

KFK-203

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM**  
**KARLSRUHE**

Dezember 1963

KFK 203

Institut für Strahlenbiologie  
Institut für Radiochemie

Dekorporation von Radionukliden  
(Untersuchungen an Radioruthenium)

Dietrich Seidel, Alexander Catsch, Karl-Heinz Schweer



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.  
KARLSRUHE

Aus dem Institut für Strahlenbiologie und dem Institut für Radiochemie,  
Kernforschungszentrum, Karlsruhe

## **Dekorporation von Radionukliden (Untersuchungen an Radoruthenium)**

Von

**Dietrich Seidel, Alexander Catsch und Karl-Heinz Schweer**

Mit 12 Abbildungen

Den Radioisotopen von Ruthenium  $^{106}\text{Ru}$  und  $^{103}\text{Ru}$  kommt im Hinblick auf ihre relativ niedrigen MZK und ihre hohe Ausbeute bei der Kernspaltung — der Anteil von  $^{106}\text{Ru}$ - $^{106}\text{Rh}$  an der Gesamtaktivität beträgt nach 2 Jahren rund 3,5% [21] — eine größere praktische Bedeutung zu. Ihre potentielle Gefährlichkeit spiegelt sich in der großen Zahl von Untersuchungen wider, die sich mit ihrem Verhalten und ihren Wirkungen im Säugetierorganismus befassen (vgl. Schrifttum bei [31]). Es ist deshalb überraschend, daß die Möglichkeiten der Dekorporation von Radoruthenium bisher nur von *Spode* und *Gensicke* [34] orientierend geprüft wurden; die Ergebnisse waren negativ, indem Äthylendiamintetraessigsäure, Grahamsalz und Trinatriumpolyphosphat (10 min nach  $^{106}\text{Ru}$  verabreicht) sich als praktisch unwirksam erwiesen. Das Fehlen eingehender Untersuchungen zu dieser Frage hängt sicherlich zu einem Teil damit zusammen, daß über das koordinations-chemische Verhalten des Ru-Ions noch sehr wenig bekannt ist (vgl. hierzu [3]). Aus diesem Grunde war es auch bei der vorliegenden Untersuchung angezeigt, eine größere Zahl von Chelatbildnern zu prüfen, die sich bezüglich Molekularkonfiguration, Zahl und Art der Ligandenatome stärker voneinander unterscheiden. Die Bedeutung dieser Faktoren für die Chelierungs- und Dekorporationseffektivität wurde in einer allgemeinen Form von *Catsch* [8, 9], *Catsch* und *Seidel* [11] und *Heller* [19] diskutiert.

### *In-vivo*-Untersuchungen

Als Versuchstiere dienten männliche Albinoratten des Heiligenberg-Inzuchtstammes im Alter von 9 bis 12 Wochen (mittleres Körpergewicht 153 g), denen  $\sim 3 \mu\text{Ci}$  trägerfreies  $^{106}\text{Ru}$  (III) in die Schwanzvene injiziert wurden. Das  $^{106}\text{Ru}$  lag als Chlorid oder Nitrosylnitrat (The Radiochemical Centre Amersham) vor; der pH der Lösungen wurde vor der Injektion auf 2 bis 3 eingestellt.

Da einige Ru-Verbindungen nach *Burykina* [7] und *Daily* et al. [13] flüchtig sind, nahmen wir von einer Veraschung der Proben Abstand und führten die Aktivitätsbestimmungen mittels eines KJ-(Tl)-Szintillationskristalls an unbehandelten Proben durch. Der Einfluß der Selbstabsorption und der nicht konstanten Geometrie ist ver-

nachlässigbar, da nur die relativ harte  $\gamma$ -Strahlung des Folgekörpers  $^{106}\text{Rh}$  registriert wird. Die in den Proben festgestellten Aktivitäten wurden in % der injizierten  $^{106}\text{Ru}$ -Menge ausgedrückt. Bezüglich weiterer Einzelheiten der Methodik und der statistischen Bearbeitung verweisen wir auf die ausführliche Darstellung bei Seidel [31].

Folgende Chelatbildner bzw. Verbindungen wurden getestet:

1. Äthylendiamintetraessigsäure (ÄDTA), 2. 2:2'-Bis-[di(carboxymethyl)amino]-diäthyläther (BADÄ), 3. 2:2'-Bis-[di(carboxymethyl)amino]diäthylsulfid (BADS), 4. 1:2-Bis-[di(carboxymethyl)aminoäthoxy]äthan (BAÄ), 5. 1:2-Bis-[di(carboxymethyl)aminoäthylthio]äthan (BATÄ), 6. Diäthylentriaminpentaessigsäure (DTPA), 7. Triäthylentetraaminhexaessigsäure (TTHA), 8. Cystamintetraessigsäure (CyTA), 9. 2:3-Dimerkaptopropionsäure (DMP), 10. 2:3-Dimerkaptopropan-sulfosäure-(1) (DMPS), 11. Äthylendiamin (en), 12. Triäthylentetraamin (trien), 13. Tetrakis-(2-aminoäthyl)endiamin (penten), 14. Thioharnstoff, 15. Rubeanwasserstoff, 16. Thiosemicarbazid, 17. Thiosalzylsäure, 18. Natriumdithionit, 19. 2:2'-Dipyridyl, 20. o-Phenanthrolin, 21. Grahams Salz, 22. Natriumtrimetaphosphat, 23. Natriumtripolyphosphat, 24. Zirconiumzitat (hergestellt nach der Vorschrift von Schubert [30]), 25. Polyvinylpyrrolidon mit einem mittleren MG = 12 600 (Periston N), 26. Thiogel A (SH-haltige Gelatine mit einem mittleren MG = 10 000) und 27. Diamox.

Die unter 1 bis 8 angeführten Polyaminopolycarboxylsäuren wurden teils als Natriumverbindungen, teils als Natrium-Kalzium-Chelate verabreicht.

