

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] L. CLAISEN, Ber. deutsch. chem. Ges. 25, 1776 (1892); 42, 59 (1909).
 [2] C. H. EUGSTER, L. LEICHNER & E. JENNY, Helv. 46, 543 (1963).
 [3] R. HOLTZWART, J. prakt. Chem. [2] 39, 230 (1889); vgl. jedoch J. A. BILTON & R. P. LINSTED, J. chem. Soc. 1937, 922; R. B. BAKER & E. E. REID, J. Amer. chem. Soc. 57, 1567 (1929).
 [4] D. S. BRESLOW, E. BAUMGARTEN & C. R. HAUSER, J. Amer. chem. Soc. 66, 1286 (1944); W. H. PUTERBAUGH, F. W. SWAMER & C. R. HAUSER, *ibid.* 74, 3438 (1952); A. TREIBS & K. HINTERMEIER, Chem. Ber. 87, 1163 (1954); J. A. BROCKMAN & P. F. FABIO, U.S. Pat. 2905679 (1959).
 [5] H. DAHN & H. HAUTH, Helv. 42, 1214 (1959).
 [6] P. S. BURNS, J. prakt. Chem. [2], 47, 105 (1893).
 [7] E. v. MEYER, J. prakt. Chem. [2], 78, 497 (1908); P. BRUYLANTS, Bull. Acad. Belgique [5], 8, 12 (1922).
 [8] F. ARNDT, H. SCHOLZ & E. FROBEL, Liebigs Ann. Chem. 527, 95 (1935).
 [9] K. J. PEDERSEN, J. Amer. chem. Soc. 57, 2098 (1929).
 [10] B. R. BROWN, Quart. Reviews 5, 131 (1951).
 [11] F. H. WESTHEIMER & W. A. JONES, J. Amer. chem. Soc. 63, 3283 (1941).
 [12] H. DAHN & H. P. SCHLUNKE, unveröffentlichte Versuche.
 [13] W. M. SCHUBERT, J. Amer. chem. Soc. 71, 2639 (1949).
 [14] A. H. FAINBERG & S. WINSTEIN, J. Amer. chem. Soc. 78, 2770 (1956).
 [15] E. M. KOSOWER, J. Amer. chem. Soc. 80, 3253 (1958).
 [16] K. H. MEYER, Liebigs Ann. Chem. 380, 212 (1911); F. ARNDT, L. LOEWE & R. GINKÖK, Rev. Fac. sci. Univ. Istanbul (A) 77, 147 (1946).
 [17] H. GOLD, Dissertation, Basel 1962.

155. Methämoglobinbildung in Erythrocyten durch Peroxideinwirkung. Versuche zur Beurteilung der Schutzfunktion von Katalase und Glutathionperoxidase¹⁾

von H. Aebi, J. P. Heiniger und E. Lauber

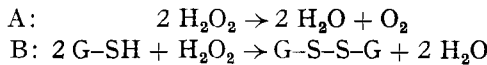
(22. V. 64)

Bei Einwirkung ionisierender Strahlen auf Lösungen von Hämoglobin oder Suspensionen intakter Blutzellen kommt es zur Bildung von Methämoglobin [1] [2]²⁾. Wie in einer vorangehenden Arbeit gezeigt worden ist, gibt es Versuchsbedingungen, unter denen die Methämoglobinbildung durch das bei der Strahleneinwirkung entstandene H₂O₂ völlig erklärt werden kann [3]. Dies ist z. B. der Fall, wenn Erythrocyten von geringer Katalase-Aktivität in einem grossen Überschuss von glucosefreiem, isotonischem Medium suspendiert und mit Dosen von 500 bis 5000 R bestrahlt werden. Da es sich bei der strahleninduzierten Methämoglobinbildung um einen komplexen Vorgang handelt, ist verständlich, dass das Ausmass dieser Umsetzung von zahlreichen Versuchsfaktoren abhängt. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang die Rolle derjenigen Enzyme, denen auf Grund ihrer Substratspezifität eine gewisse Schutzfunktion zugeschrieben wird: Katalase [2] [4] und Glutathionperoxidase [5].

¹⁾ Herrn Prof. A. ZUPPINGER, Bern, zum 60. Geburtstag in Freundschaft gewidmet.

²⁾ Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 1440.

Beide Enzyme kommen in normalen roten Blutzellen des Menschen in ansehnlicher Menge vor. Katalase zerlegt H_2O_2 , indem - bei genügend hohem Substratangebot - der Komplex Katalase- H_2O_2 (= Komplex I) mit einer weiteren Molekel H_2O_2 (= H-Donor) reagiert (Reaktion A). Die Beseitigung von H_2O_2 durch Glutathionperoxidase kommt durch Wasserstoffübertragung von reduziertem Glutathion auf H_2O_2 zustande (Reaktion B).



Für eine getrennte Erfassung dieser Reaktionen können folgende Unterschiede herangezogen werden: Katalase ist Azid-hemmbar, Glutathionperoxidase dagegen nicht. Während die Katalase zur H_2O_2 -Spaltung keiner Cofaktoren bedarf, wird bei der Beseitigung von H_2O_2 durch Glutathionperoxidase red. Glutathion in äquimolarer Menge verbraucht. Dieses muss daher in der Zelle durch wasserstoffübertragende Enzyme (Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Glutathion-Reduktase) kontinuierlich regeneriert werden (vgl. Fig. 1). Darüber hinaus verfügen normale Erythrozyten über Methämoglobin-Reduktase: ein Enzym, das den erforderlichen Wasserstoff *via* Glykolyse bzw. *via* Hexosemonophosphat-Shunt bezieht.

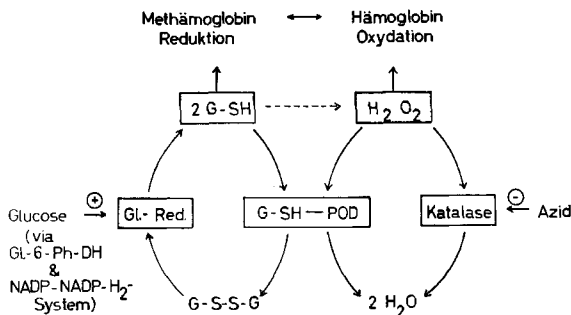


Fig. 1. Schematische Darstellung der zwischen Glutathionperoxidase (G-SH-POD) und Katalase bestehenden Beziehungen (Gl.-Red. = Glutathionreduktase)

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von Katalase und Glutathionperoxidase auf das Ausmass der Methämoglobinbildung zu untersuchen. Dazu wurden drei Arten der Peroxidbildung benützt: 1. Bildung von H_2O_2 aus Glucose und O_2 durch Einwirkung von Glucoseoxydase; 2. Zufuhr kleiner Mengen von Reagens- H_2O_2 durch Diffusion *via* Gasphase; 3. Konventionelle RÖNTGEN-Bestrahlung (60 und 250 kV).

Wie aus diesen Experimenten hervorgeht, sind die mit den 3 Versuchsanordnungen erzielten Ergebnisse durchaus vergleichbar. Sie berechtigen zum Schluss, dass beide Enzyme an der Beseitigung von H_2O_2 beteiligt sind. Je nach Bildungsgeschwindigkeit des H_2O_2 (bzw. von Peroxid-äquivalenten Produkten) und je nach Enzymgehalt der Zellen ist allerdings deren Anteil am Zustandekommen der resultierenden Schutzwirkung recht verschieden.

