bestrahlt. Strahlendosis 8000 r (Erythrocyten vom Menschen; Akatalasie-Fall F. V.), bzw. 6000 r (normale Entenerythrocyten).

Gasphase	Katalase-zusatz	Prozentuale Methämoglobinbildung			
		HämolySAT von Akatalasie-Fall (F. V.)		HämolySAT von Entenerythrocyten	
		% M-Hb	Effekt ohne Katalase = 100%	% M-Hb	Effekt ohne Katalase = 100%
O <sub>2</sub>	–	9,5	100	20	100
	+	5	53	9	45
Luft	–	15	100	36	100
	+	8,5	52	12	33
N <sub>2</sub>	–	16	100	26	100
	+	12,5	78	23	88
N <sub>2</sub> O	–	50	100	46	100
	+	32,5	65	40	87

chemische Eigenschaften aus (vgl. <sup>14</sup> <sup>16</sup>). Aus den in Tab. 3 wiedergegebenen Versuchen in Luft, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> und N<sub>2</sub>O geht ferner hervor, dass das Ausmass der Methämoglobinbildung durch Zugabe eines Katalaseüberschusses in Gegenwart von O<sub>2</sub> prozentual stärker herabgesetzt wird als in N<sub>2</sub>- oder N<sub>2</sub>O-Atmosphäre. Ein Effekt im Sinne eines Schutzes ist jedoch auch unter anaeroben Bedingungen vorhanden.

3. *Bestrahlungsversuche an Suspensionen intakter Erythrocyten.* – a) *Abhängigkeit der Methämoglobinbildung von der Strahlendosis:* Auch bei Bestrahlung intakter Zellen ist das Ausmass dieser Umsetzung in einem relativ breiten Bereich der Dosis direkt proportional (vgl. <sup>8</sup>). Arbeitet man in einem Konzentrationsbereich, der maximale Ausbeuten liefert (ca. 0,2 mg Hgb/ml), genügen im Falle katalasearmer Blutzellen bereits Strahlendosen von wenigen Tausend r zur hälftigen Umwandlung des in den Zellen vorhandenen Hämoglobins in Methämoglobin. Bei den in Tab. 4 zitierten Versuchen mit akatalatischen Erythrocyten ergeben sich Halbwerts-Dosen von 3000–9000 r. Enthalten die Zellen reichlich Katalase, werden in diesem Dosisbereich Methämoglobinmengen gebildet, die an der Erfassbarkeitsgrenze liegen. Sie dürfen beim Anstellen von Vergleichen praktisch vernachlässigt werden.

Tabelle 4. *Methämoglobinbildung in Suspensionen intakter Erythrocyten von verschiedenem Katalasegehalt*

Hämoglobinkonzentration bei Annahme gleichmässiger Verteilung 0,16–0,19 mg/ml (= ca. 0,3  $\times$  10<sup>-5</sup> M Hgb). Näheres über Herkunft und Bedeutung der angeführten Akatalasiefälle siehe <sup>7</sup> <sup>15</sup>).

Material	Prozentuale Methämoglobinbildung (100 · M-Hb/total Hgb)					
	1000 r	2000 r	4000 r	8000 r	12 000 r	20 000 r
Normale Erythrocyten vom Menschen	–	–	1	3	3	6
Akatalasie-Fall (A. B.)	–	–	18,5	46	64	86
Akatalasie-Fall (F. V.)	4	24	70	94	–	–
Normale Entenerythrocyten	15	40	76	99	–	–

b) *Konzentrationsabhängigkeit der Methämoglobinbildung:* Variiert man den Verdünnungsgrad der bestrahlten Erythrocytensuspension, ergibt sich – gleich wie beim HämolySAT – ein Optimum an Ausbeute bei ca. 0,2 mg Hgb/ml (Fig. 3). Wird diese Konzentration überschritten, nimmt die

<sup>16</sup>) F. S. DAINTON & D. B. PETERSON, *Nature* 186, 878 (1960).

prozentuale Methämoglobinbildung stark ab, und zwar wesentlich mehr, als dies bei Versuchen mit Hämolysat der Fall ist. Berechnet man auf Grund der Anfangskonzentration an Hämoglobin und der prozentualen Methämoglobinbildung die entsprechenden Absolutmengen, zeigt sich, dass auch das insgesamt im Ansatz gebildete Methämoglobin bei ca. 0,5 mg/ml ein Optimum aufweist. Vergleicht man die entsprechenden Kurven in Fig. 1 und Fig. 3 (rechte Seite), ist ersichtlich, dass sich Hämolysat und Zellsuspension in dieser Hinsicht gegensätzlich verhalten. Während im Hämolysat maximale Umsätze erst bei einer Konzentration von ca. 5 mg/ml erreicht werden, lässt sich in Zellsuspensionen von vergleichbarem Hämoglobingehalt nach Verabfolgung der gleichen Strahlendosis praktisch kein Methämoglobin nachweisen. Bei analogen Experimenten mit normalen Menschenerythrocyten kann im gesamten Konzentrationsbereich keine sichere Abhängigkeit der nur sehr geringen Methämoglobinbildung wahrgenommen werden.

