

Zur Frage der durch Lebergewebe bewirkten Umwandlung von Pestox III in einen aktiven Cholinesterase-Inhibitor.

Von
A. Locker und H. Siedek.

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität Wien.

(Eingelangt am 17. Jan. 1952. Vorgelegt in der Sitzung am 31. Jan. 1952.)

Bei Studien über die pharmakologischen Wirkungen des als Insektizid verwendeten Pestox III (Bis-bis-dimethylaminophosphorsäure-anhydrid; „Schradan“; P III) wurde von *Du Bois*¹ keine Übereinstimmung zwischen der in-vitro- und in-vivo-Wirkung auf die Cholinesterase(ChE)-Aktivität von Serum und Geweben festgestellt. Die in-vivo-Effekte waren stärker ausgeprägt und zeigten Kumulation, weshalb die Umwandlung von P III im Organismus in einen wirksameren ChE-Hemmer vermutet wurde. Von den daraufhin untersuchten Geweben glaubte *Du Bois* einen solchen Umwandlungsvorgang durch Lebergewebe nachweisen zu können: Er inkubierte Leberschnitte in Sauerstoffatmosphäre in Krebs-Phosphatringerlösung mit 0,01 m Glukose in Gegenwart von P III. Während die Konzentration von 1×10^{-3} m in vitro auf eine Rattengehirn-ChE-Präparation nicht hemmend wirkte, rief die P III-Lösung gleicher Konzentration, nachdem für $\frac{1}{2}$ Std. ein Leberschnitt in ihr inkubiert war, bereits eine Hemmung von 97% hervor.

Es widerspricht unserer Kenntnis über die allgemein entgiftende Funktion der Leber, daß eine Substanz in ihr an Giftigkeit zunehmen sollte, weshalb wir uns veranlaßt sahen, diese Versuche nachzuprüfen.

Material und Methode.

Einige methodische Angaben *Du Bois*' wurden von uns etwas abgeändert. Die Acetylcholin-chlorid(ACh)-Lösung war in unseren Untersuchungen 0,05% an Stelle von 0,01 m, das Gehirnhomogenat (nach *Potter*² hergestellt) nicht 1,66%ig, sondern 2,5%ig (Endkonzentration). Die ChE-Bestimmung

¹ *Du Bois, Doull und Coon, J. Pharmacol. exp. Ther.* **99**, 376 (1950).

² *Potter und Elvehjem, J. biol. Chemistry* **114**, 495 (1936).

erfolgte manometrisch nach *Ammon*³. Als Leerversuch wurde eine gleiche Menge Krebs-Phosphatringelösung, die den Leberschnitt enthalten hatte, einerseits in ACh-haltige Bikarbonat-Ringerlösung ohne Hirnhomogenat, andererseits in einfachen Krebs-Bikarbonat-Ringer zugekippt, um die durch eventuell nicht vollständig abgepufferte Milchsäure und aus dem Schnitt herausgelöste Leber-ChE verursachten CO₂-Drucke zu eliminieren. Die Gehirn-ChE-Präparationen, von 4 Ratten von zirka 200 g Gewicht stammend, waren in ihrer Aktivität etwas verschieden, wodurch die große Streubreite zu erklären ist.

P III wurde uns vom Chemical Research Dpt., Pest Control Ltd., Harston, Cambridge, zur Verfügung gestellt; für ACh schulden wir Hoffmann-La Roche, Basel, Dank.

Ergebnis.

In völliger Übereinstimmung mit *Du Bois* erwies sich 1×10^{-3} m P III in vitro als wirkungslos auf die Gehirn-ChE. Nach $\frac{1}{2}$ bis 2 Stdn. Inkubation von Rattenleberschnitten (Trockengewichte zwischen 10 und 20 mg) in Sauerstoff in der P III-haltigen Phosphatringelösung wurde durch dieselbe die ChE-Aktivität des Gehirns nicht verändert (Tabelle 1).

Tabelle 1. Wirkung von P III ohne Inkubation und nach Inkubation von Leberschnitten auf die Gehirn-ChE-Aktivität der Ratte. Zahl in Klammer = Versuchszahl.

Konzentration	Inkubationszeit des Leberschnitts	mg ACh, gespalten in 75 Min.	% Aktivität
Normal....	—	0,712 \pm 0,146 (10)	100 (\pm 20)
10 ⁻³ m....	0	0,795 \pm 0,236 (9)	112 (\pm 33)
10 ⁻³ m....	$\frac{1}{2}$ Std.	0,749 \pm 0,240 (11)	105 (\pm 33)
10 ⁻³ m....	1 Std.	0,773 \pm 0,248 (9)	108,5 (\pm 35)
10 ⁻³ m....	2 Stdn.	0,780 \pm 0,240 (12)	109,5 (\pm 33)

Methodische Unzulänglichkeiten für den negativen Ausfall der Nachprüfung von *Du Bois*' Befund scheinen nicht vorzuliegen. Der „aktive Anti-ChE-Stoff“ wird von *Du Bois* als in Lösung nicht beständig beschrieben und soll bereits nach 48 Stdn. bei Zimmertemp. zerstört sein. Es war uns allerdings nicht immer möglich, unmittelbar an die Beendigung der jeweiligen Inkubationsperioden sofort die Prüfung auf Hemmwirkung anzuschließen; in einigen Fällen mußten die P III-haltigen Phosphatringelösungen nach Entfernung der Leberschnitte $\frac{1}{2}$ bis 2 Stdn. vor der weiteren Untersuchung eiskühlt aufbewahrt werden. Wir glauben aber nicht, daß dies für den negativen Ausfall verantwortlich wäre.

