

Furthermore, it can be concluded that in the controls the ratio of water-soluble and insoluble components of the nuclei remained unchanged for each class. On the other hand, this ratio becomes irregular in the treated animals, where the dry weight of nuclei isolated in aqueous medium show no disposition into classes. This indicates that these modifications depend on each other, because the classes of nuclei isolated in anhydrous glycerol are well defined.

In conclusion it can be pointed out that the integrating interferometric apparatus used was able to demonstrate that the increase of nuclear water is an actual event in some enlarged nuclei of the TAA-treated liver, as remarkable as the one observed for the solid components. Furthermore these modifications are more severe than those observed in acute intoxication, where the biochemical data showed quantitative modification for the soluble components only (BARTON et al.)^{11,12}.

Riassunto. Dopo intossicazione con TAA, l'aumento di volume dei nuclei di fegato isolati è sostenuto sia da un accresciuto contenuto di acqua che di sostanze solide. Anche il rapporto fra sostanze solubili e insolubili è modificato.

G. MALVALDI

*Istituto di Patologia Generale,
Università di Pisa (Italy), 24 March 1969.*

¹¹ A. D. BARTON, E. A. CERNY and K. M. TRACY, *Archs Biochem. Biophys.* **109**, 36 (1965).

¹² The author wishes to thank Prof. E. PUCCINELLI for stimulating discussion during the work and Mr. E. MADRIGALI for technical assistance.

Neue Aspekte zur Frage der Nephrotoxizität von Phenacetin

Der Metabolismus von Phenacetin ist seit Einführung dieser Verbindung als Antipyretikum vor bald 100 Jahren wiederholt und recht eingehend bearbeitet worden¹⁻³. Es ist daher bemerkenswert, dass BÜCH et al.^{4,5} vor kurzem noch einen letzten, bisher unbekannten Hauptmetaboliten, den Sulfatester von 2-Hydroxyphenetidin, identifiziert und der quantitativen Bestimmung zugänglich gemacht haben. Diese polare und gut harnfähige Verbindung stellt das Endprodukt des Abbaupfades von Phenacetin über Phenetidin dar. Der Phenacetinmetabolismus dürfte damit in den Grundzügen nun lückenlos bekannt sein und lässt sich in Anlehnung an BÜCH et al.⁶ gemäß Figur 1 zusammenfassen. Das wiedergegebene Reaktionsschema gilt sowohl für den Menschen wie für die Ratte.

Im Verlauf von eigenen Untersuchungen zur Frage der Nephrotoxizität von Phenacetin bei der Ratte hat sich herausgestellt, dass eine auffallende Dosisabhängigkeit der Metabolisierung von Phenacetin besteht. Dieses Phänomen, das nachstehend beschrieben werden soll, ist von Interesse zunächst als Ausnahme von den Regeln der allgemeinen Pharmakokinetik und ferner, im konkreten Fall des Phenacetins, in toxikologischer Hinsicht.

Methodik. Tierversuche: Zur Verwendung gelangten weibliche, 150–200 g schwere Füllinsdorfer Albinoratten. Die Tiere erhielten 16 Stunden vor Versuchsbeginn und während des ganzen Stoffwechselversuchs kein Futter, hatten jedoch stets Zugang zu Trinkwasser. Bei Versuchsbeginn wurde jeder Ratte die berechnete Dosis Phenacetin in Form von 2,0–3,0 ml einer homogenen Suspension von pulverisiertem Phenacetin in 10% Gummiarabikum per Schlundsonde eingegeben. Anschließend Harnkollekte – je 2 gleich behandelte Ratten pro Stoffwechselkäfig – während 24 Stunden. Chemische Analysen: Phenacetin, N-Azetylaminophenol und β -Phenetidin wurden nach den von B. BRODIE und J. AXELROD⁸ beschriebenen Verfahren, das 2-Hydroxyphenetidinsulfat nach der von H. BÜCH et al.⁵ entwickelten Methode bestimmt.

