

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM**

**KARLSRUHE**

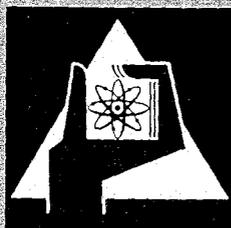
August 1967

KFK 647

Institut für Strahlenbiologie

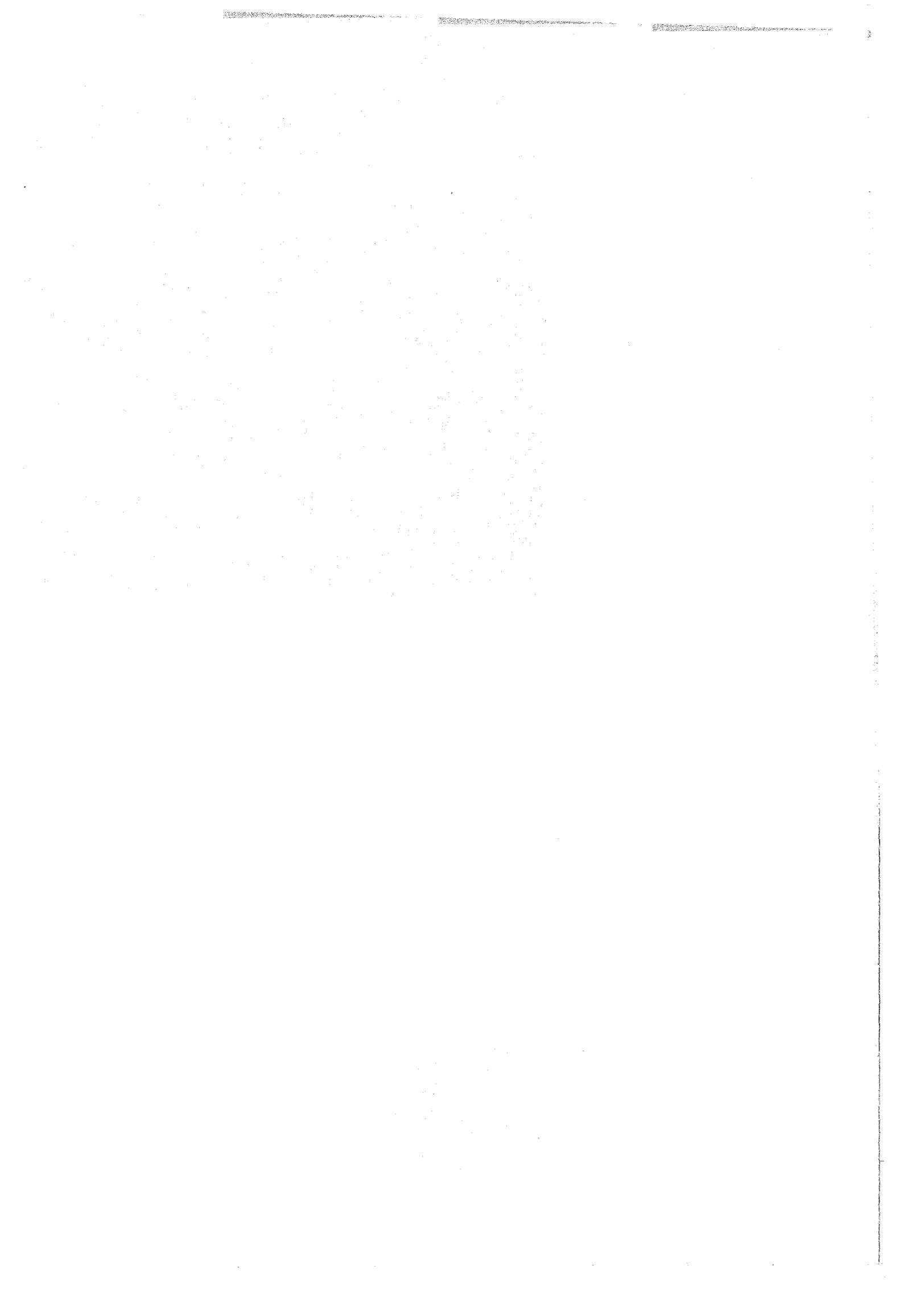
Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß von  
D-Penicillamin, Penicillosäure und Penillo-  
säure auf die Retention von Radiocobalt

P. Böhme



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.

KARLSRUHE



Kernforschungszentrum Karlsruhe

August 1967

KFK 647

Institut für Strahlenbiologie

Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß von  
D-Penicillamin, Penicillosäure und Penillo-  
säure auf die Retention von Radiocobalt

Peter Böhme

Gesellschaft für Kernforschung m.b.H., Karlsruhe



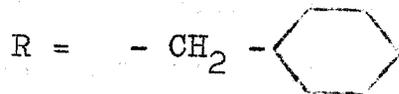
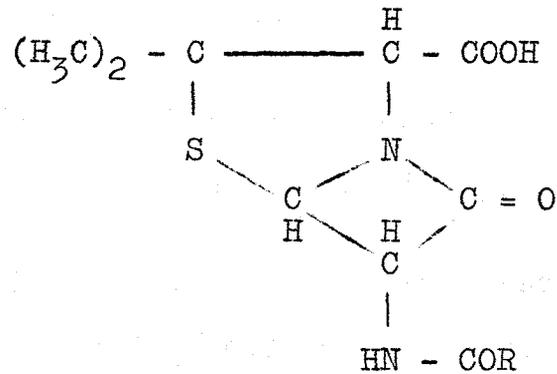
---

## Inhaltsverzeichnis

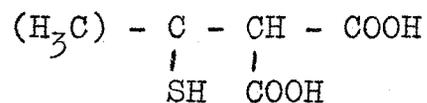
	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methodik	6
III. Ergebnisse	8
IV. Diskussion	13
V. Zusammenfassung	20
VI. Literatur	21
VII. Tabellen und Abbildungen	22

I. Einleitung

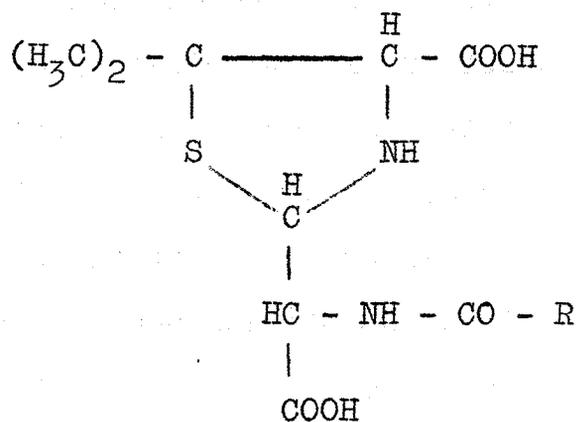
Das Benzylpenicillin



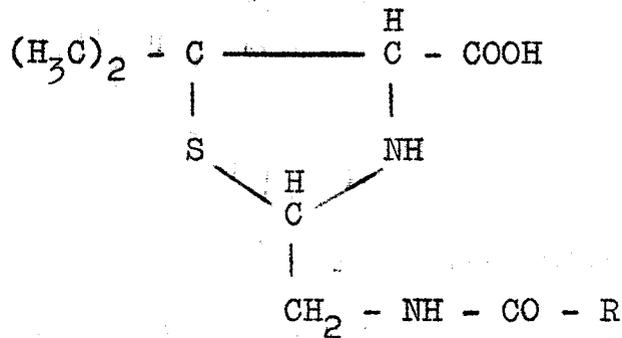
zerfällt bei der sauren Hydrolyse in seine Grundbausteine, von denen eins das Penicillamin (PA) ist:



Bei der alkalischen Hydrolyse des Penicillins entsteht durch Öffnung des  $\beta$ -Lactamringes die Penicillosäure (PCS)



die bereits bei Zimmertemperatur  $\text{CO}_2$  abspaltet und in die Penillosäure (PS) übergeht:



Im sauren Milieu können sowohl PCS als auch PS zu PA und Penaldinsäuren degradiert werden.

