

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM
KARLSRUHE**

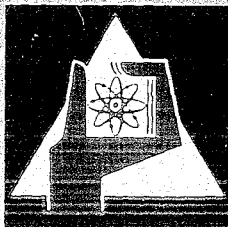
Juni 1970

KFK 1207

Institut für Strahlenbiologie

Einfluß von synthetischen Polyaminopolycarboxylsäuren auf die
Ausscheidung von Mangan bei der Ratte

W. Nadolny



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.

KARLSRUHE



Kernforschungszentrum Karlsruhe

Juni 1970

KFK 1207

Institut für Strahlenbiologie

Der Einfluß synthetischer Polyaminopolycarboxylsäuren
auf die Ausscheidung von Mangan bei der Ratte

Wilfriede Nadolny

Gesellschaft für Kernforschung m.b.H., Karlsruhe

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	6
2.1. Mangan-Bestimmung	6
2.2. Tierexperimentelle Methodik	15
2.3. Chelatbildner	16
2.4. Radiomangan	17
2.5. Statistische Auswertung	18
3. Versuchsergebnisse	18
3.1. Ausscheidung von Mn in Abhängigkeit von der Art und der Dosis des Chelatbildners	18
3.2. Einfluß von DTPA auf den Mn-Gehalt von Organen	20
3.3. Versuche mit ^{54}Mn	21
4. Diskussion	23
5. Zusammenfassung	37
6. Literatur	39
7. Tabellen und Abbildungen	44

1. Einleitung

Die Ca-Chelate des Äthylendiamintetraacetats (ÄDTA) und des Diäthylentriaminpentaacetats (DTPA) haben in den letzten Jahren bei der Behandlung von Schwer- bzw. Radio-metallvergiftungen eine zunehmende Bedeutung gewonnen (Catsch 1968a,b, Klimmer 1968, Lange 1964). Dabei konnte eine höhere Dekorporationswirksamkeit von DTPA im Tier-versuch und auch beim Menschen nachgewiesen werden (Lite-ratur bei Catsch 1968a). Darüber hinaus hat sich DTPA bei der Therapie der Eisenspeicherkrankheit, einer Störung des Fe-Stoffwechsels beim Menschen, klinisch bewährt (Literatur bei Bohne et al. 1967, Bohne und Leßmann 1969).

Um therapeutisch befriedigende Resultate zu erzielen, müssen bei der Chelatbehandlung häufig höhere Dosen über längere Zeitspannen verabreicht werden. In diesem Fall haben sich jedoch beim Menschen und bei Versuchstieren toxische Nebenwirkungen gezeigt, bei denen es sich im wesentlichen um nephrotische Veränderungen (Literatur bei Catsch 1968a, Weber 1970) und (nach neueren Untersu-chungen (Ahrens und Aronson 1968, Aronson et al. 1968, Weber 1969a, Weber 1969b)) um eine degenerative Läsion der Darmmucosa handelt. Sowohl die akute als auch die chronische Toxizität der Ca-Chelate dieser Polyaminopoly-carbonsäuren sind quantitativ bestimmt. Bei einmaliger parenteraler Applikation beträgt die LD50% $12,5 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ für DTPA (Catsch 1967) und $17,5 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ für ÄDTA (Günther 1969). Werden diese Verbindungen täglich intra-peritoneal verabfolgt, so zeigt sich, was Letalität und die Nieren- (Catsch 1964) sowie Darmschäden (Weber 1969b) betrifft, ebenfalls eine etwa 2 mal höhere toxische Wir-kung des DTPA.

Es stellt sich die Frage nach der Ursache der Toxizität der Chelatbildner. Im Hinblick auf die relativ hohe Affi-nität der Chelatbildner zu biologisch essentiellen Spuren-

metallen liegt es nahe, die toxischen Wirkungen der Chelatbildner auf den Austausch und die Mobilisierung eines oder mehrerer Spurenmetalle zurückzuführen, wodurch einerseits Metallo- bzw. metallaktivierte Enzyme, andererseits aber auch durch mehrwertige Kationen stabilisierte Zellstrukturen beeinträchtigt oder in ihrer Funktion gehemmt werden (Bersin 1963, Cotzias et al. 1960, Thiers und Vallee 1957, Wacker und Vallee 1959). Zugunsten dieser Hypothese lassen sich folgende Befunde anführen: Candura et al. (1960), Constam et al. (1964), Liberman et al. (1967), Meltzer et al. (1961), Perry und Schroeder (1957), Perry und Perry (1959), Tarui (1960), Teisinger et al. (1958) beobachteten beim Menschen unter dem Einfluß von ÄDTA eine deutlich erhöhte Ausscheidung von Zn und (in wesentlich geringerem Maße) von anderen Spurenmetallen, wie Mn, Cu, Fe und Ni, mit dem Urin. Diese Beobachtungen stützen zwar an sich die Vorstellung, daß eine Mobilisierung endogener Spurenmetalle für die Toxicität der Chelatbildner verantwortlich ist, doch handelt es sich um rein qualitative Untersuchungen. Quantitative und für die Prüfung der Hypothese unerlässliche Untersuchungen zur Frage der Dosisabhängigkeit der Metallausscheidung und der Wirksamkeit verschiedener Chelatbildner wurden bisher nur für Zn durchgeführt. Havlíček (1967) verglich die Wirkung von ÄDTA und DTPA auf die Zn-Ausscheidung im nicht toxischen Dosisbereich von 0,005 bis 0,5 mmol·kg⁻¹ und fand bei Ratten eine rund 100 mal höhere Effektivität des DTPA. In einer ähnlichen Versuchsanordnung prüfte Dvořák (1970) das Verhalten von Zn im toxischen Dosisbereich zwischen 1 und 8 mmol·kg⁻¹ und fand eine im Vergleich zu ÄDTA etwa 20 mal höhere Effektivität von DTPA.

Nigrović (1964) konnte in vivo zeigen, daß die Ca-Chelate des ÄDTA und DTPA zu einer ausgeprägten Inaktivierung der Zn-haltigen alkalischen Phosphatase der Nierenrinde führen, wobei die größere Wirksamkeit des DTPA in guter Übereinstimmung mit der unterschiedlichen Toxicität beider Liganden

stand. Arkhipova et al. (1965) wiesen in vivo eine Hemmung der Co-haltigen Glycylglycindipeptidase durch DTPA nach. In beiden Fällen konnten die Enzyme durch nachfolgende in vitro-Inkubation mit den entsprechenden Metallen reaktiviert werden.

Weitere Anhaltspunkte für die Chelattoxizität liefert der Nachweis, daß Metallchelate, die eine höhere Stabilität als die Ca-Verbindungen besitzen, unter Umständen auch eine entsprechend reduzierte Toxizität aufweisen. Dies konnte für die Zn-Chelate des ÄDTA (Sullivan 1960, Steffensen 1957) und des DTPA (Catsch 1963, Catsch 1964, Catsch und von Wedelstaedt 1965, von Wedelstaedt und Catsch 1965) nachgewiesen werden.

Aus den vorstehend angeführten Versuchen zu folgern, daß der Toxizität der Ca-Chelate ursächlich ihre Wechselwirkung mit endogenem Zn zugrundeliegt, wäre jedoch verfrüht, solange noch keine quantitativen Untersuchungen an anderen Spurenmitteln durchgeführt sind. Die obigen Befunde sind durchaus auch mit der Annahme vereinbar, daß andere Metalle als Zn beteiligt sind. So konnten zum Beispiel Foreman u. Nigrović (1968) zeigen, daß die Toxizität des (im Vergleich zum Zn-Chelat) weniger stabilen Mn(II)-DTPA deutlich geringer als die von Ca-DTPA ist.

In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung dieser Verbindungen auf die Ausscheidung von Mangan untersucht. Läge der Chelattoxizität ein Manganentzug ursächlich zugrunde, dann müßte bezüglich der Ausscheidung dieses Metalls ein gleichsinniger Unterschied in der Wirksamkeit von ÄDTA und DTPA wie bei der Toxizität vorliegen. Ferner sollte in den Organen eine verminderte Mangankonzentration zu finden sein.

Obwohl es nicht zur eigentlichen Fragestellung der vorliegenden Untersuchung gehört, dürfte es - im Hinblick auf das Verständnis der Zusammenhänge - zweckmäßig sein, kurz auf die physiologische Bedeutung und Verteilung des Mangans

im Säugetierorganismus einzugehen.

Es ist bekannt, daß Mn bei der Blutbildung, der Aktivität endokriner Drüsen, beim Vitaminstoffwechsel und beim Ablauf von Enzymprozessen eine entscheidende Rolle spielt (Literatur bei Bersin 1963, Cotzias 1958, Cotzias 1962). In vitro aktiviert Mn^{2+} , z.T. in Konkurrenz mit anderen Kationen (vor allem Mg) zahlreiche und recht unterschiedliche Enzymsysteme (Dixon und Webb 1964). Tiere zeigen charakteristische Mangelsymptome, wird ihnen eine Mn-arme Diät verabreicht (Literatur bei Bersin 1963, Cotzias 1958, Cotzias 1962).

Mit z.T. unterschiedlichen Analysemethoden untersuchten verschiedene Autoren den Mn-Gehalt in Organen des Menschen (Griffith et al. 1954, Kehoe et al. 1940, Tipton und Cook 1963) und in Säugetiergeweben (Fore und Morton 1952). Wenn auch, aller Wahrscheinlichkeit nach im Zusammenhang mit dem jeweils angewendeten Nachweisverfahren, die Angaben z.T. stark streuen, so ist doch unverkennbar, daß Mitochondrien-reiche Organe (wie Leber, Nieren und Pancreas) eine relativ hohe Mangankonzentration aufweisen, während sie in anderen Geweben wesentlich niedriger ist. Die Konzentration des Elements (bezogen auf 1 g Frischgewicht) wird für die Leber mit Werten 1,3 - 2,5 μg , die Nieren mit 0,6 - 1,2 μg und das Pancreas mit 1,3 - 2,3 μg angegeben. Auf den Mn-Gehalt des Knochens wird im späteren Zusammenhang eingegangen.

Weitere Information vermitteln Untersuchungen mit radioaktiven Mn-Isotopen (^{52}Mn , ^{54}Mn , ^{56}Mn) (Literatur bei Cotzias 1962, Cotzias et al. 1960, Kuhn 1969). Nach intravenöser Injektion von trägerfreiem ^{54}Mn wird kurzfristig nach Verabfolgung vom Skelett 4,7 % der ^{54}Mn -Dosis, von der Leber 25,5 %, der Muskulatur 18,5 %, den Nieren 6,6 % und vom Pancreas 3,1 % zurückgehalten (Kuhn 1969). Was die Verweilzeit des Radionuklids in den Organen betrifft, so ist diese durch eine multiexponentielle Funktion gekenn-

zeichnet. Ein Teil des retenierten ^{54}Mn , der im Mittel etwa 50 % der obigen Werte ausmacht, wird mit einer biologischen Halbwertszeit von 2 Tagen relativ schnell, die restliche Fraktion mit einer Halbwertszeit von 28 Tagen aus dem Skelett, 11 Tagen aus der Leber und den Nieren, 37 Tagen aus der Muskulatur und 9 Tagen aus dem Pancreas ausgeschieden. Die Ausscheidung erfolgt hauptsächlich mit den Faeces, und zwar gebunden durch das Bilirubin der Galle.

Da unsere Untersuchung unter Umständen auch für die Frage der Therapie der Mn-Vergiftung (Literatur bei Lange et al. 1964) von Bedeutung sein könnte, soll auch ein kurzer Überblick über die bisherigen Erfahrungen in dieser Beziehung gegeben werden. Verschiedene Autoren fanden nach Chelatapplikation bei Mn-vergifteten Tieren eine deutliche Intensivierung der Ausscheidung mit dem Urin und - soweit untersucht - eine dementsprechend verminderte Ablagerung in den Organen. Wenn auch die Mn-Ausscheidung mit den Faeces vermindert wurde, war die insgesamt ausgeschiedene Mn-Menge jedoch bei behandelten Tieren größer als bei unbehandelten, d.h. die Ausscheidungsbilanz war positiv (Fried et al. 1959, Kosai und Boyle 1956, Kuhn 1969, Eybl et al. 1969, Rodier et al. 1954). Eine im Vergleich zu ÄDTA höhere Effektivität von CDTA und DTPA wurde hierbei von Kuhn (1969) und Eybl et al. (1969) nachgewiesen.

CDTA (trans-Cyclohexan-1,2-diamintetraacetat) nimmt nach Eybl et al. (1969) insofern eine Sonderstellung ein, als dieser Chelatbildner, obwohl er praktisch die gleiche Affinität zu Mn(II) wie DTPA besitzt, bei gleichzeitiger Injektion mit Mn eine stärkere Ausscheidung von Mn zur Folge hat als DTPA, bei später Verabfolgung dagegen schwächer wirksam ist. Aus diesem Grunde schien es uns geboten, auch CDTA in unsere Untersuchungen einzubeziehen.

Die im Tierversuch mit Radiomangan gewonnenen Erkenntnisse können allerdings nur mit Vorbehalt als Modell für die Therapie der chronischen Mn-Vergiftung betrachtet werden,

da es sich um eine einmalige Verabfolgung sog. unwägbarer (d.h. trägerfreier) Mn-Mengen handelt.

Bei den bis jetzt nur in geringer Zahl vorliegenden klinischen Erfahrungen über die Therapie der chronischen Manganvergiftung beim Menschen durch Chelatbildner (Literatur bei Lange et al. 1964, Barbořik und Sehnlová 1967) konnte eine erhöhte Metallausscheidung mit dem Urin nach ÄDTA- und DTPA-Behandlung festgestellt werden. Aussagen über den klinischen Wert der Chelattherapie sind im Moment jedoch noch verfrüht.

2. Material und Methoden

2.1. Mangan-Bestimmung

Eine geeignete Methode zur serienmäßigen Bestimmung von Mn im Urin und Geweben zu finden, ist dadurch erschwert, daß 1) der zu erwartende Gehalt des Elements sehr gering ist, 2) das biologische Material dagegen größere Mengen anderer Elemente in variabler Zusammensetzung enthält und daß 3) bei der Aufarbeitung die Gefahr der Spureneinschleppung, aber auch eines Mn-Verlusts besteht. Unter diesen Gesichtspunkten wurden die folgenden Analysenverfahren auf ihre Anwendbarkeit hin untersucht:

- 1) Kolorimetrische Methode
- 2) Elektronspinresonanz
- 3) Neutronenaktivierungsanalyse
- 4) Atomabsorptionsspektrophotometrie

Bei dem Kolorimetrischen Bestimmungsverfahren nach Yuen (1958) wird farbloses Leukomalachitgrün durch das mit Kaliumperjodat zu Permanganat oxidierte Mangan in blaugrünes Malachitgrün überführt, dessen Absorptionsmaximum bei 620 m μ liegt. Die Methode ist mit einer Nachweisgrenze von 0,1 μ g % und einer Genauigkeit von \pm 5 % zwar relativ empfindlich, doch stören bereits Fe²⁺- und Fe³⁺-Ionen in Konzentrationen von 0,02 bzw. 0,004 mg % die Bestimmung.

Vor der Analyse der Organproben, die Eisen in größeren Mengen enthalten (Tipton und Cook 1963), läßt sich dieses Element leicht als Fe-III-Chlorid mit di-Isopropyläther extrahieren (Dodson et al. 1936), doch wird auch die bei diesem Verfahren höchstzulässige Phosphatkonzentration von 20 mg % sowohl in den Organen, als auch im Urin überschritten. Kolorimetrische Phosphorbestimmungen nach Fiske und Subbarow (1925) im 24 Stunden-Urin von Ratten ergaben einen P-Gehalt zwischen 19,7 und 32,8 mg. Auf Monophosphat umgerechnet, bedeutet dies, daß 60 bis 95 mg PO_4^{3-} vor der Mn-Bestimmung aus dem Urin entfernt werden müßten. Eine Abtrennung des störenden Phosphats könnte einerseits einen Verlust des Mn bei den einzelnen Schritten der Probenaufarbeitung, andererseits aber auch die Gefahr einer Kontamination durch die zur Abtrennung erforderlichen Reagentien mit sich bringen. Aus diesen Gründen hielten wir die Leukomalachitgrün-Methode für unsere Fragestellung für ungeeignet.

Mit Hilfe der Elektronenspinresonanz können an sich relativ sehr kleine Mn-Mengen nachgewiesen werden (e.g. Borg 1961). Zur quantitativen Bestimmung der Mn-Konzentration im Urin mußte diese Methode jedoch aufgegeben werden, weil einerseits durch die Veraschung der Proben die für diese Bestimmungsmethode geforderte 2-wertige Oxidationsstufe des Mangans nicht gewährleistet war. Andererseits ergibt sich durch die Applikation verschieden hoher Chelatdosen eine quantitativ (vielleicht auch qualitativ) unterschiedliche Zusammensetzung des Urins, wodurch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse stark beeinträchtigt wird.

Die Neutronenaktivierungsanalyse zählt zu den empfindlichsten Nachweis- und Bestimmungsmethoden von Spurenelementen im organischen und anorganischen Material (Hanle und Mitarbeiter 1964, Friedländer und Kennedy 1961, Koch und Koch-Dedic 1964). Bei diesem Analysenverfahren wird die zu untersuchende Probe mit thermischen Neutronen

bestrahlt, wobei aus stabilen, natürlichen Isotopen als Folge von Kernreaktionen Radionuklide entstehen, die durch ihre kernphysikalischen Eigenschaften wie Art und Energie der Strahlung und ihre Halbwertszeit charakterisiert sind. Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit, eine große Anzahl von Elementen mit Hilfe der durch die Bestrahlung induzierten Aktivität zu analysieren und quantitativ zu bestimmen.

Leider kam aus äußeren Gründen die Mn-Bestimmung in unseren Versuchsreihen mittels Neutronenaktivierung nicht in Betracht. Wir mußten uns damit begnügen, an einer beschränkten Anzahl von Organproben den Mn-Gehalt mittels Neutronenaktivierung zu bestimmen und konnten die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des von uns angewendeten Bestimmungsverfahrens im wesentlichen bestätigen.

Die Atomabsorptionsspektrophotometrie (AAS) hat sich als Methode zur quantitativen Bestimmung von Metallen und Halbmetallen auf vielen Gebieten der chemischen und biochemischen Analytik ihren festen Platz erobert (Literatur bei Ringhardt und Welz 1968). Mit geeigneten Apparaturen ist es möglich, extrem niedrige Elementkonzentrationen zu bestimmen. Darüber hinaus bietet die AAS die Möglichkeit, mehrere Metalle in ein und derselben Probe quantitativ zu erfassen. Das Prinzip dieser Analysenmethode ist, daß durch Zerstäuben der Probelösung in einer Flamme freie Atome des zu bestimmenden Elements erzeugt werden und die konzentrationsproportionale Intensitätsverminderung von Licht (als Folge der Absorption durch diese Atome) mit einer, für das Element charakteristischen Wellenlänge gemessen wird. Die unbekannte Metallkonzentration der Analysenlösung läßt sich mit Hilfe von Eichkurven bestimmen.

Nach Elwell und Gidley (1966) wird die Mn-Bestimmung mittels AAS nicht durch andere Kationen oder Anionen (Silicium ausgenommen) gestört. Die Vorteile, ohne vorherige Abtrennung störender Verbindungen mit sehr hoher Empfind-

lichkeit die Analyse durchführen zu können, liegen auf der Hand.