Ergebnisse und Interpretation. Die Ergebnisse eines repräsentativen von 5 analogen Versuchen sind in der Tabelle I zusammengestellt. Bestimmt wurden die wichtigsten Phenacetinmetabolite⁶ im 24-Stunden-Harn von Ratten nach einmaliger oraler Gabe von Phenacetin. Man erkennt, dass mit von 33 mg/kg bis 900 mg/kg zunehmender Dosis ein massiver Anstieg der mit dem Harn

ausgeschiedenen Dosisprozente von β -Phenetidin und Hydroxyphenetidinsulfat einhergeht. Demgegenüber bleiben die Dosisprozente des unverändert ausgeschiedenen Phenacetins und des gesamten N-Azetylaminophenols konstant bzw. nehmen leicht ab. Es erfährt, um die Situation mit andern Worten zu umschreiben, bei einer 9fachen Erhöhung der Dosis von 33 mg/kg auf 300 mg/kg die mit dem Harn eliminierte Phenacetinmenge erwartungsgemäß ebenfalls eine ungefähr 9fache Zunahme, die ausgeschiedene Phenetidinmenge jedoch steigt beim gleichen Dosissprung um einen Faktor von 90. Es kommt demnach mit steigender Dosis zu einer beträchtlichen Verschiebung der Metabolisierung von Phenacetin in Richtung des Abbaupfades über Phenetidin. Da nun Phenetidin bzw. dessen in vivo entstehende N-oxydierte Derivate ausgesprochene Blutgifte sind – wobei vor allem die Hämoglobinbildung^{3,7} und die Verkürzung der Lebensdauer der Erythrozyten⁸ eingehender untersucht worden sind – und da die hämatotoxischen Nebenwirkungen von Phenacetin im wesentlichen auf intermediär entstehendes Phenetidin zurückzuführen sind^{3,7}, liegt es auf der Hand, dass die beschriebene Verschiebung der Metabolisierung in Richtung Phenetidin für die Interpretation der verschiedenen Aspekte der Phenacetintoxizität von Interesse ist, und dies um so mehr, als eine gleichsinnige Verschiebung auch beim Menschen nachgewiesen werden kann⁹.

¹ O. HINSBERG und G. TREUPEL, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **33**, 216 (1894).

² J. N. SMITH und R. T. WILLIAMS, *Biochem. J.* **44**, 239 (1949).

³ B. BRODIE und J. AXELROD, *J. Pharmac. exp. Ther.* **97**, 58 (1949).

⁴ H. BÜCH, H. HAEUSER, K. PFLEGER und W. RUEDIGER, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **253**, 25 (1966).

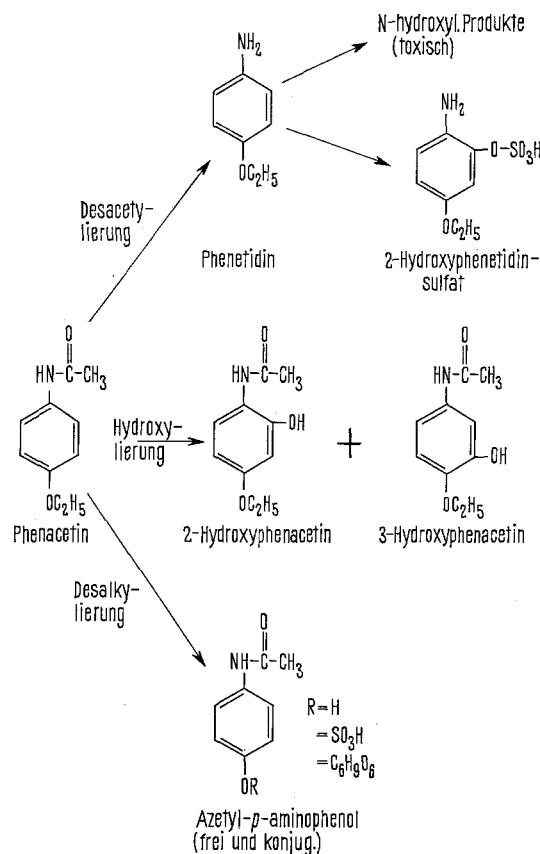
⁵ H. BÜCH, K. PFLEGER, W. RUMMEL, V. ULLRICH, D. HEY und H. STAUDINGER, *Biochem. Pharmac.* **16**, 2247 (1967).

⁶ Die beiden Hydroxyderivate von Phenacetin (2-Hydroxyphenacetin und 3-Hydroxyphenacetin) wurden nicht mitbestimmt, weil diese Metabolite zusammen lediglich etwa 0,1% der Dosis ausmachen⁸.