Bei der Prüfung der vorstehend angeführten Substanzen erhielt jede einzelne Versuchsreihe eine eigene Kontrollgruppe, d. h. Tiere, denen nur  $^{106}\text{Ru}$  injiziert wurde. Die Kontrollwerte weisen eine gewisse Streuung auf, die aller Wahrscheinlichkeit nach mit der (bezüglich des Körpergewichts) heterogenen Zusammensetzung des Tiermaterials zusammenhängt: Der  $^{106}\text{Ru}$ -Gehalt des Blutes und der Muskulatur nimmt mit wachsendem Körpergewicht zu, während er in den übrigen Organen abnimmt. Andererseits ist diese Korrelation nicht groß genug, um ein Mitteln über alle Versuchsgruppen auszuschließen (Tab. 1). Die relativ gleichförmige Verteilung des  $^{106}\text{Ru}$  im Körper, wie sie die in Tabelle 1 zusammengestellten Daten zeigen, wurde auch von früheren Untersuchern [6, 18, 33, 35] festgestellt. Bemerkenswert ist die unterschiedliche Verteilung des  $^{106}\text{RuCl}_3$  und -Nitrosylnitrat. Bruce und Carr [5] fanden demgegenüber bei peroraler Applikation ein im wesentlichen identisches Verteilungsmuster beider Ru-Formen, während Buldakov [6] eine erheblich stärkere Ablagerung von  $^{106}\text{Ru}$ -Nitrosylpentachlorid in der Leber nachwies. Diese Diskrepanzen sind jedoch im Hinblick auf die Uneinheitlichkeit der Ru-Nitrosylverbindungen [4, 6] nicht überraschend.

Eine weitere Versuchsreihe sollte die zeitliche Abhängigkeit der  $^{106}\text{Ru}$ -Verteilung klären; eine Frage, die für die Dekorporationseffektivität von Chelatbildnern von ausschlaggebender Bedeutung ist.  $^{106}\text{RuCl}_3$  wurde entweder in Wasser oder (24 Std. vor der Injektion) in Rattenserum gelöst. Tabelle 2 zeigt, daß die

Tabelle 1.  $^{106}\text{Ru}$ -Gehalt der Organe am 2. Tag nach i.v. Injektion von  $^{106}\text{Ru}$ -Chlorid (74 Tiere) und  $^{106}\text{Ru}$ -Nitrosylnitrat (9 Tiere).

$^{106}\text{Ru}$ -Verbindung	% der $^{106}\text{Ru}$ -Dosis				
	Blut	Nieren	Leber	Skelett	Muskulatur
Chlorid	6,71	3,72	5,41	5,67	17,80
Nitrosylnitrat	3,53	2,79	2,17	7,66	7,13

Tabelle 2. Zeitliche Abhängigkeit der <sup>106</sup>Ru-Verteilung nach i.v. Injektion von <sup>106</sup>Ru-Chlorid, in Wasser (Cl<sub>3</sub>-W) oder Serum (Cl<sub>3</sub>-S) gelöst, und <sup>106</sup>Ru-Nitrosylnitrat (NN). Je 5 Ratten pro Punkt. s<sub>x</sub> = Standardfehler (in % der Mittelwerte).

Zeit	<sup>106</sup> Ru-Form	% der <sup>106</sup> Ru-Dosis				
		Blut	Nieren	Leber	Skelett	Muskulatur
10 Minuten	Cl <sub>3</sub> -W	42,6	2,66	4,03	6,25	34,7
	Cl <sub>3</sub> -S	70,8	6,76	6,14	8,50	8,31
	NN	26,9	5,31	3,94	8,45	21,4
20 Minuten	Cl <sub>3</sub> -W	39,8	2,69	4,56	5,96	25,2
	Cl <sub>3</sub> -S	74,1	5,69	6,91	6,22	11,0
	NN	22,9	6,25	4,36	10,8	16,1
1 Stunde	Cl <sub>3</sub> -W	35,5	2,32	4,56	6,35	23,0
	Cl <sub>3</sub> -S	61,6	5,99	6,30	8,70	9,46
	NN	13,8	5,16	3,65	12,1	13,8
2 Stunden	Cl <sub>3</sub> -W	31,6	2,60	4,56	6,35	19,0
	Cl <sub>3</sub> -S	49,0	5,58	6,20	5,44	9,47
	NN	12,9	5,29	3,35	12,0	12,9
4 Stunden	Cl <sub>3</sub> -W	25,7	3,06	4,47	6,35	25,7
	Cl <sub>3</sub> -S	42,6	4,62	5,94	4,90	8,59
	NN	11,8	4,56	3,18	11,0	11,2
6 Stunden	Cl <sub>3</sub> -W	19,5	2,67	4,76	6,20	25,3
	Cl <sub>3</sub> -S	36,3	3,02	6,85	6,66	9,18
	NN	9,12	4,26	3,43	11,5	12,4
1 Tag	Cl <sub>3</sub> -W	11,5	2,64	4,55	5,76	21,5
	Cl <sub>3</sub> -S	17,0	3,16	7,17	6,35	11,2
	NN	6,04	3,35	2,86	8,85	8,41
2 Tage	Cl <sub>3</sub> -W	6,45	3,91	5,55	5,89	21,7
	Cl <sub>3</sub> -S	11,0	3,41	7,31	5,13	9,48
	NN	4,32	3,17	2,47	9,11	7,95
4 Tage	Cl <sub>3</sub> -W	3,27	3,86	4,84	4,67	20,0
	Cl <sub>3</sub> -S	4,73	3,52	6,91	4,30	7,77
	NN	2,56	2,50	2,28	7,53	7,06
8 Tage	Cl <sub>3</sub> -W	1,47	3,50	3,26	3,94	13,4
	Cl <sub>3</sub> -S	1,49	3,02	4,41	3,40	6,31
	NN	1,05	1,90	1,04	7,64	4,71
16 Tage	Cl <sub>3</sub> -W	0,57	2,92	1,92	3,54	13,9
	Cl <sub>3</sub> -S	0,33	2,05	2,33	2,62	3,98
	NN	0,68	1,17	0,57	6,21	3,93
s <sub>x</sub>	Cl <sub>3</sub> -W	18	5	6	4	3
	Cl <sub>3</sub> -S	6	6	5	8	6
	NN	5	4	8	4	5

unterschiedliche Verteilung beider <sup>106</sup>Ru-Formen während der ganzen Versuchsdauer erhalten bleibt. Bemerkenswert groß ist im Fall des <sup>106</sup>RuCl<sub>3</sub> der Einfluß des Lösungsmediums. Die zeitliche Abnahme des <sup>106</sup>Ru-Gehalts im Blutplasma (für welches ein Hämatokritwert von 55% festgestellt wurde) ist in Abbildung 1

