

CCA-492

547.963.4:535.37:547.751

*Originaler wissenschaftlicher Beitrag*

## Die Wirkung des Hämins und Methämoglobins auf die Oxydationsreaktion des Indols

Z. Skurić und K. Weber

*Medizinische Fakultät der Universität, Schule für öffentliches Gesundheitswesen  
»Andrija Stampar« und Institut für gerichtliche Medizin, Zagreb, Kroatien,  
Jugoslawien*

Eingegangen am 16. Dezember 1967.

Es wurde festgestellt, dass Chlorhämmin, sowie auch Methämoglobin in kleinen Konzentrationen die Oxydation des Indols durch Natriumperborat in Lösungen wesentlich beschleunigen. Diese Wirkungen wurden durch photoelektrische Messungen der Fluoreszenzintensität der Reaktionslösungen während des Reaktionsverlaufes kinetisch untersucht. Die Methoden der Kinetik enzymatisch katalysierter Reaktionen sind auf diese Modellsysteme gut anwendbar. Aceton inhibiert die Indoloxydation bei Anwesenheit der genannten Aktivatoren (Katalysatoren). Es wurde versucht die festgestellten Erscheinungen reaktionskinetisch zu deuten.

Es ist bekannt, dass Ester der Phosphorsäure und Thiophosphorsäure (Nervengifte und Insektizide) aktivierend auf die Oxydationsreaktion des Indols in Anwesenheit eines Sauerstoff-Donators (Wasserstoffperoxyd, Natriumperborat) wirken<sup>1-3</sup>. Auf Grund dieser Reaktionsbeschleunigung wurden analytische Methoden zur quantitativen Bestimmung der genannten Organophosphorverbindungen entwickelt<sup>4,5</sup>, die auf photoelektrischen Messungen der Fluoreszenzintensität der Zwischenprodukte der Oxydation (Indoxyl und Indigweiss) aufgebaut sind. Die Aktivierung der Oxydationsreaktion entspricht nach ihrem Mechanismus offenbar einer Sauerstoffübertragung, einer Art von Peroxydasewirkung, die formell-kinetisch den bekannten Gesetzmässigkeiten enzymatischer Reaktionen folgt<sup>2</sup>. Da Hämin und Methämoglobin (Hämoglobin) gleichfalls Peroxydasewirkungen auszuüben vermögen<sup>6</sup>, war es von Interesse festzustellen ob diese Eisen(III)-Komplexe auch die Oxydationsreaktion des Indols aktivieren können und ob dabei gleichfalls die Gesetze der biochemischen Kinetik befolgt werden.

### *Die Versuchsmethode*

Die Versuche wurden nach der Methode durchgeführt die in einer früheren Arbeit beschrieben ist<sup>2</sup>. Auch die Reaktionsgemische waren im Prinzip gleich zusammengesetzt und die fertigen Reaktionslösungen enthielten bei den Versuchen mit Hämin: 0,1% Natriumperborat (0,0065 M  $\text{NaBO}_3 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ), 0,008% ( $6,83 \cdot 10^{-5}$  M) Indol, 10% Isopropylalkohol (als Lösungsmittel für das Indol) und die Aktivatorlösung (Chlorhämmin in 0,05 M Natriumcarbonatlösung). Bei den Versuchen mit Methämoglobin war die Konzentration der Perboratlösung zweimal höher (0,2%) und als Lösungsmittel für diesen Aktivator diente reines Wasser. Das sind die optimalen Reaktionsgemische bezüglich der einzelnen Komponenten. Das Gesamtvolumen der wässrig-alkoholischen Versuchslösungen war immer 50 ml.

Das verwendete kristallinische Chlorhämין wurde nach dem bekannten Verfahren von Schalfjew aus Rinderblut gewonnen. Das Methämoglobin in Lamellen war ein Merck-Präparat und die anderen Chemikalien *p. a.* Präparate.

Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden durch Messung der Intensität der Fluoreszenz der Oxydationsprodukte des Indols in Abhängigkeit von der Reaktionszeit bestimmt. Als geeignetste kinetische Grösse wurde, wie üblich, die Anfangsgeschwindigkeit (Initialgeschwindigkeit,  $v_0$ ) verwendet, die beim Anlegen der Tangente an den Anfang der Intensität-Zeitkurve der Fluoreszenz und Ablesen ihres Wertes für die Reaktionszeit von 10 Sekunden erhalten wurde.

### Die Versuchsergebnisse

Für eine Reihe von Versuchen sind in der Abbildung 1. die erhaltenen Werte der Fluoreszenzintensität ( $\Phi$ ) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit

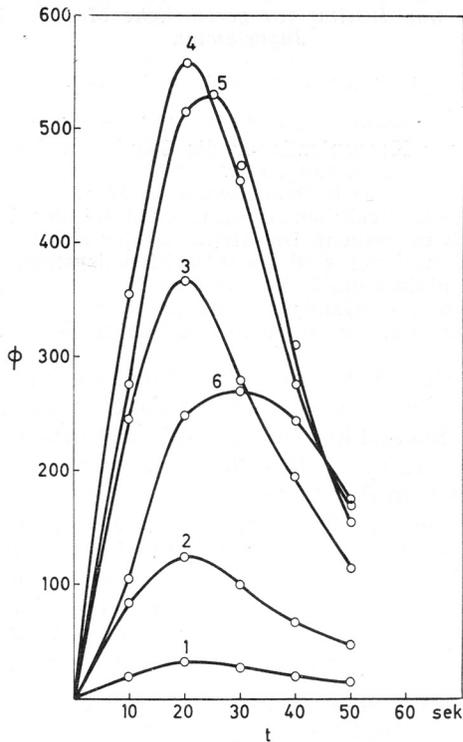


Abb. 1. Intensität-Zeitkurven für verschiedene Chlorhäminkonzentration: 1  $2 \cdot 10^{-8}M$ , 2  $1,2 \cdot 10^{-7}M$ , 3  $8 \cdot 10^{-7}M$ , 5  $2 \cdot 10^{-6}M$ , 5  $1 \cdot 10^{-5}M$ , 6  $2 \cdot 10^{-5}M$ .  $\phi$  Intensität der Fluoreszenz (relative Einheiten),  $t$  Reaktionszeit (Sekunden)

(t) für verschiedene Konzentrationen des Chlorhämins graphisch dargestellt (Intensität-Zeitkurven). Wie ersichtlich nehmen die Intensitätswerte im Verlauf der Reaktion zunächst zu (Bildung von Indoxyl und Indigweiss), fallen dann aber ziemlich rasch durch die weitere Oxydation dieser Produkte (Bildung des fluoreszenzunfähigen Indigo) wieder ab. An den Intensität-Zeitkurven wurde — wie beschrieben — für jeden Reaktionsverlauf die Anfangsgeschwindigkeit bestimmt. Die Abbildung 2. zeigt diese als Funktion der Aktivatorkonzentration (c) für Chlorhämין (Kurve 1) und Methämoglobin (Kurve 2). Es

ist ersichtlich, dass nur für kleine Konzentrationen der Aktivatoren eine angenähert lineare Abhängigkeit anzunehmen ist und nur dieser Konzentrationsbereich eignet sich für weitere kinetische Bearbeitung. Bei zu grossen Aktivatorkonzentrationen stört sicher die Oxydation der primären Reaktionsprodukte, besonders auch deshalb, weil die Lösungen des Indigo eine intensive Farbe aufweisen.

