

Über die Bindung von Blei an eisenhydroxid-haltige Stoffe in Leber, Niere und Milz vergifteter Rinder.

VON HARALD A. RÜSSEL

*Chemisches Institut der Tierärztlichen Hochschule
Hannover, Germany*

Summary

Lead in liver, spleen and kidney of poisoned cattle is bound to substances containing ferric hydroxide. In liver and kidney the smaller amount of lead is sorbed by ferritin, the greater amount by insoluble ferric hydroxide. In the spleen ferritin and insoluble ferric hydroxide contain approximately the same amount of lead. The insoluble ferric hydroxide particles could be concentrated by digestion of insoluble liver proteins with phenol. They were not identical with hemosiderin. The sorption of lead ions and of other metal ions to ferritin and ferric hydroxide was investigated in vitro. Lead sorption is preferred over the sorption of other metal ions. Reaction of metal ions with the protein shell of ferritin occurred only with copper ions. The sorbed metal ions could be split from ferritin by high concentrations of other metal ions and strongly by hydrogen ions. It seems, that lead binding disturbs the storage of iron in tissues in lead poisoning.

Es ist seit langem bekannt, daß das Blei sich in der Leber speichert. In der veterinärmedizinischen Toxikologie verwendet man die Bestimmung des Leberbleigehaltes zur Sicherung der Diagnose Bleivergiftung. Bei akuten Vergiftungen finden sich auch in der Niere sehr hohe Bleigehalte, während bei chronischen Vergiftungen der Gehalt in der Leber ausgeprägter ist. Der Bleieinwirkung auf die Leber ist bisher wenig Aufmerksamkeit gewidmet worden, obwohl Leberdegenerationen für die Bleivergiftungen typisch sind (1).

Während der Einbau von Blei in die Knochen und die Einwirkung auf die Blutfarbstoffbildung intensiv untersucht wurden (2), sind bisher Angaben über die Bleibindung an innere Organe spärlich. Der Bleigehalt der Leber konnte durch EDTA oder BAL bei Ratten nicht verändert werden (3). An Kaninchen verabreichte, sehr geringe Mengen an ^{210}Pb fanden sich vorwiegend in den

Mitochondrien der Leber (4), es wurde allerdings nicht versucht, die chemische Bindung des Bleis aufzuklären. Deshalb erschien es von Interesse, die Bindung des Bleis an die Inhaltsstoffe von Leber, Niere und Milz zu untersuchen.

Methodik

Die Organe stammten zum größten Teil von verendeten oder notgeschlachteten Rindern aus der Eifel. Die Tiere waren einer dauernden Bleizufuhr ausgesetzt. Das Material wurde in Kühlgefäßen als Expressgut versandt. Wenn es nicht sofort weiterverarbeitet werden konnte, wurde es tiefgefroren. Zum Homogenisieren der Organe benutzte man den Ultra-Turrax (Janke & Kunkel, Stauffen), eine Eisenabgabe an das verarbeitete Material war dabei nicht feststellbar. In keinem Fall wurde den Organen nachträglich Blei oder Eisen zugesetzt.

Sämtliche bei den Versuchen benutzten Geräte, Lösungen und Reagentien wurden nach den Regeln der Spurenanalyse (5) auf einen Blei- oder Eisengehalt geprüft. Während die Eisengehalte meist vernachlässigt werden konnten, mußten die meisten Lösungen mit Dithizon von Blei befreit werden. Bleiarme Salzsäure wurde durch Einleiten von Chlorwasserstoffgas in zweimal destilliertes Wasser hergestellt.

Die Eisenbestimmungen erfolgten nach der Vorschrift von Kaldor (6), wobei durch Erhitzen mit Salzsäure nur das Nichthämineisen erfaßt wird. Aus diesen salzsauren Lösungen wurde das Blei durch Amalgamvoltammetrie in Anlehnung an Specker und Trüb (7) bestimmt.

Die unlöslichen Leberanteile für die Auslaugungsversuche mit Salzsäure und Phenol wurden durch Homogenisieren, Vermischen mit der fünffachen Menge 0,9 proz. Natriumchloridlösung, Zentrifugieren und Wiederholung dieses Vorganges erhalten. Dabei wurden kleinere Mengen an Trübstoffen, die bei 600 g nicht sedimentieren, verworfen. Das Sediment enthielt z. B. 16 % Trockenmasse und 5 ppm Blei und 200 ppm Eisen. Für die Auslaugungsversuche mit Salzsäure benutzte man 5 g des Sediments und 10 ml Salzsäure. Zur Herstellung einer phenolischen Lösung setzte man solange wasserfreies Phenol zu, bis das im Sediment enthaltene Wasser vom Phenol aufgenommen war, zentrifugierte bei 600 g ab, zog den Rückstand nochmals mit 90 proz. Phenol aus und führte mit den vereinigten Phenollösungen die Sedimentationsversuche aus.

