

KFK-51

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM
KARLSRUHE**

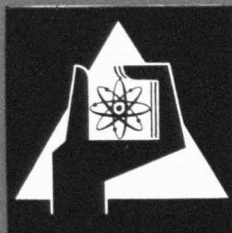
APRIL 1961

KFK 51

INSTITUT FÜR STRAHLENBIOLOGIE

DIE VERTEILUNG VON RADIOCER IN DEN LEBERZELLEN
UND IHRE BEEINFLUSSUNG DURCH DIE DIATHYLENTRIAMINPENTAESSIGSÄURE

[Referat]
A. CATSCH, H. IMMEL-TELLER, D. SCHINDEWOLF-JORDAN



KERNREAKTOR
Bau- und Betriebs-Gesellschaft m. b. H.
Zentralbücherei

30. JUNI 1961

KERNREAKTOR

BAU- UND BETRIEBS-GESELLSCHAFT M. B. H.

KARLSRUHE

Die Verteilung von Radiocer in den Leberzellen und ihre Beeinflussung durch die Diäthylentriaminpentaessigsäure

Von A. CATSCH, H. IMMEL-TELLER und D. SCHINDEWOLF-JORDAN

Aus dem Institut für Strahlenbiologie am Kernforschungszentrum Karlsruhe
(Z. Naturforschg. 16 b, 181—185 [1961]; eingegangen am 17. November 1960)

Es wurde an Ratten die Verteilung von trägerfreiem Radiocer über die Zellfraktionen des Leberhomogenats untersucht. Das Verteilungsmuster weist während der ersten Tage stärkere Veränderungen auf, und ein Gleichgewicht zwischen den einzelnen subcellulären Fraktionen stellt sich erst ab 4. Tag nach Injektion von Radiocer ein, und zwar nehmen Cytoplasma > Mitochondrien > Mikrosomen > Kerne Radiocer auf. Die Analyse des Verteilungsmusters nach einmaliger Verabreichung eines hocheffektiven Chelatbildners macht die Annahme wahrscheinlich, daß der Chelatbildner sich in gewissem Umfang im intracellulären Raum anzureichern vermag.

Die Ausscheidung von trägerfreiem Radiocer aus der Leber, die mit einer Aufnahme von rund 50% der insgesamt inkorporierten Menge ein wesentliches Speicherorgan darstellt, folgt keiner einfachen Exponentialfunktion, vielmehr der Summe von mindestens zwei, wahrscheinlich aber mehr exponentiellen Gliedern^{1,2}. Solche multiexponentiellen Ausscheidungsfunktionen können grundsätzlich auf die Ablagerung des in Frage stehenden Radionuklids in verschiedenen, strukturell und/oder chemisch definierten Organcompartments mit unterschiedlicher Bindungsaffinität zum Radionuklid zurückgeführt werden, wobei folgende Möglichkeiten in Betracht zu ziehen sind³: Es kann sich zunächst um parallel geschaltete Compartments handeln, die alle in direktem Diffusionskontakt mit dem extracellulären Raum stehen; eine multiexponentiell verlaufende Ausscheidung ist natürlich nur unter der Voraussetzung zu erwarten, daß zwischen den Compartments kein Austausch besteht, bzw. die Austauschgeschwindigkeiten kleiner sind als die jeweils größte Ausscheidungsgeschwindigkeit. Bei der zweiten Möglichkeit der Serie-Schaltung der Compartments steht nur eins in direktem Kontakt mit dem extracellulären Raum, während den restlichen ein oder mehrere, durch abnehmende Bindungsstabilität gekennzeichnete Compartments vorgeschaltet wären. Erfolgt der Transfer des Radionuklids innerhalb dieser Serie mit einer geringen Geschwindigkeit, so muß die Ausscheidungsrate aus dem Gesamtorgan mit der Zeit abnehmen. Die vorliegende Untersu-

chung versucht, diese zunächst rein formalen Vorstellungen in dem speziellen Fall vom Radiocer, welches als Produkt der Kernspaltung eine größere praktische Bedeutung hat, mit einem konkreten Inhalt zu erfüllen, und zwar wurde die naheliegende Möglichkeit einer Zuordnung der Compartments zu den cellulären Organellen geprüft. Außerdem sollten sie zum Verständnis des Wirkungsmechanismus der Diäthylentriamin-*NNN'N''*-pentaessigsäure (DTPA) beitragen; bei der DTPA handelt es sich um einen zur Gruppe der synthetischen Polyaminopolycarboxylsäuren gehörenden Chelatbildner, der neuerdings in zunehmendem Maße zur Dekoration von Metallionen Verwendung findet⁴.