c) *Hemmung der Methämoglobinbildung durch Katalase*: Während eine Beeinflussung beim Hämolysat nur teilweise gelingt (Fig. 2), lässt sich bei Suspensionen intakter katalasefreier Blutzellen eine praktische vollständige Unterdrückung der Methämoglobinbildung erreichen (vgl. 8)). Dabei spielt es grundsätzlich keine Rolle, ob die Katalase in Form von Lösung des krist. Enzyms oder von normalen, d. h. katalasehaltigen Erythrocyten zugesetzt wird (Fig. 4). Auf beide Arten

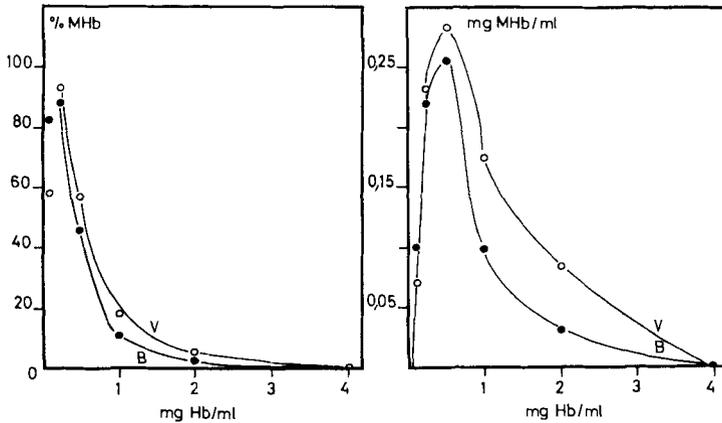


Fig. 3. Abhängigkeit der relativen und absoluten Methämoglobinbildung von der Konzentration der bestrahlten Erythrocytensuspension.

Erläuterungen betr. Versuchsbedingungen siehe Legende zu Fig. 1.

kann bei Strahlendosen von 6000 r die Methämoglobinbildung auf insignifikante Werte herabgesetzt werden. Ein Unterschied besteht zwischen den beiden Arten des Vorgehens insofern, als die resultierenden Kurvenparameter ( $I_{50}$ -Werte) um einen Faktor von ca. 7 verschieden sind. Es ist somit zur Erzielung desselben Effektes die ca. siebenfache Enzymmenge erforderlich, sofern die Katalase nicht in freier Form, sondern cellulär gebunden zum System zugesetzt wird.

Zur Beurteilung des Wirkungsbereiches der in den normalen Blutzellen enthaltenen Katalase sind ferner Bestrahlungsversuche mit Erythrocyten-Suspensionen ausgeführt worden, welche normale katalasereiche und akatalatische Zellen in verschiedenem Mischungsverhältnis enthalten. Aus dem in Tab. 5 wiedergegebenen Versuch ist ersichtlich, dass die hohe Methämoglobinbildungsrate akatalatischer Zellen bereits durch eine Beimischung von ca. 8% normaler Zellen auf die Hälfte vermindert wird. Daraus geht mit Deutlichkeit hervor, dass die in den normalen Zellen enthaltene Katalase nicht allein die Methämoglobinbildung in der «eigenen» Zelle unterdrückt, sondern auch darüber hinaus eine gewisse Schutzwirkung auf die umliegenden akatalatischen Zellen auszuüben vermag.

d) *Wirkung von Azid auf die Methämoglobinbildung in bestrahlten Erythrocyten*: Ob es in intakten Blutzellen zu einer Steigerung oder Hemmung der Methämoglobinbildung kommt, hängt vor allem vom Katalasegehalt der verwendeten Blutzellen und von der Azidkonzentration ab. Handelt

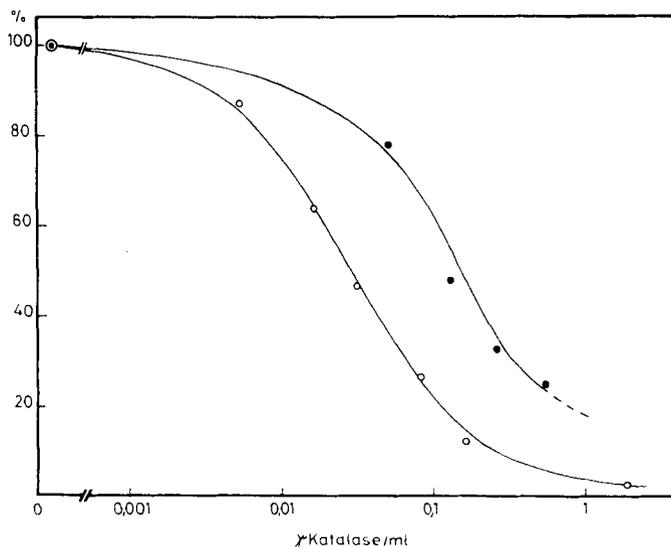


Fig. 4. Wirkung steigender Mengen zugesetzter Katalase auf die Methämoglobinbildung in bestrahlten Erythrocyten (Akatalasie-Fälle V. und B.).