Die Untersuchungen wurden mit einem Atomabsorptionsspektrophotometer und einer Manganhohlkathodenlampe von Hilger & Watts durchgeführt und die Absorptionswerte der Eich- und Probelösungen mit einem an die Meßvorrichtung angeschlossenen Schreiber (Honeywell) registriert. Die Erfassungsgrenze, d.h. die niedrigste noch bestimmbare Mn-Konzentration beträgt nach dem Hilger & Watts Manual $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Als optimale Arbeitsbedingungen ermittelten wir folgende Einstellung der Apparatur: Wellenlänge: 2795 \AA , Stromstärke zum Betrieb der Manganhohlkathodenlampe: 23 mA , Spaltbreite: $0,1 \text{ mm}$, Verhältnis des Preßluft-Acetylen-gemisches der Flamme ($1\cdot\text{min}^{-1}$): $7:1,1$. Vor und nach jeder Messung wurde zur Einstellung des Nullpunktes solange tridestilliertes Wasser zerstäubt, bis die Gelbfärbung der Flamme durch das in den Probelösungen enthaltene Natrium verschwunden war. Vor den Bestimmungen stellten wir die Empfindlichkeit des Geräts mit Hilfe der höchstkonzentrierten Eichlösung so ein, daß sich (im Hinblick auf die niedrigste noch nachweisbare Mn-Konzentration) ein vorteilhaftes Signal-zu-Rausch-Verhältnis ergab.

Die Eichlösungen enthielten, entsprechend den in den Probelösungen zu erwartenden Mn-Konzentrationen, $5,4,3,2,1$ und $0,5 \mu\text{g Mn}\cdot\text{ml}^{-1}$. Sie wurden, unter Berücksichtigung der bei der Herstellung der Analysenlösungen erfolgten Zugaben an freier HCl und der Hilfssubstanz $\text{Na}_2\text{H}_2\text{ÄDTA}$ (s. weiter unten), aus Stammlösungen in der nachfolgend beschriebenen Weise zubereitet: $3,0763 \text{ g MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (p.a. Merck) wurden gewogen und unter Zusatz von 5 ml 30% iger HCl (ultrarein, Merck) mit tridestilliertem Wasser auf 1 l gelöst. Die Konzentration dieser Stammlösung I betrug $1000 \mu\text{g Mn}\cdot\text{ml}^{-1}$. Die zweite Stammlösung II mit einer Mn-Konzentration von $10 \mu\text{g Mn}\cdot\text{ml}^{-1}$ stellten wir her,

indem wir 10 ml der Lösung I mit tridestilliertem Wasser auf 1000 ml verdünnten. Zur Bereitung der Eichlösungen wurden 50, 40, 30, 20, 10 und 5 ml der Stammlösung II mit 10 ml 30 %iger HCl und 10 ml einer 10 %igen wässrigen Lösung von $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Titriplex III, Merck) versetzt und mit tridestilliertem Wasser auf ein Volumen von 100 ml aufgefüllt. Der HCl-Zusatz sollte gewährleisten, daß die Konzentration des ionogen gelösten Mn(II) sich nicht ändert. Dies ergaben vergleichende Absorptionsmessungen von Eichlösungen, die aus frisch zubereiteter und aus 1 Monat alter Stammlösung I hergestellt wurden. Die Stammlösung II setzten wir zur Bereitung der Eichlösungen auf die beschriebene Weise vorher aus Stammlösung I neu an. Die Haltbarkeit der Eichlösungen betrug in der angegebenen Zusammensetzung gleichfalls mindestens 1 Monat, was wir durch den Vergleich der Absorptionswerte zwischen älteren und unmittelbar vor der Messung hergestellten Eichlösungen nachweisen konnten.

Wie bereits erwähnt, ermittelt man bei der quantitativen Bestimmung eines Elements durch AAS dessen Konzentration in einem bestimmten Lösungsvolumen. Zur serienmäßigen Bestimmung der Mn-Konzentration in Urin und Organen müssen daher aus dem zu analysierenden biologischen Material zur Messung geeignete Lösungen hergestellt werden. Bei der Aufarbeitung der Proben ist zu berücksichtigen, daß die nachzuweisenden Mn-Mengen sehr gering, der Anteil an Ballaststoffen (z.B. Kohlenhydrate, Fette und Eiweiß) aber sehr hoch ist. Zur Erzielung einer möglichst hohen Nachweisgenauigkeit ist es daher notwendig, das Konzentrationsverhältnis zwischen Mn und den Ballaststoffen zugunsten des Spurenelements zu verändern und Mn anzureichern. Den sichersten Weg, die Ballaststoffe zu entfernen und die Gefahr eines Mn-Verlusts oder einer Einschleppung durch verwendete Reagentien auf ein Mindestmaß zu beschränken, bietet die trockene Veraschung. Die nasse Veraschung ist weniger günstig, da sich die verschiedenen Gewebe aufgrund

ihrer unterschiedlichen Zusammensetzung nicht unter Anwendung einer Universalmethode mineralisieren lassen. Es sind z.T. (besonders bei fettreichen Organen) mehrere Arbeitsgänge unter Zuhilfenahme verschiedener Oxidationsmittel oder Oxidationsmittelgemische erforderlich, wodurch die Gefahr einer Einschleppung von Mn-Spuren erhöht ist. Außerdem ist oftmals zur restlosen Entfernung schwer oxidierbarer organischer Bestandteile eine zusätzliche Veraschung auf trockenem Wege oder ein Abrauchen mit oxidierenden Säuren unumgänglich (Koch und Koch-Dedic 1964). Dadurch besteht wiederum die Gefahr eines Mn-Verlusts.

Es kamen nur p.a. oder ultrareine Chemikalien und tridestilliertes Wasser zur Anwendung. Zur Entfernung von Metallspuren wurden alle Glasgeräte, Polyäthylengefäße und Pipetten mindestens 12 Stunden in einer wässrigen RBS-Lösung mit einem Zusatz von 0,1 % $\text{CaNa}_2\text{ÄDTA}$ gehalten und dann wiederholt mit tridestilliertem Wasser gespült. Die Reinigung der Porzellangeräte erfolgte durch längeres Erhitzen in halbkonzentrierter HCl und mehrmaliges Auskochen in tridestilliertem Wasser. Die Porzellantiegel wurden beim Glühen bis zur Gewichtskonstanz, beim Abkühlen im Exsikkator und bei den Veraschungsvorgängen der Proben zur Verhütung der Kontamination mit Metallspuren aus der Luft mit Uhrgläsern bedeckt gehalten. Als Veraschungsöfen dienten sog. Spiegelbrenner (d.h. elektrische, regulierbare Heizquellen aus Leichtmetall), wobei die Veraschungstemperatur 500 - 550 °C betrug. Sie wurde unterhalb des Tiegelbodens mit Hilfe eines NiCr-Ni-Thermoelements gemessen. Die Thermospannung betrug bei 500 °C 20,65 und bei 550 °C 22,8 mV.

Zur Herstellung der Probelösungen modifizierten wir die Methode von Dumański (1967). Es wurden folgende Reagentien verwendet: 30 %ige HCl (ultrarein, Merck), 15 %ige HCl, 2 %ige wässrige $\text{Na}_2\text{H}_2\text{ÄDTA}\cdot\text{H}_2\text{O}$ -Lösung (p.a. Merck), 20 %ige wässrige $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -Lösung (p.a. Merck).

Bei Herstellung der Urinproben setzten wir dem Urin zur Auflösung des mineralischen Sediments 1 ml 30 %ige HCl zu und überführten ihn quantitativ durch wiederholtes Nachspülen des Sammelgefäßes mit tridestilliertem Wasser in gewogene Porzellantiegel. Nach Zugabe von 1 ml 20 %iger $MgCl_2$ -Lösung dampften wir vorsichtig mit Hilfe eines Quarzoberflächenverdampfers bis zur Trockne ein. Darauf stellten wir die Tiegel in die kalten Veraschungsöfen und steigerten die Temperatur langsam bis zur vollständigen Verkohlung des Rückstandes. Die Tiegel wurden dann mit Uhrgläsern bedeckt und bei einer Temperatur von 500 - 550 °C solange verascht, bis der Rückstand keine Kohlepartikel mehr aufwies. Die $MgCl_2$ -Zugabe hatte die Aufgabe, den Rückstand während des Veraschungsvorganges locker zu halten, damit die Kohle schneller verbrennen konnte, und ein Schmelzen der alkali- und phosphatreichen Asche zu verhindern. Außerdem sollte die salzsaure Magnesiumverbindung zusammen mit der anfänglich dem Urin zugesetzten HCl eine Manganoxidbildung und damit einen Verlust an Mn durch Reaktion mit dem Tiegelmateriale auf ein Mindestmaß beschränken. Nach dem Abkühlen der veraschten Proben folgte (zur Reduktion von evtl. während des Veraschungsvorganges entstandenen Manganoxiden) Abdampfen des Rückstands mit 2 ml 15 %iger HCl unter dem Oberflächenverdampfer. Die kalten Proben wurden genau gewogen und ein aliquoter Anteil in Lösung gebracht. In ein graduiertes Reagenzglas wurden 2 ml 15 %ige HCl gegeben, bis zur 5 ml-Marke mit tridestilliertem Wasser aufgefüllt und mit 2 %iger Na_2H_2 -ÄDTA-Lösung auf ein Endvolumen von 10 ml gebracht. Nach jeder Zugabe der Lösung schüttelten wir die Proben ca. 1 Minute und zentrifugierten unlösliche Rückstände ab. Im Überstand bestimmten wir die Mn-Konzentration. Nach Chakrabarti et al. (1966) und Ramakrishna et al. (1967) werden durch den Zusatz von 1 % Na_2H_2 -ÄDTA zur Probelösung störende Einflüsse durch Anionen bei der Absorptionsmessung verhindert.

Bei den Organen bestimmten wir sofort nach der Entnahme in genau gewogenen Porzellantiegeln das Frischgewicht und trockneten zuerst im Trockenschrank über Nacht bei 110°C . Danach wurden die Tiegel in die kalten Spiegelbrenner überführt und die Temperatur langsam gesteigert, bis sich das Veraschungsgut nicht mehr aufblähte und keine öligen Destillationsprodukte mehr entwichen. Nach vollständiger Verkohlung der Organe bedeckten wir die Tiegel mit Uhrgläsern und glühten bei $500 - 550^{\circ}\text{C}$. Der veraschte Rückstand wurde nach Abkühlen in 2 ml 15 %iger HCl aufgelöst, 1 ml 20 %ige MgCl_2 -Lösung zugesetzt und mit dem Oberflächenverdampfer bis zur Trockne eingedampft. Auf 1-stündiges erneutes Veraschen bei $500 - 550^{\circ}\text{C}$ folgte Abrauchen mit 2 ml 15 %iger HCl. Die Probelösungen zur Messung der Mn-Konzentration in den Organen stellten wir auf demselben Wege wie beim Urin her.

Die Anwendbarkeit des Analysenverfahrens zur serienmäßigen Bestimmung der Mangankonzentration in Urin und Knochenproben wurde durch den sog. Bilanz-Test geprüft. Hierzu setzten wir zu dem 24 Stunden-Urin von 5 Ratten 5 ml 30 %ige HCl und 5 ml 20 %ige MgCl_2 -Lösung und verdünnten mit tridestilliertem Wasser auf ein Volumen von 50 ml. Je 10 ml wurden abpipettiert und ohne bzw. mit Zugabe eines wässrigen MnSO_4 -Standards verascht. In 10 ml Probelösung bestimmten wir die Mn-Bilanz. Über die Ergebnisse gibt Tabelle 1 Auskunft.

Ein analoger Versuch wurde durchgeführt, um die Bilanz für das im Knochen enthaltene Mn zu bestimmen. Hierzu trockneten wir 9 Rattenfemora von 230 g schweren und 10 Wochen alten Tieren zuerst bei 110 °C und dann bei ca. 250 - 300 °C im Trockenschrank und pulverisierten sie anschließend in einem Porzellanmörser. 250 mg Knochenpulver versetzten wir mit Mn-Standardlösungen und bestimmten nach dem Veraschen in 5 ml Probelösung die Mn-Konzentrationen. Die Werte der Mn-Bilanz sind aus der Tabelle 2 zu ersehen. Während beim Mn-Nachweis im Knochen die Bilanz als befriedigend angesehen werden kann, beträgt die Bilanz im Urin nur 80 %. Es ist wahrscheinlich, daß der Verlust von 20 % Mn auf eine Reaktion mit dem Porzellan des Tiegels zurückzuführen ist. Es ist hier darauf hinzuweisen, daß zur vollkommenen Veraschung des Urins mindestens 24 Stunden benötigt werden, während die Veraschung des Knochens wesentlich schneller verläuft. Tab. 1 ist zu entnehmen, daß die prozentuale Bilanz im Falle des Urins unabhängig von der Mn-Konzentration ist; wir hielten es deswegen für gerechtfertigt, den systematischen Fehler dadurch zu korrigieren, daß wir die in den Versuchen gefundenen Mn-Werte des Urins mit 1,25 (= 100/80) multiplizierten. Obwohl nicht explizit bestimmt, wurde - mit Ausnahme des Skeletts - auch die gleiche Korrektur bei den Organen vorgenommen, da aller Wahrscheinlichkeit nach auch hier eine unvollständige Bilanz vorliegt.

2.2. Tierexperimentelle Methodik

Als Versuchstiere dienten männliche Albinoratten des Heiligenberg-Inzuchtstammes. Alter und Gewicht der Tiere werden bei den einzelnen Versuchen angegeben. Die Ernährung der Ratten bestand vor und während der Versuche aus Standardfutter (Altromin) mit einem Mn-Gehalt von $42 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ und Leitungswasser ad libitum. Wir injizierten die Chelatbildner, bei Kontrolltieren die äquimolare Dosis NaCl, ausnahmslos intraperitoneal, ^{54}Mn dagegen intravenös in die freipräparierte Schwanzvene.

Nach jeder Injektion befanden sich die Tiere zur quantitativen Sammlung des Urins bzw. zur Trennung der Ausscheidungen für 24 Stunden in Stoffwechselkäfigen, die je nach Versuchsanordnung verschieden konstruiert waren. In der ersten und zweiten Versuchsserie bestimmten wir die Ausscheidung von stabilem Mn mit dem Urin und verwendeten bei einmaliger Chelatapplikation Stoffwechselkäfige, modifiziert nach der Konstruktion von Volf und Mohr (1970); die Tiere sind im Käfig immobilisiert. Bei wiederholter Chelatinjektion benutzten wir die Restrainer Racks, Model "BR" (Aerospace Industries, Inc. Garneville, N.Y., USA); auch hier sind die Tiere immobilisiert. In den erstgenannten Käfigen hatten die Tiere während des Versuchs nur Zugang zu Trinkwasser, in den Restrainer Racks Zugang zu Futter und Trinkwasser. Beide Käfige haben den Vorteil, daß der Urin quantitativ in Polyäthylengefäßen gesammelt werden konnte, ohne mit den Faeces in Berührung zu kommen. Der Nachteil bestand darin, daß durch die Immobilisierung auf die Tiere ein Stress ausgeübt wurde. Zur Bestimmung von ^{54}Mn in Urin und Faeces verwendeten wir die Stoffwechselkäfige nach Nigrović und Mohr (1966), in denen die Tiere sich frei bewegen können und freien Zugang zu Futter und Trinkwasser haben. Eine Kontamination der Ausscheidungen mit stabilem Mn war in diesem Falle ohne Belang, da nur die ^{54}Mn -Aktivität bestimmt wurde.

Zur Bestimmung des Mn- bzw. ^{54}Mn -Gehalts des Bluts und verschiedener Organe töteten wir die Tiere 24 Stunden nach der letzten Injektion durch Ausbluten in Äthernarkose, aspirierten zuerst 2 ml Blut aus der Vena cava inf. mit einer Injektionsspritze und entnahmen dann Leber, beide Nieren, Dünndarm und die Femora. Das Blutvolumen wurde nach Cartland und Koch (1928) mit $6,7 \text{ ml} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ Körpergewicht angenommen und auf das Gesamtgewicht einer Ratte umgerechnet. Den Mn-Gehalt und die ^{54}Mn -Aktivität des Skeletts erhielten wir, indem wir nach Donaldson (1924) die Mn-Menge bzw. die in einem Femur gefundene Aktivität mit 20 multiplizierten.

Zur Bestimmung des Mn-Gehalts wurden die Organe zur Reinigung von Blutspuren und der Darm nach Aufschneiden zur Entfernung des Darminhalts mehrmals in Ringer-Lösung gespült. Anhaftende Flüssigkeit entfernten wir vor der Bestimmung des Frischgewichts mit Filterpapier.

2.3. Chelatbildner

Den Versuchstieren wurden die Chelatbildner als Calcium-Natrium-Verbindungen in wässriger Lösung mit einem pH-Wert von 7,4 injiziert. Bei der Dosierung der Chelatbildner berücksichtigten wir das Körpergewicht ($\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$). Das Injektionsvolumen betrug in der Regel 2 ml für eine 300 g schwere Ratte. Den Versuchstieren mit niedrigerem Körpergewicht injizierten wir ein entsprechend geringeres Volumen. Nur die höchste DTPA-Dosis von $8 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ applizierten wir in 4 ml gelöst. Die Injektionslösungen stellten wir aus nachstehenden Substanzen folgendermaßen her:

- 1) ÄDTA (Äthylendiamintetraacetat) aus $\text{Na}_2[\text{Ca-ÄDTA}]$ (Merck)
- 2) CDTA (trans-Cyclohexan-1,2-diamintetraacetat) aus freier Säure (Fluka)
- 3) DTPA (Diäthylentriaminpentaacetat) aus freier Säure (Fluka)

$\text{Na}_2[\text{Ca-ÄDTA}]$ wurde nur in tridestilliertem Wasser, die freien Säuren des CDTA und DTPA in dem entsprechenden Volumen 2 n-NaOH (Merck) gelöst und mit der äquimolaren Menge CaCl_2 (Merck) versetzt. Die Lösungen stellten wir durch Titration mit verdünnter HCl (1 und 0,1 n) bzw. verdünnter NaOH (1 und 0,1 n) auf den pH-Wert von 7,4 ein. Die Löslichkeit der für $8 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1} \text{Na}_3[\text{Ca-DTPA}]$ errechneten Substanzmengen in der für 2 ml Injektionslösung bestimmten Flüssigkeitsmenge wurde offensichtlich bei der Herstellung der Chelatlösung überschritten; denn sowohl die Ausgangsubstanzen als auch die als Calcium-Natrium-Salz vorliegende Verbindung (Geigy) waren erst bei der Verdopplung der Lösungsmittelmenge und damit auch des Injektionsvolumens gut in Lösung zu bringen.

2.4. Radiomangan

^{54}Mn wurde uns trägerfrei als $^{54}\text{MnCl}_2$ (1 mCi gelöst in 1 ml 0,1 n HCl) geliefert (The Radiochemical Centre Amersham, U.K.). Die Stammlösung verdünnten wir zur Injektion mit tridestilliertem Wasser und stellten mit verdünnter HCl auf einen pH-Wert von 2-3 ein. Das Injektionsvolumen betrug 0,5 ml und die einem Tier verabreichte Aktivität 10 μCi .