Experimenteller Teil

I. Methodisches. - a) *Material und Bestimmungsmethoden:* Angaben über die Gewinnung und Aufbereitung der Blutproben finden sich in der vorangehenden Arbeit [3]. Die hier verwendeten Methoden zur Bestimmung von Hämoglobin als Cyanhämoglobin [6], von Methämoglobin

nach FLEISCH [7] bzw. MILLS & RANDALL [8] und der Katalase-Aktivität nach FEINSTEIN [9] sind gleichenorts beschrieben. Die Katalase-Aktivität der untersuchten Proben von Normal- und Akatalasie-Blut entspricht den in jener Arbeit [3] auf Seite 256 gemachten Angaben. Die Bestimmung von H_2O_2 erfolgte entweder enzymatisch mittels Meerrettichperoxidase und *o*-Dianisidin [10] oder nach der Titansulfat-Methode von EGERTON *et al.* [11]. Die für diese Methoden gebrauchten Enzympräparate und Reagenzien waren von folgender Herkunft: Glucoseoxydase (= GOD I), Meerrettichperoxydase (Reinheitszahl 0,6 = POD II) und krist. Katalase aus Rinderleber (Kat. I), alle «BOEHRINGER»; Glucoseoxydase «De-oxin», speziell arm an Katalase (= GOD II), von NAGASE, Osaka, Japan; *o*-Dianisidin «FLUKA», 2mal umkristallisiert; übrige Chemikalien durchwegs «MERCCK» *pro analysi*.

b) *Zusammensetzung der Versuchsansätze.* – 1. *Bildung von H_2O_2 auf enzymatischem Wege:* Die gewaschenen Erythrocyten wurden in isotonischer, phosphatgepufferter ($6,7 \cdot 10^{-3} M$; pH = 7,0) Kochsalzlösung suspendiert, entsprechend einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml bzw. $7 \cdot 10^{-6} M$ Hämoglobin. Zur Erythrocytensuspension wurden 0,025M Glucose als Substrat für die H_2O_2 -produzierende Glucoseoxydase zugesetzt. Die 6 ml messenden Ansätze wurden im Reagensglas bei 30° inkubiert. Nach einer Temperaturlausgleichsperiode von 10 min wurde die H_2O_2 -Produktion durch Zugabe einer bestimmten Menge Glucoseoxydase (0,5–100 γ GOD/Ansatz) gestartet. Am Schluss der Inkubierung (2–60 min) wurde die Methämoglobinbildung durch Zugabe eines Katalaseüberschusses (0,1 mg krist. Kat./Ansatz) gestoppt. In einer Reihe von Experimenten wurde Katalase in verschiedener Konzentration bereits von Anfang an zugesetzt. Zur Feststellung der pro Zeiteinheit gebildeten H_2O_2 -Menge wurden parallele Ansätze mit gepufferter NaCl-Lösung (ohne Erythrocyten) enthaltend 0,025M Glucose, 0,002% *o*-Dianisidin und Meerrettichperoxidase (80 γ POD II/ml) mit derselben Menge Glucoseoxydase versetzt. Nach bestimmter Versuchsdauer wurde die Extinktion bei 436 $m\mu$ gemessen und der resultierende Wert unter Verwendung einer mit Reagens- H_2O_2 erstellten Eichkurve in H_2O_2 umgerechnet (vgl. [10]). Für das zumeist verwendete Glucoseoxydase-Präparat «De-oxin» wurde unter den hier gewählten Bedingungen eine H_2O_2 -Bildungsrate von $1,0 \cdot 10^{-9}$ Mol/ γ Notatin/min ermittelt.

2. *Zufuhr von Reagens- H_2O_2 durch Diffusion via Gasphase:* 4mal gewaschene Erythrocyten wurden in 10 ml isotonischer phosphatgepufferter KREBS-RINGER-Lösung von pH 7,4 suspendiert. Die 10 ml messenden Ansätze enthielten ca. 1 ml Zellsediment, dazu evtl. Zusätze von Glucose bzw. Azid. Sie wurden in zylindrischen Glasgefäßen von 50 ml Volumen bei 37° unter stetem Rotieren inkubiert. Die Zufuhr von H_2O_2 in Dampfform erfolgte nach den Angaben von COHEN & HOCHSTEIN [12]. Nach einer Vorperiode von 5 min wurden kleine Plasticnäpfchen, 0,5 ml 30-proz. H_2O_2 («Perhydrol») enthaltend, eingehängt und die Gefäße mit Gummikappen verschlossen. Zu verschiedenen Zeiten (5 min bis 2 Std.) wurden mittels einer Spritze aliquote Teile aus den verschlossenen Ansätzen entnommen. Nach Zentrifugation der Proben wurden in Zellsediment bzw. Hämolyat Gehalt an Methämoglobin und red. Glutathion (= G-SH) ermittelt. Zur Bestimmung von G-SH diente die Alloxanmethode (Extinktion bei 305 $m\mu$) nach KAY & MURFIT [13]. Die Menge an H_2O_2 , die bei dieser Versuchsanordnung vom Plasticnäpfchen in den Ansatz diffundiert, wurde in parallelen Ansätzen, die an Stelle der Erythrocytensuspension Titan(II)-sulfat-Reagens enthielten, bestimmt. Die Geschwindigkeit der H_2O_2 -Zufuhr *via* Gasphase wurde dabei zu $1,0 \cdot 10^{-7}$ Mol/Ansatz à 10 ml/min ermittelt.

c) *Bestrahlungsbedingungen und Strahlenquelle:* Die Bestrahlung der Erythrocytensuspension erfolgte mit einem «Dermax»-Gerät der Fa. PURTSCHERT, Luzern. Betriebsbedingungen: 60 kV, 20 mA; Filter: 1 mm Al. Dosisleistung ca. 220 R/min. Die Ansätze von 3 ml (bzw. 6 ml) befanden sich in offenen zylindrischen Glasgefäßen von 2 (bzw. 4) cm Durchmesser. Zum Ausgleich der Feldinhomogenitäten wurden die Bestrahlungsansätze (meist 6–12) rotierend bewegt. Die Dosismessung erfolgte teils mittels VICTOREEN-Ionisationskammer, teils mittels Ferrosulfat-Dosimetrie nach FRICKE.

II. Methämoglobinbildung durch enzymatisch produziertes H_2O_2 . – Werden normale Erythrocyten vom Menschen zusammen mit Glucoseoxydase und Glucose inkubiert, ist bei Zugabe geringer Enzymmengen innert 30 min praktisch keine Methämoglobinbildung festzustellen. Zur fortschreitenden Oxydation des Hämoglobins kommt es nur, wenn Glucoseoxydase in relativ hoher Konzentration zugegen ist. Wie aus der in Fig. 2 dargestellten Versuchsreihe hervorgeht,

wird Hämoglobin um so rascher oxydiert, je mehr Glucoseoxydase im System vorhanden ist, d. h. je rascher H_2O_2 durch dieses Enzym freigesetzt wird. Unter den gewählten Versuchsbedingungen (0,5 mg Hgb/ml) sind z. B. 50 γ /ml Glucoseoxydase, entsprechend einer H_2O_2 -Bildungsrate von $3 \cdot 10^{-7}$ Mol H_2O_2 /min, erforderlich, um das im Ansatz vorhandene Hämoglobin (= $7,0 \cdot 10^{-6}$ Mol) innert 10 Minuten zur Hälfte in Methämoglobin überzuführen. Wie aus den Kurven für 50 und 100 γ GOD/ml hervorgeht, besteht wenigstens im oberen Konzentrationsbereich näherungsweise direkte Proportionalität zwischen H_2O_2 -Bildungsgeschwindigkeit und Hämoglobinoxidation.

