

KFK-124

KERNFORSCHUNGSZENTRUM

KARLSRUHE

Sept. 1962

KFK 124

Institut für Strahlenbiologie

Der Einfluß von Chelatbildnern auf das Verhalten von
Blei im Organismus

A. Catsch

KERNREAKTOR

Bau- und Betriebs-Gesellschaft m. B. H.
Verwaltung der Zentralbücherei

4. Mrz 1963

KERNREAKTOR

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

KARLSRUHE





Kernforschungszentrum
Beu- und Le...
Verwaltung der Zentralbücherei

Sonderdruck aus:

» ARZNEIMITTEL-FORSCHUNG «

» DRUG RESEARCH «

Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 12, 924 - 930 (1962)

Editio Cantor / Aulendorf i. Württ.

Aus dem Institut für Strahlenbiologie,
Kernforschungszentrum Karlsruhe

Der Einfluß von Chelatbildnern auf das Verhalten von Blei im Organismus

Von A. Catsch
[Alexander]

Zur Behandlung der Bleivergiftung werden seit längerem Pharmaka mit chelierenden Eigenschaften herangezogen, zunächst Natriumcitrat und 2,3-Dimercaptopropanol (BAL), dann aber nach den ersten günstigen Erfahrungen von Belknap [5] und Bessman u. a. [4] in zunehmendem Maße die wirksamere und überdies verträglichere Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA). Im Zusammenhang mit der Ausscheidungsintensivierung anderer (radioaktiver oder stabiler) Metallionen konzentriert sich neuerdings das Interesse auf bestimmte Derivate der EDTA, insbesondere die Diäthylentriaminpentaessigsäure (DTPA), die aus Gründen, die von Heller u. Catsch [30] ausführlich diskutiert wurden, der EDTA in erheblichem Maße überlegen sind (Literatur bei [7]). Die wenigen, bisher vorliegenden Untersuchungen über die Beeinflussung des Bleistoffwechsels durch DTPA sind nicht eindeutig: Während Foreman [21], Tregubenko u. a. [46] eine im Vergleich zu EDTA stärkere Beeinflussung der Bleiausscheidung durch DTPA feststellten, lassen orientierende Untersuchungen anderer Autoren [24, 27] keine wesentlichen Effektivitätsunterschiede erkennen. Die vorliegende Arbeit untersucht — mit dem Ziel, therapeutisch effektivere Substanzen zu finden — die Verteilung von Blei im Organismus der Ratte unter dem Einfluß der oben angeführten sowie einiger anderer Chelatbildner, bei deren Wahl

wir davon ausgingen, daß Blei bei seinen komplex-chemischen Reaktionen Schwefel gegenüber Sauerstoff und Stickstoff als Koordinationspartner bevorzugt. Im einzelnen wurden folgende Verbindungen untersucht: Äthylendiamin-NNN'N'-tetraessigsäure (ADTA), N'-(2-Hydroxyäthyl)-äthylendiamin-NNN'-triessigsäure (HÄDTA),

Morpholinäthylester der HÄDTA (HÄDTA-E), vgl. hierzu [6],

Diäthylentriamin-NNN'N'N'-pentaessigsäure (DTPA), Triäthyltetraamin-NNN'N'N'N'-hexaessigsäure (TTHA),

2:2'-Bis-[di-(carboxymethyl)-amino]-diäthylsulfid (BADS)

2:2'-Bis-[di-(carboxymethyl)-amino]-diäthyldisulfid (BADDs)

1:2'-Bis-[2-di-(carboxymethyl)-aminoäthylthio]-äthan (BATA),

2-Mercaptoäthyliminodiessigsäure (MÄIDA*), enthält an Verunreinigung ca. 10% BADDs,

2,5-Dimercaptopropan-(1)-sulfosäure (DMPS),

D-Penicillamin (PA),

5-Mercaptoimidoxin (MP),

β -Aminoäthylisothiuronium (AAT).

Methodik

Als Versuchstiere dienten Ratten des Heiligenberg- und des Sprague-Dawley-Stammes, denen 1–2 μc ^{210}Pb – ^{210}Bi als Nitrat in die Schwanzvene injiziert wurden; der pH der Lösungen wurde zur Vermeidung sog. radiokolloidaler Effekte auf 5–4 eingestellt. Die spezifische Aktivität variierte in den einzelnen ^{210}Pb -Chargen, im Mittel betrug sie 1,7 mc/mg . ^{210}Pb wurde teils „trägerfrei“, teils isotopisch verdünnt (durch Zusatz von stabilem $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) injiziert. Die Chelatbildner verabfolgten wir, von dem Versuch Nr. 8 abgesehen, intraperitoneal, und zwar im Falle der ADTA, HÄDTA, DTPA, TTHA, BADS und BADDs in Form ihrer Calcium-Natrium-Chelate; das CaNa_2 -Chelat des BATA erwies sich als unlöslich.

Nach Töten der Tiere (durch Ausbluten in Äther-Narkose) wurden der Femur bei 600°, Leber und Nieren bei 250° verascht bzw. verkohlt und nach Einstellung des radioaktiven Gleichgewichts zwischen ^{210}Pb und ^{210}Bi die β -Aktivität des ^{210}Bi in aliquoten Teilen der Asche mit Hilfe eines Endfensterzählrohrs bestimmt, wobei wegen der relativ weichen β -Strahlung (1,17 MeV) eine Korrektur der durch Selbstabsorption bedingten Zahlverluste notwendig war. Nach Umrechnung der Probenaktivität auf das gesamte Organ — die Aktivität des Skeletts wurde nach allgemein üblichem Vorgehen dem 20fachen des Femurs gleichgesetzt — drückten wir die so erhaltenen Werte in % der zugeführten und in Parallelmessungen bestimmten ^{210}Pb -Menge aus. Die untersuchten Organe stellen die Hauptspeicherorgane dar, während die Pb-Konzentrationen der übrigen Organe vernachlässigt werden können [48]. Da das Versuchsmaterial bezüglich des Rattenstammes, des Geschlechts und des Alters der Tiere sowie auch der spezifischen Aktivität der ^{210}Pb -Lösungen nicht homogen war, erhielt jeder Versuch eine eigene Kontrollgruppe.

*) Wegen der kleinen uns zur Verfügung stehenden Menge mußte die Zahl der Versuche beschränkt bleiben.

Tab. 1: ^{210}Pb -Gehalt der Organe. Die Chelatbildner wurden ip. unmittelbar anschließend an die iv. Injektion von trägerfreiem ^{210}Pb injiziert. Die Standardfehler $s_{\bar{x}}$ beziehen sich auf die in Klammern angeführten logarithmischen Mittelwerte. N = Anzahl der Tiere. Die Tiere in Versuch Nr. 2 wurden am 5. Tag, in Versuch Nr. 4 am 4. Tag, in den übrigen Versuchen am 2. Tag sezziert. Vers. Nr. 1: 7–10 Wochen alte ♀, mittl. Gewicht 144 g. Vers. Nr. 2: 10–11 Wochen alte ♂, mittl. Gewicht 176 g. Vers. Nr. 3: 9–10 Wochen alte ♀, mittl. Gewicht 120 g. Vers. Nr. 4: 12–14 Wochen alte ♂, mittl. Gewicht 190 g. Vers. Nr. 5: 12–15 Wochen alte ♂, mittl. Gewicht 212 g. Vers. Nr. 6: 10–15 Wochen alte ♂ mittl. Gewicht 198 g.