^{54}Mn emittiert eine energiereiche γ -Strahlung ($E_{\text{max}} = 0,84 \text{ MeV}$). Die Bestimmung des ^{54}Mn -Gehalts in den Ausscheidungen, im Blut und in den Organen erfolgte mit Hilfe eines NaJ(Tl)-Bohrlochkristalls und eines γ -Spektrometers (Firma Baird Atomic, Model 707). Die in den Proben gemessene Radioaktivität wurde in % der insgesamt injizierten ^{54}Mn -Dosis ausgedrückt. Hierzu verdünnten wir das einem Tier applizierte Injektionsvolumen von 0,5 ml mit 0,1 %iger ÄDTA-Lösung auf 100 ml und bestimmten die Aktivität in 1 ml (= 1 % der ^{54}Mn -Dosis) parallel zur Messung der Faeces-, Urin-, Blut- und Organproben. Dadurch erfolgte automatisch eine Korrektur auf den radioaktiven Zerfall (HWZ = 291 Tage).

2.5. Statistische Auswertung

Bei der statistischen Analyse erfolgten die Berechnungen überall dann, wenn exponentielle Zusammenhänge angenommen werden konnten, mit logarithmisch transformierten Einzelwerten. Dieses Verfahren bietet den Vorteil, daß die bei Versuchen dieser Art häufig anzutreffende Varianzheterogenität verschwindet. Die logarithmischen Mittelwerte wurden zurücktransformiert. Im einzelnen kamen die Methoden der Varianz- und Regressionsanalyse (Quenouille 1953) zur Anwendung. Als statistisch signifikant betrachteten wir in der Regel Ergebnisse, für die sich bei der Varianzanalyse eine Signifikanzwahrscheinlichkeit von $P \leq 0,05$ ergab.

3. Versuchsergebnisse

3.1. Ausscheidung von Mn in Abhängigkeit von der Art und der Dosis des Chelatbildners

In der ersten Versuchsserie wurde der Einfluß verschiedener Dosen von ÄDTA, CDTA und DTPA auf die Ausscheidung von Mn mit dem Urin geprüft. Wir injizierten 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 bzw. 8 $\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$. Das Alter der Tiere betrug 10 bis 12 Wochen und das mittlere Körpergewicht 220 bis 230 g. Jede Versuchsgruppe umfaßte 6 Ratten. Eine Ausnahme bildete die Gruppe bei der höchsten und bereits toxischen DTPA-Dosis; es überlebten nur 3 von 36 Versuchstieren. Die anderen Ratten starben innerhalb von 24 Stunden nach Injektion. Je 2 Kontrolltiere erhielten 1, 2, 4 bzw. 8 $\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ NaCl. In Tab. 3 sind die Versuchsergebnisse zusammengestellt.

In allen Versuchsgruppen ist die Mn-Ausscheidung höher als bei den Kontrolltieren, und es sind darüber hinaus deutliche Unterschiede in der Wirksamkeit der drei Chelatbildner: ÄDTA < CDTA < DTPA vorhanden. Die Dosisabhängigkeit der Effektivität ist noch einmal der besseren Über-

sichtlichkeit halber in den Abb. 1 - 3 wiedergegeben, und zwar einmal für die tatsächlich festgestellte Mn-Ausscheidung (Mn_g). Zum anderen ist die zusätzlich zur spontanen Mn-Ausscheidung bei den Kontrolltieren (Mn_s) durch die Chelate mobilisierte Mn-Menge (Mn_m) angeführt, die man dadurch erhält, daß von jedem individuellen Mn_t -Wert der Mittelwert von Mn_s abgezogen wird.

Mittels Regressionsanalyse berechneten wir die Kurven, die die Dosisabhängigkeit von Mn_t (Kurven 1)) und von Mn_m (Kurven 2)) wiedergeben. Wie aus den Ergebnissen der Varianzanalyse für Mn_t (Tab. 4) zu entnehmen ist, sind im Falle von ÄDTA und CDTA sowohl der quadratische als auch der kubische Term der Regressionsgleichungen statistisch nicht signifikant, so daß die Punkte im doppelt-logarithmischen Raster befriedigend durch die Geraden 1) wiedergegeben werden können. Im Falle von DTPA dagegen ist auch der quadratische Term mit $P = 0,02 - 0,01$ hoch signifikant, d.h. die Dosisabhängigkeit flacht sich im höheren Dosisbereich ab. Im Falle von Mn_m ist der quadratische Term für DTPA und CDTA signifikant (vgl. Tab. 5), und nur für ÄDTA ergibt sich eine rein lineare Regression. Die berechneten Regressionsgleichungen sind für Mn_g und Mn_m in Tab. 6 zusammengestellt. In den Abb. 1 - 3 sind schließlich die Kurven 3) wiedergegeben, die wir dadurch erhielten, daß wir von den berechneten Kurven 1) den Mittelwert von Mn_s subtrahierten. Die Kurven 3) sind erwartungsgemäß den Kurven 2) sehr ähnlich, im Falle von DTPA sogar identisch mit 2).

Was die bereits erwähnten Effektivitätsunterschiede der Chelatbildner betrifft, die außer Zweifel stehen, so interessierte uns im Hinblick auf die der Arbeit zugrunde gelegte Problemstellung in erster Linie die Bestimmung der sog. relativen Potenz (ρ), die als das Verhältnis gleichwirksamer Dosen definiert ist. Als Referenzsubstanz ist der am schwächsten wirksame Chelatbildner, d.h. ÄDTA zu

wählen. Eine Berechnung von ρ -Werten ist nur dann sinnvoll, wenn sie dosisunabhängig sind, was für unseren Fall bedeutet, daß die Dosis-Effekt-Kurven parallel verlaufen. Aus methodischen Gründen ist der statistische Test auf Parallelität nur für lineare Regressionen ohne Schwierigkeiten durchführbar. Wir legten den Berechnungen somit die Mn_t -Werte zugrunde; für die DTPA-Serie mußten überdies die Dosen $> 0,5 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ ausgeschlossen werden, da in diesem Bereich sich die statistisch signifikante quadratische Komponente deutlich manifestiert. Wie die Ergebnisse der Varianzanalyse in Tab. 7 zeigen, ist die der Nichtparallelität entsprechende Varianz praktisch mit der Fehlervarianz identisch, und es ist somit gerechtfertigt, die Dosisabhängigkeit der drei Chelate durch parallele Gerade wiederzugeben (Abb. 4). Bezogen auf ÄDTA ($\rho = 1$) beträgt ρ für

CDTA: 2,56 (2,00 - 3,28)

DTPA: 5,91 (4,42 - 8,00).

Die in Klammern angeführten Werte sind die Mutungsbereiche von ρ für $P = 0,05$.

In Abb. 5 ist die Dosisabhängigkeit noch einmal dargestellt, und zwar durch eine gemeinsame Gerade, die dadurch erhalten wurde, daß die injizierten CDTA- und DTPA-Dosen mit den oben angeführten ρ -Werten multipliziert wurden.

3.2. Einfluß von DTPA auf den Mn-Gehalt von Organen

In der zweiten Versuchsreihe sollte geprüft werden, ob bei wiederholter DTPA-Verabfolgung die Mn-Ausscheidung mit dem Urin konstant bleibt und aus welchen Organen das durch DTPA mobilisierte Mn stammt. 6 Tieren mit einem mittleren Körpergewicht von 190 g und einem Alter von 9 bis 10 Wochen injizierten wir im Abstand von 24 Stunden an 4 aufeinanderfolgenden Tagen $2 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ DTPA. Die Kontrollgruppe erhielt die äquimolare Dosis NaCl. Wie aus Tab. 8 und Abb. 6 zu entnehmen ist, nimmt die Ausscheidung von Mn mit der Zeit progredient ab und ist nach der 4. Injektion mit dem

Kontrollwert fast identisch. Bemerkenswert ist, daß die spontane Mn-Ausscheidung in der Kontrolle um einen Faktor von etwa 2 höher als in der ersten Versuchsserie war. Dies hängt aller Wahrscheinlichkeit nach damit zusammen, daß die Tiere - im Gegensatz zur 1. Versuchsreihe - Zugang zum Futter hatten, das, wie in 2.2. erwähnt, eine relativ hohe Mn-Konzentration besitzt. Auffallend war weiterhin der starke Gewichtsverlust um rund 37 % des Anfangsgewichts bei den mit DTPA behandelten Tieren; bei der Kontrollgruppe dagegen betrug die Gewichtsabnahme nur 15 %. Nach der 2. Chelatinjektion zeigte sich bei 2 der 6 Versuchstiere Durchfall, nach der 3. Injektion bereits bei 4 Ratten. 4 Tiere starben innerhalb von 24 Stunden nach der 4. DTPA-Dosis, die restlichen 2 waren nach Ablauf des letzten Versuchstages moribund.

Tab. 9 orientiert über den Mn-Gehalt und -Konzentration der Organe. Die Werte sind gegenüber der Kontrolle eindeutig vermindert. Unverkennbar ist, daß die von uns untersuchten Gewebe auf DTPA unterschiedlich ansprechen. Während der Mn-Gehalt im Skelett und in den Nieren um rund 30 % gesenkt wird, vermindert er sich in der Leber um 57 % und im Dünndarm um 80 %. Dabei ist zu bemerken, daß die Mn-Bestimmung in den Nieren durch die Empfindlichkeit der Nachweismethode ($0,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) mit einem größeren methodischen Fehler behaftet sein könnte.

3.3. Versuche mit ^{54}Mn

Wie in der Einleitung erwähnt wurde, wird Mn in erster Linie mit den Faeces ausgeschieden. In den vorangehenden Versuchen bestimmten wir nur die renale Mn-Ausscheidung, da die Mn-Bestimmung in den Faeces im Hinblick auf das in der Nahrung enthaltene Mn nicht sinnvoll ist, da zwischen ausgeschiedenem und nicht resorbiertem Mn nicht differenziert werden kann. Andererseits wäre es zur Bestimmung der Mn-Bilanz unter dem Einfluß der Chelatbildner notwendig,

auch die faecale Ausscheidung zu berücksichtigen. Zur Beantwortung dieser Frage wurde die Wirksamkeit von DTPA ($2 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$) auf die faecale und renale Ausscheidung und die Organretention von ^{54}Mn geprüft, und zwar in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Chelatverabfolgung und von der Zahl der Injektionen, d.h. der Gesamtdosis von DTPA. Das Alter der Tiere betrug 11 bis 12 Wochen und das mittlere Körpergewicht 210 g. ^{54}Mn wurde 35 Tieren trägerfrei injiziert. 6 Ratten dienten als Kontrollgruppe und 4 mal 6 und 1 mal 5 Tiere als Versuchsgruppen I - V. Über die Versuchsstruktur orientiert Tab. 10.

Tab. 11 gibt die ^{54}Mn -Ausscheidung mit dem Urin und den Faeces wieder. Daraus ist - in Übereinstimmung mit der Literatur (e.g. Bersin 1963, Cotzias 1962) - ersichtlich, daß Mn bei den Kontrolltieren vorwiegend mit den Faeces ausgeschieden wird. Die graphische Darstellung der Kontrollwerte (Abb. 7) zeigt, daß die Zeitabhängigkeit der Ausscheidung von ^{54}Mn weder im Urin noch in den Faeces einer einfachen Exponentialfunktion folgt, da die Exkretionsrate bei den Versuchs- und Kontrolltieren mit fortschreitender Zeit kleiner wird. Nach DTPA-Injektion ist eine starke Intensivierung der renalen Ausscheidung festzustellen, während die Exkretion mit den Faeces schwach erniedrigt ist (Tab. 11, Abb. 8 und 9). Die insgesamt ausgeschiedene ^{54}Mn -Menge bleibt gegenüber der Kontrolle eindeutig erhöht und das Verhältnis Urin/Faeces > 1 .

Die in den Organen verbliebene Aktivität bestimmten wir für alle Versuchsgruppen am 65. Tag. Wie aus Tab. 12 und Abb. 10 zu ersehen, ist bei den mit DTPA behandelten Tieren eine im Vergleich zur Kontrolle deutliche Senkung des ^{54}Mn -Gehalts in den untersuchten Geweben festzustellen. Im Blut wird die ^{54}Mn -Aktivität zwar durch Chelatinjektion erniedrigt, doch sind die Unterschiede bei den einzelnen Versuchsgruppen, wie aus den Ergebnissen der Varianzanalyse (Tab. 13) zu entnehmen ist, statistisch nicht signifikant, so daß

eine Mittelung über alle Versuchsgruppen berechtigt ist. Beim Dünndarm liegt eine statistisch gesicherte lineare ^{54}Mn -Abnahme bei steigender Zahl der Chelatdosen vor. Bei Leber, Nieren und Skelett fällt der unterschiedliche Verlauf der Kurven auf. So bewirken in der Leber und in den Nieren 5 Chelatinjektionen im Verhältnis zu den Versuchsgruppen, die nur 4,3 oder 2 Dosen erhalten haben, eine deutliche Verminderung des ^{54}Mn -Gehalts. Nach 4-, 3- und 2 maliger DTPA-Applikation scheint die Zahl der Injektionen keinen Einfluß auf die Verminderung des ^{54}Mn -Gehalts in den Organen auszuüben; es stellt sich im Kurvenverlauf ein angedeutetes Plateau ein. Wird jedoch nur eine Chelatdosis injiziert, so zeigt diese, im Vergleich zu 2 - 4-maliger DTPA-Applikation eine erkennbar niedrigere Wirksamkeit. Die Varianzanalyse ergibt für die Leber einen statistisch eindeutig gesicherten, für die Nieren mit $P < 0,1$ einen nicht voll signifikanten kubischen Term. Beim Skelett zeigt die Mobilisierung von ^{54}Mn in Abhängigkeit von der Gesamtdosis des Chelats mit zunehmender Zahl der Injektionen einen signifikanten quadratischen und linearen Term.

4. Diskussion

Die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe zeigen, daß ÄDTA, CDTA und DTPA bei der Mobilisierung von endogenem Mangan deutliche Effektivitätsunterschiede aufweisen. Die Dosisabhängigkeit der Effektivität der 3 Chelatbildner läßt sich durch eine gemeinsame Kurve (Abb. 5) wiedergeben, wenn man die Dosen von CDTA und DTPA mit den entsprechenden Faktor ρ (s.S. 20) multipliziert. Die experimentell ermittelten ρ -Werte betragen für CDTA $\sim 2,6$ und für DTPA ~ 6 , d.h. zur Erzielung einer gleich starken Mobilisationswirkung muß ÄDTA 2,6 mal höher als CDTA und 6 mal höher als DTPA dosiert werden.

Nach Heller und Catsch (1959) sollte die Wirksamkeit eines Chelatbildners in erster Näherung und unter den vereinfachenden Annahmen, daß der Chelatbildner im Verhältnis zu dem zu mobilisierenden Metall in großem Überschuß vorliegt und im physiologischen pH-Bereich nur 1:1-Chelate gebildet werden, proportional zur sog. effektiven Stabilitätskonstante E sein:

$$E = \frac{K_{ML}^M [L]_t}{\alpha_L + [Ca^{2+}] K_{CaL}^{Ca}},$$

wobei K_{ML}^M die Stabilitätskonstanten des Metall(M)-Ligand(L)-Chelats und $[L]_t$ die gesamte Konzentration des Chelatbildners im physiologischen Verdünnungsraum bedeuten. α_L gibt den Anteil der freien Anionen L^{b-} an der Summe aller nicht-komplexierten Protonierungsstufen der Säure $H_y L^{(b-y)-}$ für einen gegebenen pH-Wert wieder und errechnet sich aus den Aziditätskonstanten der Säure nach:

$$\alpha_L = 1 + K_{HL}^H [H] + K_{HL}^H \cdot K_{H_2L}^H [H]^2 + K_{HL}^H \cdot K_{H_2L}^H \cdot K_{H_3L}^H [H]^3 + \dots$$

Die Einführung der Stabilitätskonstante K_{CaL}^{Ca} und der im biologischen Milieu mit $\sim 10^{-3}$ M praktisch konstant gehaltenen Konzentration $[Ca^{2+}]$ wird dadurch bedingt, daß Ca^{2+} das wichtigste konkurrierende endogene Kation darstellt. Die Konkurrenz anderer Kationen ist zu vernachlässigen, weil sie entweder (wie die Alkalimetalle) keine nennenswerte Koordinationstendenz zeigen, oder (wie die Spurenmetalle) nur in sehr niedrigen Konzentrationen vorliegen. Im physiologischen pH-Bereich von 7,4 kann α_L für die von uns untersuchten Chelatbildner als additives Glied vernachlässigt werden, da $\alpha \ll K_{CaL}^{Ca} [Ca^{2+}]$ ist. Dies bedeutet, daß für diese Komplexbildner die Konkurrenz zwischen Metall und Protonen viel kleiner ist, als die Konkurrenz zwischen Metall und Calcium.

Die Berechnung von E läßt sich für die von uns untersuchten Chelatbildner durchführen, da die in die effektive Stabilitätskonstante eingehenden Aciditäts- und Stabilitätskonstanten bekannt sind (Zusammenstellung bei Catsch 1968a); die Ca^{2+} -Konzentration im physiologischen Milieu ist mit 10^{-3} M als konstant anzunehmen. Die Dosis der Chelatbildner, d.h. $[\text{L}]_t$, ist in diesem Zusammenhang irrelevant, da ein Vergleich der Effektivität von äquimolaren Dosen der einzelnen Chelatbildner durchgeführt wird. Nachstehend sind die Logarithmen der effektiven Stabilitätskonstanten der Mn(II)-Chelate von ÄDTA, CDTA und DTPA angeführt. Die zugrunde gelegten Annahmen sind: $\text{pH} = 7,4$, $[\text{Ca}^{2+}] = 10^{-3}$ M und $[\text{L}]_t = 1$ M.

ÄDTA	CDTA	DTPA
6,34	7,70	7,71

Da somit der Quotient der effektiven Stabilitätskonstanten $\Delta = \frac{E_{\text{DTPA}}}{E_{\text{ÄDTA}}} = \frac{E_{\text{CDTA}}}{E_{\text{ÄDTA}}} \sim 24$ ist, wäre im Vergleich

zu ÄDTA eine 24 mal höhere Wirksamkeit der beiden anderen Chelatbildner zu erwarten gewesen. Die experimentell ermittelten ρ -Werte von ~ 6 bzw. $\sim 2,6$ zeigen jedoch, daß die Mobilisationswirkung von DTPA und CDTA eindeutig niedriger als erwartet ist. Eine ähnliche Diskrepanz zwischen dem ρ -Wert von DTPA und dem Verhältnis der effektiven Stabilitätskonstanten von DTPA und ÄDTA wurde übrigens auch von Dvořák (1970) bei der Mobilisierung von endogenem Zink festgestellt. DTPA war in diesem Fall nur 20 mal wirksamer als ÄDTA, während nach $\frac{E_{\text{DTPA}}}{E_{\text{ÄDTA}}}$ eine 89 mal höhere Effektivität zu erwarten war.