Bei Durchführung desselben Experimentes mit katalasearmen Erythrocyten (z. B. von «Akatalasie»-Fall A.B.) ist zur Erzielung desselben Effektes in gleicher Zeitspanne rund 25mal weniger Glucoseoxydase erforderlich. Wie aus der Darstellung in Fig. 3 ersichtlich ist, bewirken Enzymmengen, die bei normalen katalasehaltigen Zellen praktisch keine Methämoglobinbildung hervorzurufen vermögen, eine rasche Oxydation des Hämoglobins. Im Gegensatz zu jenen in Fig. 2 zeigen die Kurven in Fig. 3 einen deutlich biphasischen Verlauf. In formaler Hinsicht lässt der

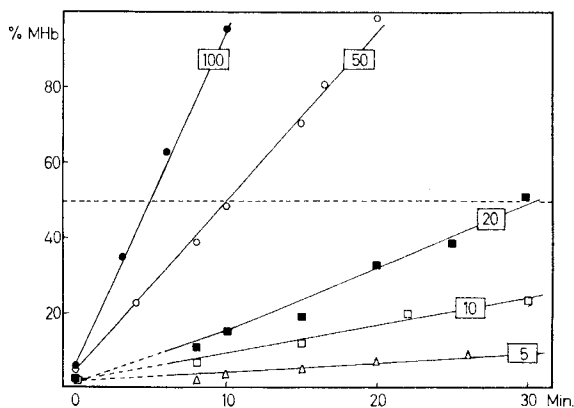


Fig. 2. Oxydation von Hämoglobin zu Methämoglobin in katalasehaltigen Erythrocyten durch enzymatisch gebildetes H_2O_2 . Suspension normaler Erythrocyten vom Menschen (0,5 mg Hgb/ml; ca. 2500 P.E./g Hgb)

H_2O_2 -Bildung durch Glucoseoxydase und Glucose. Ordinate: Prozentualer MHb-Gehalt (MHb/Total-Hgb.). Abszisse: Zeit in Minuten nach Start der H_2O_2 -Bildung durch Zusatz von Glucoseoxydase. Die Zahlen bei den Kurven geben die zugesetzte Glucoseoxydasekonzentration in γ /ml bzw. die Bildungsrate für H_2O_2 in 10^{-9} Mol/ml/min an.

Verlauf der Methämoglobinbildung zwei Abschnitte erkennen³⁾. Auf eine initiale Latenzzeit («lag»-Periode) folgt nach stetigem Übergang eine zweite Phase, während welcher Hämoglobin mit praktisch konstanter Geschwindigkeit in Methämoglobin übergeführt wird. Da sowohl die Dauer der initialen Latenzphase als auch die Steigung der Kurvenabschnitte in der stationären Phase eine gesetzmässige Beziehung zur GOD-Konzentration erkennen lassen, ist eine entsprechende Auswertung dieser Zeit-Umsatzkurven in Tabelle 1 vorgenommen worden. Dabei diente die Tangente an den Kurvenabschnitt mit maximaler Steigung als Hilfslinie (vgl. Fig. 2). Dies erlaubt eine planimetrische Bestimmung der folgenden Grössen: *Phase 1*: Strecke von $t = 0$ bis zum Schnittpunkt von Tangente und Abszisse (= Dauer der initialen «lag»-Phase; $t_0 - t_1$). *Phase 2*: Strecke auf Abszisse zwischen den Schnittpunkten der Tangente mit Abszisse und mit der Horizontalen MHb = 50% (= Zeit, welche in der stationären Phase zur Oxydation der halben Menge des vorgelegten Hämoglobins erforderlich ist: $t_1 - t_2$).

³⁾ Dies trifft übrigens auch für den Gehalt an red. Glutathion zu, indem dieser in der ersten Phase auf 10-20% des Ausgangswertes absinkt und anschliessend keine wesentliche Änderung mehr erfährt.

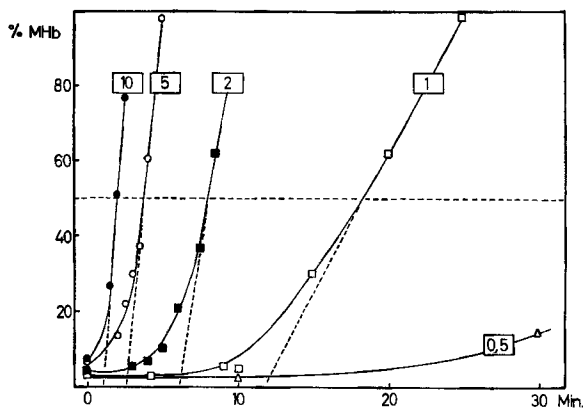


Fig. 3. Oxydation von Hämoglobin zu Methämoglobin in «akatalatischen» Erythrocyten durch enzymatisch gebildetes H_2O_2 . Suspension von Enten-Erythrocyten (0,5 mg Hgb/ml; 6 P. E./g Hgb)
Weitere Erklärungen siehe Legende zu Fig. 2

Tabelle 1. Methämoglobinbildung durch enzymatisch produziertes H_2O_2 in Erythrocytensuspensionen von verschiedenem Katalasegehalt (Konzentration der Suspensionen 0,5 mg Hgb/ml)

Auswertung der Zeitumsatzkurven auf Grund der in Fig. 3 gezogenen Hilfslinien, d. h. lineare Extrapolation der Kurvenabschnitte mit maximaler Steigung nach $MHb = 0\%$ (Schnittpunkt der Tangente mit Abszisse). Weitere Erklärung siehe Text

Herkunft der Erythrocyten (Katalase-Aktivität)	GOD-Zusatz (γ/ml) bzw. H_2O_2 -Produktionsrate (10^{-9} Mol/ml/min)	Phase 1 («lag»)	Phase 2 (stationäre Phase)	
		Zeit $t_0 - t_1$ (min)	Zeit $t_1 - t_2$ (min)	MHb-Bildungsrate (mg MHb/ml/min)
Ente, normal (6 P.E./g Hgb)	1	11,4	6,2	0,040
	2	5,2	2,8	0,089
	5	2,5	1,1	0,228
	10	1,1	0,8	0,312
Mensch, Akatalasie-Fall A. B. (22 P.E./g Hgb)	0,5	12,0	15,8	0,016
	1	5,3	12,7	0,020
	2	3,4	6,2	0,040
	5	1,7	3,2	0,078
Mensch, normal (2400 P.E./g Hgb)	5	—	~150	0,002
	10	—	66	0,004
	20	—	29	0,009
	50	—	10,8	0,023
	100	—	4,8	0,052

Ein direkter Vergleich der sehr unterschiedlichen Methämoglobinbildung in normalen und «akatalatischen» Erythrocyten ist an Hand der in Fig. 2 und 3 für 10 γ GOD/ml gegebenen Kurven möglich. Ferner können für diesen Zweck die in Tabelle 1 berechneten Werte genommen werden, speziell die Zeit ($t_1 - t_2$), welche zur Oxydation von 50% der im Ansatz vorhandenen (konstant gehaltenen) Hämoglobinmenge erforderlich ist. Trägt man die auf diese Weise erhaltenen reziproken Zeitwerte als Funktion der GOD-Konzentration bzw. Bildungsgeschwindigkeit von H_2O_2 auf, ergeben sich für Erythrocyten von verschiedenem Katalasegehalt die in Fig. 4 dargestellten

Kurven. Aus diesen geht hervor, dass die Methämoglobinbildung bei gegebener H_2O_2 -Produktion um so rascher erfolgt, je geringer der Katalasegehalt der Zellen ist. Es sei vorweggenommen, dass das Ergebnis dieser Versuche denjenigen, wie sie früher [4] [14] in analogen Bestrahlungsexperimenten erhalten worden sind, formal recht ähnlich ist. In beiden Fällen ist die Methämoglobinbildung in Enten-Erythrocyten, welche bekanntlich annähernd katalasefrei sind, am höchsten.