In den nächsten Versuchsreihen wurden nun für drei verschiedene Konzentrationen des Chlorhämins, sowie auch des Methämoglobins, die Anfangsge-

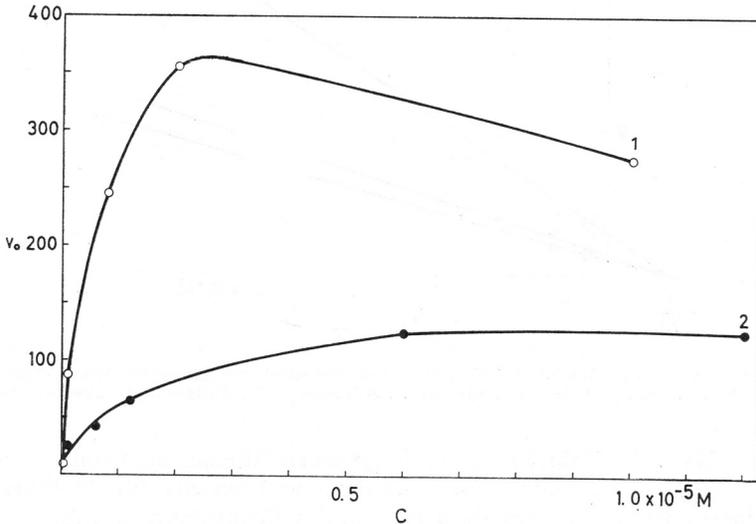


Abb. 2. Anfangsgeschwindigkeit ( $v_0$ ) der Reaktion als Funktion der Aktivatorkonzentration ( $c$ ). 1 für Chlorhämmin, 2 für Methämoglobin

schwindigkeiten für zunehmende Anfangskonzentrationen des Indols ( $s$ ) bestimmt. Betrachtet man diese Reaktion als Modell der Peroxydasewirkung, so kommt dem Chlorhämmin, bzw. dem Methämoglobin die Rolle des Enzyms und dem Indol die des Substrates zu. In diesem Sinne wurden in den Abbildungen 3. und 4. für je drei »Enzym«-Konzentrationen die reziproken Werte der Anfangsgeschwindigkeiten ( $1/v_0$ ) als Funktion der reziproken Substratkonzentration ( $1/s$ ) dargestellt. Diese Darstellung, nach dem Vorgang von H. Lineweaver und D. Burk<sup>8</sup>, sowie M. Dixon<sup>9</sup>, ermöglicht es graphisch die Michaeliskonstante ( $K_s$ ) der betreffenden Reaktion zu ermitteln. Es wurden die Werte der Tabelle I erhalten.

TABELLE I  
Werte der Michaeliskonstante

Für die Aktivierung mit	$K_s \cdot 10^5$
Chlorhämmin	2,8
Methämoglobin	1,2

Weiterhin wurden aus den Sättigungskurven die maximalen Geschwindigkeiten ( $V_m$ , Sättigungsgeschwindigkeit) ermittelt, wobei sich für die einzelnen »Enzym«-Konzentrationen die Werte der Tabelle II ergaben. Es ist

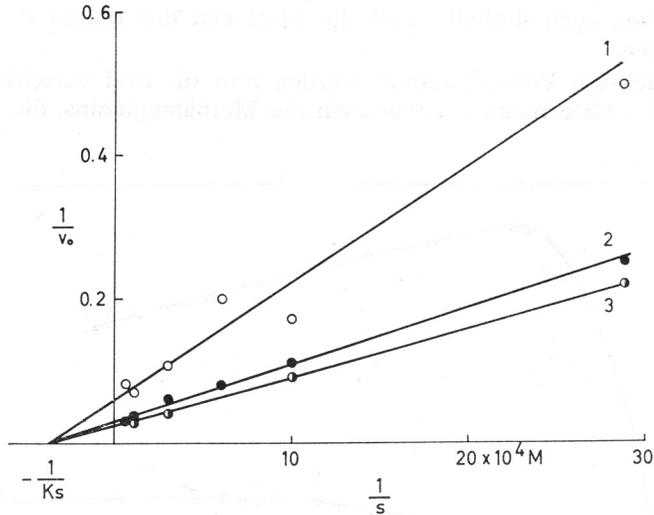


Abb. 3. Bestimmung der Michaeliskonstante ( $K_s$ ) für drei verschiedene Konzentrationen des Chlorhämoglobins: 1  $2 \cdot 10^{-7} M$ , 2  $6 \cdot 10^{-7} M$  und 3  $8 \cdot 10^{-7} M$ ,  $v_0$  Anfangsgeschwindigkeit,  $s$  Substratkonzentration

