

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM  
KARLSRUHE**

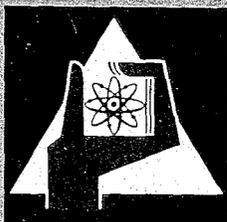
November 1967

KFK 684

Institut für Strahlenbiologie

In vitro-Untersuchungen über den Einfluß von  
Chelatbildnern auf die Eisenbindung in Humanserum

R. Ohrtmann



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.  
KARLSRUHE



Kernforschungszentrum Karlsruhe

November 1967

KFK 684

Institut für Strahlenbiologie

In vitro-Untersuchungen über den Einfluß von Chelatbildnern auf  
die Eisenbindung in Humanserum

Renate Ohrtmann

Gesellschaft für Kernforschung m.b.H., Karlsruhe



## Inhaltsverzeichnis

|                               | Seite |
|-------------------------------|-------|
| I. Einleitung                 | 1     |
| II. Material und Methodik     | 4     |
| III. Ergebnisse               | 6     |
| IV. Diskussion                | 12    |
| V. Zusammenfassung            | 20    |
| VI. Literaturverzeichnis      | 22    |
| VII. Tabellen und Abbildungen | 24    |

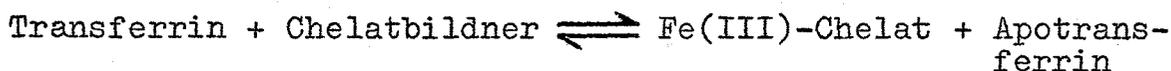
## I. Einleitung

Die einzelnen Phasen des Eisenstoffwechsels: Resorption, Transport, Ablagerung und Ausscheidung werden im wesentlichen durch komplex-chemische Reaktionen zwischen ionalem Eisen und endogenen Liganden bzw. durch Austauschreaktionen des Eisens zwischen zwei Liganden reguliert. Bei diesen Vorgängen nimmt das Transferrin als spezifisches Eisen-transportprotein des Blutplasmas eine zentrale Stellung ein. Die verschiedenen Prozesse und Reaktionen im einzelnen (z.B. beim Transport des Eisens vom Gastrointestinaltrakt in die Reticulocyten) sind jedoch noch nicht in allen Einzelheiten bekannt. Es ist jedoch mit Sicherheit anzunehmen, daß die Richtung, in der das Eisen transportiert wird, neben anderen Faktoren von der relativen Affinität der einzelnen endogenen Liganden zum Eisen (relativ in bezug auf Transferrin) entscheidend beeinflußt wird. Die Erkenntnis dieser Zusammenhänge hat zu der Entwicklung und Anwendung von Chelatbildnern geführt, die auf Grund ihrer eisenkomplexierenden Eigenschaften in der Lage sind, den Eisenstoffwechsel zu beeinflussen. Diese Möglichkeit ist im Hinblick auf therapeutische Konsequenzen bei der Eisenintoxikation und bei Eisenspeicherkrankheiten von Bedeutung. Von den auf ihre Verwendbarkeit klinisch geprüften Liganden zeigten Desferrioxamin B (DFOA) und Diäthylentriaminpentaacetat (DTPA) die höchste Effektivität im Sinne einer erhöhten Eisenausscheidung mit dem Urin bei Hämochromatosepatienten (3, 6, 10, 12-14, 19, 22, 25, 30-32). Bohne und Mitarb. (7) konnten vor kurzem zeigen, daß bei Ratten mit einer experimentell erzeugten Hämochromatose die Fe-Ausscheidung im Urin nach Verabfolgung von 2-( $\beta$ -Aminoäthoxy)-cyclohexylamintetraacetat (ACATA) höhere Werte erreicht als nach äquimolaren Dosen von DTPA und DFOA. Die gleiche Untersuchung ergab weiterhin, daß ein anderer Chelatbildner, der 2,2'-Bis[di(carboxymethyl)amino]diäthyläther (BADÄ), zu einer höheren Eisenausscheidung als DTPA und DFOA führt. Diese Ergebnisse bestätigen frühere in vitro-Untersuchungen

von Lê (23) über die Mobilisierung von Fe(III) aus  $^{59}\text{Fe}$ -markiertem Transferrin. Allerdings kann man aus letzteren Ergebnissen nicht unmittelbare Rückschlüsse auf die Wirksamkeit der Chelatbildner bei Eisenspeicherkrankheiten ziehen, da die Trennung von Transferrin und Fe-Chelaten mittels Fällung mit abs. Äthanol erfolgte und da bei diesem Trennverfahren die Gefahr besteht, daß auch ein Teil des von den Chelatbildnern komplexierten Eisens mitgefällt wird. Es soll hier besonders erwähnt werden, daß BADÄ und Hydroxyäthyläthylendiamintriacetat (HÄDTA) sich bei der Mobilisation von Fe aus dem Transferrinkomplex *in vitro* und auch *in vivo* als wirksamer erwies als Äthylendiamintetraacetat (ÄDTA), obwohl die Stabilitätskonstanten dieser Fe(III)-Komplexe um eine bzw. fünf Größenordnungen niedriger sind als die des Fe(III)-ÄDTA-Komplexes (9, 29).

*In vitro*-Untersuchungen von Rubin und Mitarb. (27) über die Mobilisierung von Transferrin-Eisen durch  $\beta$ -Hydroxyäthyliminodiacetat, Nitrilotriacetat, Di- $\beta$ -Hydroxyäthylglycin, ÄDTA und einige seiner Derivate ergaben, daß keiner der Chelatbildner in der Lage war, das Eisen aus seiner Bindung im Transferrin herauszulösen; das Eisenbindungsäquivalent der Liganden betrug hierbei das 10-fache des Eisengehalts im Serum, die Versuchsdauer bis zu 24 Stunden. Bei Zusatz von Fe(III)-Chelaten zum Serum in einer der sog. ungesättigten Eisenbindungskapazität des Serums äquivalenten Menge mobilisierte Transferrin das Eisen aus den Fe(III)-Chelaten des  $\beta$ -Hydroxyäthyliminodiacetat, Nitrilotriacetat und Di- $\beta$ -Hydroxyäthylglycin, nicht aber aus den Fe-Komplexen des ÄDTA und seinen Derivaten. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Verteilung von Eisen (das einem Gemisch von Serum und Chelatbildner zugesetzt wurde) zwischen Transferrin und Ligand in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration untersucht. Hierbei war HÄDTA 5 mal wirksamer als ÄDTA, obwohl die Stabilitätskonstante des Fe(III)-ÄDTA-Komplexes um 5 Größenordnungen höher als die des Fe(III)-HÄDTA-Komplexes

ist. Aus den Befunden von Rubin und Mitarb. (27) geht hervor, daß bei den Chelaten der ÄDTA-Gruppe das Gleichgewicht der Reaktion:



weder von der einen, noch von der anderen Seite her erreicht wird, d.h. offensichtlich verlaufen die Austauschreaktionen des Metallions zwischen den zwei Liganden wesentlich langsamer, als dies für die Reaktion zwischen Metallion und einem Liganden der Fall ist. Weiterhin zeigt sich, wie auch bei den Untersuchungen von Lê (23), daß die Stabilität der Fe(III)-Komplexe nicht als alleiniger Faktor die Fe-Verteilung zwischen zwei konkurrierenden Liganden bestimmt.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Rubin und Mitarb. (27) fanden Cleton und Mitarb. (11), daß Apotransferrin in vitro in der Lage ist, bis zu 78 % des Eisens aus dem Fe-ÄDTA-Komplex zu mobilisieren, wenn die beiden Liganden in äquimolaren Mengen vorhanden sind. Die Fe-Mobilisation aus den Fe(III)-Komplexen des DTPA und des Äthylendiamindi-(o-hydroxyphenylacetat) (ÄDDHA) durch Apotransferrin betrug 21 % bzw. 41 %. Bei einem 10-fachen Überschuß an Chelatbildner erniedrigte sich der Anteil des aus den Chelaten mobilisierten Eisens auf 10 %. Dagegen war keiner der drei Liganden in der Lage, innerhalb von 24 Stunden dem Transferrin-Komplex das Eisen zu entziehen; auch dann nicht, wenn die Eisenbindungskapazität dieser Liganden das 50-fache des Transferrins betrug. Wurde  $^{59}\text{Fe}$  einem äquimolaren Gemisch von Chelatbildner und Apotransferrin zugesetzt, dann wurden nach 24 Stunden 18,3 und 2 % Fe(III) von ÄDDHA, DTPA bzw. ÄDTA gebunden. Die Stabilitätskonstanten der entsprechenden Fe(III)-Komplexe betragen  $10^{33}$ ,  $10^{28,6}$  und  $10^{25}$ . Demnach zeigen die Ergebnisse von Cleton und Mitarb. (11) eine Abhängigkeit zwischen Eisenbindung durch die verschiedenen Chelatbildner und den Stabilitätskonstanten der gebildeten Fe(III)-Chelate.

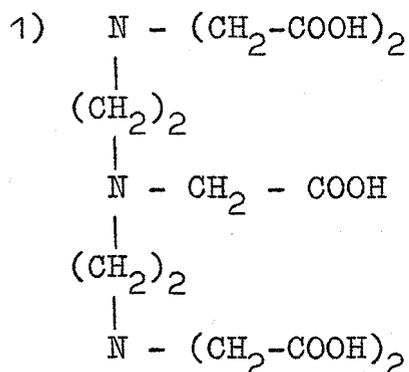
Vergleicht man die Ergebnisse dieser Untersuchungen (7, 11, 23, 27) über die kompetitive Eisenbindung zwischen Ligand und Transferrin, ergeben sich Widersprüche bei der Beantwortung folgender Fragen: (1) Kann das Transferrin-Eisen durch Chelatbildner vom Typ der Polyaminopolycarbonsäuren bzw. DFOA mobilisiert werden und in welchem Umfang?

(2) Besteht eine Abhängigkeit der Eisenbindung bzw. Mobilisation durch Chelatbildner von den Stabilitätskonstanten der gebildeten Fe(III)-Chelate?

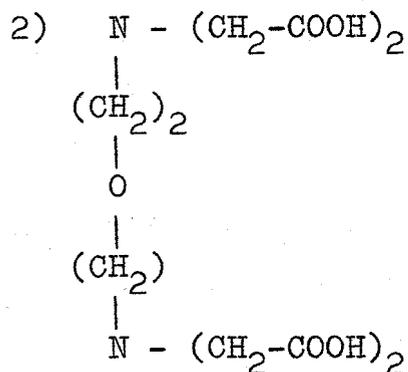
Um diese Fragen einer Klärung näher zu bringen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen, die Verteilung von  $^{59}\text{Fe}$  zwischen Transferrin und einigen Chelatbildnern in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern zu untersuchen. Dabei ging es uns in erster Linie um die Beantwortung der Frage, ob und in welchem Maße die thermodynamischen Stabilitätskonstanten der Eisenkomplexe für die Fe-Mobilisation maßgeblich sind oder ob auch noch andere Faktoren bei diesen Vorgängen von Bedeutung sind.