Es liegen gewisse Hinweise zugunsten der Annahme vor, daß auch in vivo (d.h. bei Verfütterung von Penicillin) ein Abbau desselben im Magen-Darm-Trakt zu PCS und PS und schließlich zu PA stattfinden könnte. Hier ist zunächst die Tatsache anzuführen, daß die Verfütterung von Penicillin an Küken einen eindeutigen und auf den ersten Blick paradox anmutenden Wachstumseffekt aufweist (Wacker et al. (1955)); die Annahme des Abbaus des Penicillins wird insofern nahegelegt, als auch die Verfütterung von PA den gleichen Wachstumseffekt zeigt. Dieser Befund wurde seitdem wiederholt bestätigt (Brunner 1955, Jukes 1956, Kaemmerer 1956). Es wurde weiterhin vermutet, daß die chelierenden Eigenschaften des PA für den nutritiven Effekt verantwortlich zu machen sind. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, daß auch ein anderes Aminothiol mit chelierenden Eigenschaften, und zwar das Cysteamin, eine deutliche Wuchsstoffwirkung besitzt (Wacker et al. 1956). In Fortführung dieser Untersuchungen und Vorstellungen prüften Büechl und Wiemann (1967) an Küken die nutritive Wirksamkeit von PCS und PS und verglichen sie mit der von Penicillin. Es zeigte sich hierbei, daß beide Säuren ein-

deutig eine größere Aktivität als Penicillin aufweisen und ebenso wirksam wie PA sind. Dies wurde als ein weiteres (wenn auch natürlich nicht streng beweisendes) Argument zugunsten der postulierten Degradation der beiden Säuren zu PA angesehen. PS und PCS wären demnach als Protopenicillamine bzw. Prochelatoren aufzufassen und kämen als tierische Mastmittel in Frage.

Diese Befunde und Überlegungen sind jedoch auch in anderer Beziehung interessant. Es ist bekannt, daß PA zu zahlreichen Metallionen eine beachtlich hohe Affinität aufweist (Lenz und Martell 1964) und mit ihnen stabile Komplexverbindungen vom Typ der Chelate eingeht. Besonders ausgeprägt ist die Affinität des PA zu Cu; dies war auch der Anlaß für die praktisch-therapeutische Verwendung des PA bei der Behandlung des Morbus Wilson, bei der bekanntlich die Störung des Cu-Stoffwechsels und eine erhebliche Speicherung von Cu eine wesentliche Rolle spielt (Walshe 1956). Die Verwendung von PA als therapeutisches Antidot wurde auch für andere Metallionen (die eine hohe Affinität zu Schwefel als Ligandenatom aufweisen) wie beispielsweise Hg (Aposhian 1958, Nigrović 1963), Pb (Boulding und Baker 1957, Brugsch 1965, Catsch 1962, Harris 1958), Cd (Niemeier 1967), Co (Lê 1964) und Au (Eyring und Engleman 1963) nachgewiesen oder zur Diskussion gestellt. Ein wesentlicher Vorteil des PA, soweit es sich um die D-Form handelt, ist, daß es im Gegensatz zu anderen therapeutischen Chelatbildnern (wie den synthetischen Polyaminopolycarboxylsäuren) aus dem Magen-Darm-Trakt

in größeren Mengen resorbiert wird und außerdem eine relativ geringe Toxizität und somit einen hohen therapeutischen Index aufweist (Aposhian und Aposhian 1959).

Falls die eingangs erwähnte Hypothese über die in vivo-Degradation der PCS und PS zu PA tatsächlich zuträfe, so würde sich daraus eine Reihe praktisch wichtiger Konsequenzen ergeben. Es läge beispielsweise der Gedanke nahe, die PS und PCS im Rahmen einer Prophylaxe von Schwermetallintoxikationen zu verwenden. Der langsame Abbau beider Säuren im Magen-Darm-Trakt zu PA erscheint prädestiniert zu sein, um eine Schutzwirkung bei gewerbehygienisch gefährdeten Personen in bestimmten Schwermetall-verarbeitenden Betrieben zu gewährleisten. Ein weiterer und entscheidender Vorteil wäre der Umstand, daß die Darstellung der PCS und PS in finanzieller Beziehung erheblich günstiger ist als die des doch relativ sehr kostspieligen PA.

Im Hinblick auf diese Überlegungen und den bisher jedoch noch ausstehenden direkten Nachweis des in vivo-Abbaus beider Säuren zu PA schien es uns wünschenswert, entsprechende Untersuchungen mit dem Ziel der Verifizierung der Hypothese durchzuführen. Für die experimentelle Prüfung dieser Frage bietet sich eine Versuchsanordnung an, in der der Einfluß von PS bzw. PCS auf die Retention von Radiocobalt ( $^{60}\text{Co}$ ) im Organismus untersucht wird. Cobalt ist insofern besonders geeignet, als Lê (1964) nachweisen konnte, daß unter einer größeren Zahl verschiedener, von ihm untersuchter

Chelatbildner PA einen sehr stark ausgeprägten Einfluß auf das metabolische Verhalten von Radiocobalt ausübt, und zwar im Sinne einer verminderten Retention und erhöhten Ausscheidung aus dem Organismus. Es ist zwar zuzugeben, daß Co und dessen radioaktive Isotope in praktischer Beziehung eine nur untergeordnete Rolle spielen; die vorliegende Untersuchung sollte vielmehr als ein empfindliches Modellsystem betrachtet werden.

Die Planung der Versuchsreihen lag somit auf der Hand: Es war zunächst die maximale Wirksamkeit des PA selbst bei Inkorporation von  $^{60}\text{Co}$  sowie die Abhängigkeit der Effektivität von der PA-Dosis zu prüfen. Zu diesem Zweck wurde  $^{60}\text{Co}$  gleichzeitig mit verschiedenen PA-Dosen intravenös injiziert und die  $^{60}\text{Co}$ -Verteilung über die wesentlichen Speicherorgane bestimmt. Die so gewonnenen Dosis-Effekt-Kurven wurden nun zum Vergleich bei den folgenden Versuchen herangezogen und die bei Verabfolgung von PS bzw. PCS erhaltenen Werte mit den PA-Ergebnissen mit dem Ziel, zu einer Abschätzung der in vivo freigesetzten PA-Menge zu gelangen, verglichen. Bei den Versuchen mit PS und PCS war der Einfluß verschiedener Parameter zu prüfen: die eventuelle Abhängigkeit ihrer Wirksamkeit von der Applikationsart, vom Zeitpunkt der Verabfolgung und schließlich (im Falle wiederholter Gaben) von der Zeitdauer der Verabreichung.

