

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
7. Jg., S. 480—485, September 1959

## Zur Messung der in vivo- und in vitro-Reaktivierbarkeit alkylphosphatvergifteter Serumcholinesterase durch 2-PAM und Toxogonin mit verschiedenen Substraten

VON MARIKA GELDMACHER—v. MALLINCKRODT, H. J. URBACH, H. KITTEL und H. H. LINDORF

*Aus dem Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Universität Erlangen-Nürnberg  
(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Weinig)*

(Eingegangen am 31. März 1969)

Zur Messung der Cholinesteraseaktivität in Gegenwart von 2-PAM und Toxogonin sind echte Ester wie Acetylcholin, Butyrylcholin und Benzoylcholin geeignete Substrate. Substrate mit Säureanhydridcharakter wie Acetylthiocholin, Butyrylthiocholin, *o*-Nitrophenylbutyrat, Indoxylacetat, Phenylbenzoat und  $\alpha$ -Naphthylacetat werden durch die beiden Oxime gespalten. Das Ausmaß der Spaltung ist jedoch von der Oximmenge im Ansatz abhängig. Nach Gaben von 2-PAM und Toxogonin in den empfohlenen therapeutischen Mengen sind deshalb Verfahren, die Acetylthiocholin, Butyrylthiocholin und *o*-Nitrophenylbutyrat verwenden, trotzdem brauchbar.

### *Measurement of the in vivo and in vitro reactivation of alkyl phosphate-poisoned serum cholinesterase by 2-PAM and toxogonin in the presence of different substrates*

True esters, like acetyl choline, butyrylcholine and benzoyl choline are suitable substrates for the measurement of cholinesterase activity in the presence of 2-PAM and toxogonin. Substrates with acid anhydride character, like acetylthiocholine, butyrylthiocholine, *o*-nitrophenyl butyrate, indoxyl acetate, phenyl butyrate and  $\alpha$ -naphthyl acetate are all cleaved by the two oximes. The extent of the cleavage is, however, proportional to the concentration of the oxime. Therefore, following the administration of 2-PAM and toxogonin in the recommended therapeutic amounts, methods that employ acetylthiocholine, butyrylthiocholine and *o*-nitrophenyl butyrate can, nevertheless, be used.

Oxime wie 2-PAM (2-Pyridinaldoximmethyljodid) und Toxogonin (Bis-(4-hydroxyiminomethyl-1-pyridiniummethyl)-ätherdichlorid) werden zur Therapie von Vergiftungen mit Alkylphosphaten, insbesondere E 605 eingesetzt. Dabei interessierte in bestimmten Fällen eine Kontrolle des Therapieerfolges durch Messung der Serumcholinesterase-Aktivität nach der Oximgabe. Zur grundsätzlichen Entscheidung, ob ein Oxim zur Reaktivierung eines phosphorylierten Enzyms in der Lage ist, wurde von einigen Autoren der in vitro-Test herangezogen. Bei klinischen Fällen haben z. B. HEITMANN und FELGENHAUER (1) versucht, vor der therapeutischen Anwendung die Wirksamkeit des Reaktivators an der in vivo alkylphosphatvergifteten Serumcholinesterase der Patienten durch in vitro-Inkubation mit Toxogonin zu testen.

Auch forensisch spielt die Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität im Serum bei der Beurteilung von Vergiftungsfällen eine Rolle. Auf Grund der starken individuellen Unterschiede in der Aktivität des normalen Enzyms, des Vorkommens atypischer Serumcholinesterasen mit z. T. sehr niedriger oder fehlender Aktivität, des Einflusses von Krankheiten sowie der Möglichkeit einer Cholinesterase-Blockierung nicht nur durch Alkylphosphate, sondern auch durch Carbamate und viele Medikamente haben FRIEDBERG und SAKAI (2) für forensische Zwecke ein Verfahren zur in vitro-Reaktivierung alkylphosphatvergifteter Cholinesterasen mit 2-PAM ausgearbeitet. Sie empfehlen, mit einer beliebigen Methode die Aktivität ohne und mit 2-PAM-Zusatz zu prüfen. Ergebe sich durch PAM eine Aktivitätssteigerung, so liege mit Sicherheit eine Vergiftung mit einem organischen Phosphorsäureester vor. Die Autoren selbst verwendeten zur Aktivitätsbestimmung die

manometrische Methode von AMMON (3) mit Acetylcholin als Substrat.

HEITMANN und FELGENHAUER (1) wiesen kürzlich darauf hin, daß Toxogonin eine „esterolytische“ Wirkung besitzt, wodurch es in der Lage ist, Substrate wie Acetylthiocholin, Butyrylthiocholin und  $\alpha$ -Naphthylacetat zu spalten und damit eine stark reaktivierte Cholinesterase vorzutauschen. NENNER und ERDMANN (4) haben dies für Acetylthiocholin bestätigt.

Schon BERGNER und O'NEILL (5) hatten gezeigt, daß Oxime wie 2-PAM, 4-PAM und DAM (Diacylmonoxim) Acetyl- und Butyrylthiocholin im schwach alkalischen Milieu unter Freisetzung von Thiocholin spalten. Dieser Effekt war bei pH 5 praktisch nicht mehr zu beobachten, was die Autoren darauf zurückführen, daß nur bei höheren pH-Werten das Gleichgewicht zugunsten des allein in Reaktion tretenden Oximations verschoben ist. Bei Durchführung der enzymatischen Spaltung bei pH 5,3 konnten sie eine Störung infolge Oximwirkung ausschalten.

