

KERNFORSCHUNGSZENTRUM

KARLSRUHE

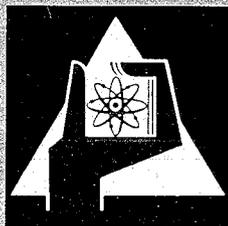
Juli 1967

KFK 614

Institut für Strahlenbiologie

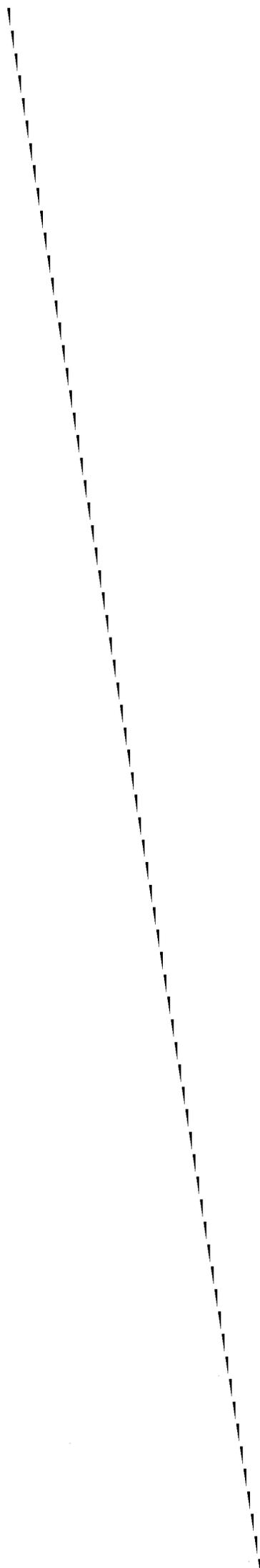
Untersuchungen über das Verhalten von Zn- und Ca-Chelaten der
Äthylendiamintetraessigsäure und der Diäthylentriaminpenta-
essigsäure im Säugetierorganismus und in vitro

W. Jammers



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.

KARLSRUHE



Kernforschungszentrum Karlsruhe

Juli 1967

KFK 614

Institut für Strahlenbiologie

Untersuchungen über das Verhalten von Zn- und Ca-Chelaten
der Äthylendiamintetraessigsäure und der Diäthylentriamin-
pentaessigsäure im Säugetierorganismus und in vitro

W. Jammers

Gesellschaft für Kernforschung m.b.H., Karlsruhe

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Untersuchungen der Verteilung von ^{65}Zn im Organismus	5
1. Methodik	5
2. Ergebnisse	6
III. In vitro-Untersuchungen	8
1. Vorbemerkungen	8
2. Papierelektrophoretische Untersuchungen	9
3. Gelfiltration über Sephadex	11
a) Orientierende Versuche	11
b) Ergebnisse	14
IV. Diskussion der Versuchsergebnisse	16
V. Zusammenfassung	23
VI. Literatur	25
VII. Tabellen und Abbildungen	26

I. Einleitung

Als Chelatbildner bezeichnet man organische Moleküle bzw. Ionen, die mehrere Elektronendonatoratome besitzen und in der Lage sind, mit Metallionen überaus stabile Koordinationsverbindungen zu bilden. Sie haben in den letzten Jahren eine erhebliche Bedeutung als Antidote für die Behandlung von Vergiftungen mit radioaktiven, aber auch stabilen Metallionen gewonnen. Besonders eingehende Untersuchungen liegen für die Gruppe der synthetischen Polyaminopolycarboxylsäuren vor, insbesondere für die Äthylendiamintetraessigsäure (ÄDTA) und die ihr verwandte Diäthylentriaminpentaessigsäure (DTPA).

In jüngster Zeit sind mehrere Arbeiten veröffentlicht worden, die sich näher mit dem Verhalten der Zn-Chelate der oben erwähnten Liganden befassen; der Grund hierfür liegt in folgenden Tatsachen und Überlegungen: Es ist bekannt, daß bei wiederholter Verabfolgung höherer Dosen der Calcium-Chelate mit toxischen Nebenerscheinungen zu rechnen ist, bei denen es sich im wesentlichen um eine nephrotische Schädigung der Nierentubuli handelt. Was die Pathogenese dieser Veränderungen betrifft, so liegt von vornherein die Annahme nahe, daß hierbei die Wechselwirkung der Chelate mit endogenen Spurenmetallen, die zu den Liganden ausnahmslos eine höhere Affinität als die Ca-Ionen aufweisen, eine entscheidende Rolle spielt. Anders ausgedrückt, würde es nach Verabfolgung der Ca-Chelate zu einer Mobilisierung bestimmter Spurenmetalle kommen, was seinerseits zu einer Beeinträchtigung der Funktion und Aktivität metall-kontrollierter Enzyme führen könnte. Zu Gunsten dieser Hypothese spricht vor allem der Nachweis, daß das Zn-Chelat der DTPA eine im Vergleich zu Ca-DTPA deutlich herabgesetzte Toxizität aufweist (Catsch 1963, 1964a, Catsch und von Wedelstaedt 1965). Auf der anderen Seite ist die Dekorporationseffektivität der Zn-DTPA gegenüber Ca-DTPA nur unwesentlich herabgesetzt, wie Untersuchungen an ^{91}Y und ^{144}Ce zeigten (Catsch et al. 1964); die Zn-DTPA weist diesen Untersuchungen zufolge einen

etwa 10 - 20 mal höheren therapeutischen Index (definiert als Verhältnis der toxischen therapeutischen Dosis) als Ca-DTPA auf, und die praktische Anwendung der Zn-DTPA wird damit nahegelegt. Vor einer endgültigen Empfehlung der Zn-DTPA jedoch war ein wesentlicher Punkt zu klären. Untersuchungen an der mit ^{65}Zn markierten Zn-DTPA haben nämlich gezeigt, daß es nach Verabfolgung des Chelats im Körper der Versuchstiere zu einer Retention von ^{65}Zn kommt (Catsch et al. 1964, Catsch und Lê 1966, Foreman 1960). Falls es sich bei der Retention von ^{65}Zn um eine echte Abspaltung und Ablagerung des chelierten Zn handeln würde, wäre natürlich die praktische Verwendung der Zn-DTPA für therapeutische Zwecke im Hinblick auf mögliche toxische, durch das Zn bedingte Nebeneffekte in Frage gestellt. Mit Hilfe einer speziellen Methodik (unter Verwendung des doppelt mit ^{65}Zn und ^{14}C markierten Zn-DTPA) konnte diese Frage von Harmuth-Hoene et al. (1966) sowie Harmuth-Hoene (1967) eindeutig dahingehend beantwortet werden, daß es sich bei der beobachteten Retention von ^{65}Zn nicht um eine echte Abspaltung, vielmehr um einen isotopischen Austausch des chelierten ^{65}Zn mit endogenem Zn handelt. Daß mit der Möglichkeit eines isotopischen Austausches grundsätzlich gerechnet werden muß, hatten bereits frühere Untersuchungen von Catsch und Lê (1965, 1966) gezeigt.

Die oben erwähnten Untersuchungen über das Verhalten von Zn-DTPA sowie andere, weiter unten angeführte Arbeiten ergaben jedoch in einer anderen Beziehung unerwartete Resultate: Die Stabilitätskonstante des Zn-Chelats der ÄDTA beträgt nach Schwarzenbach et al. (1954) $10^{16,26}$, die der DTPA nach Anderegg et al. (1959) $10^{18,40}$, während die Ca-Chelate der ÄDTA und DTPA mit Werten von $10^{10,85}$ bzw. $10^{10,89}$ praktisch identisch sind. Die sog. Effektivitätskonstante (vgl. hierzu Catsch 1964b, Heller und Catsch 1959) der DTPA für Zn^{2+} ist somit rund 100 mal größer als die der ÄDTA, und es sollte dementsprechend auch eine höhere biologische Effektivität der DTPA, d.h. eine geringere Retention von ^{65}Zn erwartet werden. Überraschender-

weise ist dies jedoch nicht immer der Fall. Foreman (1960) fand nach intravenöser Injektion von Ratten mit ^{65}Zn -markierter Zn-DTPA eine Retention von 17 % der Aktivität im gesamten Körper der Ratte; im Falle von ^{65}Zn -markierter ÄDTA betrug die Retention 19 %. Die Dosierung der Chelate wurde von Foreman nicht angegeben. Stand et al. (1962) untersuchten die Ausscheidung von ^{65}Zn mit dem Urin von Mäusen nach i.v. Injektion der beiden Zn-Chelate; im Falle von Zn-DTPA wurden innerhalb von 24 Stunden 80 % der ^{65}Zn -Dosis, 60 % bei ÄDTA ausgeschieden. Die Dosis betrug $1 \mu\text{mol Zn}$, während die Chelatbildner im Überschuß von insgesamt $2 \mu\text{mol}$ vorlagen. In Untersuchungen am Menschen fanden Rosoff et al. (1965), das nach intravenöser Injektion von ^{65}Zn -markierter Zn-DTPA im Laufe des ersten Tages nur 5 % ^{65}Zn , im Falle von ÄDTA dagegen 50 % mit dem Urin ausgeschieden wurden; eine Dosierung des Zn und der Chelatbildner wird von den Autoren nicht angegeben. Catsch und Lê (1966) prüften die Retention von trägerfreiem ^{65}Zn im gesamten Körper der Ratte bei gleichzeitiger Injektion der Ca-Chelate der ÄDTA und DTPA in unterschiedlich hoher Dosierung (1 bis $10^3 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$); im höheren Dosisbereich wurde dem Einfluß von DTPA eine eindeutig niedrigere ^{65}Zn -Retention beobachtet, während bei niedrigen Dosen die Effektivität beider Chelatbildner praktisch identisch war. Die gleichen Autoren untersuchten weiterhin die ^{65}Zn -Retention im gesamten Körper nach intravenöser und intraperitonealer Injektion der mit ^{65}Zn markierten Zn-Chelate der ÄDTA und DTPA, wobei die Dosis von rund 10 bis $10^3 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ variiert wurde; sie fanden hierbei im Dosisbereich von $>10^2 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ keinen Unterschied in der Retention von ^{65}Zn in Abhängigkeit von der Art des Liganden; bei niedriger Dosierung jedoch wurde überraschenderweise und in Übereinstimmung mit den oben erwähnten Befunden von Rosoff et al. (1965) im Falle von Zn-DTPA eine eindeutig höhere ^{65}Zn -Retention als nach Verabfolgung der Zn-ÄDTA beobachtet.

Diese widersprüchlichen Befunde voran dürften aller Wahrscheinlichkeit nach auf die unterschiedliche Dosierung der Chelate zurückzuführen sein, und es kann festgestellt werden, daß bei niedrigen Dosen die ^{65}Zn -Retention im Falle von DTPA offenbar ein stärkeres Ausmaß als bei ÄDTA erreicht. Dieses Ergebnis steht aber im ausgesprochenen Widerspruch zu dem Verhältnis der effektiven Stabilitätskonstanten, das eine etwa 100 mal höhere Wirksamkeit der DTPA erwarten ließ. Wir hatten oben erwähnt, daß es sich bei der beobachteten Retention von ^{65}Zn aller Wahrscheinlichkeit nach nicht um eine echte Abspaltung, sondern um einen isotopischen Austausch des chelierten ^{65}Zn gegen das endogene stabile Zn handelt. Auch wenn man diesen Umstand berücksichtigt, bleibt die höhere Retention von ^{65}Zn im Falle von DTPA unerwartet, da zumindest für niedrigere Dosen der DTPA angenommen werden müßte, daß die austauschbare Fraktion des endogenen Zn-Pools größer ist als nach Verabfolgung von Zn-ÄDTA. Diese Aussage kann natürlich nur bedeuten, daß das metabolische Verhalten kleiner Zn-DTPA-Dosen, d.h. ihr sog. physiologischer Verdünnungsraum sich von dem der Zn-ÄDTA unterscheidet.

In allen bisher besprochenen Untersuchungen wurde entweder die Ausscheidung des ^{65}Zn mit dem Urin oder die Retention im gesamten Körper der Versuchstiere untersucht, während die Frage des Verteilungsmusters von ^{65}Zn nach Verabfolgung der Zn-Chelate bisher noch nicht berührt wurde. Aus diesem Grunde erschien es uns interessant, die Retention von ^{65}Zn nach Verabreichung verschiedener Dosen von markierter Zn-ÄDTA bzw. -DTPA in den einzelnen Organen zu untersuchen. Diese Versuchsreihe, die den ersten Teil der vorliegenden Arbeit darstellt, sollte weiterhin durch in vitro-Untersuchungen ergänzt werden, deren Aufgabe es war, den Einfluß beider Chelatbildner auf das elektrophoretische Verhalten von ^{65}Zn im Blutplasma festzustellen. Wir versprachen uns von diesen Untersuchungen an einem übersichtlichen und einfachen Modellsystem zusätzliche Information zu der uns interessierenden Frage.

II. Untersuchungen der Verteilung von ^{65}Zn im Organismus

1. Methodik

Als Versuchstiere dienten junge ausgewachsene Albinoratten-Männchen des Heiligenberg-Inzucht-Stammes, deren Ernährung aus "Altromin-R"-Pellets ($20 \mu\text{g Zn}\cdot\text{g}^{-1}$) und Wasser ad libitum bestand. Die zu prüfenden Chelate wurden in wässriger Lösung (0,5 ml, pH \sim 7) in die Schwanzvene injiziert.

Folgende Chelate wurden verwendet: $\text{Na}_3[\text{Zn-DTPA}]$ und $\text{Na}_2[\text{Zn-ÄDTA}]$; der Überschuß an freien Liganden beträgt $\leq 0,2 \%$. Für die Markierung der beiden Zn-Chelate verwendeten wir $^{65}\text{Zn Cl}_2$ (The Radiochemical Center, Amersham), das in sehr hoher spezifischer Aktivität (praktisch in trägerfreier Form) vorlag. Die zur Markierung der Chelatdosis verwendete Aktivität betrug in der Kontrollgruppe $\sim 1 \mu\text{Ci}$ pro Tier, in den Versuchen mit den Chelaten wurde die Dosis im Hinblick auf die Meßempfindlichkeit unserer Apparatur und die Chelatwirksamkeit auf $\sim 5 \mu\text{Ci}$ pro Tier erhöht. Die Dosierung der Zn-Chelate betrug 1 bzw. 10 μmol pro Tier.

Die Tiere wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der i.v. Injektion getötet (der früheste Zeitpunkt betrug 15 Min., der späteste 48 Stunden). Die Tiere wurden zu den angegebenen Zeitpunkten in Äthernarkose getötet; es wurde zunächst aus der Vena cava inf. 1 ml Blut entnommen, dann Leber, Milz, Nieren und 1 Femur herauspräpariert.

Die in den Gewebeproben enthaltene ^{65}Zn -Menge bestimmten wir durch Messung der γ -Aktivität mittels eines NaJ(Tl)-Bohrlochszintillators. Im Hinblick auf die günstige Zählgeometrie sowie die relativ harte vom ^{65}Zn emittierte γ -Strahlung verzichteten wir auf eine Veraschung der Organproben, und die Messungen wurden in allen Fällen im frischen Zustand durchgeführt. Die in den einzelnen Proben gefundenen Aktivitäten wurden in 1 % der injizierten ^{65}Zn -Dosis ausgedrückt, die wir durch Parallelmessungen aliquoter Teile der injizierten Lösungen bestimmten. Die im Femur gefundene

Aktivität wurde nach dem Vorgang von Donaldson (1924) mit dem Faktor 20 multipliziert, um einen Schätzwert für den ^{65}Zn -Gehalt im gesamten Skelett zu erhalten. Die gesamte Blutmenge wurde mit 13 % des Körpergewichts angenommen (Farris und Griffith 1963).

2. Ergebnisse

Der ^{65}Zn -Gehalt der von uns untersuchten Organe in Abhängigkeit von der Art und Dosis des Chelats sowie von der Zeit ist in den Tabellen 1 - 5 sowie - der besseren Übersichtlichkeit halber - in den Abbildungen 1 - 6 graphisch wiedergegeben.