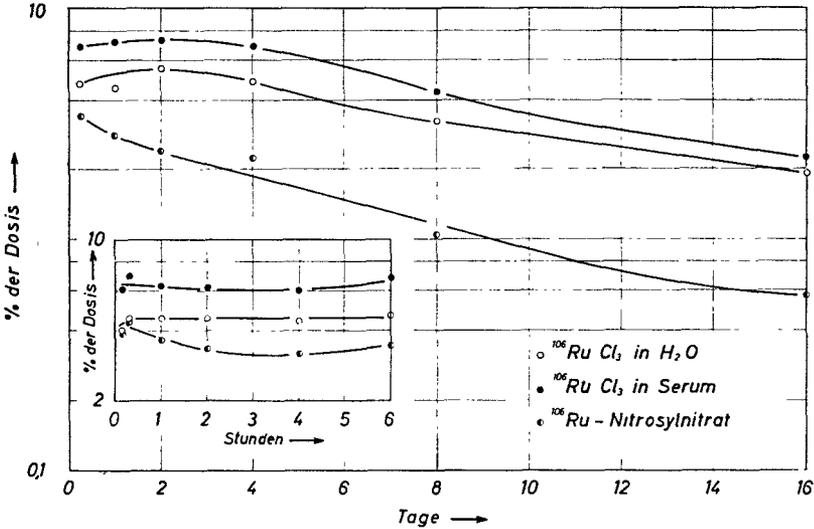


Abb. 1. Zeitliche Abnahme des  $^{106}\text{Ru}$ -Gehalts im Blutplasma.

wiedergegeben. Der Vergleich der in Tabelle 2 und Abbildung 1 angeführten Werte läßt erkennen, daß die überwiegende Menge des  $^{106}\text{Ru}$  sich im Blutplasma befindet. Die graphische Zerlegung der multiexponentiellen Clearancekurven ergibt vier Fraktionen, über deren prozentualen Anteil und HWZ Tabelle 3 orientiert. Im Falle der  $^{106}\text{RuCl}_3$ -Lösung in Serum überwiegen im Vergleich zur wäßrigen Lösung die „langsamen“ Fraktionen, während bei  $^{106}\text{Ru}$ -Nitrosylnitrat die „schnelle“ Fraktion zunimmt.

Die Wirksamkeit der Chelatbildner unter *optimalen* Bedingungen, d. h. bei gleichzeitiger intravenöser Applikation mit  $^{106}\text{Ru}$ , ist der Zusammenstellung in Tabelle 4 zu entnehmen. Wenn einige der eingangs aufgezählten Substanzen hierbei fehlen, so bedeutet dies, daß ein gesicherter Einfluß dieser Chelatbildner auf die  $^{106}\text{Ru}$ -Verteilung vermißt wurde. Das Wirkungsmuster der effektiven Substanzen ist unterschiedlich: Während DTPA, TTHA, BADS und trien die Retention von  $^{106}\text{Ru}$  in annähernd gleichem Maße in allen Organen senken, bewirken Thioalazylsäure, Thiogel, Zr-citrat, en und insbesondere Dithionit eine über den Kontrollwert hinausgehende Ablagerung in der Leber. Dithionit ist bekanntlich ein sehr starkes Reduktionsmittel, und es liegt deshalb nahe, die erhöhte Ablagerung in der Leber auf die Reduktion des Chlorids zu metallischem Ru und ein Abfangen entsprechender kolloidaler Partikel durch das RES zurückzuführen. Auch im Falle des Thiogels und Zr-citrats dürfte der

Tabelle 3. Prozentualer Anteil und Halbwertszeit der vier Glieder der multiexponentiellen Plasmaclearance von  $^{106}\text{Ru}$ . Abkürzungen vgl. Tabelle 2.

$^{106}\text{Ru}$ -Form	%	HWZ	%	HWZ	%	HWZ	%	HWZ
$\text{Cl}_3$ -W	57	< 1'	21	1,2 h	15	13,3 h	7	60 h
$\text{Cl}_3$ -S	33	< 1'	26	2,3 h	28	13,5 h	14	65 h
NN	88	< 1'	6	3,0 h	2	27 h	4	62 h

Tabelle 4.  $^{106}\text{Ru}$ -Gehalt der Organe am 2. Tag nach gleichzeitiger i.v. Injektion von  $^{106}\text{RuCl}_3$  und verschiedenen Chelatbildnern. Der  $^{106}\text{Ru}$ -Gehalt ist in % der jeweiligen Kontrolle (Mutungsbereich für  $P = 0,05$ ) ausgedrückt. Je 5 Tiere pro Gruppe.

Chelatbildner $\mu\text{M}/\text{Tier}$	% der Kontrolle				
	Blut	Nieren	Leber	Skelett	Muskulatur
50 $\text{Na}_2\text{Ca-BAD}\ddot{\text{A}}$	56 — 98	65 — 76	56 — 81	85 — 106	85 — 170
50 $\text{Na}_2\text{Ca-BADS}$	50 — 87	54 — 62	42 — 62	71 — 88	60 — 120
50 $\text{Na}_3\text{Ca-DTPA}$	7,6— 13,2	14,1— 16,8	10,8— 15,3	24 — 30	10,4 — 26
50 $\text{Na}_2\text{-BAT}\ddot{\text{A}}$	1,2— 2,1	8,0— 10,4	3,7— 5,0	63 — 86	0,65— 1,5
50 $\text{Na}_4\text{Ca-TTHA}$	42 — 72	51 — 59	48 — 69	57 — 71	44 — 88
25 $\text{Na}_2\text{Ca-CyTA}$	59 — 102	59 — 68	51 — 74	81 — 101	78 — 155
40 DMP	29 — 67	140 — 173	30 — 44	32 — 39	23 — 45
40 DMPS	8,1— 18,9	239 — 297	23 — 34	55 — 67	10,0 — 19,0
50 en	3,8— 6,3	37 — 45	470 — 656	130 — 178	5,8 — 9,1
25 trien	11,7— 20	41 — 47	42 — 60	20 — 26	9,1 — 18,2
25 Rubeanwasserstoff	43 — 64	98 — 135	49 — 64	65 — 84	27 — 46
50 Dithionit	25 — 41	141 — 175	938 — 1300	108 — 149	13 — 22
50 Thiosalizylsäure	27 — 43	95 — 127	362 — 466	29 — 37	16,6 — 28
6,25 mg Thiogel	26 — 46	46 — 53	174 — 250	66 — 82	35 — 69
1,25 mg Thiogel	76 — 124	113 — 157	143 — 228	84 — 108	45 — 102