Es erhebt sich nun die Frage, was dieser Diskrepanz ursächlich zugrunde liegt. Eine mögliche Erklärung wäre, daß die Chelatbildner ein unterschiedliches metabolisches Verhalten, wie physiologisches Verdünnungsvolumen, unterschied-

liche Ausscheidungsgeschwindigkeit und Ausscheidungswege und/oder Abbau zu Metaboliten, aufweisen. Diese Annahme kann, jedenfalls für ÄDTA und DTPA, mit Sicherheit ausgeschlossen werden, denn die Untersuchungen von Bohne et al. (1968), Havlíček et al. (1968) und Volf et al. (1970) haben den Nachweis erbracht, daß diese Chelatbildner denselben physiologischen Verdünnungsraum (20% des Körpergewichts), gleiche Ausscheidungsgeschwindigkeit (HWZ ~ 20 Min.) und denselben Ausscheidungsweg (95 % in 24 Stunden mit dem Urin) besitzen und im Körper keine Metabolisierung stattfindet (Zorn 1970). Was CDTA betrifft, so könnten, bedingt durch die cyclische Konfiguration, andere Verhältnisse im metabolischen Verhalten vorliegen, wie dies von Rubin et al. (1960) vermutet wurde, jedoch aufgrund der Mobilisierung von ^{59}Fe (Günther 1969), ^{54}Mn (Kuhn 1969) wenig wahrscheinlich ist. Eine weitere Deutung könnte von der Annahme ausgehen, daß die Chelatbildner andere Spurenmetalle in sehr hohen Konzentrationen und mit unterschiedlicher Effektivität mobilisieren, so daß die wichtigste Voraussetzung für die Gültigkeit der effektiven Stabilitätskonstanten, nämlich ein hoher Überschuß an freiem Chelat, nicht mehr gegeben ist. Diese Erklärung scheidet aber insofern aus, als nach allen bisher gemachten Erfahrungen sich die Mobilisierung von Spurenmetallen durch ÄDTA hauptsächlich auf Zink beschränkt (Candura et al. (1960), Millar et al. (1954), Perry und Perry (1959), Perry und Schroeder (1957), Tarui (1960), Teisinger und Fišerová-Bergerová (1958)). Die quantitativen Untersuchungen von Dvořák (1970) und Havlíček (1968) über den Einfluß von ÄDTA und DTPA auf die Ausscheidung von endogenem Zink haben gezeigt, daß die ausgeschiedene Zinkmenge im Verhältnis zum freien Chelat sehr klein ist und aus diesem Grund vernachlässigt werden kann.

Nachdem die vorangehenden Überlegungen keine plausible und begründete Beantwortung der zur Diskussion stehenden Frage geben konnten, erscheint es notwendig, die Mobilisierung

eines endogenen Spurenmetalls in einer allgemeinen semi-quantitativen Form zu diskutieren.

Bezeichnen wir mit $[M]_t$ und $[L]_t$ die Konzentrationen aller Metall- und Chelatspecies. Die Konzentration des Metallchelats $[ML]$ hängt von der Stabilitätskonstanten

$$K = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad (1)$$

sowie von $[M]_t$ und $[L]_t$ ab. Die Konzentrationen haben die Dimension $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. $[M]$ und $[L]$ sind gleich $[M_t - ML]$ bzw. $[L_t - ML]$, so daß

$$K = \frac{[ML]}{[M_t - ML][L_t - ML]} \quad (2)$$

wird. Diese Schreibweise hat den Vorteil, daß sie den Verhältnissen in einem biologischen System gerecht wird, indem $[M_t - ML]$ nicht nur die Konzentration freier Metallionen $[M]$ allein, sondern auch die aller anderer Species, z.B. der Verbindungen mit biologischen Liganden, wiedergibt. Sinngemäß gilt dies auch für $[L_t - ML]$.

Sind K , $[M]_t$ und $[L]_t$ bekannt, läßt sich $[ML]$ als Unbekannte aus (2) errechnen:

$$[ML] = \frac{z}{2} - \left(\left(\frac{z}{2} \right)^2 - [M]_t [L]_t \right)^{1/2} \quad (3),$$

worin

$$z = [M]_t + [L]_t + \frac{1}{K} \quad (4)$$

ist.

Abb. 11 gibt einige nach (3) berechnete Kurven wieder, die die Abhängigkeit der chelierten Metallfraktion $\frac{[ML]}{[M]_t}$ von $[L]_t$ und K zeigen. Aus äußeren Gründen sind in der Abb. 11 nicht die Stabilitätskonstanten K , sondern $\frac{1}{K}$ (d.h. die sog. Instabilitätskonstanten) bei den einzelnen Kurven angeführt. Die äquimolare Konzentration $[L]_t = [M]_t$ ist durch die gestrichelte Vertikale hervorgehoben. Die Dar-

stellung ist in bezug auf n , den Exponenten in $[L]_t$, $[M]_t$ und $\frac{1}{K}$ normiert.

Beim Vergleich von zwei Chelatbildnern L_1 und L_2 mit den Stabilitätskonstanten K_1 und K_2 ist ρ als das Verhältnis gleichwirksamer Konzentrationen $[L_1]_t$ und $[L_2]_t$ definiert, während Δ das Verhältnis K_1/K_2 ist.

Analysieren wir den speziellen von zwei Chelatbildnern, für die $\Delta = 10$ beträgt, wobei der Chelatbildner mit der höheren Stabilitätskonstante L_1 und der andere mit L_2 bezeichnet wird; Δ ist $\frac{K_1}{K_2}$. Aus Abb. 11 ist zu entnehmen, daß für $\log [L_1]_t \geq n+1$ und bei relativ niedrigen Stabilitätskonstanten ($\frac{1}{K} \geq 10^{n+2}$) das Verhältnis gleichwirksamer Chelatkonzentrationen $\rho = \Delta$ ist und mit wachsendem $[L]_t$ gleich 1 wird. Ist $\log [L_1]_t \leq n$, so ist bei relativ hohen Stabilitätskonstanten ($\frac{1}{K} \leq 10^{n-2}$) ebenfalls $\rho = 1$, und nur im Bereich von $\frac{1}{K} = 10^{n-1} - 10^{n+1}$ ist $1 < \rho < \Delta$, d.h. es liegt die Situation, die wir im Falle von Mn und den von uns untersuchten Chelatbildnern haben. Prüfen wir, für welches Modell die obigen Randbedingungen zutreffen.

Es wird angenommen, daß der physiologische Verdünnungsraum der Ca-Chelate des ÄDTA und DTPA rund 20 % des Körpergewichts ausmacht, d.h. dem extracellulären Wasser gleichkommt (Bohne et al. 1968, Foreman et al. 1953, 1960, Volf et al. 1970). Die Mn-Konzentration im Blutplasma ($[M]_t$) wird mit $\sim 10^{-6}$ M (Miller und Yoe 1962) bzw. $\sim 10^{-7}$ M (Cotzias und Papavasiliou 1962) angegeben. In dem von uns untersuchten Chelatdosisbereich ($0,1 - 10$ mmol \cdot kg $^{-1}$) würde die maximale Konzentration ($[L]_t$) bei einer 250 g schweren Ratte im Bereich von etwa $5 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-2}$ M liegen und mit einer Halbwertszeit von ~ 20 Min. abnehmen. Damit ist bereits eine der Randbedingungen nicht erfüllt, und die Hypothese, daß die Chelierung des Mn ausschließlich im Plasmawasser stattfindet, kann verworfen werden. Die Tatsache, daß die mit dem Urin ausge-

schiedene Mn-Mengen weit höher als der Mn-Gehalt des Plasmas ist und daß eine Verarmung der Gewebe an Mn resultiert, ist - für sich allein betrachtet - kein Argument gegen die Hypothese, da es infolge des gestörten Gleichgewichts zu einem "Einströmen" von Mn aus den Geweben in das extracelluläre Kompartiment kommen müßte.

Eine mögliche Erweiterung der ursprünglichen Hypothese könnte davon ausgehen, daß zum extracellulären Kompartiment auch der Knochen gehört; eine Annahme, die physiologisch durchaus sinnvoll ist. Da die Mn-Konzentration des Knochenmarks 100 mal niedriger als die des Knochengewebes ist (Cotzias 1962), kann sie bei den folgenden Überlegungen vernachlässigt werden. Geht man von den mittels AAS bestimmten und mit den Angaben anderer Autoren übereinstimmenden Werten aus, beträgt die Konzentration maximal 10^{-4} M. Wenn auch die Mn-Konzentration im Knochen höher als im Blutplasma ist, ist die Randbedingung $[L_1]_t \leq [M]_t$ immer noch nicht erfüllt.

Die Mn-Konzentration im intracellulären Raum beträgt nach unseren Daten etwa $3 \cdot 10^{-5}$ M. Nimmt man nun an, daß ein kleiner Bruchteil der Chelatdosis, beispielsweise 1 %, in den intracellulären Raum gelangt, würde sich die Chelat-Konzentration hier auf $5 \cdot 10^{-6}$ - $5 \cdot 10^{-4}$ M erniedrigen und die erste Randbedingung erfüllt sein. Ist $[M]_t \sim 10^{-5}$ M, so müßten, entsprechend der zweiten Randbedingung, die K-Werte für die Chelatbildner in der Größenordnung von 10^6 - 10^4 liegen. Die Stabilitätskonstanten von Mn(II)-ÄDTA und -DTPA betragen $10^{14,04}$ bzw. $10^{15,60}$ und erniedrigen sich, wenn man der pH-Abhängigkeit sowie der Konkurrenz von Ca^{2+} durch die sog. effektive Stabilitätskonstante (vgl. S. 25) Rechnung trägt, auf $10^{6,34}$ für ÄDTA und $10^{7,71}$ für DTPA, d.h. Werte, die um rund 2 Größenordnungen höher als die aufgrund der Randbedingungen postulierten K liegen. Ein Widerspruch besteht jedoch insofern nicht, als die effektiven Stabilitätskon-

stanten die Konkurrenz endogener Liganden nicht berücksichtigen und somit durch die Stabilitätskonstante für die endogenen Mn-Assoziate zu dividieren wären, die aus den obigen Werten sich somit zu etwa 10^2 ergibt. Diese Stabilität ist allerdings relativ niedrig; die Stabilitätskonstante des Ca-Albumin ist beispielsweise 10^3 . Ein zwingendes Argument gegen die vorstehend entwickelte Arbeitshypothese ist der niedrige K-Wert allerdings nicht: Die effektiven Stabilitätskonstanten wurden für die relativ hohe Ca^{2+} -Konzentration im Blutplasma berechnet, während sie im intracellulären Raum niedriger ist und damit auch die effektive Stabilitätskonstante und die Stabilität der endogenen Mn-Verbindung sich um den entsprechenden Betrag erhöhen.

Die Annahme, daß ein kleiner Bruchteil der Chelatdosis in den intracellulären Raum gelangt, steht nicht im Widerspruch zu der weiter oben erwähnten Feststellung, daß die Chelate sich im extracellulären Raum verteilen; sie basiert auf dem durch Extrapolation der Plasmaclearance nach $t = 0$ erhaltenen Chelatkonzentration im Blutplasma. Diese Methode ist jedoch relativ unempfindlich, und die Ungenauigkeit der Anfangskonzentration lässt die Annahme einer intracellulären Permeation bis zu 10 % der Dosis ohne weiteres zu. Außerdem liegen auch andere Befunde vor, die einen direkten Hinweis dafür geben, daß ein kleinerer Bruchteil der Chelate die Zellmembran zu passieren imstande ist (Ballou u. Palotay 1966, Slouka 1969).

Daß im Falle hoher DTPA-Dosen ($>0,5 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$) die Dosis-Effekt-Kurve nicht, wie bei den anderen Chelatbildnern, linear verläuft, sondern sich abflacht, könnte verschiedene Gründe haben: Die Menge des grundsätzlich mobilisierbaren Mn ist beschränkt, so daß eine weitere Erhöhung der Dosis wirkungslos bleibt. Gegen diese - an sich durchaus plausible und in einem höheren Dosisbereich sicherlich realisierte - Vorstellung spricht in unserem speziellen Fall

allerdings der Umstand, daß $\rho_{\text{DTPA/CDTA}}$ im Dosisbereich $\geq 0,5 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ zunehmend kleiner wird, während er bei Dosen $< 0,5 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ mit einem Wert von $\frac{5,91}{2,56} = 2,31$ annähernd konstant bleibt. Begründeter erscheint somit die Erklärung, die wir weiter oben erwähnten und demzufolge mit wachsendem $[\text{L}]_t$ ρ kleiner wird und dem Grenzwert 1 zustrebt. Dafür spricht auch der Umstand, daß die Steigung der experimentellen Dosis-Effekt-Kurven durchgehend < 1 ist.

Unerwartet ist die im Vergleich zu DTPA gesichert geringere Wirksamkeit des CDTA; unerwartet deswegen, weil die effektiven Stabilitätskonstanten für beide Chelatbildner praktisch identisch sind (vgl. S. 25). Die Ursache für die geringere Effektivität des CDTA muß aller Wahrscheinlichkeit darin gesehen werden, daß es sich um einen Chelatbildner handelt, der - im Gegensatz zu den anderen Polyaminopolycarboxylsäuren - eine ausgesprochene Tendenz zur Bildung sog. robuster (oder inerter) Chelate aufweist, die durch träge ablaufende Austauschreaktionen gekennzeichnet sind. Ein robustes Verhalten von CDTA konnte sowohl in rein chemischen Systemen (Schwarzenbach et al. 1954, Margerum et al. 1963) als auch im biologischen Milieu (Günther 1969, Harmuth-Hoene et al. 1970), speziell für Mn (Kuhn 1969), nachgewiesen werden.

Die Beurteilung der Versuchsreihe, in der die Tiere an 4 aufeinanderfolgenden Tagen DTPA erhielten (vgl. Tab. 8), ist aus mehreren Gründen erschwert. Zunächst können keine Aussagen über die faecale Mn-Ausscheidung gemacht werden, da - wie weiter oben bereits erwähnt - die Trennung von ausgeschiedenem und nicht resorbiertem, aus der Nahrung stammendem Mn nicht möglich ist. Es könnte zwar daran gedacht werden, die faecale Ausscheidung unter Heranziehung der spezifischen Aktivität des Urins (die aus Versuchsreihe 2) und 3) zu berechnen wäre) zu bestimmen.

Wir nahmen davon jedoch Abstand, da dieses Vorgehen von der Annahme ausgeht, daß die spezifische Aktivität des Urins mit der der Faeces identisch ist. Unter Berücksichtigung des Mn-Stoffwechsels erscheint jedoch eine solche Annahme als wenig wahrscheinlich, zumindest aber experimentell nicht verifizierbar. Weiterhin wäre für die vorliegende Frage die Bestimmung der sog. Bilanz erforderlich. Diese ist jedoch nicht möglich, da die aus dem Darm resorbierte Mn-Menge nicht bekannt ist. Es ist zu vermuten, daß die Mn-Aufnahme bei den Kontrolltieren und erst recht bei den unter dem toxischen Einfluß des DTPA stehenden Tieren stark reduziert ist. Die Tiere nehmen kaum Futter und Wasser zu sich, was sich auch in einer relativ starken Gewichtsabnahme (S. 21) widerspiegelt.

Es ist somit nur der Vergleich der Differenz zwischen dem Mn-Gehalt der Organe bei den Kontrolltieren und denen der DTPA-Gruppe mit der unter dem Einfluß von DTPA mit dem Urin ausgeschiedenen Mn-Menge möglich. Die faecale Ausscheidung bei den DTPA-Tieren ist, wie aus den Versuchen mit ^{54}Mn hervorgeht, in diesem Zusammenhang als additives Glied vernachlässigbar. Die DTPA-Tiere schieden innerhalb von 4 Tagen insgesamt rund $31 \mu\text{g Mn}$ mit dem Urin aus, während die Differenz des Organgehalts nach Tab. 8 $28 - 35 \mu\text{g}$ beträgt. Es liegt auf den ersten Blick eine recht gute Übereinstimmung vor. Tatsächlich jedoch müßte eine etwas höhere Ausscheidung vorliegen, da wir die Mobilisierung von Mn aus dem Dickdarm, dem Pankreas und der Muskulatur nicht bestimmt haben, d.h. Organen, deren Mn-Gehalt durch DTPA sicherlich gesenkt wird, wie aus den Versuchen von Kuhn (1969) hervorgeht.

Die Versuche mit ^{54}Mn bestätigen zunächst die auch von anderen Autoren (Literatur bei Cotzias 1962) gemachte Beobachtung, daß die Ausscheidung des Mn in erster Linie mit den Faeces erfolgt; die Ausscheidungsraten liegen in unserem Versuch bis zum 64. Tag um rund 2 Größenord-

nungen höher als die im Urin. In Übereinstimmung mit dem Schrifttum ist auch die nichtexponentielle Zeitabhängigkeit, zumindest was die faecale Ausscheidung betrifft. Im Falle des Urins ist eine gesicherte Aussage nicht möglich, da der für die Bewertung wichtige 64 Tage-Punkt wegen Unterschreitens der Nachweisgrenze fehlt. Der ^{54}Mn -Versuch sollte vor allem die Frage beantworten, ob die Intensivierung der Mn-Ausscheidung mit dem Urin einen stärkeren Effekt im Sinne einer positiven Bilanz nicht nur vortäuscht. Dies könnte nämlich dann der Fall sein, wenn der Chelatbildner nur eine "Umschaltung" der Ausscheidungswege bedingt, d.h. eine dem erhöhten Mn-Gehalt im Urin entsprechende Verminderung der faecalen Ausscheidung. Dies ist, wie den Daten in Tab. 11 und Abb. 9 zu entnehmen ist, in nur geringem Maße der Fall: Die ^{54}Mn -Ausscheidung mit den Faeces ist nur geringfügig gegenüber der Kontrolle gesenkt, obwohl die renale Ausscheidung von ^{54}Mn um rund 2 - 3 Größenordnungen erhöht wird. Dies bedeutet offenbar, daß eine bestimmte Fraktion des Mn-Pools zwar in einer ausscheidungsfähigen, aber durch Chelatbildner nicht mobilisierbaren Form vorliegt. Diese Annahme entspricht dem später von uns vorgeschlagenen Kompartiment-Modell der Leber. Was die mobilisierbare Mn-Fraktion betrifft, so zeigen unsere Versuchsergebnisse, daß die Effektivität der jeweils ersten Chelatdosis zeitunabhängig ist: Zum Beispiel führt DTPA erstmalig am 8. Tag verabfolgt zu einer 1,33 mal höheren Mn-Ausscheidung, als wenn der Verabfolgung am 8. Tag eine Dosis am 2. Tag vorangeht. Auch für die anderen Zeitpunkte ergeben sich vergleichbar hohe Quotienten von 1,36, 1,28 bzw. 1,52. Auf der anderen Seite ist eine Chelatdosis, wenn sie zu einem beliebigen Zeitpunkt, aber erstmalig verabfolgt wird, wirksamer als wenn ihr eine Chelatverabfolgung vorangeht. Dies ist nicht unerwartet, da die mobilisierbare ^{54}Mn -Fraktion in letzterem Fall vermindert ist. Es ist jedoch nicht statthaft, auf eine echte Verarmung des Mn-Pools zu schließen, da in der vorliegenden Versuchsanordnung

die spezifische Aktivität des ^{54}Mn in den Ausscheidungen nicht bestimmt wurde.

Auf den ersten Blick unerwartet ist die in Abb. 10 wiedergegebene Abhängigkeit des ^{54}Mn -Gehalts der verschiedenen Organe von der Zahl der Chelatdosen. Während im Skelett und im Darm der ^{54}Mn -Gehalt sich umgekehrt proportional zur Chelatgesamtdosis verhält, zeigen im Falle der Nieren und vor allem (hier auch statistisch signifikant) der Leber die Kurven im Bereich von 2 - 4 Chelatdosen ein Plateau, d.h. keine oder eine nur schwach ausgeprägte Dosisabhängigkeit.