## II. Material und Methodik

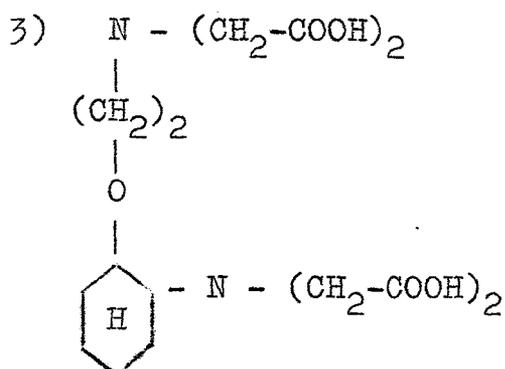
Für die Untersuchungen wurde menschliches Nüchternserum in größeren Mengen gewonnen und bei  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Zur Markierung verwendeten wir trägerfreies  $^{59}\text{FeCl}_3$ . Die Prüfung der Komplexierungseigenschaften erstreckte sich auf die folgenden 4 Liganden:



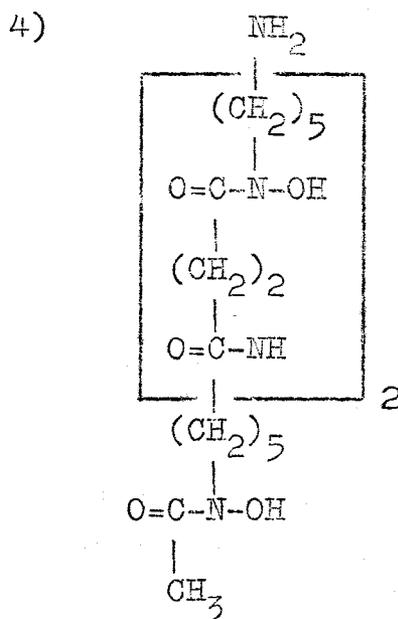
Diäthylentriaminpenta-  
essigsäure  
(DTPA)



2'2-Bis[di-(carboxymethyl)-  
amino]diäthyläther  
(BADÄ)



2-(β-aminoäthoxy)cyclohexyl-  
amintetraessigsäure  
(ACATA)



Desferrioxamin B  
(DFOA)

Die Polyaminopolycarbonsäuren BADÄ, DTPA und ACATA lagen als Ca-Chelate, DFOA als Methansulfonat vor; die Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 erfolgte mittels einer Mikro-Einstab-Glaselektrode.

Das Reaktionsgemisch setzte sich aus je 0,5 ml Serum und Chelatbildnerlösung, 1 ml Na-Veronal/HCl Puffer (pH = 7,4; J = 0,06) und ~ 2 µCi <sup>59</sup>Fe in 0,01 ml verdünnter HCl zusammen. Der pH-Wert des Gemisches wurde nach Zugabe von <sup>59</sup>Fe mit verdünnter NaOH auf 7,4 eingestellt. Da die Komplexierungseigenschaften der untersuchten Chelatbildner in starkem Maße von der Wasserstoffionenkonzentration abhängen, war die strikte Einhaltung des pH-Wertes im Reaktionsgemisch eine unerlässliche Voraussetzung für die Erzielung reproduzierbarer Ergebnisse.

Die Trennung der Komponenten erfolgte elektrophoretisch, und zwar in einer Kammer nach Durrum mit hängender Anordnung der Papierstreifen (Schleicher & Schüll No. 2043 a) unter folgenden Bedingungen:

- 1) pH = 8,6 für die Auftrennung von Serumproteinen,  
pH = 7,4 für die Trennung der Serumproteine von  
den Chelatbildnern
- 2) Na-Veronal/HCl Puffer, J = 0,06
- 3) Konstante Stromstärke:  $0,25 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-1}$
- 4) Laufzeit: 5 Stunden
- 5) Aufgetragene Menge:  $10 \mu\text{l}$

Nach beendeter Elektrophorese erfolgte die radiometrische Auswertung der getrockneten Papierstreifen mittels eines zwei-kammerigen fensterlosen Methandurchflußzählers (Firma Berthold) mit einer annähernden  $4 \pi$  Geometrie. Die Streifen wurden mit einer Geschwindigkeit von  $120 \text{ mm} \cdot \text{h}^{-1}$  durch das Zählrohr transportiert. Die Aktivität wurde mittels eines synchron geschalteten Ratemeters registriert, die prozentuale Verteilung der aufgetragenen Aktivität zwischen Serumprotein und Chelatbildner durch planimetrische Auswertung der Aktivitätspeaks ermittelt. Zur Identifizierung der Serumproteinfraktionen wurden die Papierstreifen anschließend mit Bromphenolblau angefärbt und mit Hilfe eines Extinktionsschreibers (Firma Zeiss) photometrisch ausgewertet.

Den Ergebnissen der ersten Versuchsreihe liegen jeweils drei Einzelwerte zugrunde, während für die restlichen Versuche zwei Untersuchungen vorliegen.

### III. Ergebnisse

In Vorversuchen bestimmten wir zunächst die Verteilung von  $^{59}\text{Fe}$  über die einzelnen Serumeiweißfraktionen. Zu diesem Zweck verwendeten wir einen Ansatz aus 2 ml Serum und  $\sim 2 \mu\text{Ci } ^{59}\text{Fe}$  in 0,01 ml verdünnter HCl, der unter den oben angeführten Bedingungen bei einem pH-Wert von 8,6 elektrophoretisch getrennt wurde. Dieser pH-Wert gestattet eine gute Auftrennung der verschiedenen Eiweißfraktionen. Wie aus Abb. 1 hervorgeht, wird das  $^{59}\text{Fe}$  ausschließlich

von der  $\beta$ -Globulinfraction des Serums gebunden, was in Übereinstimmung mit Ergebnissen früherer Untersuchungen (17) steht.

Weiterhin untersuchten wir die elektrophoretischen Eigenschaften der verschiedenen Fe(III)-Chelate. Hierbei kam es in erster Linie darauf an festzustellen, ob unter den angegebenen Bedingungen (Laufzeit, Pufferkonzentration, Stromstärke) eine optimale Trennung der Chelate von der  $\beta$ -Globulinfraction des Serums erreicht werden kann. Zu diesem Zweck wurde für jedes Chelat ein Ansatz aus 0,5 ml Serum, 0,5 ml einer wässrigen Lösung mit einer Ligandenkonzentration zwischen  $7 \cdot 10^{-2}$  und  $7 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  und 1 ml Na-Veronal/HCl Puffer (pH = 7,4) hergestellt; die Zugabe von  $\sim 2 \mu\text{Ci } ^{59}\text{Fe}$  erfolgte zuletzt, anschließend wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und die elektrophoretische Trennung vorgenommen. Die  $^{59}\text{Fe}$ -Aktivitätskurven für die vier Chelate in Gegenwart von Serumprotein sind in Abb. 2a - d wiedergegeben. Während die drei Polyaminopolycarbonsäuren BADÄ, DTPA und ACATA entsprechend den negativen Ladungen ihrer Chelate zur Anode wandern, verhält sich das einfach positiv geladene Fe(III)-DFOA als Kation. Wie aus Tab. 1 hervorgeht, ist die Wanderungsgeschwindigkeit der vier Chelate um einen Faktor von 4 - 7 größer als die des Transferrins, so daß eine vollständige Trennung der beiden Peaks gewährleistet ist. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Chelate ist proportional zur Ladungszahl: Sie beträgt  $\sim 1 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$  im Falle von  $[\text{Fe(III)-BADÄ}]^-$ ,  $[\text{Fe(III)-ACATA}]^-$ ,  $[\text{Fe(III)-DFOA}]^+$  und  $\sim 2 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$  bei  $[\text{Fe(III)-DTPA}]^{2-}$ .

In der ersten Versuchsserie prüften wir die Abhängigkeit der Chelateffektivität von der Konzentration des Chelatbildners. Hierzu verwendeten wir wässrige Lösungen in einem Konzentrationsbereich von  $1,2 \cdot 10^{-5}$  bis  $4,0 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Je 0,5 ml dieser Lösungen wurden einem Gemisch von 0,5 ml Serum und 1,0 ml Na-Veronal/HCl Puffer (pH = 7,4) zugesetzt. Als letzte Komponente wurde  $^{59}\text{Fe}$  zugegeben.

Die elektrophoretische Trennung erfolgte a) nach 10 Minuten oder b) nach einer 5-stündigen Inkubationszeit (37 °C). Die Ergebnisse sind in Tabelle 2a, b sowie Abb. 3 und 4 zusammengefaßt. Der Anteil des an das Transferrin gebundenen  $^{59}\text{Fe}$  nimmt mit steigender Konzentration des zugesetzten Liganden ab. Wird die elektrophoretische Trennung erst nach 5-stündiger Inkubationszeit vorgenommen, dann verschiebt sich die Verteilung des  $^{59}\text{Fe}$  zugunsten des Transferrins. Der Umfang, in dem dies stattfindet, nimmt in der Reihenfolge: BADÄ  $\simeq$  DTPA > DFOA  $\simeq$  ACATA ab. Im Falle von ACATA und DFOA sind die Dosiseffektkurven ohne und mit Inkubation praktisch identisch.

Der Charakter der in den Abb. 3 und 4 wiedergegebenen Kurven ist, wenn man von den unterschiedlichen Konzentrationen absieht, für alle Chelatbildner identisch. Ihre Neigung nimmt nach Überschreitung einer Schwellenkonzentration mit steigender Chelatkonzentration zu und nimmt einen Wert von  $\sim 1$  erst bei Konzentrationen an, bei denen  $\leq 10\%$  des  $^{59}\text{Fe}$  durch das Transferrin gebunden sind.

Man kann die Dosiseffektkurven ohne bzw. mit Inkubation für alle vier Chelatbildner befriedigend durch eine gemeinsame Kurve wiedergeben, wenn man die Ligandenkonzentration mit einem Effektivitätsfaktor  $1/\rho$ , der für jeden Chelatbildner einen unterschiedlichen Wert aufweist, multipliziert (Abb. 5, 6). Bezogen auf die Effektivität von BADÄ, gibt  $1/\rho$  den Faktor wieder, um den die Wirksamkeit der einzelnen Chelatbildner bezüglich der Chelierung des  $^{59}\text{Fe}$  im Vergleich zu BADÄ erhöht ist. Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, nimmt die Effektivität, d.h.  $\rho$ , in der Reihenfolge: BADÄ < DTPA < ACATA < DFOA zu und erhöht sich nach 5-stündiger Inkubation bei DTPA, ACATA bzw. DFOA um einen Faktor von 1,4, 3,8 bzw. 2,1. Die Effektivität von ACATA ist demnach nach 5-stündiger Inkubation besonders stark erhöht.

In einer zweiten Versuchsserie prüften wir den Einfluß der Inkubationsdauer sowie der Reihenfolge, in der die einzelnen Komponenten des zu trennenden Ansatzes in Lösung gebracht wurden. Zu diesem Zweck wurde das elektrophoretische Verhalten in folgenden drei Varianten untersucht:

- a) Das Radioeisen ( $\text{Fe}^*$ ) wurde einem Gemisch von Serum (P) und Chelatbildner (L) zugesetzt:  
 $[\text{P} + \text{L}] + \text{Fe}^*$ .
- b) Das Radioeisen wurde dem Chelatbildner zugesetzt, anschließend erfolgte die Zugabe des Serums:  
 $[\text{L} + \text{Fe}^*] + \text{P}$ .
- c) Das Radioeisen wurde dem Serum zugesetzt, als dritte Komponente folgte der Chelatbildner:  
 $[\text{P} + \text{Fe}^*] + \text{L}$ .

Der Ansatz setzte sich bei allen drei Varianten aus 0,5 ml Serum, 0,01 ml  $^{59}\text{FeCl}_3$  ( $\sim 2 \mu\text{Ci}$ ), 1,0 ml Veronalpuffer und 0,5 ml einer wässrigen Lösung des Chelatbildners zusammen. Wir verwendeten für diese Versuchsserie jeweils zwei Konzentrationen der vier Chelatbildner, bei denen im Falle der Variante a) 10 bis 50 % des  $^{59}\text{Fe}$  am Transferrin gebunden sind. Um den Einfluß der Inkubationsdauer zu untersuchen, führten wir die elektrophoretische Trennung des Reaktionsgemisches zu drei verschiedenen Zeiten durch: 1) Unmittelbar nach Herstellung des Ansatzes, 2) nach 5 Stunden und 3) nach 24 Stunden. Die Ansätze wurden während dieser Zeit bei einer konstanten Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  gehalten.

Die Ergebnisse dieser Versuchsserie sind in Tab. 4 wiedergegeben; sie lassen deutlich erkennen, daß sowohl die zeitliche Reihenfolge, in der die drei Komponenten: Serumprotein, Chelatbildner und  $^{59}\text{Fe}$  dem Reaktionsgemisch zugesetzt werden, als auch die Inkubationsdauer die Verteilung des Eisens zwischen Transferrin und Chelatbildner entscheidend beeinflussen.