## II. Material und Methodik

Als Versuchstiere dienten männliche Albino-Ratten mit einem mittleren Körpergewicht von 238 g, denen  $^{60}\text{CoCl}_2$  in die Schwanzvene injiziert wurde. Der pH-Wert der Lösungen war auf 2-4 eingestellt; die insgesamt injizierte Aktivität betrug  $\sim 3 \mu\text{Ci}$  pro Tier. Die von uns verwendete  $^{60}\text{Co}$ -Charge lag in einer spezifischen Aktivität von  $\leq 100 \text{ Ci} \cdot \text{g}^{-1}$  vor. Die Ernährung der Tiere vor und während der Versuche bestand aus Standardfutter Altromin B und Wasser ad libitum. Der pH-Wert der wässrigen Lösungen von PA, PS und PCS war auf 6-7 eingestellt; sie wurden entweder intravenös und gleichzeitig mit  $^{60}\text{Co}$  oder oral mittels einer Schlundsonde verabfolgt. Das injizierte Volumen betrug im ersten Fall 0,5 ml, bei oraler Applikation 1 ml. Im letzteren Fall wurde (mit Ausnahme eines speziellen Versuchs) 18 Stunden vor Versuchsbeginn den Tieren das Futter entzogen.

Die Tiere wurden 72 Stunden nach Injektion von  $^{60}\text{Co}$  getötet und der  $^{60}\text{Co}$ -Gehalt der Leber, Nieren, in beiden Femores sowie in einem aliquoten Teil der Muskulatur (M. quadriceps) bestimmt. Außerdem bestimmten wir die Aktivität in 1 ml Blut, das mittels einer heparinisierten Spritze aus der V. cava inf. aspiriert wurde.

Die Messung der  $\gamma$ -Aktivität des  $^{60}\text{Co}$  erfolgte an nicht veraschten Proben der Gewebe; dies ist im Hinblick auf die harte  $\gamma$ -Strahlung des  $^{60}\text{Co}$  sowie die Art des von uns verwendeten Strahlendetektors (NaJ (Tl)-Bohrlochszintillator-Kristall)

berechtigt, da der Einfluß der Geometrie auf die Zählraten in diesem Fall vernachlässigbar klein ist.

Die in den Organen bzw. Organproben gefundenen Aktivitäten wurden auf die Masse des gesamten Organs umgerechnet. Hierbei wurde nach allgemein üblichem Vorgang das Gewicht des Skeletts dem 10-fachen beider Femores gleichgesetzt, während die Masse der gesamten Muskulatur mit 45 % des Körpergewichts angenommen wurde. Parallel zu den Messungen der Organproben bestimmten wir auch die Aktivität in aliquoten Teilen der injizierten Lösungen, die für die Angabe der insgesamt injizierten  $^{60}\text{Co}$ -Menge dienten. Die Aktivität der Organe wurde zunächst in % der injizierten  $^{60}\text{Co}$ -Dosis ausgedrückt. Die Effektivität der getesteten Substanzen ist im folgenden definiert als der  $^{60}\text{Co}$ -Gehalt der Organe, ausgedrückt in % der entsprechenden Kontrollwerte von unbehandelten Tieren.

Die statistischen Berechnungen der Mittelwerte und der Standardfehler wurden für die logarithmisch transformierten Einzelwerte durchgeführt, was den Vorteil hat, daß der Standardfehler des obigen Quotienten gleich dem Standardfehler der Differenz der logarithmischen Mittelwerte ist.

### III. Ergebnisse

Die Untersuchungen wurden derart durchgeführt, daß jede der einzelnen Versuchsserien eine eigene Kontrollgruppe, d.h. Tiere, denen nur  $^{60}\text{Co}$  injiziert wurde, enthielt. Tabelle 1 gibt die Verteilung von  $^{60}\text{Co}$  über die Organe in den einzelnen Kontrollgruppen wieder. Führt man mittels der Varianzanalyse für jedes Organ eine Heterogenitätsprüfung durch, so ergibt sich, daß die Streuung zwischen den Mittelwerten der Gruppen in der Regel größer als die Intragruppenvariabilität ist. Aus diesem Grunde war es notwendig, bei der Auswertung der weiteren Versuche die  $^{60}\text{Co}$ -Aktivitäten nach Behandlung mit PA, PCS bzw. PS in % des jeweiligen Kontrollwertes auszudrücken.

Das von uns festgestellte Verteilungsmuster des  $^{60}\text{Co}$  in den einzelnen Organen zeigt in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (e.g. Lê 1964), daß  $^{60}\text{Co}$  sehr schnell aus dem Körper ausgeschieden wird; die Gesamtmenge der von uns festgestellten Aktivität macht nicht mehr als 10 % der injizierten  $^{60}\text{Co}$ -Dosis aus. Die Hauptmenge des retenierten  $^{60}\text{Co}$  wird in der Leber abgelagert; demgegenüber ist der  $^{60}\text{Co}$ -Gehalt in den anderen Organen bzw. Geweben vernachlässigbar. Insbesondere zeigten die Blutproben sehr niedrige Werte, so daß wir in den folgenden Versuchen die entsprechenden Meßdaten, die in der Regel nur wenig höher als der Null-Effekt waren, unberücksichtigt ließen und die Auswertung der Versuche nur auf Leber, Nieren, Skelett und Muskulatur beschränkten.

Die Aufgabe der ersten Versuchsreihe war es, die Abhängigkeit der Effektivität von PA von der Dosis unter optimalen Bedingungen zu bestimmen. Optimal in dem Sinne, daß PA i.v. gleichzeitig mit  $^{60}\text{Co}$  injiziert wurde. Die Dosis variierte von 0,01 bis 316  $\mu\text{mol}$  PA pro Tier. Jeder Dosispunkt ist mit 6-8 Tieren belegt. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind graphisch in Abbildung 1 wiedergegeben; sie gibt die für die einzelnen Dosen ermittelten Mittelwerte und deren einfache Standardfehler wieder. Es ist darauf hinzuweisen, daß in der 316  $\mu\text{mol}$ -Gruppe die Aktivität der Skelett- und Muskulatur-Proben - genau wie im Falle des Blutes - nur wenig über dem Null-Effekt lag, so daß wir bei der graphischen Wiedergabe auf diesen Punkt verzichten mußten.

Die Daten der Abbildung 1 bestätigen zunächst in vollem Umfang die bereits von Lê (1964) erstmalig nachgewiesene hohe Wirksamkeit des PA. Eine statistisch signifikante Hemmung der  $^{60}\text{Co}$ -Retention tritt in allen Organen bei Dosen von  $\geq 0,1 \mu\text{mol}$  auf, und im hohen Dosisbereich  $\geq 100 \mu\text{mol}$  wird die Ablagerung des  $^{60}\text{Co}$  auf 1 % und weniger der entsprechenden Kontrollwerte gesenkt. Die PA-Effektivität erstreckt sich zwar auf alle Organe, es ist jedoch unverkennbar, daß der  $^{60}\text{Co}$ -Gehalt der Leber durch PA stärker als in den anderen Organen gesenkt wird.

In der zweiten Versuchsreihe wurden je 100  $\mu\text{mol}$  PCS bzw. PS i.v., und zwar ebenfalls gleichzeitig mit  $^{60}\text{Co}$  injiziert. Die in Tabelle 2 zusammengestellten Ergebnisse zeigen für

beide Verbindungen eine signifikante Hemmung der  $^{60}\text{Co}$ -Retention, die jedoch wesentlich schwächer als bei Verabreichung von 100  $\mu\text{mol}$  PA ist. Tabelle 2 zeigt weiterhin, daß PS in allen Organen wirksamer als PCS ist und daß wiederum die  $^{60}\text{Co}$ -Retention in der Leber am stärksten beeinflußt wird.