⁷ H. BAADER, S. GIRGIS, M. KIESE, H. MENZEL und L. SKROBOT, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **241**, 317 (1961).

⁸ A. PLETSCHER, A. STUDER und P. MIESCHER, *Schweiz. med. Wschr.* **88**, 1214 (1958).

⁹ J. RAAFLAUB und U. C. DUBACH, *Br. med. J.* (1969), im Druck.



Metabolische Umwandlung des Phenacetins bei der Ratte und beim Menschen (nach H. BÜCH et al.⁵).

Eine Konsequenz des erhobenen Befundes besteht zunächst darin, dass es bei chronisch-toxikologischen Untersuchungen mit Phenacetin inadäquat ist, als Dosis lediglich die pro Tag und Körpergewicht eingenommene Phenacetinmenge festzulegen. Es ist wichtig zu präzisieren, wie die Tagesdosis verabreicht wird, ob als Stosddosis oder über Stunden verteilt. In der Tabelle II zusammengestellte Ergebnisse von Versuchen an Ratten belegen diese Feststellung. Wenn also beispielsweise eine Tagesdosis von 400 mg/kg auf 5 Partaldosen von 80 mg/kg in Abständen von 3 Stunden verteilt wird, resultiert im Harn eine Metabolitenverteilung, die derjenigen einer Einzeldosis von 80 mg/kg entspricht. Es sind demnach bei tierexperimentellen Langfristversuchen mit dem Futter beigemischten Phenacetin a priori weniger toxische Auswirkungen zu erwarten als bei Verabreichung der gleichen Tagesdosis als tägliche Stosddosis mit der Schlundsonde.

Für die weiteren Untersuchungen zur Frage der Nephrotoxizität von Phenacetin nehmen wir als Arbeitshypothese an, dass auch hier, wie bei der Hämatotoxizität von Phenacetin, das intermediär gebildete Phenetidin das eigentlich schädliche Agens ist. Für diese Hypothese sprechen, in Ergänzung zu dem oben Ausgeführten, folgende Argumente. Bei gezielter Befragung analgeticasüchtiger Patienten mit geschädigter Nierenfunktion stellt sich in der Regel heraus, dass diese mit Vorliebe hohe Dosen phenacetinhaltiger Präparate auf einmal einzunehmen pflegen. Just diese Suchtgewohnheit hat, wie wir nun wissen, zur Folge, dass relativ grosse Phenetidinmengen entstehen und die Nieren passieren. Des weiteren dürfte Phenetidin zu denjenigen körper-

Tabelle I. Phenacetin und Phenacetinmetaboliten im 24-Stunden-Harn der Ratte nach einmaliger oraler Gabe von Phenacetin. Dosis von 33 mg/kg auf 900 mg/kg Körpergewicht ansteigend. Gehaltsangaben in Prozent der Phenacetindosis

Dosis	33 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	900 mg/kg
Phenacetin	0,26%	0,28%	0,33%	0,23%
N-Azetyl- <i>p</i> -aminophenol (frei und konjugiert)	86,0%	83,3%	77,1%	65,0%
<i>p</i> -Phenetidin	0,031%	0,047%	0,301%	0,527%
2-Hydroxy-phenetidinsulfat	< 0,5%	3,7%	10,5%	14,0%

Tabelle II. Phenacetin und Phenacetinmetaboliten im 24-Stunden-Harn der Ratte nach oraler Gabe von 400 mg/kg Phenacetin, nach Applikation a) als Stosddosis (gesamte Dosis auf einmal) und b) als verteilte Dosis (gesamte Dosis auf 5 × 80 mg/kg in 3stündigen Abständen verteilt). Vergleich der Mittelwerte von je 5 Parallelversuchen. Gehaltsangaben in Prozent der Gesamtdosis

	a) Stosddosis (n = 5)	b) Verteilte Dosis (n = 5)	Signifikanz der Differenz
Phenacetin	0,31% s = ± 0,07	0,27% s = ± 0,07	p > 0,05 n.s.
N-Azetyl- <i>p</i> -aminophenol (frei und konjugiert)	75,4% s = ± 7,8	75,2% s = ± 5,2	p > 0,05 n.s.
<i>p</i> -Phenetidin	0,266% s = ± 0,100	0,040% s = ± 0,013	p < 0,01 s.
2-Hydroxyphenetidinsulfat	10,4% s = ± 1,8	3,2% s = ± 0,7	p < 0,001 h.s.