Ohne auf Einzelheiten zunächst einzugehen, kann als wesentliches und mit den in der Einleitung zitierten Arbeiten in Übereinstimmung stehendes Ergebnis hervorgehoben werden, daß ein deutlicher Unterschied zwischen dem Verhalten von ^{65}Zn nach Verabreichung von 1 μmol Zn-DTPA im Vergleich sowohl zu der Kontrolle als auch zu den drei anderen Versuchsgruppen besteht: Die ^{65}Zn -Retention ist in diesem Falle zwar eindeutig niedriger als in der Kontrollgruppe, jedoch statistisch gesichert höher als nach Verabfolgung von 10 μmol Zn-DTPA und 1 bzw. 10 μmol Zn-ÄDTA. Auf der anderen Seite liegen sicherlich keine, zumindest keine stärkeren Unterschiede zwischen den drei zuletzt erwähnten Gruppen.

Im Blut (Tab. 1, Abb. 1) nimmt der ^{65}Zn -Gehalt während der ersten Stunde relativ sehr schnell ab, und die Unterschiede zwischen der Kontroll- und den Chelatgruppen, auf die wir schon hingewiesen hatten, manifestieren sich am stärksten erst ab der 4. Stunde. Das unterschiedliche Verhalten des ^{65}Zn in den 5 verschiedenen Gruppen, das bei der doppelt-logarithmischen Auftragung in Abb. 1 nicht so stark zum Ausdruck kommt, wird besonders bei Vernachlässigung der späteren Zeitpunkte und bei einer halblogarithmischen Darstellung (Abb. 2) deutlich. Sie zeigt eindeutig, daß die Blutclearance des ^{65}Zn bei beiden ÄDTA-Dosen praktisch

identisch ist, und weiterhin den klaren Unterschied in dem Verhalten der beiden DTPA-Dosen.

Was die ^{65}Zn -Retention in der Leber (Tab. 2, Abb. 3) betrifft, so wird der maximale Gehalt von rund 20 % in der Kontrollgruppe bereits nach 15 Minuten erreicht, und eine gesicherte Abnahme tritt frühestens nach der 8. Stunde auf, so daß zwischen 15 Minuten und der 8. Stunde offenbar ein Plateau besteht. Die Chelatgruppen verhalten sich insofern anders, als hier die maximale Konzentration erst zu späteren Zeitpunkten erreicht wird, und zwar im Falle der 1 μmol DTPA-Dosis bei etwa 30 - 60 Minuten eindeutig früher als bei den drei anderen Chelatgruppen, bei denen ein Anstieg der Aktivität noch bis zur 4. - 8. Stunde zu beobachten ist. Zu späteren Zeitpunkten, d.h. ab 8. Stunde, verläuft die Ausscheidung des ^{65}Zn aus der Leber in allen vier Gruppen mit einer praktisch gleichen Geschwindigkeit.

Was die Kinetik der ^{65}Zn -Retention in der Milz (Tab. 3, Abb. 4) betrifft, so liegt für alle Gruppen ein gleichsinniges Verhalten vor, indem eine gesicherte Abnahme der Aktivität erst ab 24. Stunde beobachtet wird.

Deutliche Unterschiede liegen wiederum in den Nieren (Tab. 4, Abb. 5) vor, indem - wenn man von der absoluten Höhe der Retention absieht - die Kinetik bei der 1 μmol DTPA-Dosis mit der der Kontrolle identisch ist, während die Ausscheidung des ^{65}Zn aus den Nieren in allen anderen Gruppen im doppelt-logarithmischen Maßstab befriedigend durch eine Gerade wiedergegeben werden kann.

Das Skelett (Tab. 5, Abb. 6) ist das einzige Gewebe, bei dem die Zeitabhängigkeit der ^{65}Zn -Retention im Falle der 10 μmol DTPA-Dosis sich möglicherweise von den beiden ÄDTA-Dosen unterscheidet, indem die in den ÄDTA-Gruppen deutliche Abnahme der Aktivität zwischen der 1. und 4. Stunde bei 10 μmol DTPA-Dosis vermißt wird. Es ist jedoch fraglich, ob diese nicht sehr stark ausgeprägten Unterschiede statistisch signifikant sind.

In den Tabellen 1 - 5 ist neben dem ^{65}Zn -Gehalt der Organe, in % der ^{65}Zn -Dosis ausgedrückt, auch der relative Gehalt angeführt; relativ, indem der ^{65}Zn -Gehalt in % der in den untersuchten Organen gefundenen Aktivität ausgedrückt ist. Bei dieser Darstellungsart bleiben die quantitativen Unterschiede unberücksichtigt, dagegen kommt die unterschiedliche Kinetik klar zum Ausdruck. Auch bei dieser Wiedergabe verhält sich die 1 μmol DTPA-Dosis insofern exzeptionell als die Retention von ^{65}Zn durch die Leber während der ersten Stunde relativ höher als bei den anderen Chelatgruppen ist und sich in dieser Beziehung nur unwesentlich von den Verhältnissen in der Kontrollgruppe unterscheidet.

III. In vitro-Untersuchungen

1. Vorbemerkungen

Die Aufgabe dieser Untersuchungen war es, das Zn der Plasmaproteine mit ^{65}Zn zu markieren und die Verteilung des ^{65}Zn bei verschiedenen Konzentrationen der Ca- bzw. Zn-Chelate der ÄDTA und DTPA zu bestimmen. Diese Fragestellung bedingt folgende, an die Trennmethode zu stellende Forderungen: 1) Das Trennverfahren als solches sollte die ^{65}Zn -Verteilung über die einzelnen Komponenten des Ansatzes nicht beeinflussen und 2) eine scharfe und quantitative Trennung des Chelatbildners von den Plasmaproteinen ermöglichen.

Von vornherein kam die Fällung der Proteine durch Schwermetallsalze nicht in Frage; zwar werden hierbei die Proteine quantitativ gefällt, und der Chelatbildner bleibt im Rückstand, jedoch müßte mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß das originale Verteilungsmuster des ^{65}Zn beeinflußt wird, da die Schwermetallionen als konkurrierende Reaktionspartner fungieren würden.

Eine weitere Methode zur Abtrennung der Plasmaproteine ist die Alkoholfällung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nach Cohn und Gurd (1950). Mit Hilfe der Reaktion nach Lowry (1951) konnten

wir jedoch zeigen, daß die Fällung der Proteine hierbei nicht quantitativ ist, da wir nach Fällung und Zentrifugation der Proteine bei 30 000 UpM (30 Minuten) im Überstand immer noch Spuren von Proteinen nachweisen konnten. Wir gingen deshalb dazu über, die Anwendbarkeit der Papierelektrophorese für unsere Fragestellung zu prüfen.

2. Papierelektrophoretische Untersuchungen

Wir verwendeten hierfür das Elektrophoresegerät der Fa. LKB, als Trägermaterial Papierstreifen der Fa. Schleicher & Schüll (Nr. 2043 A). Als Puffer diente Natriumveronal-HCl mit einer Ionenstärke von 0,058 und einem pH-Wert von 7,4. Die Laufzeit betrug 15-18 Stunden, die Stromstärke $\sim 0,1 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-1}$. Nach Beendigung der elektrophoretischen Trennung wurden die Papierstreifen getrocknet und mittels eines 2-kammrigen fensterlosen Methandurchflußzählrohrs radiometrisch ausgewertet. Die Geschwindigkeit des Durchzugs des Streifens durch das Zählrohr und der Registrierung der Aktivität mittels eines Ratemeters betrug $120 \text{ mm} \cdot \text{h}^{-1}$, die Blende der Zählrohre 1 mm. Die danach mit Bromviolett angefärbten Proteine wurden mittels eines Extinktionsschreibers der Fa. Zeiss registriert.

Abb. 7 zeigt, daß trägerfreies $^{65}\text{Zn Cl}_2$ in wässriger Lösung bei pH = 7,4 elektrophoretisch nicht wandert, sondern an der Auftragstelle liegen bleibt. Demgegenüber ist im Serum eine eindeutige Wanderung des ^{65}Zn mit den Proteinen festzustellen; Abb. 8 zeigt das Pherogramm eines Ansatzes, der 15 Minuten nach Inkubation bei 20°C elektrophoretisch getrennt wurde. Eine selektive Bindung des ^{65}Zn durch eine definierte Proteinfraction liegt offenbar nicht vor, indem die Aktivität sich in den β - und α -Globulinen sowie dem Albumin nachweisen läßt, während die γ -Globuline praktisch kein ^{65}Zn zu binden scheinen. Was die erwähnte Bindung des ^{65}Zn durch Albumin betrifft, ist allerdings darauf hinzuweisen, daß die beiden Peaks nicht kongruent sind, indem der Abstand zur Auftragsstelle beim ^{65}Zn kürzer ist. Wird die Inkubationszeit auf 6 bzw. 15 Stunden verlängert, so resultieren die in Abb. 9 und 10 wiedergegebenen Pherogramme. Man gewinnt den Eindruck, daß bei längeren Inkuba-

tionszeiten die Bindung des ^{65}Zn durch die Albumine bzw. - vorsichtiger ausgedrückt - die am schnellsten wandernde ^{65}Zn -Fraktion in den Hintergrund tritt und die Bindung durch die Globuline dominiert.

Abb. 11 zeigt, daß trägerfreies ^{65}Zn in einer 10^{-4} molaren Lösung von Ca-ÄDTA einen relativ schnell wandernden und scharfen Aktivitätspeak aufweist. Allerdings ist eine gewisse Asymmetrie des Peaks unverkennbar, und zwar liegt in Richtung zur Auftragsstelle eine deutliche "Schleppe" vor. Die Elektrophorese bei Zusatz einer 10^{-4} molaren Ca-ÄDTA-Lösung zu ^{65}Zn -markiertem Serum gibt eine nicht vollständige Trennung der beiden Aktivitätskomponenten (Abb. 12). Der überwiegende Bruchteil des ^{65}Zn wandert als ÄDTA-Chelat. Auch hier jedoch ist die Asymmetrie des Chelatpeaks unverkennbar, so daß zwischen den Aktivitäten, die durch ÄDTA einerseits und durch die Proteine andererseits gebunden sind, die Nulllinie nicht erreicht wird.

Wesentlich andere Verhältnisse liegen im Fall von DTPA vor. Das Pherogramm einer wässrigen 10^{-4} molaren Lösung von Ca-DTPA und ^{65}Zn ist in Abbildung 13 wiedergegeben. Es fällt zunächst die im Vergleich zu ÄDTA geringere Wanderungsgeschwindigkeit des Maximums auf; ferner ist der Aktivitätspeak wesentlich breiter als im Falle von ÄDTA, so daß sogar noch an der Auftragsstelle Spuren von Aktivität nachzuweisen sind. Die Breite des Aktivitätspeaks legt die Annahme nahe, daß es sich nicht um eindeutig definierte Chelatspezies handelt, vielmehr um ein Gemisch verschiedener Chelate, die sich in ihrer Ladungszahl unterscheiden. An sich ist diese Vermutung insofern nicht unplausibel, als die höhere Zähigkeit der DTPA die Bildung verschiedener Chelatspezies wahrscheinlich macht. Da bereits in wässriger DTPA-Lösung die ^{65}Zn -Verteilung einen sehr breiten und verwaschenen Peak gibt, konnte vermutet werden, daß in einem Ansatz von DTPA und Serum sich eine Überlappung des Chelatpeaks mit der Proteinfraction ergeben würde. Dies ist auch der Fall, wie Abb. 14 zeigt. Es unterliegt keinem Zweifel, daß die papierelektrophoretische

Trennmethode für unsere Fragestellung ungeeignet ist, da sowohl bei ADTA als auch und in noch stärkerem Maße bei DTPA eine saubere Trennung der Bindung des Zn durch die Proteine einerseits und durch die Chelatbildner andererseits gebundenen ^{65}Zn nicht gewährleistet ist.

3. Gelfiltration über Sephadex

a) Orientierende Versuche

Wir folgten bei der Gelfiltration über Sephadex im wesentlichen der von Flodin (1962) eingehend beschriebenen Methodik. Bei der überwiegenden Mehrzahl der Versuche trennten wir über Sephadex G-25 und nur in einem speziellen Versuch über Sephadex G-200. Im Falle von Sephadex G-200 hatte die Säule Ausmaße von 55 x 2 cm; das innere Volumen betrug 113 ml, während wir für das äußere Volumen 51 ml errechneten. Bei der Trennung über G-25 wies die Säule ein Ausmaß von 90 x 1,5 cm auf, das äußere Volumen war in diesem Fall 64 ml, das innere Volumen 80 ml. Das Sephadex-Gel wurde in Natrium-Veronal-HCl-Puffer mit einer Ionenstärke von 0,01 und einem pH-Wert von 7,4 aufgeschwemmt; den gleichen Puffer verwendeten wir auch als Elutionsflüssigkeit.

Die ^{65}Zn -Aktivität des Eluats wurde fortlaufend mittels eines NaJ(Tl)-Szintillators gemessen und mit einem Rate-meter registriert.

Als wesentlich erwies sich das Material der für die Ableitung von der Sephadexsäule verwendeten Schläuche. Wir prüften eine Reihe verschiedener Materialien und fanden in allen Fällen eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Retention des ^{65}Zn durch das Schlauchmaterial. Das einzige Material, das eine sehr geringe Affinität zu ^{65}Zn aufweist, ist Teflon, so daß alle weiteren Versuche mit Teflonschläuchen durchgeführt wurden.

In dem ersten orientierenden Versuch sollte die Frage geklärt werden, welche Effektivität die Trennmethode über Sephadex aufweist und durch welche der hierbei getrennten Proteinfractionen das ^{65}Zn gebunden wird. Wir verwendeten hierzu die Trennsäule mit Sephadex G-200. Das trägerfreie ^{65}Zn wurde dem Serum zugegeben und der ^{65}Zn -Gehalt des Eluats sowie mit Hilfe eines Uvicord-Geräts die optische Extinktion bei $254\text{ m}\mu$ bestimmt und registriert. Da der Veronalpuffer ebenfalls bei $254\text{ m}\mu$ eine Extinktion zeigt, verwendeten wir für diesen speziellen Versuch einen Borat-Puffer mit einer Ionenstärke von 0,01 und einem pH-Wert von 7,75.

Die Ergebnisse des orientierenden Versuchs sind in Abb. 15 wiedergegeben. Man kann drei Peaks unterscheiden: der nach 6 Stunden Elutionszeit auftretende Peak III dürfte dem Albumin entsprechen, während es sich bei dem Peak II um Globuline handelt. Der auffallend hohe Peak I dürfte wahrscheinlich durch den starken Gehalt des von uns verwendeten Humanserums an Lipoproteiden bedingt sein. Der Nachweis, daß es sich bei dem Peak III im wesentlichen um Albumine handelt, wurde dadurch erbracht, daß die entsprechenden Eluatfraktionen mit Sephadex G-25 eingeeengt und dann papierelektrophoretisch nach der oben beschriebenen Methode getrennt wurden; mit dem einzigen Unterschied, daß wir einen Borat-Puffer mit einer Ionenstärke von 0,529 und pH 7,75 verwendeten. Die Laufzeit war wiederum 15 Stunden und die Stromstärke $\sim 0,1\text{ mA}\cdot\text{cm}^{-1}$. Das in Abb. 16 wiedergegebene Pherogramm zeigt, daß es sich bei den in den entsprechenden Eluatfraktionen enthaltenen Proteinen im wesentlichen um Albumine handelt, während die Konzentration der Globuline eindeutig niedriger als im Nativserum ist.

Gibt man dem Serum eine bekannte Menge von ^{65}Zn zu, so findet man, wie der Zusammenstellung in Tabelle 6 zu entnehmen ist, in den Proteinfractionen des Serums im Durchschnitt nur 81 % der Aktivität, während die restlichen 20 % in der Sephadexsäule zurückgehalten werden. Es war

deswegen auch notwendig, nach jeder Trennung die Säulen mit einer 10^{-2} molaren $\text{Na}_2\text{ÄDTA}$ -Lösung intensiv nachzuspülen, um das in der Säule retinierte ^{65}Zn quantitativ zu entfernen.

Verdünt man das ^{65}Zn isotopisch mit steigenden Dosen von ZnCl_2 , so nimmt, wie Tabelle 6 zeigt, die durch die Proteine gebundene Menge des ^{65}Zn mit steigender Dosis ab. Rechnet man von diesen Prozentsätzen und von den jeweiligen Zn-Dosen auf die retinierte Menge des stabilen Zn um, so ergibt sich ein mit $48,7 \pm 1,4 \%$ Zn pro 1 ml Blut annähernd konstanter Wert. Dies weist darauf hin, daß höhere Zn-Mengen die Kapazität der Zinkbindung des Serums übersteigen. Da der Zn-Gehalt in dem von uns verwendeten Serum nach der Methode von Vallee und Gibson (1948) zu $1,67 \%$ pro 1 ml bestimmt wurde, ist die Zn-Bindungskapazität des Serums rund 30 mal größer als der normale Zn-Gehalt.