Konzentration der Erythrocytensuspensionen 0,22 mg Hgb/ml Blut von Akatalasie-Fall A. B. Strahlendosis 6000 r (250 kV). Ordinate: Relative Methämoglobinbildung: M-Hbim Kontrollansatz ohne Zusätze = 100%. Abszisse: Menge zugesetzter Katalase a) in Form von krist. Leberkatalase (○), b) in Form normaler Menschen-Erythrocyten (●) (Katalase-Aktivität ca. 2500 Perborat-Einheiten pro g Hgb); Aktivität umgerechnet auf Gewichtseinheiten bei Annahme einer Kat. -F. von 40000.

Tabelle 5. Methämoglobinbildung in bestrahlten Erythrocytensuspensionen enthaltend normale katalasehaltige und akatalatische Zellen in verschiedenem Mischungsverhältnis

Blut A = katalasefreie bzw. -arme Zellen (Akatalasie-Fall A. B.) 12 Perborat-Einheiten/g Hgb  
Blut B = katalasehaltige Zellen (normales Menschenblut; J. P. H.); 2640 Perborat-Einheiten/g Hgb. Hämoglobingehalt der Suspension 0,22 mg/ml. Strahlendosis 6000 r (250 kV).

Proz. Anteil an		Methämoglobinbildung	
Blut A	Blut B	absolute Werte	relative Werte
(- Katalase)	(+ Katalase)	(mg M-Hb/ml)	(% M-Hb pro total Hgb)
100	—	0,20	91
95	5	0,145	66,5
90	10	0,086	39
75	25	0,050	22,5
50	50	0,025	11,5
—	100	< 0,002	~ 0

es sich um normale, katalasereiche Erythrocyten, in denen selbst bei hohen Strahlendosen nur wenig Methämoglobin gebildet wird, resultiert bei Zugabe steigender Mengen Azid ein zweischenklicher Kurvenverlauf. Unter den hier gewählten Versuchsbedingungen besteht ein Wirkungsoptimum bei ca.  $3 \times 10^{-4}$  M Azid (vgl. Fig. 5). Es handelt sich hier offensichtlich um die Überlagerung zweier entgegengesetzter Effekte, nämlich einer steigenden Wirkung infolge Katalase-Hemmung, welche bei Konzentrationen unter  $10^{-4}$  M vorherrscht, und einem bei hohen Azid-Konzentrationen auftretenden Hemmeffekt.

Handelt es sich dagegen um katalasefreie bzw. -arme Zellen, ist nur die zweite dieser beiden Wirkungen zu beobachten. Die in akatalatischen Erythrocyten von vorneherein hohe Methä-

moglobinbildung wird bereits durch kleine Azidkonzentrationen (ca.  $10^{-5}$  M) merklich herabgesetzt. Der resultierende S-förmige Kurvenverlauf (vgl. Fig. 5) hat einen Parameter ( $I_{50}$ -Wert) von ca.  $10^{-4}$  M Azid und erreicht bei dieser Konzentration eine Methämoglobinbildungsrate, welche derjenigen normaler Erythrocyten nach Bestrahlung mit der gleichen Dosis entspricht. Die Resultantennatur der Azidwirkung kommt somit im Experiment mit intakten Blutzellen deutlich zum Ausdruck.

e) *Einfluss der Gasphase*: Auch bei Bestrahlung intakter Erythrocyten hängt die Methämoglobinbildung von der Art der Gasphase ab. Dabei ergeben sich beim Vergleich der Ausbeuten in Luft,  $O_2$ ,  $N_2$  und  $N_2O$  Unterschiede, die von denen in Hämolytat-Versuchen abweichen. Bei intakten akatalatischen Zellen ist die Methämoglobinbildung stets geringer, wenn Luft durch  $O_2$ ,  $N_2$  oder  $N_2O$  ersetzt wird. Während die Umsätze in  $O_2$  bei gleicher Strahlendosis nur wenig kleiner sind (ca. -25%), wird die Methämoglobinbildung unter anaeroben Bedingungen weitgehend unterdrückt (ca. -90%). Wird Luft durch  $N_2O$  ersetzt, kommt es bei intakten Zellen - im Gegensatz zum Hämolytat - gleichfalls zu einer Herabsetzung der Methämoglobinbildung auf etwa die Hälfte (-55%).

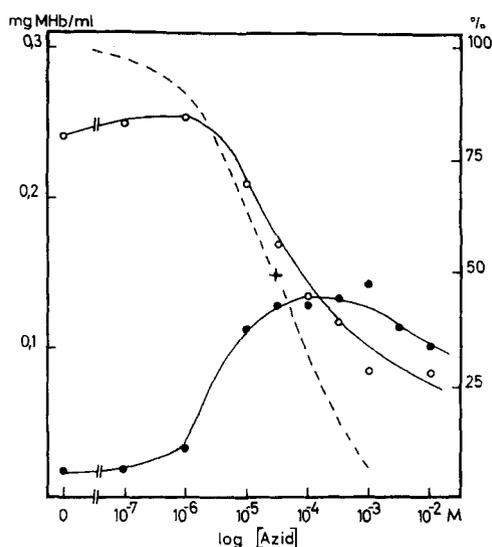


Fig. 5. *Wirkung von Azid auf die Methämoglobinbildung in bestrahlten Erythrocyten*  
 Blut A (○): katalasefreie bzw. -arme Zellen (Akatalasie-Fall A. B.) 0,28 mg Hgb/ml. Blut B (●): katalasehaltige Zellen (normales Menschenblut); 0,31 mg Hgb/ml; --- Katalaseaktivität. Ordinate, links: Methämoglobinbildung in mg M-Hb/ml, rechts: relative Katalaseaktivität. Abszisse: Azidkonzentration, log [I]. Strahlendosis 8000 r.