In der nächsten Versuchsreihe wurden je 600  $\mu\text{mol}$  PA, PCS bzw. PS oral zu verschiedenen Zeitpunkten vor der intravenösen Injektion von  $^{60}\text{Co}$  (30 Minuten bis 8 Stunden) verabfolgt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 2 und 3 wiedergegeben. PA weist bei allen Zeitpunkten einen erheblich stärkeren Einfluß auf die  $^{60}\text{Co}$ -Retention als PS und PCS auf; der maximale PA-Effekt wird bei der frühesten Verabfolgung (30 Minuten vor Injektion des  $^{60}\text{Co}$ ) beobachtet und nimmt bei größeren Zeitspannen progredient ab. Immerhin ist selbst bei einer 6 Stunden vorangehenden PA-Applikation die  $^{60}\text{Co}$ -Ablagerung noch auf 10-30 % der Kontrolle reduziert. Wie auch bei gleichzeitiger i.v. Injektion zeigen PCS und PS eine im Vergleich zu PA wesentlich schwächere, wenn auch statistisch eindeutig gesicherte Wirksamkeit. Außer diesem generellen Effektivitätsunterschied liegt auch eine unterschiedliche Kinetik vor, indem PS und PCS ihre maximale Wirksamkeit später als PA, d.h. nach 1-2 Stunden erreichen. Vergleicht man die Wirksamkeit von PS und PCS, so zeigt sich - genau wie bei intravenöser gleichzeitiger Applikation - eine eindeutige Überlegenheit der PS vor PCS. Desgleichen manifestiert

sich der Einfluß beider Säuren am stärksten in der Leber.

Da PS einen signifikanten Effekt auf die  $^{60}\text{Co}$ -Ablagerung, auch wenn es 6-8 Stunden vorher verabfolgt wird, ausübt, prüften wir in einem weiteren Versuch die Wirksamkeit der 24 Stunden vor der i.v. Injektion von  $^{60}\text{Co}$  oral verabfolgten PS. Die Dosis betrug wiederum 600  $\mu\text{mol}$ . Die in Tabelle 3 zusammengestellten Versuchsergebnisse zeigen, daß auch unter diesen Versuchsbedingungen der  $^{60}\text{Co}$ -Gehalt der Leber, Nieren und der Muskulatur gesichert unter den entsprechenden Kontrollwerten liegen, während ein Effekt im Skelett vermißt wird.

In Anbetracht der relativ hohen Dosierung der PS und PCS von 600  $\mu\text{mol}$  in den vorangehenden Versuchen erschien es uns angezeigt, die Frage zu prüfen, ob und in welchem Umfang eine Verminderung der PS- bzw. PCS-Dosierung auf 190  $\mu\text{mol}$  sich bemerkbar macht. Als Zeitpunkt der Verabfolgung wählten wir den ~~den~~ offenbar optimalen Zeitpunkt von einer Stunde vor der  $^{60}\text{Co}$ -Applikation. Die in Tabelle 4 zusammengestellten Ergebnisse zeigen eine geringfügige Verminderung der Effektivität, wobei aber die schon früher festgestellte deutliche Überlegenheit der PS über PCS und die stärkere Wirkung in der Leber in vollem Umfang erhalten bleiben.

In allen bisher besprochenen Versuchen wurden die zu prüfenden Verbindungen an Tiere verabfolgt, die 18 Stunden vorher fasteten. Es war deshalb zu prüfen, ob dieser Faktor einen

Einfluß auf die Wirksamkeit der Substanzen ausübt. 600 µmol PS bzw. PCS wurden oral eine Stunde vor der i.v. Injektion von  $^{60}\text{Co}$  verabfolgt. Ein Teil der Tiere hatte Zugang zum Futter, während den restlichen Tieren das Futter 18 Stunden vorher entzogen wurde. Die in Tabelle 5 zusammengestellten Ergebnisse lassen einen stärkeren und gleichsinnigen Einfluß dieses Faktors vermissen. Die Varianzanalyse der Daten zeigt, daß nur im Falle der Nieren ein mit  $p = 0,01-0,02$  signifikant stärkerer Effekt der PS und PCS bei nichtfastenden Tieren vorliegt.

In einem letzten Versuch prüften wir die Frage, ob eine mehrfache prophylaktische Verabfolgung der PCS einen stärkeren Effekt zeigt als eine einmalige Dosis. Die Versuchsanordnung war folgende: Je 600 µmol PCS wurden 4 mal, und zwar 78, 54, 28 und 6 Stunden vor Injektion des  $^{60}\text{Co}$  oral appliziert; in der zweiten Gruppe 54, 28 und 6 Stunden, in der dritten Gruppe 28 und 6 Stunden und in der letzten Versuchsgruppe 6 Stunden vor  $^{60}\text{Co}$ . Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Die Prüfung mittels der Varianzanalyse zeigt, daß die Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen in keinem Fall statistische Signifikanz erreichen, so daß eine Mittelung aller Mittelwerte zulässig ist.

#### IV. Diskussion

In Übereinstimmung mit der bereits früher von Aposhian (1958) und Lê (1964) beschriebenen hohen Wirksamkeit des PA bei oraler Verabreichung, die auf dessen hohe Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt schließen läßt, finden auch wir nach prophylaktischer oraler Verabfolgung des PA eine sehr ausgeprägte Hemmung der  $^{60}\text{Co}$ -Retention in allen Organen. Vergleicht man jedoch das hierbei resultierende Wirkungsmuster des PA mit dem bei gleichzeitiger intravenöser Verabfolgung, ist jedoch ein gewisser Unterschied nicht zu verkennen. Bei diesem Vergleich gingen wir so vor, daß wir aus Abbildung 1 die i.v.-Dosen von PA entnahmen, welche die gleiche Wirksamkeit wie die zu verschiedenen Zeitpunkten vor  $^{60}\text{Co}$  und oral verabreichten  $600\ \mu\text{mol}$  PA zeigen. Diese interpolierten Werte bezeichnen wir als "äquivalente" Dosen; sie sind wegen der Steilheit der Dosis-Effekt-Kurven in Abbildung 1 zwar nicht sehr genau, doch dürften aus Abbildung 4, welche die Abhängigkeit der äquivalenten Dosis vom Zeitpunkt der oralen PA-Applikation wiedergibt, folgende Tatsachen eindeutig hervorgehen:

- 1) Die Zeitabhängigkeit der PA-Effektivität weist bei allen Organen bzw. Geweben eine Halbwertszeit von etwa einer Stunde auf. Dieser Wert kann somit als ein Maß für die Geschwindigkeit der Blutclearance des PA und dessen Ausscheidung durch die Nieren angesehen werden.
- 2) Die Gerade, welche die Zeitabhängigkeit der äquivalenten Dosis im Falle von Leber und Nieren wiedergibt, liegt

um fast eine Größenordnung höher als die für Skelett und Muskulatur. Anders ausgedrückt bedeutet dies, daß prophylaktisch verabfolgtes PA die Ablagerung von  $^{60}\text{Co}$  in Leber und Nieren relativ stärker als in Skelett und Muskulatur beeinflusst. Demgegenüber zeigt i.v. und gleichzeitig mit  $^{60}\text{Co}$  injiziertes PA diesen Effektivitätsunterschied nicht.

3) Extrapoliert man die beiden in Abbildung 4 wiedergegebenen Geraden nach  $t = 0$  Stunden, so ergibt sich im Falle der Leber und Nieren eine Äquivalenzdosis von fast 1000  $\mu\text{mol}$ , im Falle des Skeletts und der Muskulatur von etwa 150  $\mu\text{mol}$ , während die tatsächlich verabfolgte Dosis 600  $\mu\text{mol}$  betrug.