Die Untersuchung der löslichen, bleihaltigen Verbindungen erfolgte durch Ausziehen von 50 g Leberhomogenat mit 150 ml 0,1 M Natriumacetatlösung. Nach Abzentrifugieren wurde die Lösung auf 80° C erhitzt, gekühlt und zentrifugiert. Im Überstand fällte man das Ferritin mit

Aceton. Von allen Fraktionen wurden Proben zur Analyse entnommen, die Verluste wurden rechnerisch eliminiert.

Ein in ähnlicher Weise erzeugter Milzauszug wurde ohne Erhitzen durch Gelchromatographie getrennt. 10 ml des Auszugs wurden auf eine Säule mit 85 cm Packungslänge und 2,5 cm Durchmesser mit bleifrei gewaschener Sepharose 4 B (Deutsche Pharmacia, Frankfurt) gegeben. Als Eluierungsmittel diente 0,1 M Natriumacetatlösung. Ferritin erschien nach 210-310 ml. Zur Reinheitskontrolle wurde es der Acrylamidgelelektrophorese nach (8) mit Anfärbung als Berliner Blau und mit Amidoschwarz unterzogen.

Unlösliche Nierenbestandteile wurden wie bei der Leber gewonnen. Für Löseversuche verwandte man auf 5 g Feuchtmaterial 50 ml folgender Lösungen: Puffer vom pH 4,6 mit 0,5 M an Natriumacetat und Essigsäure, 0,9 proz. Natriumchloridlösung und 0,1 M Natriumcitratlösung, beide auf pH 7 eingestellt. Die Ultrafiltration der Extrakte erfolgte durch Kollodiumhülsen SM 13 200 (Sartorius-Membranfilter GmbH, Göttingen).

Für die Modellversuche in vitro wurde Ferritin aus Pferdemilz hergestellt, jedoch nicht kristallisiert, um eine Verunreinigung mit Cadmiumsulfat zu vermeiden. Die Reaktionsansätze enthielten Ferritin mit 2 mg Ferritineisen, 1 ml 1 M Natriumacetatlösung und zuge setzte Metallsalzlösung. Das pH wurde auf $7,0 \pm 0,1$ eingestellt und das Volumen auf 10 ml aufgefüllt. Nach 30 Min. Stehen wurden die freien Metallionen in der Versuchslösung direkt polarographisch bestimmt, die an Ferritin gebundenen wurden aus der Differenz ermittelt. In analoger Weise wurden Versuche mit nach (9) hergestelltem Apoferritin und mit Eisenhydroxid angesetzt. Letzteres fällte man aus einer Lösung von Eisen-II-perchlorat, die mit Natriumhydrogencarbonat auf pH 7-8 gebracht wurde, durch Einleiten von Sauerstoff aus. Die direkte polarographische Metallbestimmung wurde auch bei der Untersuchung des pH-Einflusses und von Komplexbildnern auf die Metallsorption an Ferritin benutzt.

Ergebnisse

1. Leber. Das Blei kann aus Leberhomogenaten praktisch nicht dialysiert werden, wie Tab. 1 zeigt. Auch schwache Säuren und Komplexbildner und starke Basen können es nicht zu dialysierbaren Verbindungen umsetzen, das erreichen in nennenswertem Umfang lediglich starke Säuren und Komplexbildner. Aus diesen Befunden konnte bereits geschlossen werden, daß das Blei an hochmolekulare Verbindungen gebunden ist und ferner, daß komplexe Bindungen nicht vorliegen, da diese durch Natronlauge gespalten werden.

TABELLE 1

Dialysierbarkeit von Blei aus Leberhomogenaten. (Es wurden 50 g Homogenat mit 40 ppm Pb zusammen mit 50 ml Lösungsmittel 16 Stunden gegen Wasser dialysiert.)