Nr.	Chelatbildner ($\mu\text{M}/\text{Tier}$)	N	% ^{210}Pb in		
			Leber	Nieren	Skelett
1	—	16	2,94 (0,469)	4,45 (0,659)	51,5 (1,498)
	50 ADTA	5	1,59 (0,144)	1,57 (0,194)	10,7 (1,028)
	100 ADTA	5	0,925 (−0,034)	1,19 (0,075)	6,89 (0,858)
	250 ADTA	5	0,745 (−0,128)	0,692 (−0,160)	3,55 (0,550)
	50 DTPA	5	0,924 (−0,034)	0,942 (−0,026)	4,53 (0,656)
	100 DTPA	5	0,855 (−0,068)	0,917 (−0,037)	3,38 (0,529)
	250 DTPA	5	0,578 (−0,258)	0,616 (−0,210)	1,51 (0,180)
	250 TTHA	6	0,995 (−0,002)	0,901 (−0,045)	2,65 (0,422)
	250 BADS	5	0,708 (−0,156)	0,745 (−0,128)	3,16 (0,500)
	250 BATA	5	0,635 (−0,198)	0,635 (−0,198)	4,74 (0,676)
	0,5 BADDS	6	1,27 (0,103)	1,61 (0,208)	19,0 (1,278)
	5 BADDS	6	0,650 (−0,187)	0,516 (−0,287)	5,78 (0,762)
	50 BADDS	16	0,573 (−0,241)	0,358 (−0,471)	2,50 (0,398)
	50 AAT	6	2,34 (0,368)	3,53 (0,548)	31,3 (1,495)
$s_{\bar{x}}$	16	0,023	0,026	0,029	
	6	0,041	0,045	0,047	
	5	0,045	0,047	0,051	
2	—	4	1,62 (0,210)	3,15 (0,495)	45,7 (1,640)
	250 ADTA	4	0,452 (−0,345)	0,653 (−0,185)	3,43 (0,737)
	250 DTPA	4	0,347 (−0,460)	0,379 (−0,237)	2,67 (0,427)
	$s_{\bar{x}}$		0,053	0,027	0,029
3	—	5	3,92 (0,582)	7,58 (0,880)	35,4 (1,548)
	100 MP	5	3,37 (0,528)	5,01 (0,700)	28,2 (1,450)
	$s_{\bar{x}}$		0,072	0,027	0,027
4	—	7	1,95 (0,290)	3,10 (0,492)	35,2 (1,547)
	50 PA	7	1,38 (0,140)	2,36 (0,372)	23,1 (1,365)
	50 DMPS	7	0,371 (−0,431)	0,611 (−0,214)	11,7 (1,068)
	$s_{\bar{x}}$		0,019	0,014	0,012
5	—	6	5,92 (0,772)	8,80 (0,945)	32,8 (1,515)
	1 MAIDA	6	2,84 (0,453)	3,05 (0,482)	17,6 (1,245)
	10 MAIDA	6	1,30 (0,115)	0,971 (−0,012)	4,75 (0,677)
	50 MAIDA	6	0,976 (−0,010)	0,349 (−0,457)	1,76 (0,235)
	25 BADDS	6	0,938 (−0,028)	0,466 (−0,532)	2,79 (0,445)
$s_{\bar{x}}$		0,055	0,025	0,025	
6	—	5	5,50 (0,740)	7,58 (0,868)	27,4 (1,458)
	25 MAIDA	5	1,25 (0,090)	0,502 (−0,500)	1,99 (0,298)
	12,5 BADDS	5	1,44 (0,158)	0,629 (−0,202)	3,68 (0,566)
	250 HADTA	5	1,44 (0,158)	0,733 (−0,135)	3,35 (0,525)
	$s_{\bar{x}}$		0,044	0,030	0,019

Bei der statistischen Bearbeitung berechneten wir mit Hilfe der Varianzanalyse einen gemeinsamen, d. h. für alle Versuchsgruppen eines Versuchs gültigen Standardfehler. Bei den Versuchsreihen mit sehr ausgeprägten Mittelwertsunterschieden (Tab. 1) war eine vorherige Normalisierung der Varianzheterogenität durch logarithmische Transformierung der Einzelwerte notwendig.

Die quantitative Bestimmung freier SH-Gruppen führten wir mittels einer jodometrischen Methode [32] durch.

V Versuchsergebnisse

Tab. 1 gibt die Ergebnisse einer Versuchsreihe wieder, in der die Chelatbildner zur Erzielung einer möglichst starken Wirkung unmittelbar im Anschluß an die Injektion von trägerfreiem ^{210}Pb injiziert wurden. Im Falle der BADDS, MAIDA und DMPS war eine höhere Dosierung nicht möglich, da Dosen $> 100 \mu\text{M}/\text{Tier}$ z. T. schon letal wirkten und makroskopisch sichtbare Nierenveränderungen ergaben.

Die Wirksamkeit eines Chelatbildners L bei der Dekorporation eines trägerfreien Radiometalls M, definiert als der Quotient

$$\frac{\% \text{ M im Organ nach Injektion von L}}{\% \text{ M im Organ von Kontrolltieren}}$$

sollte nach Heller u. Catsch [50] in erster Näherung dem Ausdruck

$$E = \frac{K_{\text{ML}}^{\text{M}} \cdot [L_{\text{total}}]}{\alpha + K_{\text{CaL}}^{\text{Ca}} \cdot [\text{Ca}]}$$

proportional sein, wobei $[L_{\text{total}}]$ und $[\text{Ca}]$ die Konzentration des Chelatbildners, d. h. dessen Gesamtdosis, bzw. von Ca^{2+} und K_{ML}^{M} , $K_{\text{CaL}}^{\text{Ca}}$ die Chelatstabilitätskonstanten der M- bzw. Ca-1:1-Chelate bedeuten. Der den Einfluß des pH auf die Chelatstabilität berücksichtigende Verteilungskoeffizient α berechnet sich aus dem gegebenen pH und den Basizitätskonstanten (K_1^{H}). Bei Auftragen der Effektivität gegen E werden (nach Überschreitung eines Schwellenwertes von E) Gerade im doppelt-logarithmischen Raster gefordert. Eine entsprechende Analyse ließ sich nur für ADTA, DTPA und MAIDA durchführen, da im Moment nur für diese Substanzen die interessierenden Konstantenwerte zur Verfügung stehen (Tab. 2). Der Berechnung von E wurde ein pH des Blutplasmas von 7,4 und für $[\text{Ca}]$ ein konstanter Wert von 10^{-3} zugrunde gelegt; $[L_{\text{total}}]$ berechnet sich aus der Dosis und bei Annahme eines sog. Verdünnungsvolumens im Körper von 75 ml. Abb. 1 ist zu entnehmen, daß die Versuchspunkte im Falle der Leber und Nieren stärker, jedoch nicht systematisch streuen und befriedigend durch Gerade wiedergegeben werden können. Im Falle des Skeletts ist dies

Tab. 2: Chelatstabilitäts- und Basizitätskonstanten der DTPA (nach [1]), ADTA (nach [42]) und MAIDA (nach [41]).

$$K_{ML}^M = \frac{[ML]}{[M] \cdot [L]} \quad K_i^H = \frac{[H_iL]}{[H] \cdot [H_{i-1}L]}$$

log	DTPA	ADTA	MAIDA
K_1^H	10,58	10,26	10,79
K_2^H	8,60	6,16	8,17
K_3^H	4,27	2,67	2,14
K_4^H	2,64	1,99	—
K_5^H	1,5	—	—
K_{CaL}^{Ca}	10,89	10,70	4,88
K_{PbL}^{Pb}	18,87	18,5	17,05