Die letzte, in den orientierenden Untersuchungen zu klärende Frage war, ob die Trennung des durch die Plasmaproteine einerseits und durch den Chelatbildner andererseits gebundenen ^{65}Zn quantitativ ist: Serum wurde mit ^{65}Zn markiert und die gleiche Menge einer 10^{-2} molaren Lösung von Ca-ÄDTA zugegeben. Bei dieser Konzentration müßten nach den Ergebnissen der papierelektrophoretischen Versuche 100 % des ^{65}Zn durch ÄDTA gebunden sein. Wir trennten über Sephadex G-25, d.h. wir verzichteten wie auch bei den folgenden Versuchen mit Chelatbildnern auf die Auftrennung der Proteine und bestimmten die Extinktion des Eluats bei $254 \text{ m}\mu$ und gleichzeitig den ^{65}Zn -Gehalt. Da ÄDTA bei $254 \text{ m}\mu$ nicht absorbiert, waren zwei distinkte Peaks (die der Extinktion einerseits und die der Aktivität andererseits) zu erwarten. Dies ist, wie Abb. 17 zeigt, tatsächlich der Fall. Somit können wir zusammenfassend feststellen, daß die Methode der Gelfiltration über Sephadex praktisch frei von methodisch bedingten Artefaktmöglichkeiten ist und außerdem eine quantitative und vollständige Trennung der Proteine von den Chelatbildnern erlaubt.

b) Ergebnisse

Die Versuchsanordnung bei den folgenden Untersuchungen war folgende: Es wurde über Sephadex G-25 getrennt; das aufgetragene Volumen betrug jeweils 2 ml, und zwar 0,3 ml Serum, 0,3 ml der Chelatlösung und das zur Auffüllung auf 2 ml verwendete Elutionsmittel. Der pH-Wert des Eluats und des zu trennenden Ansatzes betrug 7,4. Markiert wurde wiederum mit trägerfreiem ^{65}Zn in einer Aktivität von ungefähr 0,5 μC pro ml Serum. Wenn nicht anders vermerkt, wurde das Serum mit ^{65}Zn markiert, 5 Minuten bei 20° inkubiert und anschließend der Chelatbildner hinzugefügt. Der Druck, mit dem das Elutionsmittel durch die Säule floss, betrug 150 cm Wassersäule, das Durchflußvolumen ca. 1 ml min.. Um die Bilanz der Aktivität zu bestimmen, wurden aliquote Teile der zu trennenden Lösung unter gleichen Bedingungen wie die einzelnen Fraktionen des Eluats mittels eines NaJ(Tl)-Szintillationsbohrlochkristalls gemessen. Die Bilanz nach erfolgter Trennung betrug im Durchschnitt 95 %. Die im Serum bzw. durch den Chelatbildner gebundene ^{65}Zn -Menge wurde in % der jeweiligen Bilanz ausgedrückt. Die ^{65}Zn -Bestimmung im Eluat erfolgte wiederum mittels des oben beschriebenen Durchflußzählers und zusätzlich (zur Kontrolle) mit Hilfe eines NaJ(Tl)-Bohrlochkristalls. Auf die Bestimmung der Absorption der Proteine konnte, nachdem die vorangehenden Versuche gezeigt hatten, daß sie eindeutig vor den Chelatbildnern eluiert werden, verzichtet werden.

In der ersten Versuchsreihe wurde der Einfluß verschiedener Konzentrationen der Ca-Chelate von ÄDTA und DTPA geprüft. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 7 und graphisch in Abb. 18 wiedergegeben. Sie zeigen, daß beide Liganden bei einer Molarität $\leq 10^{-5}$ praktisch unwirksam sind, indem 100 % des ^{65}Zn in der Proteinfraction gefunden werden. Eine Erhöhung der Konzentration auf 10^{-3} molar dagegen bewirkt eine praktisch 100 %ige Bindung des ^{65}Zn durch den Chelatbildner. Die Frage, ob Unterschiede zwischen dem Verhalten von ÄDTA und DTPA bestehen, kann

dahingehend beantwortet werden, daß bei relativ niedrigen Konzentrationen von $\leq 10^{-4}$ molar beide Chelatbildner annähernd gleich wirksam sind, während bei höheren Konzentrationen DTPA den ^{65}Zn -Gehalt der Proteine etwa stärker als die entsprechenden ÄDTA-Konzentrationen senkt. Diese Unterschiede sind jedoch nur geringfügiger Art, und es ist auch im Hinblick auf den steilen Verlauf der Dosis-Effekt-Kurve (die Neigung beträgt -1) fraglich, ob sie real oder durch eine nicht ausreichend genaue Einstellung der Konzentration bedingt sind.

Verwendet man anstelle der Ca-Chelate die entsprechenden Zn-Chelate, so erhält man im Falle der DTPA im großen und ganzen identische Effektivitätskurven der Ca- und Zn-Chelate wie bei Ca-DTPA. Im niedrigen Konzentrationsbereich von $\sim 10^{-5}$ molar wird allerdings im Falle Zn-DTPA ein etwas größerer Bruchteil von rund 10 - 30 % ^{65}Zn mobilisiert im Gegensatz zu der praktisch fehlenden Wirksamkeit vergleichbarer Konzentrationen des Ca-Chelats. Auffallend ist das exzeptionelle Verhalten von Zn-ÄDTA, das im Gegensatz zu DTPA eine deutlich geringere Wirksamkeit als das Ca-Chelat zeigt, während - dies sei hier noch einmal betont - im Falle der Ca-Chelate kein wesentlicherer Unterschied zwischen der Wirksamkeit beider Chelatbildner vorlag.

Wie auch in den Versuchen mit den Ca-Chelaten wurde bei den Zn-Verbindungen die Trennung über Sephadex kurzfristig, und zwar nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten durchgeführt. Wird jedoch die Inkubationsdauer verlängert, so hat dies im Falle von Zn-DTPA keinen Einfluß auf die Verteilung des ^{65}Zn , während im Falle der Zn-ÄDTA die Effektivität deutlich zunimmt; dies ist der Zusammenstellung in Tabelle 8 sowie der graphischen Wiedergabe in Abb. 18 zu entnehmen. Nach längerer Inkubation nimmt der ^{65}Zn -Gehalt der Plasmaproteine bei allen Konzentrationen der Zn-ÄDTA mit fortschreitender Zeit ab und erreicht schließlich den gleichen Wert, wie er bei kurzfristiger Inkubation mit Zn-DTPA erhalten wird.

IV. Diskussion der Versuchsergebnisse

Die nach Verabfolgung der mit ^{65}Zn markierten Zn-Chelate der ÄDTA und DTPA in den verschiedenen Organen zu beobachtende Retention von ^{65}Zn könnte grundsätzlich durch eine 1) echte Retention von Zn (infolge einer Instabilität der Zn-Chelate im physiologischen Milieu) und/oder 2) durch isotopischen Austausch des mit ^{65}Zn markierten und in chelierter Form zugeführten Zn mit dem nichtradioaktiven Zn-Isotop des endogenen Zn-Pools bedingt sein.

Würde der mit 1) gekennzeichnete Mechanismus eine ausschlaggebende Rolle spielen, so wäre aus komplex-chemischen Gründen eine Abnahme der ^{65}Zn -Retention mit wachsender Chelatdosis zu erwarten, was auch, wie der graphischen Wiedergabe der Ergebnisse in Abb. 19 zu entnehmen ist, tatsächlich der Fall ist. Weiterhin sollte die ^{65}Zn -Retention im Falle der DTPA wesentlich geringer als nach Verabfolgung von Zn-ÄDTA sein; dies im Hinblick auf den rund 100 mal höheren Wert der sog. effektiven Stabilitätskonstante der Zn-DTPA (vgl. hierzu I.). Diese Erwartung konnte jedoch experimentell, wie Abb. 19 zeigt, nicht bestätigt werden, indem die ^{65}Zn -Retention nach Verabfolgung von 10 μmol Zn-DTPA auf keinen Fall geringer als nach Verabfolgung von 10 μmol ÄDTA ist; im Gegenteil, die Werte liegen bei allen Organen sogar etwas höher als nach Injektion von Zn-ÄDTA. Noch stärker ausgeprägt ist der Unterschied in dem Verhalten beider Liganden bei der niedrigeren Dosis von 1 μmol ; die ^{65}Zn -Retention ist im Falle von DTPA durchgehend und erheblich höher. Diese Ergebnisse stehen übrigens in guter Übereinstimmung mit den in der Einleitung zitierten Untersuchungen von Catsch und Lê (1966) sowie Rosoff et al. (1965).

Im Hinblick auf diese nicht zu übersehende Diskrepanz kann der Mechanismus 1), d.h. die Annahme einer echten Abspaltung und Retention von Zn als wenig wahrscheinlich ausgeschlossen werden, und es erhebt sich somit die Frage, ob die experimentellen Befunde mit der Annahme 2) des isoto-

pischen Austausches vereinbar sind. Das Ausmaß des Austausches, anders ausgedrückt die scheinbare Retention von ^{65}Zn , sollte hierbei in erster Näherung durch das Verhältnis der Mengen des endogenen und austauschbaren Zn einerseits und des durch den Chelatbildner gebundenen Zn andererseits bestimmt sein. Demnach wäre bei Erhöhung der Zn-Chelatdosis eine Abnahme der scheinbaren ^{65}Zn -Retention zu erwarten, was auch tatsächlich bei beiden Chelatbildnern der Fall ist. Unverständlich bleibt jedoch wiederum, warum der isotopische Austausch im Falle der 1 μmol DTPA-Dosis ein so viel höheres Ausmaß als nach Zuführung von 1 μmol Zn-ÄDTA erreicht.

Überlegungen bezüglich der für diesen auffallenden Befund verantwortlichen Ursachen könnten von der Tatsache ausgehen, daß DTPA 8 Elektronendonoratome besitzt, während es sich bei der ÄDTA um einen nur 6-zähligen Liganden handelt. Da andererseits Zn^{2+} eine maximale Koordinationszahl von 4 betätigt, ist im Falle der höherzähligen DTPA mit der Bildung relativ stabiler bimetallischer Zn_2 - oder ZnCa -DTPA-Chelate und eventuell auch mit der Möglichkeit von polymeren Chelaten zu rechnen. Daß Zn_2 -DTPA-Chelate tatsächlich gebildet werden, wurde von Anderegg et al. (1959) eindeutig nachgewiesen, wobei die Stabilitätskonstante $K_{\text{Zn}_2\text{L}}^{\text{ZN}}$ mit $10^{4,4}$ einen relativ hohen Wert erreicht. Die ÄDTA dagegen ist nicht in der Lage, bimetallische Chelate von nennenswerterer Stabilität zu bilden.

Die Annahme, daß es im Falle der DTPA zu höhermolekularen polymeren Chelatspezies kommt und daß dies die Ursache für die erhöhte ^{65}Zn -Retention darstellt, kann jedoch insofern ausgeschlossen werden, da in diesem Fall eine bevorzugte Ablagerung des ^{65}Zn in den Organen des RES zu erwarten gewesen wäre. Dies ist jedoch nicht der Fall, und die erhöhte Ablagerung von ^{65}Zn betrifft praktisch alle von uns untersuchten Organe, wenn auch in unterschiedlich starker Ausprägung.

Die bimetallischen DTPA-Chelate unterscheiden sich von dem einfachen 1:1-Chelat (Zn-DTPA) durch die Zahl der negativen Ladungen; sie beträgt im ersteren Fall 1, beim einfachen Chelat dagegen 3. Untersuchungen mit den ^{14}C -markierten Ca-Chelaten der ÄDTA und DTPA (Foreman 1960) haben nun gezeigt, daß der physiologische Verdünnungsraum der Ca-Chelatanionen rund 25 % des Körpergewichts ausmacht und daß deshalb (sowie im Hinblick auf die Tatsache, daß keine ^{14}C -Aktivität in den Erythrocyten nachgewiesen werden konnte) die Annahme nahegelegt wird, daß die mehrfach negativ geladenen Chelatanionen nicht in der Lage sind, Zellenmembranen zu permeieren, und sich im wesentlichen nur im extracellulären Wasser verteilen. Es wäre nun durchaus denkbar, daß das nur eine negative Ladung aufweisende Zn_2 -DTPA eine im Vergleich zum einfachen Zn-DTPA erhöhte Zellpermeabilität und damit aber auch einen größeren Verteilungsraum aufweist. Da - wie bereits erwähnt - im Falle der ÄDTA mit der Bildung von bimetallischen Chelaten nicht gerechnet werden kann, erscheint die Annahme eines größeren physiologischen Verdünnungsvolumens von DTPA nicht unplausibel. Es bedarf jedoch noch die Tatsache einer Erklärung, warum dies nur bei der kleineren Zn-DTPA-Dosis der Fall ist.

Die Untersuchungen von Harmuth-Hoene (1967), Harmuth-Hoene et al. (1967) sowie Havlicek (1967) haben in Übereinstimmung mit den obigen Überlegungen gezeigt, daß Zn-DTPA noch in der Lage ist, endogenes Zn (unter Bildung bimetallischer Chelate) zu mobilisieren. Andererseits steht jedoch auch fest, daß die mobilisierte und mit dem Urin zur Ausscheidung gebrachte Zn-Menge erheblich größer ist als die im Blutplasma vorliegende Zn-Menge. Aus der Tatsache, daß die mobilisierbare Zn-Fraktion des Blutplasmas offenbar nur sehr beschränkt ist, ist zu folgern, daß bei höheren Zn-DTPA-Dosen die Konzentration der bimetallischen Chelate im Vergleich zur gesamten Chelatdosis zu vernachlässigen ist; bei kleineren Chelatdosen dagegen würde die Bildung der Zn_2 -DTPA prozentual stärker ins Gewicht fallen und damit könnte auch der erhöhte isotopische

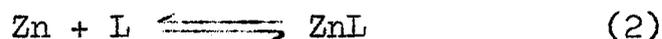
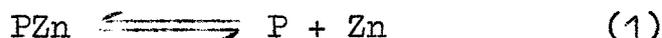
Austausch infolge des größeren physiologischen Verdünnungsvolumens sich manifestieren. Dies gilt umsomehr, als die Menge des intracellulären Zn ein Vielfaches des durch die Plasmaproteine gebundenen Zn ist (Gilbert und Taylor 1956).

Der Vergleich der Kinetik der ^{65}Zn -Retention in den verschiedenen Versuchsgruppen zeigte, daß die erhöhte ^{65}Zn -Retention im Falle der 1 μmol Zn-DTPA-Dosis sich am stärksten in der Leber manifestiert. Dies würde bei Zutreffen der obigen Arbeitshypothese bedeuten, daß das Zn_2 -DTPA sich in besonderem Maße in den Leberzellen anreichert. Auf der anderen Seite ist nicht ohne weiteres einzusehen, warum das exzeptionelle Verhalten der 1 μmol Zn-DTPA-Dosis sich auch im Knochen manifestiert, da das Permeabilitätsvermögen auf das Verhalten der Chelate in diesem Gewebe keinen Einfluß ausüben sollte. Es kann somit die von uns zur Diskussion gestellte Erklärung, zumindest als alleinige Erklärung, die bestehenden Befunde offenbar nicht befriedigend erklären.

Eine grundsätzlich andere Deutung wäre die Annahme, daß der isotopische Austausch im Falle der Zn-DTPA erheblich schneller als bei Zn-ÄDTA verläuft, wobei außerdem ein Unterschied in den Austauschgeschwindigkeiten bei den beiden DTPA-Dosen vorliegen sollte. Eine Entscheidung darüber, ob dieser Deutungsversuch zutrifft, kann auf Grund der in vivo-Ergebnisse allein natürlich nicht getroffen werden, und es soll im folgenden geprüft werden, ob die in vitro-Versuche eine diesbezügliche Information enthalten.