Material und Methode

Als Versuchstiere dienten 8–11 Wochen alte, 130 bis 180 g schwere Rattenmännchen des Heiligenberg-Inzuchtstammes, denen wir 1–2 μc trägerfreies ¹⁴⁴CeCl₃ ($p_{\text{H}} \sim 3$) in die Schwanzvene injizierten. Die Leber wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion unter Äthernarkose in situ vom Cavastumpf aus mit 10-proz. Rohrzuckerlösung durchspült und ein aliquoter Teil des Leberbreies mit dem Gerät von Potter und Elvehjem homogenisiert. Die anschließende Darstellung der einzelnen Zellfraktionen erfolgte nach der Methode von HOGEBOM und Mitarbb.⁵ Die in den Tab. 1 und 2 als Waschflüssigkeiten 1 und 2 bezeichneten Fraktionen wurden bei der Resuspension der Mitochondrien bzw. Mikrosomen gewonnen. In einer Versuchsreihe führten wir außerdem eine Fällung der Cytoplasmaproteine durch Äthanol durch. Die in aliquoten Teilen des Gesamthomogenats und der einzel-

¹ A. CATSCH, Strahlentherapie, im Druck.

² P. W. DURBIN, M. H. WILLIAMS, M. GEE, R. H. NEWMAN u. J. G. HAMILTON, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 91, 78 [1956].

³ H.-J. HELLER u. A. CATSCH, Strahlentherapie 109, 464 [1959].

⁴ A. CATSCH, Conference on Biological Aspects of Metal Binding, University Park, Pa., September 1960. Fed. Proc. suppl., im Druck.

⁵ H. G. HOGEBOM, W. C. SCHNEIDER u. G. E. PALADE, J. biol. Chemistry 172, 619 [1948].

Gruppe	Zeit	N	Gesamt-homogenat	Kerne Mitochondrien Mikrosomen	Cytoplasma	
					Proteine	Überstand
Kontrolle	2,5 St.	5	39,7 ± 1,58 100	24,0 ± 1,22 60,5	6,58 ± 0,89 16,6	9,10 ± 0,65 22,9
	18 St.	5	43,6 ± 2,73 100	26,6 ± 1,62 61,0	6,59 ± 0,30 15,1	10,4 ± 0,91 23,9
	4 Tage	5	33,8 ± 2,32 100	25,4 ± 2,20 75,1	4,33 ± 0,19 12,8	4,09 ± 0,03 12,1
DTPA	4,5 St.	4	19,3 ± 2,10 100	6,85 ± 0,81 35,5	2,04 ± 0,29 10,6	10,4 ± 1,50 53,9
	20 St.	5	7,34 ± 0,47 100	4,09 ± 0,47 55,8	0,71 ± 0,07 9,6	2,54 ± 0,10 34,6
	4 Tage	3	1,32 ± 0,08 100	0,93 ± 0,03 70,5	0,17 ± 0,03 12,9	0,22 ± 0,04 16,6

Tab. 3. Einfluß von DTPA auf den ^{144}Ce -Gehalt der Zellfraktionen zu verschiedenen Zeitpunkten nach i.v. Injektion von ^{144}Ce . 250 μMole $\text{CaNa}_3\text{-DTPA}$ wurden 2 Stdn. nach ^{144}Ce i.p. injiziert. Erklärungen s. Tab. 1.