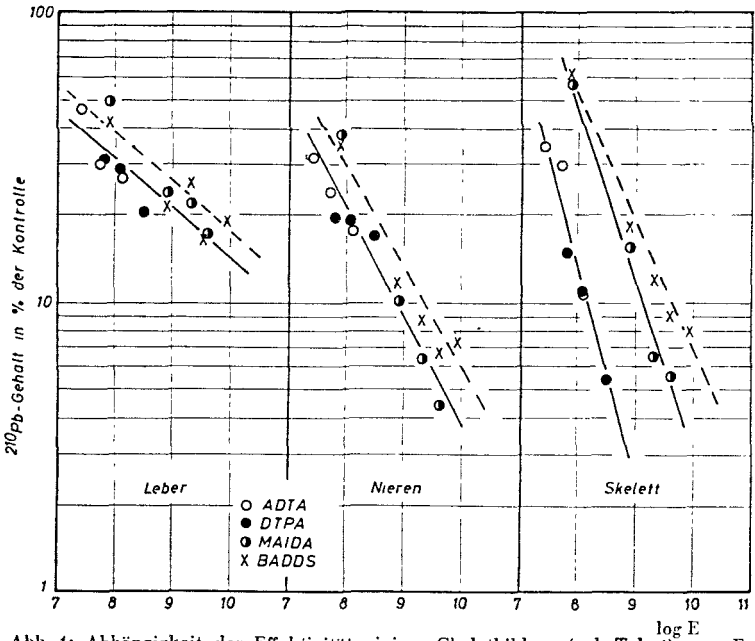


Abb. 1: Abhängigkeit der Effektivität einiger Chelatbildner (vgl. Tab. 1) von E . Weitere Erklärung s. Text.

jedoch nicht möglich, da die MAIDA eine mit $P < 0,001$ gesichert schwächere Wirkung zeigt als auf Grund ihrer E-Werte bei Extrapolation der Ausgleichsgerade für ADTA und DTPA erwartet werden kann. Wir berechneten deshalb für MAIDA eine gesonderte Gerade, deren Neigung mit der von ADTA und DTPA offensichtlich identisch ist.

Die Frage, ob auch andere Chelatbildner, für die noch keine Konstanten vorliegen, ein von der Theorie abweichendes Wirkungsmuster zeigen, prüften wir folgendermaßen: Da die statistische Behandlung aus den oben erwähnten Gründen mit den logarithmischen Werten durchgeführt wurde, lassen sich für die experimentell beobachteten und wie oben definierten Effektivitäten nach statistisch üblichem Vorgang Standardfehler berechnen. Geht man mit den entsprechenden Mutungsgrenzen der Effektivität in die Geraden der Abb. 1 ein, so können auch für E Mutungsbereiche angegeben werden, welche — die Gültigkeit der Theorie vorausgesetzt — sich für die verschiedenen Organe überlappen sollten. Abb. 2 zeigt, daß eine befriedigende Übereinstimmung nur bei TTHA und BADS vorliegt, während die übrigen Chelatbildner im Skelett niedrigere E-Werte als in Leber und Nieren zeigen und somit der MAIDA ähnliche Verhältnisse vorliegen.

Werden die Chelatbildner erst nach DMPS 48 h, d. h. nach abgeschlossener Gewebsablagerung des ^{210}Pb , verabreicht, so zeigen sie eine erheblich schwächere Wirkung (Tab. 3). Besonders auffallend ist der sehr stark ausgeprägte Effektivitätsverlust im Skelett. Die im Vergleich zum Ca-Na_2 -Chelat der HADTA stärkere Wirkung des Morpholinonesters (HADTA-E) in der Leber ist mit $P = 0,2-0,1$ nicht voll, in den Nieren dagegen mit $P < 0,001$ gut gesichert.

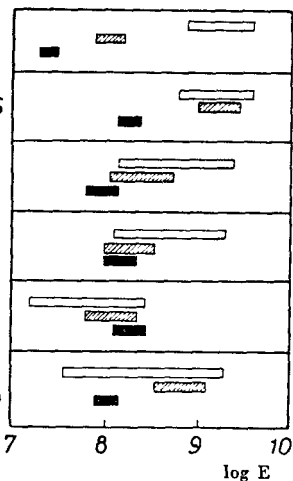


Abb. 2: Geschätzte Mutungsbereiche ($P = 0,05$) der E-Werte einiger Chelatbildner unter Zugrundelegung ihrer Effektivität in Skelett (■), Nieren (▨) und Leber (□). Weitere Erklärung s. Text.

Tab. 3: ^{210}Pb -Gehalt der Organe nach iv. Injektion von trägerfreiem ^{210}Pb . Die Chelatbildner wurden in Versuch Nr. 7 ip., in Nr. 8 iv. injiziert. Sektion der Tiere in Versuchen Nr. 7 am 12. Tag, in Nr. 8 am 4. Tag.
Versuch Nr. 7: Je 8 Wochen alte ♂, mittleres Gewicht 160 g.
Versuch Nr. 8: Je 8 14—16 Wochen alte ♂, mittleres Gewicht 198 g.

Nr.	Chelatbildner ($\mu\text{M}/\text{Tier}$)	% ^{210}Pb in		
		Leber	Nieren	Skelett
7	—	0,445	0,748	45,7
	Je 50 ADTA nach 48, 120 u. 168 h	0,294	0,552	39,9
	Je 50 DTPA nach 48, 120 u. 168 h	0,356	0,605	37,8
	Je 50 BADS nach 48, 120 u. 168 h	0,560	0,581	40,9
	Je 25 BADDS nach 48, 120 u. 168 h	0,221	0,235	40,2
	$s_{\bar{x}}$	0,022	0,022	1,28
8	—	5,31	4,01	56,4
	100 HADTA nach 24 h	2,68	2,93	29,7
	100 HADTA-E nach 24 h	2,27	2,02	29,7
	$s_{\bar{x}}$	0,17	0,15	1,18

Tab. 4: ^{210}Pb -Gehalt der Organe. Die Chelatbildner wurden ip. unmittelbar nach der iv. Injektion von ^{210}Pb + 3 mg (Versuch Nr. 9) bzw. 4,5 mg Pb (Versuch Nr. 10) injiziert, Sektion am 2. Tag. Versuch Nr. 9: Je 5 10—11 Wochen alte ♂, mittleres Gewicht 170 g. Versuch Nr. 10: Je 5 7—9 Wochen alte ♂, mittleres Gewicht 162 g.