Einen ähnlichen Effekt auf die beiden Thioester wie die genannten Oxime haben auch Imidazol und Cystein (6). Wir selbst (7) konnten die Spaltung von *o*-Nitrophenylbutyrat durch 2-PAM und Toxogonin zeigen.

Damit ist grundsätzlich die Frage zu klären, welche Substrate für die Prüfung des klinischen Erfolges von Oximgaben bzw. für in vitro-Inkubation geeignet sind, und welche für solche Untersuchungen ausscheiden.

In einer früheren Arbeit (7) war die Vermutung ausgesprochen worden, daß ähnlich wie *o*-Nitrophenylbutyrat auch andere Substrate mit Säureanhydrid-Charakter durch Oxime gespalten werden, während dies bei echten Estern wie z. B. Acetylcholin nicht der Fall ist. Dafür sprechen die Ergebnisse von FRIEDBERG und SAKAI (2)

sowie SÜCKER (8) mit Acetylcholin und 2-PAM unter Verwendung der manometrischen Methode bzw. eines kolorimetrischen und potentiometrischen Verfahrens, sowie von NENNER und ERDMANN (4) mit Acetylcholin und Toxogonin bei Anwendung einer titrimetrischen Methode.

Wir führten deshalb mit verschiedenen für die Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität in der Literatur angegebenen Substraten Versuche durch, in denen wir neben unvergiftetem menschlichem Serum auch 2-PAM und Toxogonin dem Ansatz zufügten. Damit sind nun die folgenden Verbindungen auf ihre Reaktion mit den beiden genannten Oximen geprüft:

Acetylthiocholin und 2-PAM

Acetylthiocholin und Toxogonin (vgl. auch (1), (4))

Butyrylthiocholin und 2-PAM

Butyrylthiocholin und Toxogonin (vgl. auch (1))

*o*-Nitrophenylbutyrat und 2-PAM (vgl. auch (7))

*o*-Nitrophenylbutyrat und Toxogonin (vgl. auch (17))

Indoxylacetat und 2-PAM

Indoxylacetat und Toxogonin

Phenylbenzoat und 2-PAM

Phenylbenzoat und Toxogonin

$\alpha$ -Naphthylacetat und 2-PAM

$\alpha$ -Naphthylacetat und Toxogonin (vgl. auch (1))

Acetylcholin und 2-PAM (vgl. auch (2), (8))

Acetylcholin und Toxogonin (vgl. auch (4))

Butyrylcholin und 2-PAM

Butyrylcholin und Toxogonin

Benzoylcholin und 2-PAM

Benzoylcholin und Toxogonin.

### Methodik und Ergebnisse

Für die Untersuchungen verwendeten wir reines 2-PAM in Form des Jodids und Toxogonin (Obidoximchlorid). Die Präparate stellten Gemische der *syn*- und *anti*-Form in wechselnder Zusammensetzung dar. Sie wurden den Ansätzen in Mengen zugesetzt, die im Falle einer Substratspaltung etwa gleichen Umsatz ergaben wie der jeweilige Serumzusatz. Zum Vergleich wurden deshalb stets normale Serumproben mitgeführt. Die Versuchsbedingungen entsprachen den von den einzelnen Autoren angegebenen.

Bei einigen Substraten wurden auch Vielfache der eben genannten Oximmengen geprüft, um einen Anhaltspunkt für die Abhängigkeit der Substratspaltung von der Oximenge zu gewinnen.

Mit Ausnahme von *o*-Nitrophenylbutyrat zeigte die Substratspaltung durch die beiden Oxime schon kurz nach dem Starten der Reaktion während des Beobachtungszeitraumes einen linearen Verlauf.

Entsprechendes galt für die Spaltung aller Substrate durch die Serumcholinesterasen. Um eine bessere Vergleichsmöglichkeit zu erhalten, wurde deshalb im Sinne eines „kinetischen Tests“ (vgl. KNEDEL und BÖTTGER (9)) nur der lineare Anteil der Beziehung zwischen Substratspaltung (wiedergegeben durch die Extinktions-

zunahme bzw. die CO<sub>2</sub>-Entwicklung) und Zeit wieder gegeben, der ein Maß für die Geschwindigkeit der Hauptreaktion darstellt. Lediglich bei *o*-Nitrophenylbutyrat ist auch der Anfangsteil der Reaktion wiedergegeben.

Die Ergebnisse wurden graphisch dargestellt, wobei jeder Punkt den Mittelwert aus mindestens drei Einzelbestimmungen darstellt.

Acetylthiocholin nach WEBER (10).

Reaktionsbedingungen:

0,05M Tris-Puffer: pH 7,4;

Tris-Puffer-DTNB-(5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure)-Lösung: 20 mg DTNB in 200 ml Trispuffer lösen.

Zu 2 ml Trispuffer-DTNB-Lösung wurden zugesetzt

a) 0,02 ml Serum

b) 0,2 mg PAM in 0,02 ml Trispuffer

c) 0,2 mg Toxogonin in 0,02 ml Trispuffer.

Es wurde einige Min. bei 22° vorinkubiert, sodann die Reaktion durch Zusatz von 0,2 ml Acetylthiocholinjodidlösung (55 mM) gestartet.

Reaktionstemperatur 22°.