Lösungsmittelzusatz	% des Bleis dialysiert
Ohne	< 1
Puffer pH 4	4
0,1 N Salzsäure	29
1 N Salzsäure	53
0,1 N Natronlauge	< 1
0,1 M EDTA	18
25. proz. Ammoniumcitratlösung	< 1
50 proz. Ammoniumacetatlösung	2

Wurde Leberhomogenat mit 0,9 proz. Natriumchlorid- oder 0,01 M Natriumacetatlösung ausgelaugt, so war im Durchschnitt 62 % des Bleis unlöslich. Dieser unlösliche Anteil war mit Salzsäure der Konzentrationen von 0,1 - 6 N herauslösbar, gleichzeitig wurde auch Eisen als Eisen-III-chlorid in Lösung gebracht. Dabei bestand eine weitgehende Parallelität der Salzsäurelöslichkeit dieser beiden Metalle.

Es wurde auf verschiedene Weise versucht, die blei- und eisenhaltigen Verbindungen rein zu isolieren. Eine Aufarbeitung auf Hämosiderin verlief negativ. Schließlich gelang eine gewisse Anreicherung durch Lösen der wasserunlöslichen Leberanteile in Phenol. Dabei gingen die metallhaltigen Verbindungen scheinbar in Lösung. Da sie beim Zentrifugieren wieder sedimentieren, liegen offensichtlich keine niedermolekularen Eisenverbindungen vor. Aus der Tab. 2 ist eine gute Parallelität zwischen

TABELLE 2

Sedimentation von Blei- und Eisenverbindungen aus phenolischen Lösungen wasserunlöslicher Leberanteile

Zentrifugal- beschleunigung	Dauer	% Pb sedimentiert	% Fe sedimentiert
10 000 g	30 Min.	30	38
10 000 g	60 Min.	40	47
20 000 g	60 Min.	52	54
40 000 g	60 Min.	62	62

Blei und Eisen erkennbar, demnach müssen die beiden Metalle gemeinsam darin vorkommen. Die Sedimente sahen braun aus, bestanden also z. T. aus Eisenhydroxid und enthielten Blei und Eisen etwa im Verhältnis 1 : 500. Es kann angenommen werden, daß die geringe Bleimenge an der Oberfläche des Eisen-III-hydroxids sorbiert ist. Entsprechende Modellversuche sind weiter unten beschrieben.

Die Extraktion von 3 verschiedenen Leberhomogenaten mit Natriumacetatlösung und anschließender Erhitzung auf 80 °C - eine abgekürzte Methode zur Anreicherung von Ferritin - zeigte durchschnittlich eine Löslichkeit von 7 % des Bleis und 4 % des Eisens. Daraufhin wurde eine Leber auf Ferritin ausgearbeitet und die Blei- und Eisengehalte der Fraktionen bestimmt. Die Ergebnisse in Tab. 3 zeigen eine leidliche Überein-

TABELLE 3

Fraktionierung wasserlöslicher Blei- und Eisenverbindungen aus Leber

Fraktion	% Pb*	% Fe*
Wäßriger Extrakt	20	5,8
Hitzestabil bis 80 °	7	4,4
Fällbar mit Aceton (Ferritin)	5	3,7
Als Ion vorliegend	2	nicht best.

*Anteile vom Gesamtgehalt des Homogenats

stimmung zwischen Blei- und Eisengehalt, wenn man von der Tatsache absieht, daß das Blei in einer nicht hitzestabilen Verbindung stärker als das Eisen angereichert ist. Leberferritin spielt als Bleispeicher anteilmäßig keine große Rolle. Noch geringer ist die Menge der freien Bleionen, es erübrigt sich deshalb zu prüfen, ob sie schon in der Leber vorhanden waren oder erst bei der Aufarbeitung entstanden sind.

2. Milz. Die Milz hat als Speicherungsorgan für Blei wohl keine besondere Bedeutung, wegen ihres Ferritinreichtums war es jedoch von Interesse, das Vorkommen von Blei darin zu untersuchen. In 4 Milzen waren im Durchschnitt 47 % des Bleis und 43 % des Eisens in 0,1 M Natriumacetatlösung löslich. Der Milzextrakt wurde durch Gelchromatographie an Agarosegel aufgetrennt. In der Ferritinfraktion fanden sich 59 % des löslichen Bleis und 68 % des Eisens. Da das Rinderferritin bis jetzt nicht kristallisiert werden kann (10), wurde die Reinheit durch Übereinstimmung der Berliner-Blau- und der Amidoschwarzfärbung in der Acrylamidgelelektrophorese festgestellt. Der Rest der Metalle verteilte sich