Werden praktisch katalasefreie Erythrocyten in einem Medium suspendiert, dem krist. Katalase zugefügt worden ist, verhalten sie sich wie normale katalasehaltige Zellen. Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, wird die Geschwindigkeit der Methämoglobinbildung (in Phase 2) durch Zusatz von 50 γ Katalase/ml um ca. das 300fache herabgesetzt. Dieser Effekt ist auch bei Ansätzen mit normalen Zellen zu beobachten; er ist jedoch viel schwächer. Ansätze, die (in Zellen und Medium)

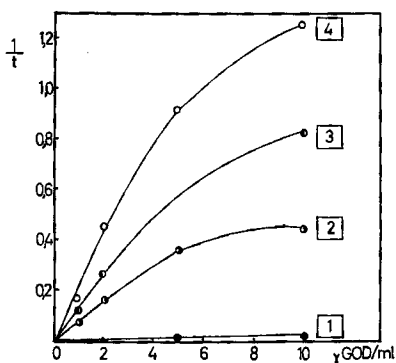


Fig. 4. Ausmass der Methämoglobinbildung als Funktion der H_2O_2 -Produktion in Erythrocyten von verschiedenem Katalasegehalt

Katalasegehalt der untersuchten Proben: 1. 2500 P.E./g Hgb (Mensch; normal, J.-P. H.); 2. 22 P.E./g Hgb (Mensch; Akatalasie-Fall A. B.); 3. 10 P.E./g Hgb (Mensch; Akatalasie-Fall W. N.); 4. 6 P.E./g Hgb (Ente)

Ordinate: Geschwindigkeit der Methämoglobinbildung in Phase 2 $(t_1 - t_2)^{-1}$. Abszisse: Zusatz an Glucoseoxydase (γ /ml) bzw. H_2O_2 -Produktion (10^{-9} Mol/ml/min)

Tabelle 2. Einfluss der Katalase-Aktivität von Erythrocyten und suspendierendem Medium auf die Methämoglobinbildung durch H_2O_2

Versuchsordnung und Auswertung gemäss Angaben in Fig. 2 und Tabelle 1. Die in Klammern gesetzten Zahlenwerte rechts auswertung geben das Verhältnis zwischen beobachteter und der «theoretischen» Methämoglobin-Bildungsrate an, wenn von der früher gemachten Annahme ausgegangen wird, dass zur Bildung von 1 Mol Methämoglobin 2 Mole H_2O_2 erforderlich sind (10^{-9} Mol H_2O_2 = 0,032 mg MHb) [3]

Katalase-Aktivität Erythrocyten (P.E./g Hgb)	Medium (γ /ml)	GOD-Zusatz (γ /ml) bzw. H_2O_2 -Bildungsrate (10^{-9} Mol/ml/min)	Phase 2 (stationäre Phase)		$Q \frac{MHb - \text{beob.}}{MHb - \text{theor.}}$
			Zeit $t_1 - t_2$ (min)	MHb-Bildungsrate (mg MHb/ml/min)	
6	—	1	6,2	0,040	1,25
	—	10	0,8	0,312	0,98
	50	10	270	0,001	0,003
	50	100	50	0,005	0,0016
2400	—	10	66	0,004	0,013
	—	100	4,8	0,052	0,016
	50	100	39	0,006	0,0019
	50	200	34	0,007	0,0011

praktisch keine Katalase enthalten, zeigen in der stationären Phase eine Methämoglobinbildung, welche näherungsweise dem stöchiometrischen Verhältnis $2 \text{H}_2\text{O}_2:1 \text{MHb}$ entspricht; d. h. pro μMol produziertes H_2O_2 werden 32 mg Hämoglobin zu Methämoglobin oxydiert. In katalasehaltigen Zellen ist dieses Verhältnis 100- bis 1000mal kleiner.

III. Methämoglobinbildung durch H_2O_2 zugeführt durch Diffusion *via* Gasphase. –

Die Schutzfunktion der Glutathionperoxidase lässt sich nach COHEN & HOCHSTEIN [12] am besten in relativ konzentrierten Suspensionen gewaschener, d. h. annähernd glucosefreier Erythrocyten untersuchen, indem diesen kontinuierlich Reagens- H_2O_2 in geringer Menge zugeführt wird. In Ansätzen ohne Glucose kommt es relativ rasch zum Verbrauch des in den Zellen vorhandenen red. Glutathions. Ist Glucose vorhanden, wird dagegen red. Glutathion kontinuierlich regeneriert (vgl. Fig. 1). Dieses dient u. a. zur peroxidatischen Umsetzung von H_2O_2 . Die unterschiedliche Geschwindigkeit der Methämoglobinbildung in Ansätzen mit und ohne Glucosezusatz darf daher als Mass für die Glutathionperoxidase-Aktivität genommen werden. Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, sind sowohl normale als auch «Akatalasie»-Erythrocyten bei Vorhandensein von Glucose in der Lage, den Spiegel an red. Glutathion zu halten und eine Oxydation des Hämoglobins zu Methämoglobin trotz konstanter Zufuhr von Reagens- H_2O_2 weitgehend zu verhindern. Am stärksten ist dieser Effekt bei «Akatalasie»-Zellen, deren Restaktivität durch Azid blockiert worden ist (vgl. Tabelle 3; Zeilen 1 und 3: 33,5% \rightarrow 3,5% MHb). Zu beobachten ist dieser Effekt auch bei normalen Zellen, sofern deren Katalaseaktivität durch Azidzusatz weitgehend gehemmt worden ist (vgl. Tabelle 3; Zeilen 5 und 7: 17,9% \rightarrow 9,0% MHb).