Gemessen wurde die Extinktionszunahme bei 405 nm in 1 cm-Küvetten (siehe Abb. 1).

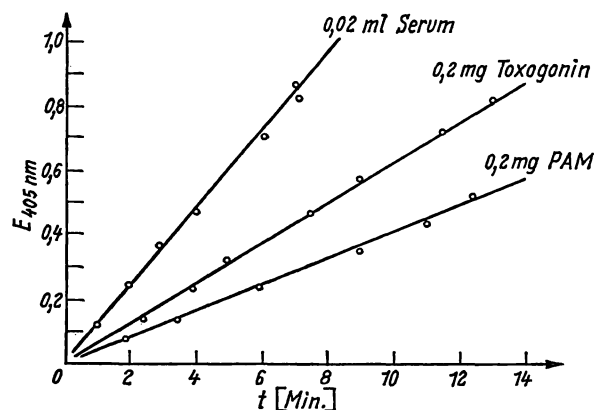


Abb. 1

Spaltung von Acetylthiocholin durch Serum, 2-PAM und Toxogonin

Für Acetylthiocholin wurde unter den genannten Bedingungen auch die Abhängigkeit der Substratspaltung von verschiedenen Oximmengen, nämlich 0,05; 0,1; 0,2 und 0,3 mg Toxogonin sowie 0,1; 0,2; 0,3 und 0,4 mg PAM pro Ansatz festgestellt (Abb. 2).

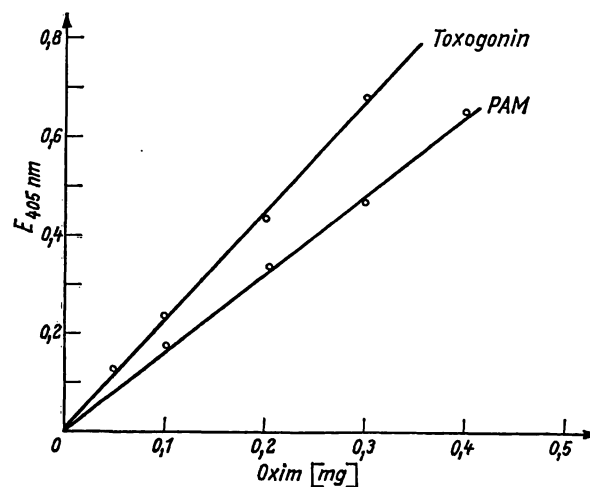


Abb. 2

Spaltung von Acetylthiocholin durch verschiedene Oximmengen. Gemessen wurde jeweils die Extinktionszunahme innerhalb von 8 Min.

**Butyrylthiocholinjodid**

Wir verwendeten den Reagensatz Merckotest; Cholinesterase, kinetischer Test<sup>1)</sup>, der auf die Untersuchungen von KNEDEL und BÖTTGER (9) aufbaut.

Reaktionsbedingungen:

Endkonzentration im Ansatz vor der Bestimmung:

0,02M Phosphatpuffer pH 7,7

6 mM S-Butyrylthiocholinjodid

0,25 mM 5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure.

Zu 2 ml der obigen Lösung wurden zugesetzt:

- 0,01 ml Serum
- 0,1 mg PAM in 0,01 ml Phosphatpuffer
- 0,1 mg Toxogonin in 0,01 ml Phosphatpuffer.

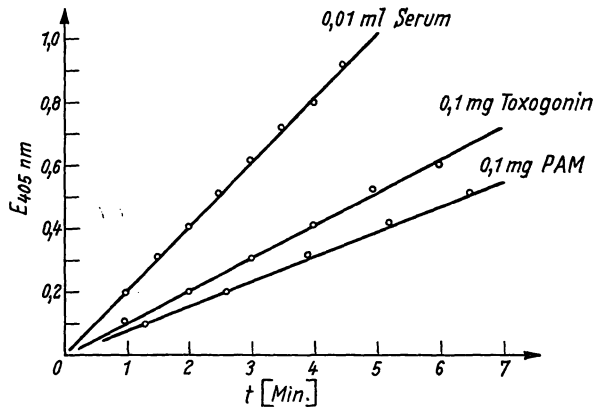


Abb. 3

Spaltung von Butyrylthiocholin durch Serum, 2-PAM und Toxogonin

Reaktionstemperatur: 22°.

Gemessen wurde die Extinktionszunahme bei 405 nm, der starken Extinktionszunahme wegen abweichend von der Vorschrift in 0,5 cm-Küvetten (Abb. 3).

Für Butyrylthiocholin wurde unter den genannten Bedingungen auch die Abhängigkeit der Substratspaltung von verschiedenen Oximmengen, nämlich 0,1; 0,2 und 0,3 mg pro Ansatz, festgestellt (Abb. 4):

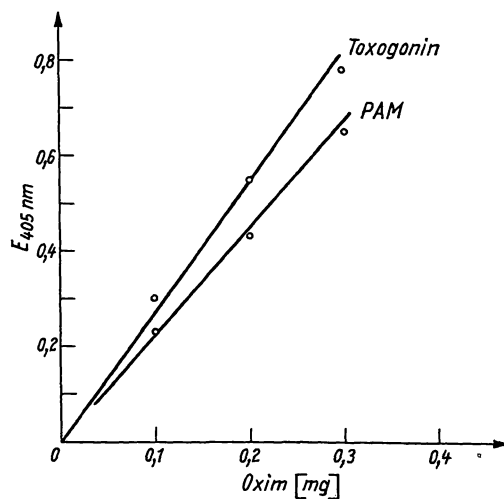


Abb. 4

Spaltung von Butyrylthiocholin durch verschiedene Oximmengen. Gemessen wurde jeweils die Extinktionszunahme innerhalb von 3 Min.