Fassen wir die Leber als ein aus nur einem Kompartiment bestehendes Organ auf und nehmen weiterhin an, daß die Chelateffektivität zeitunabhängig ist, müßte eine lineare Beziehung zwischen ^{54}Mn -Gehalt und der Zahl der Chelatdosen resultieren, wie z.B. im Falle des Darms. Nähme die Chelateffektivität mit fortschreitender Zeit ab, ist eine Beziehung wie im Falle des Skeletts zu erwarten. Fassen wir die Leber als ein 2-Kompartiment-System auf und nehmen an, daß das in einem der beiden Kompartimente retenierte ^{54}Mn sich gegenüber dem Chelatbildner refraktär verhält, zumindest sich aber in erheblich geringem Maße als aus dem zweiten Kompartiment mobilisieren läßt, ist - wie sich rechnerisch zeigen läßt - eine andere Dosisabhängigkeit zu erwarten, auf jeden Fall aber kein signifikanter kubischer Term. Nur ein Kompartiment-System ist in der Lage, eine annähernd befriedigende Erklärung zu geben: Nehmen wir an, daß die Leber aus drei Kompartimenten A, B und C besteht, von denen A mit dem zentralen Kompartiment des extracellulären Wassers kommuniziert und den parallel geschalteten und miteinander nicht in Austausch stehenden Kompartimenten B und C vorgeschaltet ist. Der Transfer von Mn aus A nach B und C soll relativ schnell erfolgen, während die Ausscheidung aus den Kompartimenten B und C, die etwa gleich groß ist und wesentlich langsamer, jedoch mit

nicht wesentlich verschiedenen Halbwertszeiten verläuft. Eine Mobilisierung von Mn durch Chelatbildner soll aus A und B, dagegen nicht aus C möglich sein, und es soll keine Zeitabhängigkeit der Chelateffektivität vorliegen. Die geschilderten Verhältnisse sind schematisch in Abb.12 wiedergegeben. Die unter diesen Annahmen resultierende Dosisabhängigkeit zeigt im Prinzip den gleichen Verlauf wie die experimentelle Kurve in Abb. 10 ; die Tatsache, daß im hypothetischen Modell der Mn-Gehalt nach 5 Dosen wesentlich niedriger als im Experiment liegt, ist kein entscheidendes Argument gegen das von uns vorgeschlagene Modell. Die bestehende Diskrepanz läßt sich beseitigen, wenn man eine kürzere Verweilzeit des Mn im Kompartiment A annimmt. Eine physiologische und biochemische Konkretisierung des Modells ist ohne zusätzliche Untersuchungen im Moment noch nicht möglich. Das Modell könnte jedoch für die Frage des Mn-Stoffwechsels von heuristischem Wert sein.

Exzeptionell verhält sich der Mn-Gehalt des Bluts, indem die Chelateffektivität relativ klein ist und keine ausgeprägte Abhängigkeit von der Gesamtdosis vorzuliegen scheint. Es ist nun bekannt, daß der Mn-Gehalt der Erythrocyten den des Plasmas um einen Faktor ~ 2 übersteigt (Cotzias 1962) und daß das Mn in den Erythrocyten in einer sehr stabilen und nichtmobilisierbaren Verbindung vorliegt; dies würde die geringe Effektivität erklären. Die Konstanz des ^{54}Mn -Gehalts andererseits kann als Hinweis für die in einem früheren Zusammenhang geäußerte Vorstellung sein, daß die durch Chelatbildner induzierte Verarmung der Plasmaproteine an Mn relativ schnell durch Freisetzung von Mn aus den Geweben kompensiert wird, das in dem vorliegenden Versuch mit ^{54}Mn markiert ist.

Stellen wir uns abschließend die Frage, ob und welchen Beitrag die Ergebnisse unserer Untersuchung zu den der Arbeit zugrunde gelegten Fragen liefern. Was zunächst die Pathogenese der Chelat-Toxizität betrifft, so kann der von uns

geführte Nachweis, daß die Ca-Chelate zu einer dosisproportionalen Erhöhung der Mn-Ausscheidung mit dem Urin und einer entsprechenden Verarmung der Organe und Gewebe führen, naturgemäß von entscheidender Bedeutung sein. Im Hinblick auf den relativ starken Effekt und die in der Einleitung angedeutete wichtige Funktion von Mn bei enzymatischen Reaktionen ist es nicht statthaft, sich - wie in den bisherigen Diskussionen des Schrifttums - ausschließlich auf die Beeinflussung des Zn-Stoffwechsels durch die Ca-Chelate zu beschränken. Entscheidend für die eventuelle Beteiligung des Mn bei der Pathogenese der Chelattoxizität ist, ob die Unterschiede in der Wirksamkeit und Toxizität verschiedener Chelate gleichsinnig sind. Dies ist tatsächlich der Fall, indem die relative Potenz von DTPA im Vergleich zu ÄDTA bei der Mn-Mobilisierung ~ 6 und bei der Toxizität ~ 2 (Catsch 1968a) beträgt. Der Umstand, daß der Unterschied in der Toxizität 3 mal schwächer ausgeprägt ist (im Falle von Zn sogar 10 mal schwächer), steht zu der Hypothese nicht im Widerspruch. Seidel (1970) konnte nämlich zeigen, daß neben den sog. chelatspezifischen (d.h. auf Wechselwirkung mit endogenen Spurenmitteln beruhenden) Effekten auch eine "chelatunspezifische" Toxizität besteht, d.h. Wirkungen des Chelat-Anions per se.

Im Zusammenhang mit der Frage nach der pathogenetischen Relevanz der Mn-Ausscheidung ist die besonders stark ausgeprägte Verarmung des Darms an Mn hervorzuheben, da nach neueren und in der Einleitung zitierten Untersuchungen der Darmschädigung im Rahmen der Chelat-Toxizität eine größere Bedeutung als den nephrotischen Veränderungen zuzukommen scheint. Eine endgültige Analyse des Toxizitätsmechanismus kann und sollte auch nicht durch die vorliegende Untersuchung gegeben werden, die sich auf nur einen Aspekt des gesamten Fragenkomplexes beschränkte.

Die Konsequenzen, die sich aus unseren Befunden für die Therapie der Mn-Vergiftung ergeben, liegen auf der Hand: Dem DTPA ist als dem wirksamsten Chelatbildner der Vorzug zu geben. Die im Vergleich zu ÄDTA und anderen Verbindungen größere Effektivität des DTPA wurde zwar auch von früheren Autoren (s. Einleitung) hervorgehoben; allerdings unter Versuchsbedingungen (Verwendung von trägerfreiem Radiomangan und/oder sehr frühzeitige Verabfolgung der Chelatbildner), so daß unsere Ergebnisse nicht nur eine Bestätigung von bereits bekannten Tatsachen angesehen werden dürfen.

5. Zusammenfassung

An Ratten wurde der Einfluß der Ca-Chelate des ÄDTA, CDTA und DTPA in einem Dosisbereich von 0,065 bis 8 mmol·kg⁻¹ auf die Ausscheidung von Mn mit dem Urin untersucht. Die Ausscheidung von Mn nimmt mit wachsender Chelatdosis und die Effektivität der Chelatbildner in der Reihenfolge: ÄDTA < CDTA < DTPA zu. Die relative Potenz des CDTA und DTPA im Vergleich zu ÄDTA beträgt 2,6 bzw. 6,0.

Wiederholte Verabfolgung von DTPA führt zu einer Verarmung der Organe an Mn, wobei Leber und Dünndarm den höchsten Mn-Verlust aufweisen. Die Mn-Ausscheidung mit dem Urin nimmt mit fortschreitender Zahl der Chelatdosen ab, was darauf hinweist, daß die mobilisierbare Fraktion des Mn-Pools beschränkt ist.

In einem Versuch mit trägerfreiem Radiomangan (⁵⁴Mn) wurde der Einfluß wiederholter DTPA-Dosen auf die Ausscheidung von ⁵⁴Mn mit Urin und Faeces und die Organretention in Abhängigkeit vom Beginn der Behandlung und von der Zahl der Injektionen, d.h. der Chelatgesamtdosis, untersucht. DTPA bewirkt eine stark erhöhte Ausscheidung von ⁵⁴Mn mit dem Urin, während die faecale Exkretion nur wenig vermindert wird, so daß eine positive Ausscheidungsbilanz resul-

tiert. Die Wirksamkeit einer Chelatdosis hängt vom Zeitpunkt ab und davon, ob sie erstmalig verabfolgt wird. Was die Mobilisierung von ^{54}Mn aus den Organen betrifft, so nimmt der ^{54}Mn -Gehalt in Abhängigkeit von der Zahl der Chelatinjektionen ab, wobei speziell die Leber ein besonderes Verhalten zeigt. Beim Blut ist die Chelateffektivität relativ klein, und es scheint keine ausgeprägte Abhängigkeit von der Chelatgesamtdosis vorzuliegen.

Bei der Diskussion der Versuchsergebnisse wird die Tatsache, daß die relative Potenz von CDTA und DTPA im Vergleich zu ÄDTA kleiner ist, als nach dem Quotienten aus den effektiven Stabilitätskonstanten der Chelatbildner zu erwarten wäre, dadurch gedeutet, daß die Chelierung von Mn nicht nur im extrazellulären Wasser, sondern auch intrazellulär stattfindet. Die im Vergleich zu DTPA niedrigere Effektivität des CDTA wird mit der Tendenz von CDTA, sog. robuste Chelate zu bilden, erklärt.

Es wird versucht, den bei der Leber beobachteten Effekt der ^{54}Mn -Mobilisierung unter der Annahme zu deuten, daß dieses Organ aus 3 Kompartimenten besteht, die in besonderer Weise geschaltet sind. Das exzeptionelle Verhalten des Bluts wird dadurch erklärt, daß die durch den Chelatbildner induzierte Verarmung der Plasmaproteine an Mn relativ schnell durch Freisetzung von Mn aus den Geweben kompensiert wird, das mit ^{54}Mn markiert ist.

Die Bedeutung der Versuchsergebnisse für die Chelattoxizität und die praktisch-therapeutische Anwendung von DTPA bei der Mn-Vergiftung werden diskutiert.

6. Literatur

- Ahrens, F.A., A.L. Aronson: Fed. Proc. 27, 1401 (1968)
- Arkhipova, O.G., E.Ya. Golubovich, V.I. Spiridonova:
Farmakol. Toksikol. 28, 92 (1965)
- Aronson, A.L., P.B. Hammond, A.C. Strafuss: Toxicol.
appl. Pharmacol. 12, 337 (1968)
- Ballou, J.E., J.L. Palotay: Health Phys. 12, 895 (1966)
- Barbořík, M., H. Selmalová: Praconí lékařství 19/4, 155
(1967)
- Bersin, Th.: Biochemie der Mineral- und Spurenelemente
Frankfurt a.M. : Akad. Verlagsgesellschaft (1963)
- Bohne, F., A.E. Harmuth-Hoene, K. Kürzinger, F. Havliček:
Strahlenther. 136, 609 (1968)
- Bohne, F., A.E. Harmuth-Hoene, K.M. Weber: Naunyn-Schmiede-
bergs Arch. exp. Path. Pharmak. 257, 409 (1967)
- Bohne, F., J. Leßmann: Arzneim.-Forsch. 19, 944 (1969)
- Borg, D.C.: Fed. Proc. Suppl. 10, 104 (1961)
- Candura, F., M. Candura, T. Villa, S. Eszechieli: Lav.
Umano 12, 402 (1960)
- Cartland, G.F., C. Koch: Amer. Journ. Physiol. 85, 540
(1928)
- Catsch, A.: Strahlenschutz 3, 181 (1963)
- Catsch, A.: Naunyn-Schmiedebergs-Arch. exp. Path. Pharmak.
246, 316 (1964)
- Catsch, A.: Arzneim.-Forsch. 17, 493 (1967)
- Catsch, A.: Dekorporierung radioaktiver und stabiler
Metallionen. München: R. Thiemig (1968a)
- Catsch, A.: Naturwissenschaften 55, 473 (1968b)
- Catsch, A., E. von Wedelstaedt: Experientia 21, 210 (1965)

- Chakrabarti, C.L., J.W. Robinson, Ph.W. West: *Analyt.Chim. Acta* 34, 269 (1966)
- Constam, G.R., W. Leemann, F. Almasy, A.G. Constam: *Schweiz. Med. Wsch.* 94, 1104 (1964)
- Cotzias, G.C.: *Physiol. Rev.* 38, 503 (1958)
- Cotzias, G.C.: In: *Mineral Metabolism*, Vol. 2B, S. 403, London - New York 1962
- Cotzias, G.C., D.C. Borg, A.J. Bertichamps: In: *Metal-Binding in Medicine*. Philadelphia, Montreal: I.B. Lippincott 1960, S. 50
- Cotzias, G.C., P.S. Papavasiliou: *Nature* 195, 823 (1962)
- Dixon, M., E.C. Webb: *Enzymes*. 2nd Ed. London: Longmans, Green and Co. LTD. 1964, S. 422-423
- Dodson, R.W., G.J. Forney, E.H. Swift: *J. Amer. Chem. Soc.* 58, 2573 (1936)
- Donaldson, H.H.: *The Rat: data and reference tables*. 2nd Ed. Mem. Wistar Institute, No. 6 (1924)
- Dumański, J.: *Roczn. Nauk. Roln., Ser. A*, 90, 431 (1965)
- Dvořák, P.: *Strahlenther.* 1970, im Druck
- Elwell, W.T., J.A.F. Gidley: *Atomic Absorption Spectrophotometry*. Oxford, London, Edingburgh, New York, Toronto, Sydney, Paris, Braunschweig: Pergamon Press 1966, S. 103
- Eybl, V., J. Sýkora, F. Mertl.: *Int. Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg.* 25, 115 (1969)
- Fiske, C.H., Y. Subbarow: *J. biol. Ch.* 66, 375 (1925)
- Fore, H., R.A. Morton: *Biochem. J.* 51, 598 (1952)
- Fore, H. R.A. Morton: *Biochem. J.* 51, 600 (1952)
- Foreman, H. C.C. Lusbaugh, M. Magee, L. Humason: *LAMS - 2445*, 67 (1960)

- Foreman, H., V. Nigrović: In: Symp. on Diagnosis and Treatment of Deposited Radionuclides. Richland, Wash., U.S.A. 1967, Excerpta med. Fdn. 1968, S. 419
- Foreman, H., M. Vier, M. Magee: J. Biol. Chem. 203, 1045 (1953)
- Fried, J.F., A. Lindenbaum, J. Schubert: Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 100, 570 (1959)
- Friedländer, G. J.W. Kennedy: Lehrbuch der Kern- und Radiochemie. München: K. Thiemig 1961
- Griffith, G.C., E.M. Butt, J. Walker: Ann. Int. Med. 41, 501 (1954)
- Günther, R.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 262, 405 (1969)
- Hanle, H. und Mitarbeiter: Isotopentechnik. München: K. Thiemig 1964, Thiemig-Taschenbücher Bd. 11
- Harmuth-Hoene, A.E., M. Vladár, R. Ohrtmann: Chem.-Biol. Interactions 1, 271 (1969/70)
- Havliček, F.: Strahlenther. 134, 296 (1967)
- Havliček, F., F. Bohne, H. Zorn: Strahlenther. 136, 604 (1968)
- Heller, H.J., A. Catsch: Strahlenther. 109, 464 (1959)
- Kehoe, R.A., J. Cholak, R.V. Story: J. Nutrition 19, 579 (1940)
- Klimmer, O.R.: Arch. Toxikol. 24, 15 (1968)
- Koch, O.G., G.A. Koch-Dedic: Handbuch der Spurenanalyse. Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York: Springer 1964
- Kosai, M.F., A.J. Boyle: Indust. Med. and Surg. 25, 1 (1956)
- Kuhn, A.: Strahlenther. 137, 101 (1969)
- Lange, J.: Berliner Medizin 15, 109 (1964)
- Lange, J., W. Reinl, K.H. Stumpf: Verhdl. Dtsch. Ges. Inn. Med. 1964, S. 355

- Liberman, U.A., U. Barzel, A. de Vries, H. Ellis: Am. J. Med. Sci. 254, 35 (1967)
- Margerum, D.W., T.J. Bydalek: Inorg. Chem. 2, 683 (1963)
- Meltzer, L.E., F.P. Palmo, J.R. Kitschell: Lancet 1961/II, S. 637
- Millar, M.J., M.L. Fischer, C.A. Mawson, P.V. Elcoate: Nature 174, 881 (1954)
- Miller, D.O., J.H. Joe: Analyt. Chim. Acta 26, 224 (1962)
- Nigrović, V.: Arch. exp. Path. Pharmac. 249, 206 (1964)
- Nigrović, V., Th. Mohr: Strahlenther. 130, 314 (1966)
- Perry, H.M., E.F. Perry: J. Clin. Inv. 38, 1452 (1959)
- Perry, H.M., H.A. Schroeder: Am. J. Med. 22, 168 (1957)
- Quenouille, M.H.: Introductory Statistics, London (1953)
- Ramakrishna, T.V., J.W. Robinson, Ph.W. West: Analyt. Chim. Acta 37, 20 (1967)
- Ringhardt, I., B. Welz: Z. f. analyt. Chem. 243, 190 (1968)
- Rodier, J., R. Mallet, L. Rodi: Arch. Malad. Profess. 15, 210 (1954)
- Rubin, M., J. Houlihan, J. Princiotta: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 103, 663 (1960)
- Schwarzenbach, G., R. Gut, C. Anderegg: Helv. Chim. Acta 37, 937 (1954)
- Seidel, A.: Strahlenther. 1970, im Druck
- Slouka, V.: An. Cong. Europ. Soc. Radiobiol. Ulm 1969
- Steffensen, D.: Nature 180, 827 (1957)
- Sullivan, T.J.: Arch. Int. Pharmacodyn. 124, 225 (1960)
- Tarui, S.: Med. J. Osaka Univ. 10, 499 (1960)
- Teisinger, J., V. Fišerová-Bergerová: Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg. 16, 478 (1958)

- Thiers, R.E., B.L. Vallee: J. Biol. Chem. 226, 911 (1957)
- Tipton, I.H., M.J. Cook: Health Phys. 9, 103 (1963)
- Volf, V., Th. Mohr: Z. f. Versuchstierhaltung 1970,
im Druck
- Volf, V., A. Seidel, M. Vladár: Atomkernenergie (ATKE)
15, 141 (1970)
- Wacker, W.E.C., B.L. Vallee: J. Biol. Chem. 234, 3257
(1959)
- Weber, K.M.: Experientia 25, 708 (1969a)
- Weber, K.M.: Z. ges. exp. Med. 150, 354 (1969b)
- Weber, K.M.: Virchows Arch., Abt. B, Zellpath. 5, 39 (1970)
- v. Wedelstaedt, E., A. Catsch: Strahlenther. 128, 285
(1965)
- Yuen, S.H.: Analyst 83, 350 (1958)
- Zorn, H.: Inaugural-Dissertation Karlsruhe (1970)

7. Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1: Mn-Bilanz im veraschten Rattenurin

Zahl der Analysen	Mn-Zugabe (μg)	Mittelwert der gefundenen Mn-Konzentration (μg)	Bilanz in %
2	0	1,16	-
3	5	5,24	81,6
2	0	1,11	-
3	10	9,64	85,3
2	0	1,17	-
3	10	8,53	73,6
2	0	1,26	-
3	20	16,94	78,4
Mittelwert der Mn-Bilanz			79,6

Tabelle 2: Mn-Bilanz im veraschten Knochenpulver

Mn-Zugabe (μg)	Mittelwert der gefundenen Mn- Konzentrationen (μg)	Bilanz in %
0	2,38	-
1	3,25	87,0
2	4,33	97,5
3	5,50	104,0
4	6,45	101,3
5	6,81	89,0
Mittelwert der Mn-Bilanz		95,8

Tabelle 3 : Mittelwerte der Ausscheidung von Mn mit dem 24-Stunden-Urin in Abhängigkeit von der Art und Dosis des Chelatbildners. In Klammern ist der logarithmische Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. N = Zahl der Ratten.