Der zeitliche Verlauf der Methämoglobinbildung zeigt auch bei dieser Versuchsanordnung eine initiale Verzögerung («lag»-Phase). Diese kommt darin zum Ausdruck, dass die Methämoglobinbildung meist erst in der zweiten Stunde der Inkubierung deutlich ansteigt. Aus den Kurven in Fig. 5 und 6 ist ferner ersichtlich, dass vor allem diejenigen Ansätze eine hohe Bildungsrate für Methämoglobin aufweisen, in denen Katalase entweder weitgehend fehlt (= Akatalasie-Zellen: alle Kurven in Fig. 6) oder durch Azid blockiert worden ist (normale Zellen: Kurven A und C in

Tabelle 3. *Methämoglobin- und Glutathion-Gehalt in Erythrocyten bei Inkubation unter verschiedenen Versuchsbedingungen*

H_2O_2 -Zufuhr durch Diffusion *via* Gasphase. Versuchsdauer 60 min. Temperatur 37° C

Herkunft der Erythrocyten (Katalase-Aktivität)	Zusätze		Red. Glutathion (mg G-SH/ml Zellsediment)		Methämoglobin (in % der Gesamthämine)	
	Azid	Glucose	$t = 0 \text{ min}$	$t = 60 \text{ min}$	$t = 0 \text{ min}$	$t = 60 \text{ min}$
	$5 \times 10^{-3} \text{ M}$	$1,6 \times 10^{-2} \text{ M}$				
Akatalasie-Fall	+	–	0,51	0,15	~ 0	33,5%
A. B.	–	–	0,50	0,14	~ 0	20,6%
(26 P. E./g Hgb)	+	+	0,56	0,46	~ 0	3,5%
	–	+	0,54	0,48	~ 0	~ 0 %
normale Erythrocyten vom Menschen	+	–	0,49	0,09	~ 0	17,9%
	–	–	0,54	0,26	1,2	0,8%
(3400 P. E./g Hgb)	+	+	0,58	0,56	1,2	9,0%
	–	+	0,58	0,50	~ 0	0,9%

Fig. 5). Gleichzeitig bringen diese Kurven aber auch die Schutzwirkung der Glutathionperoxidase zum Ausdruck, indem die Methämoglobinbildung bei Glucosezusatz durchwegs kleiner ist als in den entsprechenden glucosefreien Ansätzen.

IV. Methämoglobinbildung als Resultante aus Hämoglobinoxidation und Methämoglobinreduktion. – Intakte Erythrocyten sind auf Grund der in ihnen enthaltenen Methämoglobinreduktase imstande, Methämoglobin in Hämoglobin zurückzuführen. Als H-Donoren dienen vorwiegend Lactat und Glucose, wobei die Wasserstoffübertragung *via* Lactat-Dehydrogenase und NAD bzw. *via* NADP und red. Glutathion erfolgt [15]. Bei Untersuchungen über die Peroxid-

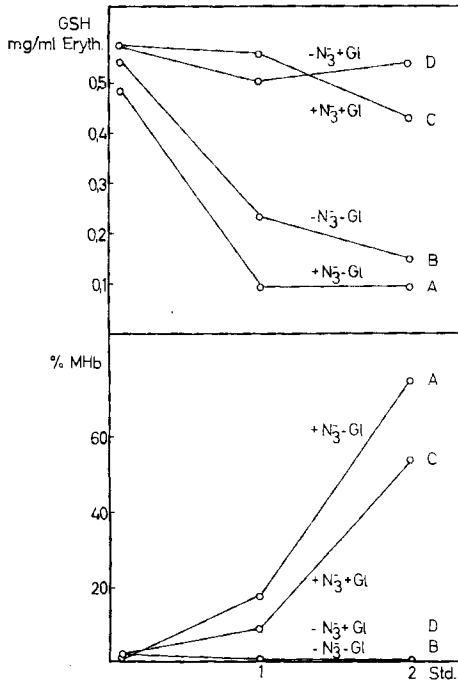


Fig. 5

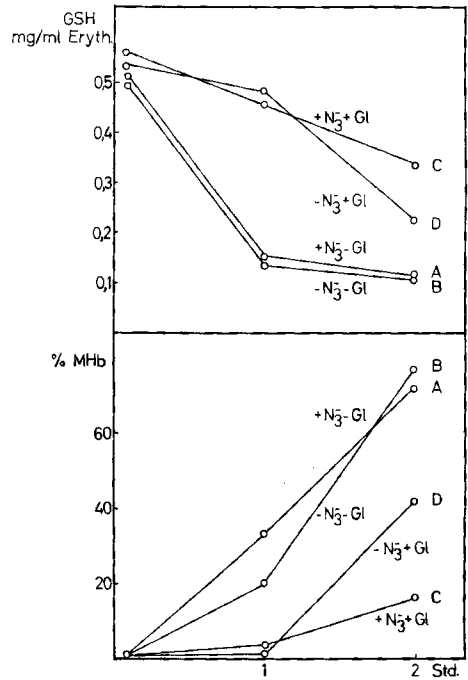


Fig. 6

Fig. 5 und 6. Methämoglobin- und Glutathion-Gehalt normaler (5) und akatalatischer (6) Erythrocyten bei Inkubierung unter verschiedenen Versuchsbedingungen

A: ohne Glucose, + 0,005 M Azid; B: ohne Glucose, ohne Azid; C: + 0,016 M Glucose, + 0,005 M Azid; D: + 0,016 M Glucose, ohne Azid

Ordinate (oben): mg red. Glutathion pro ml Zellsediment; (unten) prozentualer Methämoglobin-gehalt. Abszisse: Zeit in Stunden

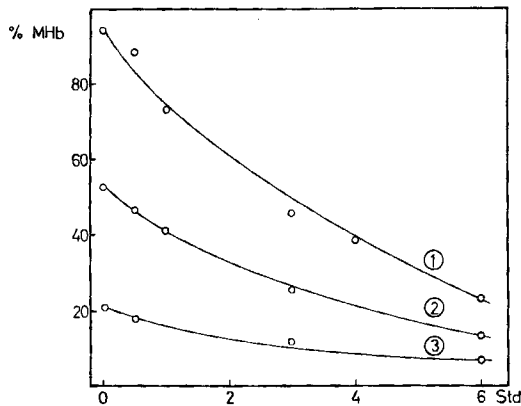


Fig. 7. Methämoglobinreduktion in Erythrocyten nach vorheriger Methämoglobinbildung durch Glucoseoxydase-Einwirkung. Suspension normaler Erythrocyten vom Menschen (0,75 mg Hgb/ml) Ordinate: Prozentualer Methämoglobingehalt. Abszisse: Zeit in Stunden nach Start (Resuspendieren der Zellen im Medium mit 0,025 M Lactat, jedoch ohne Glucoseoxydase). 1, 2 und 3: Proben von verschiedenem Methämoglobingehalt

bzw. Strahlen-induzierte Methämoglobinbildung stellt sich die Frage, inwieweit die obigen Befunde durch die Methämoglobinreduktase der Erythrocyten beeinflusst worden sind.

Als Versuchsobjekt dienen Erythrocyten, deren Hämoglobin zuvor in Methämoglobin übergeführt worden ist. Werden solche Zellen nach Vorbehandlung gewaschen und anschliessend bei 30° inkubiert, lässt sich die Rückbildungsrate unter gegebenen Bedingungen messen. Dabei ist vorerst der Einfluss des relativen Methämoglobingehaltes der Zellen auf die Rückbildungsgeschwindigkeit untersucht worden. Erythrocyten von beliebigem Methämoglobingehalt kann man z. B. durch Glucoseoxydase-Einwirkung während verschiedener Zeit oder durch Bestrahlung mit verschiedenen Dosen erhalten. Die Abhängigkeit der Methämoglobinreduktion vom relativen Methämoglobingehalt der Zellen ist unter Anwendung der ersterwähnten Methodik geprüft worden. Wie aus Fig. 7 hervorgeht, verlaufen alle Zeit-Umsatzkurven ähnlich, indem eine Herabsetzung des anfänglichen Methämoglobingehaltes auf die Hälfte durchwegs nach etwa 3 Std. erreicht wird. Die entsprechenden MHb-Werte nach 0 und 3 Std. sind für Kurve 1: 92 → 45% (= 0,49); Kurve 2: 53 → 26% (= 0,49); Kurve 3: 21 → 11% (= 0,52). Aus Kurve 1 ergibt sich eine maximale Rückbildungsrate für Methämoglobin bei Lactatzusatz von 0,002 mg MHb/mg Hgb/min. Die pro Zeiteinheit reduzierte Methämoglobinmenge scheint indessen unter diesen Bedingungen zur Methämoglobinkonzentration in den Zellen proportional zu sein. Zwecks besserer Vergleichbarkeit ist daher der zu Beginn gemessene Methämoglobingehalt der Erythrocyten stets gleich 100% gesetzt worden.