Diskussion.

Wenn auch von vielen Methylestern anorganischer (und auch organischer) Säuren bekannt ist, daß sie im Organismus durch „Giftung“

³ *Ammon*, Pflügers Arch. **233**, 486 (1933).

an toxischer Wirkung zunehmen⁴, so scheint doch einer eventuellen Diskrepanz zwischen der in-vitro- und in-vivo-Wirkung von P III auf ChE ein anderer Sachverhalt zugrunde zu liegen. Die Grenzkonzentration für eine in-vitro-Hemmung von Gehirn-ChE liegt nach eigenen Untersuchungen um 2×10^{-3} m, wenig höhere Konzentrationen (5×10^{-3} m) lassen bereits Hemmwirkung erkennen, die bei 2×10^{-2} m 100% beträgt. Bei 2,5%igem Hirnhomogenat würde die Grenzkonzentration von 2×10^{-3} m einem Gewichtsverhältnis P III : Gewebsmenge von etwa 1 : 50 entsprechen und 100% Hemmung durch 2×10^{-2} m erst bei einem Verhältnis von 1 : 5 eintreten, was besagt, daß P III ein sehr schwacher ChE-Hemmer ist. Die von *Du Bois* verwendete Gewichtsrelation 5 mg/kg Körpergewicht, das heißt 1 : 200000¹, ist daher um 4×10^3 zu niedrig, um einen Hemmungseffekt hervorzurufen. Aber auch der unter 5×10^{-3} m liegende Konzentrationsbereich scheint nicht ohne Wirkung auf die Gehirn-ChE zu sein, es läßt sich in diesem Bereich in vitro ein Steigerungseffekt nachweisen⁵: Wurden Gehirn-ChE-Proben in Sauerstoff längere Zeit mit P III-Lösungen dieses Konzentrationsbereiches versetzt, so wurde dadurch die ChE-Aktivität erhöht, nach 1½ Stdn. Inkubation um zirka 20%, nach 3 Stdn. um zirka 100%. Mit niedrigeren Konzentrationen (unter 3×10^{-4} m) war durch längeres Vermischen mit dem Ferment an diesem keine Aktivitätssteigerung zu erzielen, ebenso nicht in dem weiterhin Hemmung zeigenden Bereich zwischen 5×10^{-3} m und 2×10^{-2} m. Bei der Leber-ChE lag die P III-Konzentration, welche nach 3stündiger Inkubation gleichfalls eine 100% übersteigende Aktivitätszunahme bewirkte, um 2×10^{-3} m.

Ein Steigerungseffekt ließ sich auch bei Untersuchung der Wirkung von P III in vivo, in der Dosierung 10 mg/kg Körpergewicht (das heißt 1 : 100000) an Meerschweinchen demonstrieren⁶: Nach 24 Stdn. war eine 39%ige Zunahme der Gehirn-ChE-Tätigkeit festzustellen, nach 48 Stdn. verminderte sich die Aktivität etwas. Während also in vitro bei einem Gewichtsverhältnis unter 1 : 50 (entsprechend 2×10^{-4} m) keine Steigerung mehr hervorgerufen werden konnte, trat sie in vivo noch nach 1 : 100000 auf. Da die geringen Unterschiede, die in der ChE-Aktivität zwischen Ratten und Meerschweinchen bestehen dürften, diese Diskrepanz nicht erklären können, ist sie ein Hinweis darauf, daß für in-vivo-Beeinflussungen andere Bedingungen gelten als für in vitro. So wurde z. B. auch bei TEPP (Tetraäthylpyrophosphat) keine Übereinstimmung zwischen in-vivo- und in-vitro-Wirkung auf Gehirn- und Blut-ChE gefunden⁷. Bei in-vivo-Beeinflussung ist nach *Hobbiger* vor

⁴ *Flury* und *Neumann*, Klin. Wschr. 1942, 557.

⁵ *Locker* und *Siedek*, unveröffentlicht.

⁶ *Locker* und *Siedek*, Exper. (im Druck).

⁷ *Hobbiger*, Brit. J. Pharmacol. 6, 21 (1951).

allein die Verteilung des Inhibitors durch den Blutstrom, seine Lipidlöslichkeit, seine Passage zwischen Blut und Gewebe (besonders wichtig bei Wirkung auf Gehirn-ChE) sowie die Lokalisation und Konzentration der ChE im Gewebe zu beachten. Eine Untersuchung über die Verteilung und Ausscheidung von radioaktivem P III⁸ ergab besonders starke Speicherung in der Muskulatur und in zunehmendem Maße in der Leber, wo es zum Teil unzerstört ausgeschieden wird, dagegen nur eine geringe Anreicherung im Gehirn. Wenn diese dem für in-vitro-Steigerung errechneten Mengenverhältnis entspricht, könnte P III auch in vivo eine ChE-Aktivierung hervorrufen.

Die Überlegung über Dosis-Wirkungsbeziehung, die erwähnten Befunde über Aktivierung durch P III sowie der direkte negative Ausfall einer Nachprüfung der Angabe *Du Bois'* machen es sehr unwahrscheinlich, daß P III durch Lebergewebe in einen aktiven ChE-Hemmer verwandelt wird.

Zusammenfassung.

Die Angabe, daß Pestox III (Bis-bis-dimethylamino-phosphorsäureanhydrid) durch Leberschnitte in vitro in eine Cholinesterase stark hemmende Substanz umgewandelt wird, konnte nicht bestätigt werden.

⁸ *Hofmann-Credner* und *Siedek*, Arch. intern. Pharmacodyn. 89, 74 (1952).