Betrachten wir zunächst die mit den Ca-Chelaten der ÄDTA und DTPA erhaltenen Ergebnisse. Sie zeigten, daß mit zunehmender Chelatdosis der Gehalt der Plasmaproteine an ^{65}Zn abnimmt. Es kann sich dabei natürlich nur um eine echte Mobilisation des primär durch die Plasmaproteine gebundenen (und mit ^{65}Zn markierten) Zn handeln. Bei dieser Annahme ist jedoch überraschend, daß DTPA praktisch die gleiche Wirksamkeit wie ÄDTA zeigt, zumindest nur wenig

wirksamer ist, während auf Grund der 100 mal höheren effektiven Stabilitätskonstante der DTPA eine entsprechend stärkere Effektivität dieses Chelatbildners zu erwarten gewesen wäre. Diese Überlegung gilt jedoch nur für den Fall, daß die Mobilisierung des Zn über die freien Zn-Ionen gemäß den Reaktionen



verläuft. Mit P wird das Protein, mit L der Chelatbildner bezeichnet. Es ist jedoch auch ein grundsätzlich andersartiger Mobilisationsmechanismus denkbar. Der erste Schritt wäre die Bildung eines sog. ternären Komplexes



die zweite Reaktion der Zerfall des ternären Komplexes



Voraussetzung hierfür ist, daß die effektive Stabilitätskonstante des ZnL-Komplexes größer ist als die des PZn-Komplexes ist. Bestimmend für das Ausmaß der Zn-Mobilisierung wäre in erster Linie die Reaktion (3); hierbei kann aber natürlich nicht mit den Stabilitätskonstanten der einfachen ZnL-Chelate operiert werden, die ja definitionsgemäß nur für den Fall freier Zn-Ionen Gültigkeit haben. Bei der Reaktion (3) beteiligen sich nicht alle potentiellen Ligandenatome des Chelatbildners, sondern eine nur beschränkte Anzahl. In diesem Falle sollten aber keine wesentlicheren Unterschiede in der Effektivität von DTPA und ÄDTA bei der Bildung der ternären Komplexe beobachtet werden, was auch in Übereinstimmung mit den tatsächlich erhobenen Befunden steht. Es ist in diesem Zusammenhang darauf hinzuweisen, daß an einem anderen System, und zwar der Inaktivierung der Zn-haltigen Carboanhydratase, von Carpy (1967) nachgewiesen wurde, daß der Inaktivierung des Enzyms (der eine echte Mobilisierung von Zn ursächlich

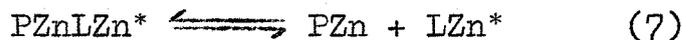
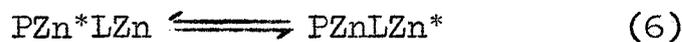
zugrunde liegt) die Bildung eines ternären Komplexes vorausgeht und daß - wie auch in unseren Versuchen - eine Korrelation zwischen Inaktivierungsausmaß und effektiver Stabilitätskonstante nicht vorliegt.

Was den Einfluß der Zn-Chelate betrifft, so ist zunächst festzuhalten, daß Zn-DTPA einen stärkeren Einfluß auf den ^{65}Zn -Gehalt der Proteine als Ca-DTPA ausübt, indem - zumindest bei niederen Konzentrationen - der ^{65}Zn -Gehalt der Proteine durch das Zn-Chelat in stärkerem Maße als durch das Ca-Chelat gesenkt wird. Dieser Befund besagt, daß bei relativ niedrigen Konzentrationen des Chelatbildners die austauschbare Zn-Fraktion des Blutplasmas größer als die mobilisierbare Zn-Fraktion ist.

Der zweite und auf den ersten Blick überaus überraschende Befund ist der starke Unterschied in der Wirksamkeit der Zn-ÄDTA und Zn-DTPA, indem im Gegensatz zu den Verhältnissen bei den Ca-Chelaten Zn-ÄDTA wesentlich schwächer wirksam als Zn-DTPA ist; allerdings nur unter der Voraussetzung, daß die Trennung der Komponenten des Ansatzes kurzfristig nach der Inkubierung vorgenommen wird. Weiterhin ist überraschend, daß bei längeren Inkubationszeiten im Falle der DTPA sich kein Einfluß der Inkubierungszeit bemerkbar macht, während im Falle der ÄDTA deren Wirksamkeit mit fortschreitender Zeit eindeutig zunimmt, so daß bei langen Inkubationszeiten kein Unterschied mehr in der Wirkung der beiden Chelatbildner vorliegt. Dieser Befund bedeutet offenbar, daß der isotopische Austausch im Falle der Zn-ÄDTA wesentlich langsamer als bei Zn-DTPA verläuft; der Austausch scheint im letzteren Fall sehr schnell vonstatten zu gehen, da die Inkubierungszeit sich hier als ohne Einfluß auf die Verteilung des ^{65}Zn erwies.

Zur Deutung dieser Befunde soll zunächst in einer allgemeinen Form auf die dem isotopischen Austausch ursächlich zugrunde liegenden möglichen Reaktionsmechanismen eingegangen werden: Der isotopische Austausch könnte zunächst über das freie dissoziierte Zn^{2+} ablaufen. Da der PZn-Wert

in unserem System im Hinblick auf die relativ hohe Bindungsstabilität sowohl der Protein-Zn als auch der ÄDTA- bzw. DTPA-Zn-Komplexe sehr groß ist, wäre die Annahme nicht unplausibel, daß der isotopische Austausch deswegen relativ langsam verläuft. Es erhebt sich hier aber sogleich die Frage, warum bei der (chemisch der ÄDTA doch sehr eng verwandten) DTPA die Austauschprozesse so viel schneller verlaufen. Diese Diskrepanz führt zu der Diskussion eines grundsätzlich anderen Mechanismus, bei dem der isotopische Austausch nicht über die freien Zn-Ionen, sondern über die Bildung von gemischten Komplexen verläuft, und zwar entsprechend den folgenden Reaktionsschritten:



Mit Zn^* ist das radioaktiv markierte Zn bezeichnet. Es ist nun ohne weiteres denkbar, daß die sterische Anordnung der beiden Zn-Atome in dem gemischten Komplex ihren isotopischen Austausch (Reaktion (6)) in starkem Maße beschleunigt.

Wie weiter oben erwähnt wurde, bestimmten wir den Zn-Gehalt des von uns untersuchten Serums zu $\sim 1,7 \gamma \text{ Zn} \cdot \text{ml}^{-1}$. Dies entspricht einer ungefähr $2 \cdot 10^{-5}$ molaren Konzentration. Es müßte demnach bei äquimolaren Zn-Chelat-Konzentrationen und bei Vorliegen des isotopischen Austausches eine Reduktion des ^{65}Zn -Gehalts des Blutplasmas um 50 % erwartet werden. Tatsächlich liegt der Gehalt mit 80 % eindeutig höher. Das Gleiche gilt natürlich auch für die höheren Chelatkonzentrationen; auch hier wird der ^{65}Zn -Gehalt des Blutplasmas in wesentlich schwächerem Maße reduziert, als auf Grund des Verhältnisses der Zn-Konzentrationen in den beiden austauschbaren Komponenten zu erwarten wäre. Auch diese Diskrepanz läßt sich zwanglos mit dem oben postulierten Austauschmechanismus (der Bildung intermediärer

gemischter Komplexe) erklären, da die Konzentration des gemischten Komplexes nicht nur eine Funktion der Chelatkonzentration, sondern auch der Gleichgewichtskonstante der Reaktion (5) ist.

Daß die Konstante der Reaktionen (5) und (7) im Falle der höherzähligen DTPA wesentlich größer als für ÄDTA ist, erscheint durchaus plausibel.

Wir können somit zusammenfassend feststellen, daß insofern eine gute Übereinstimmung zwischen den in vitro- und in vivo-Versuchen besteht, als für beide Versuchsanordnungen die Unterschiede in dem Verhalten von Zn-ÄDTA und Zn-DTPA zwanglos auf unterschiedliche Austauschgeschwindigkeiten beim isotopischen Austausch zurückgeführt werden könnten.

Der in vivo festgestellte Unterschied zwischen den beiden DTPA-Dosen würde im Rahmen dieser Überlegungen sich ebenfalls befriedigend mit der Tatsache erklären, daß die Zn-Konzentration des Blutplasmas relativ niedrig ist und daß damit auch Reaktion (5) sich nur bei niedrigen Chelatkonzentrationen bemerkbar machen sollte.

Diese Überlegungen schließen natürlich die andere, von uns diskutierte Erklärungsmöglichkeit nicht aus, daß bei niedrigen Zn-DTPA außerdem vorzugsweise bimetallische Chelate gebildet werden, die einen größeren Verteilungsraum besitzen.

V. Zusammenfassung

1) Ratten wurden mit 1 und 10 μmol Zn-ÄDTA bzw. Zn-DTPA (mit ^{65}Zn markiert) intravenös injiziert und die Retention von ^{65}Zn durch die Organe bestimmt.

2) Die Retention von ^{65}Zn ist im Falle der Zn-DTPA, insbesondere bei der 1 μmol -Dosis stärker als bei Zn-ÄDTA. Das exzeptionelle Verhalten der 1 μmol -DTPA-Dosis manifestiert sich vor allem zu früheren Zeitpunkten in der Leber.

3) In vitro-Versuche (Gelfiltration von Blutplasma über Sephadex) zeigten, daß die Ca-Chelate der ÄDTA und DTPA bei der Mobilisierung von Zn aus den Proteinen keine unterschiedliche Effektivität aufweisen. Dies wird mit der Bildung ternärer Komplexe erklärt.

4) Es wurde festgestellt, daß im Falle der Zn-Chelate ein isotopischer Austausch mit den Proteinen stattfindet, wobei die austauschbare Zn-Fraktion der Plasmaproteine größer als die mobilisierbare Fraktion ist. Der isotopische Austausch verläuft im Falle der DTPA wesentlich schneller als bei ÄDTA.

5) Die Ergebnisse wurden diskutiert und Hypothesen vorgeschlagen, welche die Resultate befriedigend erklären:

a) DTPA ist in der Lage bimetallische Chelate zu bilden, die infolge einer geringeren Ladungszahl ein größeres physiologisches Verdünnungsvolumen als die ÄDTA-Chelate besitzen. b) Der isotopische Austausch verläuft im Falle der DTPA bevorzugt und mit hoher Geschwindigkeit über die Bildung gemischter Komplexe, während er im Falle der ÄDTA erheblich langsamer und über freie Zn-Ionen vonstatten geht.

VI. Literatur

- Anderegg, G. et al. (1959) *Helv. chim. Acta* 42, 827.
- Carpy, S. (1967) Inaugural-Dissertation Karlsruhe.
- Catsch, A. (1963) *Strahlenschutz in Praxis und Forschung*
Bd. 3, S. 183, Freiburg/Breisgau.
- Catsch, A. (1964a) *Naunyn Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharm.* 246, 316.
- Catsch, A. (1964b) *Radioactive Metal Mobilization in Medicine*, Springfield, Ill.
- Catsch, A. et al. (1964) *Int. J. Rad. Biol.* 8, 35.
- Catsch, A., Lê, D.Kh. (1965) *Experientia* 21, 724.
- Catsch, A., Lê, D.Kh. (1966) *Strahlentherapie* 130, 557.
- Catsch, A., v.Wedelstaedt, E. (1965) *Experientia* 21, 210.
- Cohn, E.J., Gurd, F.R. (1950) *J. Am. Chem. Soc.* 72, 465.
- Donaldson, H.H. (1924) *The Rat*.
- Farris, E.J., Griffith, J.Q. (1963) *The Rat in Laboratory Investigation*. New York.
- Flodin, P. (1962) *Dextran Gels and their Application in Gel Filtration*. Uppsala.
- Foreman, H. (1960) *Metal-Binding in Medicine*, S. 82, Philadelphia, Montreal.
- Gilbert, J.G., Taylor, D.M. (1956) *Biochim. Biophys. Acta* 21, 545.
- Harmuth-Hoene, A.E. (1967), im Druck.
- Harmuth-Hoene, A.E. et al. (1967) *Int. J. Rad. Biol.* 10, 479.
- Havlicek, F. (1967), im Druck.
- Heller, H.-J., Catsch, A. (1959) *Strahlentherapie* 109, 464.
- Lowry, O.H. et al. (1951) *J. biol. Chem.* 193, 265.
- Rosoff, B. et al. (1965) *Fed. Proc.* 24, 170.
- Schwarzenbach, G. et al. (1954) *Helv. chim. Acta* 37, 937.
- Stand, F. et al. (1962) *J. Pharm. exp. Therap.* 138, 399.
- Vallee, B.L. et al. (1948) *J. biol. Chem.* 176, 435.

VII. Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1: ^{65}Zn -Gehalt des Bluts zu verschiedenen Zeitpunkten nach intravenöser Injektion von Zn-Chelaten. 1. Zeile: in % der injizierten ^{65}Zn -Dosis \pm Standardfehler. 2. Zeile: in % der in allen Organen gefundenen ^{65}Zn -Aktivität. Je 6 Ratten pro Versuchspunkt.

Zeit [Std.]	Kontrolle	Zn-ÄDTA		Zn-DTPA	
		1 μMol	10 μMol	1 μMol	10 μMol
0,25	16,3 \pm 1,35 34,4	7,97 \pm 0,72 50,6	8,76 \pm 0,75 49,8	11,1 \pm 0,48 36,7	8,45 \pm 0,28 47,0
0,5	6,12 \pm 0,38 18,5	4,98 \pm 0,45 41,7	4,55 \pm 0,31 41,3	6,96 \pm 0,28 26,3	5,32 \pm 0,35 40,7
1	5,19 \pm 0,20 14,6	2,52 \pm 0,23 29,5	2,63 \pm 0,20 32,7	3,28 \pm 0,27 15,3	2,27 \pm 0,05 22,9
2	3,89 \pm 0,25 13,7	1,13 \pm 0,15 16,2	1,25 \pm 0,11 18,6	3,41 \pm 0,19 15,3	1,09 \pm 0,19 13,5
4	3,36 \pm 0,16 11,1	0,69 \pm 0,017 11,4	0,67 \pm 0,013 11,6	2,59 \pm 0,20 11,8	0,76 \pm 0,011 9,8
8	3,93 \pm 0,47 10,2	0,56 \pm 0,10 9,1	0,49 \pm 0,028 8,1	1,46 \pm 0,043 8,6	0,79 \pm 0,017 9,9
24	5,02 \pm 0,51 15,4	0,83 \pm 0,06 13,0	0,42 \pm 0,025 8,8	1,69 \pm 0,094 11,5	0,79 \pm 0,075 11,7
48	2,71 \pm 0,24 9,4	0,61 \pm 0,019 9,5	0,35 \pm 0,028 8,7	1,26 \pm 0,095 9,4	0,45 \pm 0,042 8,8

Tabelle 2: ^{65}Zn -Gehalt der Leber zu verschiedenen Zeitpunkten nach intravenöser Injektion von Zn-Chelaten. 1. Zeile: in % der injizierten ^{65}Zn -Dosis \pm Standardfehler. 2. Zeile: in % der in allen Organen gefundenen ^{65}Zn -Aktivität. Je 6 Ratten pro Versuchspunkt.

Zeit [Std.]	Kontrolle	Zn-ÄDTA		Zn-DTPA	
		1 μMol	10 μMol	1 μMol	10 μMol
0,25	21,37 \pm 1,28 45,1	1,81 \pm 0,09 11,5	1,80 \pm 0,045 10,3	8,86 \pm 0,14 34,1	2,75 \pm 0,055 15,3
0,5	16,93 \pm 0,48 51,3	2,45 \pm 0,075 20,5	1,96 \pm 0,09 17,8	11,23 \pm 0,95 45,7	3,16 \pm 0,16 24,1
1	20,19 \pm 0,91 56,7	3,00 \pm 0,2 35,2	2,36 \pm 0,12 29,4	11,4 \pm 1,18 53,3	4,21 \pm 0,16 42,3
2	15,70 \pm 0,73 55,3	3,29 \pm 0,14 47,0	2,93 \pm 0,16 43,6	11,3 \pm 0,52 50,7	3,78 \pm 0,086 46,6
4	17,83 \pm 0,57 58,7	3,00 \pm 0,15 49,7	2,89 \pm 0,2 50,0	12,18 \pm 0,87 54,4	3,68 \pm 0,023 47,8
8	20,45 \pm 0,46 53,1	3,24 \pm 0,15 52,4	3,07 \pm 0,14 50,4	8,89 \pm 0,41 52,3	4,20 \pm 0,25 52,8
24	15,8 \pm 0,63 48,5	2,96 \pm 0,22 47,0	2,28 \pm 0,095 47,7	7,32 \pm 0,30 50,6	3,30 \pm 0,22 48,6
48	9,83 \pm 0,13 34,2	2,62 \pm 0,19 40,8	1,55 \pm 0,06 37,4	5,5 \pm 0,12 40,9	1,99 \pm 0,22 39,0

Tabelle 3: ^{65}Zn -Gehalt der Milz zu verschiedenen Zeitpunkten nach intravenöser Injektion von Zn-Chelaten. 1. Zeile: in % der injizierten ^{65}Zn -Dosis \pm Standardfehler. 2. Zeile: in % der in allen Organen gefundenen ^{65}Zn -Aktivität. Je 6 Ratten pro Versuchspunkt.