Nr.	Chelatbildner ($\mu\text{M}/\text{Tier}$)	% ^{210}Pb in		
		Leber	Nieren	Skelett
9	—	31,1	10,0	22,7
	50 DTPA	25,6	6,56	18,0
	50 HADTA	25,7	4,54	21,8
	50 MADA	22,6	2,44	16,3
	25 BADDS	22,4	3,30	19,3
	$s_{\bar{x}}$	1,94	0,74	0,75
10	—	46,9	12,0	25,0
	100 ADTA	41,0	8,02	19,1
	100 DTPA	37,7	6,28	20,3
	100 BADS	38,6	4,38	22,9
	50 BADDS	30,0	3,04	18,0
	$s_{\bar{x}}$	1,92	1,01	1,33

Isotopisch verdünntes ^{210}Pb zeigt ein vom trägerfreien Radionuklid unterschiedliches Verteilungsmuster, und zwar eine erheblich stärkere Ablagerung in der Leber und niedrigere Konzentrationen im Skelett (Tab. 4). Auch in diesem Fall weisen die Chelatbildner eine deutlich schwächere Wirkung

Tab. 5: ^{210}Pb -Gehalt der Organe nach iv. Injektion von ^{210}Pb + 3 mg Pb. Die Chelatbildner wurden ip. injiziert. Die Tiere wurden in Versuch Nr. 12 am 12. Tag, in allen übrigen Versuchen am 7. Tag seziiert. Versuch Nr. 11: Je 7 20–24 Wochen alte ♀, mittleres Gewicht 211 g. Versuch Nr. 12: Je 9 11–14 Wochen alte ♂, mittleres Gewicht 215 g. Versuch Nr. 13: Je 7 28 Wochen alte ♂, mittleres Gewicht 314 g. Versuch Nr. 14: Je 8 10–12 Wochen alte ♂, mittleres Gewicht 173 g. Versuch Nr. 15: Je 8 8–9 Wochen alte ♀, mittleres Gewicht 123 g.

Nr.	Chelatbildner ($\mu\text{M}/\text{Tier}$)		% ^{210}Pb in		
			Leber	Nieren	Skelett
11	—	—	1,55	1,40	30,9
	Je 50 ADTA	nach 48, 120 u. 168 h	1,91	1,20	29,0
	Je 50 DTPA	nach 48, 120 u. 168 h	1,21	1,58	25,5
	Je 50 BADS	nach 48, 120 u. 168 h	1,24	1,01	22,9
	Je 25 BADDS	nach 48, 120 u. 168 h	1,09	0,95	20,7
	$s_{\bar{x}}$		0,16	0,11	1,23
12	—	—	2,28	3,05	32,7
	Je 250 ADTA	nach 24, 48 u. 72 h	1,40	2,07	20,6
	Je 250 DTPA	nach 24, 48 u. 72 h	1,80	1,86	17,4
	Je 250 BADS	nach 24, 48 u. 72 h	1,65	1,46	20,7
	$s_{\bar{x}}$		0,15	0,18	1,08
	13	—	—	1,68	3,59
Je 250 ADTA		nach 24, 48 u. 72 h	1,47	3,25	14,1
Je 250 DTPA		nach 24, 48 u. 72 h	1,33	2,87	11,8
Je 250 BADS		nach 24, 48 u. 72 h	1,27	2,75	14,7
Je 250 HADTA		nach 24, 48 u. 72 h	1,46	2,22	12,8
$s_{\bar{x}}$			0,11	0,35	0,61
14	—	—	3,46	1,41	29,9
	Je 250 ADTA	nach 24 u. 48 h	3,29	1,07	21,5
	Je 250 HADTA	nach 24 u. 48 h	2,90	0,77	20,4
	$s_{\bar{x}}$		0,30	0,11	1,29
15	—	—	5,82	0,954	47,5
	Je 25 DMPS	nach 24, 48 u. 72 h	3,53	1,28	32,7
	Je 25 DTPA	nach 24, 48 u. 72 h	4,35	0,999	36,7
	Je 50 MAIDA	nach 24, 48 u. 72 h	3,37	0,366	18,6
	$s_{\bar{x}}$		0,41	0,14	1,38

auf. Tab. 5 gibt die Ergebnisse eines Versuchs wieder, in dem wir die Chelatbildner frühestens 24 h nach Injektion des isotopisch verdünnten ^{210}Pb verabfolgten. Für die Versuche Nr. 12, 14 und 15, in denen verschiedene Dosen der ADTA, DTPA und MAIDA unter vergleichbaren Bedingungen injiziert wurden, ist in Abb. 3 die Abhängigkeit der Effektivität von E wiedergegeben. Im Falle der Leber streuen die Punkte relativ

stark, und die angegebene Regressionsgerade ist schlecht gesichert, in Nieren und Skelett ist die lineare Abhängigkeit dagegen offensichtlich, wobei aber in Übereinstimmung mit Abb. 1 die MAIDA im Falle des Skeletts eine deutlich gegenüber der Erwartung herabgesetzte Wirkung zeigt.

Was das Wirkungsmuster der anderen Chelatbildner unter den Bedingungen der späten Verabfolgung und/oder der isotopischen Verdünnung betrifft, so sind die in den Tab. 3–5 angeführten Ergebnisse im großen und ganzen gleichsinnig, und es ergibt sich unter Berücksichtigung aller Befunde und ihrer statistischen Signifikanz folgende Anordnung der Substanzen nach Maßgabe ihrer Wirksamkeit:

Leber: ADTA < HADTA \approx DTPA < BADS
< BADDS \approx MAIDA

Nieren: ADTA < DTPA < HADTA \approx BADS
< BADDS < MAIDA

Skelett: ADTA \approx HADTA \approx BADS \approx BADDS
< DTPA < MAIDA

Die schwefelhaltigen BADDS und BADS sowie die HADTA zeigen eine unverhältnismäßig niedrige Skeletteffektivität; im Falle des BADS war dies in Abb. 2 nur angedeutet. Es sei noch erwähnt, daß höhere Dosen des HADTA-E sich unter den Versuchsbedingungen der Tab. 5 als toxisch erwiesen; auf die Wiedergabe der sehr stark streuenden Werte wird deshalb verzichtet. Hervorzuheben bleibt, daß die Chelatbildner generell bei später Verabreichung und iso-

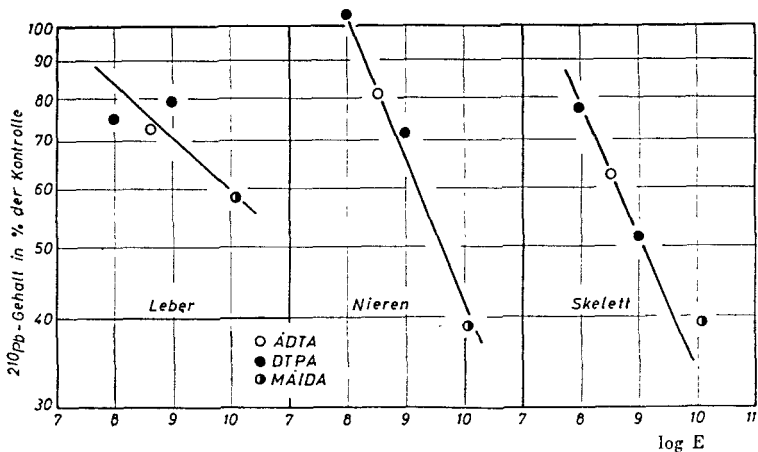


Abb. 5: Abhängigkeit der Effektivität einiger Chelatbildner (vgl. Tab. 5) von E unter Zugrundelegung der Gesamtdosis.

- topisch verdünntem ^{210}Pb (Tab. 5) eine deutlich größere Wirkung zeigten als bei
1. trägerfreiem ^{210}Pb und später Verabreichung (Tab. 5) und
 2. isotopisch verdünntem ^{210}Pb und früher Verabreichung (Tab. 4).