höhere  $^{106}\text{Ru}$ -Gehalt der Leber durch die Kolloidalität dieser Präparate bedingt sein, während die Frage, ob Thiosalizylsäure und en von der Leber zurückgehalten und/oder abgebaut werden, noch offen ist. Desgleichen kann auch für die erhöhte  $^{106}\text{Ru}$ -Ablagerung in den Nieren unter dem Einfluß von DMP und DMPS noch keine begründete Erklärung gegeben werden; es sei hier jedoch erwähnt, daß beide (und andere) SH-haltige Substanzen durch eine auffallend hohe Nephrotoxizität gekennzeichnet sind. Hervorzuheben ist schließlich, daß  $\text{BAT}\ddot{\text{A}}$  eine auffallend geringe Skeletteffektivität zeigt, während es in den übrigen Organen allen anderen Chelatbildnern überlegen ist.

Das  $^{106}\text{Ru-BAT}\ddot{\text{A}}$ -Chelat wird vorwiegend mit dem Urin während der ersten 24 Stunden ausgeschieden (Abb. 2).

Wird die  $^{106}\text{Ru-BAT}\ddot{\text{A}}$ -Lösung bereits 24 Stunden vor der Injektion hergestellt, so resultiert eine gesichert stärkere Herabsetzung der  $^{106}\text{Ru}$ -Ablagerung,

Tabelle 5.  $^{106}\text{Ru}$ -Gehalt der Organe am 2. Tag nach gleichzeitiger i.v. Injektion von  $^{106}\text{RuCl}_3$  und  $50 \mu\text{M Na}_2\text{-BAT}\ddot{\text{A}}$ . Die Injektion erfolgte in Versuch A 10 min nach Herstellung der  $^{106}\text{Ru-BAT}\ddot{\text{A}}$ -Lösung, in Versuch B nach 24 Std. Je 5 Tiere pro Gruppe.

Gruppe	% der $^{106}\text{Ru}$ -Dosis				
	Blut	Nieren	Leber	Skelett	Muskulatur
A	0,067	1,41	0,79	2,72	0,14
B	0,010	0,57	0,25	0,72	0,020
$\bar{s}$	0,0046	0,028	0,083	0,088	0,014
P	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

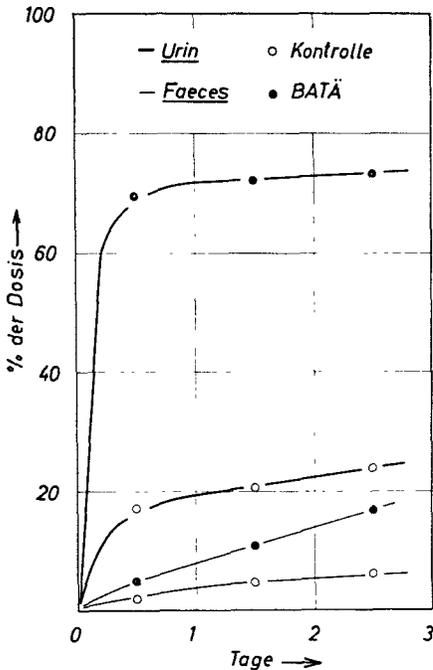


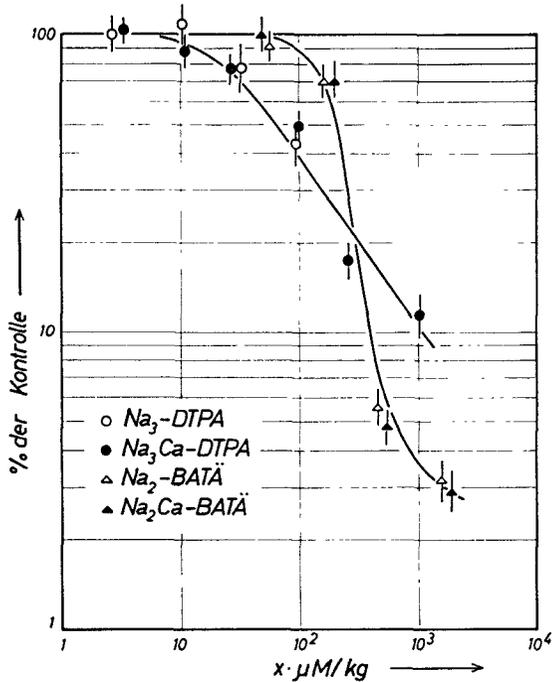
Abb. 2. Kumulative Ausscheidung von  $^{106}\text{RuCl}_3$  und  $^{106}\text{Ru-BATÄ}$ . Je 3 Tiere.

als wenn die Herstellung der Lösung (wie auch in den vorangehenden Versuchen) kurzfristig vorher erfolgt (Tab. 5).