Bei der Analyse dieser Verhältnisse hat man von folgenden Überlegungen auszugehen: Obwohl die enterale Resorption von PA bisher direkt nicht untersucht wurde, kann auf Grund der Tatsache, daß keine wesentlicheren Unterschiede in der Dekorporationseffektivität von oral und parenteral verabfolgtem PA bestehen (Aposhian 1958, Lê 1964), auf eine annähernd vollständige Resorption geschlossen werden. Da die Resorption von PA aus dem Magen-Darm-Trakt nicht schlagartig erfolgen sollte, das resorbierte PA andererseits relativ schnell mit einer Halbwertszeit von  $\sim 1$  Stunde (vgl. Abbildung 4) aus dem Organismus ausgeschieden wird, war bei der Zeitabhängigkeit der äquivalenten Dosen ein Plateau zu erwarten. Daß dies experimentell nicht beobachtet wurde, weist darauf hin, daß die Resorption sehr schnell mit einer Halbwertszeit von  $< 1$  Stunde vor sich geht. Bei oraler prophylaktischer Verabfolgung des PA entspricht der maximale

Effekt (1/2 Std.-Gruppe) einer äquivalenten Dosis von ~600  $\mu\text{mol}$ , die ihrerseits mit der tatsächlich applizierten Dosis identisch ist. Wäre für die Wirksamkeit die zum Zeitpunkt der  $^{60}\text{Co}$ -Injektion im Blut vorliegende PA-Konzentration maßgebend, müßte in Skelett und Muskulatur die gleiche Wirkung wie in Leber und Nieren resultieren, was jedoch nicht der Fall ist. Auf Grund dieser Diskrepanz müssen wir folgern, daß die PA-Konzentration des Bluts niedriger ist, d.h. der äquivalenten Dosis von ~100  $\mu\text{mol}$  entspricht, und daß die höhere Effektivität in Leber und Nieren durch eine Speicherung des PA bedingt ist.

Was die Wirksamkeit von PCS und PS betrifft, so seien zunächst die Ergebnisse des in Tabelle 2 wiedergegebenen Versuchs besprochen, in dem 100  $\mu\text{mol}$  gleichzeitig mit  $^{60}\text{Co}$  intravenös injiziert wurden. Die hierbei beobachtete Retention der  $^{60}\text{Co}$ -Ablagerung kommt, wenn man zum Vergleich wiederum die in Abbildung 1 wiedergegebenen Dosis-Effekt-Kurven für PA heranzieht, im Falle der PCS einer Dosis von etwa 0,1-0,3  $\mu\text{mol}$  PA und im Falle der PS - entsprechend ihrer im Vergleich zu PCS höheren Effektivität - von etwa 0,3-0,5  $\mu\text{mol}$  PA gleich. Geht man von der in der Einleitung erwähnten und der vorliegenden Untersuchung zugrunde gelegten Arbeitshypothese aus, daß die Säuren in vivo zu PA degradiert werden, so müßten wir auf Grund des obigen Ergebnisses annehmen, daß eine Umsetzung beider Säuren zu PA auch im Blut möglich ist, wobei jedoch der umgesetzte Bruchteil mit  $\leq 0,5\%$  der insgesamt injizierten Menge verschwin-

dend klein und nur infolge der sehr ausgeprägten Effektivität von PA experimentell überhaupt nachweisbar ist.

Es kann jedoch auch die grundsätzlich andersartige Deutung unserer Versuchsergebnisse nicht ohne weiteres ausgeschlossen werden, und zwar daß eine Degradation der Säuren zu PA im Blut nicht stattfindet, sondern daß beide Verbindungen selbst chelierende Eigenschaften aufweisen. Sie besitzen, wie den auf S. 1 wiedergegebenen Strukturformeln zu entnehmen ist, tatsächlich mehrere potentielle Ligandenatome (Carboxylsauerstoff, Stickstoff sowie Schwefel in Ätherbindung). Die Frage ist jedoch offen, ob im Hinblick auf die sterisch ungünstige Anordnung der Elektronendonoratome die Bildung stabilerer Chelate tatsächlich möglich ist; dies gilt zumindest für die einfachen 1:1-Chelate. Da  $^{60}\text{Co}$  in trägerfreier und damit in verschwindend niedriger Konzentration vorliegt, kann wegen des ausgesprochenen Ligandenüberschusses jedoch auch mit solchen Chelatspezies gerechnet werden, bei denen das  $^{60}\text{Co}$  durch mehrere Molekel der PS bzw. PCS gebunden wäre. Bisher liegt nur eine Arbeit über die komplex-chemischen Eigenschaften der PCS vor (Cressman et al. 1966), derzufolge PCS mit  $\text{Cu}^{2+}$  ein einfaches 1:1-Chelat bildet, dessen Stabilitätskonstante  $10^{4,50}$  beträgt. Die chelierenden Eigenschaften der PS und PCS im Falle von  $\text{Co}^{2+}$  sind noch nicht untersucht. Geht man von der Annahme aus, daß die PS und PCS Chelatbildner darstellen, so könnte auf Grund des von uns ermittelten Effektivitätsunterschieds im Vergleich zu PA postuliert werden,

daß die sog. effektive Stabilitätskonstante (vgl. hierzu Heller und Catsch 1959) der Co(II)-Chelate um etwa drei Größenordnungen niedriger als die des Co(II)-PA ist. Die Stabilität des Co(II)-PA ist zwar noch nicht bestimmt, doch dürfte eine so hohe Effektivität der PCS und PS sehr wenig wahrscheinlich sein, da die offenbar hohe Affinität des PA zu  $\text{Co}^{2+}$  offensichtlich durch den Mercaptidschwefel bedingt ist, während Schwefel als Thioäther - wie er in der PS und PCS vorliegt - in der Regel eine wesentlich schwächere Ligandatomwirksamkeit aufweist. Schwer zu vereinen mit der Annahme, daß PCS und PS selbst als Chelatbildner fungieren, ist schließlich die Tatsache, daß PS bei allen Versuchsanordnungen wirksamer als PCS ist. Dies insofern, als PCS mit zwei Carboxylgruppen ein Ligandenatom mehr als PS aufweist und damit eine größere Effektivität der PCS zeigen sollte.

Auch die bei oraler Verabfolgung von PCS und PS erzielten Ergebnisse (Abb. 2, 3, Tab. 3-6) lassen, für sich allein betrachtet, keine Entscheidung zwischen den beiden Erklärungsmöglichkeiten zu. Geht man von der Annahme aus, daß die Säuren selbst als Chelatbildner fungieren und im Magen-Darm-Trakt nicht zu PA abgebaut werden, müßte auf Grund der unterschiedlichen Abhängigkeit der Effektivität vom Zeitpunkt ihrer Verabfolgung postuliert werden, daß sie sich bezüglich der enteralen Resorption grundsätzlich anders als PA verhalten; es sei hier noch einmal in Erinnerung zurückgerufen, daß die Zeitabhängigkeit der PA-Effektivität annähernd exponentiell mit der Zeit abnahm, während

bei Verabfolgung von PS und PCS der maximale Effekt sich erst 1-2 Stunden nach der Verabfolgung der Substanzen einstellte. Es wäre folglich anzunehmen, daß PS und PCS wesentlich langsamer als PA und/oder in tieferen Darmabschnitten resorbiert werden. Zugunsten dieser Vorstellung lassen sich jedoch im Moment keine direkten Befunde anführen, und aus den gleichen Gründen, wie wir sie weiter oben diskutierten, erscheint uns die Annahme plausibler, daß PS und PCS im Darm zu PA abgebaut werden und daß ihre Degradation relativ langsam erfolgt. Diese Annahme ist notwendig, um die charakteristische Zeitabhängigkeit der Effektivität von PS bzw. PCS zu erklären.