Diskussion

Bei der ADTA und DTPA handelt es sich um 6- bzw. 8-zählige Liganden; die Vermehrung der Zahl der Elektronendonatoratome führt bei 3- und mehrwertigen Metallionen zu einer Erhöhung der Chelatstabilität, nicht aber bzw. in geringerem Maße bei 2-wertigen Metallionen [1, 10, 28]. Dementsprechend zeigen auch ADTA und DTPA nur wenig unterschiedliche $K_{\text{PbL}}^{\text{Pb}}$ und $K_{\text{CaL}}^{\text{Ca}}$ (vgl. Tab. 2). Die Unterschiede der E-Werte sind relativ geringfügig, und eine im Vergleich zu ADTA deutlich stärkere Effektivität der DTPA konnte nur unter der Voraussetzung, daß die Abhängigkeit der Wirksamkeit von E sehr stark ausgeprägt ist, erwartet und für das Skelett auch experimentell nachgewiesen werden (vgl. Abb. 1). Unter Berücksichtigung der oben erwähnten komplex-chemischen Gesetzmäßigkeit wird verständlich, daß eine weitere Erhöhung der Koordinationsgruppen in der 10zähligen TTHA zu keiner entsprechend stärkeren Blei-Dekorporation führt, wie sie z. B. für höherwertige Metallionen wie Ce^{3+} , Y^{3+} [10, 11] und Th^{4+} [12] nachgewiesen wurde.

Daß im speziellen Fall des Bleis (und evtl. auch anderer Schwermetalle) die Zahl der Donoratome des Liganden von geringerer Bedeutung, dafür aber ihre Art wesentlich ist, zeigt die im Vergleich zu den anderen Polyaminosäuren höhere Effektivität der nur 4-zähligen, dafür aber Mercaptidschwefel aufweisenden MAIDA. Überraschend war dabei allerdings, daß die höhere Wirksamkeit der MAIDA sich nur auf Leber und Nieren, nicht aber auf das Knochengewebe erstreckt. Da diese unverhältnismäßig geringe Skeletteffektivität von dem Zeitpunkt der MAIDA-Applikation weitgehend unabhängig zu sein scheint, ist eine stärkere Instabilität des Pb-Chelats selbst im Milieu des Knochengewebes und weniger ein unterschiedliches Stoffwechselverhalten des Chelatbildners anzunehmen. Verschiedene Autoren [15, 33, 35, 36, 38] halten es nun für wahrscheinlich, daß im Knochen, zumindest lokal, niedrigere pH-Werte als im Blutplasma und in der extracellulären Flüssigkeit vorliegen; im einzelnen werden Werte im Bereich von $\text{pH} = 6,6\text{--}6,8$ disku-

tiert. Der Einfluß des pH auf die Chelatstabilität wird durch die Größe α in E berücksichtigt. Im Falle der ÄDTA oder DTPA ist allerdings $\alpha \ll K_{CaL}^{Ca} \cdot [Ca]$, so daß α als additives Glied vernachlässigt werden kann und die Effektivität sich invers proportional allein zu $K_{CaL}^{Ca} \cdot [Ca]$ verhält. Im Falle der MÄIDA und anderer Polyaminosäuren ist dies wegen der niedrigeren K_{CaL}^{Ca} und der z.T. höheren Basizitätskonstanten [41, 45] nicht mehr der Fall, und es resultiert, wie Abb. 4 zeigt, mit kleiner werdendem pH eine ausgeprägte Zunahme des Nenners in E, damit aber auch eine Abnahme von E. Die Annahme eines pH $\sim 6,9$ im Knochen wäre, wie den Abb. 1 und 4 zu entnehmen ist, bereits ausreichend, um die experimentell beobachtete Skeletteffektivität der MÄIDA zu erklären. Der in Frage stehende Befund findet somit eine plausible und in sich konsistente Erklärung, die zwanglos auch für die geringe Skeletteffektivität der anderen oben erwähnten Chelatbildner (BADS, BADDS und BATA) herangezogen werden kann (vgl. Abb. 4).

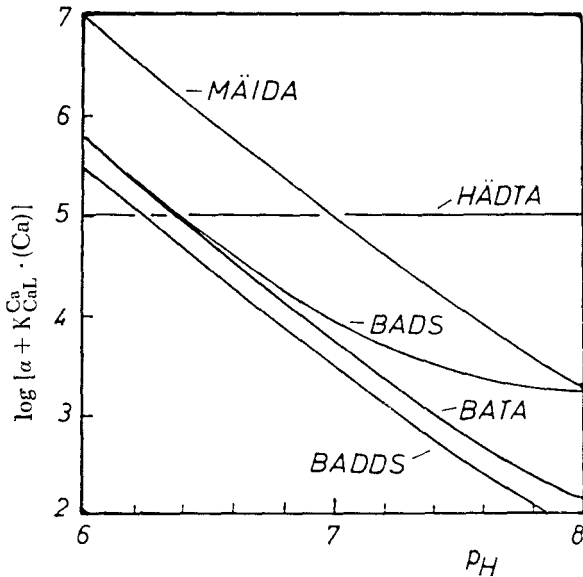


Abb. 4: Abhängigkeit der Größe $\alpha + K_{CaL}^{Ca} \cdot [Ca]$ vom pH Konstanten für HÄDTA nach [14], für alle anderen Chelatbildner nach [41, 45]. Vgl. hierzu auch Tab. 2.

Die BADS, BATA und BADDS haben gemeinsam, daß der Schwefel in der verlängerten Alkylenbrücke der Polyaminosäure als sog. Heteroatom fungiert. Wie wir eingangs erwähnten, war die stärkere Koordinationsaffinität des Bleis zum Schwefel der Anlaß, besagte Verbindungen in die Untersuchungen einzubeziehen. Die BADS und BATA zeigten jedoch, wenn überhaupt, so eine nur geringfügige Verbesserung der Effektivität gegenüber ÄDTA oder DTPA. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß Schwefel in Ätherbindung einen wesentlich schwächeren Koordinationspartner als Mercaptidschwefel darstellt [41]. Daß er im Falle der BADS und BATA jedoch überhaupt an der Bildung der Chelatringe teilnimmt, wird aus dem Vergleich des BADS mit dem 2:2'-Bis-[di-(carboxymethyl)-aminol]-diäthyläther deutlich: Die letztere, Äthersauerstoff an Stelle von Schwefel enthaltende Substanz ist im Falle von Blei nur sehr schwach wirksam [24, 46].

Unerwartet hoch ist die im Vergleich zu BADS und BATA stärkere und der MAIDA fast gleichkommende Effektivität des BADDS. Die K_{PbL}^{Pb} des BADDS ist bis jetzt noch nicht bekannt, doch ist es aus komplex-chemischen Überlegungen wenig wahrscheinlich, daß sie wesentlich höher als die der BADS und BATA ist*). Auffallend ist weiterhin die im Vergleich zu BADS und BATA höhere Toxizität des BADDS. Es wäre auf Grund dieser Befunde, zusammen mit der bekannten Tatsache, daß Disulfide im Organismus reduziert werden können [17, 20, 25, 47], die Arbeitshypothese zu diskutieren, daß der BADDS im Organismus zu der wirksameren MAIDA reduziert wird. Zunächst von der Annahme einer vollständigen Umsetzung (1 M BADDS \rightarrow 2 M MAIDA) ausgehend, berechneten wir unter Einsetzen der Stabilitäts- und Basizitätskonstanten der MAIDA die „effektiven“ E-Werte des BADDS. Abb. 1 zeigt, daß die entsprechenden Geraden (gestrichelt) gegenüber den ÄDTA, DTPA- bzw. MAIDA-Geraden um einen annähernd konstanten Betrag mit $P < 0,001$ gesichert nach rechts verschoben sind. Die Aufspaltung des BADDS wäre demnach nicht vollständig, sondern der für die Effektivität verantwortliche Bruchteil würde etwa 50% ausmachen. Für die Annahme einer wenn auch nicht vollständigen Umsetzung des BADDS entstehen jedoch gewisse Schwierigkeiten: Zunächst dürfte im Hinblick auf die generell starke Oxydationstendenz von Sulfhydryl-Substanzen die umgekehrt verlaufende Reak-