fremden Verbindungen gehören, die im Verlaufe der Harnbereitung im Nierengewebe passiv, durch Diffusion, reabsorbiert werden. Die Reabsorption erfolgt dementsprechend in denjenigen Tubulusabschnitten, wo die eigentliche Harnkonzentrierung stattfindet, also in den Nierenpapillen. In den Papillen sind andererseits auch die hauptsächlichen pathologisch-anatomischen Veränderungen der chronischen interstitiellen Nephritis infolge Analgetica-Abusus lokalisiert^{10,11}. Zu erwähnen in diesem Zusammenhang sind schliesslich auch zwei ältere, bisher wenig beachtete Arbeiten, in denen über die tierexperimentelle Erzeugung von Papillennekrosen durch einfache aromatische, dem Phenacetin chemisch recht nahe verwandte Amine, nämlich N-Methylanilin¹² und Tetrahydrochinolin¹³, berichtet wird. Insbesondere die erstere dieser Arbeiten, in der das Auftreten von aseptischen Papillennekrosen nach Verfütterung täglicher Dosen von 6 mg N-Methylanilin HCl pro Ratte während 1–2 Jahren bei einem Viertel der behandelten Tiere beschrieben wird, sei hier hervorgehoben. Entsprechende Langfristversuche mit Phenacetin sind unseres Wissens bisher nie durchgeführt worden. Derzeit laufende Versuche sollen nun diese Lücke schliessen.

¹⁰ S. SCHEIDECKER, Bull. Schweiz. Akad. med. Wiss. 14, 139 (1958).

¹¹ F. GLOOR, Ergebn. allg. Path. path. Anat. 41, 64 (1961).

¹² J. WHITE und P. MORI-CHAVEZ, J. natn. Cancer Inst. 12, 777 (1952).

¹³ J. REHNS, Archs int. Pharmacodyn. Thér. 8, 199 (1901).

Die beschriebene Verschiebung der prozentualen Metabolitenverteilung im Harn in Abhängigkeit von der Phenacetindosis entspricht nicht den Gesetzmässigkeiten der allgemeinen Pharmakokinetik. In der Regel verlaufen die verschiedenen Abbau- und Eliminationsprozesse, durch die ein gegebenes Medikament aus dem Organismus eliminiert wird, durchwegs nach der Kinetik erster Ordnung, das heisst proportional der Plasmakonzentration des Medikamentes. Entsprechend ist jeweils die prozentuale Verteilung der Metaboliten im Harn, unabhängig von der applizierten Dosis. Es gibt jedoch Ausnahmen von dieser Regel, vor allem dann, wenn ein wichtiger Teilprozess der Abbaureaktionen nach einer Kinetik gemischter oder nullter Ordnung (Sättigungskinetik) verläuft. Bekannt ist der von G. LEVY¹⁴ eingehend untersuchte und abgeklärte Ausnahmefall der Salizylsäure. Es hat sich nun gezeigt, dass auch Phenacetin als Ausnahmefall zu gelten hat, wobei allerdings hier im Unterschied zur Salizylsäure eine genauere Analyse der dem anomalen Verhalten zugrunde liegenden Mechanismen noch aussteht.

Summary. Experiments on the metabolism of phenacetin in the rat are reported. Estimations of phenacetin, total

acetyl-*p*-aminophenol, *p*-phenetidine and 2-hydroxyphenetidine-sulfate in the urine excreted after ingestion of phenacetin reveal an unusual dose-dependence of the metabolic pattern. The degradation of phenacetin through deacetylation to phenetidine is greatly enhanced by raising the dose. The results are briefly discussed in view of their possible significance in the development of analgesic nephropathy in man. As a working hypothesis for further experiments it is assumed, that phenetidine is the main toxic agent in nephropathy due to phenacetin abusus.