Wie in einer früheren Arbeit gezeigt worden ist, haben Akatalasie-Zellen eine der Norm entsprechende Methämoglobinreduktase-Aktivität [15]. Während die Überführung in Methämoglobin durch Strahleneinwirkung nur in Akatalasie-Zellen praktikabel ist, lässt sich die Technik der Vorinkubierung mit Glucoseoxydase in allen Fällen anwenden. Die Versuche in Tabelle 4 zeigen, dass Methämoglobin, welches durch RÖNTGEN-Bestrahlung gebildet worden ist, in gleicher Weise reduziert wird, wie das durch Glucoseoxydase erzeugte. Die Vorbehandlung mit Glucoseoxydase hat den Nachteil, dass trotz Waschen und Resuspendieren Spuren von Enzym an den Zellen haften bleiben. Die in Experiment A (Tabelle 4) beobachtete Verzögerung der Methämoglobin-Reduktion in Gegenwart von Glucose dürfte vermutlich auf Kontamination mit Resten von Glucoseoxydase zurückzuführen sein.

Tabelle 4. *Methämoglobinreduktion in Erythrocyten nach Methämoglobinbildung durch Glucoseoxydase-Einwirkung oder Bestrahlung. Einfluss von Lactat- und Glucose-Zusatz auf die Rückbildungsrate*

Methämoglobingehalt der Zellen bei Versuchsbeginn = 100% gesetzt. Inkubierung bei 30°. Konzentration der Erythrocytensuspension 0,75 mg Hgb/ml. Die Oxydation des Hämoglobins erfolgte in A, durch Vorinkubierung mit Glucoseoxydase (100 γ /ml, 20 min), in B. durch Bestrahlung (20000 R)

Zusatz:	Relativer Methämoglobingehalt nach verschiedener Versuchsdauer						
	A. Normale Erythrocyten (3000 P.E./mg Hgb)				B. Akatalasie-Erythrocyten (20 P.E./mg Hgb)		
	$t = 1$	2	4	6 Std.	$t = 1\frac{1}{2}$	$2\frac{1}{2}$	$3\frac{1}{2}$ Std.
Kontrolle (ohne Substrat)	95	86	73	61%	83	77	70%
+ Glucose (0,025 M)	94	90	80	67%	75	55	37%
+ Lactat (0,025 M)	86	67	40	25%	52	36	25%

Vergleicht man den Methämoglobingehalt von Akatalasie-Zellen, die mit und ohne Zusatz von 0,025 M Glucose oder Lactat bestrahlt worden sind, lassen sich keine gesicherten Unterschiede nachweisen: Nach Bestrahlung mit 16000 R (60 kV RÖNTGEN-Strahlen) ist z. B. in Zellen von A. B. (Katalase-Aktivität: 22 P.E./g Hgb) ein relativer Methämoglobingehalt von durchwegs

68–72% festzustellen. Dieser Befund steht in Einklang mit dem oben gegebenen Wert für die maximale Rückbildungsrate für Methämoglobin. Er berechtigt zum Schluss, dass die Methämoglobinreduktion in diesen Experimenten – wenigstens bei kurzer Versuchsdauer – verhältnismässig klein ist und daher vernachlässigt werden darf.

Diskussion

Katalase und Glutathionperoxidase sind imstande, in und um die Erythrocyten gebildetes H_2O_2 unschädlich zu machen. Sie konkurrieren dabei um ihr gemeinsames Substrat, sind aber in funktioneller Hinsicht als Synergisten zu betrachten, weil jede auf ihre Weise zum Schutz des leicht oxydablen Hämoglobins beiträgt (Fig. 1). Aus den mit verschiedener Versuchsanordnung erzielten Resultaten geht hervor, dass bei relativ hoher H_2O_2 -Bildungsrate (vgl. Fig. 2 und 3) die Katalasewirkung vorherrscht, bei kleinem H_2O_2 -Angebot (vgl. Fig. 5 und 6) dagegen die Aktivität der Glutathionperoxidase. Die beiden extremen Auffassungen, wonach Katalase als *das* Schutzenzym des Hämoglobins anzusehen ist (WARBURG [2]), bzw. wonach Glutathionperoxidase hiefür ausschliesslich von Belang ist (COHEN & HOCHSTEIN [12]), lassen sich demnach sehr wohl auf einen Nenner bringen. Vergleicht man die Versuchsanordnungen, wie sie von beiden Seiten zur Fundierung ihrer Auffassung gewählt worden sind, fällt auf, dass WARBURG & Mitarbeiter mit relativ stark verdünnten (0,1–0,5 mg Hgb/ml), COHEN & HOCHSTEIN mit eher konzentrierten (20 bis 120 mg Hgb/ml) Erythrocytensuspensionen gearbeitet haben. Diesem Aspekt ist entsprechend Rechnung zu tragen.

Zur Gegenüberstellung der mit beiden Versuchsanordnungen erzielten Resultate erscheint es gerechtfertigt, die pro Zeiteinheit gebildete bzw. in das System gelangte Menge an H_2O_2 nicht auf das Gesamtvolumen, sondern auf die gleiche Hämoglobinmenge (bzw. das Zellvolumen) zu beziehen. Wählt man diese Vergleichsbasis, ergibt sich folgendes Bild: In den Versuchen mit Glucoseoxydase (1–100 γ /ml) wird H_2O_2 mit einer Geschwindigkeit von 10^{-9} bis 10^{-7} Mol/min/ml produziert. Bei einem Hämoglobingehalt der Suspension von ca. 0,5 mg/ml beträgt demnach die Bildungsrate $2 \cdot 10^{-9}$ bis $2 \cdot 10^{-7}$ Mol H_2O_2 /mg Hgb/min. In den Versuchen mit Diffusion von Reagens- H_2O_2 *via* Gasphase sind im Mittel 10^{-8} Mol H_2O_2 /ml/min in die Erythrocytensuspension gelangt. Da meist bei einer Konzentration von ca. 30 mg Hgb/ml gearbeitet worden ist, resultiert eine Geschwindigkeit der H_2O_2 -Zufuhr von ca. $3 \cdot 10^{-10}$ Mol/mg Hgb/min. Ein Vergleich dieser Zahlenwerte zeigt, dass in den Versuchen mit Glucoseoxydase pro Minute und mg Hämoglobin 3–300mal mehr H_2O_2 gebildet worden ist als in den Experimenten mit H_2O_2 -Diffusion *via* Gasphase. Dabei gilt der untere Grenzwert für die Experimente mit Akatalasie-Zellen, der obere für diejenigen an normalen Menschenerythrocyten.