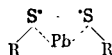
*) Verschiedene Näherungsverfahren ergeben für K_{PbL}^{Pb} des BADDS Schätzwerte, die um 1,7—4,0 log-Einheiten tiefer liegen als für MAIDA (P. Moser u. H. J. Heller, persönliche Mitteilung). Das Verhältnis der Effektivitäten E_{MAIDA} / E_{BADDS} läge damit in den Grenzen 0,5—100.

tion, die Oxydation der MAIDA zu BADDS, wahrscheinlicher sein. Entsprechende Untersuchungen in vitro zeigten allerdings, daß in Lösungen von MAIDA in Blutplasma die Konzentration jodometrisch nachweisbarer SH-Gruppen auf nur 70%, bei vorheriger Sättigung des Plasmas mit O_2 auf 65% erniedrigt wird. Die mehrfach nachgewiesene biologische Reduktion von Disulfiden findet weiterhin intracellulär statt und ist wahrscheinlich enzymatischer Natur [18], wobei Erythrocyten und Nierengewebe in dieser Beziehung besonders wirksam sind [19]. Eine Permeation des BADDS in das Zellinnere anzunehmen, ist nun nicht ohne weiteres möglich, da die Ca-Chelate des BADDS, wie auch die der ADTA, wasserlösliche zweifach geladene Anionen darstellen und andererseits im Falle der ADTA gezeigt werden konnte, daß sie sich aus diesem Grund fast ausschließlich im extracellulären Raum verteilt [21]. Zur Klärung dieser Fragen wurden Untersuchungen in vitro mit folgenden Ergebnissen durchgeführt: Lösungen von Na_2 - und Na_2Ca -BADDS in Blutplasma oder Vollblut zeigen nach 50 min keine Erhöhung der jodometrisch nachweisbaren SH-Konzentration. Weitere Versuche prüften die Möglichkeit der BADDS-Reduktion in Anwesenheit von Nierengewebe; diese Anordnung wird durch das ausgeprägte Disulfidreduktionsvermögen der Niere [19] und durch die oben erwähnte Nephrotoxizität des BADDS und der MAIDA nahegelegt. Nierenschnitte wurden für die Dauer von 50 min bei $37^\circ C$ in $1/15$ M Phosphatpuffer (pH 7,4) mit und ohne isotonischer Glukose suspendiert. Die Konzentration des Na_2 - bzw. Na_2Ca -BADDS betrug 10^{-3} M. In keinem Fall konnte eine über den Kontrollwert hinausgehende gesicherte Erhöhung der SH-Konzentration nachgewiesen werden. Allerdings ist die Methode nicht empfindlich genug, um bei der relativ niedrigen BADDS-Konzentration die Reduktion eines möglicherweise nur kleinen Bruchteils des BADDS mit Sicherheit erfassen zu können. Aus diesem Grunde wurde die Konzentration auf 10^{-2} M erhöht; die Versuchsbedingungen blieben bis auf das Fehlen der Glukose die gleichen. Im Falle des Na_2 -BADDS wurde eine Reduktion von $2,33 \pm 0,84\%$, bei Na_2Ca -BADDS von $3,7 \pm 0,52\%$ nachgewiesen. Wegen der unphysiologisch hohen BADDS-Konzentration kommt diesem Ergebnis eine volle Beweiskraft allerdings nicht zu; auch kann über den Ort und den Wirkungsmechanismus der evtl. vorliegenden BADDS-Reduktion noch nichts Definitives gesagt werden.

Nach Cecil [13] können Disulfidbindungen bestimmter Verbindungen durch Ag^+ und Hg^{2+} gespalten werden; die Frage, ob Pb^{2+} eine entsprechende Wirkung im Falle des BADDS zugeschrieben werden kann,

muß solange offen bleiben, bis geklärt ist, ob die Differenz in den Stabilitäten der MAIDA- und BADDS-Bleichelate ausreichend groß ist, um die Reduktion der S—S-Bindung in Gegenwart von Pb^{2+} durch eine entsprechende Änderung des Reduktionspotentials zu ermöglichen.

Schließlich ist noch zu überlegen, ob nicht beide S-Atome des BADDS an der Chelatbildung teilnehmen, was zu einer Erhöhung der Stabilität gegenüber BADS führen würde. Ohne besondere Annahmen erscheint dies insofern kaum möglich, als der hierbei entstehende dreigliedrige Chelatring wegen der Ringspannung und der geringen Wirkung eines normalen Thioätherschwefels energiemäßig sehr ungünstig liegt. Da Disulfidbrücken bekanntlich leicht in die Radikale $R-S-S-R \rightleftharpoons R-S^{\cdot} \quad \cdot S-R$ zerfallen, wäre vielleicht nach H. J. Heller (persönliche Mitteilung) die Bildung einer nicht klassischen Struktur



nicht ausgeschlossen. Weitere Untersuchungen zu dieser Frage sind beabsichtigt.

Bei dem Vergleich der restlichen Chelatbildner sei zunächst die im Vergleich zu ADTA relativ hohe Effektivität der HADTA erwähnt, die sich aber nur auf Leber und Nieren, nicht aber das Skelett erstreckt, ein Wirkungsmuster, wie es schon früher für Radiocer und -yttrium beschrieben wurde [8, 9]. Dieser Befund kann aber, im Gegensatz zu den S-haltigen Substanzen, nicht mit einer pH-Abhängigkeit der Chelatstabilität erklärt werden (vgl. Abb. 4); eine begründete Deutung kann im Moment noch nicht vorgeschlagen werden. Die relativ hohe Wirksamkeit der HADTA weist an sich auf die stärkere Affinität des Bleis zu der aliphatischen Hydroxylgruppe hin. Alle anderen Substanzen mit freien SH-Gruppen sind nicht nur der MAIDA sondern auch den schwefelfreien Polyaminosäuren deutlich unterlegen; dies betrifft vor allem die MP, AÄT und PA. Die AÄT weist zwar keine SH-Gruppe auf, doch lagert sie sich im Organismus sehr schnell zu dem Mercaptoäthylguanidin um [26, 45]. PA ist bei der Quecksilbervergiftung ein sehr wirksames Antidot [2], die bei einigen Fällen von Bleivergiftung beim Menschen bisher gewonnenen Erfahrungen [5] sind jedoch in Übereinstimmung mit unseren praktisch negativen Ergebnissen wenig überzeugend. Mit am wirksamsten ist das wasserlösliche BAL-Derivat, die DMPS, jedoch ähnlich dem BAL selbst den Polyaminosäuren deutlich unterlegen. Eine befriedigende Erklärung für die recht hohe Lebereffektivität der DMPS kann im Moment noch nicht gegeben werden.

Zusammenfassend gewinnt man somit den Eindruck, daß die gleichzeitige Anwesenheit von Sulfhydryl- und Carboxyl-, evtl. auch aliphatischen Hydroxylgruppen eine maximale Wirksamkeit des Liganden gewährleistet. Damit sind auch Ansatzpunkte für die weitere Entwicklung gegeben.