Die Tatsache, daß PS wirksamer als PCS ist, erklärt sich zwanglos damit, daß PCS bei Zimmertemperatur und in wässrigem Medium durch  $\alpha$ -Decarboxylierung in die einbasische PS übergeht. Man hätte somit anzunehmen, daß die PCS nicht direkt zu PA, vielmehr zuerst zu PS umgewandelt wird und daß diese Reaktion nicht sehr schnell verläuft. In Übereinstimmung mit dieser Vorstellung findet sich auch in den Abbildungen 2 und 3 eine für PCS angedeutete Verschiebung des Effektivitätsmaximums in Richtung späterer Zeitpunkte. Die Tatsache schließlich, daß die Zeitabhängigkeit der PCS- und PS-Effektivität im Falle der Leber deutliche Unterschiede aufweist, und daß dieser Unterschied in der Wirksamkeit beider Säuren sich zu späteren Zeitpunkten zu verwischen scheint, könnte als Hinweis dafür angesehen werden, daß die Reaktion:  $PCS \rightarrow PS \rightarrow PA$  sich nicht ausschließlich auf den In-

testinaltrakt beschränkt, sondern auch in der Leber erfolgen kann.

Zusammenfassend können wir somit feststellen, daß die Ergebnisse unserer Untersuchungen zu der von Büechl und Wiemann (1967) postulierten Hypothese, daß PS und PCS biologische Vorstufen des PA darstellen, nicht in Widerspruch stehen, wenn sie auch im Hinblick auf die Möglichkeit, daß PS und PCS selbst als Chelatbildner fungieren können, nicht als streng bewiesen angesehen werden darf.

Eine endgültige Entscheidung würde natürlich der direkte Nachweis von PA (beispielsweise im Blut oder im Urin) nach oraler Verabfolgung von PS und PCS erlauben. Nach Abschluß unserer Untersuchungen wurde eine solche Untersuchung von Schüßler (1967) durchgeführt. Es wurden an Ratten 600  $\mu$ mol PS bzw. PCS mittels einer Schlundsonde verabfolgt, der in den darauf folgenden 24 Stunden ausgeschiedene Urin quantitativ gesammelt und mit Hilfe der Methode von Spackman et al. (1958) PA im Urin nachgewiesen. Wenn man von der Annahme ausgeht, daß die enterale Resorption von PA 100 % beträgt, so würden die von Schüßler ermittelten Daten zeigen, daß bei oraler Verabfolgung von PCS 4 % zu PA und im Falle von PS 16 % zu PA abgebaut und mit dem Urin ausgeschieden werden. Dieser im Falle der PS offenbar stärkere Abbau steht nicht nur mit den bereits erwähnten von Büechl und Wiemann, sondern auch mit unseren experimentellen Ergebnissen, denen zufolge PCS schwächer wirksam ist als PS, in guter Übereinstimmung.

Was die in der Einleitung kurz erwähnten praktischen Aspekte betrifft, so wird in weiteren Untersuchungen zu prüfen sein, welchen Einfluß die als Prochelatoren aufzufassenden PS und PCS auf das biologische Verhalten von solchen Metallionen ausüben, denen eine größere gewerbe-medizinische Bedeutung zukommt. Es wird vor allem zu untersuchen sein, ob die doch relativ geringfügige Umsetzung der PS und PCS zu PA ausreichend ist, um einen Einfluß auch auf die Toxizität der eben erwähnten Schwermetalle auszuüben

#### V. Zusammenfassung

Es wurde die Retention von  $^{60}\text{Co}$  bei gleichzeitiger intravenöser Injektion mit D-Penicillamin (PA) durch die Organe der Ratten untersucht und eine sehr ausgeprägte Retentionshemmung durch PA festgestellt. Die prophylaktische orale Verabfolgung von PA, Penicillosäure (PCS) und Penillosäure (PS) führt ebenfalls zu einer verminderten Ablagerung von  $^{60}\text{Co}$ . Bezüglich der Wirksamkeit gilt:  $\text{PA} \gg \text{PS} > \text{PCS}$ . Es kann angenommen werden, daß PS und PCS im Intestinaltrakt zu PA abgebaut werden. Die theoretischen und praktischen Konsequenzen werden diskutiert.

VI. Schrifttum

- Aposhian, H.V.: Science 128, 93 (1958)
- Aposhian, H.V. and M.M. Aposhian: J. Pharm. exp. Ther. 126, 131 (1959)
- Boulding, J.E. and R.A. Baker: Lancet II, 985 (1957)
- Brugsch, H.G.: J. Occup. Med. 7, 394 (1965)
- Brunner, R.: Wien. Tierärztliche Nachr. 42, 491 (1955)
- Büechl, H. und H. Wiemann: Arzneimittelforsch. 17, 16 (1967)
- Catsch, A.: Arzneimittelforsch. 12, 924 (1962)
- Cressman, W.A., E.T. Sugita, J.T. Doluisio and P.J. Niebergall: J. Pharm. Pharmac. 18, 801 (1966)
- Eyring, E.J. und E.P. Engleman: Arthr. Rheumat. 6, 216 (1963)
- Jukes, T.H.: Fed. Proc. 15, 559 (1956)
- Kaemmerer, K.: Vet.-Med. Nachr. 83 (1956)
- Lê, D.Kh.: Nature 204, 696 (1964)
- Lenz, G.R. und A.E. Martell: Biochemistry 3, 745 (1964)
- Niemeier, B.: Dissertation (1967)
- Nigrović, V.: Arzneimittelforsch. 13, 787 (1963)
- Schübler, H.: Arzneimittelforsch. 17, 364 (1967)
- Spackmann, D.H., W.H. Stein und S. Moore: Analyt. Chem. 30, 1190 (1958)
- Wacker, A., W. Heyl, H. Büechl und H.-J. Holthoff: Arzneimittelforsch. 5, 702 (1955)
- Wacker, A., W. Heyl, H. Büechl und H.-J. Holthoff: Arzneimittelforsch. 17, 16 (1967)

VII. Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1: Verteilung von  $^{60}\text{Co}$  über die Organe von Kontrollratten. N = Zahl der Tiere. P = Signifikanzwahrscheinlichkeit für Heterogenität.

Nr.	N	% der $^{60}\text{Co}$ -Dosis			
		Leber	Nieren	Skelett	Muskulatur
1	8	4,22	0,96	0,58	1,83
2	6	5,43	0,93	0,61	2,00
3	8	5,63	0,92	0,68	2,08
4	6	6,02	0,76	0,55	1,83
5	8	5,56	0,85	0,62	2,19
6	4	5,92	0,98	0,53	1,97
7	6	4,60	0,99	0,69	1,65
8	6	6,13	1,06	0,53	1,61
P		0,01-0,001	0,05-0,01	>0,05	0,05-0,01

Tabelle 2:  $^{60}\text{Co}$ -Verteilung bei gleichzeitiger i.v. Injektion von 100  $\mu\text{M}$  PS und PCS. Mittelwerte von 6 Ratten. In Klammern sind die dem Standardfehler entsprechenden Werte angegeben.