Im Hinblick auf das unterschiedliche Wirkungsmuster des BATÄ einerseits und der DTPA andererseits war es interessant, die Dosisabhängigkeit ihrer Effektivität zu untersuchen. Auf eine vollständige Wiedergabe der Ergebnisse wird verzichtet (vgl. [31]), und es werden nur die Dosiseffekturven für das Skelett und (als repräsentatives Beispiel für das Verhalten der anderen Organe) die Leber angeführt (Abb. 3 u. 4). Ein Unterschied in der Wirksamkeit der Ca-Chelate und der Na-Verbindungen, wie er sich angedeutet für ÄDTA in den Untersuchungen von *Spode* und *Gensicke* [34] findet, liegt offensichtlich nicht vor. Bei der Darstellung in den Abbildungen 3 und 4 wurden die tatsächlich injizierten BATÄ-Dosen mit dem Faktor  $x = 6$  multipliziert, und zwar aus dem Grunde, weil die später zu besprechenden in-vitro-Untersuchungen eine etwa 6mal höhere Effektivität des BATÄ ergaben und weil die Effektivität beider Chelatbildner, entsprechend der theoretischen Erwartung, durch eine *einzig* Dosiseffekturkurve wiedergegeben werden kann. Bei den in-vivo-Untersuchungen ist dies jedoch offensichtlich nicht möglich. BATÄ verhält sich insofern andersartig, als die Skeletteffektivität im höheren Dosisbereich trotz wachsender Dosis abnimmt. Eine Abflachung der Kurve wird auch im Falle der Leber deutlich. Besagte Abweichungen von einem linearen Verlauf sind mit  $P < 0,001$  bzw.  $0,01 > P > 0,001$  statistisch gesichert.

Die Wirksamkeit des BATÄ im Falle von  $^{106}\text{Ru-Nitrosylnitrat}$  ist deutlich schwächer als beim  $^{106}\text{RuCl}_3$ , allerdings mit Ausnahme des Skeletts (Abb. 5).

Abb. 3.  $^{106}\text{Ru}$ -Gehalt der Leber (in % der Kontrolle) am 2. Tag nach gleichzeitiger i.v. Injektion von  $^{106}\text{RuCl}_3$  und verschiedenen DTPA- und BATÄ-Dosen. Die BATÄ-Dosen sind mit 6 multipliziert (vgl. hierzu Text). Mutungsbe- reiche für  $P = 0,05$ . Je 5 Tiere.



Im Hinblick auf das abweichende Wirkungsmuster des BATÄ war es ange- zeigt, die Verteilung des  $^{35}\text{S}$ -markierten BATÄ im Organismus zu prüfen.

Bei der Synthese gingen wir vom  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  aus, das als  $\text{Ba}^{35}\text{SO}_4$  gefällt und mit CO bei 900 bis 1000° C zu  $\text{Ba}^{35}\text{S}$  reduziert wurde [15].  $\text{Ba}^{35}\text{S}$  wurde nach Markova et al. [25] in Thioharnstoff- $^{35}\text{S}$  überführt und hieraus Äthylendithiol- $^{35}\text{S}$  nach Speziale [32] dargestellt. Nach dem von Schläpfer [27] angegebenen Verfahren erfolgte aus dem Äthylendithiol- $^{35}\text{S}$  über das 1,8-Bis-phtalimido-3,6-dithia- $^{35}\text{S}$ -oktan die Herstellung des 1,8-Diamino-3,6-dithia- $^{35}\text{S}$ -oktandihydrochlorids, das mit Chloressigsäure zu BATÄ- $^{35}\text{S}$  umgesetzt wurde. Die spezifische Aktivität betrug nach Umkristallisieren aus Wasser 73  $\mu\text{Ci/mM}$ .

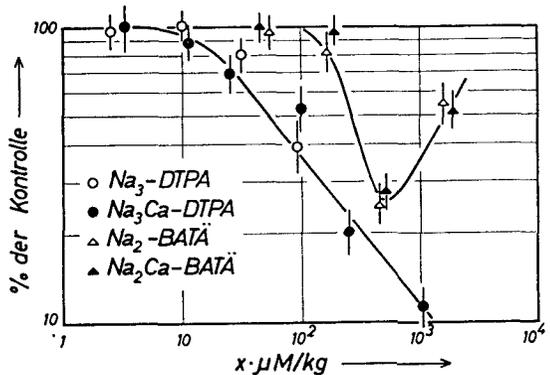


Abb. 4.  $^{106}\text{Ru}$ -Gehalt des Skeletts (in % der Kontrolle) am 2. Tag nach gleichzeitiger i.v. Injektion von  $^{106}\text{RuCl}_3$  und verschiedenen DTPA- und BATÄ-Dosen. Die BATÄ-Dosen sind mit 6 multipliziert (vgl. hierzu Text). Mutungsbereiche für  $P = 0,05$ . Je 5 Tiere.

Tabelle 6.  $^{35}\text{S}$ -Gehalt der Organe nach i.v. Injektion von  $100\ \mu\text{M Na}_2\text{-BATÄ-}^{35}\text{S}$ .  
Je 3 Tiere.

Stunden	% der $^{35}\text{S}$ -Dosis		
	Nieren	Leber	Skelett
2	0,68	1,57	0,45
6	—	0,76	0,39
24	—	0,30	0,29
48	0,18	0,43	0,27

Für die Bestimmung der  $^{35}\text{S}$ -Aktivität wurden die Proben nach dem von *Kalberer und Rutschmann* [22] verbesserten *Schöningerschen* Verfahren im Sauerstoffkolben verbrannt;  $^{35}\text{SO}_2$  bzw.  $^{35}\text{SO}_3$  wurden in einer Lösung von Äthanolamin in Methanol absorbiert und im Flüssigszintillator unter Zusatz von PPO + POPOP in Toluol gemessen. Die Zählausbeute betrug, wie der Vergleich von  $4\pi$ -geeichten Standardpräparaten zeigte, rund 35%. Die Aktivität des bei der Knochenverbrennung anfallenden und mit einem Endfensterzählrohr gemessenen Rückstandes war vernachlässigbar.

Die nach i.v. Injektion von  $100\ \mu\text{M Na}_2\text{-BATÄ-}^{35}\text{S}$  in den Organen gefundenen Aktivitäten sind in Tabelle 6 zusammengestellt; sie sind mit den von *Foreman* [17] für  $^{14}\text{C}$ -markierte EDTA und DTPA gefundenen Werte im wesentlichen identisch, so daß kein zwingender Grund besteht, ein exceptionelles metabolisches Verhalten des BATÄ anzunehmen.