ziemlich gleichmäßig auf die anderen Fraktionen mit der Ausnahme, daß eine Fraktion, die vor dem Ferritin erschien, 23 % des Bleis und 15 % des Eisens enthielt. Die in dieser Fraktion enthaltenen Substanzen müssen ein größeres Molekulargewicht als Ferritin haben; ob es sich hierbei um ferritinhaltige Aggregate oder um andere, eisenhydroxidhaltige Stoffe handelt, wurde nicht geprüft. Es kann aber angenommen werden, daß das Blei hier in ähnlicher Weise sorbiert ist wie beim Ferritin. Ebenfalls nicht weiter untersucht wurde die Bleibindung an die unlöslichen Milzbestandteile, da hier gegenüber der Leber nichts Neues zu erwarten war.

3. Niere. Der Anteil unlöslicher Bleiverbindungen in der Niere ist noch höher als in Leber und Milz. Es wurden zumeist 90 % und mehr gefunden. Die wäßrigen Auszüge enthielten keine freien Bleionen, es waren Spuren von Ferritin nachweisbar, an das das Blei gebunden sein konnte.

Aus den unlöslichen Anteilen eines Nierenhomogenats ließ sich mit Essigsäure-Natriumacetat-Puffer pH 4,6 26 % des Bleis als ultrafiltrierbare, polarographisch aktive Bleionen lösen. Versuche zur Bleilösung mit neutralen Salzen, mit Komplexbildnern oder Reduktionsmitteln (um schwerlösliches Eisen-III-hydroxid in leicht lösliche Eisen-II-salze zu überführen) ergaben zunächst kein ganz einheitliches Bild, obwohl die Löslichkeit von Blei und Eisen im allgemeinen übereinstimmte. Dann wurden die Versuche unter Beschränkung auf zwei Lösungsmittel - Natriumchloridlösung als einfache Salz-, Natriumcitrat als Chelatligandlösung - fortgesetzt, weil die Frage einer Ausscheidungsmöglichkeit für das Blei in der Niere interessierte. Mit Natriumchloridlösung gingen 13 % des Bleis und 45 % des Eisens in Lösung, davon waren allerdings nur 25 % des gelösten Eisens und 27 % des Bleis ultrafiltrierbar. Bei der Behandlung der unlöslichen Nierenbestandteile mit Natriumcitratlösung wurden 84 % des Bleis und 62 % des Eisens gelöst, davon waren 54 % des Bleis und 93 % des Eisens ultrafiltrierbar. Diese Ergebnisse zeigen, daß die bleihaltigen Eisenhydroxidteilchen in der Niere eine sehr geringe Partikelgröße haben und leicht kolloidal in Lösung gehen. Mit Komplexbildnern werden sie größtenteils zu niedermolekularen Teilchen umgesetzt. So ließen sich einige Widersprüche vorheriger Versuche aufklären, es waren kolloidale Teilchen beim Zentrifugieren nicht sedimentiert und deshalb als lösliche Metallverbindungen angesehen worden. Warum das Blei in der Niere reaktionsfähiger als in der Leber ist, Citratlösungen hatten dort z. B. keine Wirkungen, kann z. Zt. nicht erklärt werden.

4. Sorption von Metallionen in vitro an Ferritin und Eisenhydroxid. Um Näheres über die Art der Bindung von Blei an Ferritin und Eisenhydroxid zu erfahren, wurden Modellversuche ausgeführt, da bisher keine Untersuchungen über das Bindevermögen von Ferritin für andere Metalle als Eisen bekannt sind. Die Ergebnisse der Anlagerungsversuche bei pH 7 sind in Abb. 1 dargestellt. Man ersieht, daß bei allen Metallionen ausser Kupfer die Bindung in Form einer Sorptionskurve