Organ	% der Kontrolle	
	PS	PCS
Leber	28,7 (26,3-31,3)	38,0 (34,7-41,5)
Nieren	39,1 (36,6-41,6)	58,7 (56,2-61,3)
Skelett	57,5 (54,4-60,6)	81,4 (79,4-85,4)
Muskulatur	37,2 (33,2-41,7)	54,5 (49,2-60,4)

Tabelle 3:  $^{60}\text{Co}$ -Verteilung bei einer 24 h vorhergehenden oralen Verabfolgung von 600  $\mu\text{M}$  PS. Mittelwerte von 6 Ratten. In Klammern sind die dem Standardfehler entsprechenden Werte angegeben.

Organ	% der Kontrolle
Leber	68,3 (62,0 - 73,2)
Nieren	75,2 (73,1 - 77,3)
Skelett	109 (100 - 119)
Muskulatur	81,1 (70,5 - 92,7)

Tabelle 4:  $^{60}\text{Co}$ -Verteilung bei einer 1 h vorhergehenden oralen Verabfolgung von 190  $\mu\text{M}$  PS und PCS. Mittelwerte von 6 Ratten. In Klammern sind die dem Standardfehler entsprechenden Werte angegeben.

Organ	% der Kontrolle	
	PS	PCS
Leber	32,4 (28,6-36,9)	68,9 (60,3-78,8)
Nieren	72,7 (66,6-79,7)	85,5 (81,6-89,5)
Skelett	78,9 (75,6-82,2)	98,6 (93,3-104,2)
Muskulatur	82,2 (70,4-96,2)	80,0 (70,5-90,9)

Tabelle 5: Abhängigkeit der prophylaktischen PCS-Behandlung von der Zahl der Dosen. Mittelwerte von 8 Ratten. P = Signifikanzwahrscheinlichkeit für Heterogenitätstest.

Zahl der Dosen	% der <sup>60</sup> Co-Dosen				
	Niere	Leber	Skelett	Musk.	Blut
0	0,96	6,70	0,58	1,84	0,220
4	0,64	3,28	0,50	1,37	0,194
3	0,69	4,03	0,46	1,67	0,198
2	0,73	4,20	0,57	1,93	0,214
1	0,71	3,46	0,46	1,74	0,201
P	0,05-0,04	0,01-0,01	0,2-0,1	>0,2	>0,2

Abbildung 1: Einfluß verschiedener PA-Dosen bei gleichzeitiger i.v. Injektion auf die  $^{60}\text{Co}$ -Verteilung. Mittelwerte (und Standardfehler) von 6-8 Ratten.

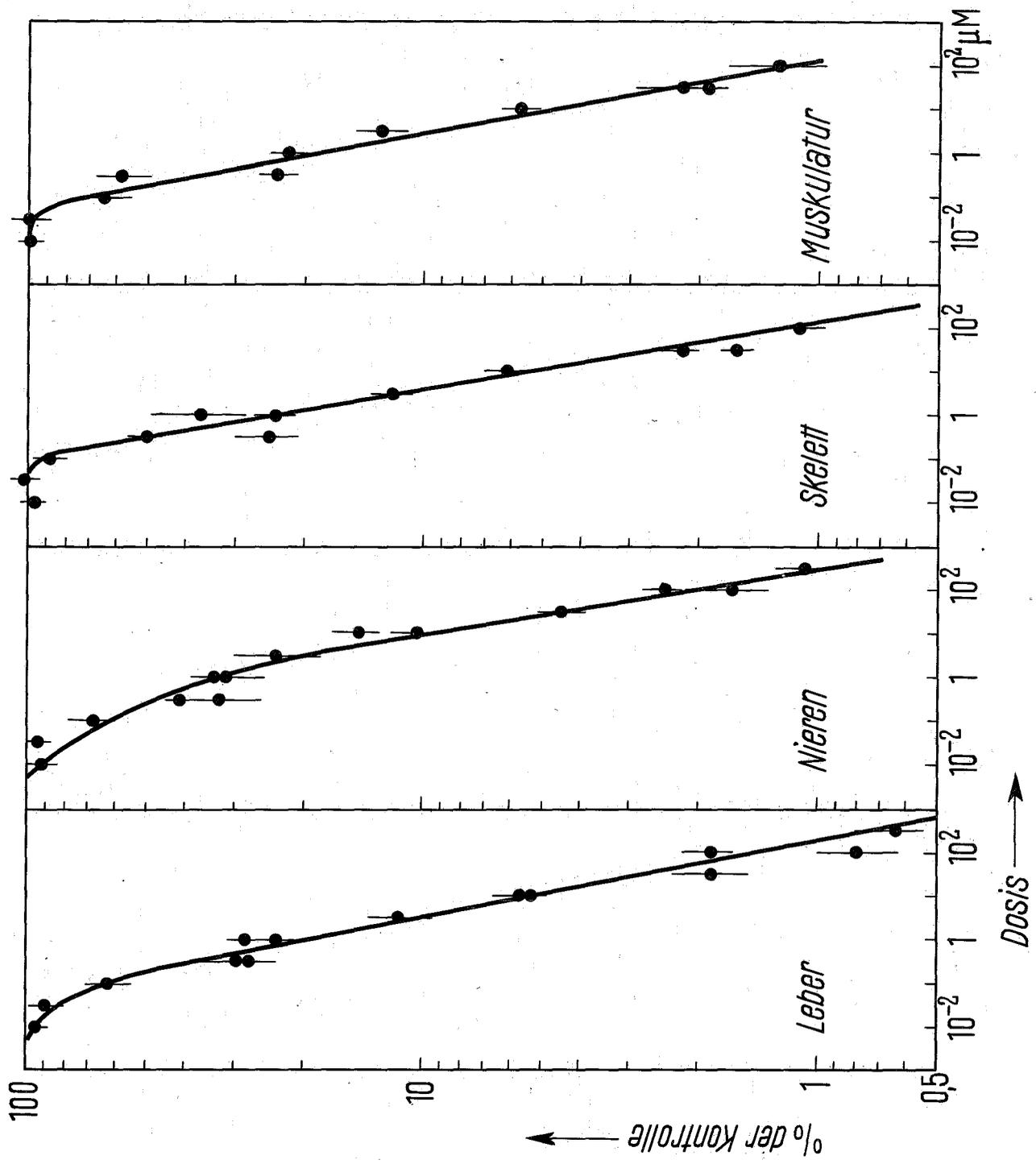


Abbildung 2: Einfluß von 600  $\mu\text{mol}$  PA, PS und PCS, oral zu verschiedenen Zeitpunkten vor  $^{60}\text{Co}$  verabfolgt, auf die  $^{60}\text{Co}$ -Verteilung in Leber und Nieren. Mittelwerte (und Standardfehler) von 6 Ratten.