ersichtlich dass für Chlorhämoglobin eine grössere Michaeliskonstante und auch grössere Sättigungskonzentrationen erhalten wurden als für Methämoglobin. Diese Tatsache ist wichtig für die Deutung des Reaktionsverlaufes.

Es ist bekannt, dass die Katalyse der Oxydationsreaktion des Indols durch Phosphorsäure-Ester nur bei Anwesenheit von Aceton nennenswert zum Aus-

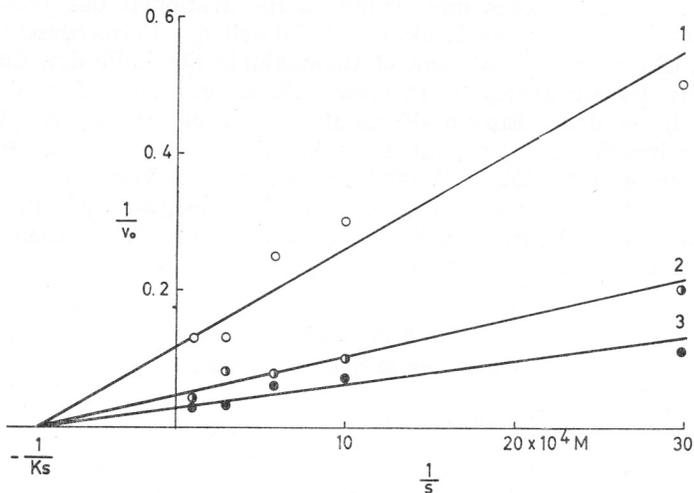


Abb. 4. Bestimmung der Michaeliskonstante ( $K_s$ ) für drei verschiedene Konzentrationen des Methämoglobins: 1  $2 \cdot 10^{-7} M$ , 2  $6 \cdot 10^{-7} M$  und 3  $8 \cdot 10^{-7} M$ ,  $v_0$  Anfangsgeschwindigkeit,  $s$  Substratkonzentration

TABELLE II  
Sättigungsgeschwindigkeiten

Chlorhämिन $M \cdot 10^7$	$V_m$	Methämoglobin $M \cdot 10^7$	$V_m$
2	16	1,2	8
6	32	6	22
8	42	12	34

druck kommt<sup>2</sup>. Es war deshalb wichtig auch den Einfluss des Acetons auf die Aktivierung der Indoloxydation durch Chlorhämिन und Methämoglobin zu untersuchen. Die entsprechenden Versuche ergaben, dass Aceton die Reaktionsaktivierung durch diese »Enzyme« keineswegs erhöht, sondern im Gegenteil inhibiert. Die Abbildung 5. zeigt einige Intensität-Zeitkurven die bei Abwesenheit (Kurve 1), bzw. bei Anwesenheit von Aceton in verschiedenen Konzentrationen (Kurve 2—5) erhalten wurden. Die Reaktionen die der Abbildung 5. zugrunde liegen wurden durch Chlorhämिन aktiviert und bei der Aktivierung mit Methämoglobin wurde eine prinzipiell gleiche Inhibierung durch Aceton festgestellt. Trägt man die Anfangsgeschwindigkeiten solcher Reaktionen als