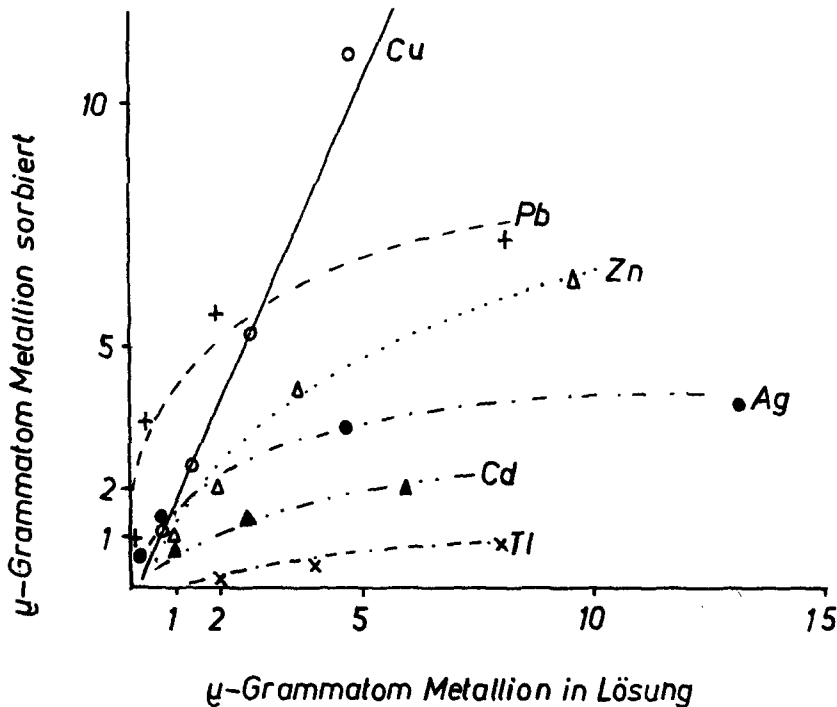


Abb. 1 Sorption von Metallionen an Ferritin in Lösungen vom pH 7 mit 2 mg Ferritineisen.

verläuft. Diese Kurvenform kommt durch Reaktion an der Oberfläche eines hochmolekularen Teilchens zustande. Zunächst werden nur wenige Ionen sorbiert, deshalb annähernd lineare Zunahme der sorbierten Teilchen. In dem Maße, in dem die Oberfläche mehr und mehr besetzt wird, nimmt die Konzentration der Ionen in Lösung zu und schließlich geht die Kurve in eine Waagerechte über. Jetzt ist die Oberfläche besetzt, durch weitere Erhöhung der Ionenkonzentration in Lösung wird die Zahl der sorbierten Ionen nicht mehr erhöht. Von den

untersuchten Metallen werden die Bleiionen am stärksten gebunden.

Da festgestellt werden konnte, daß Apoferritin außer Kupferionen keine Metallionen binden kann, bewirkt der Eisenhydroxidkern des Ferritins die Metallionensorption. Gestützt wurde dieser Befund durch die Tatsache, daß die Sorption von Metallionen an synthetisch gewonnenes Eisenhydroxid der Sorption an Ferritin so ähnlich ist, daß sich eine Wiedergabe der Kurven erübrigt. Daß das Kupfer eine Ausnahme macht, liegt an der starken Bindung seiner Ionen an Proteine.

Ferritin soll nach (11) kleine Mengen von Eisen-II-Ionen enthalten, deren Oxidation durch SH-Gruppen verhindert wird. Bei unseren Versuchen wurden durch die Sorption von Bleiionen keine Eisen-II-Ionen in Freiheit gesetzt. Daß solche Ionenveränderungen möglich sind, zeigte ein Versuch mit cadmiumhaltigem Ferritin. Nach Zusatz von Bleiionen wurden $2/3$ der den sorbierten Bleiionen äquivalente Menge Cadmiumionen in Freiheit gesetzt. Die sorbierten Ionen werden auch durch Wasserstoffionen verdrängt. Wird bleihaltiges Ferritin, das bei pH 7 keine polarographische Stufe ergibt, mit Säure versetzt, so erscheint unterhalb pH 6 diese Stufe und erreicht bei pH 3,5 wieder die Höhe der Referenzlösung. Demnach ist das Blei wieder völlig desorbiert.

Um einen Überblick über den Einfluß der komplexen Bindung von Bleiionen auf die Sorption an Ferritin zu erhalten, wurde bei konstanter Ferritin- und Bleimenge Citrat, SH-Glutathionat, Nitrilotriacetat und EDTA zugesetzt. Mit zunehmender Stärke des Bleikomplexes und zunehmender Konzentration an Komplexbildnern nimmt die Sorption ab. Das ist dadurch bedingt, daß durch die Komplexbildung die Konzentration an freien Metallionen verringert wird. Da das Ferritin eine heterogene Phase darstellt, kann man für die Austauschreaktion keine Gleichgewichtskonstante nach dem Massenwirkungsgesetz berechnen. Es läßt sich lediglich feststellen, daß das Ferritin mit den Biokomplexbildnern Citrat und Glutathionat um das Bleiion konkurrieren kann.