Ein ähnlicher Unterschied dürfte auch bei den entsprechenden Werten für die stationäre H_2O_2 -Konzentration im suspendierenden Medium bestehen. Der in Frage kommende Konzentrationsbereich liegt vermutlich zwischen 10^{-7} und 10^{-5} M H_2O_2 . Eine Korrelierung der Werte für Bildungsgeschwindigkeit und stationäre Konzentration lässt sich zwar nicht durchführen. Hingegen erscheint eine Schätzung der stationären H_2O_2 -Konzentration auf Grund nachstehender Überlegungen angingig. Diese geben zudem Gelegenheit zur Diskussion des in Fig. 3 dargestellten biphasischen Kurvenverlaufes bezüglich Methämoglobinbildung.

Die Interpretation des biphasischen Verlaufes der Methämoglobinbildung in katalasearmen Zellen (vgl. Fig. 3 und Tabelle 1) stützt sich zunächst auf die Beobachtung, dass die Dauer der initialen «lag»-Phase zur Geschwindigkeit der H_2O_2 -Bildung umgekehrt proportional ist. Die in dieser Zeit gebildete H_2O_2 -Menge ist somit konstant. Im Falle von Enten-Erythrocyten (Tabelle 1; Beispiel 1) sind es unabhängig von der Bildungsgeschwindigkeit für H_2O_2 durchwegs 10^{-8} Mol H_2O_2 /ml. Dieser Wert entspricht (bezogen auf den gesamten Ansatz) dem 3fachen derjenigen H_2O_2 -Menge, welche zur vollständigen Oxydation des zelleigenen Bestandes an red. Glutathion nach Reaktion B (vgl. Seite 1429) erforderlich ist⁴). Dies sind $4 \cdot 10^{-3} \times 1,5 \cdot 10^{-3} \times 0,5 \cdot 10^{-3} = 3 \cdot 10^{-9}$ Mol/ml. Eine analoge Berechnung lässt sich für Akatalasie-Zellen von Menschen, die lediglich einen halb so grossen Gehalt an red. Glutathion und eine dementsprechend kürzere Latenzphase aufweisen, durchführen (Tabelle 1; Beispiel 2). Am Ende der Latenzphase dürfte im Ansatz eine mittlere H_2O_2 -Konzentration vorliegen, die gleich oder kleiner ist als die Differenz aus diesen beiden Werten, d. h. $(10^{-8}) - (3 \cdot 10^{-9}) = 7 \cdot 10^{-9}$ Mol H_2O_2 /ml. Die Annahme, dass es erst dann zur merklichen Oxydation von Hämoglobin zu Methämoglobin kommt, wenn der Vorrat an red. Glutathion in den Zellen aufgebracht ist und die H_2O_2 -Konzentration einen bestimmten Schwellenwert überschritten hat, erlaubt jedenfalls eine zwanglose Erklärung der Latenzphase, wie sie bei der Methämoglobinbildung in katalasearmen Erythrocyten beobachtet werden kann.

Für die Interpretation des Kurvenverlaufes (in Fig. 3) ist ferner die Beobachtung von Interesse, dass die Gesamtdauer der zweiten Phase, während welcher die Methämoglobinbildung erfolgt, ihrerseits in einem bestimmten Verhältnis zur H_2O_2 -Produktion und zur oxydierten Hämoglobinmenge steht. So ist z. B. die Methämoglobinbildung in Enten-Erythrocyten bei einer H_2O_2 -Produktionsrate von 10^{-9} Mol/min/ml (bei Zusatz von 1γ GOD/ml) innert $2 \times 6,2 = 12,4$ min beendet. In dieser Zeitspanne werden im System $12,4 \cdot 10^{-9}$ Mol H_2O_2 /ml gebildet. Diese Menge entspricht näherungsweise der (theoretisch) zur Oxydation von $0,5$ mg Hgb/ml erforderlichen H_2O_2 -Menge von $1,5 \cdot 10^{-8}$ Mol H_2O_2 /ml (1 Mol H_2O_2 = $0,5$ Mol MHb). Dasselbe gilt sinngemäss für die übrigen in Tabelle 1 (Zeilen 1-4) aufgeführten H_2O_2 - bzw. Methämoglobin-Umsätze.

Dieser Versuch einer quantitativen Auswertung der in Fig. 3 dargestellten Kurven berücksichtigt weder die Geschwindigkeit der enzymatischen Glutathion-(G-S-S-G)-Reduktion, noch eine eventuelle Methämoglobinrückbildung, noch die Tatsache, dass die Oxydation des Hämoglobins zu Methämoglobin nicht allein in einer Oxydation des Häm-Eisens besteht. Die dabei begangenen Fehler haben zur Folge, dass die stationäre Konzentration an H_2O_2 , wie sie sich am Ende der Phase 1 einstellt, unterhalb des hier errechneten Grenzwertes von $7 \cdot 10^{-6}$ molar liegen dürfte.

Die Versuche zeigen, dass Hämoglobin in intakten Erythrocyten solange vor Oxydation durch H_2O_2 geschützt bleibt, als der Bestand an red. Glutathion eine peroxidatische Umsetzung des H_2O_2 via Glutathionperoxidase erlaubt. Wird dieses Substrat aus irgend einem Grunde aufgebraucht, fällt diese «Schutzreaktion» aus, und es kann nach Überschreiten einer bestimmten Konzentrationsschwelle zur Oxydation des Hämoglobins kommen. Ob und in welchem Ausmass das über den Schwellenwert hinaus angestaute H_2O_2 Hämoglobin tatsächlich oxydiert, hängt von der Katalase-Aktivität im Erythrocyten ab. Während in praktisch katalasefreien Zellen Hämoglobin in annähernd stöchiometrischer Menge umgesetzt wird, bleibt eine solche in katalasehaltigen Zellen weitgehend aus (Fig. 2 und 3). Aus einem Vergleich der 3 in Tab. 1 angeführten Versuche folgt, dass ein Anstieg der Katalaseaktivität von 6 auf 22 P.E./g Hgb bereits genügt, um die Methämoglobinbildung (in Gegenwart von 5γ GOD/ml) von 0,228 auf 0,090 mg MHb/ml/min herabzusetzen. In Proben

⁴) Gehalt der Enten-Erythrocyten an red. Glutathion ca. $4 \cdot 10^{-3}$ M; bei einer Hämoglobinkonzentration von $0,5$ mg/ml macht der Zellinhalt ca. $1,5\%$ des Gesamtvolumens der Suspension aus; bei der Oxydation von 1 Mol red. Glutathion wird $\frac{1}{2}$ Mol H_2O_2 verbraucht.

mit einer (normalen) Katalaseaktivität von 2500 P.E./g Hgb wird bei gleichem H_2O_2 -Angebot nur noch ein verschwindend kleiner Bruchteil (ca. 1/100) der theoretisch möglichen Methämoglobinmenge gebildet (= 0,002 mg MHb/ml/min). Katalase ist somit in diesem Falle sehr wohl imstande, Hämoglobin vor Oxydation durch H_2O_2 bzw. peroxidäquivalente Produkte zu schützen. Dies trifft vermutlich stets dann zu, wenn das Glutathionperoxidase-System, welches im Verhältnis zur Katalase eine relativ geringe Umsatzkapazität aufweist, den H_2O_2 -Anfall nicht allein vollständig umzusetzen vermag.