Daß die Wirksamkeit der Chelatbildner bei später Verabreichung abnimmt, ist eine für alle Metallionen generell gültige Erscheinung, deren Ursachen wir an anderer Stelle [7] ausführlich diskutierten. Eine Möglichkeit, die Dekorporationseffektivität zu verbessern, bieten veresterte Chelatbildner, die sich im Gegensatz zu den wasserlöslichen Ca-Chelaten im Zellinneren anreichern und eine stärkere Mobilisierung intracellulär deponierter Metallionen bewirken [6, 7]; eine intracelluläre Hydrolyse der Ester mit Freisetzung der wirksamen Ligandengruppierung ist dabei natürlich vorauszusetzen. Auch im speziellen Falle des Bleis zeigten die orientierenden Untersuchungen mit HADTA eine höhere Wirksamkeit des Esters. Weitere Untersuchungen sind schon im Hinblick auf die bei höheren Dosen des HADTA-E nicht eindeutigen Ergebnisse geboten.

Die beim Übergang vom trägerfreien zum isotopisch verdünntem Radioblei beobachtete Effektivitätsabnahme der Chelatbildner wurde auch für Yttrium [44] und Thorium [12, 23, 39], nicht aber für Quecksilber [37] beschrieben. Bei Verabfolgung gewichtsmäßiger Bleimengen resultiert in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen [40, 48] eine stärkere Ablagerung in der Leber, die auf die Bildung kolloidaler Aggregate und deren Abfangen durch das reticulo-endotheliale System (RES) zurückzuführen ist. Daß Metallkolloide durch Chelatbildner sowohl in vivo als auch in vitro mit geringer Geschwindigkeit solubilisiert werden, ist allgemein bekannt. Einer Erklärung bedarf allerdings der Umstand, daß spät verabreichte Chelatbildner bei gewichtsmäßigem Blei wirksamer sind als bei frühzeitiger Verabfolgung: Zum Zeitpunkt der frühen Chelatverabreichung darf in Analogie zu Untersuchungen an anderen Kolloiden bereits eine weitgehend vollständige Ablagerung im RES angenommen werden, und wir erwähnten bereits, daß kolloidale Metalle mit Chelatbildnern in der Regel überaus träge reagieren. Auf der anderen Seite scheint das sich im Organismus bildende Bleikolloid wenig stabil zu sein, da die anfänglich sehr hohen Konzentrationen in der Leber bereits zum 7. Tag stark reduziert sind. Eine teilweise Mobilisierung des Bleidepots der Leber in den Blutkreislauf mit nachfolgender Ablagerung im Skelett ist somit wahrscheinlich, und unter diesen Umständen

war für frühzeitig verabfolgte Chelatbildner eine stärkere, allerdings nur scheinbare Unwirksamkeit im Skelett zu erwarten. Auffallend ist weiterhin, daß spät verabreichte Chelatbildner im Falle von isotopisch verdünntem Radioblei eine stärkere Mobilisation aus dem Knochen bewirken als bei trägerfreiem Radioblei. Die zeitlich bedingte Abnahme der Skeletteffektivität bedeutet grundsätzlich, daß Blei — ähnlich den Verhältnissen bei Radiostrontium — im Knochen sehr rasch dem Gleichgewicht entzogen und in eine dem Chelatbildner nicht mehr zugängliche Form überführt wird. Im Hinblick auf die beschränkte Bleikapazität des Knochens [54] ist es nun durchaus denkbar, daß die physiko-chemischen Mechanismen, die eine irreversible Fixierung des Bleis bewirken, im Falle größerer Bleimengen in geringerem Maße wirksam werden als beim trägerfreien Radioblei.

Fassen wir zusammen, so kann die Wirksamkeit der Chelatbildner trotz der Einschränkungen, die sie bei später Verabreichung und isotopischer Verdünnung, d. h. unter den praktisch wichtigen Bedingungen, erfährt, immer noch als befriedigend angesehen werden. Durch 3malige Verabreichung der MAIDA konnte beispielsweise der Bleigehalt der Leber auf rund 60% und der in Nieren und Skelett auf etwa 40% der Werte bei unbehandelten Kontrolltieren gesenkt werden. Wenn wir nun zu den praktisch-therapeutischen Konsequenzen übergehen, die sich aus unseren Untersuchungen ergeben, so sind wir uns darüber voll im klaren, daß die anfänglich sehr optimistische Bewertung der Chelatbildner bei der Therapie der Bleivergiftung einer wesentlich zurückhaltenderen Beurteilung Platz gemacht hat. In kritischen Diskussionen zu dieser Frage [22, 29, 51] konnte neuerdings dahingehend Übereinstimmung erzielt werden, daß geeigneten Chelatbildnern auch jetzt noch bei der Therapie der Bleivergiftung eine erhebliche Bedeutung zukommt; vor allem wird die Frage, ob eine Mobilisierung des sog. Depotbleis im Knochen überhaupt anzustreben sei, positiv beantwortet. Es kann somit zunächst angenommen werden, daß der therapeutische Wert eines Chelatbildners in erster Linie durch die Menge des zur Ausscheidung gebrachten Bleis bestimmt wird. Die Schlußfolgerungen aus unserer Untersuchung liegen damit auf der Hand: Während die DTPA und weitere von uns untersuchte Substanzen gegenüber der ADTA, die klinisch bis jetzt noch fast allein zur Anwendung kommt, nur unwesentliche Vorteile bieten, stehen uns in der BADDS, MAIDA, evtl. auch dem Ester der HADTA wirksamere und z. T. erheblich wirksamere Substanzen zur Verfügung. Allerdings wäre eine geringere therapeutische Breite in Kauf zu nehmen. Am

vordringlichsten erscheint im Moment, die Untersuchungen mit besagten Chelatbildnern auf größere Säugetiere auszudehnen.

Zusammenfassung

Es wurde der Einfluß verschiedener Chelatbildner auf die Verteilung von Radioblei im Organismus der Ratte untersucht. Eine starke und allen anderen Substanzen (Äthylendiamintetraessigsäure, Diäthylentriaminpentaessigsäure und ein wasserlösliches Derivat des Dimercaptopropanol eingeschlossen) überlegene Wirkung, d.h. Reduktion der Bleiablagerung, zeigten 2:2'-Bis-[di-(carboxymethyl)-amino]-diäthyl-disulphid (BADDS) und 2-Mercaptoäthyliminodiessigsäure (MAIDA). Die quantitative Analyse der Ergebnisse macht es wahrscheinlich, daß dem BADDS im Organismus eine Sonderstellung zukommt, die im einzelnen diskutiert wird. Obwohl die Effektivität aller Chelatbildner bei später Verabreichung und bei isotopischer Verdünnung des Radiobleis generell abnimmt, ist die durch BADDS oder MAIDA auch unter diesen Bedingungen erzielte Dekorporation befriedigend hoch. Die therapeutische Breite beider Substanzen ist allerdings kleiner als bei den anderen untersuchten Polyaminosäuren.

Wir danken für Überlassung der Präparate den Firmen: Heyl & Co., Berlin (PA), E. Merck AG, Darmstadt (MP), Nordmark Werke, Hamburg (AAT). Die DMPS verdanken wir der Freundlichkeit des Radiologischen Instituts, Freiburg i. Br. Alle übrigen Substanzen wurden uns freundlicherweise von der J. R. Geigy AG, Basel, zur Verfügung gestellt. Für die gewissenhafte Durchführung der Versuche danken wir den Damen L. Braun, H. Reckert und I. Rösler.