Im ganzen zeigen die Versuchsergebnisse, daß das Blei gegenüber anderen Metallen bevorzugt von Ferritin und von Eisenhydroxid sorbiert wird. Es ist also verständlich, daß in Leber, Niere und Milz bleivergifteter Rinder das Blei von eisenhydroxidhaltigen Stoffen gebunden ist und daß andere Metalle sich dort nicht oder nur in untergeordnetem Maß finden. Settlemire und Matrone (12) stellten zwar einen hohen Zinkgehalt in der Leberferritinfraktion bei Ratten fest, das Futter enthielt jedoch den außerordentlich hohen Zinkgehalt von 0,75 %, so daß diese Befunde als Ausnahme anzusehen sind.

Eine Beziehung zwischen Eisen und Blei ist bereits von Butt et al. (13) gefunden worden. Sie stellten

einen nahezu linearen Zusammenhang zwischen Eisen- und Bleigehalt in menschlichen Lebern bei Krankheiten mit abnormer Eisenspeicherung fest. Da die Patienten offensichtlich keine größeren Bleimengen aufgenommen hatten, stammt der Bleigehalt dieser Lebern aus den kleinen Bleimengen in Nahrung und Luft. Sie werden normalerweise ausgeschieden, in diesen Fällen von den großen Eisenhydroxidmengen festgehalten. Während dort die Störung des Eisenstoffwechsels Ursache der Bleispeicherung ist, ist es bei den untersuchten Rindern die abnorme Bleizufuhr. Wahrscheinlich führt sie zu einer Veränderung der Eisenspeicherung, wie der Versuch über die löslichen Anteile in Lebern zeigte. Es wurden nur 7 % lösliches Nichteiseneisen gefunden, während Underwood und Morgan (14) in gesunden Rindern 70 % festgestellt haben. Ob die Störung der Eisenspeicherung eine allgemeine Erscheinung bei der Bleivergiftung ist und ob ihr eine Bedeutung für die Bleiwirkung im Organismus zukommt, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützte diese Arbeit durch Gewährung einer Sachbeihilfe. Fräulein B. Saacke sei für gewissenhafte Mitarbeit gedankt. Ferner danke ich den Herren Veterinärbeamten der Veterinärämter in Schleiden und Euskirchen für die Probenahmen.

Literatur

1. JUBB, K. V. F. und KENNEDY, P. C. Pathology of Domestic Animals, Vol. 2, S. 334 (1963). Academ. Press, New York.
2. MOESCHLIN, S. Klinik und Therapie der Vergiftungen 4. Aufl. S. 46 (1964), Thieme Verl., Stuttgart.
3. ARONSON, A. L. und HAMMOND, P. B. J. Pharmacol. exper. Therap. 146, 241 (1964).
4. LANG, H. und FINGERHUT, M. Arch. exper. Path. Pharmacol. 235, 41 (1958).
5. IWANTSCHIEFF, G. das Dithizon in der Mikro- und Spurenanalyse (1962), Verl. Chemie, Weinheim.
6. KALDOR, J. Austral. J. exper. Biol. 32, 795 (1954).
7. SPECKER, H. und TRÜB, H. Z. f. anal. Chem. 186, 123 (1962).

8. PAPADAKIS, J. Diss. Univ. Freiburg (1965).
9. BEHRENS, H. und TAUBERT, M. Z. f. physiol. Chem. 290, 156 (1952).
10. RÜSSEL, H. Dtsch. tierärztl. Wschr. 75, 313 (1968).
11. MAZUR, A., LITT, J. und SHORR, E. J. biol. Chem. 187, 485 (1950).
12. SETTLEMIRE, C. T. und MATRONE, G. J. Nutrit. 92, 153 (1967).
13. BUTT, E. M., NEUMANN, R. E., GILLMOUR, T. C. und DIDO, S. L. Metal Binding in Medicine, (herausgegeben von M. J. SEVEN und L. A. JOHNSON). S. 43 (1960). J. B. Lippincott Comp., Philadelphia.
14. UNDERWOOD, E. J. und MORGAN, E. H. Austral. J. exper. Biol. 41, 247 (1963).