Bezüglich der Reihenfolge in der Zugabe der drei Komponenten kann festgestellt werden, daß  $^{59}\text{Fe}$  bevorzugt von dem Liganden gebunden wird, mit dem es zuerst in Kontakt kam, d.h. vom Transferrin in Variante c) bzw. vom Chelatbildner in Variante b). Dementsprechend ist bei der Variante b) der Anteil des vom Transferrin gebundenen  $^{59}\text{Fe}$  relativ gering; er beträgt bei sofortiger Trennung des Reaktionsgemisches 0 - 13 % für die verschiedenen Konzentrationen der Chelatbildner. Kommt das  $^{59}\text{Fe}$  dagegen zuerst mit dem Serumprotein in Kontakt (Variante c)), dann wird es zu 100 % vom Transferrin gebunden, und der Chelatbildner im Konzentrationsbereich von  $1,5 \cdot 10^{-4}$  bis  $7,9 \cdot 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$  ist nicht in der Lage, das vom Transferrin komplexierte Eisen zu mobilisieren.

Setzt man  $^{59}\text{Fe}$  einem Gemisch beider Liganden zu (Variante a)), so ist der vom Transferrin gebundene Anteil des  $^{59}\text{Fe}$  höher als bei der Variante b) und niedriger als bei der Variante c); er liegt zwischen 12 und 50 % für die untersuchten Konzentrationen der Chelatbildner.

Der Einfluß der Reaktionsdauer macht sich besonders stark im Falle von BADÄ bemerkbar. Während bei beiden Konzentrationen in der Variante a) nach sofort einsetzender elektrophoretischer Trennung im Mittel 21 % des  $^{59}\text{Fe}$  vom Transferrin gebunden werden, erhöht sich dieser Anteil nach 5- bzw. 24-stündiger Inkubation auf 50 bzw. 70 %. Im Falle von DTPA kann man nach 5-stündiger Inkubation zwar noch einen Anstieg des Transferrin- $^{59}\text{Fe}$  beobachten, nicht mehr dagegen nach weiteren 19 Stunden. Anders liegen die Verhältnisse im Falle von ACATA und DFOA, bei denen der  $^{59}\text{Fe}$ -Gehalt des Transferrins offensichtlich äußerst langsam zunimmt bzw., wie im Falle von DFOA, praktisch konstant bleibt. Bei der DFOA-Serie liegt die Streuung innerhalb der experimentellen Fehlerbreite. Diese Unterschiede zwischen den vier untersuchten Chelatbildnern bezüglich des Einflusses der Reaktionsdauer auf die Verteilung des Radioeisens über beide Liganden im

Fälle der Variante a) sind in Abb. 7 deutlich zu erkennen.

Ähnlich liegen die Verhältnisse, wenn das Radioeisen zunächst mit dem Chelatbildner in Kontakt kommt und das Serumprotein als dritte Komponente zugesetzt wird (Variante b)). Im Falle von BADÄ erhöht sich der Anteil des vom Transferrin gebundenen  $^{59}\text{Fe}$  im Mittel von 4 % auf 29 % und 66 % nach 5- bzw. 24-stündiger Reaktionsdauer (Abb. 8). Nach 24-stündiger Inkubation ist demnach Transferrin auch bei nachträglicher Zugabe in der Lage, fast die gleiche Menge von  $^{59}\text{Fe}$  zu binden wie in Variante a). In Gegenwart von DTPA kann man diesen "Austausch" des Chelatbildners, an den das Radioeisen primär gebunden war, gegen das Transferrin im Laufe von 24 Stunden auch noch beobachten, allerdings in geringerem Maße; hier steigt der  $^{59}\text{Fe}$ -Transferrin-Komplex im Mittel von 2 % auf 27 % an. Im Falle von ACATA und DFOA liegen - ähnlich wie bei der Variante a) - wiederum nur geringe Unterschiede in der Verteilung des  $^{59}\text{Fe}$  zu verschiedenen Zeitpunkten vor. In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß die Genauigkeit der Auswertung der Radioaktivitätskurven, in solchen Fällen, in denen einer der beiden Peaks  $\ll 10$  % des  $^{59}\text{Fe}$  enthält, gering ist. Es ist daher fraglich, ob die Abnahme des am Transferrin gebundenen  $^{59}\text{Fe}$  von 12,6 auf 0 % real ist.

Setzt man die Chelatbildner dem mit  $^{59}\text{Fe}$  markierten Serum zu (Variante c)), sind die drei Polyaminopolycarbonsäuren auch nach 24 Stunden nicht in der Lage, das vom Transferrin gebundene Eisen zu mobilisieren, während DFOA in der gleichen Zeitspanne den  $^{59}\text{Fe}$ -Transferrin-Komplex von 100 auf 94 % reduziert.

In einer letzten Versuchsserie untersuchten wir die Verteilung des  $^{59}\text{Fe}$  über Serumprotein und Liganden, die in einer hohen Konzentration von  $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  dem mit  $^{59}\text{Fe}$  markierten Serum zugesetzt wurden. Die elektrophoretische

Trennung erfolgte a) sofort oder b) nach 5-stündiger Inkubation bei 37 °C. Diese Versuchsanordnung erlaubt einen direkten Vergleich der Effektivität der vier untersuchten Chelatbildner. Wie die in Tab. 5 zusammengestellten Ergebnisse zeigen, nimmt die Effektivität in der gleichen Reihenfolge der Chelatbildner zu, wie wir dies für den Effektivitätsfaktor  $\rho$  zeigen konnten, nämlich  $BAD\ddot{A} < DTPA < ACATA < DFOA$ . Während in Gegenwart von  $BAD\ddot{A}$  100 % des  $^{59}Fe$  durch Transferrin gebunden sind, sind es im Falle von DTPA und ACATA im Mittel 93 % und bei DFOA nur 68 %. Nach 5-stündiger Inkubation zeigte die  $^{59}Fe$ -Verteilung bei  $BAD\ddot{A}$  und DTPA keine wesentliche Veränderung, während in Gegenwart von ACATA bzw. DFOA 10 bzw. 13 % des Radioeisens den Liganden ausgetauscht haben.

#### IV. Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen in Übereinstimmung mit Cleton und Mitarb. (11) den Einfluß der Ligandenkonzentration auf die Verteilung von Fe(III) zwischen zwei konkurrierenden Liganden. Der Verlauf der Dosis-Effekt-Kurven für alle vier Chelatbildner ist identisch, obwohl die jeweiligen Ligandenkonzentrationen, die zur Erreichung einer vergleichbaren Verteilung von Eisen notwendig sind, unterschiedliche Werte aufweisen. Es besteht also die Möglichkeit, mit Hilfe des Effektivitätsfaktors  $\rho$  (Tab. 3) die relative Effektivität verschiedener Chelatbildner quantitativ zu charakterisieren, und es liegt nahe, die Abhängigkeit des Faktors von der effektiven Stabilitätskonstanten  $E$  zu prüfen. Die Berechnung von  $E$  berücksichtigt neben der thermodynamischen Stabilitätskonstanten die Liganden- und Metallkonzentration sowie die Konkurrenz der im Reaktionsgemisch vorhandenen Ca-Ionen und der Protonen. Sie erfolgt nach folgender Gleichung:

$$E = \frac{K_{Fe(III)} \cdot [L]_{tot}}{\alpha + K_{Ca} \cdot [Ca]} \quad (1)$$

$K_{\text{Fe(III)}}$ : Stabilitätskonstante des Fe-Chelats

$[\text{L}]_{\text{tot}}$  : Ligandenkonzentration ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )

$[\text{Ca}]$  : Ca-Konzentration ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )

$K_{\text{Ca}}$  : Stabilitätskonstante des Ca-Chelats

Der Einfluß der Protonen auf die Stabilitätskonstante findet in dem Verteilungskoeffizienten  $\alpha$  Berücksichtigung, der sich aus dem pH-Wert des Reaktionsgemisches und den Basizitätskonstanten von L errechnet (9, 18). Die Stabilitätskonstanten  $K_{\text{Fe(III)}}$  betragen  $10^{25,0}$  für BADÄ,  $10^{28,6}$  für DTPA (2) und für DFOA  $10^{30,6}$  (2). Die Stabilität von Fe(III)-ACATA ist noch nicht bestimmt. Die entsprechenden  $K_{\text{Ca}}$ -Werte betragen  $10^{10,0}$ ,  $10^{10,9}$  bzw.  $10^{2,6}$ .  $[\text{Ca}]$  im Serum beträgt  $\sim 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} = \text{const.}$  Die Berechnung von E nach Gleichung (1) gilt unter der Voraussetzung, daß  $[\text{L}]_{\text{tot}} \gg [\text{Fe}]_{\text{tot}}$  ist; diese Bedingung ist, wenn nur das trägerfreie  $^{59}\text{Fe}$  berücksichtigt wird, sicherlich erfüllt. Es ist jedoch zu bedenken, daß das Transferrin Fe enthält und daß der Ligand prinzipiell auch in der Lage sein könnte, das Transferrin-Fe zu mobilisieren. In diesem Falle gilt

$$E = \frac{K_{\text{Fe(III)}} \cdot [\text{L}]_{\text{tot}}}{\alpha + K_{\text{Ca}} \cdot [\text{Ca}] + K_{\text{Fe(III)}} \cdot [\text{Fe}]} \quad (2)$$

Da jedoch im Hinblick auf die hohe Stabilität des Transferrins ( $10^{31}$  (1))  $[\text{Fe}] \ll K_{\text{Fe(III)}}$  ist, dürfte es wenig wahrscheinlich sein, daß  $K_{\text{Fe(III)}} \cdot [\text{Fe}] \gg K_{\text{Ca}} \cdot [\text{Ca}]$  ist. Damit sollte der nach (2) berechnete E-Wert nur unwesentlich niedriger sein als bei der Näherungsberechnung nach (1). Die nach (1) für pH = 7,4 berechneten Logarithmen der effektiven Stabilitätskonstanten ergeben für BADÄ, DTPA und DFOA 14,6, 17,0 bzw. 22,1.

Wie aus Abb. 9 hervorgeht, läßt sich die Abhängigkeit von  $\rho$  von der effektiven Stabilitätskonstanten E durch eine Gerade im doppelt-logarithmischen Raster darstellen. Dies

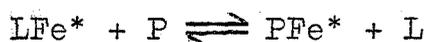
gestattet eine Schätzung der effektiven Stabilitätskonstanten für ACATA. Betrachtet man die Ergebnisse nach sofortiger Trennung des Reaktionsgemisches, so würde  $\log E$  für ACATA = 18,1 betragen.

Wie Abb. 9 zeigt, verläuft die Gerade mit einer Steigung  $\ll 1$ . Dies bedeutet, daß die Effektivität der Liganden in Gegenwart von Transferrin keine direkte Proportionalität zu der effektiven Stabilitätskonstante  $E$  aufweist.

Bezüglich der Eisenmobilisation aus dem Fe-Transferrin-Komplex durch DTPA bestätigen unsere Ergebnisse (Variante c)) die von Cleton und Mitarb. (11), die bei einem 100-fachen Überschuß von DTPA zu Transferrin (bezogen auf die molare Eisenbindungskapazität) innerhalb von 24 Stunden keine nennenswerte Fe-Mobilisation durch DTPA feststellen konnten. Die von uns verwendete Konzentration von  $8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  DTPA entspricht bei einer durchschnittlichen ungesättigten Eisenbindungskapazität des Serums von  $200 \text{ } \mu\text{g} / 100 \text{ ml} = 3,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  einem 220-fachen Überschuß an DTPA. Dagegen fanden wir im Vergleich zu Cleton und Mitarb. (11) eine wesentlich stärkere Fe-Mobilisation aus dem Fe-DTPA-Komplex durch Transferrin, nämlich 28 % nach 24 Stunden (Variante b)), während diese Autoren bei einem nur 5-fachen Überschuß an DTPA eine Fe-Mobilisation durch das Transferrin von weniger als 10 % fanden. Eine befriedigende Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse kann im Augenblick noch nicht gegeben werden. Die in vitro-Befunde von Nielsen (26), daß Transferrin nicht in der Lage ist, Eisen aus dem Ferrioxamin-Komplex zu mobilisieren, während das DFOA Eisen aus dem Transferrin mobilisieren kann, sind zwar mehr qualitativer Natur, lassen aber ähnliche Tendenzen wie unsere Ergebnisse erkennen.