<sup>1)</sup> Hersteller: E. Merck, Darmstadt.

***o*-Nitrophenylbutyrat**

nach MAIN, MILES und BRAID (11).

Reaktionsbedingungen:

Butanol-Phosphatpuffer:

5 ml Butanol + 95 ml 0,05M Phosphatpuffer pH 7,6,

*o*-Nitrophenylbutyrat-Stammlösung:

0,5M in Methanol.

Substrat-Pufferlösung (frisch herstellen):

100 ml Butanol-Phosphatpuffer + 0,3 ml *o*-Nitrophenylbutyrat-Stammlösung.

Zu 5 ml Substrat-Pufferlösung wurden zugesetzt:

- 0,004 ml Serum in 1 ml Butanol-Phosphatpuffer
- 0,3 mg PAM in 1 ml Butanol-Phosphatpuffer
- 0,3 mg Toxogonin in 1 ml Butanol-Phosphatpuffer.

Reaktionstemperatur: 25°.

Gemessen wurde nach Zusatz von 0,05 ml DFP (Diisopropylfluorphosphat)-Lösung (0,025M in Isopropanol) und Auffüllen mit 50proz. Äthanol ad 10,0 die Extinktionszunahme bei 414 nm in 1 cm-Küvetten (Abb. 5).

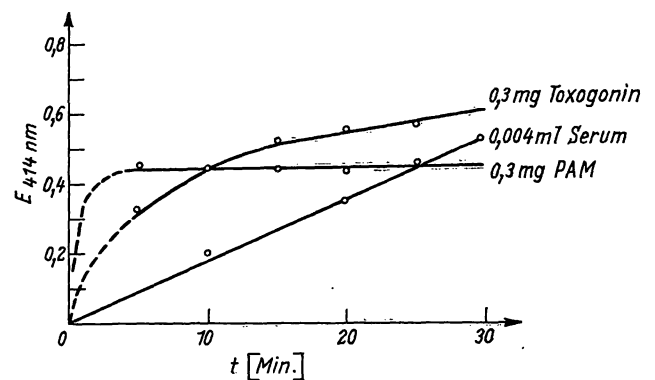


Abb. 5

Spaltung von *o*-Nitrophenylbutyrat durch Serum, 2-PAM und Toxogonin

Für *o*-Nitrophenylbutyrat wurde unter den genannten Bedingungen auch die Abhängigkeit der Substratspaltung von verschiedenen Oximmengen, nämlich 0,1; 0,3; 0,4 und 0,6 mg 2-PAM sowie 0,1; 0,2; 0,3 und 0,4 mg Toxogonin pro Ansatz, festgestellt (Abb. 6):

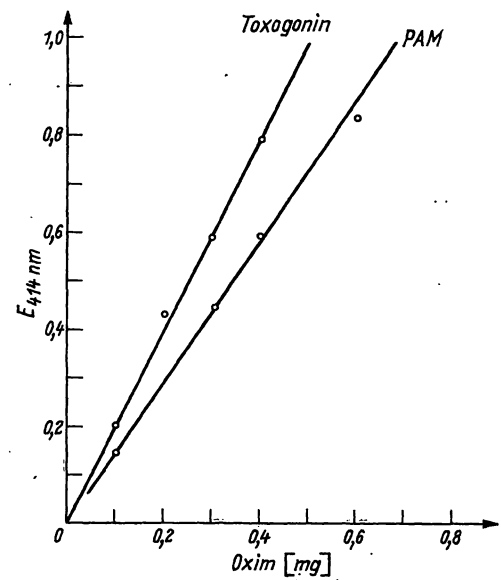


Abb. 6

Spaltung von *o*-Nitrophenylbutyrat durch verschiedene Oximmengen innerhalb von 30 Min.

**Indoxylacetat**

nach URIEL (12)

Reaktionsbedingungen:

5 mg Indoxylacetat wurden in 0,5 ml Aceton gelöst und sofort in 22 ml Veronalpuffer pH 8,2;  $\mu = 0,05$  gegeben.

Zu 2 ml Puffer-Aceton-Substratgemisch wurden zugesetzt:

- 0,1 ml Serum
- 0,1 mg PAM in 0,1 ml Veronalpuffer
- 0,1 mg Toxogonin in 0,1 ml Veronalpuffer.

Reaktionstemperatur: 22°

Gemessen wurde die Extinktionszunahme bei 667 nm in 1 cm-Küvetten (Abb. 7):

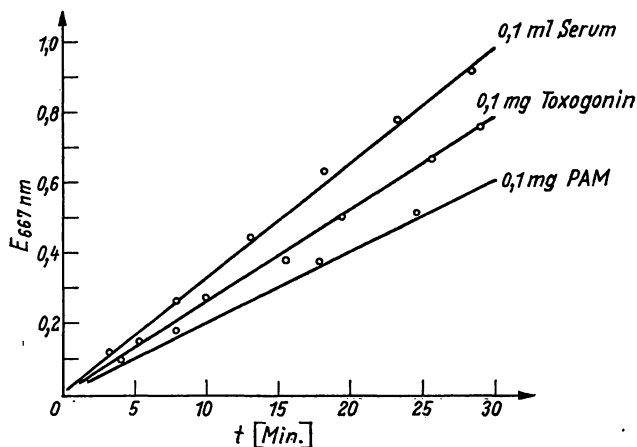


Abb. 7

Spaltung von Indoxylacetat durch Serum, 2-PAM und Toxogonin

**Phenylbenzoat:**

nach RIDER, MOELLER und DuBOIS (13).