Chelat-Dosis [mmol · kg ⁻¹]	N	µg Mn
ADTA		
0,125	6	2,63 (0,42 ± 0,039)
0,25	4	4,37 (0,64 ± 0,032)
0,5	6	3,72 (0,57 ± 0,012)
1	6	6,92 (0,84 ± 0,028)
2	5	11,00 (1,04 ± 0,015)
4	5	17,80 (1,25 ± 0,013)
8	5	21,38 (1,33 ± 0,028)
CDTA		
0,0625	4	2,75 (0,44 ± 0,029)
0,125	4	5,25 (0,72 ± 0,037)
0,25	4	5,89 (0,77 ± 0,052)
0,5	4	8,32 (0,92 ± 0,046)
1	4	15,49 (1,19 ± 0,039)
2	4	15,49 (1,19 ± 0,017)
4	4	26,92 (1,43 ± 0,017)
8	5	30,91 (1,49 ± 0,036)

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 3

DTPA		
0,0625	4	4,17 (0,62 ± 0,026)
0,125	5	6,31 (0,80 ± 0,044)
0,25	5	9,13 (0,96 ± 0,021)
0,5	4	12,30 (1,09 ± 0,035)
1	4	14,13 (1,15 ± 0,051)
2	4	17,38 (1,24 ± 0,005)
4	4	22,39 (1,35 ± 0,019)
8	3	28,85 (1,46 ± 0,012)
NaCl		
1	2	1,70
2	2	0,97
4	2	1,64
8	2	1,53
Mittelwert:		1,46

Tabelle 4: Varianzanalyse der in Tab. 3 zusammengestellten Versuchsergebnisse.
 S.Q.A. = Summe der Quadrat-Abweichungen. n = Zahl der Freiheitsgrade. s^2 = Varianz.
 t = Prüffunktion. P = Signifikanzwahrscheinlichkeit.

	Art der Varianz	S.Q.A.	n	s^2	t	P
ÄDTA	Gesamt	4,2871	36	-	-	-
	Regression, linear	3,9209	1	3,9209	19,1	<< 0,001
	Regression, quadratisch	0,0001	1	0,0001	0,0964	0,95 - 0,9
	Fehler	0,3661	34	0,0107	-	-
CDTA	Gesamt	4,3218	32	-	-	-
	Regression, linear	3,8597	1	3,8597	16,1	<< 0,001
	Regression, quadratisch	0,0153	1	0,0153	1,0167	0,4 - 0,3
	Fehler	0,4468	30	0,0148	-	-
DTPA	Gesamt	2,2642	32	-	-	-
	Regression, linear	2,1055	1	2,1055	22,4	<< 0,001
	Regression, quadratisch	0,0308	1	0,0308	2,7080	0,02 - 0,01
	Fehler	0,1279	30	0,0042	-	-
DTPA (0,0625 - 0,5 mmol·kg ⁻¹)	Gesamt	0,5847	17	-	-	-
	Regression, linear	0,5104	1	0,5104	10,5	<< 0,001
	Regression, quadratisch	0,0041	1	0,0041	0,9441	0,4 - 0,3
	Fehler	0,0702	15	0,0046	-	-

Tabelle 5: Varianzanalyse der Mn-Ausscheidung (Gesamtausscheidung minus Spontanausscheidung in Kontrolle). Abkürzungen s. Tab. 4.

	Art der Varianz	S.Q.A.	n	s ²	t	P
ÄDTA	Gesamt	7,6514	36	-	-	-
	Regression, linear	6,9110	1	6,9110	17,8	<< 0,001
	Regression, quadratisch	0,0021	1	0,0021	0,3109	0,8 - 0,7
	Fehler	0,7404	34	0,0217	-	-
CDTA	Gesamt	6,5825	32	-	-	-
	Regression, linear	6,0297	1	6,0297	20,6	<< 0,001
	Regression, quadratisch	0,1297	1	0,1297	3,0329	0,005
	Fehler	0,4231	30	0,0141	-	-
DTPA	Gesamt	3,2214	32	-	-	-
	Regression, linear	2,9426	1	2,9426	21,3	<< 0,001
	Regression, quadratisch	0,0836	1	0,0836	3,5835	0,005-0,002
	Fehler	0,1952	30	0,00651	-	-

Tabelle 6: Berechnete Dosis-Effekt-Kurven für Mn-Ausscheidung: $y = \bar{y} + a(x - \bar{x}) + b(x^2 - \bar{x}^2)$
 $y = \log \text{Mn}_g$ bzw. $\log \text{Mn}_m$; $x = \log (\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1})$

		\bar{y}	a	\bar{x}	b	\bar{x}^2
ÄDTA	Mn _g	0,854	0,164	3,95	-	-
	Mn _m	0,702	0,218	3,95	-	-
CDTA	Mn _g	1,033	0,180	3,61	-	-
	Mn _m	0,932	0,279	3,61	-0,0134	18,45
DTPA	Mn _g	1,060	0,162	3,27	-0,0069	15,64
	Mn _m	0,983	0,214	3,27	-0,0115	15,64

Tabelle 7: Test auf Parallelität der Geraden in Abb. 4 , erhalten durch Summieren der S.Q.A. und n aus Tab. 4.

Art der Varianz	n	S.Q.A.	s ²	t bzw.F	P
I					
Gesamt	85	9,1936	-	-	-
Regression, linear	1	8,2664	8,2664	27,4	<< 0,001
Parallelität	2	0,0246	0,0123	1,12	>> 0,2
Fehler	82	0,9026	0,0110	-	-
II					
Gesamt	87	9,8233	-	-	-
Regression, linear	1	8,2664	8,2664	21,2	<< 0,001
Fehler	86	1,5569	0,0182	-	-

Tabelle 8: Mittelwerte der Mn-Ausscheidung (μg im 24-Stunden-Urin nach 4-maliger Injektion von DTPA bzw. NaCl an 4 aufeinanderfolgenden Tagen. N = Zahl der Ratten

Tag	N	DTPA $2 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$	N	NaCl $2 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$
1.	6	$12,30 \pm 1,15$	5	$2,82 \pm 1,12$
2.	5	$8,13 \pm 1,07$	5	$3,39 \pm 1,20$
3.	5	$5,89 \pm 1,12$	5	$3,55 \pm 1,12$
4.	5	$4,37 \pm 1,10$	6	$4,07 \pm 1,20$
Mittelwert:				$3,54 \pm 1,07$

Tabelle 9: Mittelwerte des Mn-Gehalts von Organen nach 4 DTPA-Dosen, Je 6 Ratten pro Gruppe.

	DTPA		NaCl	
	µg Mn in		µg Mn in	
	Organ	1 g	Organ	1 g
Skelett	37,63 ± 1,07	2,45 ± 0,12	53,38 ± 1,74	4,07 ± 0,25
Leber	6,69 ± 0,36	1,10 ± 0,06	15,30 ± 1,09	2,51 ± 0,16
Nieren	1,78 ± 0,20	1,10 ± 0,11	2,44 ± 0,09	1,77 ± 0,13
Dünndarm	1,66 ± 0,26	0,48 ± 0,08	8,17 ± 0,52	1,95 ± 0,22

Tabelle 10: Struktur der ^{54}Mn -Versuchsreihe. In Gruppe V
5 Tiere, sonst je 6 Tiere.

Versuchs- gruppe	Tag der DTPA-Verabfolgung				
	2.	8.	16.	32.	64.
Kontrolle (NaCl)	2.	8.	16.	32.	64.
I	2.	8.	16.	32.	64.
II	-	8.	16.	32.	64.
III	-	-	16.	32.	64.
IV	-	-	-	32.	64.
V	-	-	-	-	64.

Tabelle 11: Mittelwerte des ^{54}Mn -Gehalts im Urin und Faeces. In der 2. Zeile ist der logarithmische Mittelwert \pm Standardfehler angeführt. Je 6 Tiere pro Gruppe. Gruppe V 5 Tiere.

Versuchsgruppe	Tag der Injektion	% der ^{54}Mn -Dosis	
		Faeces	Urin
NaCl	2.	11,44 (1,0583 \pm 0,0176)	0,0215 (-1,6680 \pm 0,0935)
	8.	2,78 (0,4433 \pm 0,0273)	0,00938 (-2,0280 \pm 0,0527)
	16.	1,06 (0,0250 \pm 0,0187)	0,00514 (-2,2966 \pm 0,0790)
	32.	0,307 (-0,5133 \pm 0,0261)	0,00121 (-2,918 \pm 0,0309)
	64.	0,142 (-0,8483 \pm 0,0195)	unterhalb der Nachweisgrenze
DTPA I	2.	11,27 (1,0520 \pm 0,0349)	13,04 (1,1150 \pm 0,0163)
	8.	2,27 (0,3566 \pm 0,0115)	4,30 (0,6333 \pm 0,0071)
	16.	0,881 (-0,0550 \pm 0,0178)	1,91 (0,2816 \pm 0,0212)
	32.	0,206 (-0,6866 \pm 0,0261)	0,728 (-0,1380 \pm 0,0134)
	64.	0,0594 (-1,2266 \pm 0,0658)	0,207 (-0,6850 \pm 0,0191)

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 11

DTPA II	8.	2,25 (0,3516 ± 0,0495)	5,69 (0,7550 ± 0,0173)
	16.	0,888 (-0,0516 ± 0,0513)	2,26 (0,3550 ± 0,0529)
	32.	0,214 (-0,6700 ± 0,0693)	0,790 (-0,1025 ± 0,0050)
	64.	0,0773 (-1,1116 ± 0,0678)	0,226 (-0,6450 ± 0,0115)
DTPA III	16.	0,981 (-0,0083 ± 0,0493)	2,59 (0,4133 ± 0,0182)
	32.	0,283 (-0,5483 ± 0,0684)	0,802 (-0,0960 ± 0,0190)
	64.	0,0951 (-1,0216 ± 0,0420)	0,244 (-0,6133 ± 0,0182)
DTPA IV	32.	0,288 (-0,54 ± 0,0503)	0,929 (-0,0320 ± 0,0205)
	64.	0,0919 (-1,0366 ± 0,0329)	0,262 (-0,5816 ± 0,0163)
DTPA V	64.	0,103 (-0,9860 ± 0,0349)	0,315 (-0,5020 ± 0,0237)

Tabelle 12: Mittelwerte des ^{54}Mn -Gehalts der Organe am 65. Tag in Abhängigkeit von der Zahl der Chelatdosen. N = Zahl der Ratten

Versuchsgruppe	N	Zahl der Chelatdosen	% der ^{54}Mn -Dosis in				
			Blut	Skelett	Leber	Nieren	Dünndarm
Kontrolle	6	0	0,0152 $\pm 0,0012$	1,40 $\pm 0,080$	0,286 $\pm 0,017$	0,0946 $\pm 0,0082$	0,0631 $\pm 0,0076$
I	6	5	0,0109 $\pm 0,0015$	1,03 $\pm 0,046$	0,135 $\pm 0,004$	0,0549 $\pm 0,0023$	0,0423 $\pm 0,0041$
II	6	4	0,0133 $\pm 0,0012$	1,24 $\pm 0,054$	0,161 $\pm 0,006$	0,0669 $\pm 0,0036$	0,0469 $\pm 0,0031$
III	6	3	0,0129 $\pm 0,0014$	1,28 $\pm 0,062$	0,165 $\pm 0,008$	0,0670 $\pm 0,0031$	0,0463 $\pm 0,0028$
IV	6	2	0,0126 $\pm 0,0015$	1,34 $\pm 0,029$	0,171 $\pm 0,008$	0,0700 $\pm 0,0034$	0,0506 $\pm 0,0022$
V	5	1	0,0132 $\pm 0,0012$	1,28 $\pm 0,067$	0,211 $\pm 0,014$	0,0805 $\pm 0,0045$	0,0608 $\pm 0,0025$

Tabelle 13: Varianzanalyse der in Tab.12 zusammengestellten Versuchsergebnisse. Abkürzungen s. Tab. 4.

Organ	Art der Varianz	S.Q.A.	n	s ²	t	P
Skelett	Gesamt	956,83	28			
	Regression, linear	158,71	1	158,71	2,79	0,01 - 0,005
	Regression, quadratisch	286,90	1	286,90	3,75	< 0,001
	Regression, kubisch	2,07	1	2,07	0,32	0,8 - 0,7
	Fehler	509,15	25	20,36		
Leber	Gesamt	1671,17	28			
	Regression, linear	906,44	1	906,44	5,97	< 0,001
	Regression, quadratisch	2,32	1	2,32	0,30	0,8 - 0,7
	Regression, kubisch	127,45	1	127,45	2,24	0,05 - 0,025
	Fehler	634,96	25	25,40		
Nieren	Gesamt	1395,24	28			
	Regression, linear	652,70	1	652,70	5,09	< 0,001
	Regression, quadratisch	10,55	1	10,55	0,64	0,6 - 0,5
	Regression, kubisch	87,83	1	87,83	1,85	0,1 - 0,05
	Fehler	644,16	25	25,76		
Dünndarm	Gesamt	1968,55	28			
	Regression, linear	727,71	1	727,71	3,99	< 0,001
	Regression, quadratisch	42,91	1	42,91	0,97	0,4 - 0,3
	Regression, kubisch	56,70	1	56,70	1,11	0,3 - 0,2
	Fehler	1141,23	25	45,65		

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 13

Blut	Gesamt	4121,29	27			
	Regression, linear	171,58	1	171,58	1,05	0,4 - 0,3
	Regression, quadratisch	85,77	1	85,77	0,74	0,5 - 0,4
	Regression, kubisch	129,76	1	129,76	0,91	0,4 - 0,3
	Fehler	3734,18	24	155,59		

Abb. 1: Abhängigkeit der Mn-Ausscheidung im Urin von der ÄDTA-Dosis (D)

Kurve 1) $Mn_g = aD$

2) $Mn_m = Mn_g - Mn_s = bD - cD^2$

3) $Mn_m = aD - Mn_s$

Erklärung s. Text.

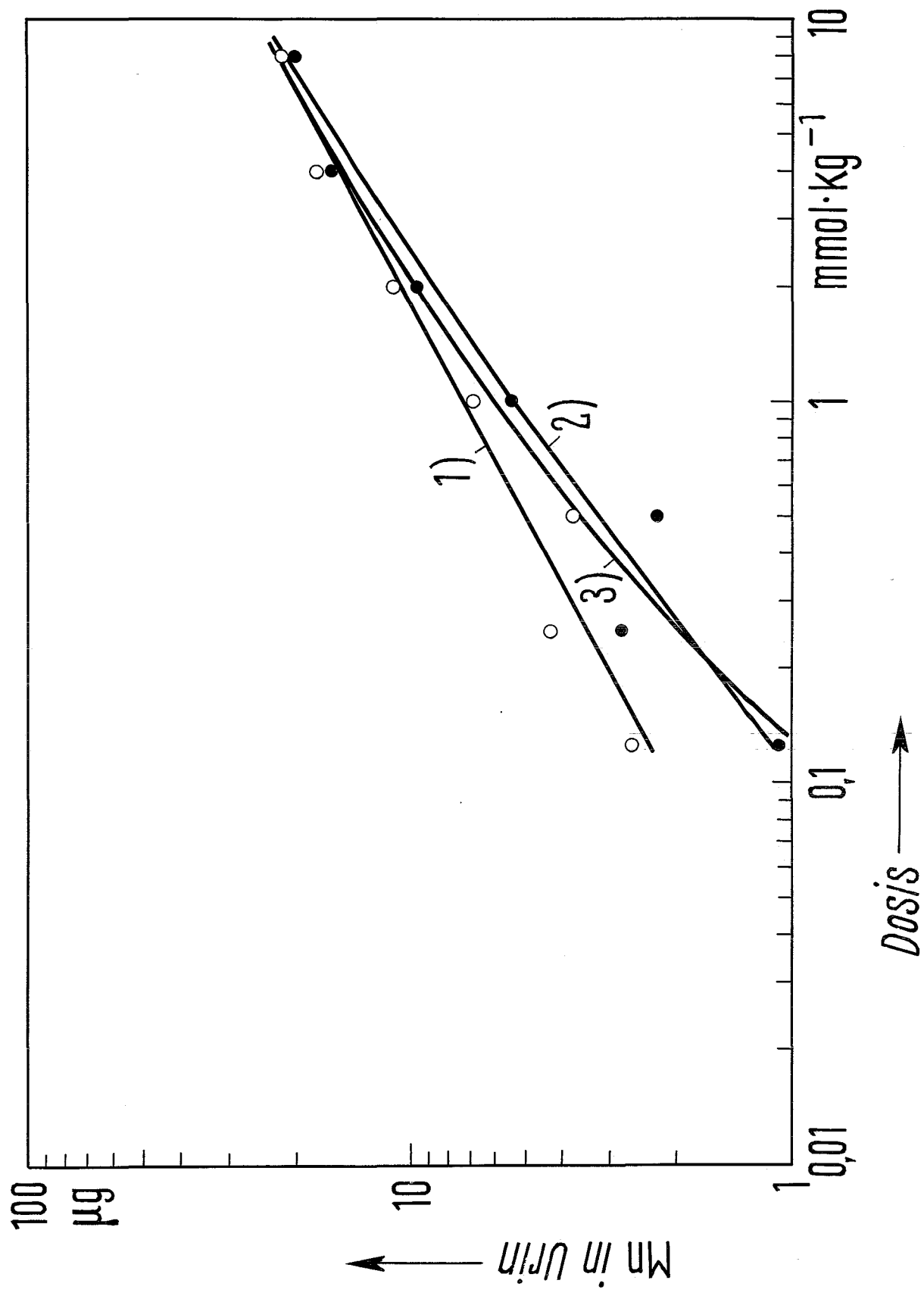


Abb. 2: Abhängigkeit der Mn-Ausscheidung im Urin von
der CDTA-Dosis (D)

Kurve 1) $Mn_g = aD$

2) $Mn_m = Mn_g - Mn_s = bD - cD^2$

3) $Mn_m = aD - Mn_s$

Erklärung s. Text.