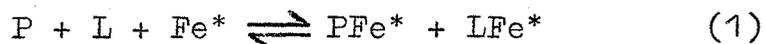
Auffallend ist der unterschiedliche Einfluß der Inkubationszeit auf die Eisenbindung durch die vier Chelatbildner in Gegenwart von Transferrin. Während im Falle von BADÄ und DTPA der  $^{59}\text{Fe}$ -Transferrin-Komplex im Laufe von

24 Stunden deutlich zunimmt, ist dieses bei ACATA und DFOA nicht der Fall (Tabelle 4, Abb. 7 und 8). Ein weiterer Hinweis für die Zeitabhängigkeit der Bindungs- und Mobilisationsreaktionen des Fe(III), wie sie auch von Margerum (24) und Rubin und Mitarb. (27) gezeigt werden konnte, ergibt eine Gegenüberstellung unserer Ergebnisse der Varianten b) und c) (Tabelle 4). Die Einstellung eines Gleichgewichtes der Reaktion



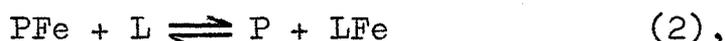
läßt sich innerhalb von 24 Stunden bei keinem der vier untersuchten Chelatbildner erzielen. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß Schwarzenbach und Mitarb. (28) zeigen konnten, daß die Mobilisation verschiedener Metalle aus ihrer Komplexbindung mit Diaminocyclohexantetraacetat wesentlich langsamer erfolgt als aus ÄDTA. Das analoge Cyclohexylderivat von BADÄ ist ACATA, und es wäre plausibel, daß bei diesen beiden Liganden ähnliche Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit auftreten. Weiterhin ergaben Untersuchungen von Anderegg und Mitarb. (2), daß die Fe(III)-Mobilisation aus DFOA durch Polyaminopolycarbonsäuren relativ langsam verläuft.

Es erhebt sich die Frage, um welche Reaktionsmechanismen es sich im einzelnen bei den von uns untersuchten Chelierungs- und Austauschreaktionen handelt und von welchen Faktoren ihre Kinetik bestimmt wird. Bei der Chelierung des ionalen radioaktiven Fe\* durch das Apotransferrin (P) und/oder den Chelatbildner (L)



sollte die Verteilung von Fe\* über die beiden Liganden eine Funktion des Verhältnisses der effektiven Stabilitätskonstanten der beiden Fe(III)-Komplexe sein. Da die Basizitätskonstanten sowie die Stabilität des Ca-Transferrin-Komplexes nicht bekannt sind, läßt sich die effektive Stabilitätskonstante des Fe(III)-Transferrins nicht berechnen. Es muß aber auf jeden Fall bei Reaktion (1)

gefordert werden, daß eine Korrelation besteht zwischen der Bildung des Fe(III)-Chelats ( $\text{LFe}^*$ ) und seiner effektiven Stabilitätskonstante. Ein Vergleich von  $\text{LFe}^*$ , d.h. der Effektivität, mit der die Chelatbildner das  $\text{Fe}^*$  in Gegenwart von Transferrin zu binden vermögen, ist durch den relativen Effektivitätsfaktor  $\rho$  gegeben. Wie Abb. 9 zeigt, verläuft die Gerade, die  $\rho$  als eine Funktion von E wiedergibt, mit einer Steigung  $\ll 1$ . Dies bedeutet, daß eine oder beide der im Reaktionsschema (1) implizit gemachten Näherungsannahmen nicht zutreffen, nämlich daß (a) nur die Reaktion (1), d.h. nur eine Chelierung von  $\text{Fe}^*$  durch die beiden Liganden stattfindet und (b) daß diese Reaktion sehr schnell verläuft. Würde außer der Chelierung von  $\text{Fe}^*$  auch eine Mobilisation inaktiven Eisens aus dem Transferrin stattfinden:



dann wäre sie nur dann erfaßbar, wenn gleichzeitig auch ein isotopischer Eisenaustausch vor sich geht:



Unter der Annahme, daß die Reaktionen (1), (2) und (3) nebeneinander ablaufen, müßte dies zu einer Verringerung von  $[\text{LFe}^*]$  führen, da der gesamte Eisengehalt des Transferrins  $[\text{PFe}] \gg [\text{LFe}^*]$  ist.

Wenn wir annehmen, daß die Reaktion (2) abläuft, so ist ebenfalls zu fordern, daß eine Korrelation zwischen der effektiven Stabilitätskonstante und der Effektivität besteht. Dies ist aber nicht der Fall, wie wir weiter oben zeigen konnten. Was die Näherungsannahme (b) anbetrifft, daß nämlich die Reaktion (1) schnell verläuft, so muß festgestellt werden, daß diese sicherlich nicht der Fall ist. Unsere Ergebnisse (Tabelle 4, Abb. 7 und 8) zeigen nämlich, daß die Bildung des  $^{59}\text{Fe}$ -Transferrin mit der Dauer der Inkubation bei zwei der untersuchten Chelatbildner (BADÄ, DTPA) deutlich zunimmt. Eine mögliche Erklärung für diese Zeitabhängigkeit könnte darin bestehen,

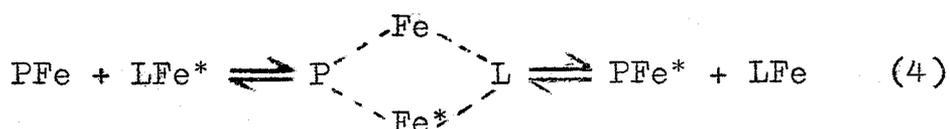
daß die Bildung des Fe(III)-Transferrin (PFe\*) langsamer als die des Fe(III)-Chelats (LFe\*) erfolgt. Gegen diese Annahme ist jedoch einzuwenden, daß bei der Variante c) die Bildung von PFe\* bei sofortiger Trennung bereits zu 100 % erfolgt ist. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß die elektrophoretische Trennung fünf Stunden in Anspruch nimmt und der als 0 bezeichnete Zeitpunkt in Wirklichkeit einer 5-stündigen Inkubationszeit gleichzusetzen ist. Ein zwingendes Argument gegen die Annahme einer langsamen Bildung des Fe(III)-Transferrin ist jedoch die Tatsache, daß unmittelbar nach Zusatz von  $\text{Fe}^{3+}$  zu Apotransferrin (P) die Bildung des Transferrin sich spektrophotometrisch bei 520 m $\mu$  nachweisen läßt.

Eine zweite Erklärungsmöglichkeit für den Zeitfaktor bei der Bildung von PFe\* wäre die Annahme, daß der Chelatbildner bzw. das betreffende Fe(III)-Chelat metabolisiert wird, was beides eine entsprechende Zunahme von PFe\* zur Folge haben sollte. Ein metabolischer Abbau des DTPA und der ihm verwandten Polyaminopolycarbonsäuren im Serum konnte aber bisher nicht nachgewiesen werden. Dagegen konnte Kemberle (21) zeigen, daß DFOA, nicht aber Ferrioxamin, im Plasma verhältnismäßig schnell metabolisiert wird. Da aber gerade bei diesem Liganden die Erhöhung von PFe\* am langsamsten erfolgt, erscheint auch diese Erklärung des Zeitfaktors nicht plausibel.

Die einzige Möglichkeit, unsere Ergebnisse befriedigend erklären zu können, liegt in der Annahme, daß (a) ein isotopischer Eisen austausch zwischen dem  $^{59}\text{Fe}$ -Chelat (LFe\*) und dem im Serum vorhandenen nicht markierten Transferrin (PFe) stattfindet. Diese Annahme erscheint plausibel, da die Gesamtmenge an PFe im Reaktionsgemisch wesentlich größer ist als an LFe. Weiterhin müssen wir annehmen, daß (b) der isotopische Eisen(III)austausch langsam verläuft. Ein Hinweis für die Richtigkeit dieser Annahme ergibt sich aus den Untersuchungen von Jones und Long (20), die zeigen

konnten, daß der isotopische Eisen austausch zwischen Fe(III)-ÄDTA und  $^{59}\text{FeCl}_3$  äußerst langsam verläuft.

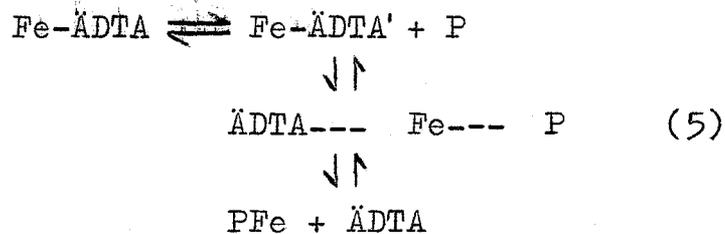
Aus unseren Ergebnissen geht hervor, daß die Austauschgeschwindigkeiten für die einzelnen Chelatbildner unterschiedlich sind; sie nehmen in der Reihenfolge: BADÄ > DTPA >> ACATA  $\approx$  DFOA ab. Falls der Austausch über freies  $\text{Fe}^{3+}$  erfolgt, muß gefordert werden, daß eine positive Korrelation zwischen dem Ablauf der Reaktion und der effektiven Stabilitätskonstante des in Frage kommenden Fe(III)-Chelats besteht. Dies trifft aber bei unseren Ergebnissen nicht zu. Eine zweite Möglichkeit wäre der Austausch über die Bildung eines intermediären Komplexes:



Aus einer Arbeit von Fletcher und Huehns (15) geht hervor, daß im Serum neben dem mit Eisen gesättigten Transferrin ( $\text{PFe}_2$ ) und dem eisenfreien Apotransferrin (P) auch solches Transferrin vorhanden ist, daß nur 1 Atom Eisen pro Molekül enthält ( $\text{PFe}$ ). Während bei niedrigem bzw. hohem Eisengehalt des Serums der Anteil an P bzw.  $\text{PFe}_2$  überwiegt, ist bei einem mittleren Eisensättigungsgrad des Serums der Anteil an  $\text{PFe}$  verhältnismäßig hoch. In dem von uns verwendeten Serum war das Transferrin zu einem Drittel mit Eisen gesättigt; es sollten demnach genügend  $\text{PFe}$ -Moleküle für die Bildung eines intermediären Komplexes nach (4) zur Verfügung stehen.

Daß der Eisen(III)-Austausch zwischen Chelatbildnern und Transferrin nicht über das freie Metallion, sondern über einen intermediären Komplex erfolgt, konnte von Bates und Mitarb. (4, 5) für ÄDTA, Citrat und Nitrilotriacetat nachgewiesen werden. Die Befunde dieser Autoren zeigen eine deutliche Abhängigkeit der Austauschgeschwindigkeiten von der Art des Liganden, während der Einfluß der

Stabilität der betreffenden Fe(III)-Chelate sekundär war. Bates und Mitarb. schlagen folgendes Reaktionsschema für den Eisenaustausch zwischen Fe(III)-ÄDTA und Apotransferrin (P) vor:



Hierbei bezeichnet Fe-ÄDTA' einen aktivierten Komplex, in dem die koordinative Bindung zwischen Eisen und Ligand teilweise gelockert ist, vermutlich durch Auffalten des Moleküls. Obwohl es sich bei diesen Untersuchungen um eine echte Eisenmobilisation handelt - der Nachweis des Fe(III)-Transferrin erfolgte spektrophotometrisch und nicht wie bei uns durch Markierung mit  $^{59}\text{Fe}$  - erscheint es plausibel, daß auch der isotopische Fe(III)-Austausch in ähnlicher Weise über einen intermediären Komplex verläuft. Für diese Annahme spricht die Tatsache, daß unsere Befunde, wie auch die von Bates und Mitarb. (4, 5), eine deutliche Abhängigkeit der Austauschgeschwindigkeit von der Art des Liganden aufweisen. Besonders langsam verlaufen die Reaktionen bei ACATA und DFOA. Beide Moleküle sind im Vergleich zu BADÄ und DTPA in ihrer freien Drehbarkeit stärker behindert, worin möglicherweise ihre geringe Tendenz zur Bildung ternärer bzw. quarternärer Komplexe oder ihre "Robustheit" begründet sind.