4. *Versuche mit Reagens- $H_2O_2$* . - a) *Zeitlicher Verlauf der Methämoglobinbildung*: Versetzt man ein Hämolytat katalasearmer Erythrocyten bei Zimmertemperatur mit verdünnter  $H_2O_2$ -Lösung, ist in den darauffolgenden 15 min eine stetige Zunahme von Methämoglobin zu beobachten. Nach diesem Zeitpunkt kommt es zu einer fortschreitenden Verzögerung der Reaktion. Je nach zugesetzter  $H_2O_2$ -Menge flacht die Zeitumsatzkurve nach 30-50 min ab. Der Kurvenverlauf, wie er sich beim Versetzen eines Akatalasie-Hämolytates von 0,48 mg Hgb/ml mit verschiedenen  $H_2O_2$ -Mengen ergibt, ist in Fig. 6 dargestellt. Unter der Annahme, dass sich alles  $H_2O_2$  ausschliesslich mit dem  $Fe^{II}$  des Hämoglobins umsetzt, lässt sich zwischen dem Verbrauch an  $H_2O_2$  und der Menge an oxydiertem Hgb-Eisen folgende stöchiometrische Beziehung berechnen:  $1 \mu\text{Mol } H_2O_2 = 2 \mu\text{At Häm-Eisen} = 0,5 \mu\text{Mol Hgb}$ . Unter dieser Annahme machen die im obigen Versuch (Fig. 6) beobachteten Ausbeuten an Methämoglobin bei  $1,68 \times 10^{-5}$  M  $H_2O_2$  17%, bei  $4,35 \times 10^{-5}$  M  $H_2O_2$  10% und bei  $1,3 \times 10^{-4}$  M  $H_2O_2$  5% der Theorie aus. Mit steigender Anfangskonzentration

an  $\text{H}_2\text{O}_2$  im Ansatz nimmt die Absolutmenge an gebildetem Methämoglobin zwar zu, die prozentuale Ausbeute hingegen ab.

b) *Abhängigkeit der Ausbeute von der Hämoglobinkonzentration*: Gibt man eine bestimmte Menge  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu einer Reihe akatalatischer HämolySATproben von verschiedener Konzentration, ergibt sich eine Konzentrationsabhängigkeit der Methämoglobinbildung, die derjenigen nach Bestrahlung sehr ähnlich ist (vgl. Fig. 1). Die Daten in Tab. 6 bestätigen, dass die Absolutmenge an gebildetem Methämoglobin auch in Versuchen mit direktem  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zusatz mit der Anfangskonzentration des Hämoglobins stetig zunimmt, die prozentuale Bildungsrate dagegen abnimmt. Die gebildete Absolutmenge nähert sich im Konzentrationsbereich von 5–10 mg/ml einem oberen

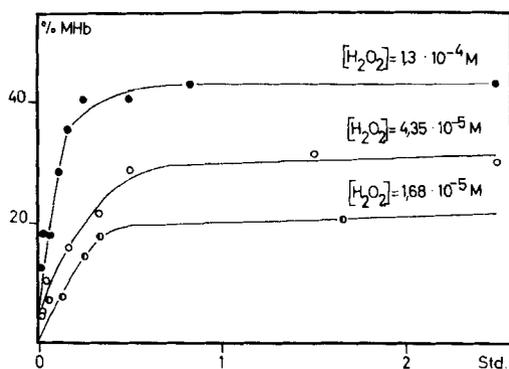


Fig. 6. *Bildungsgeschwindigkeit von Methämoglobin bei  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zusatz* HämolySAT von Akatalasie-Blut (Fall A. B.). Hämoglobinkonzentration 0,48 mg Hgb/ml; Versuchstemperatur  $20^\circ$ . Ordinate: Prozentuale Methämoglobinbildung (M-Hb/total Hgb) bei 3  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen. Abszisse: Zeit nach  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zusatz.