Reaktionsbedingungen:

Phosphatpuffer: 5,35 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$  und 7 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  wurden in Wasser ad 1000 gelöst.

Phenylbenzoat-Stammlösung: 2 g Phenylbenzoat in 100 ml Methanol.

Puffer-Substratlösung: 500 ml Phosphatpuffer + 1 ml Phenylbenzoat-Stammlösung.

Zu 1 ml Puffer-Substratlösung wurden zugesetzt:

- 1 ml Serum
- 1 mg PAM in 1 ml Phosphatpuffer
- 1 mg Toxogonin in 1 ml Phosphatpuffer.

Reaktionstemperatur: 22°

Gemessen wurde die Extinktionszunahme bei 360 nm in 1 cm-Küvetten (Abb. 8):

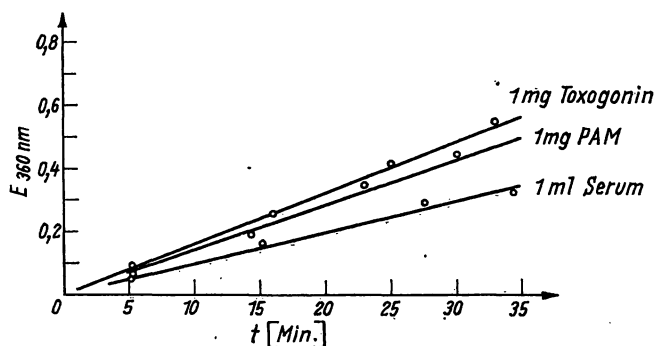


Abb. 8

Spaltung von Phenylbenzoat durch Serum, 2-PAM und Toxogonin

 **$\alpha$ -Naphthylacetat**Wir arbeiteten nach URIEL (12) unter Verwendung von  $\alpha$ -Naphthylacetat als Substrat und Echtblausalz B als Farbsalz.

Reaktionsbedingungen:

0,15M Phosphatpuffer: pH = 7,2.

5 mg  $\alpha$ -Naphthylacetat wurden in 0,5 ml Aceton gelöst und zusammen mit 1 mg Echtblausalz B in 25 ml Phosphatpuffer gegeben.

Zu 1 ml Puffer-Substrat-Farbsalzlösung wurden zugesetzt:

- 0,1 ml Serum + 0,9 ml Phosphatpuffer
- 1 mg PAM in 1 ml Phosphatpuffer
- 1 mg Toxogonin in 1 ml Phosphatpuffer.

Reaktionstemperatur: 22°

Messung der Extinktion in 1 cm-Küvetten.

In Ansatz a) mit Serum entwickelte sich bei der Inkubation ein gelbroter Farbton. Gemessen wurde die Extinktion im Absorptionsmaximum bei 515 nm.

In Ansatz b) mit PAM lag das Absorptionsmaximum bei 535 nm. Die Extinktionszunahme wurde hier verfolgt. Sie war bei 515 nm jeweils etwas geringer.

Ansatz c) mit Toxogonin entwickelte einen blauroten Farbton. Das Absorptionsmaximum, in dem die Extinktionszunahme verfolgt wurde, lag bei 689 nm. Daneben wird auch die sehr geringe Extinktionszunahme bei 515 nm angegeben (Abb. 9).

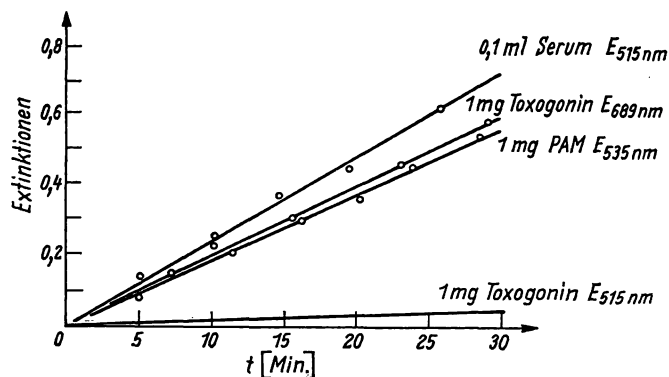


Abb. 9

Spaltung von  $\alpha$ -Naphthylacetat durch Serum, 2-PAM und Toxogonin**Acetylcholin:**nach FRIEDBERG und SAKAI (2) in der Warburg-Apparatur<sup>2)</sup>.

Reaktionsbedingungen:

Lösungsmittel und Verdünnungsflüssigkeit für Acetylcholinchlorid, Serum, PAM und Toxogonin:

10 Teile 0,9proz. NaCl-Lösung + 3 Teile 1,26proz.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung.Zur Einstellung eines pH-Wertes von etwa 7,73 (vgl. SÜLLMANN (14)) wurde 1/2 Std. mit einem Gasgemisch (5%  $\text{CO}_2$ , 95%  $\text{N}_2$ ) gesättigt.