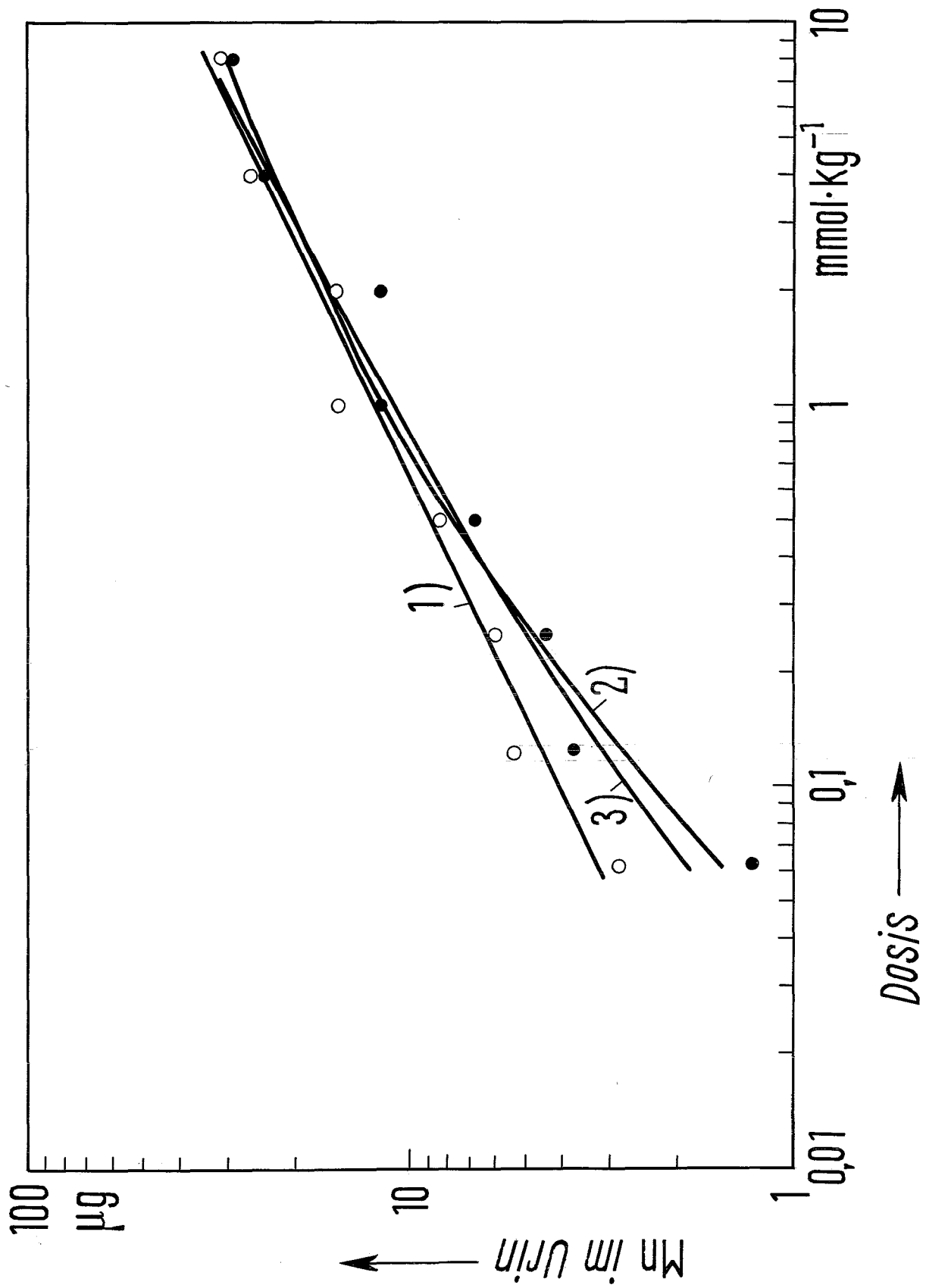


Abb. 3: Abhängigkeit der Mn-Ausscheidung im Urin von der DTPA-Dosis (D)

$$\begin{aligned} \text{Kurve 1) } Mn_g &= aD - bD^2 \\ 2) Mn_m &= Mn_g - Mn_s = bD - cD^2 \\ 3) Mn_m &= aD - bD^2 - Mn_s \end{aligned}$$

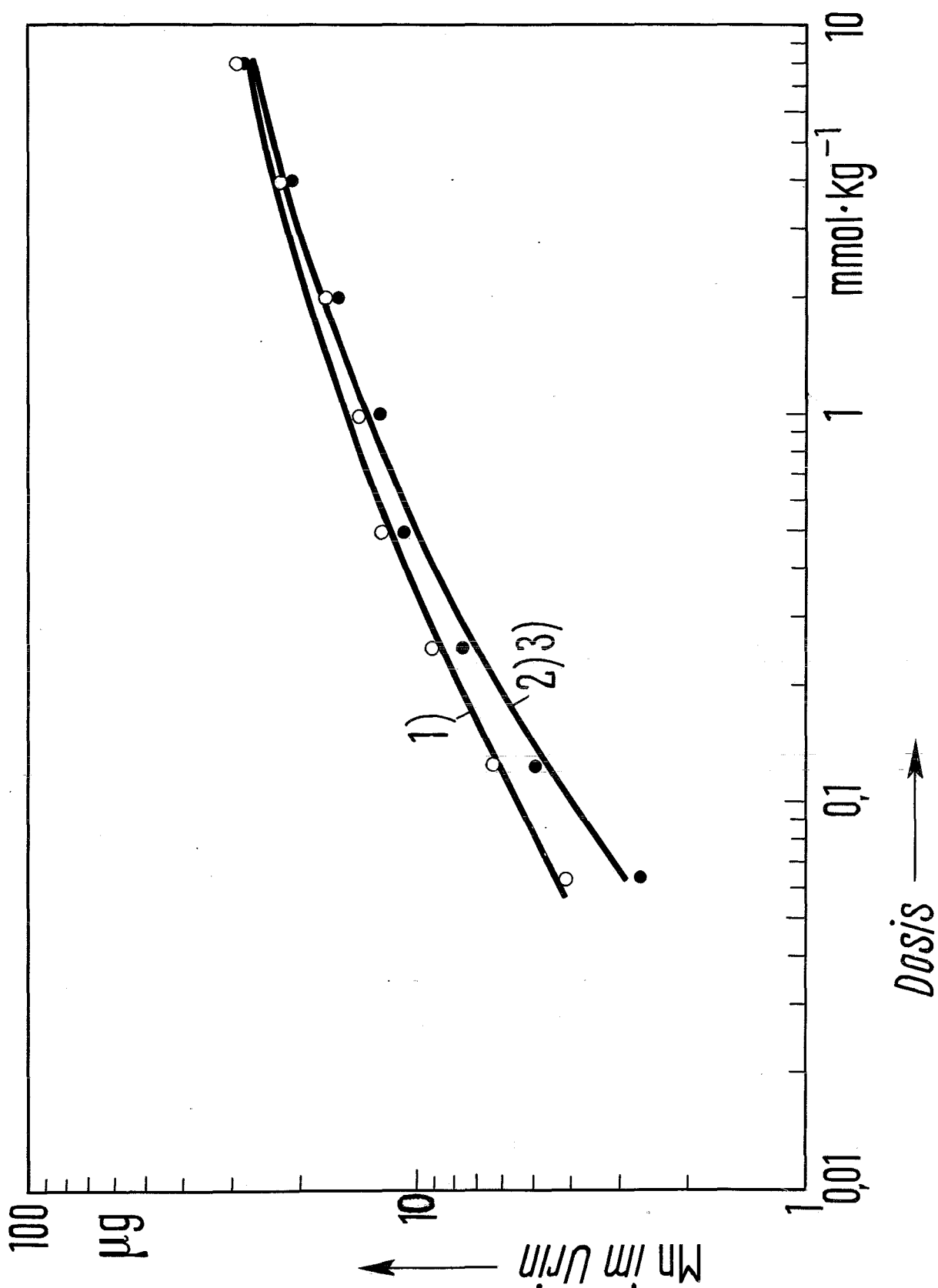


Abb. 4: Darstellung der Dosisabhängigkeit durch
parallele Geraden.

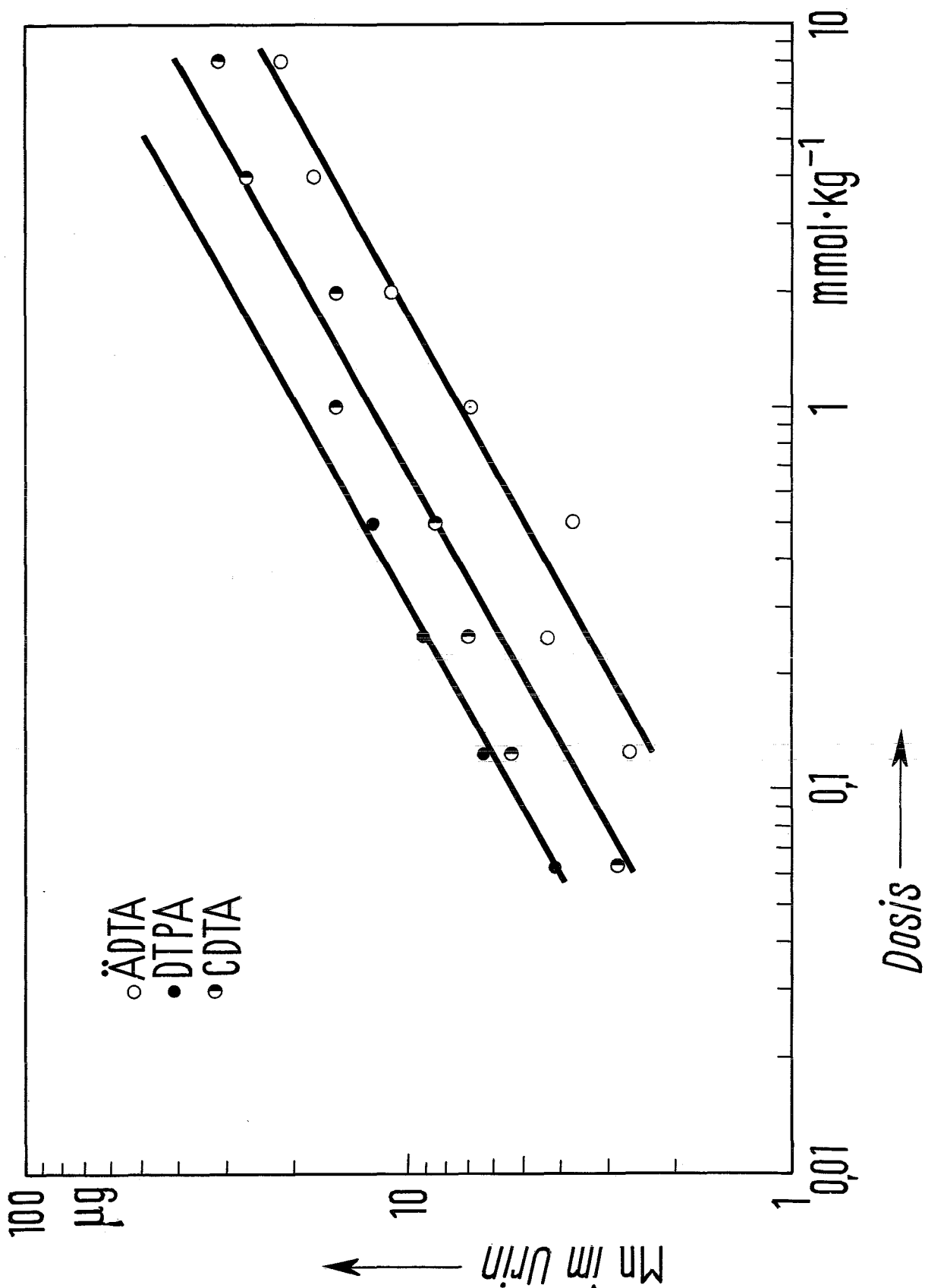


Abb. 5: Abhängigkeit der Mn-Ausscheidung (Mn_g) von der relativen Chelatdosis (s. Text).

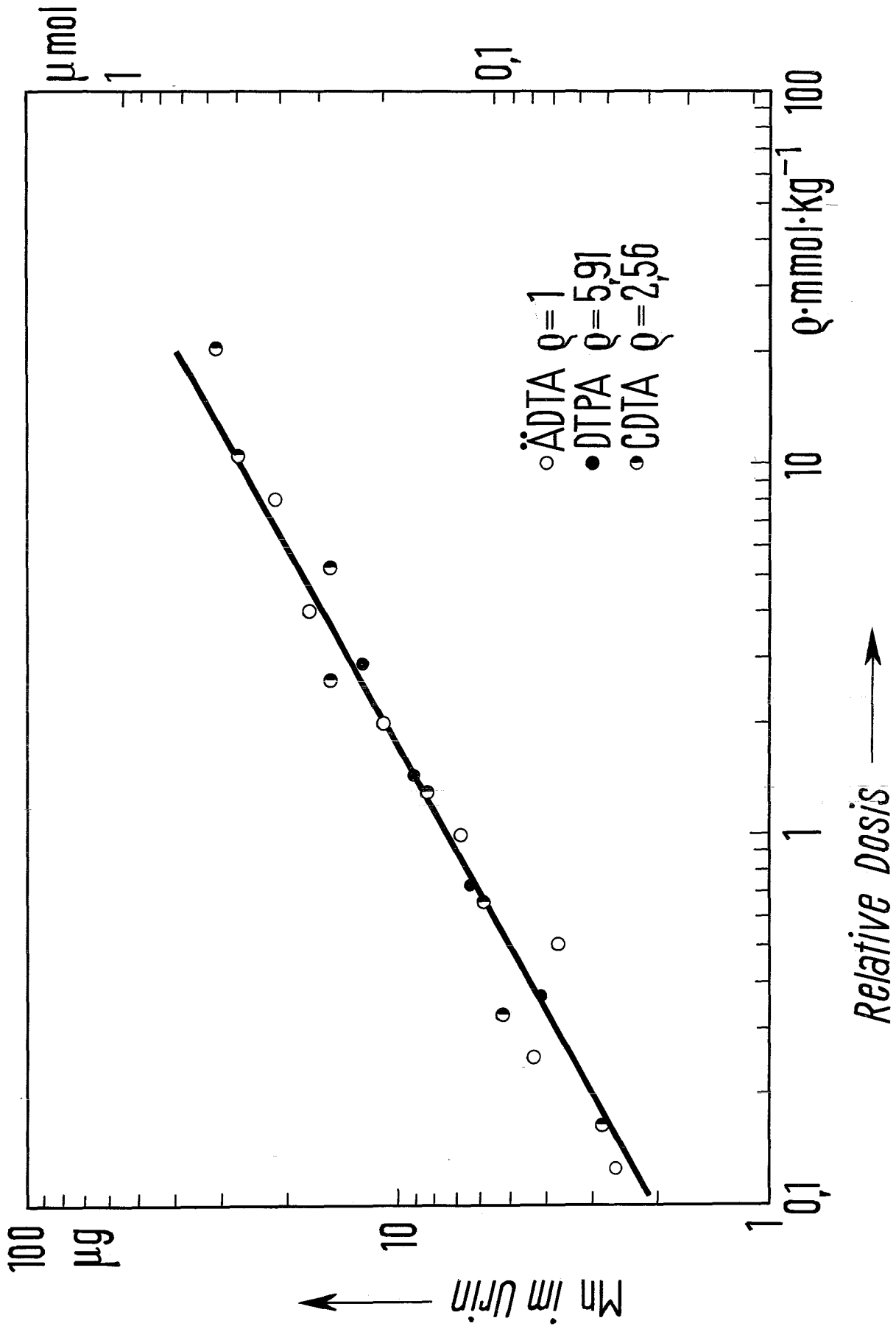


Abb. 6: Mn-Ausscheidung mit dem Urin (Nr. 1) nach
4-maliger Verabfolgung von DTPA. Nr. 2 = Aus-
scheidung in der Kontrollgruppe. Nr. 3 = Nr. 1 -
Nr. 2

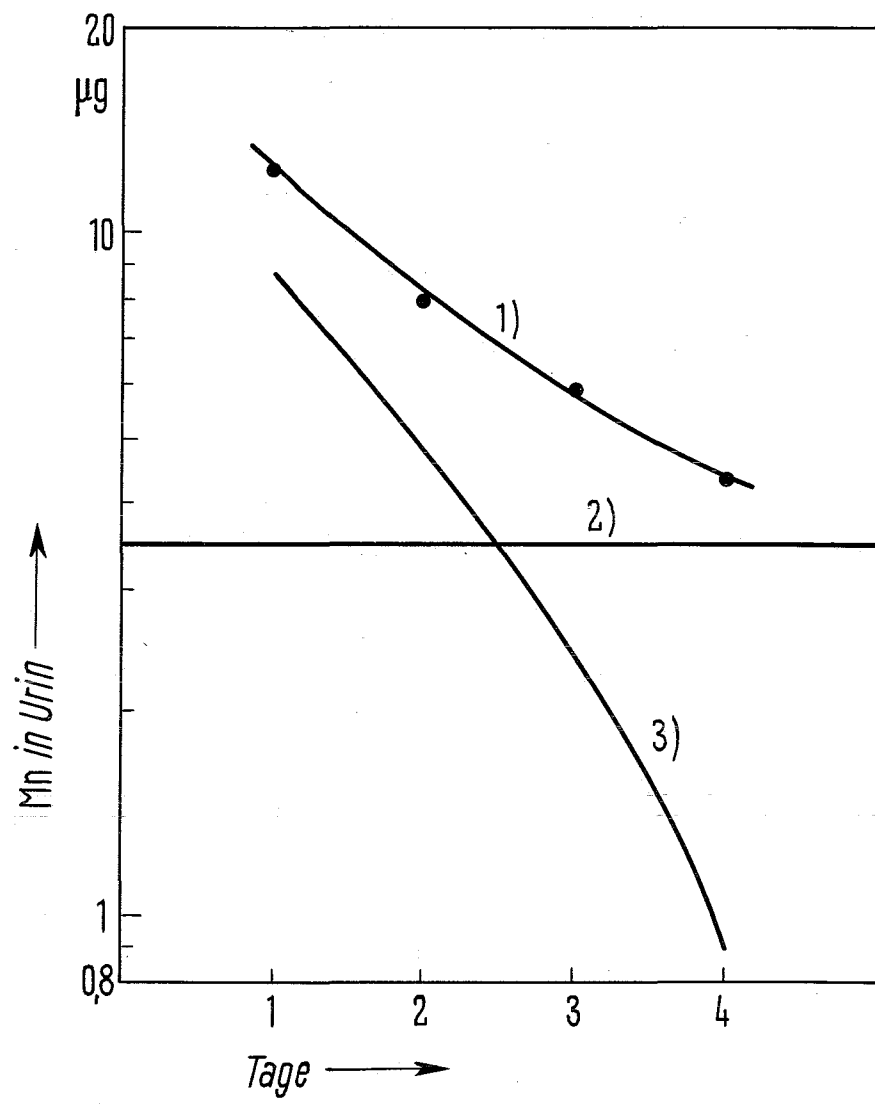


Abb. 7: ^{54}Mn -Ausscheidung bei Kontrolltieren (NaCl)