Schließlich wollen wir auf die Folgerungen eingehen, die sich aus unseren Untersuchungen für die Anwendung von Chelaten zur Fe-Mobilisation in vivo ergeben. Grundsätzlich müssen bei der Übertragung von in vitro-Versuchsergebnissen auf das biologische Milieu eine Reihe von Faktoren berücksichtigt werden, die die Effektivität der verschiedenen Chelatbildner beeinflussen können. Hierzu gehören das physiologische Verteilungsvolumen der Liganden und ihre Einbeziehung in metabolische Vorgänge,

die Existenz anderer endogener Fe-Liganden (neben dem Transferrin z.B. Ferritin, Hämoglobin und Apoenzyme) sowie die Konkurrenz anderer Metallionen und Metallkomplexe.

Bei einem Vergleich der Fe-Mobilisation aus dem Transferrin bei hoher Konzentration ( $10^{-2}$  mol.l<sup>-1</sup>) der vier von uns untersuchten Liganden (Tabelle 5) erwies sich DFOA den Polyaminopolycarbonsäuren gegenüber als deutlich effektiver, während in vivo-Untersuchungen von Bohne und Mitarb. (7) eine stärkere Fe-Mobilisation durch ACATA im Vergleich zu DFOA zeigten. Zieht man jedoch in Betracht, daß der physiologische Verteilungsraum von DFOA 50 % des Körpergewichtes beträgt (21), während man annehmen kann, daß ACATA (ähnlich wie DTPA) nur auf den extracellulären Raum verteilt ist (ca. 25 % des Körpergewichtes) (8, 16) und daß weiterhin DFOA im Plasma und verschiedenen Organen verhältnismäßig schnell metabolisiert wird (21), während dies für die Polyaminopolycarbonsäuren bisher nicht nachgewiesen werden konnte, so läßt sich die Diskrepanz zwischen den in vivo- und in vitro-Ergebnissen bezüglich der Fe-Mobilisation durch DFOA und ACATA zwanglos erklären. Die Überlegenheit des ACATA über BADÄ und DTPA, die Bohne und Mitarb. (7) feststellten, wird durch unsere Befunde bestätigt. Es ist offensichtlich, daß die Effektivität eines Chelatbildners in der Mobilisation von endogenem Eisen bzw. anderen Metallen nicht ausschließlich eine Funktion der Stabilität der betreffenden Metallkomplexe sondern auch der chemischen Konfiguration des Liganden ist.

#### V. Zusammenfassung

Es wurde die kompetitive Fe(III)-Bindung zwischen vier Chelatbildnern (BADÄ, DTPA, ACATA, DFOA) einerseits und Serumprotein (Transferrin) andererseits mit Hilfe von <sup>59</sup>Fe als Markierungssubstanz in Abhängigkeit von Ligandenkonzentration, Inkubationszeit und Reihenfolge der

Zugabe der Komponenten zum Reaktionsgemisch in vitro untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß der Fe-Transferrin-Komplex mit steigender Chelatbildnerkonzentration abnimmt. Nach 5- bzw. 24-stündiger Inkubation verschob sich die Verteilung des  $^{59}\text{Fe}$  zugunsten des Transferrin in unterschiedlichem Maße bei den einzelnen Chelatbildnern, bei BADÄ und DTPA wesentlich stärker als bei ACATA und DFOA. Das Radioeisen wurde bevorzugt von dem Liganden gebunden, mit dem es zuerst in Kontakt kam. Die Effektivität der untersuchten Chelatbildner bezüglich Eisenbindung und -Austausch nimmt in der Reihenfolge: BADÄ < DTPA < ACATA < DFOA zu und zeigt eine stärkere Abhängigkeit von der chemischen Konfiguration des Liganden als von der effektiven Stabilitätskonstanten der betreffenden Fe(III)-Chelate. Um die vorliegenden Untersuchungsergebnisse befriedigend erklären zu können, wird angenommen, daß (a) ein isotopischer Fe-Austausch zwischen dem  $^{59}\text{Fe}$ -Chelat und dem im Serum vorhandenen nicht markierten Transferrineisen über die Bildung eines intermediären Komplexes stattfindet und (b), daß dieser Fe(III)-Austausch langsam verläuft.

VI. Literaturverzeichnis

- 1) Aasa, R., B.G. Malmström, P. Saltman, T. Vänngård:  
Biochim. Biophys. Acta 75, 203 (1963)
- 2) Anderegg, G., F. L'Eplattenier, G. Schwarzenbach:  
Helv. chim. Acta 46, 1409 (1963)
- 3) Bannerman, R.M., S.T. Callender, D.L. Williams: Brit.  
Med. J. 2, 1573 (1962)
- 4) Bates, G.W., C. Billups, P. Saltman: J. biol. Chem.  
242, 2810 (1967)
- 5) Bates, G.W., C. Billups, P. Saltman: J. biol. Chem.  
242, 2816 (1967)
- 6) Bickel, H., E. Gaumann, W. Keller-Schierlein, V. Prelog,  
E. Vischer, A. Wettstein, H. Zahner: Experientia  
16, 129 (1960)
- 7) Bohne, F., A.E. Harmuth-Hoene, K.M. Weber: Naunyn-  
Schmiedeberg. Arch. exptl. Path. Pharm. 257, 409  
(1967)
- 8) Bohne, F., A.E. Harmuth-Hoene, F. Havlíček: In Vor-  
bereitung.
- 9) Catsch, A.: Radioactive metal mobilization in medicine.  
Springfield Illinois, Ch.C. Thomas, 1964
- 10) Cleton, F.J., W.D. Noyes, A. Turnbull, C.A. Finch:  
Clin. Res. 9, 91 (1961)
- 11) Cleton, F.J., A. Turnbull, C.A. Finch: J. clin.  
Invest. 42, 327 (1963)
- 12) Fahey, J., C.E. Rath, J.V. Princiotto, I.B. Brick,  
M. Rubin: J. Lab. clin. Med. 57, 436 (1961)
- 13) Fahey, J., J.V. Princiotto, C. Rath, M. Rubin:  
Circulat. Res. 3, 52 (1960)
- 14) Figueroa, W.G., S.G. Tuttle: Clin. Res. 9, 92 (1961)

- 15) Fletcher, J., E.R. Huehns: Nature 215, 584 (1967)
- 16) Foreman, H.: In "Metal binding in medicine".  
J.B. Lippincott, Philadelphia, Montreal, 1960,  
S. 82-94
- 17) Giblett, E.R., C.G. Hickmann, O. Smithies: Nature  
183, 1589 (1959)
- 18) Heller, H.-J., A. Catsch: Strahlentherapie 109, 464  
(1959)
- 19) Hwang, Y.F., E.B. Brown: Arch. intern. Med. 114,  
741 (1964)
- 20) Jones, S.S., F.A. Long: J. phys. Chem. 56, 25 (1952)
- 21) Keberle, H.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 119, 758 (1964)
- 22) Kirimilidis, St., Ph. Philippidis, Ch. Drossos, J.  
Economidis: Helv. paediat. Acta 21, 343 (1966)
- 23) Lê, D.Kh.: Arzneimittel-Forschg. 15, 387 (1957)
- 24) Margerum, D.W.: J. phys. Chem. 63, 336 (1959)
- 25) Moeschlin, S.: Schweiz. med. Wschr. 42, 1295 (1962)
- 26) Nielsen, J.B.: Acta Med. Scand. 173, 499 (1963)
- 27) Rubin, M., J. Houlihan, J.V. Princiotto: Proc. Soc.  
exptl. biol. Med. 103, 663 (1960)
- 28) Schwarzenbach, G., R. Gut, G. Anderegg: Helv. chim.  
Acta 37, 937 (1954)
- 29) Skochdopole, R., S. Chaberek: J. inorg. nucl. Chem.  
11, 222 (1959)
- 30) Smith, R.S.: Brit. Med. J. 2, 1577 (1962)
- 31) Walsh, J.R., R.E. Mass, F.W. Smith, V. Lange:  
Arch. intern. Med. 113, 435 (1964)
- 32) Wöhler, F.: Proc. 8<sup>th</sup> Congr. Europ. Soc. Haematol.  
Vienna 1961, I, S. 244. Karger Basel, New York.

VII. Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1: Elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit von  $^{59}\text{Fe}$ , gebunden durch  $\beta$ -Globulin und synthetische Chelatbildner.

| Substanz          | Wanderungsgeschwindigkeit<br>mm / 5 Std. |
|-------------------|--|
| $\beta$ -Globulin | 13,2                                     |
| BADÄ              | 60,0                                     |
| DTPA              | 95,5                                     |
| ACATA             | 55,0                                     |
| DFOA              | 50,0                                     |

Tabelle 2a:  $^{59}\text{Fe}$ -Gehalt des Transferrins (% der  $^{59}\text{Fe}$ -Dosis und Mutungsbereich, dem einfachen Standardfehler entsprechend) in Abhängigkeit von der Chelatbildnerkonzentration. Sofortige Trennung des Reaktionsansatzes.

| Konzentration<br>( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) | BADÄ                | DTPA                | ACATA               | DFOA                |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| $1,2 \cdot 10^{-5}$                                   |                     |                     | 100                 | 91,2 (77,2 - 107,7) |
| $4,0 \cdot 10^{-5}$                                   |                     |                     | 93,3                | 77,2 (71,3 - 83,9)  |
| $1,2 \cdot 10^{-4}$                                   | 100                 | 100                 | 89,1 (67,0 - 118,5) | 51,6 (48,8 - 54,5)  |
| $4,0 \cdot 10^{-4}$                                   | 89,7 (78,2 - 103,0) | 89,7 (73,6 - 109,4) | 70,7 (53,0 - 94,4)  | 30,4 (21,5 - 43,0)  |
| $1,2 \cdot 10^{-3}$                                   | 79,4 (71,9 - 87,7)  | 66,0 (59,0 - 73,9)  | 56,2 (49,8 - 63,4)  | 12,5 ( 7,4 - 21,2)  |
| $4,0 \cdot 10^{-3}$                                   | 57,9 (47,5 - 70,6)  | 32,7 (14,1 - 76,0)  | 21,8 (17,5 - 27,2)  | 4,7 ( 3,1 - 7,1)    |
| $1,2 \cdot 10^{-2}$                                   | 42,0 (34,4 - 51,2)  | 17,6 ( 5,0 - 61,9)  | 4,2 ( 0,9 - 18,7)   |                     |
| $4,0 \cdot 10^{-2}$                                   | 23,1 (17,8 - 29,8)  | 5,9 ( 1,7 - 20,8)   |                     |                     |
| $1,2 \cdot 10^{-1}$                                   | 8,1 ( 6,8 - 9,7)    |                     |                     |                     |

Tabelle 2b:  $^{59}\text{Fe}$ -Gehalt des Transferrins (% der  $^{59}\text{Fe}$ -Dosis und Mutungsbereich, dem einfachen Standardfehler entsprechend) in Abhängigkeit von der Chelatbildnerkonzentration. Trennung des Reaktionsansatzes nach 5-std. Inkubation.

| Konzentration<br>( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) | BADÄ                | DTPA               | ACATA               | DFOA               |
|---|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| $1,2 \cdot 10^{-5}$                                   |                     |                    | 100                 | 90,5 (81,9 - 99,9) |
| $4,0 \cdot 10^{-5}$                                   |                     |                    | 97,7 (93,8 - 101,8) | 85,1 (74,0 - 97,8) |
| $1,2 \cdot 10^{-4}$                                   | 100                 | 100                | 93,3 (87,0 - 100,1) | 52,0 (47,1 - 57,5) |
| $4,0 \cdot 10^{-4}$                                   | 94,8 (85,9 - 104,7) | 100                | 71,3 (61,2 - 81,8)  | 26,9 (14,9 - 48,6) |
| $1,2 \cdot 10^{-3}$                                   | 89,1 (80,7 - 98,4)  | 100                | 56,6 (40,6 - 77,8)  | 19,3 (11,8 - 31,6) |
| $4,0 \cdot 10^{-3}$                                   | 78,9 (66,7 - 93,3)  | 48,9 (34,2 - 69,9) | 24,1 (14,6 - 39,2)  | 7,0 ( 4,3 - 11,6)  |
| $1,2 \cdot 10^{-2}$                                   | 62,7 (56,8 - 69,2)  | 38,9 (29,7 - 50,8) | 4,9 ( 1,9 - 12,3)   |                    |
| $4,0 \cdot 10^{-2}$                                   | 44,7 (37,8 - 52,8)  | 12,4 ( 6,2 - 24,8) |                     |                    |
| $1,2 \cdot 10^{-1}$                                   | 24,4 (20,6 - 28,8)  | 0,9                |                     |                    |
| $4,0 \cdot 10^{-1}$                                   | 4,8 ( 1,6 - 14,2)   |                    |                     |                    |