Zu 1,5 ml einer 0,5proz. Acetylcholinchloridlösung wurden zugesetzt:

- 0,05 ml Serum + 0,45 ml Verdünnungsflüssigkeit
- 0,1 mg bzw. 2 mg PAM in 0,5 ml Verdünnungsflüssigkeit
- 0,1 mg bzw. 2 mg Toxogonin in 0,5 ml Verdünnungsflüssigkeit.

Reaktionstemperatur: 37°

Gemessen wurden  $\mu\text{l CO}_2/\text{Min.}$ ; Endablesung nach 60 Min. (Abb. 10).**Butyrylcholin**

Manometrische Bestimmung:

Reaktionsbedingungen wie bei Acetylcholin beschrieben, Butyrylcholinchlorid-Lösung 0,5proz., Serummenge pro Ansatz 0,02 ml.

Ergebnisse siehe Abbildung 11.

<sup>2)</sup> Wir danken der Firma Wacker, Burghausen, für die freundliche apparative Unterstützung.

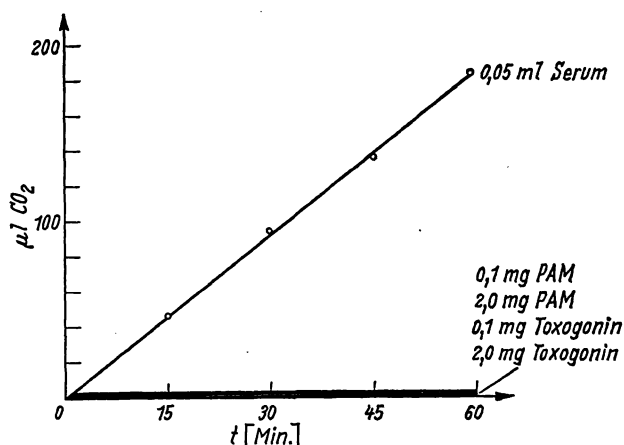


Abb. 10  
Reaktion von Acetylcholin mit Serum, 2-PAM und Toxogonin

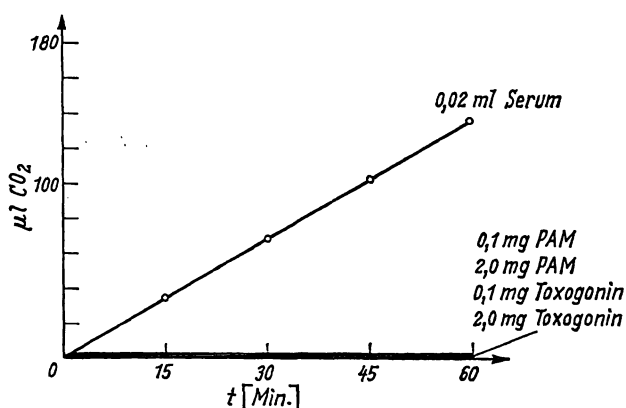


Abb. 11  
Reaktion von Butyrylcholin mit Serum, 2-PAM und Toxogonin

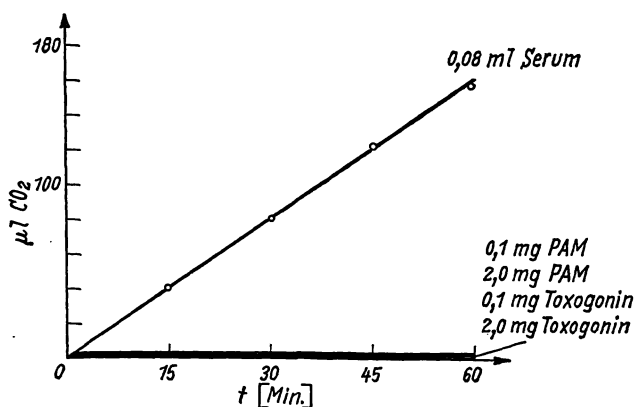


Abb. 12  
Reaktion von Benzoylcholin mit Serum, 2-PAM und Toxogonin  
(Manometrischer Test)

#### Benzoylcholin

##### Manometrische Bestimmung:

Reaktionsbedingungen wie bei Acetylcholin angegeben unter Verwendung einer 0,15proz. Benzoylcholinchloridlösung und 0,08 ml Serum pro Ansatz. Ergebnisse siehe Abbildung 12.

Der optische Test mit Messung der Extinktionsabnahme bei 240 nm (vgl. z. B. GOEDDE und ALTLAND (15)) ist schon in Gegenwart geringer PAM- und Toxogoninmengen nicht anwendbar, da beide Oxime bei 240 nm stark absorbieren.

#### Diskussion

Unsere Versuchsergebnisse haben zunächst diejenigen von BERGNER und O'NEILL (5), GELDMACHER-v. MALLINCKRODT und KAISER (7), HEITMANN und FELGEN-

HAUER (1) sowie NENNER und ERDMANN (4) bestätigt, wonach Acetylthiocholin, Butyrylthiocholin, *o*-Nitrophenylbutyrat und  $\alpha$ -Naphthylacetat durch Oxime wie 2-PAM bzw. Toxogonin gespalten werden. Wir konnten weiter zeigen, daß auch Indoxylacetat und Phenylbenzoat in der gleichen Weise reagieren. Die Versuche wurden unter den von den einzelnen Autoren für die Substratspaltung durch Cholinesterase angegebenen Bedingungen durchgeführt. Die Oxime wurden den Ansätzen in Mengen zugesetzt, die etwa gleichen Umsatz ergaben wie die jeweils eingesetzte Serummenge. Eine Beziehung derart, daß eine bestimmte Oximmenge für alle Substrate den gleichen Umsatz ergab wie eine entsprechende Serummenge, ließ sich nicht ableiten.