Grenzwert. Behandelt man die resultierende Funktion als Sättigungskurve, erhält man bei planimetrischer Extrapolation (Verfahren von LINEWEAVER-BURK) nach  $[\text{Hgb}] \rightarrow \infty$  einen Höchstwert von  $\sim 35\%$  der Theorie. Ein Vergleich der Methämoglobinbildung bei Bestrahlung mit derjenigen nach  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zusatz liefert Anhaltspunkte über die relative Wirksamkeit der beiden Einwirkungsarten. Aus den in Fig. 1 und Tab. 6 gegebenen Daten lässt sich z. B. entnehmen, dass in einem HämolySAT (Akatalasie-Fall A. B.) enthaltend 0,5 mg Hgb/ml der Zusatz von 0,13  $\mu\text{Mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ /ml die Bildung derselben Menge Methämoglobin bewirkt wie die Bestrahlung mit 13000 r. Unter diesen Versuchsbedingungen sind somit 1000 r und 10  $\mu\text{Mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ /l einander gleichwertig.

Tabelle 6. *Abhängigkeit der Methämoglobinbildung durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zusatz von der Hämoglobinkonzentration*

HämolySAT von Akatalasieblut (Fall A. B.). Versuchstemperatur  $20^\circ$ . Die zugesetzte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Menge entspricht einer Endkonzentration von  $1,3 \times 10^{-4}\text{M}$ . Theoretischer Wert der Ausbeute an Methämoglobin  $6,5 \times 10^{-5}\text{M}$  entspr. 4,42 mg M-Hb/ml (100%)

Ansatz	Hämoglobin-konzentration (mg Hgb/ml)	Methämoglobinbildung gemessen 1 Std. nach $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zusatz		Ausbeute in Prozent der Theorie
		relativer Wert (% M-Hb/total Hgb)	Absolutwert (mg M-Hb/ml)	
1	0,25	38,5	0,096	2,2%
2	0,5	52,3	0,262	5,9
3	1,0	54,5	0,435	9,8
4	2,0	36,0	0,720	16,3
5	4,0	22,0	0,880	20,0
6	8,0	12,2	0,976	22,1

Führt man analoge Experimente mit HämolySATproben von beträchtlicher Katalaseaktivität durch (z. B. mit normalen Menschen-Erythrocyten), wird das Reagens  $\text{H}_2\text{O}_2$  unmittelbar nach erfolgter Zugabe unter  $\text{O}_2$ -Entwicklung zerlegt und es unterbleibt eine Methämoglobinbildung praktisch völlig. Dasselbe gilt für Akatalasie-HämolySATproben, denen vor der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zugabe geringe Mengen von krist. Katalase zugefügt worden sind.

c) *Einfluss der Versuchstemperatur*: Die durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zusatz erzeugbare Methämoglobinbildung ist temperaturabhängig. Versetzt man z. B. HämolySAT-Proben enthaltend 0,48 mg Hgb/ml mit 0,5 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Endkonzentration  $4,3 \cdot 10^{-5} \text{ M H}_2\text{O}_2$ ) und inkubiert man diese 90 min bei  $2^\circ$ ,  $20^\circ$  und  $37^\circ$ , ist eine prozentuale Methämoglobinbildung von 4, 32 bzw. 85% festzustellen. Zur Beantwortung der Frage nach Art und Ausmass der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Umsetzung bei erniedrigter Versuchstemperatur ( $2^\circ$ ) wurde folgendes Experiment ausgeführt: Ein Grossansatz enthaltend 0,53 mg Hgb/ml wurde nach Kühlung auf  $2^\circ$  bei  $t = 0^\circ$  mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Endkonzentration  $0,84 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) versetzt und bei  $2^\circ$  inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden je 6 ml entnommen, diese jeweils 1 Std. bei  $37^\circ$  gehalten und dann ihr Methämoglobingehalt bestimmt. Die unter diesen Bedingungen erfassbare Methämoglobinmenge nimmt mit steigender Dauer der Aufbewahrung bei  $2^\circ$  stetig ab. Während bei Erwärmung der Probe sofort nach  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zugabe unter den hier gewählten Bedingungen 37% des vorgelegten Hämoglobins in Methämoglobin übergeführt werden, lassen sich nach 30 min dauernder Vorinkubierung bei  $2^\circ$  noch 30%, nach 1 Std. 23% als Methämoglobin erfassen. Nach 4 Std. nimmt der Prozentsatz des auf diese Weise erfassbaren Methämoglobins auf 15%, nach 12 Std. auf ca. 5% ab. Die Methämoglobinbildung sinkt somit nach ca. 4 Std. auf den halben Betrag, was im vorliegenden Falle einem Schwund an «verfügbarem»  $\text{H}_2\text{O}_2$  von ca.  $1 \times 10^{-9} \text{ Mol/ml/Std.}$  entsprechen würde. Allerdings wird durch dieses Experiment noch nicht beantwortet, ob es sich hierbei um den Ausdruck einer spontanen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zerlegung in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\frac{1}{2} \text{ O}_2$  handelt oder ob freies  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei erniedrigter Temperatur – in Gegenwart von Proteinen und anderer möglicher Reaktionspartner – anderweitig umgesetzt wird.