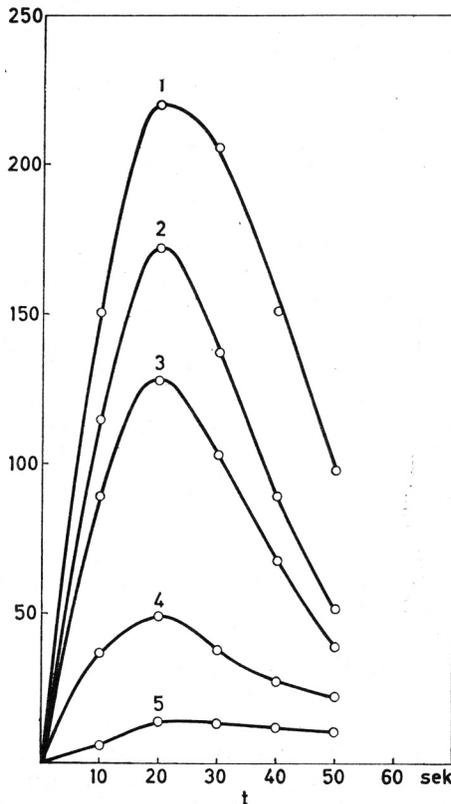
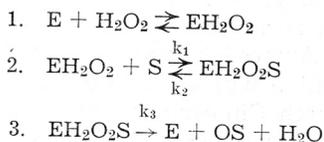


Abb. 5. Intensität-Zeitkurven bei Anwesenheit von Aceton: 1 ohne Aceton, 2  $2,75 \cdot 10^{-2} M$ , 3  $5,55 \cdot 10^{-2} M$ , 4  $13,8 \cdot 10^{-2} M$  und 5  $27,5 \cdot 10^{-2} M$  Aceton. Aktivierung durch Chlorhämिन

Funktion der Acetonkonzentration graphisch auf, so ist ihre Abnahme nach etwa einem exponentiellen Gesetz festzustellen. Es ist aber wichtig, dass es sich bei dieser Inhibition um verhältnismässig grosse Acetonkonzentrationen handelt.

### Besprechung der Versuche

Es kann zunächst festgestellt werden, dass die Gesetzmässigkeiten der Kinetik enzymatisch katalysierter Reaktionen auf die hier untersuchte Katalyse der Oxydation des Indols angewandt werden können. Bezeichnet man die »Enzyme« (Chlorhämין und Methämoglobin) mit E, das Indol (Substrat) mit S, die Oxydationsprodukte des Indols (Indoxyl und Indigweiss) mit OS und berücksichtigt, dass das Natriumperborat eigentlich eine alkalische Form von Wasserstoffperoxyd ist, so ergeben sich folgende Einzelprozesse der Reaktion:



Die Michaeliskonstante wird durch das Gleichgewicht 2, das zum aktiven Komplex  $EH_2O_2S$  der Reaktion führt, bedingt:  $K_s = k_2/k_1$ . Es wurde die Michaeliskonstante mit  $K_s$  und nicht mit  $K_m$  bezeichnet, da anzunehmen ist, dass in diesem Falle  $K_s = K_m$  ist, die Michaeliskonstante also die Dissotiationskonstante des aktiven Komplexes darstellt. Das Gleichgewicht 2 würde sich dann sehr rasch einstellen und die Reaktion 3 mit wesentlich kleinerer Geschwindigkeit verlaufen. Dem Gleichgewicht 2 ist das Gleichgewicht 1, das zur Bildung des »Enzym«-Peroxyds  $EH_2O_2$  führt, vorgelagert. Die Sättigungsgeschwindigkeit ist von der Reaktion 3 abhängig:  $V_m = k_3 [EH_2O_2]$ .

Wenn man nun annimmt, dass Chlorhämין mit dem Wasserstoffperoxyd und mit dem Indol in quantitativer Beziehung in anderem Ausmass Komplexe bildet als das Methämoglobin, so ist klar, dass auch die Michaeliskonstanten verschiedene Werte haben können. Die kleinere Konstante für die Katalyse mit Methämoglobin entspricht einer grösseren Bildungsgeschwindigkeit von  $EH_2O_2S$  und wenn die Sättigungsgeschwindigkeiten gleich wären, so müsste das einer intensiveren Aktivierung der Gesamtreaktion entsprechen. Die Sättigungsgeschwindigkeiten sind aber bei Anwesenheit von Methämoglobin kleiner und damit ergibt sich gemäss der Beziehung:

$$v_0 = \frac{V_m \cdot [S]}{K_s + [S]}$$

schliesslich allgemein eine kleinere Geschwindigkeit für die Reaktion die durch Methämoglobin aktiviert wird.