Cytoplasma ist auf den ersten Blick überraschend, und zwar aus folgenden Gründen: Für die Ca-Chelate der Polyaminosäuren, die wasserlösliche Anionen darstellen, wird angenommen, daß sie nicht imstande sind, Zellmembranen zu permeieren, und sich ausschließlich im extracellulären Raum verteilen^{7,8}. Auf der anderen Seite führten uns unsere Untersuchungen zu der Folgerung, daß das Cytoplasma das vorgeschaltete celluläre Compartment darstellt, welches das ^{144}Ce weniger fest als die übrigen Fraktionen bindet. Falls beide Annahmen zutreffend sind, so wäre eine gegenteilige Wirkung der DTPA zu erwarten gewesen, nämlich eine im Vergleich zu den anderen Fraktionen stärker ausgeprägte Verarmung des Cytoplasmas an ^{144}Ce . Es schien uns deshalb geboten, das Versuchsergebnis in einem zweiten Versuch bei etwas abgeänderten Bedingungen zu reproduzieren. DTPA wurde bereits 2 Stdn. nach ^{144}Ce injiziert; wir führten nur die Trennung der Cytoplasmafraktion und eine Fällung der Cytoplasmaproteine durch. Tab. 3 zeigt zunächst, daß die frühzeitigere DTPA-Verabfolgung zu einer stärkeren Reduktion des Lebergehalts führt, auf rund 20% nach 18 Stdn. und auf 4% der Kontrollwerte nach 4 Tagen. Die Ursache hierfür dürfte darin zu sehen sein, daß zum Zeitpunkt der DTPA-Applikation sich noch größere ^{144}Ce -Mengen im Blut und im extracellulären Raum befinden, die durch den Chelatbild-

ner der Ablagerung in der Leber entzogen und zur Ausscheidung gebracht werden. Dazu kommt noch, daß auch das bereits intracellulär in der Leber abgelagerte ^{144}Ce , entsprechend den obigen Überlegungen, in einer weniger fest gebundenen und damit leichter mobilisierbaren Form vorliegt. Der unerwartete Befund des vorangehenden Versuchs, die schwächere Reduktion des Cytoplasmagehalts an ^{144}Ce , konnte bestätigt und darüber hinaus gezeigt werden, daß die Erhöhung der relativen Werte nach DTPA ausschließlich durch den sog. Überstand des Cytoplasmas bedingt wird, während der ^{144}Ce -Gehalt der cytoplasmatischen Proteinfraction in stärkerem und gleichem Maße wie in den übrigen Fraktionen gesenkt wird.

Das im Überstand des Cytoplasmas enthaltene ^{144}Ce kann grundsätzlich nur in niedermolekularer Form vorliegen, und zwar sollte es sich — dies ist die einzige naheliegende und begründete Annahme — um ^{144}Ce -DTPA-Chelate handeln. Dies konnte durch elektrophoretische Untersuchungen bestätigt werden: Ratten wurde mit 250 μMolen DTPA injiziert und die Leber nach 2 Stdn. nach dem oben geschilderten Vorgang sorgfältig durchspült, homogenisiert und die Cytoplasmafraktion dargestellt. Da der radio-metrische Nachweis des ^{144}Ce in den Pherogrammen größere Aktivitäten erfordert, wurde es erst nachträglich in vitro zum Cytoplasma zugegeben. Typische, jedoch reproduzierte Ergebnisse sind in den Abb. 3 und 4 wiedergegeben. Während das ^{144}Ce bei nicht mit DTPA behandelten Kontrolltieren sich ausnahmslos an der Auftragsstelle bzw. in den Proteinfractionen des Cytoplasmas nachweisen läßt

⁶ Für die Überlassung danken wir der J. R. Geigy AG., Basel.

⁷ H. FOREMAN, M. VIER u. M. MAGEE, J. biol. Chemistry 203, 1045 [1953].

⁸ H. FOREMAN, in: Metal-Binding in Medicine, S. 82, J. B. Lippincott Co., Philadelphia, Montreal 1960.