Tabelle 3:  $\rho$ -Werte der verschiedenen Chelatbildner  
in bezug auf BADÄ.

|                           | BADÄ | DTPA | ACATA | DFOA  |
|---------------------------|------|------|-------|-------|
| sofortige<br>Trennung     | 1    | 3,3  | 6,6   | 66,6  |
| nach 5-std.<br>Inkubation | 1    | 4,5  | 25,0  | 143,0 |

Tabelle 4:  $^{59}\text{Fe}$ -Gehalt des Transferrins (% der  $^{59}\text{Fe}$ -Dosis) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer und der Art der Versuchsvariante (vgl. Text).

| Konzentration<br>( $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) | Chelat-<br>bildner | 0 Std. |      |     | 5 Std. |      |      | 24 Std. |      |      |
|---|--------------------|--------|------|-----|--------|------|------|---------|------|------|
|   |                    | a      | b    | c   | a      | b    | c    | a       | b    | c    |
| $7,9 \cdot 10^{-2}$                                 | BADÄ               | 14,6   | 5,2  | 100 | 45,6   | 27,0 | 100  | 65,0    | 58,5 | 100  |
| $3,5 \cdot 10^{-2}$                                 |                    | 26,8   | 2,0  | 100 | 54,6   | 30,7 | 100  | 75,0    | 74,1 | 100  |
| $9,0 \cdot 10^{-3}$                                 | DTPA               | 25,0   | 4,2  | 100 | 41,5   | 14,7 | 100  | 44,0    | 26,0 | 100  |
| $8,0 \cdot 10^{-3}$                                 |                    | 27,1   | 0    | 100 | 40,1   | 12,1 | 100  | 48,5    | 28,0 | 100  |
| $5,5 \cdot 10^{-3}$                                 | ACATA              | 14,9   | 0    | 100 | 14,3   | 4,7  | 100  | 19,5    | 10,1 | 100  |
| $4,0 \cdot 10^{-3}$                                 |                    | 19,7   | 0    | 100 | 25,2   | 4,7  | 100  | 22,7    | 11,9 | 100  |
| $1,5 \cdot 10^{-3}$                                 | DFOA               | 11,9   | 0    | 100 | 8,4    | 0    | 90,7 | 15,7    | 2,4  | 92,2 |
| $1,5 \cdot 10^{-4}$                                 |                    | 49,8   | 13,0 | 100 | 46,8   | 6,1  | 98,8 | 41,7    | 0    | 96,0 |

Abb. 1: Pherogramm von  $^{59}\text{Fe}$ -haltigem Serum.

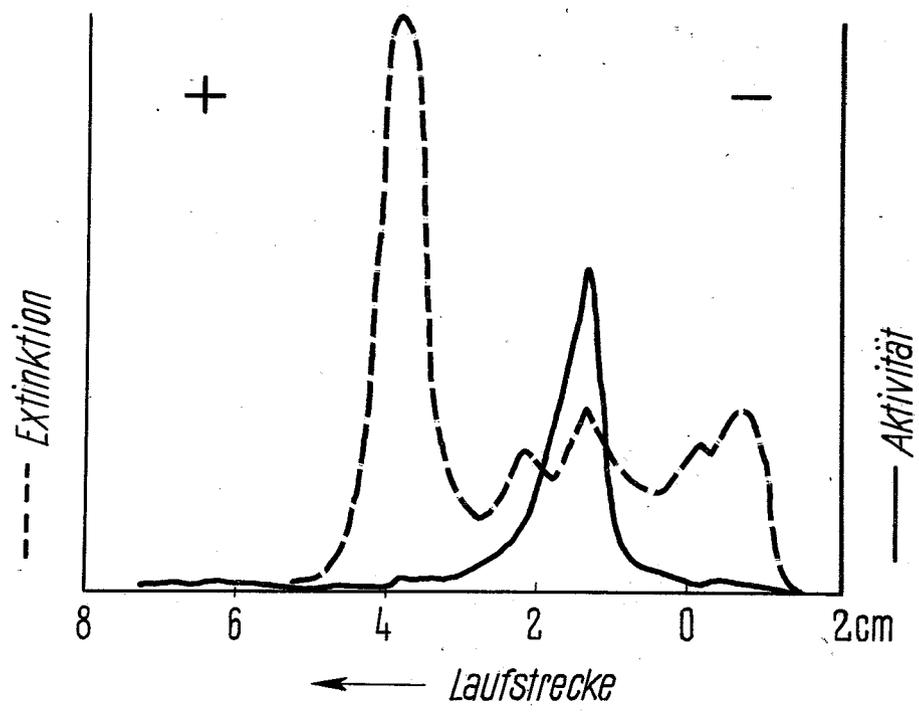


Abb. 2a: Pherogramm von  $^{59}\text{Fe}$ -haltigem Serum in Anwesenheit von BADÄ.

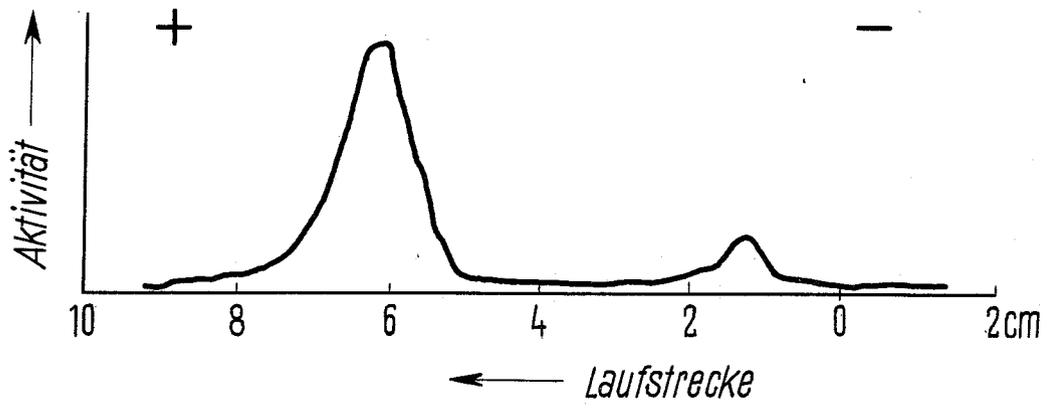


Abb. 2b: Pherogramm von  $^{59}\text{Fe}$ -haltigem Serum in Anwesenheit von DTPA.

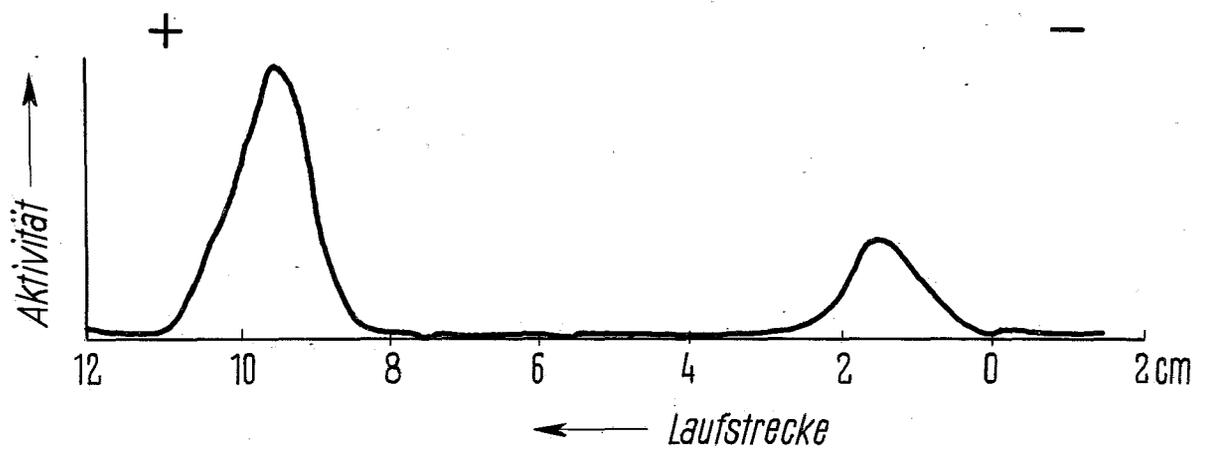


Abb. 2c: Pherogramm von  $^{59}\text{Fe}$ -haltigem Serum in Anwesenheit von ACATA.

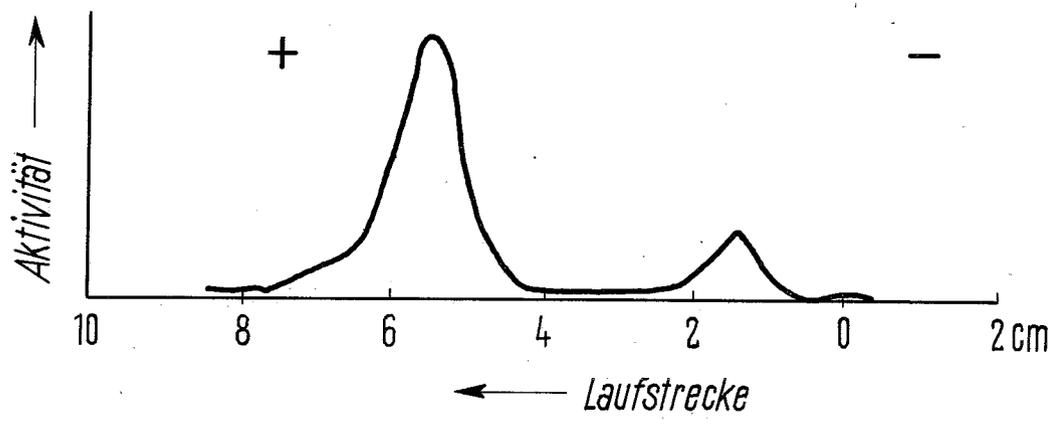


Abb. 2d: Pherogramm von  $^{59}\text{Fe}$ -haltigem Serum in Anwesenheit von DFOA.

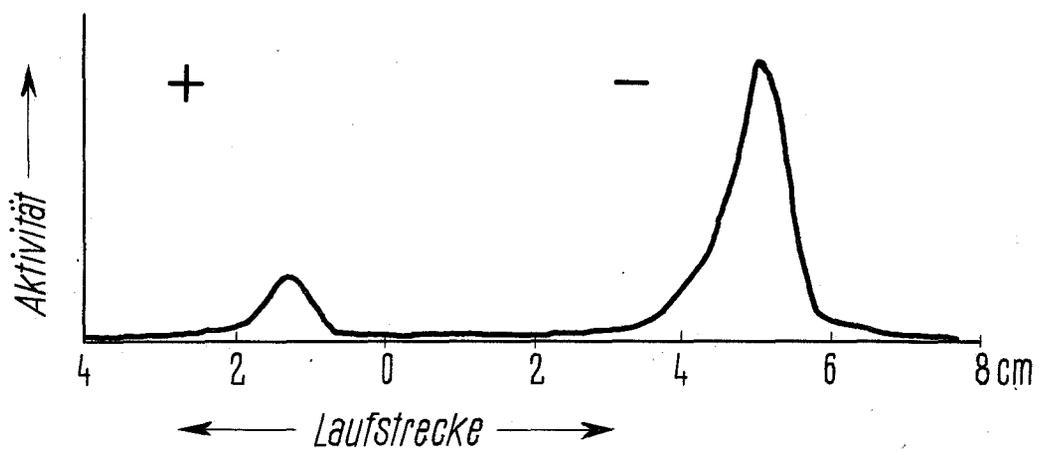


Abb. 3:  $^{59}\text{Fe}$ -Gehalt des Transferrins in Abhängigkeit  
von der Chelatbildner-Konzentration. o = ohne  
Inkubation, ● = mit Inkubation.