In diesem Zusammenhang ist auch zu beachten, dass sich die hier untersuchten Reaktionen in alkalischen Lösungen ( $pH = 10$ ) abspielen. In solchen Lösungen wird aber das Methämoglobin sehr rasch in Hämatin und denaturiertes Globin gespalten<sup>10</sup> und das Chlorhämין bildet natürlich auch Hämatin. So wäre also in beiden Fällen der Aktivierung eigentlich das Hämatin als Katalysator der Indoloxydation zu betrachten und die Reaktionsgeschwindigkeiten sollten deshalb — bei sonst gleichen Versuchsbedingungen — gleich sein. Da dies jedoch nicht der Fall ist kann man auch folgern, dass das Globin

(denaturierte Globin) die Oxydationsreaktion, bzw. die Aktivierung derselben durch Hämatin, in gewissem Masse inhibiert. Dies könnte etwa durch Bildung eines Hämichroms, einer Verbindung des Hämatins mit dem denaturierten Globin, vor sich gehen.

Die hier beschriebene Arbeitsmethode könnte für die Erforschung der katalytischen Fähigkeiten der verschiedenen Blutarten, bzw. Hämoglobin-typen, herangezogen werden.

## LITERATUR

1. B. Gehauf und J. Goldenson, *Anal. Chem.* **29** (1957) 276.
2. Z. Skurić und K. Weber, *Croat. Chem. Acta* **38** (1966) 23.
3. B. Uhlik und K. Weber, *Arh. hig. rada* **16** (1965) 329.
4. D. N. Kramer und R. M. Gamson, *Anal. Chem.* **29** (1957) 21 A.
5. K. Weber, *Arh. hig. rada* **12** (1961) 169.
6. Vergl. z.B. B. C. Saunders, A. G. Holmes-Siedle und B. Stark, *Peroxydase*, Butterworths-London 1964, S. 174; G. Schwab und F. Rost, Fermentmodelle, im *Handbuch der Katalyse*, III. Bd. *Biokatalyse*, Springer — Wien 1941, S. 573.
7. Vergl. L. Lumper, Grundlagen der Kinetik enzymatisch katalysierter Reaktionen, Hoppe-Seyler/Thierfelder: *Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse*, II. Aufl. VI Bd. Teil A, S. 18.
8. H. Lineweaver und D. Burk, *J. Am. Chem. Soc.* **56** (1934) 658.
9. M. Dixon, *Biochem. J.* **55** (1953) 170.
10. H. F. Holden, *Austr. J. exper. Biol. Med. Sci.* **25** (1947) 47.

## IZVOD

## Djelovanje hemina i methemoglobina na oksidacionu reakciju indola

Z. Skurić i K. Weber

Ustanovljeno je da klorhemin kao i methemoglobin u malenim koncentracijama znatno pospješuju oksidaciju indola u otopinama utjecajem natrijeva perborata. Ovi utjecaji ispitivani su kinetički fotoelektričnim mjerenjima intenziteta fluorescencije reakcionih otopina za vrijeme toka reakcije. Metode kinetike enzimatski kataliziranih reakcija mogu se dobro primijeniti na ove modelne sisteme. Aceton inhibira oksidaciju indola u prisutnosti navedenih aktivatora (katalizatora). Pokušano je kinetičko tumačenje dobivenih rezultata.

ŠKOLA NARODNOG ZDRAVLJA »ANDRIJA STAMPAR«

ZAVOD ZA SUDSKU MEDICINU  
MEDICINSKI FAKULTET  
SVEUČILISTA U ZAGREBU

Primljeno 16. prosinca 1967.