Zeit [Std.]	Kontrolle	Zn-ÄDTA		Zn-DTPA	
		1 μMol	10 μMol	1 μMol	10 μMol
0,25	0,69 \pm 0,033 1,3	0,16 \pm 0,013 1,0	0,12 \pm 0,013 0,7	0,32 \pm 0,025 1,2	0,15 \pm 0,017 0,8
0,5	0,48 \pm 0,016 1,4	0,17 \pm 0,013 1,4	0,11 \pm 0,011 1,0	0,38 \pm 0,052 1,5	0,13 \pm 0,006 0,8
1	0,67 \pm 0,094 1,9	0,13 \pm 0,081 1,5	0,10 \pm 0,002 1,2	0,33 \pm 0,007 1,5	0,17 \pm 0,012 1,7
2	0,51 \pm 0,018 1,8	0,15 \pm 0,011 2,1	0,10 \pm 0,013 1,6	0,39 \pm 0,015 1,7	0,14 \pm 0,007 1,7
4	0,66 \pm 0,017 2,2	0,13 \pm 0,005 2,1	0,10 \pm 0,004 1,7	0,35 \pm 0,02 1,6	0,14 \pm 0,009 1,8
8	0,81 \pm 0,066 2,1	0,12 \pm 0,007 1,9	0,09 \pm 0,005 1,5	0,35 \pm 0,015 2,1	0,16 \pm 0,006 2,0
24	0,70 \pm 0,027 2,1	0,13 \pm 0,012 2,2	0,10 \pm 0,011 2,0	0,31 \pm 0,017 2,1	0,13 \pm 0,014 1,9
48	0,46 \pm 0,045 1,6	0,12 \pm 0,007 1,9	0,06 \pm 0,004 1,7	0,23 \pm 0,03 1,7	0,10 \pm 0,006 2,1

Tabelle 4: ^{65}Zn -Gehalt der Nieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach intravenöser Injektion von Zn-Chelaten. 1. Zeile: in % der injizierten ^{65}Zn -Dosis \pm Standardfehler. 2. Zeile: in % der in allen Organen gefundenen ^{65}Zn -Aktivität. Je 6 Ratten pro Versuchspunkt.

Zeit [Std.]	Kontrolle	Zn-ÄDTA		Zn-DTPA	
		1 μMol	10 μMol	1 μMol	10 μMol
0,25	4,13 \pm 0,15 8,7	3,98 \pm 0,17 25,3	4,15 \pm 0,35 23,8	3,65 \pm 0,29 14,0	3,42 \pm 0,20 19,0
0,5	3,79 \pm 0,18 11,1	2,86 \pm 0,071 23,9	2,78 \pm 0,4 25,2	3,06 \pm 0,22 11,7	2,42 \pm 0,12 18,5
1	4,46 \pm 0,13 12,5	1,86 \pm 0,074 21,8	1,70 \pm 0,15 21,2	2,92 \pm 0,14 13,6	1,35 \pm 0,11 13,6
2	3,40 \pm 0,43 12,0	1,38 \pm 0,14 19,7	1,15 \pm 0,058 17,1	2,81 \pm 0,15 12,7	1,01 \pm 0,048 12,5
4	3,57 \pm 0,16 11,8	0,98 \pm 0,041 16,2	0,77 \pm 0,013 13,3	2,60 \pm 0,12 12,0	1,15 \pm 0,037 14,9
8	4,34 \pm 0,095 11,3	0,84 \pm 0,050 13,5	0,91 \pm 0,032 14,9	1,81 \pm 0,098 10,6	0,80 \pm 0,016 10,1
24	2,69 \pm 0,082 8,3	0,57 \pm 0,017 9,1	0,39 \pm 0,021 8,4	1,21 \pm 0,079 8,3	0,59 \pm 0,013 8,2
48	1,35 \pm 0,039 4,7	0,37 \pm 0,012 5,8	0,22 \pm 0,011 5,3	0,69 \pm 0,014 5,1	0,28 \pm 0,012 5,5

Tabelle 5: ⁶⁵Zn-Gehalt des Skeletts zu verschiedenen Zeitpunkten nach intravenöser Injektion von Zn-Chelaten. 1. Zeile: in % der injizierten ⁶⁵Zn-Dosis ± Standardfehler. 2. Zeile: in % der in allen Organen gefundenen ⁶⁵Zn-Aktivität. Je 6 Ratten pro Versuchspunkt.

Zeit [Std.]	Kontrolle	Zn-ÄDTA		Zn-DTPA	
		1 µMol	10 µMol	1 µMol	10 µMol
0,25	4,97 ± 0,050 10,5	1,84 ± 0,095 11,6	2,67 ± 0,42 15,4	3,52 ± 0,16 13,8	3,24 ± 0,21 17,9
0,5	5,69 ± 0,25 17,7	1,49 ± 0,12 12,5	1,62 ± 0,075 14,7	3,78 ± 0,20 14,8	2,07 ± 0,13 15,9
1	5,06 ± 0,15 14,3	1,02 ± 0,032 12,0	1,26 ± 0,055 15,5	3,47 ± 0,068 16,3	1,95 ± 0,10 19,5
2	4,94 ± 0,42 17,2	1,06 ± 0,043 15,0	1,28 ± 0,065 19,1	4,40 ± 0,060 19,6	2,09 ± 0,045 25,8
4	4,94 ± 0,80 16,2	1,24 ± 0,14 20,6	1,36 ± 0,073 23,4	4,58 ± 0,14 20,2	1,98 ± 0,16 25,7
8	9,02 ± 0,32 23,3	1,43 ± 0,11 23,1	1,53 ± 0,077 25,1	4,47 ± 0,15 26,4	1,99 ± 0,075 25,2
24	8,32 ± 0,90 25,7	1,79 ± 0,21 28,7	1,60 ± 0,11 33,0	4,11 ± 0,15 28,1	2,01 ± 0,09 29,6
48	14,39 ± 0,46 50,1	2,67 ± 0,10 42,0	1,97 ± 0,16 46,9	5,76 ± 0,055 42,9	2,28 ± 0,16 44,6

Tabelle 6: Abhängigkeit der Bindung von ^{65}Zn und Zn durch Plasmaproteine von der isotopischen Verdünnung.

Isotopischer Träger [$\gamma\text{Zn}\cdot\text{ml}^{-1}$]	^{65}Zn -Bindung durch Proteine [%]	Zn-Bindung durch Proteine [$\gamma\cdot\text{ml}^{-1}$]
0	100*	0
2	98	2
20	99	19,8
60	81	48,4
60	78	46,8
100	50	50,0
100	44	44,0
150	33	49,3
150	33	49,3

* Die tatsächliche Recovery (Mittelwert von 3 Versuchen) betrug 82 %. Die bei isotopischer Verdünnung erhaltenen Werte wurden deshalb mit 100/82 multipliziert.

Tabelle 7: ^{65}Zn -Bindung durch Plasmaproteine (% der zugegebenen Aktivität) in Abhängigkeit von der Chelatkonzentration.

Chelatkonzentration ($\text{M}\cdot\text{l}^{-1}$)	Ca-ÄDTA	Ca-DTPA	Zn-ÄDTA	Zn-DTPA
$5\cdot 10^{-6}$				$87,4 \pm 1,0$
$1\cdot 10^{-5}$	$95,1 \pm 2,3$	$94,8 \pm 0,75$	97,5	$78,9 \pm 2,98$
$2\cdot 10^{-5}$		$85,8 \pm 2,25$		$73,3 \pm 1,15$
$5\cdot 10^{-5}$	$80,6 \pm 3,15$	$79,5 \pm 1,57$		
$1\cdot 10^{-4}$	$68,0 \pm 3,6$	$65,5 \pm 3,55$	$88,9 \pm 3,5$	$52,5 \pm 1,53$
$2\cdot 10^{-4}$	$51,4 \pm 2,34$	$36,7 \pm 2,51$	82,4	
$3\cdot 10^{-4}$	$33,8 \pm 2,12$	$16,6 \pm 0,82$		$31,6 \pm 0,92$
$5\cdot 10^{-4}$	$20,2 \pm 1,6$	0,51		$10,5 \pm 1,92$
$7\cdot 10^{-4}$	$4,85 \pm 1,21$			
$1\cdot 10^{-3}$			$77,4 \pm 2,8$	
$5\cdot 10^{-3}$			69,2	
$1\cdot 10^{-2}$			$57,1 \pm 1,7$	
$5\cdot 10^{-2}$			28,1	

Abb. 1: Zeitliche Abnahme des ^{65}Zn -Gehalts des Bluts.

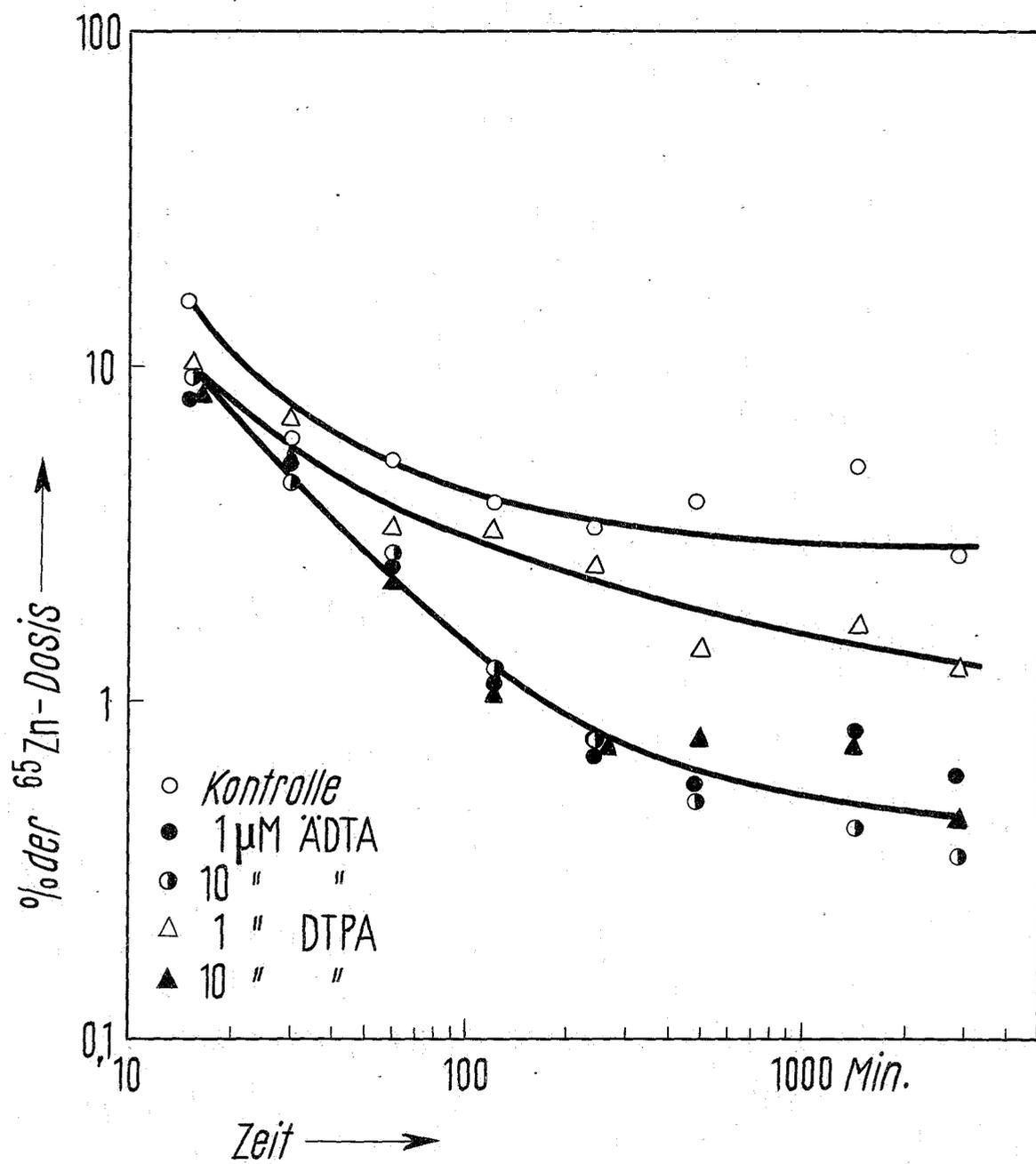


Abb. 2: Zeitliche Abnahme des ^{65}Zn -Gehalts des Bluts.

Abb. 3: Zeitliche Abnahme des ^{65}Zn -Gehalts der Leber.

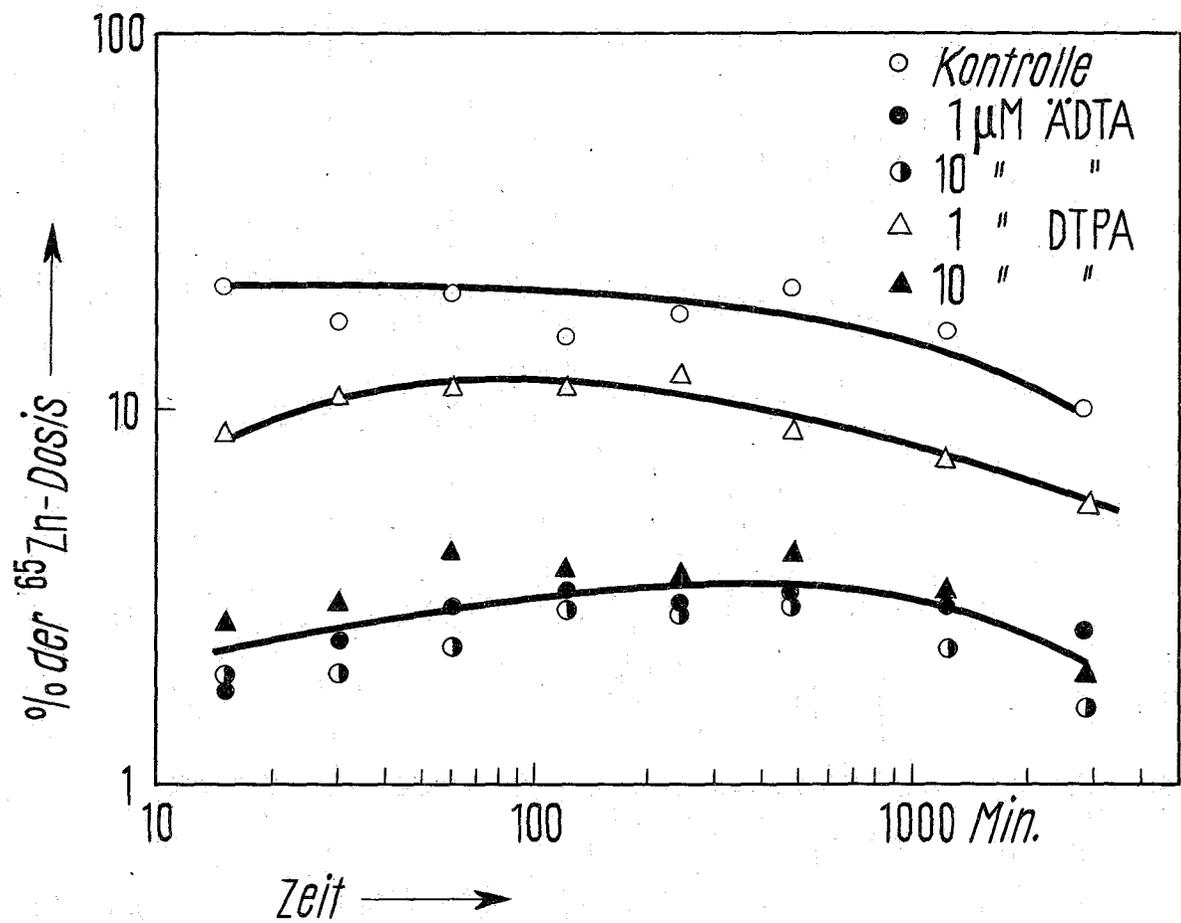


Abb. 4: Zeitliche Abnahme des ^{65}Zn -Gehalts der Milz.