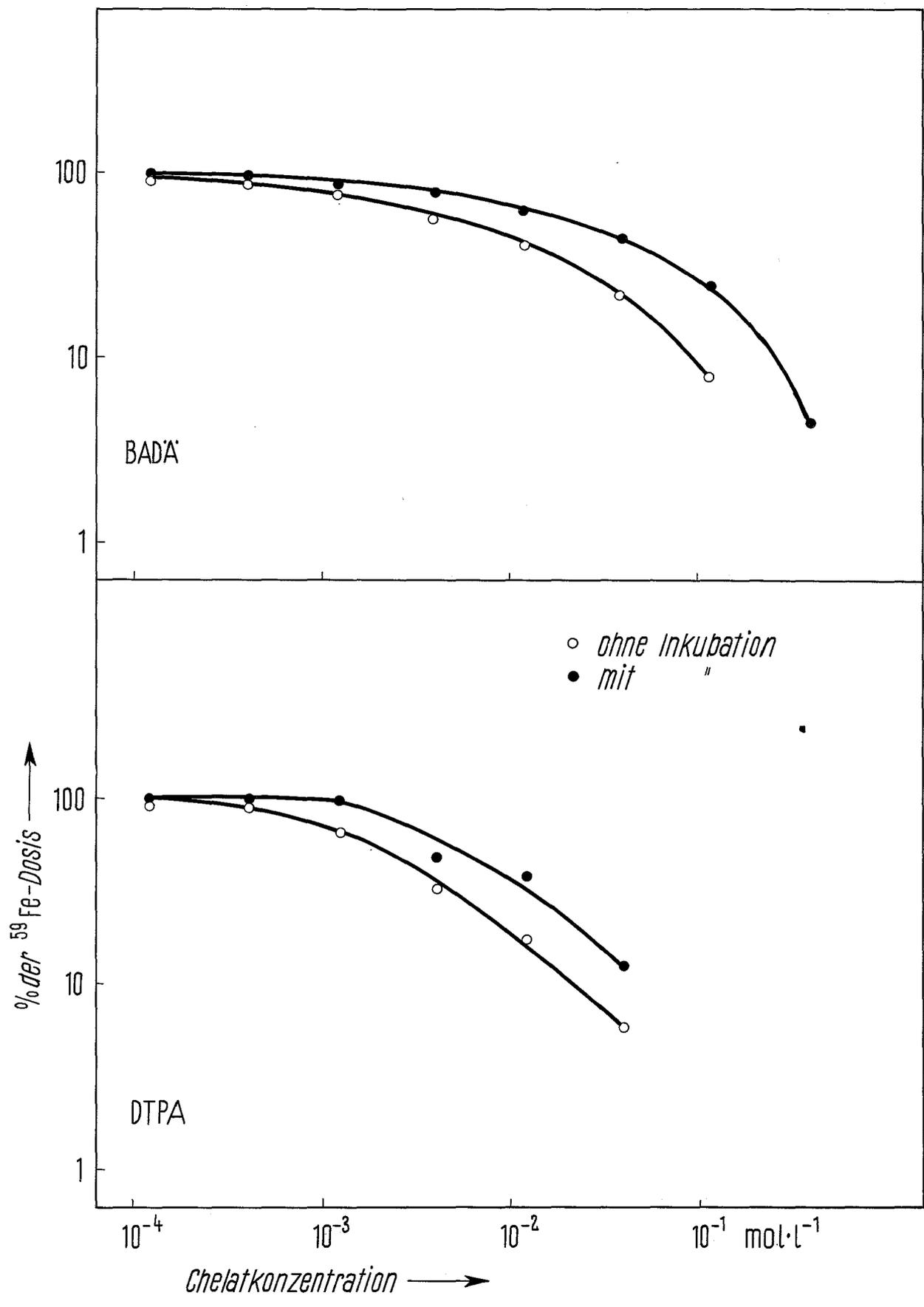


Abb. 4:  $^{59}\text{Fe}$ -Gehalt des Transferrins in Abhängigkeit  
von der Chelatbildner-Konzentration. o = ohne  
Inkubation, ● = mit Inkubation.

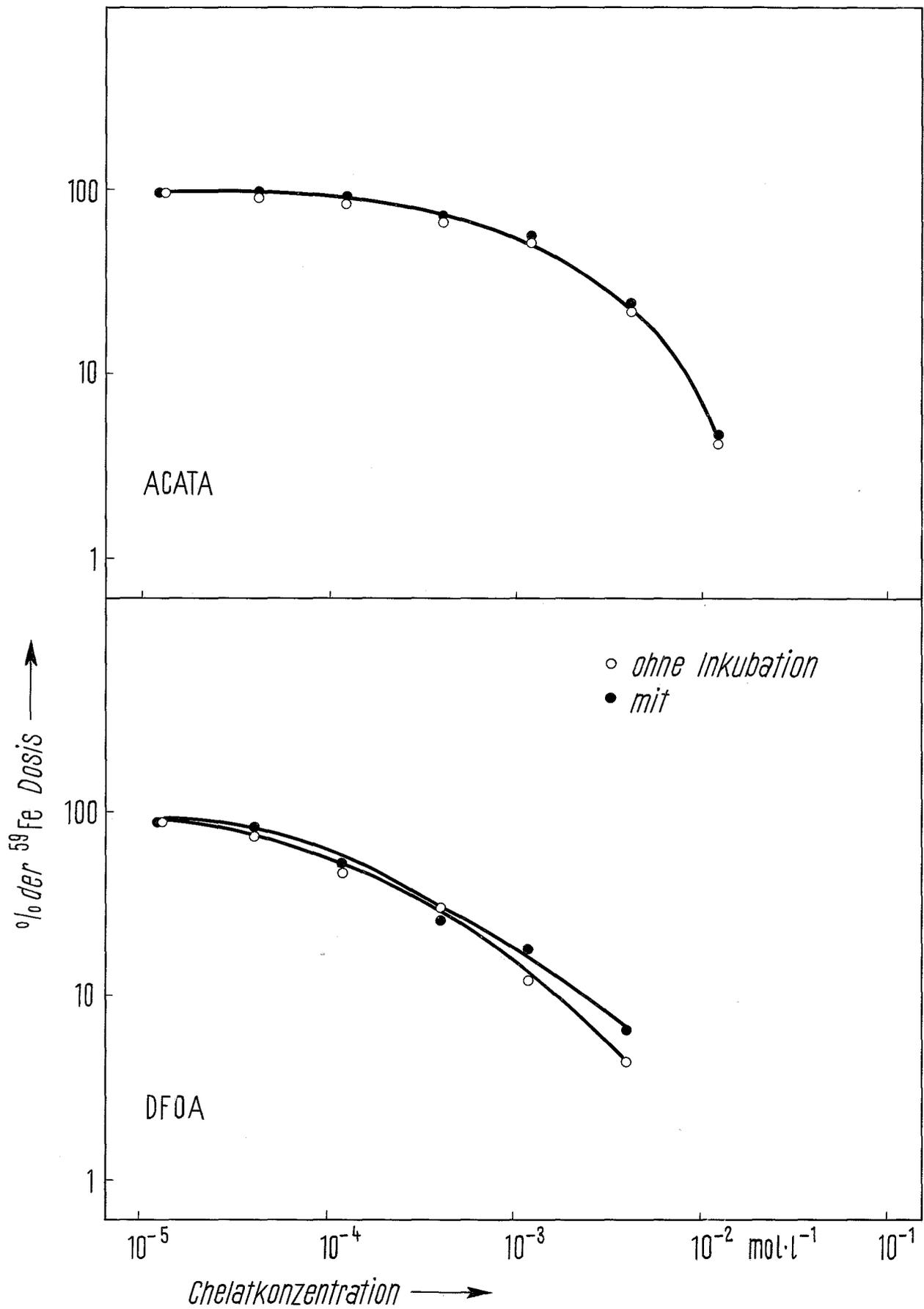


Abb. 5:  $^{59}\text{Fe}$ -Gehalt des Transferrins in Abhängigkeit von der Chelatbildner-Konzentration. Ohne Inkubation.  
Die Konzentrationen sind mit  $\rho^{-1}$  multipliziert (vgl. Text und Tabelle 3).

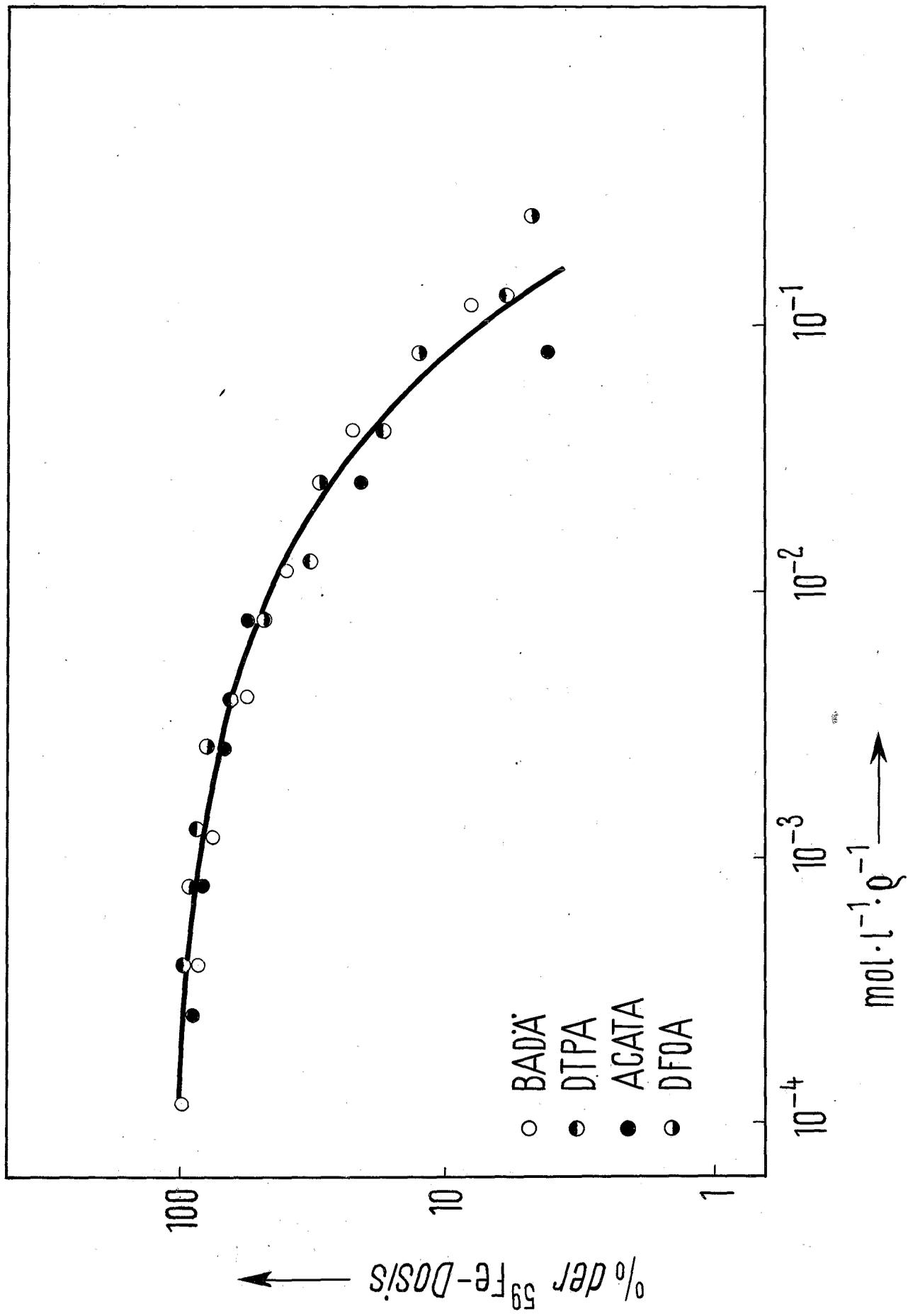


Abb. 6:  $^{59}\text{Fe}$ -Gehalt des Transferrins in Abhängigkeit von der Chelatbildner-Konzentration. Mit Inkubation.  
Die Konzentrationen sind mit  $\rho^{-1}$  multipliziert (vgl. Text und Tabelle 3).