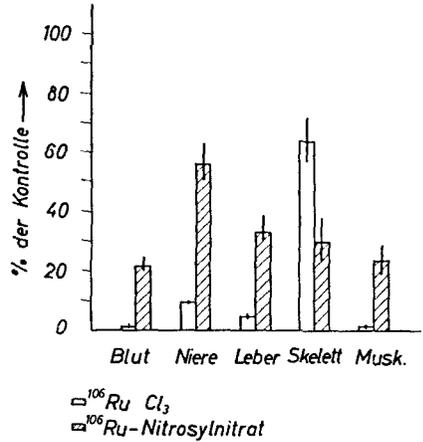
Wird BATÄ intraperitoneal und unmittelbar im Anschluß an die intravenöse Injektion von  $^{106}\text{Ru}$  appliziert, ist die Wirksamkeit praktisch aufgehoben (Tab. 7); dies trifft auch für DTPA und alle anderen, in der Tabelle nicht eigens angeführten Substanzen zu. Bei wiederholter Verabreichung von BATÄ resultiert ebenfalls ein nur geringfügiger Dekorporationseffekt, und auch nur dann, wenn mit der Applikation 10 min nach Injektion von  $^{106}\text{Ru}$  begonnen wird, während zu späteren Zeitpunkten ein gesicherter Effekt vermißt wird. Daß BATÄ bei zeitlich getrennter Verabreichung absolut unwirksam ist, konnte auch durch eine empfindlichere Versuchsanordnung, d. h. durch Untersuchung der  $^{106}\text{Ru}$ -Ausscheidung mit Urin und Fäzes, bestätigt werden (Abb. 6).

$^{106}\text{Ru}$  wird bevorzugt mit dem Urin ausgeschieden; wenn auch über den renalen Ausscheidungsmechanismus noch nichts bekannt ist, war es nicht uninteressant, die Wirksamkeit des diuretisch wirksamen Diamox zu prüfen, und zwar bei einer Dosierung und Applikationsart, für die eine gesicherte Intensivierung der

Tabelle 7.  $^{106}\text{Ru}$ -Gehalt der Organe nach i.v. Injektion von  $^{106}\text{RuCl}_3$  und nachträglicher i.p. Verabreichung von  $\text{Na}_2\text{-BATÄ}$ . Der  $^{106}\text{Ru}$ -Gehalt der Organe ist in % der jeweiligen Kontrolle (Mutungsbereich für  $P = 0,05$ ) angegeben. N = Anzahl der Tiere.

$\mu\text{M/Tier}$	N	% der Kontrolle			
		Blut	Nieren	Leber	Skelett
100 nach 1 min	10	61 – 104	77 – 99	77 – 105	83 – 103
je 50 nach 10, 40, 70, 100, 130 und 160 min	20	45 – 106	73 – 96	62 – 113	78 – 141
dto., aber erst nach 72 Std.	20	64 – 147	86 – 114	72 – 130	70 – 135

Abb. 5.  $^{106}\text{Ru}$ -Gehalt der Organe (in % der Kontrolle) am 2. Tag nach gleichzeitiger i.v. Injektion von  $^{106}\text{RuCl}_3$  bzw.  $^{106}\text{Ru}$ -Nitrosylnitrat und  $50 \mu\text{M Na}_2\text{-BATA}$ . Mutungsbereiche für  $P=0,05$ . Je 5 Tiere.



$^{137}\text{Cs}$ -Ausscheidung durch *Richmond* und *Furchner* [26] nachgewiesen wurde. Tabelle 8 zeigt, daß Diamox im Falle von  $^{106}\text{Ru}$  absolut unwirksam ist.

Tabelle 8.  $^{106}\text{Ru}$ -Gehalt der Organe am 10. Tag nach i.v. Injektion von  $^{106}\text{RuCl}_3$ . Die Tiere erhielten 1 Tag vor der  $^{106}\text{Ru}$ -Injektion bis zur Sektion mit dem Trinkwasser Diamox (0,15 mg/ml). Je 9 Tiere.

Gruppe	% der $^{106}\text{Ru}$ -Dosis				
	Blut	Nieren	Leber	Skelett	Muskulatur
Kontrolle	7,8	2,90	2,13	4,71	10,3
Diamox	0,67	3,04	2,68	5,17	7,8
P	< 0,001	0,7 - 0,6	0,5 - 0,4	0,4 - 0,3	0,4 - 0,3

*In-vitro-Untersuchungen*

Die überaus langsame Plasmaclearance des  $^{106}\text{Ru}$  (Abb. 1) läßt eine Bindung des  $^{106}\text{Ru}$  durch eine oder mehrere Plasmaproteinfraktionen vermuten. Zur Klärung dieser Frage wurden unter Heranziehung einiger Chelatbildner elektrophoretische Untersuchungen durchgeführt.

Rattenserum wurde durch Zentrifugation (20 min bei 5000 U/min) von aus der V. cava inf. aspiriertem Blut gewonnen. Da der Zusatz von  $^{106}\text{Ru}$ -Nitrosylnitrat zu einer Koagulation des Serums führt, blieben die Untersuchungen auf  $^{106}\text{RuCl}_3$  beschränkt, das uns in zwei Chargen (I u. II) zur Verfügung stand. 0,05 ml der  $^{106}\text{Ru}$ -Lösung ( $\sim 1 \mu\text{e}$ ) wurde 1 ml Serum zugesetzt. Die Konzentration der Chelatbildner war, wenn nicht anders angegeben, 0,1 molar. Zur elektrophoretischen Trennung, mit der (mit Ausnahme eines speziellen Versuchs) wenige Minuten nach Herstellung der Lösungen begonnen wurde, verwendeten wir Zellulose-Azetat-Membranfolien (Schleicher & Schüll); die Laufzeit betrug 4 Std. bei 0,6 mA  $\text{cm}^{-2}$ , pH 7,4 (0,03 molarer Barbitol-Natrium-Puffer nach *Michaelis*). Die Folien wurden zuerst radiometrisch (zwei Endfensterzählrohre, Blendenweite 1,5 mm) ausgewertet, und anschließend nach Anfärbung mit Amidoschwarz 10 B die Extinktion bestimmt. Jeder Versuchspunkt wurde mehrfach belegt, wobei sich in der Regel eine befriedigende Reproduzierbarkeit ergab.