Summary

The Influence of Chelate-forming Compounds on the Reactions of Lead in the Organism

Experiments have been carried out in rats to study the influence of various chelate-forming compounds on the distribution of radio-lead in the organism. 2:2'-Bis-[di-(carboxymethyl)-amino]-diethyl-disulphide (BADDS) and 2-mercaptoethyliminodiacetic acid (MEIDA) showed the most potent activity, resulting in reduced deposition of lead. These two compounds were found superior in effect to all other substances (including ethylenediamine-tetraacetic acid, diethylenetriaminepentaacetic acid, and a water-soluble derivative of diemercaptopropanol). Quantitative analysis of the results obtained indicates that BADDS occupies a specific position in the organism, which is made the subject of a detailed discussion. The activity of all chelate-forming compounds generally decreases under conditions of application at a late stage and isotopic dilution of radio-lead. The de-corporating effects of BADDS and MEIDA remain satisfactory even

under these conditions. The therapeutic range of both substances is inferior to that of the other polyamino acids tested.

Literatur

- [1] Anderegg, G., Nägeli, P., Müller, F. u. Schwarzenbach, G., *Helv. Chim. Act.* **42**, 827 (1959)
- [2] Aposhian, H. V. u. Aposhian, M. M., *J. Pharm. exp. Ther.* **126**, 131 (1959)
- [3] Belknap, E. L., *Ind. Med. Surg.* **21**, 305 (1952)
- [4] Bessman, S. P., Ried, H. u. Rubin, M., *Med. Ann. Distr. Columbia* **21**, 512 (1952)
- [5] Boulding, J. E., McGill, M. D. u. Baker, R. A., *Lancet* **1957**, 985
- [6] Catsch, A., *Int. J. Appl. Rad. Isot.* **11**, 131 (1961)
- [7] Catsch, A., *Fed. Proc.* **20**, suppl. 10, 206 (1961)
- [8] Catsch, A. u. Lê, D. Kh., *Strahlentherapie* **104**, 494 (1957)
- [9] Catsch, A. u. Melchinger, H., *Strahlentherapie* **107**, 437 (1958)
- [10] Catsch, A. u. Schindewolf-Jordan, D., *Experientia* **17**, 205 (1961)
- [11] Catsch, A. u. Schindewolf-Jordan, D., *Nature* **191**, 715 (1961)
- [12] Catsch, A. u. Tocchini-Valentini, G. P., *Strahlentherapie* **116**, 426 (1961)
- [13] Cecil, R., *Biochem. J.* **45**, 572 (1950)
- [14] Chaberek, S. u. Martell, A. E., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1477 (1955)
- [15] Cretin, A., *Presse Méd.* **59**, 1240 (1951)
- [16] Durham, E. J. u. Ryskiewich, D. P., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 4812 (1958)
- [17] Eldjarn, L., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **2**, 202 (1950)
- [18] Eldjarn, L. u. Børresen, H. C., *Act. Physiol. Scand.* **50**, suppl. 175, 35 (1960)
- [19] Eldjarn, L., Bremer, J. u. Børresen, H. C., *Biochem. J.* **82**, 192 (1962)
- [20] Fischer, P., Goutier-Pirotte, M., *Arch. Int. Physiol.* **62**, 76 (1954)
- [21] Foreman, H., In: *Metal-Binding in Medicine*, p. 82, Philadelphia & Montreal 1960
- [22] Foreman, H., *Fed. Proc.* **20**, Suppl. 10, 191 (1961)
- [23] Fried, J. F. u. Schubert, J., *Rad. Res.* **15**, 227 (1961)
- [24] Fried, J. F., Schubert, J. u. Lindenbaum, A., *Arch. Ind. Health* **20**, 475 (1959)
- [25] Gilman, A., Philips, F. S., Koelle, E. S., Allen, R. P. u. John, E. S., *Am. J. Physiol.* **147**, 115 (1946)
- [26] Hagen, U. u. Blumenfeld, F., *Z. Naturforsch.* **11b**, 607 (1956)
- [27] Hammond, P. B. u. Aronson, A. L., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **88**, 498 (1960)
- [28] Harder, R. u. Chaberek, S., *J. Inorg. Nucl. Chem.* **11**, 197 (1959)
- [29] Hardy, H. L., *Fed. Proc.* **20**, suppl. 10, 199 (1961)
- [30] Heller, H.-J. u. Catsch, A., *Strahlentherapie* **109**, 464 (1959)
- [31] Kehoe, R. A., *Fed. Proc.* **20**, suppl. 10, 196 (1961)
- [32] Kuhn, R., Birkhöfer, L. u. Quackenbusch, F. W., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **72**, 407 (1939)
- [33] Lees, H. u. Kuyper, A. C., *J. Biol. Chem.* **225**, 641 (1957)
- [34] MacDonald, N. S., Nushbaum, R. E., Ezmirlan, F., Barbera, R. C., Spain, P. u. Rounds, D. E., *Arch. Biochem. Biophys.* **43**, 118 (1953)
- [35] Neuman, W. F., Frischein, H., Chen, P. S., Mulryan, B. J. u. DiStefano, V., *J. Amer. Chem. Soc.* **78**, 3863 (1956)
- [36] Neuman, W. F., Mulryan, B. J. u. Martin, G. R., *Clin. Orthopaed.* **17**, 124 (1960)
- [37] Nigrović, V., unveröffentlichte Befunde

- [38] Nordin, B. E. C., J. Biol. Chem. 227, 551 (1957)
- [39] Schubert, J. u. Fried, J. F., Nature 185, 551 (1960)
- [40] Schubert, J. u. White, M. R., J. Lab. Clin. Med. 39, 260 (1952)
- [41] Schwarzenbach, G., Anderegg, W., Schneider, W. u. Senn, H., Helv. Chim. Act. 38, 1147 (1955)
- [42] Schwarzenbach, G., Gut, R. u. Anderegg, G., Helv. Chim. Act. 37, 957 (1954)
- [43] Schwarzenbach, G., Senn, H. u. Anderegg, G., Helv. Chim. Act. 40, 1686 (1957)
- [44] Semenov, D. I. u. Tregubenko, I. P., Trud. Inst. Biol. Akad. Nauk SSSR, Ural Filial 9, 4 (1957)
- [45] Shapira, R., Doherty, D. G. u. Burnett, W. T., Rad. Res. 7, 22 (1957)
- [46] Tregubenko, I. P., Yashunsky, V. G. u. Semenov, D. I., Biokhimiya 26, 177 (1961)
- [47] Williams, R. T., Detoxication Mechanisms, London 1959
- [48] Wolf, P. M., Born, H. J. u. Catsch, A., Strahlentherapie 23, 509 (1943)

*Anschr. d. Verf.: Prof. Dr. A. Catsch, Institut für Strahlenbiologie,
Kernforschungszentrum, Karlsruhe, Postfach 947*

Verantwortlich für die Redaktion: Dr. W. Saenger. Verlag: Editio Cantor, Aulendorf i. Württ. Ruf: Aulendorf (07525) 431. — Druck: Vereinigte Buchdruckereien, August Sandmaier & Sohn, Buchau a. F.

Bezugsbedingungen: Die Zeitschrift erscheint monatlich einmal. Sie kann vom Verlag oder durch eine Buchhandlung bezogen werden. Der Bezugspreis beträgt im Abonnement pro Halbjahr (6 Hefte) 70,— DM einschl. Versandkosten. Das Einzelheft kostet 6,— DM einschließl. Versandkosten. Kostenlose Probehefte liefert der Verlag auf Anforderung.

Auslandsabonnements errechnen sich einschließlich Versand auf der Basis von 68,— DM pro Jahr.