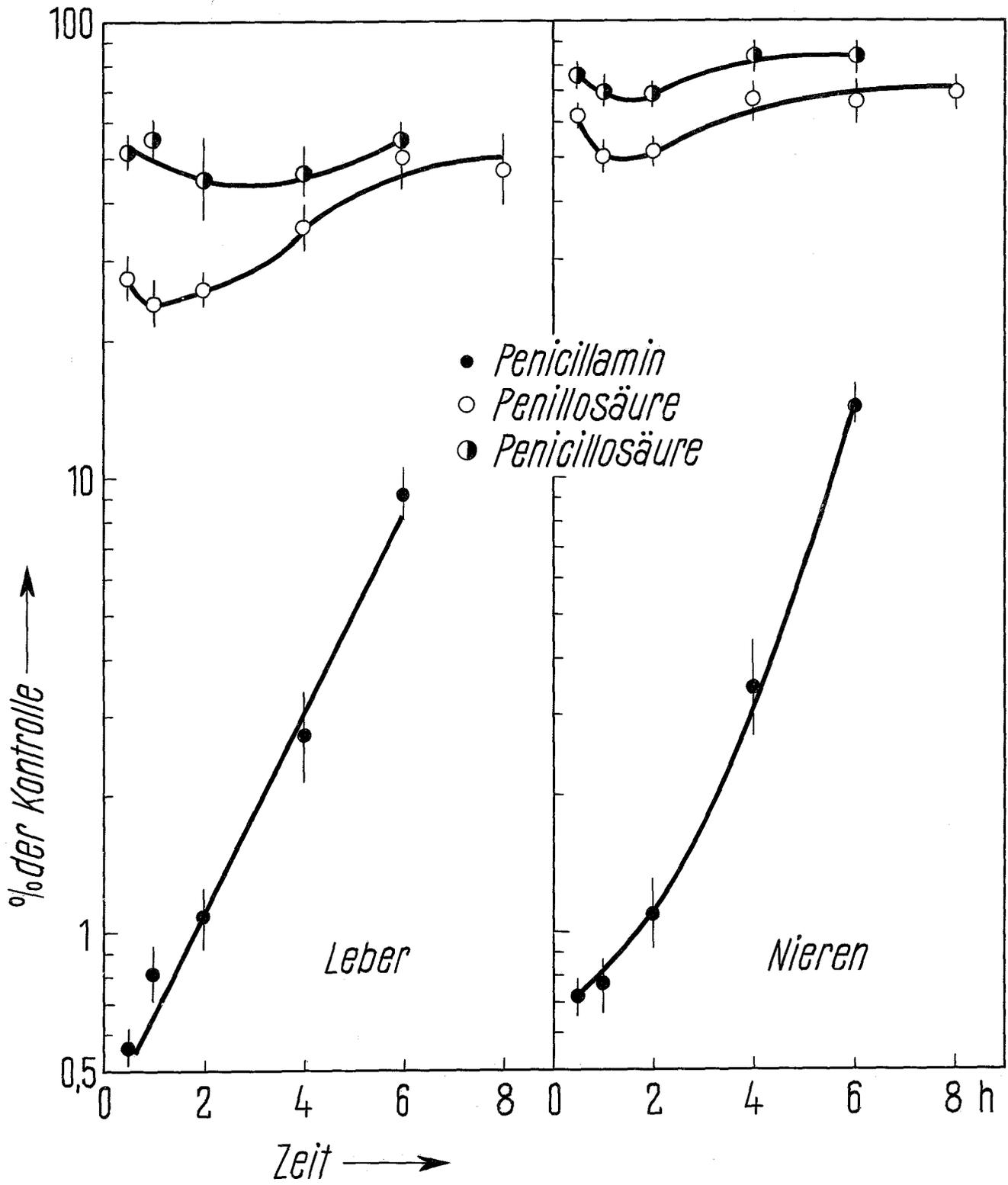


Abbildung 3: Einfluß von 600 µmol PA, PS und PCS, oral zu verschiedenen Zeitpunkten von  $^{60}\text{Co}$  verabfolgt, auf die  $^{60}\text{Co}$ -Verteilung in Skelett und Muskulatur. Mittelwerte (und Standardfehler) von 6 Ratten. Die Aktivität der Muskelproben bei Verabfolgung von PA (1/2 und 1 h) war zu niedrig, um ausgewertet werden zu können.

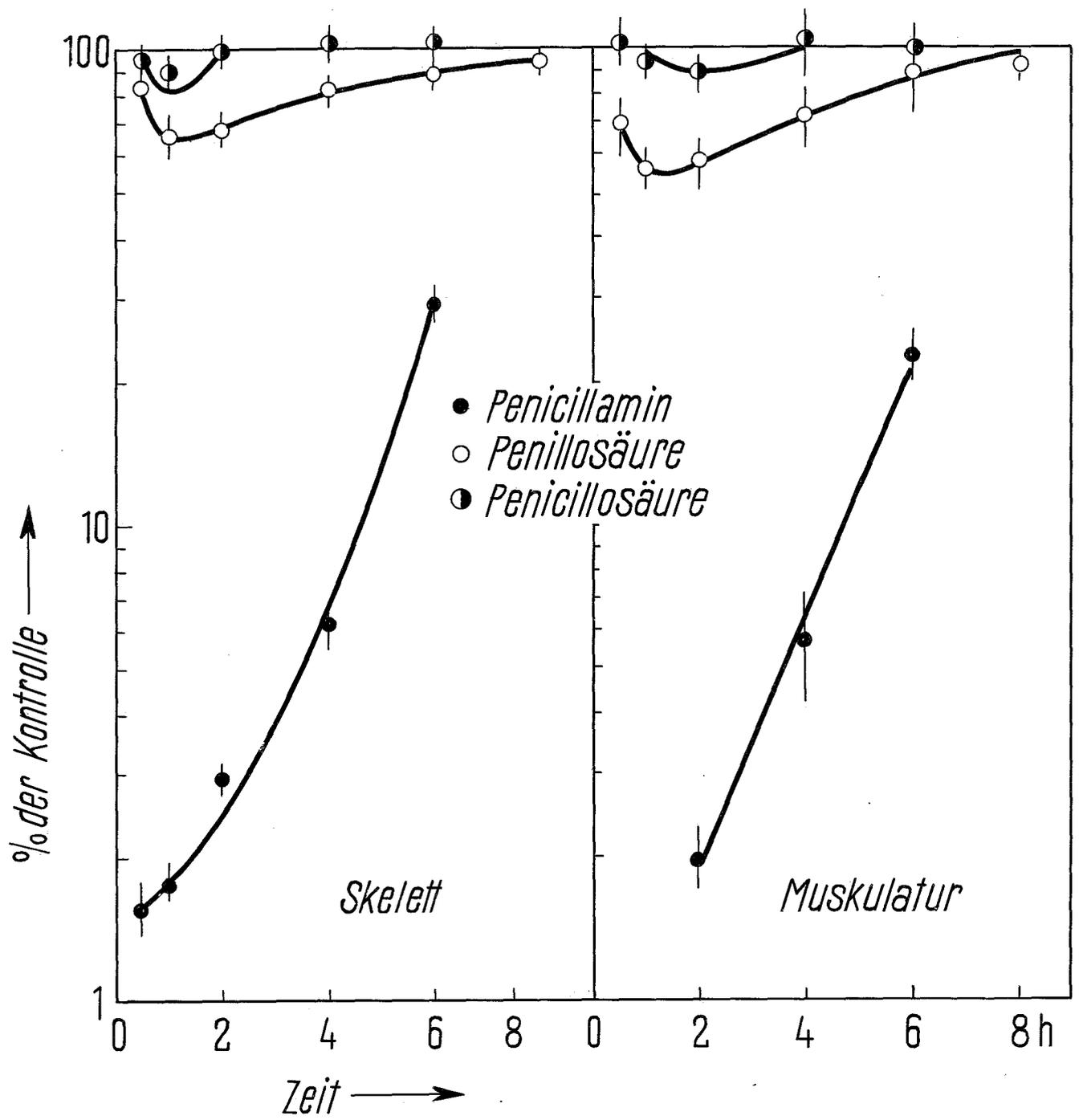


Abbildung 4: Äquivalente i.v. Dosen von PA nach oraler Verabfolgung von 600  $\mu\text{mol}$  PA zu verschiedenen Zeitpunkten.