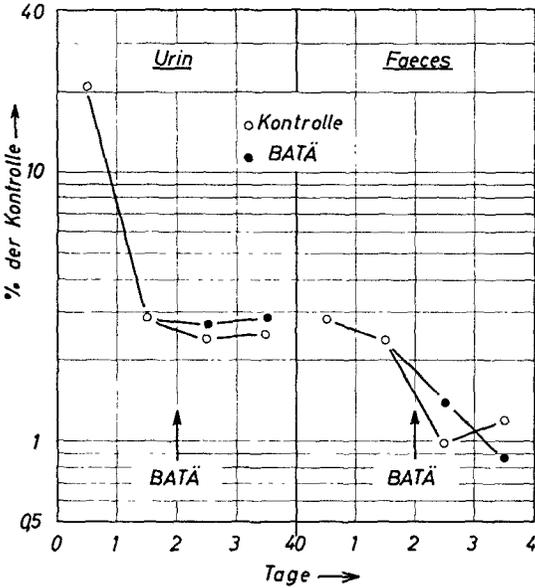


Abb. 6. Einfluß von 300  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{BATÁ}$ , in 6 Fraktionen 48 Stunden nach der i.v. Injektion von  $^{106}\text{RuCl}_3$  i.p. verabreicht, auf die Ausscheidung von  $^{106}\text{Ru}$ . Je 3 Tiere.

Abbildung 7 gibt das Verhalten beider  $^{106}\text{Ru}$ -Chargen in wäßriger Lösung wieder. Eine kationische Fraktion wird, wie auch in allen späteren Versuchen, vermißt. Bei der immobilen Fraktion dürfte es sich um radiokolloidales  $^{106}\text{Ru}$  und/oder die nichtionisierten Hydratisomeren  $\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_3$  und  $\text{RuCl}_2(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}$  handeln, auf deren Existenz Dwyer und Backhouse [14] hinweisen. Die Tendenz von  $\text{Ru}(\text{III})$  zur Bildung der Chlorokomplexe  $[\text{RuCl}_6]^{3-}$ ,  $[\text{RuCl}_5(\text{OH})]^{2-}$  [14] dürfte für den verwaschenen anionischen Peak verantwortlich sein, wobei der prozentuale Anteil dieser Fraktion bei Charge II deutlich größer ist.

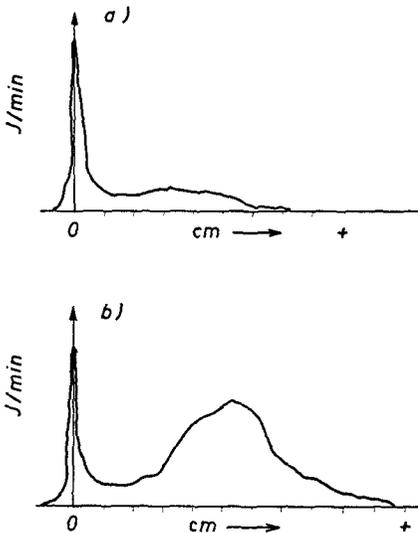
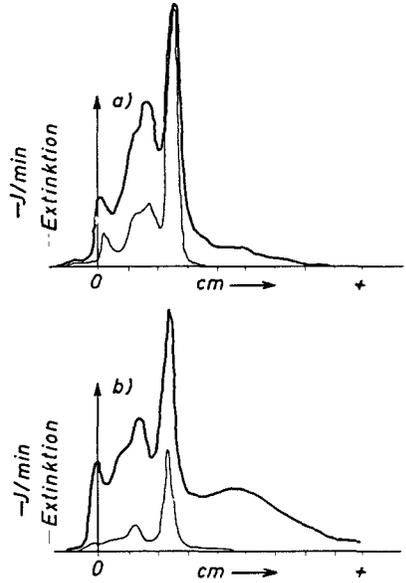


Abb. 7. Elektrophoretisches Verhalten von  $^{106}\text{RuCl}_3$  in wäßriger Lösung. a: Charge I, b: Charge II.

Abb. 8. Elektrophoretisches Verhalten von  $^{106}\text{RuCl}_3$  in Serum. a: Charge I. b: Charge II.



$^{106}\text{Ru}$  wird von allen Proteinfraktionen des Serums gebunden (Abb. 8). Da ein bestimmter Anteil des  $^{106}\text{Ru}$  als anionischer und von den Proteinen nicht gebundener Peak vorliegt, der sich mit den Proteinpeaks überlappt, ist eine exakte Auswertung des Pherogramms nicht möglich, und die Frage, ob eine stärkere Affinität des  $^{106}\text{Ru}$  zu einem bestimmten Protein vorliegt, muß offen bleiben.

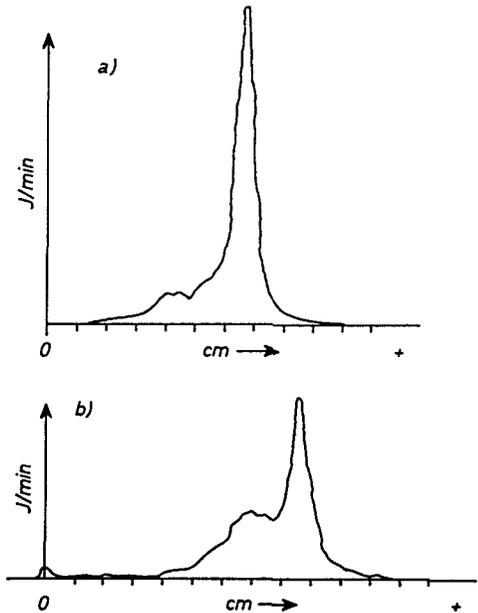


Abb. 9. Elektrophoretisches Verhalten von  $^{106}\text{RuCl}_3$  in einer wäßrigen  $\text{Na}_2\text{-BATÄ}$ -Lösung. a: Charge I, b: Charge II.