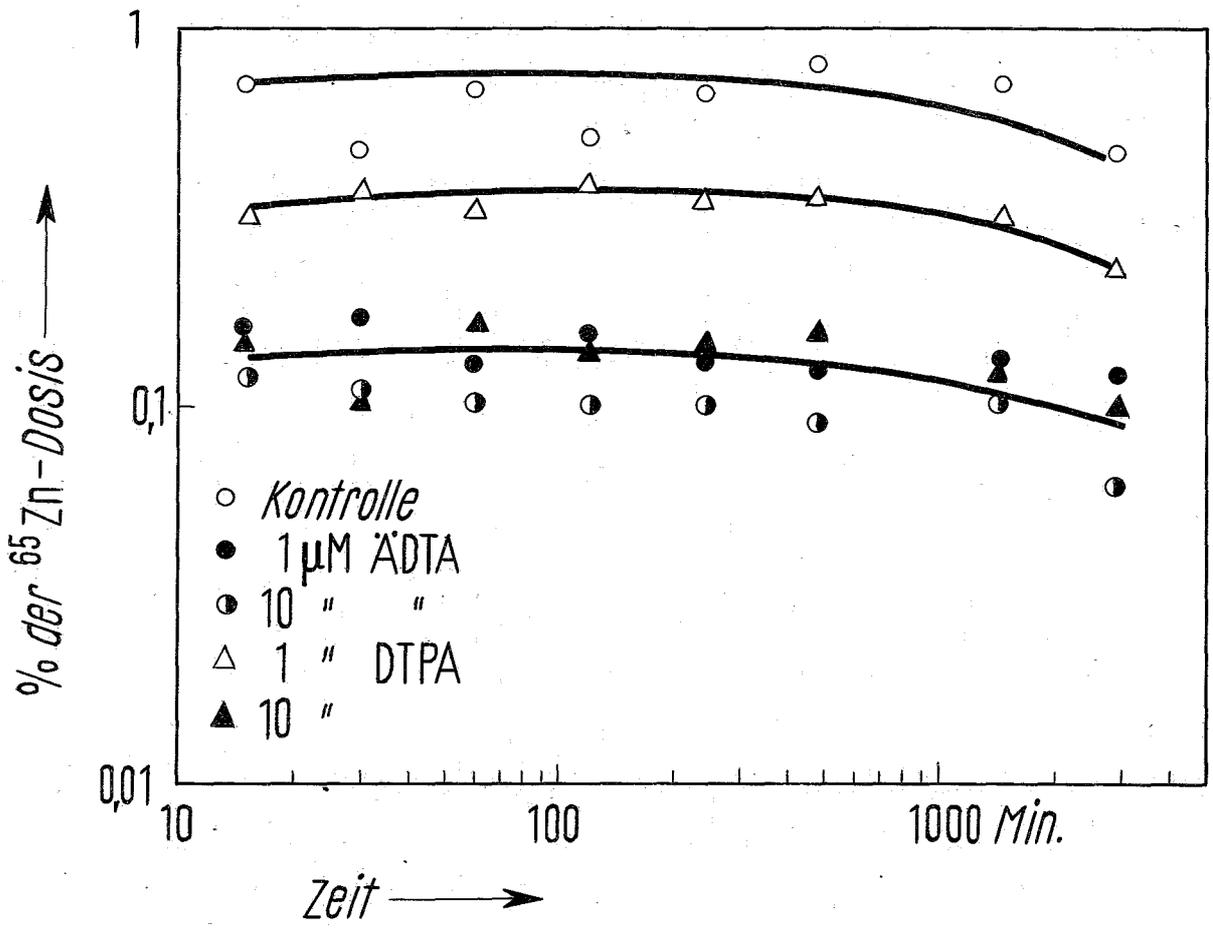


Abb. 5: Zeitliche Abnahme des ^{65}Zn -Gehalts der Nieren.

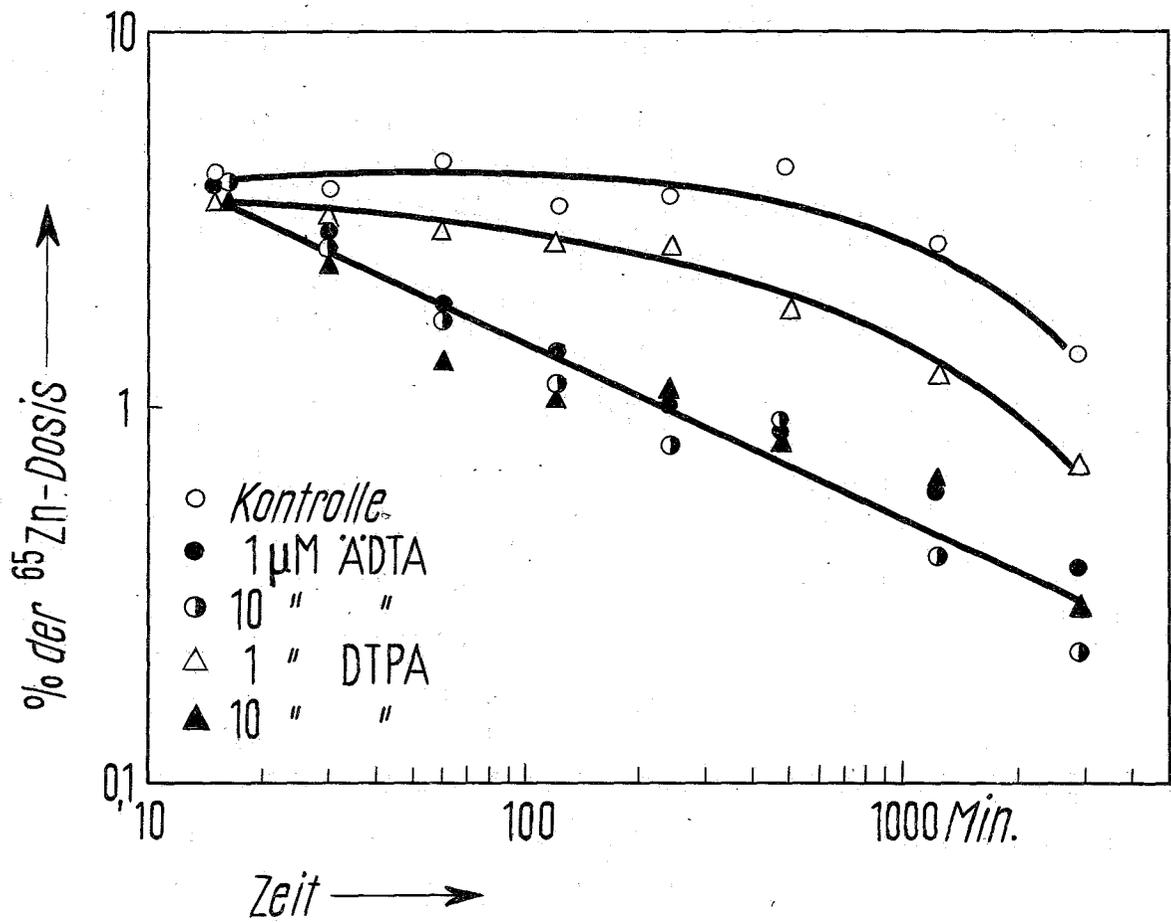


Abb. 6: Zeitliche Abnahme des ^{65}Zn -Gehalts des Skeletts.

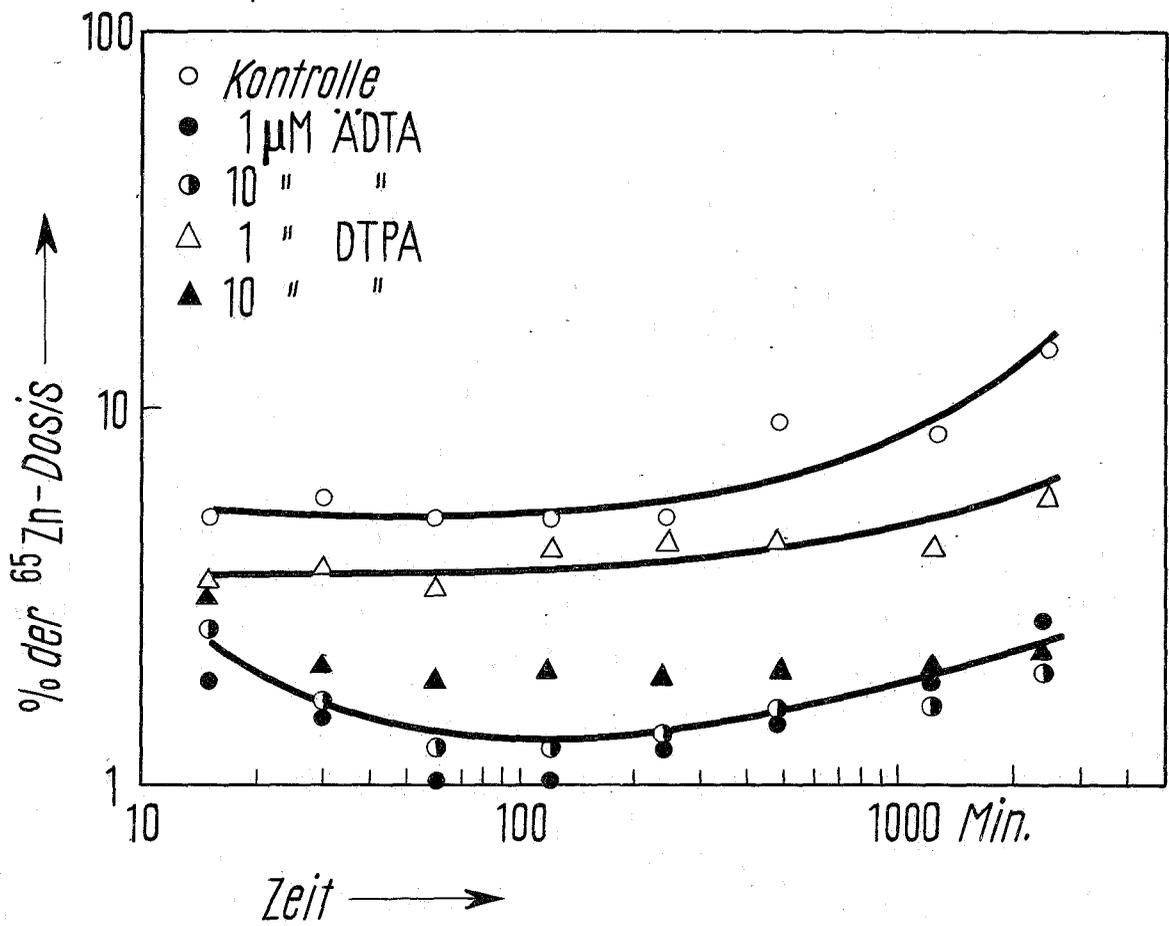


Abb. 7: Pherogramm einer wässrigen $^{65}\text{ZnCl}_2$ -Lösung.

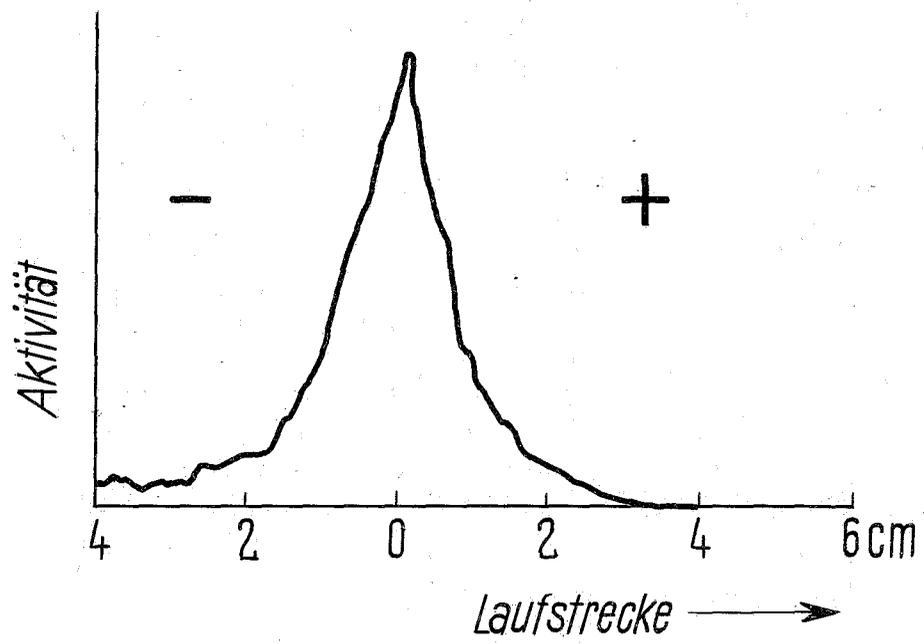


Abb. 8: Pherogramm von ^{65}Zn -haltigem Plasma.
Inkubationszeit 5 Min.

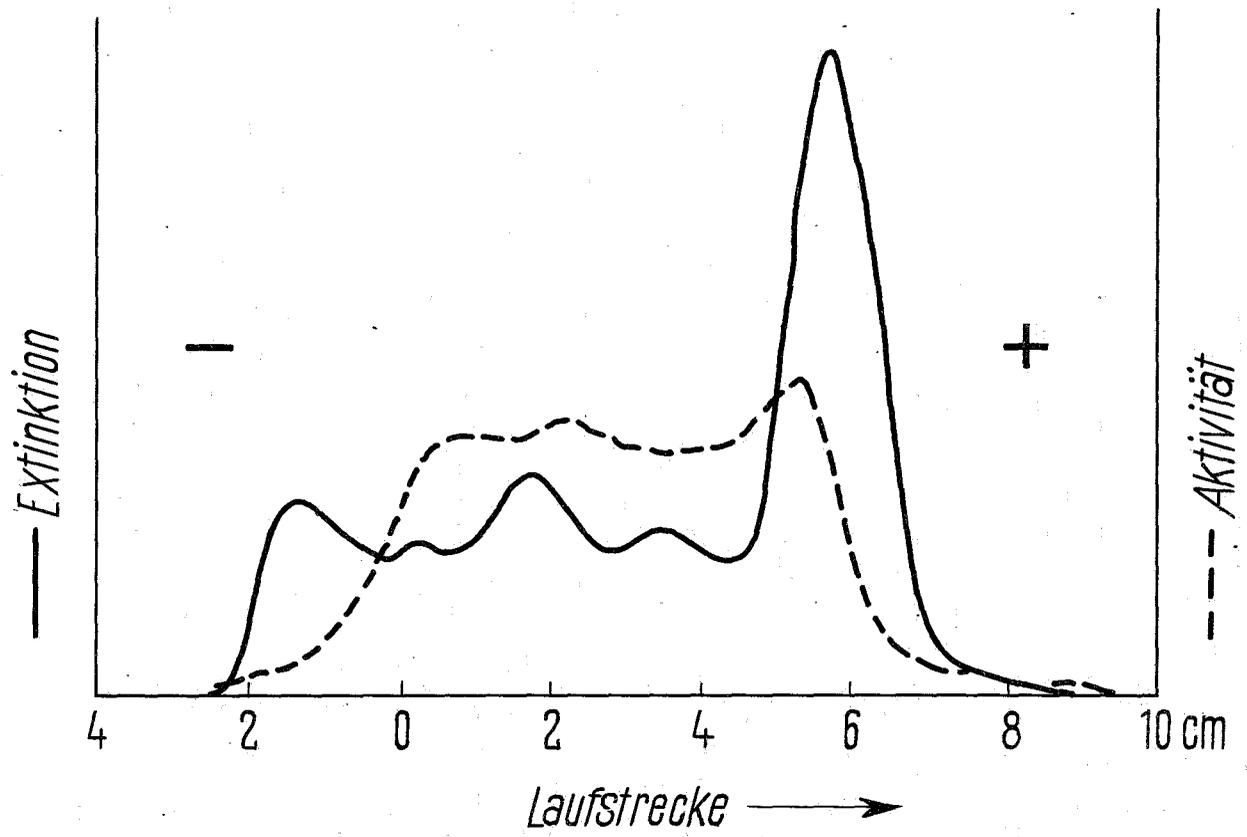


Abb. 9: Pherogramm von ^{65}Zn -haltigem Plasma.
Inkubationszeit 2 Std.