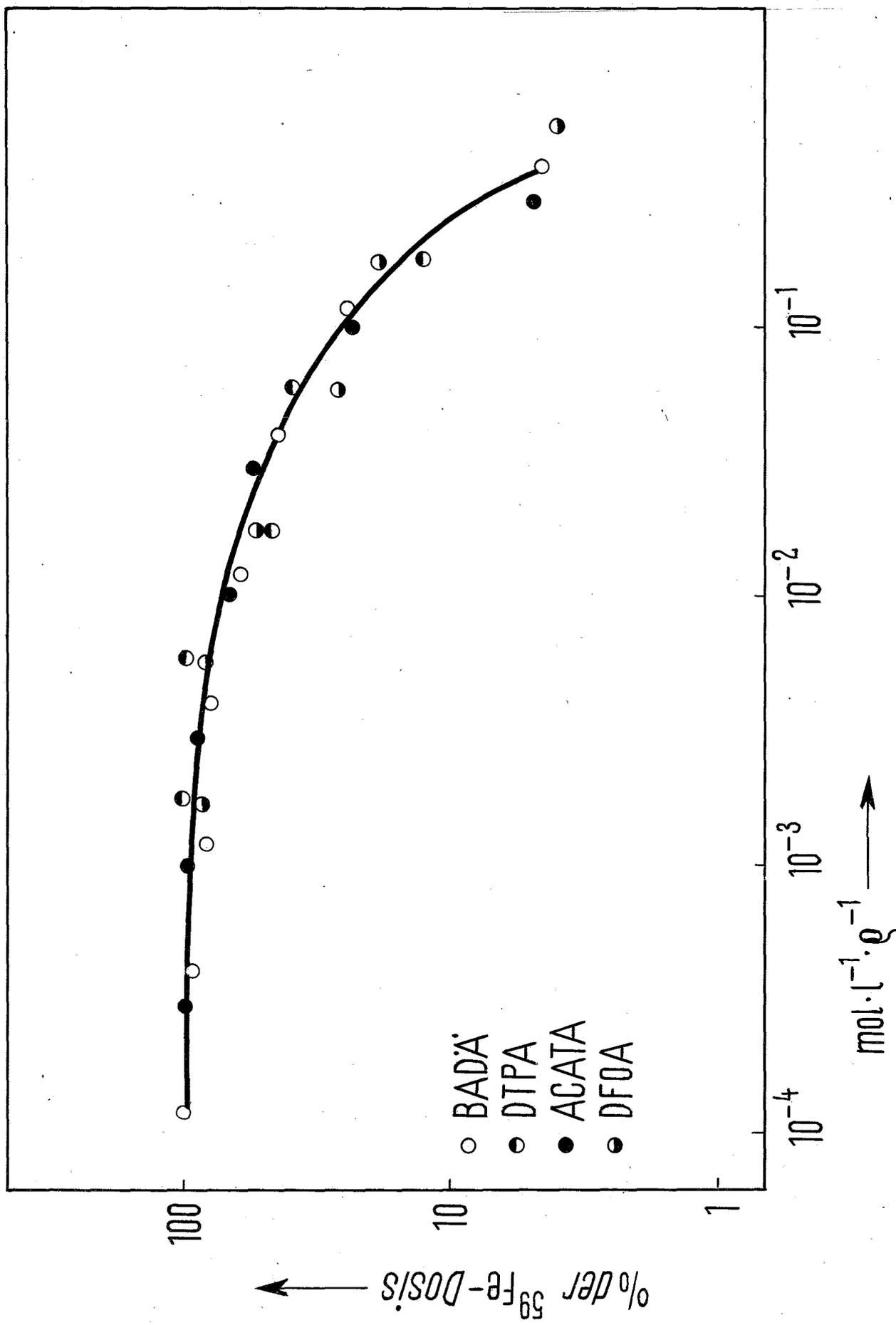


Abb. 7:  $^{59}\text{Fe}$ -Gehalt des Transferrins in Abhängigkeit  
von der Art des Chelatbildners und von der  
Inkubationsdauer. Variante a) (s. Text).

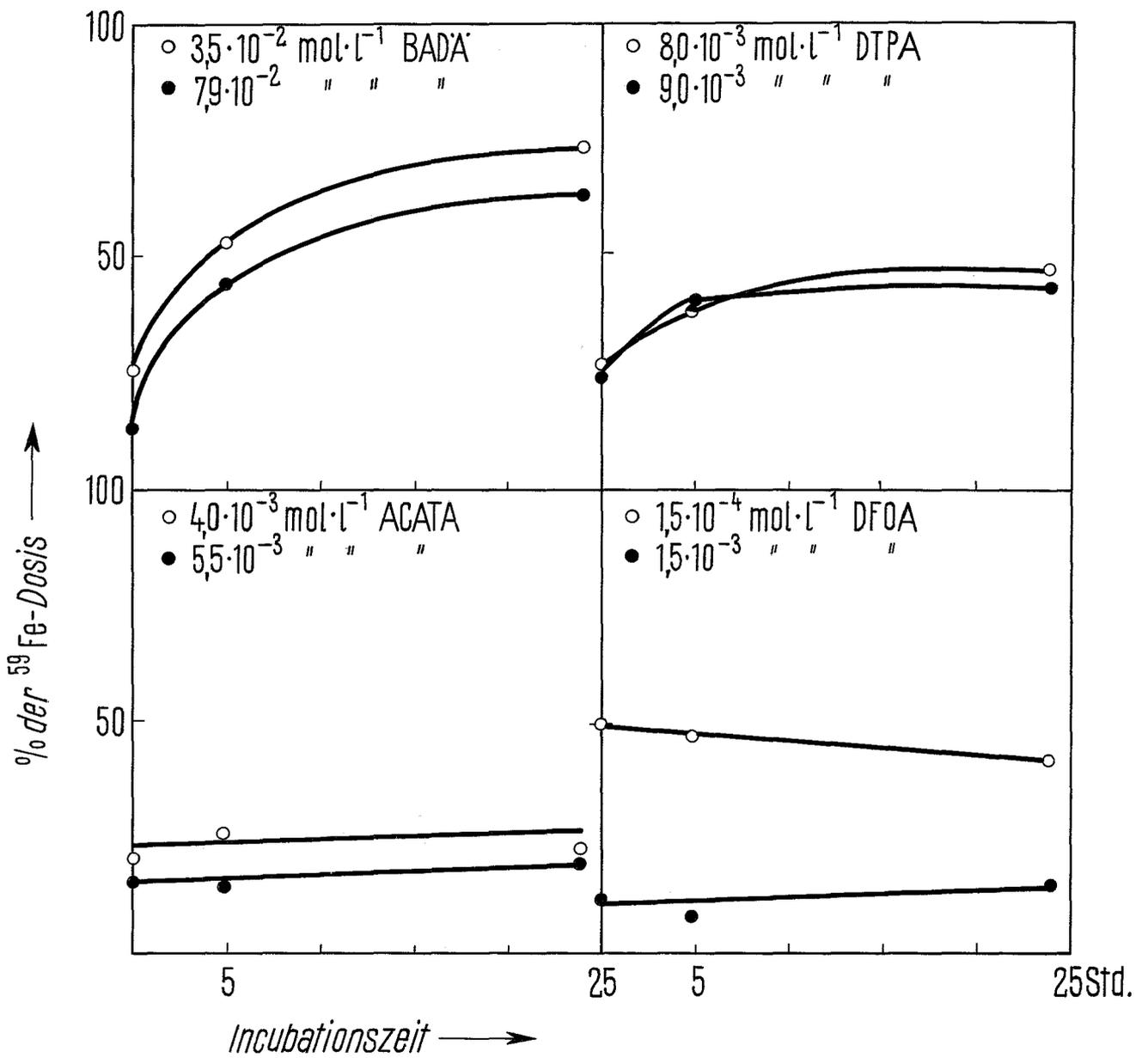


Abb. 8:  $^{59}\text{Fe}$ -Gehalt des Transferrins in Abhängigkeit  
von der Art des Chelatbildners und von der  
Inkubationsdauer. Variante b) (s. Text).

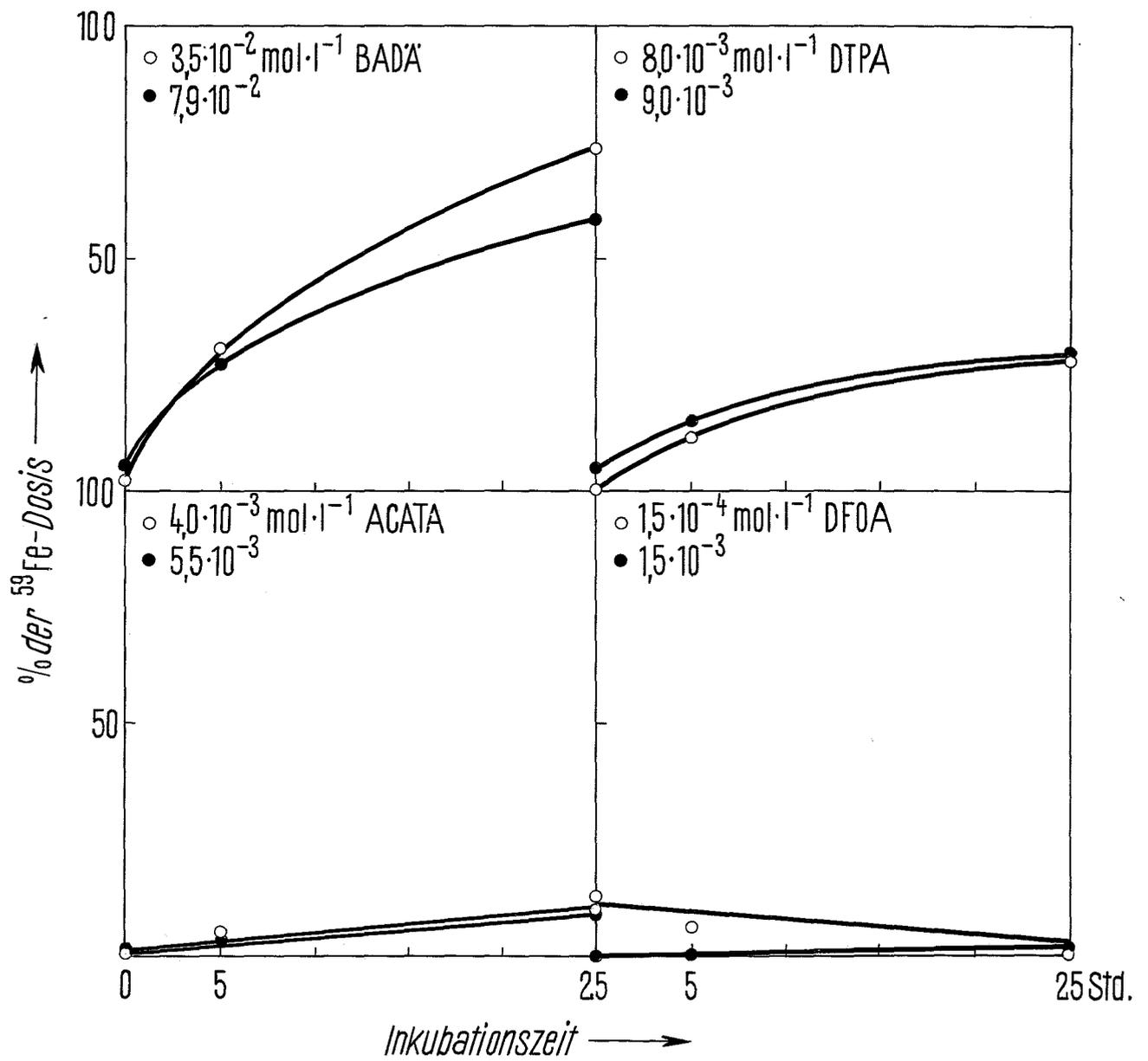


Abb. 9: Abhängigkeit der  $p$ -Werte von der effektiven Stabilitätskonstante  $E$  der Fe(III)-Chelate.