Ergänzende, hier nicht im einzelnen wiedergegebene Versuche wurden auch mit E 600-vergiftetem Serum durchgeführt. Erfolgte die E 600-Zugabe so, daß eine Restaktivität von 10–20% verblieb, und wurde 8 Stdn. nach der Hemmstoffzugabe die Aktivität sowohl allein als auch nach Zusatz verschiedener 2-PAM- und Toxogoninmengen gemessen, so ergab sich eine Substratspaltung, die über der durch 2-PAM bzw. Toxogonin allein zu erreichenden lag, jedoch niedriger als die Summe der zu erwartenden Spaltung durch das Oxim und die verbliebene Restaktivität des Serums war. Es überlagern sich offenbar die reine Oximwirkung, die Hemmwirkung des Oxims auf die Cholinesterase und die einsetzende Reaktivierung des vergifteten Enzyms durch das Oxim.

Acetylcholin, Butyrylcholin und Benzoylcholin waren durch 2-PAM und Toxogonin in der genannten sowie in 20fach höherer Konzentration, wie sie z. B. von FRIEDBERG und SAKAI zur in vitro-Reaktivierung alkylphosphatvergifteter Cholinesterasen empfohlen werden, nicht spaltbar.

Damit bestätigte sich für die untersuchten Substrate die von GELDMACHER-v. MALLINCKRODT und KAISER (7) geäußerte Vermutung, daß nur echte Ester gegen Oxime stabil sind, während Substrate mit Säureanhydridcharakter, wie mehrfach für Oxim-ähnliche Verbindungen auch von anderen Autoren beobachtet (Literatur s. bei O'BRIEN (16)), gespalten werden.

Wie schon HEITMANN und FELGENHAUER (1) zeigten, erfolgt diese Spaltung im allgemeinen zunächst in linearer Abhängigkeit von der Zeit. Nur im Fall des *o*-Nitrophenylbutyrat ist relativ rasch ein weitgehend stöchiometrischer Umsatz sowohl für 2-PAM (GELDMACHER-v. MALLINCKRODT und KAISER (7)) als auch Toxogonin (NEHLS (17)) festzustellen.

Die Substratspaltung durch die beiden Oxime verläuft, wie wir für Acetylthiocholin, Butyrylthiocholin und *o*-Nitrophenylbutyrat prüften, in dem untersuchten Bereich weitgehend in linearer Abhängigkeit von der Oximmenge. Dies zeigten auch NENNER und ERDMANN (4) für Acetylthiocholin und Toxogonin.

Um die Frage zu beantworten, inwieweit die untersuchten, mit Oximen reagierenden Substrate für die Kontrolle einer in vivo-Reaktivierung der Serumcholinesterasen nach therapeutischen Gaben von

Tab. 1

Autor	Substrat	Reaktionsansatz		Bei maximaler Blutkonz. in den Ansatz gebracht nach Gabe von	
		zugesezte Serummenge	Endvolumen	Toxogonin 250 mg i. v.	2-PAM 500 mg i. v.
MAIN, MILES, BRAID (11) KNEDEL und BÖTTGER (9) WEBER (10)	<i>o</i> -Nitrophenylbutyrat	0,004 ml	6 ml	0,2 µg	0,4 µg
	Butyrylthiocholin	0,01 ml	2 ml	0,5 µg	1,0 µg
	Acetylthiocholin	0,02 ml	2 ml	1,0 µg	2,0 µg

2-PAM und Toxogonin geeignet sind, müssen die im Reaktionsansatz enthaltene Serummenge und die Oximkonzentration im Serum berücksichtigt werden. Die Therapie mit 2-PAM und Toxogonin erfolgt im allgemeinen durch i.v.-Injektion. Würde unmittelbar darauf Blut entnommen, so wäre bei Gabe von 500 mg 2-PAM bzw. 250 mg Toxogonin mit einer maximalen Serumkonzentration von 100 µg/ml für 2-PAM bzw. 50 µg/ml für Toxogonin zu rechnen. Mit zunehmendem Abstand zwischen einmaliger Injektion und Blutentnahme nimmt diese Konzentration entsprechend der Halbwertszeit der Oxime im Blut (etwa 2 Std. für 2-PAM-jodid nach KONDRITZER und Mitarbeiter (18) sowie für Toxogonin nach ERDMANN, BOSSE und FRANKE (19)) ab.

CALESNICK und Mitarbeiter (20) fanden 30 Min. nach i.v.-Injektion von 45 mg 2-PAM-Cl/kg beim Menschen einen Blutspiegel von 29,3 µg/ml.

Legt man diese Werte zugrunde, so können bei Bestimmung der Serum-Cholinesterase-Aktivität mit den wichtigsten der genannten Verfahren dem Reaktionsansatz nach einmaliger Injektion der üblichen therapeutischen Dosis durch die eingesetzte Serummenge maximal 2-PAM und Toxogonin entsprechend der Tabelle 1 zugeführt sein.