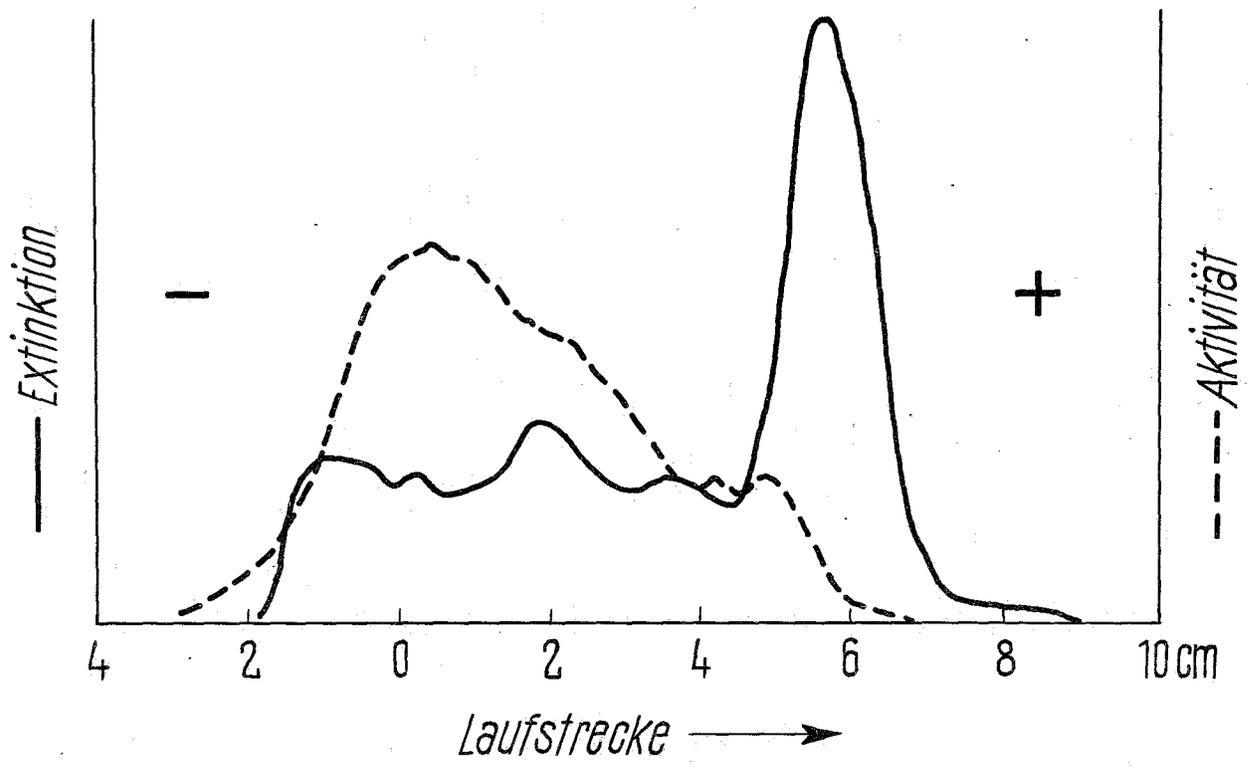


Abb. 10: Pherogramm von ^{65}Zn -haltigem Plasma.
Inkubationszeit 6 Std.

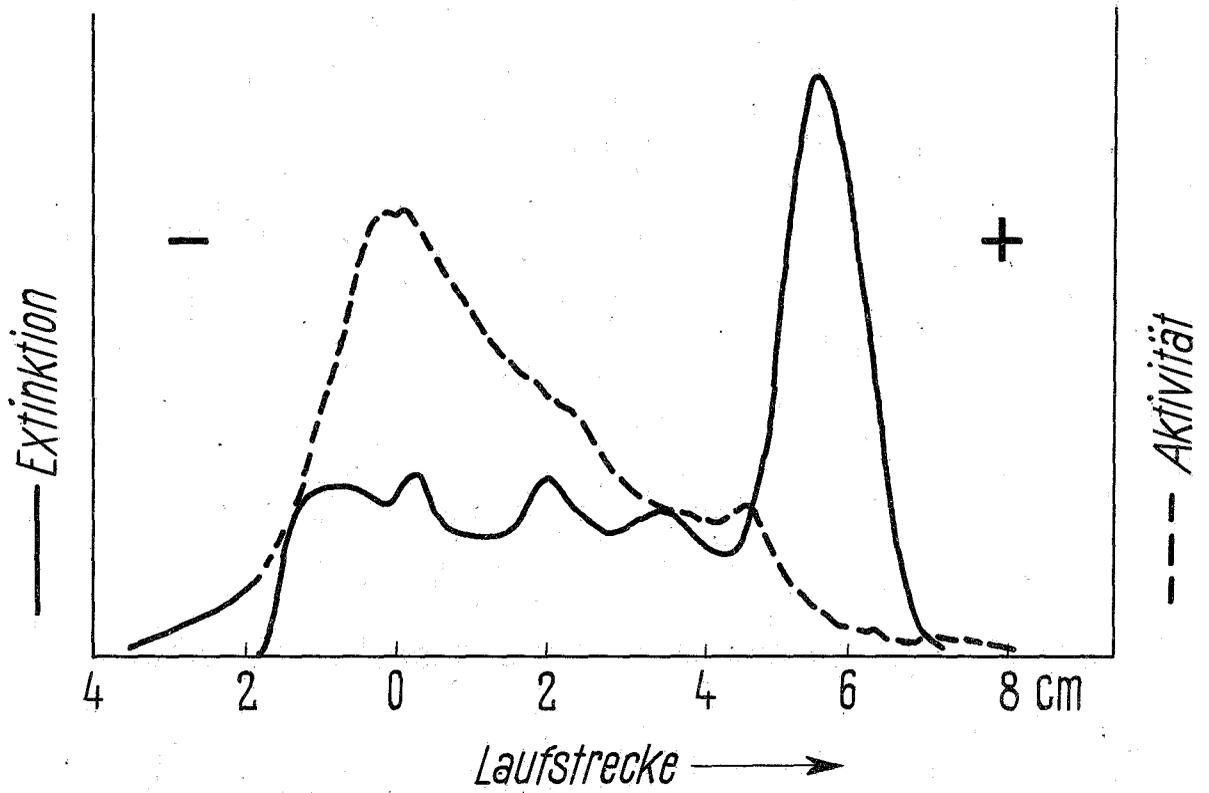


Abb. 11: Pherogramm einer ^{65}Zn -haltigen, wässrigen
 10^{-4} molaren Ca-ÄDTA-Lösung.

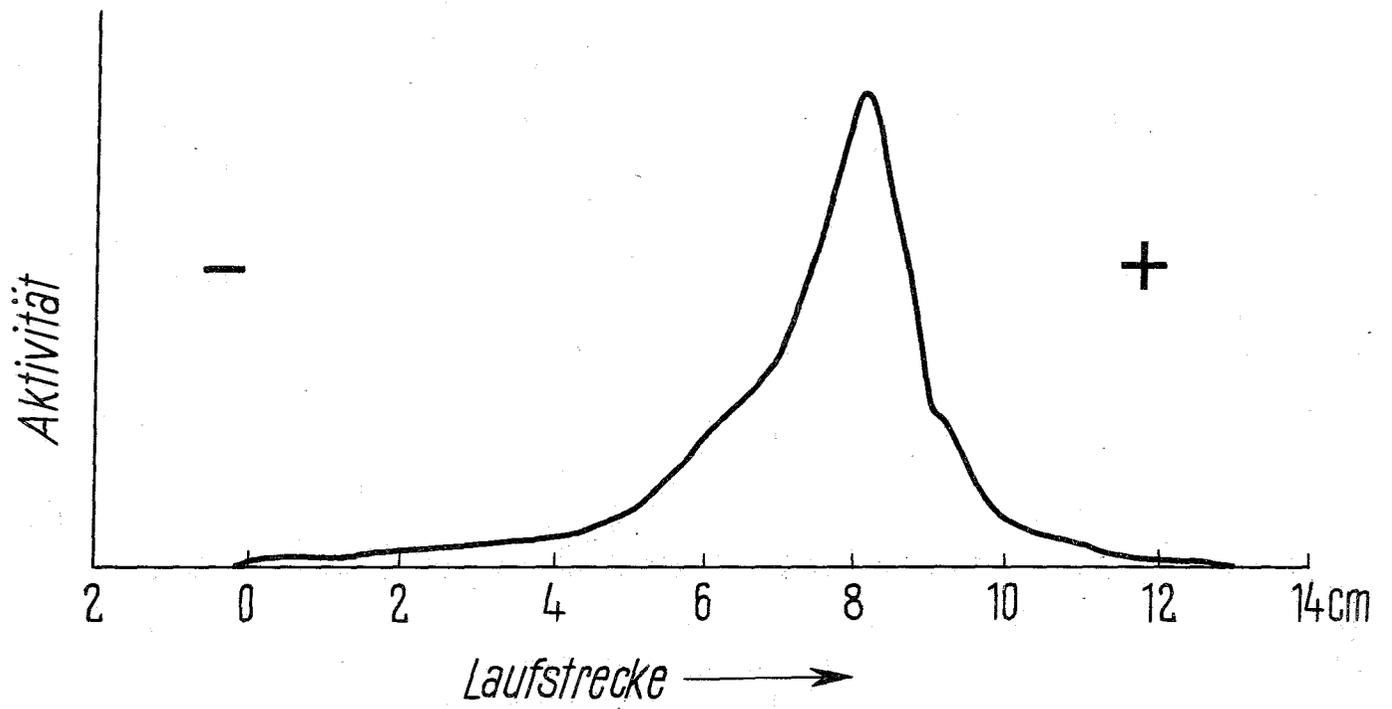


Abb. 12: Pherogramm von ^{65}Zn -haltigen 10^{-4} molaren
Ca-ÄDTA-Lösung in Plasma.

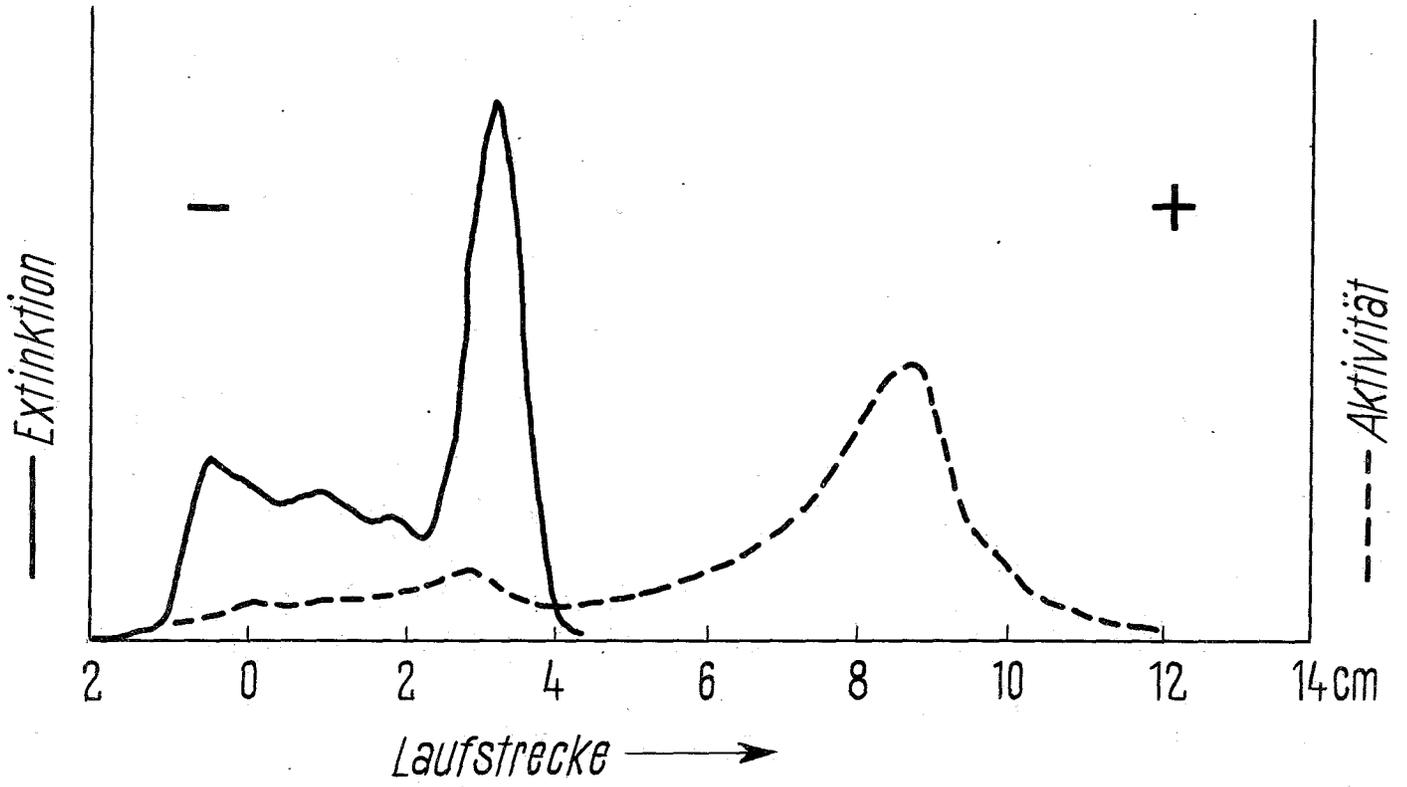


Abb. 13: Pherogramm einer ^{65}Zn -haltigen, wässrigen
 10^{-4} molaren Ca-DTPA-Lösung.

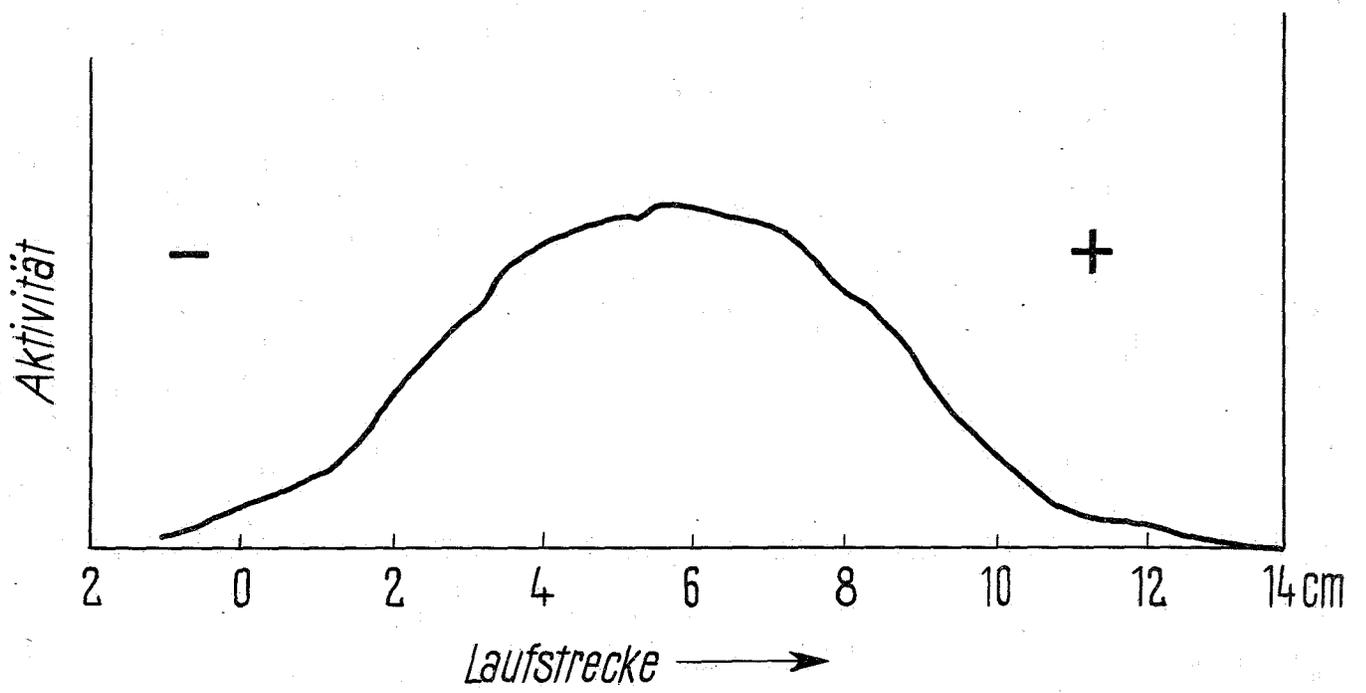


Abb. 14: Pherogramm von ^{65}Zn -haltigen 10^{-4} molaren
Ca-DTPA-Lösung in Plasma.