U. C. DUBACH und J. RAAFLAUB

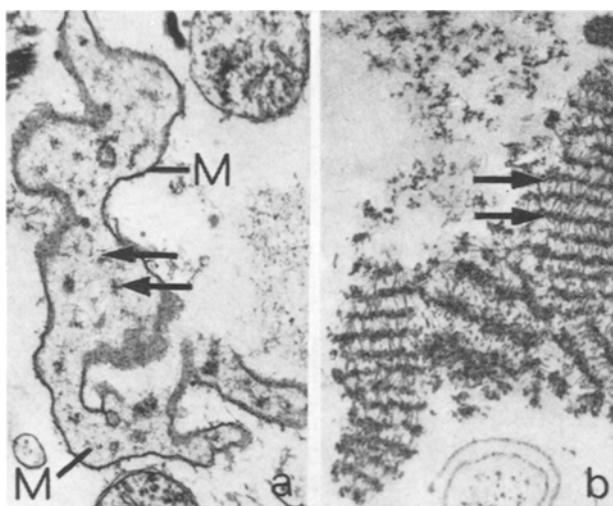
Medizinische Poliklinik der Universität Basel und
Abteilung für experimentelle Medizin der
F. Hoffmann-La Roche und Co. A.G.,
CH-4002 Basel (Schweiz), 23. Juni 1969.

¹⁴ G. LEVY, J. Pharm. Sci. 54, 959 (1965).

ATP-erzeugte periodische Verdichtungen im endoplasmatischen Retikulum von Fibroblasten

Die Synthese von Kollagenvorstufen in Fibroblasten, einschliesslich Hühnerherzfibroblasten¹, erfolgt in den Zisternen des endoplasmatischen Retikulums^{2,3}. Bei allen für die Elektronenmikroskopie üblichen Fixierungsarten enthalten die erweiterten Zisternen in Fibroblasten mit erhöhter Kollagensynthese ein gleichmässig verteiltes filamentäres Material. Bei Kontraktionsversuchen an glyzerinextrahierten Hühnerherzfibroblasten⁴ beobachteten wir ein periodisches Ordnen des filamentären Materials in den Zisternen nach Zugabe einer ATP-haltigen Lösung. Die Glyzerinextraktion (1–12 Tage) erzeugt ein

solches Ordnen nicht. Sie bewirkt eine vollständige Auflösung der Plasmamembran und eine Ruptur beziehungsweise teilweisen Schwund der Zysternenwand und gestattet damit den Zutritt der ATP-Lösung an den Inhalt der Zisternen. Eine Glyzerinextraktion von einem Tag genügt. Die ATP-Lösung enthielt 0,002 M ATP in 0,01 Tris-HCl Puffer pH 7,0; 0,003 M MgCl₂ und 0,12 M KCl. Nach Inkubation der extrahierten Zellen mit der ATP-Lösung treten elektronenoptische Verdichtungen des filamentären Materials in den Zisternen auf (Figur 1a und b). Die Verdichtungen haben eine zylindrische Form mit einem Durchmesser von 800–1000 Å und eine wechselnde Länge, die meist durch die Grösse der Zisterne bestimmt ist. Der Mittelpunktabstand der Verdichtungen von einander beträgt 1500–1800 Å. Der freie Raum (700 bis 900 Å) zwischen den Verdichtungen wird durch feine Filamente überbrückt. Der räumliche Aufbau der hier gefundenen Strukturen erinnert an die Kollagenanordnung in der Descemetmembran⁵. Extrazellulär wurde in Fibroblastenkulturen ein morphologisch ähnliches Material nachgewiesen⁶, bei dem es sich um eine dreidimensionale Aggregation von Kollagenmonomeren handeln soll. Die Periodizität des extrazellulär gefundenen Materials ist aber mit 850 Å nur etwa halb so gross wie die Periodizität der ATP-erzeugten Strukturen in den Zi-



Verdichtungen (↓) innerhalb des Membransystems (M) des endoplasmatischen Retikulums. (a) in Aufsicht. $\times 20\,000$; (b) in Queransicht. $\times 12\,000$.

¹ W. SCHARZ, H.-J. MERKER und A. KUTZSCHE, Z. Zellforsch. 56, 107 (1962).

² J. P. REVEL und E. D. HAY, Z. Zellforsch. 61, 110 (1963).

³ R. ROSS, J. dent. Res. 45, 449 (1966).

⁴ D. GRAF KEYSERLINGK und W. SCHWARZ, Naturwissenschaften 55, 549 (1968).

⁵ M. A. JAKUS, J. biophys. biochem. Cytol. 2, Suppl. 241 (1956).

⁶ B. GOLDBERG und H. GREEN, J. Cell Biol. 22, 227 (1964).