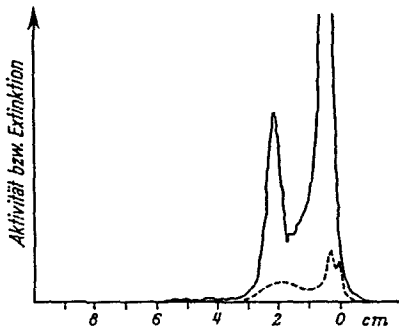


Abb. 3. Verteilung der Proteine (---) und des ^{144}Ce (—) im Cytoplasmapherogramm. Kontrolle.

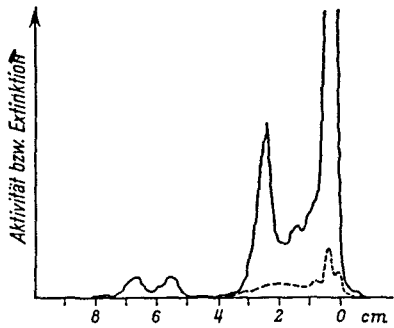


Abb. 4. Verteilung der Proteine (---) und des ^{144}Ce (—) im Cytoplasmapherogramm. Verabfolgung von DTPA.

(Abb. 3), wandert nach DTPA-Verabreichung etwa 6% des gesamten ^{144}Ce schneller als die Proteine anodenwärts (Abb. 4), wobei die Lokalisation dieser Fraktion der in entsprechenden Kontrollen festgestellten Wanderungsgeschwindigkeit von ^{144}Ce - oder Ca-DTPA entspricht. Interessanterweise weist diese Fraktion zwei distinkte Peaks auf, was möglicherweise mit der bei p_{H} 8,6 nicht mehr zu vernachlässigenden Bildung von Hychoxo-DTPA-Komplexen zusammenhängt. Die in dem Cytoplasma der gesamten Leber vorhandene DTPA-Menge läßt sich auf

Grund der elektrophoretisch festgestellten Verteilung und unter Berücksichtigung von Untersuchungen über den Einfluß verschiedener DTPA-Dosen auf das elektrophoretische Verhalten von ^{144}Ce im Blutserum⁹ zu etwa 1–10 μMolen , das sind maximal 4% der applizierten Dosis, abschätzen.

Erwiesen dürfte dadurch sein, daß die Cytoplasmafraktion eine kleinere Menge DTPA enthält; es erhebt sich jedoch sofort die Frage, ob es sich hierbei um eine echte intracelluläre Anreicherung handelt oder nur um eine durch die Versuchsmethodik bedingte Verunreinigung der Fraktion mit Spuren von extracellulärer DTPA. Die letztere Möglichkeit läßt sich naturgemäß auch bei sehr sorgfältiger Durchspülung der Leber nicht mit Sicherheit, zumindest nicht vollständig, ausschalten. In früheren Untersuchungen¹⁰ jedoch konnten wir zeigen, daß nach Zufuhr von DTPA die ^{144}Ce -Konzentration im Blut und damit auch im extracapillären Raum nur sehr kurzfristig, für maximal etwa 60 Min., erhöht ist, während in den vorliegenden Untersuchungen das Cytoplasma für die Dauer von mindestens 2 Tagen erhöhte Konzentrationen zeigt. Wir sind somit geneigt, den in Frage stehenden Befund, wenn auch nicht als direkten Beweis, so doch als starken Hinweis für eine gewisse intracelluläre Anreicherung des Chelatbildners anzusehen; dies um so mehr, als eine Reihe anderer, hier nicht näher diskutierter Befunde ebenfalls diese Annahme nahelegte^{1,4}. Diese Feststellung und Überlegungen haben insofern auch eine gewisse praktische Bedeutung, als sie Ansatzpunkte für die weitere Entwicklung im Sinne einer größeren Dekorporations-Effektivität von Chelatbildnern mit höherem Permeabilitäts-Vermögen geben¹¹.

Eine ausführliche Darstellung der Untersuchungen erfolgt in der Dissertation von H. IMMEL-TELLER.

⁹ D. SCHINDEWOLF-JORDAN, unveröffentlichte Ergebnisse.

¹⁰ A. CATSCH u. D. KH. LÊ, *Strahlentherapie* **107**, 298 [1958].

¹¹ A. CATSCH, *Int. J. appl. Radiat. Isotopes*, im Druck.