Im Bestrahlungsexperiment lässt sich gleichfalls eine derartige Abhängigkeit der Methämoglobinbildung in HämolySATproben von der Versuchstemperatur (während und nach der Bestrahlung) beobachten. Unter den hier gewählten Bestrahlungsbedingungen (ca. 400 r/min; 250 kV-Strahlen), die einer theoretischen Bildungsrate von  $10^{-9} \text{ Mol H}_2\text{O}_2/\text{ml/min}$  entsprechen, ist der zwischen  $+2^\circ$  und  $20^\circ$  bestehende Unterschied hinsichtlich Methämoglobinbildung etwa im selben Ausmass vorhanden. Demgegenüber besteht oberhalb  $20^\circ$  eine wesentlich geringere Temperaturabhängigkeit, welche indessen nach Herkunft des HämolySates und je nach Zusammensetzung der Ansätze beträchtlichen Schwankungen unterworfen ist. Auf Grund dieser methodischen Erfahrungen ist durchwegs bei Zimmertemperatur bestrahlt und das Methämoglobin nach 1 Std. Inkubierung bei  $20^\circ$  bestimmt worden.

### Diskussion

Dass das Ausmass der strahleninduzierten Methämoglobinbildung mit abnehmendem Katalasegehalt stark ansteigt,<sup>1</sup> ist bereits von WARBURG *et al.*<sup>5)</sup> gezeigt worden. Dieses Verhalten, welches als Beweis für die Schutzfunktion der Katalase angesehen wird, lässt sich am besten durch vergleichende Untersuchungen an Blutzellen von unterschiedlichem Katalasegehalt studieren (vgl. Tab. 1). Wie aus diesen Versuchen hervorgeht, ist nun aber die Abhängigkeit der Methämoglobinbildung vom Katalasegehalt eine ganz andere, je nachdem das Hämoglobin bei der Bestrahlung als HämolySAT, d. h. in molekulardispers gelöster Form, oder als Zellsuspension vorliegt.

In HämolySATproben lässt sich die Methämoglobinbildung, die in bekannter Weise von Strahlendosis und Hämoglobin-Konzentration abhängt, durch Variation der Katalaseaktivität nur relativ wenig beeinflussen. So werden in Proben von hämolysiertem Normalblut trotz hohem Katalasegehalt beträchtliche Mengen von Methämoglobin gebildet. Zusätze von krist. Katalase im Überschuss sind hier praktisch ohne, im Falle katalasearmer Proben nur von relativ geringer Wirkung (vgl. Fig. 2). Die Bildungsrate für Methämoglobin wird somit im HämolySAT durch Katalasezusätze nur wenig herabgesetzt. Dies legt den Schluss nahe, dass hinsichtlich Methä-

moglobinbildung offenbar zwischen einem Katalase-abhängigen, d. h. auf  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Wirkung beruhenden, und einem Katalase-unabhängigen, d. h. nicht durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung erklärbaren Anteil unterschieden werden muss. Mit dieser Deutung stimmt auch die Beobachtung überein, wonach sich durch  $10^{-4}\text{M}$  Azid in Hämolytaten normaler, katalasereicher Zellen eine Verdoppelung der Bildungsrate für Methämoglobin erzielen lässt.

In Suspensionen intakter Blutzellen ist eine analoge Dosis-Abhängigkeit wie beim Hämolytat zu beobachten, indem bis zu einer Umsetzung von 70–80% der vorgelegten Hämoglobinmenge direkte Proportionalität zwischen Strahlendosis und Methämoglobinbildung besteht. Unterschiede hinsichtlich Hämoglobin-Konzentration und Katalaseaktivität wirken sich jedoch in bestrahlten Suspensionen völlig anders aus. So lässt sich eine nennenswerte Methämoglobinbildung überhaupt nur in katalasearmen Blutzellen feststellen (vgl. <sup>8</sup>). Fügt man Katalase in beliebiger Form zum System, wird die Methämoglobinbildung dadurch vollständig unterdrückt. Andererseits kann die äusserst geringe Methämoglobinbildung in Suspensionen normaler, d. h. katalasereicher Blutzellen durch Zusatz von  $10^{-4}\text{M}$  Azid auf ein Vielfaches gesteigert werden. Im Gegensatz zum Hämolytat wird in intakten Erythrocyten bei Bestrahlung nur dann in nennenswertem Ausmass Methämoglobin gebildet, wenn praktisch keine Katalase im Ansatz vorhanden oder dieses  $\text{H}_2\text{O}_2$ -spaltende Enzym zuvor durch einen Inhibitor blockiert worden ist.