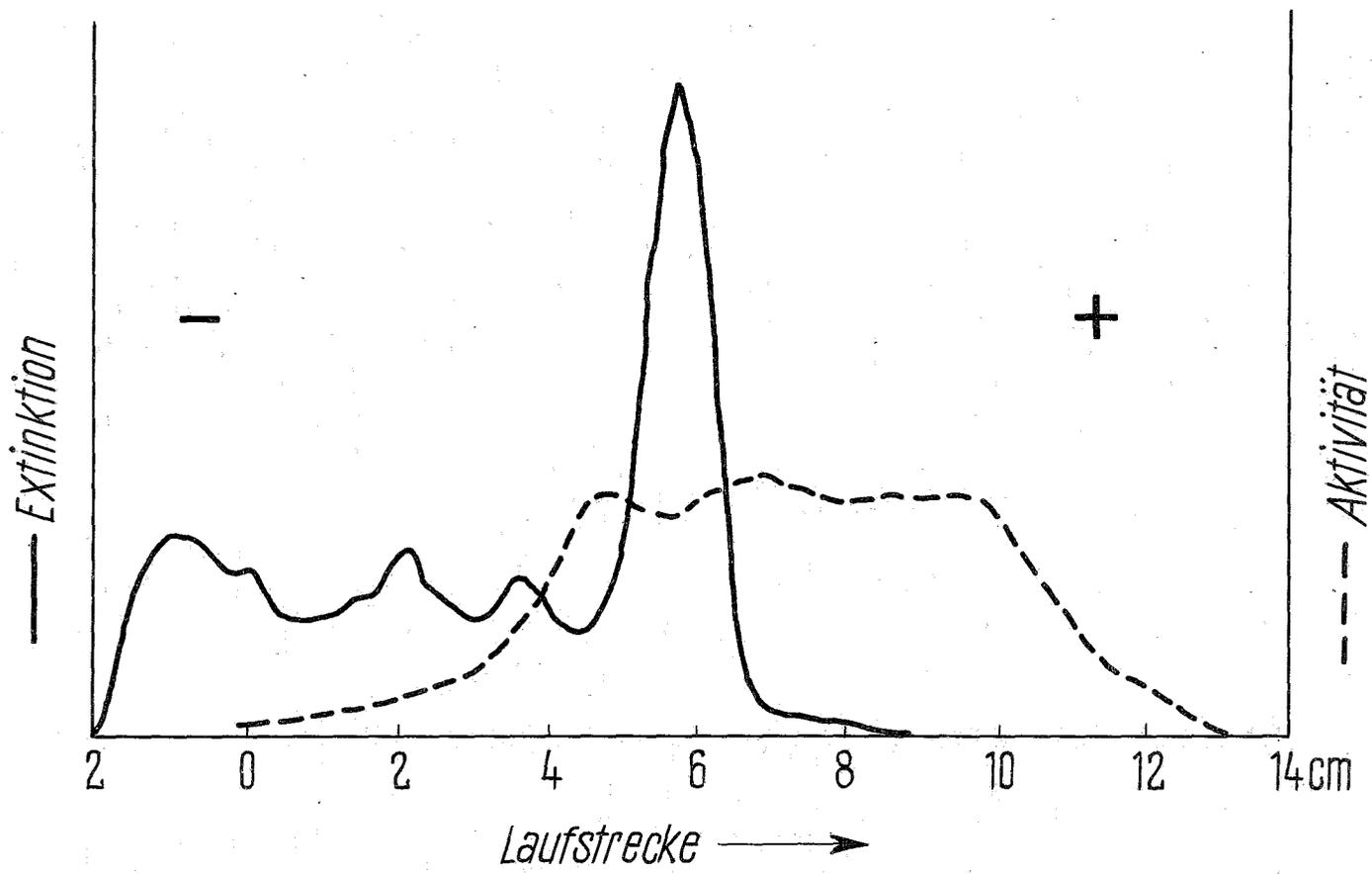


Abb. 15: Elutionsdiagramm von ^{65}Zn -haltigem Plasma.

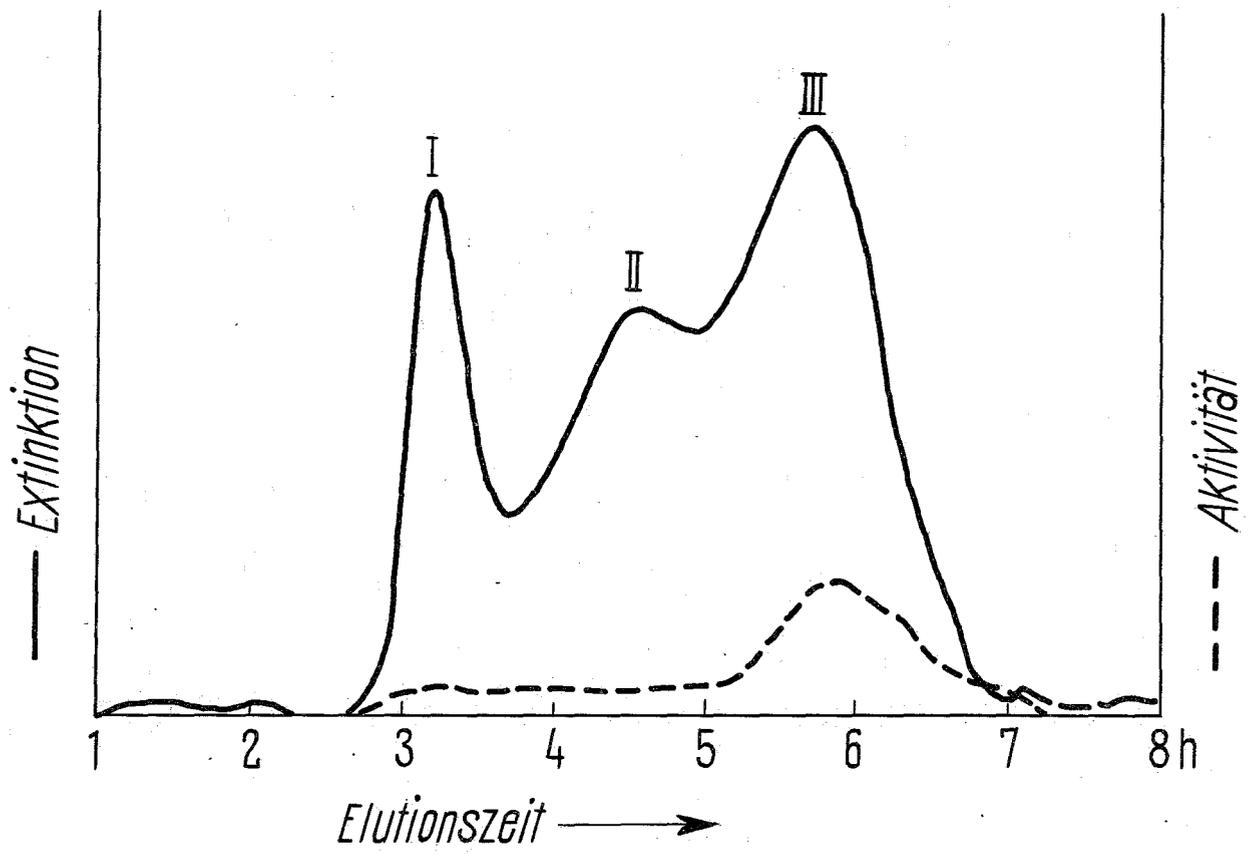


Abb. 16: Pherogramm von Peak III.

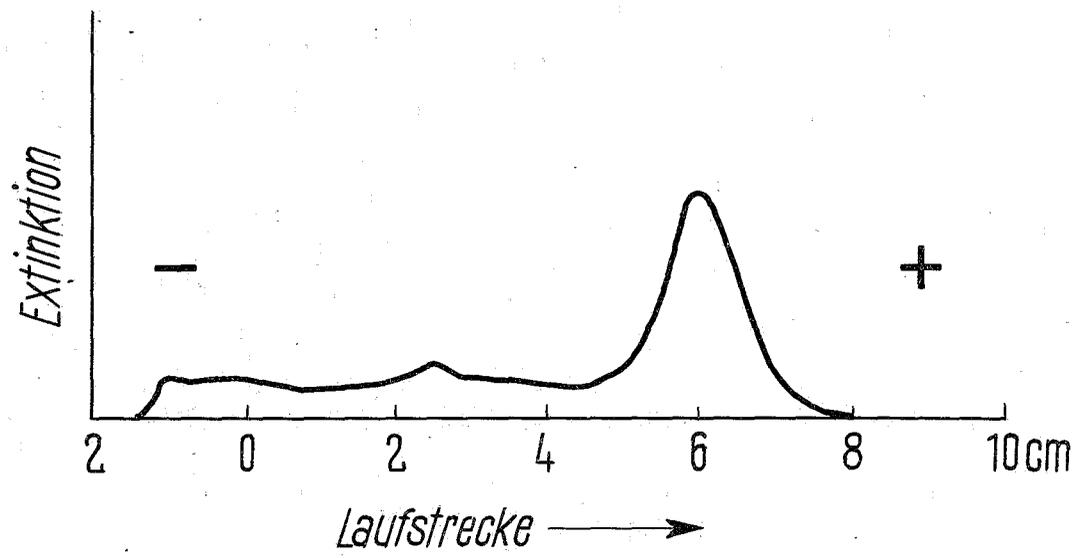


Abb. 17: Elutionsdiagramm einer ^{65}Zn -haltigen 10^{-2} molaren
Ca-ÄDTA-Lösung in Plasma.

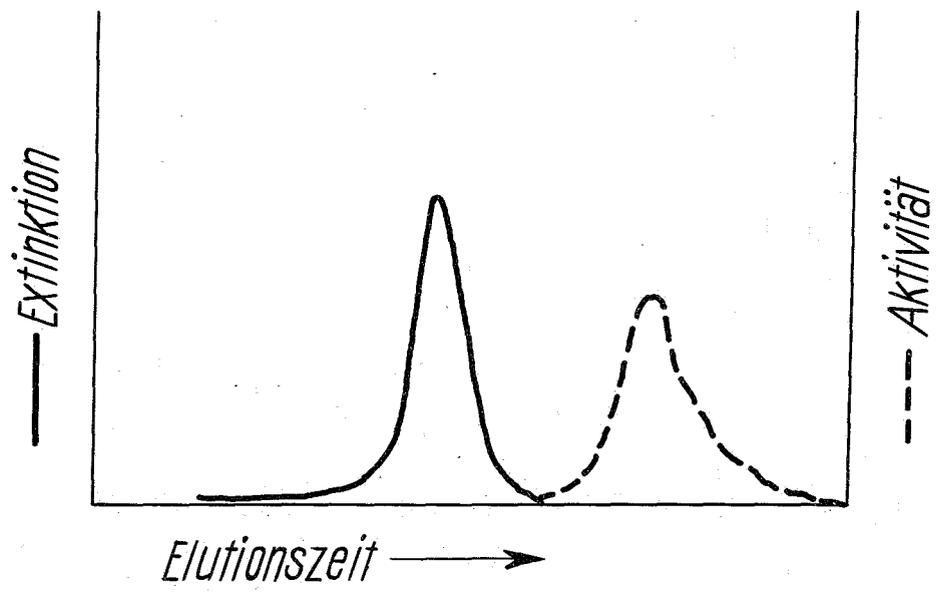


Abb. 18: ^{65}Zn -Gehalt der Proteine in Abhängigkeit von der Chelatkonzentration.
Zn-ÄDTA: ● sofortige Trennung; ▲ Trennung nach Inkubation (vgl. Tab. 8).

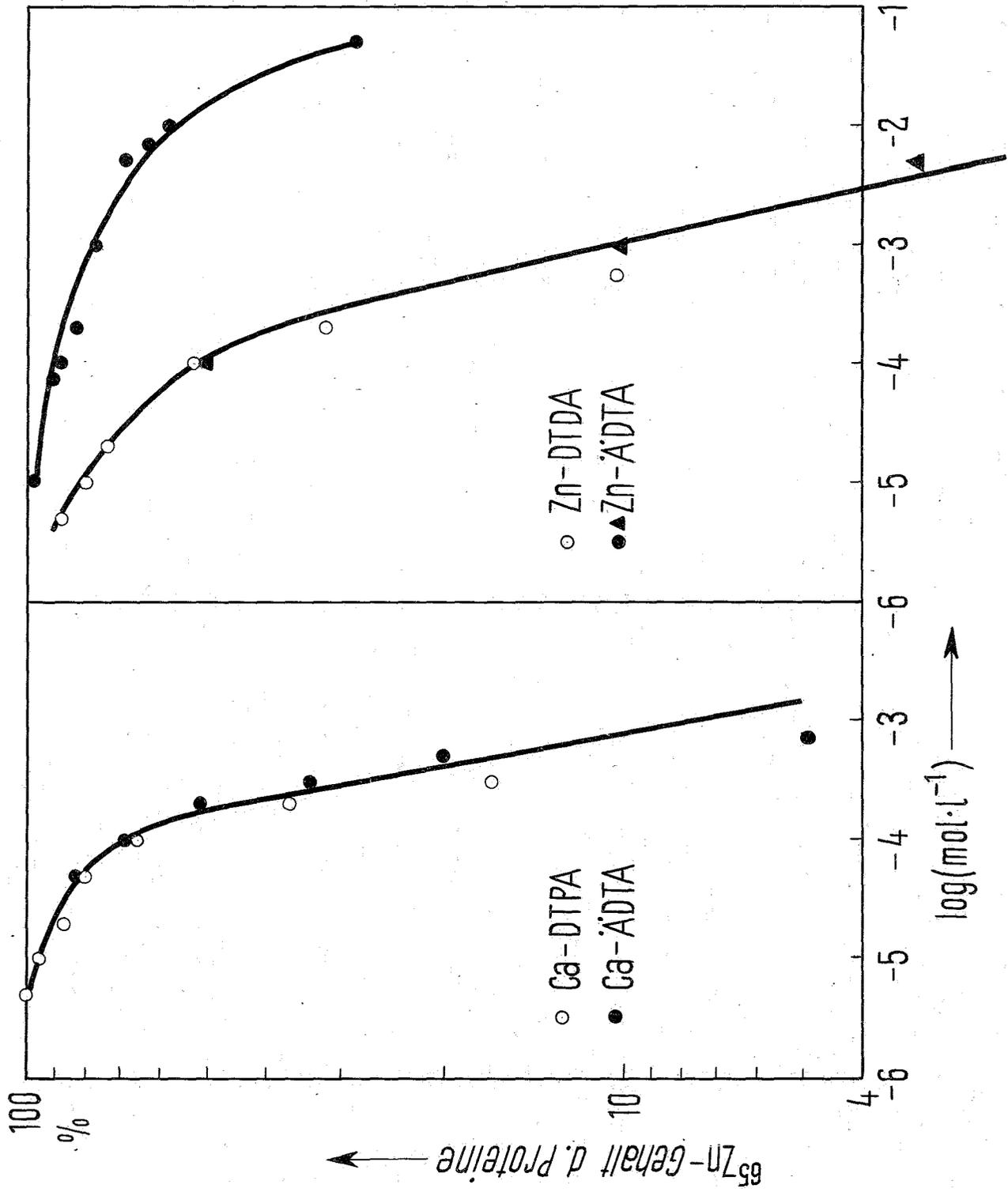


Abb. 19: ^{65}Zn -Retention in Abhängigkeit von der effektiven
Stabilitätskonstante der Zn-Chelate.
o ÄDTA, ● DTPA.