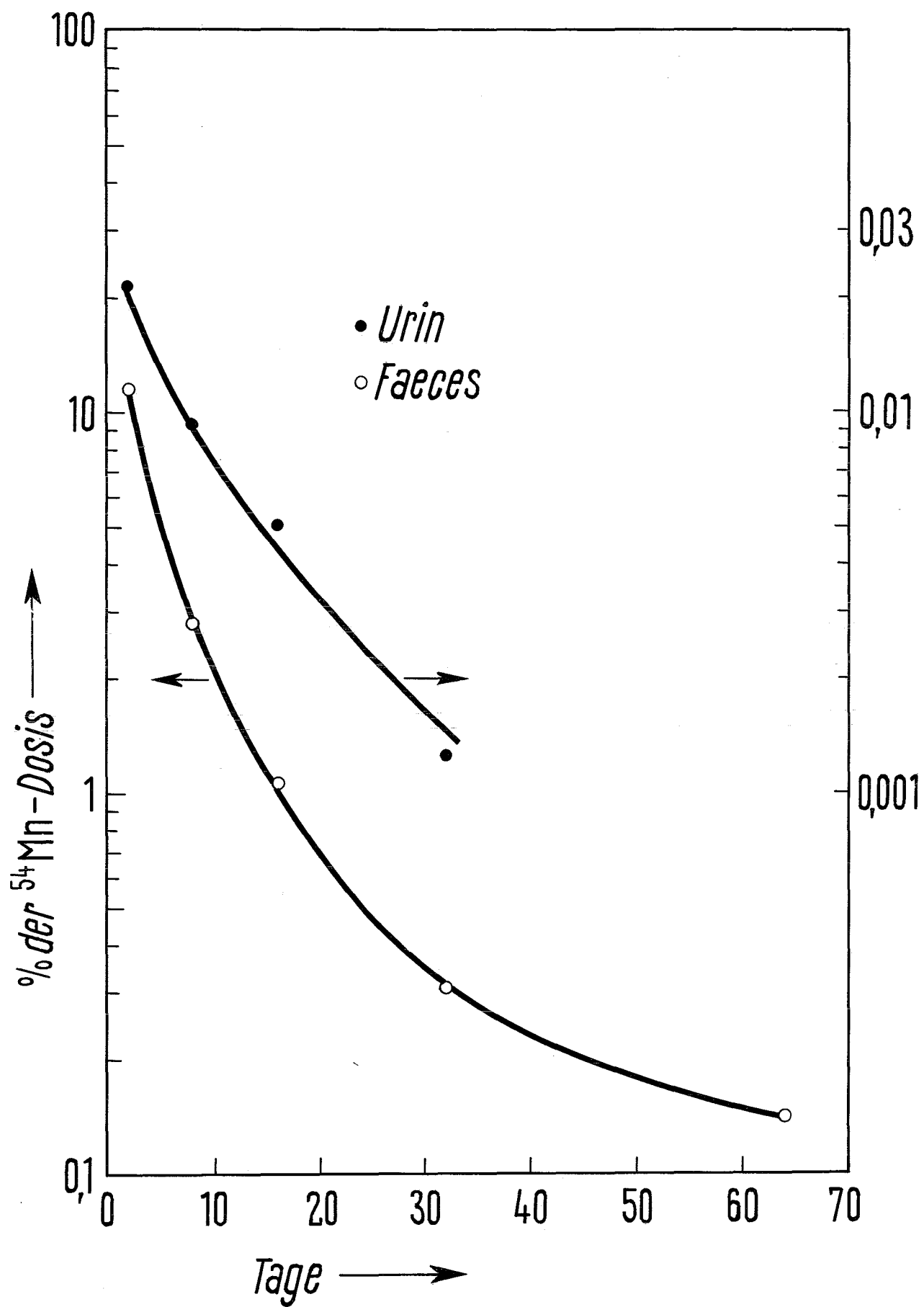


Abb. 8: ^{54}Mn -Ausscheidung mit den Faeces bei DTPA-behandelten Tieren.

Gruppe I : ○
" II : ●
" III : ◐
" IV : ◑
" V : Δ

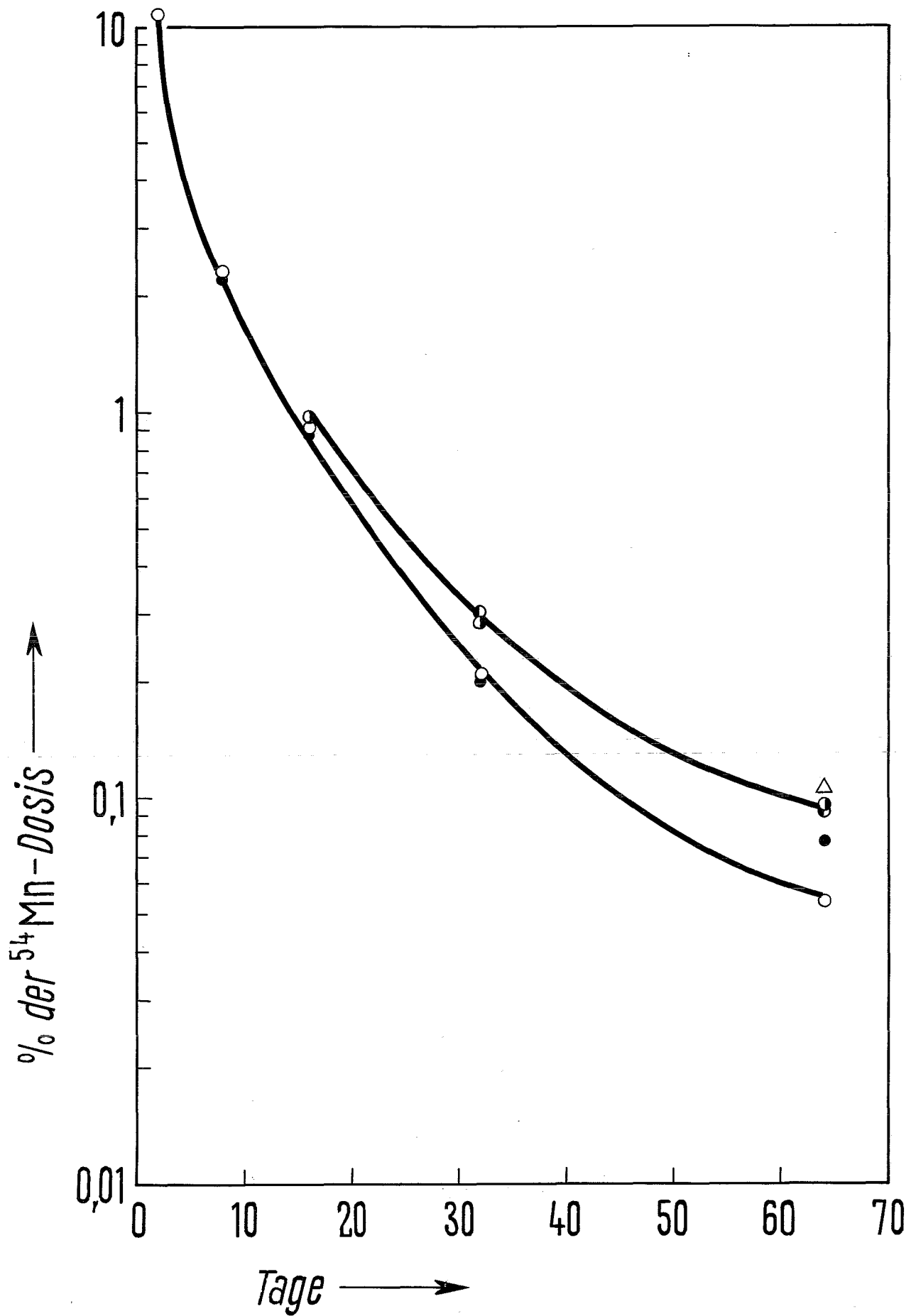


Abb. 9: ^{54}Mn -Ausscheidung mit dem Urin bei DTPA-
behandelten Tieren.

Gruppe I : o
" II : ●
" III : ●
" IV : ●
" V : Δ

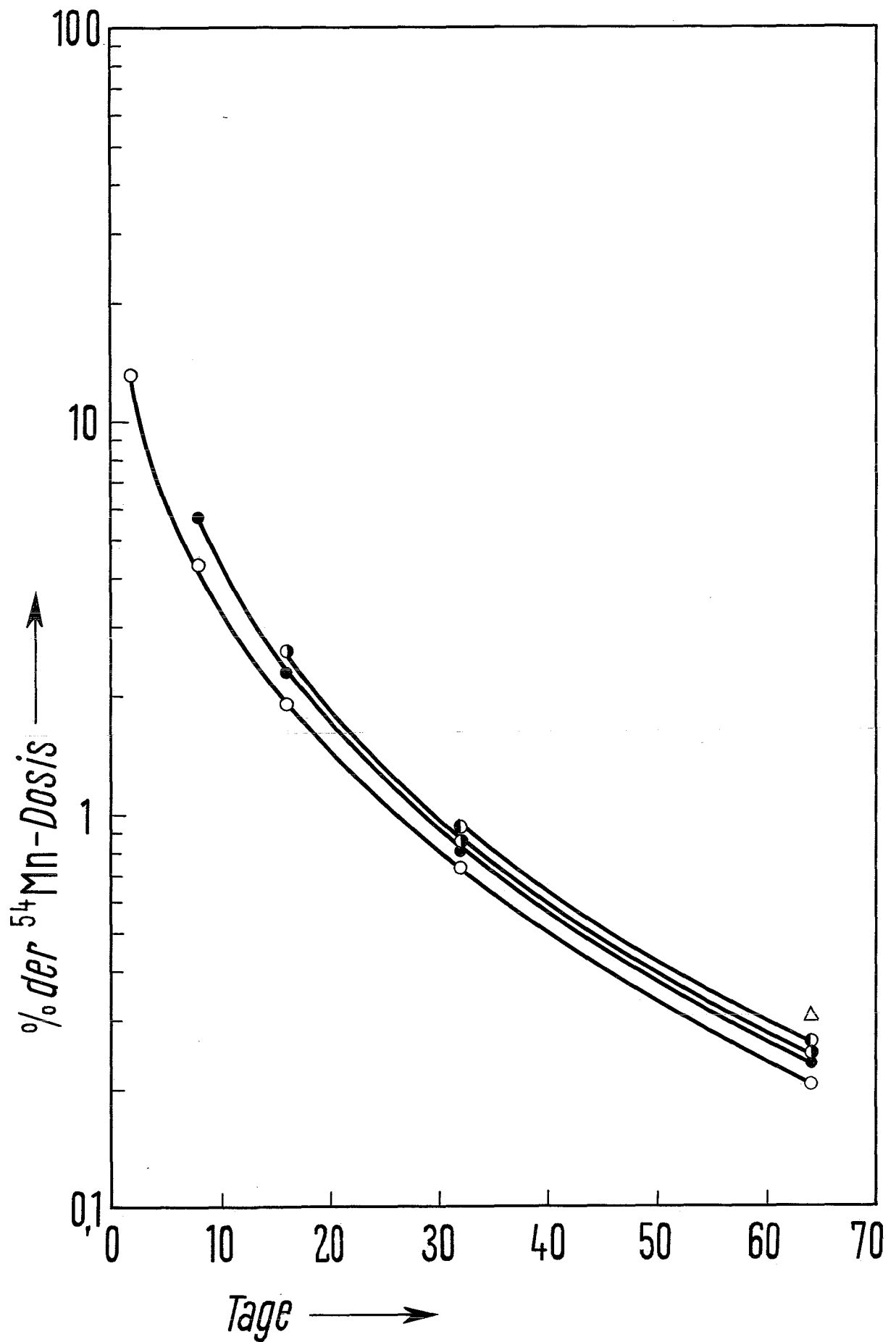


Abb. 10: ^{54}Mn -Gehalt der Organe in der Kontrolle und in den DTPA-Gruppen. Die Kurven sind mittels der Regressionsanalyse berechnet.

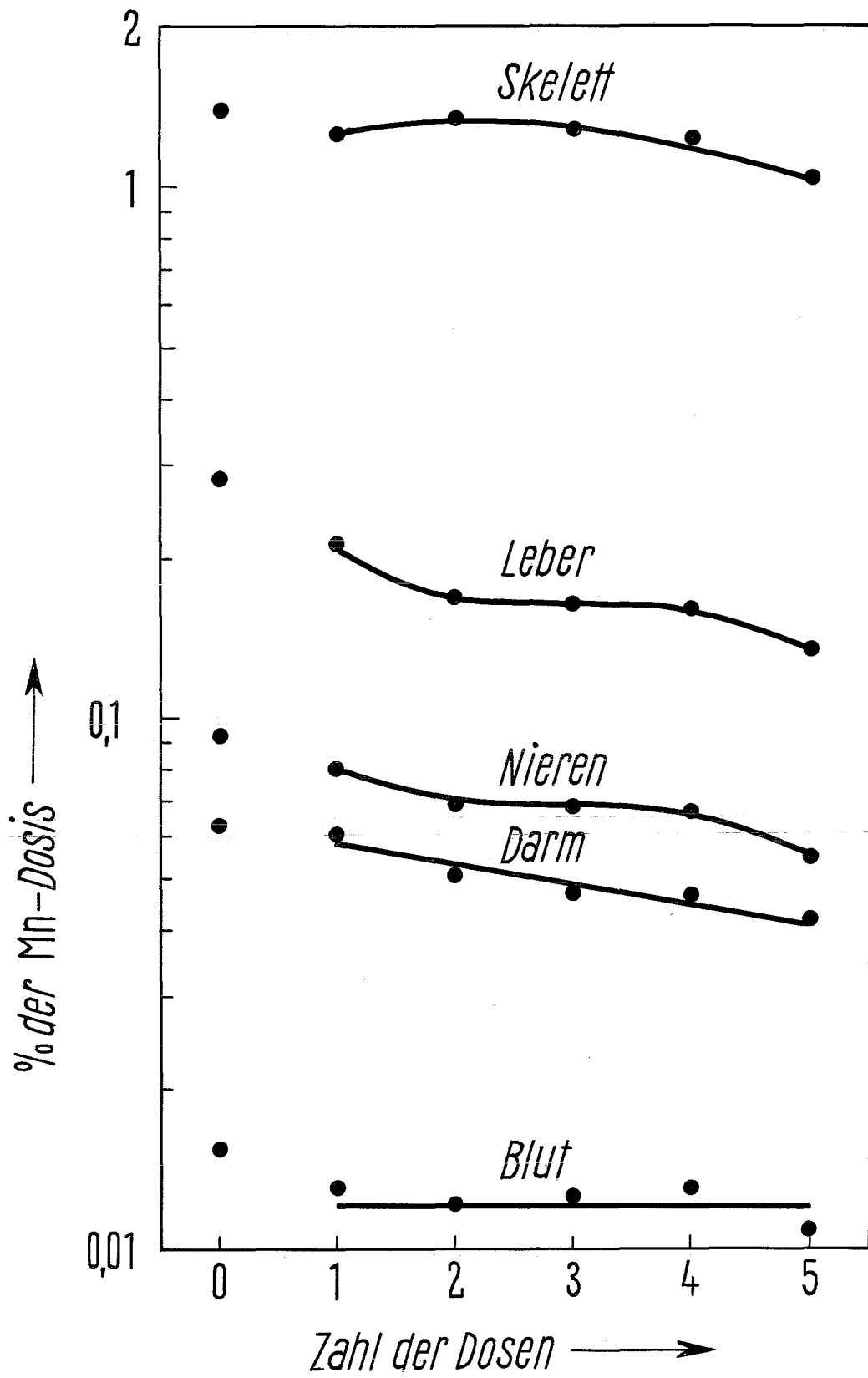


Abb. 11: Theoretisch berechnete Dosis-Effekt-Kurven.
Einzelheiten s. Text.

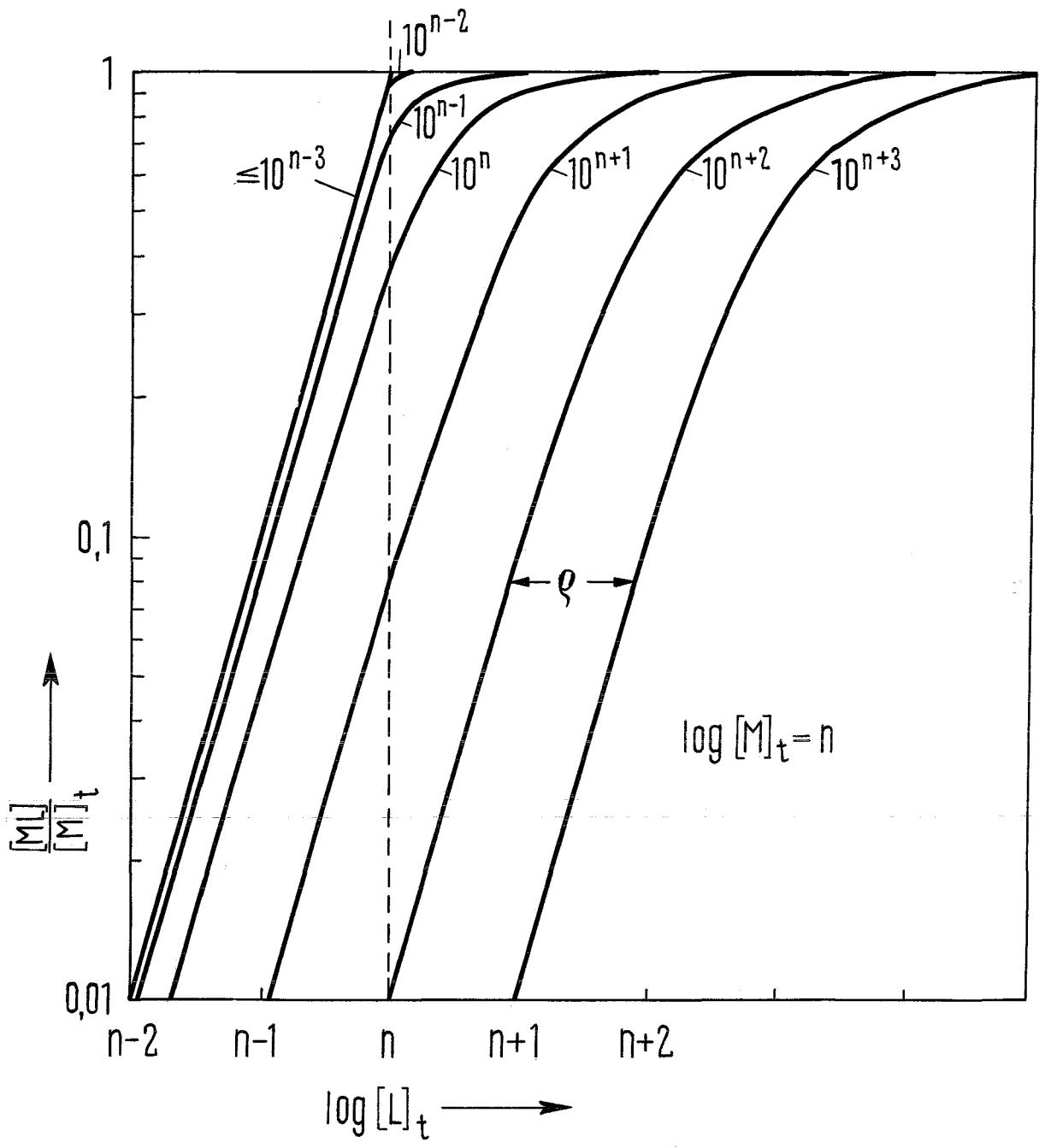


Abb. 12: Einfluß eines Chelatbildners auf den ^{54}Mn -
Gehalt in einem hypothetischen 3-Kompartiment-
System. Einzelheiten s. Text.