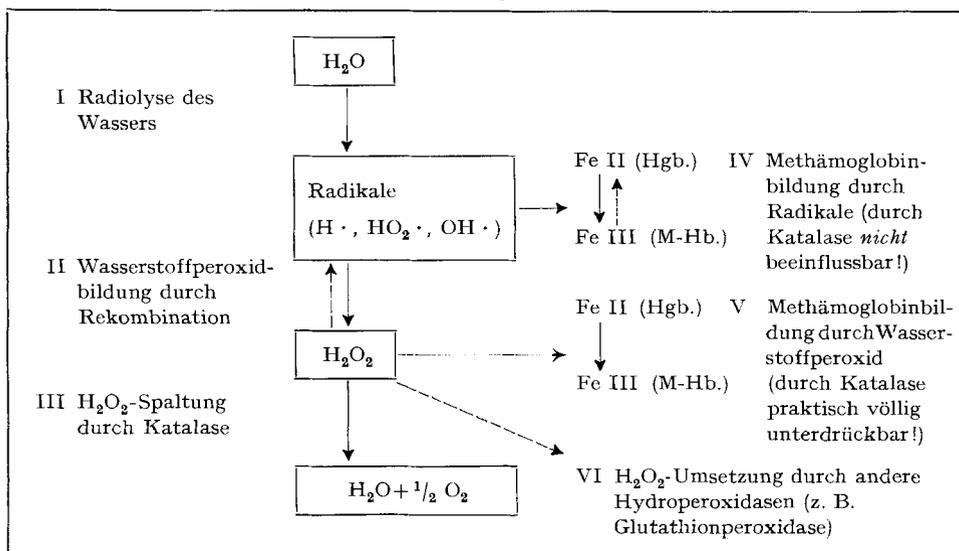
Die Verschiedenheit der mit Hämolytat und Zellsuspension erhaltenen Versuchsergebnisse weist darauf hin, dass für das Zustandekommen dieses Effektes die unterschiedliche räumliche Anordnung der Reaktionspartner in den beiden Systemen verantwortlich sein dürfte. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit, nämlich der Einfluss strukturabhängiger Enzymsysteme (z. B. Aktivität von Methämoglobinreduktase und Glutathionperoxydase) darf hier in Anbetracht der gewählten Versuchsbedingungen (Inkubierung der mehrfach gewaschenen Zellen ohne Glucose und andere Substrate) ausser acht gelassen werden. Während BARRON & JOHNSON<sup>2</sup>) die strahleninduzierte Methämoglobinbildung in Gegenwart von  $\text{O}_2$  als Radikalreaktion ( $\text{OH} + \text{Fe}^{\text{II}} \rightarrow \text{OH}^- + \text{Fe}^{\text{III}}$ , bzw.  $\text{HO}_2 + \text{Fe}^{\text{II}} \rightarrow \text{HO}_2^- + \text{Fe}^{\text{III}}$ ) deuten, nehmen WARBURG *et al.*<sup>5</sup>) an, dass dieser Oxydationsvorgang ausschliesslich auf die Umsetzung des Hämoglobins mit dem bei der Strahleneinwirkung gebildeten  $\text{H}_2\text{O}_2$  zurückzuführen ist. Die vorliegenden Experimente berechtigen zur Annahme, dass beide Erklärungen teilweise zutreffen, allerdings – je nach Art des Versuchsobjektes – in unterschiedlichem Ausmass. Während die bei der Bestrahlung primär gebildeten Radikale ( $\text{H}^\cdot$ ,  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{HO}_2^\cdot$ ) im Hämolytat (= Hämoglobin-Lösung) zum überwiegenden Teil mit einer der zahlreichen reaktionsfähigen Gruppen ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ;  $\text{R-SH}$  etc.) des Hämoglobins direkt reagieren, kommt es in der Zellsuspension von entsprechendem Hämoglobingehalt wesentlich weniger häufig zu einer derartigen Umsetzung. Dies deshalb, weil der Grossteil des Systems (d. h. 999/1000 bei einer 1 %/100-Zellsuspension!) frei ist von oxydablen Stoffen, die mit diesen Radikalen direkt in Reaktion treten könnten. Es kommt deshalb vor allem zur Rekombination der Radikale unter Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  als alleinigem Reaktionsprodukt (z. B.  $\text{OH}^\cdot + \text{OH}^\cdot \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$  oder  $\text{HO}_2^\cdot + \text{HO}_2^\cdot \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ ).  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist bei Abwesenheit von Katalase im suspendierenden Medium relativ beständig und daher ohne weiteres befähigt, in die Erythrocyten hinein zu diffundieren, um dort – gleich wie Reagens  $\text{H}_2\text{O}_2$  – eine Oxydation des Hämoglobins zu Methämoglobin zu bewirken. Es herrscht somit in Suspensionen katalasearmer Erythrocyten die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Wirkung bei weitem vor, während im entsprechenden Hämolytat Wasserstoffperoxid und oxydierende Radikale in der gleichen Grössenordnung an der Methämoglobinbildung beteiligt sind.

Dass es sich bei der Methämoglobinbildung in bestrahlten Hämoglobin-Lösungen keineswegs um einen einheitlichen Vorgang handelt, geht aus anderen Beobachtungen

hervor: Nach AFIFI<sup>17)</sup> ist hierbei zwischen einer sofort auftretenden Reaktion und einem «effet prolongé» zu unterscheiden. Die O<sub>2</sub>-Abhängigkeit dieser verzögert ablaufenden Hämoglobinoxidation (bis ca. 4 Stunden) macht verständlich, weshalb bei Messung nach 1stündiger Inkubierung eine Temperaturabhängigkeit der Gesamtausbeute an Methämoglobin resultiert. Nach LASER<sup>18)</sup> ist bei der Hämoglobinbestrahlung – nicht nur unter anaeroben Bedingungen – mit einer Rückreaktion zu rechnen, indem sich Methämoglobin mit reduzierenden Radikalen (H<sup>•</sup>) unter Rückbildung von Hämoglobin umsetzt. Dasselbe gilt für die Wirkung des hier verwendeten Katalase-Inhibitors Azid. Nach THEORELL & EHRENBERG<sup>19)</sup> wird Azid in Gegenwart von Ferrihämiproteiden bei Bestrahlung oder auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe zu N<sub>2</sub> und N<sub>2</sub>O oxidiert, wobei Fe<sup>III</sup> zu Fe<sup>II</sup> reduziert wird.