Das Ergebnis der mit enzymatisch gebildetem H_2O_2 ausgeführten Experimente stimmt im wesentlichen mit den kürzlich von COHEN & HOCHSTEIN [12b] mitgeteilten Befunden überein. Dasselbe gilt auch für die Höhe des von diesen Autoren bei $3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ H_2O_2 vermuteten Schwellenwertes, unterhalb welchem H_2O_2 ausschliesslich durch Glutathionperoxidase umgesetzt werden soll. Ihre verallgemeinernde Folgerung, wonach die Katalase für die Beseitigung von endogen entstandenem H_2O_2 ohne praktische Bedeutung ist, bedarf indessen einer Präzisierung. Es ist unbestritten, dass endogen bzw. metabolisch gebildetes H_2O_2 von den Erythrocyten - wie in allen anderen Zellen - praktisch ausschliesslich peroxidatisch umgesetzt wird (vgl. [16]). Dies trifft auch für die Aktivität der Erythrocyten-Katalase zu, sofern ein geeigneter H-Donor (z. B. Formiat) zugegen ist [14]. Gleich wie Glutathionperoxidase ist die Peroxidase-Wirkung der Katalase ein relativ langsam ablaufender Vorgang mit beschränktem Umsetzungsvermögen.

Von ungleich grösserer Bedeutung ist nun aber der Befund, dass die bei Strahlenwirkung gebildeten Reaktionsprodukte auf Erythrocyten *in vitro* stets so einwirken, wie wenn die kritische Konzentration an H_2O_2 überschritten worden wäre. Die früher bei Dosisraten von ca. 400 R/min (entspr. ca. 10^{-9} Mol H_2O_2 /ml/min) an Erythrocyten von verschiedenem Katalasegehalt beobachteten Dosis-Wirkungskurven für Methämoglobinbildung stimmen in formaler Hinsicht mit den in Fig. 4 dargestellten Kurven weitgehend überein [4] [14]. Die hier gewählte Versuchsanordnung mit enzymatisch produziertem H_2O_2 darf somit sehr wohl als Modell für die strahleninduzierte Methämoglobinbildung betrachtet werden, das weiteren Aufschluss über das Zusammenwirken der am Schutz des Hämoglobins beteiligten Enzymsysteme zu geben vermag.

Die Ausführung dieser Arbeit erfolgte mit Unterstützung durch den SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG (Projekt A 142 bzw. 2879).

SUMMARY

1. The rate of methaemoglobin formation induced by small amounts of H_2O_2 , (a) generated enzymatically, or (b) added by diffusion as vapour, has been investigated in suspensions of normal and acatalasic red cells.

2. At low rates of H_2O_2 -generation (*i.e.* 10^{-10} - 10^{-9} moles H_2O_2 /mg Hgb/min) removal of H_2O_2 is mainly due to glutathione peroxidase activity, whereas at higher rates (*i.e.* 10^{-9} - 10^{-7} moles H_2O_2 /mg Hgb/min) catalase activity is responsible for haemoglobin protection. Under the latter experimental conditions the yield of methaemoglobin formed depends mainly on red cell catalase activity.

3. The existence of a lag-phase in methaemoglobin formation and measurements of reduced glutathione concentration suggest that catalase and haemoglobin compete

for excess H_2O_2 only after the intracellular supply of reduced glutathione has been exhausted and the H_2O_2 concentration in the cells has passed a critical level of less than $7 \cdot 10^{-6} \text{M}$ H_2O_2 .

Medizinisch-chemisches Institut der Universität Bern

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. FRICKE & B. W. PETERSON, *Amer. J. Roentgenol.* **17**, 611 (1927); H. LASER, *Nature* **174**, 753 (1954); **176**, 361 (1955); **176**, 361 (1955); E.S.G. BARRON & PH. JOHNSON, *Radiat. Research* **5**, 290 (1956).
- [2] O. WARBURG, W. SCHRÖDER & H. W. GATTUNG, *Z. Naturforsch.* **15b**, 163 (1960).
- [3] J. P. HEINIGER & H. AEBI, *Helv.* **46**, 255 (1963).
- [4] H. AEBI, J. P. HEINIGER & HEDI SUTER, *Experientia* **18**, 129 (1962).
- [5] G. C. MILLS, *Arch. Biochemistry Biophysics* **86**, 1 (1960).
- [6] E. J. VAN KAMPEN & W. G. ZIJLSTRA, *Clin. chim. Acta* **6**, 538 (1961).
- [7] H. FLEISCH, *Helv. physiol. Acta* **17**, 318 (1959).
- [8] G. C. MILLS & H. P. RANDALL, *J. biol. Chemistry* **232**, 589 (1958).
- [9] R. N. FEINSTEIN, *J. biol. Chemistry* **180**, 1197 (1949).
- [10] H. AEBI, A. TEMPERLI, R. GRESSLY, R. OESTREICHER & A. ZUPPINGER, *Helv.* **43**, 1714 (1960).
- [11] A. C. EGERTON, A. J. EVERETT, G. J. MINKOFF, S. RUDRANCHANA & K. C. SALOOJA, *Analyt. chim. Acta* **10**, 422 (1954).
- [12] G. COHEN & P. HOCHSTEIN, a) *Science* **134**, 1756 (1961); b) *Biochemistry* **2**, 1420 (1963).
- [13] W. W. KAY & K. C. MURFIT, *Biochem. J.* **74**, 203 (1960).
- [14] H. AEBI, F. JEUNET, R. RICHTERICH, H. SUTER, R. BÜTLER, J. FREI & H. R. MARTI, *Enzymol. biol. Clin.* **2**, 1 (1962/63).
- [15] A. BLUMBERG, H. R. MARTI, F. JEUNET & H. AEBI, *Schweiz. med. Wschr.* **92**, 1324 (1962).
- [16] H. AEBI, *Bull. Soc. Chim. biol.* **42**, 187 (1960); F. PORTWICH & H. AEBI, *Helv. physiol. Acta* **18**, 1 (1960).

156. Reaktivität von Koordinationsverbindungen XI [1]¹⁾.

Mechanismus der Kupfer(II)-katalysierten Autoxydation von *o*-Phenylendiamin

von K. Wüthrich und S. Fallab

(30. V. 64)

Um zu prüfen, wie weit bei Metallionen-katalysierten Autoxydationen Komplexbildungsreaktionen zwischen Substrat und dem katalytisch aktiven Metallion von Bedeutung sind, haben wir die Katalyse der Autoxydation von *o*-Phenylendiamin durch Kupfer(II)-Ionen in wässriger Lösung untersucht²⁾.

Die Reaktion von *o*-Phenylendiamin (H_2B) mit O_2 führt, wie wir durch EPR.-Messungen³⁾ zeigen konnten, primär zu Radikalstufen, die über verschiedene un-

¹⁾ Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 1448.

²⁾ Die Anwendung der Redoxeeigenschaften des *o*-Phenylendiamins in technischen Prozessen wurde bereits mehrmals beschrieben [2]. Es ist auch im Hinblick auf derartige Anwendungen interessant, über das Verhalten des *o*-Phenylendiamins gegen O_2 nähere Angaben zu erhalten.

³⁾ Eine ausführliche Beschreibung dieser Messungen erfolgt in einer späteren Mitteilung.