Die in den einzelnen Reaktionsansätzen enthaltenen Oximmengen betragen demnach höchstens 1/50 der von uns zur Prüfung eingesetzten Mengen. Sie bedingen damit eine Substratspaltung, die höchstens den entsprechenden Anteil der durch normales Serum verursachten Substratspaltung ausmacht. Daraus ergibt sich, daß bei Entnahme von Serum nach einmaligen therapeutischen 2-PAM- und Toxogoninabgaben in der angegebenen Dosierung zur Prüfung auf eine eingetretene Reaktivierung der Serum-Cholinesterasen mit den drei eben genannten

Verfahren keine erhebliche Verfälschung des Befundes eintritt. Nur mehrfache, relativ kurz hintereinander erfolgende Oxim-Injektionen könnten auf Grund eines durch Kumulierung höheren Blut-Oximspiegels zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Bei anderen Verfahren die mit größeren Serumengen arbeiten, ist die Fehlermöglichkeit entsprechend größer.

Für Reaktivierungsversuche in vitro, für welche 2-PAM-Konzentrationen im Bereich von 10<sup>-3</sup> molar empfohlen werden (FRIEDBERG und SAKAI (2)), können dagegen als Substrate bisher nur echte Ester wie Acetylcholin, Butyrylcholin und Benzoylcholin als brauchbar angesehen werden.

Bei der Beurteilung der erhobenen Befunde ist daran zu denken, daß der fehlende Einfluß einer Oximtherapie oder eines Oximzusatzes in vitro auf alkylphosphatvergiftete Serumcholinesterasen nicht unbedingt einen therapeutischen Effekt ausschließen muß, da für die Giftwirkung von Alkylphosphaten auf den Organismus die Hemmung der Organ-Cholinesterasen ausschlaggebend sein dürfte, die ein anderes Verhalten als das Serumenzym zeigen können.

Zieht man aus diesem Grunde, wie von NENNER und ERDMANN (4) angeregt, zur Verlaufskontrolle die Aktivität der Acetylcholinesterase der Erythrocyten mit heran, so gelten auch hier für die Substratauswahl die genannten Gesichtspunkte. Entsprechendes ist bei histochemischen Untersuchungen zu berücksichtigen.

Die Arbeit wurde mit Hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt, wofür wir auch an dieser Stelle unseren besten Dank aussprechen.

Die Präparate 2-PAM-Jodid und Toxogonin wurden uns lebenswürdigerweise von Herrn Dr. LORKE, Leiter des Instituts für Toxikologie der Farbenfabriken Bayer AG, zur Verfügung gestellt, wofür wir herzlich danken.

### Literatur

1. HEITMANN, R. und K. FÉLGENHAUER, Dtsch. Med. Wschr. 94, 224 (1969). — 2. FRIEDBERG, K. D. und F. SAKAI, Dtsch. Zschr. gerichtl. Med. 47, 580 (1958). — 3. AMMON, H., Pflügers Arch. Physiol. 233, 486 (1934). — 4. NENNER, M. und W. D. ERDMANN, Dtsch. Med. Wschr. 94, 504 (1969). — 5. BERGNER, A. D., und J. J. O'NEILL, J. Histochem. Cytochem. 6, 72 (1958). — 6. HEILBRONN, E., Acta Chem. Scand. 13, 1547 (1959). — 7. GELDMACHER-v. MALLINCKRODT, M. und I. KAISER, diese Z. 6, 141 (1968). — 8. SUCKER, H., Enzymatische Methoden, in: Gadamer's Lehrbuch der chemischen Toxikologie und Anleitung zur Ausmittelung der Gifte, Bd. II, Hrsg. E. GRAF und FR. R. PREUSS. Van den Hoek und Rupprecht, Göttingen (1966). — 9. KNEDEL, M. und R. BÖTTGER, Klin. Wschr. 45, 325 (1967). — 10. WEBER, H., Dtsch. Med. Wschr. 91, 1927 (1966). — 11. MAIN, A. R., K. E. MILES und P. E. BRAID, Biochem. J. 78, 769 (1961). — 12. URIEL, J., Ann. Inst. Pasteur 101, 104 (1961). — 13. RIDER, J. A., H. C. MOELLER, und K. P. DuBois, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 76,

427 (1951). — 14. SÜLLMANN, H., Manometrische Methoden zur Untersuchung des Gewebsstoffwechsels. in: Handbuch der Physiologisch-Pathologisch-Chemischen Analyse, Hrsg. K. Lang und E. Lehnartz, Bd. VI/A Enzyme, Teil A Springer, Berlin, Heidelberg (1964). — 15. GOEDDE, H. W. und ALTLAND, K., Arbeitsvorschriften. in: GOEDDE, H. W., DOENICKE, A. und ALTLAND, K., Pseudocholinesterasen. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1967). — 16. O'BRIEN, R. D., Toxic phosphorus esters. Academic Press New York und London (1960). — 17. NEHLS, M., Dissertation Erlangen, in Vorbereitung. — 18. KONDRITZER, A. A., P. ZVIRBLIS, A. GOODMAN und S. H. PAPLANUS, J. Pharm. Sci. 57, 1142 (1968). — 19. ERDMANN, W. D., I. BOSSE und P. FRANKE, Dtsch. Med. Wschr. 90, 1436, (1965). — 20. CALESNICK, B., J. A. CHRISTENSEN, und M. RICHTER, Arch. Environ. Health 15, 599 (1967).

Priv.-Doz. Dr. Dr. Marika Geldmacher-von Mallinckrodt  
8520 Erlangen, Universitätsstraße 22