Aus der schematischen Darstellung in Fig. 7 ist ersichtlich, wie die beiden Komponenten der strahleninduzierten Methämoglobinbildung unter sich und mit anderen Umsetzungen verknüpft sind. Einerseits besteht ein Antagonismus zwischen den von Radikalen ausgelösten Oxydationsvorgängen (z. B. Methämoglobinbildung) und der Rekombination von Radikalen zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Andererseits konkurrieren Hämoglobin und Katalase um das Wasserstoffperoxid. Da Radikale und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Bestrahlungsprodukte von unterschiedlicher Stabilität und Reichweite sind, wird verständlich, weshalb

Fig. 7. Schematische Darstellung der sich bei der Bestrahlung von Hämoglobin abspielenden Umsetzungen



in strukturierten Systemen Art und Ausmass strahlenchemischer Umsetzungen vom Verteilungszustand abhängen. Dies gilt insbesondere für die räumlichen Beziehungen zwischen «strahlenschützenden» und «strahlenempfindlichen» Komponenten des Systems. Von diesem Gesichtspunkt aus muss die Deutung einer Strahlenwirkung

<sup>17)</sup> F. AFIFI, Bull. Soc. Chim. biol. 43, 545 (1961).

<sup>18)</sup> H. LASER, Symposia genetica biol. italica 8, 368 (1961).

<sup>19)</sup> H. THEORELL & A. EHRENBERG, Arch. Biochemistry 41, 462 (1952).

als ausschliesslicher  $H_2O_2$ -Effekt, wie dies z. B. bei der Methämoglobinbildung in intakten, katalasearmen Erythrocyten durchaus berechtigt ist, als strahlenbiologischer Sonderfall angesehen werden. Eine verallgemeinernde Extrapolation erscheint nur dann vertretbar, wenn alle diejenigen Reaktionspartner, mit denen freies  $H_2O_2$  im Gleichgewicht steht (z. B. oxydierende Radikale, evtl. organische Peroxide) und die eine « $H_2O_2$ -äquivalente» Wirkung haben können, mit einbezogen werden.

Die Ausführung dieser Arbeit erfolgte mit Unterstützung durch die KOMMISSION FÜR ATOMWISSENSCHAFT DES SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS (Projekt A 142). Wir danken Herrn Prof. A. ZUPPINGER für die Bereitstellung der Bestrahlungsanlage und Fräulein HEDI SUTER für die zuverlässige Mitarbeit.

#### SUMMARY

1. Radiation induced methaemoglobin-formation in haemolysates and in red cell suspensions of normal and acatalatic human blood has been studied under various experimental conditions.

2. The absolute amount of methaemoglobin produced by a given X-ray dose depends on haemoglobin concentration, the nature of the gas phase, catalase activity of the blood sample and the presence of catalase inhibitors (azide).

3. Since these factors affect methaemoglobin-formation in haemolysates and in cell suspensions quite differently, it is assumed that compartmentation is relevant to the manifestation of radiation effects in heterogenous systems.

Medizinisch-chemisches Institut der Universität Bern

## 25. Über cyclische $\beta$ -Diketone

### 4. Mitteilung<sup>1)</sup>

### Synthese und Eigenschaften von 2,2-Dimethyl-, 4,4-Dimethyl- und 2,2,4,4-Tetramethyl-cholestandion-(1,3)

von H. Mühle und Ch. Tamm

(6. XII. 62)

Im Rahmen unserer Untersuchungen über die physikalischen und chemischen Eigenschaften von unsymmetrisch substituierten cyclischen  $\beta$ -Diketonen haben wir kürzlich den Verlauf der O-Methylierung bei 1,3-Dionen der Decalin<sup>1)</sup>- und der Steroid-Reihe<sup>2)</sup> studiert. In der vorliegenden Mitteilung berichten wir über die Ergebnisse der Methylierungen mit Methyljodid und Alkali von Cholestandion-(1,3) (II) und 4,4-Dimethylcholestandion-(1,3) (XIV). Unter diesen Bedingungen sollte vorwiegend C-Alkylierung eintreten<sup>3)</sup>.

<sup>1)</sup> 3. Mitteilung: H. MÜHLE & CH. TAMM, *Helv.* 45, 1475 (1962).

<sup>2)</sup> CH. TAMM, *Helv.* 43, 1700 (1960).

<sup>3)</sup> Zur Alkylierung von  $\beta$ -Dicarbonylverbindungen vgl. den Übersichtsartikel von H. STETTER, *Angew. Chem.* 67, 769 (1955).