Gerade wiedergeben (Abb. 12). Dies bedeutet, daß DTPA 100mal wirksamer als ÄDTA und BATÄ 6mal wirksamer als DTPA ist.

### Diskussion

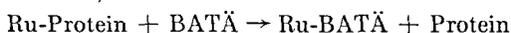
Die elektrophoretischen Untersuchungen bestätigen in vollem Umfang die beiden wesentlichsten Ergebnisse der in-vivo-Versuche: Einmal die Effektivitätsunterschiede in der Reihenfolge  $BAT\ddot{A} > DTPA > \ddot{A}DTA$  und zweitens die auffallend stark ausgeprägte Zeitabhängigkeit der Chelatwirksamkeit.

Allgemein wird für Ru(III) eine Koordinationszahl von 6 angenommen [12], doch kann im Hinblick auf den großen Ionenradius des Ru(III) auch die Betätigung der höheren Koordinationszahl 8 nicht ausgeschlossen werden [19]; die besonders hohe Wirksamkeit der Szähligen DTPA und BATÄ spricht zugunsten dieser Annahme. Die Effektivität der Chelatbildner sollte nach *Heller* und *Catsch* [20] unter anderem dem Verhältnis der Chelatstabilitätskonstanten für Ru(III) und Ca(II), d. h.  $K_{RuL}^{Ru} / K_{CaL}^{Ca}$ , proportional sein. Nach den in Abbildung 12 wiedergegebenen Resultaten der in-vitro-Versuche ist das besagte Konstantenverhältnis im Falle des BATÄ um rund eine Zehnerpotenz größer als bei DTPA. Da nun die  $K_{CaL}^{Ca}$  des BATÄ  $10^{4,32}$  [29] und der DTPA  $10^{10,89}$  [1] betragen, ist zu folgern, daß die  $K_{RuL}^{Ru}$  des BATÄ kleiner als die der DTPA ist und daß die höhere biologische Dekorporationseffektivität des BATÄ durch seine relativ niedrige Affinität zu Ca(II) bedingt wird.

Wie von *Heller* und *Catsch* [20] begründet wird, sollte die biologische Wirksamkeit verschiedener Chelatbildner sowie verschiedener Dosen eines gegebenen Chelatbildners durch eine gemeinsame Kurve wiedergegeben werden können. Diese Forderung ist jedoch nur in den in-vitro-Versuchen erfüllt (Abb. 12), während es bei den in-vivo-Versuchen nicht gelingt, die experimentellen Punkte durch eine gemeinsame Ausgleichskurve wiederzugeben (Abb. 3 u. 4). Im Hinblick auf den (entgegen der theoretischen Erwartung) nichtlinearen Verlauf der Dosiseffektkurven kann kein Zweifel bestehen, daß BATÄ sich anomal verhält. Da das  $Na_2Ca$ -Chelat des BATÄ im Gegensatz zu anderen Polyaminopolycarboxylsäuren bei  $pH \geq 6$  schwer wasserlöslich ist [10, 31], war zu überlegen, ob dies nicht auch den für den nichtlinearen Verlauf der Kurven und insbesondere für das paradoxe Verhalten der Skeletteffektivität verantwortlichen Faktor darstellt. Es müßte dann postuliert werden, daß es in vivo, insbesondere in einem Milieu mit hoher Ca-Konzentration wie im Knochen, zu einer Präzipitation des BATÄ kommt, was seinerseits durch Verminderung der effektiven Chelatkonzentration und/oder durch Kopräzipitation des  $^{106}Ru$  zu einem Effektivitätsverlust führen sollte. Diese Annahme kann jedoch durch die Ergebnisse mit dem  $^{35}S$ -markierten BATÄ ausgeschlossen werden, da die BATÄ-Konzentrationen weder in der Leber noch im Skelett im Vergleich zu denen von  $^{14}C$ -markierter DTPA [17] erhöht sind (Tab. 6). Außerdem zeigt BATÄ bei anderen Radiometallen, wie  $^{210}Pb$  [10] und  $^{60}Co$  [23], sowie bei  $^{106}Ru$ -Nitrosylnitrat (vgl. Abb. 5) eine durchaus normale Skeletteffektivität, so daß es sich nur um ein für  $RuCl_3$  gültiges Phänomen zu handeln scheint. Eine begründete Erklärung hierfür kann im Moment noch nicht gegeben werden.

Die Abnahme der Dekorporationseffektivität von Chelatbildnern mit größer werdendem Zeitintervall zwischen Inkorporation des Radiometalls und Verabreichung des Chelatbildners wird allgemein darauf zurückgeführt, daß mit

fortschreitender Zeit die Bindung des Radiometalls durch wirksame endogene Liganden an Bedeutung gewinnt [8, 9, 20]. Der im Vergleich zu anderen bisher untersuchten Radiometallen extrem stark ausgeprägte Einfluß des Zeitfaktors im Falle von  $^{106}\text{Ru}$  und insbesondere die in-vitro-Ergebnisse (Abb. 10) verlangen jedoch nach einer anderen Erklärung. Die Stabilität des Ru-BATÄ ist offenbar größer als die der Ru-Proteinkomplexe. Wenn es bei *nachträglicher* Zugabe von BATÄ trotzdem zu keiner nennenswerten Bindung des Ru kommt, so kann es nur bedeuten, daß die Austauschreaktion



überaus träge verläuft. Es lägen somit Verhältnisse vor, wie sie in der Koordinations-Chemie mit dem Begriff der sogenannten *robusten* Komplexe [28] gekennzeichnet werden. Diese Annahme ist um so berechtigter, als die Kationen der Platinmetalle bekanntlich in besonderem Maße zur Bildung solcher nur träge austauschender Assoziate tendieren.

Einige der experimentellen Befunde weisen darauf hin, daß auch die *Bildung* der Ru-Komplexe mit einer meßbaren Geschwindigkeit verläuft. Dies betrifft sowohl die Bildung des BATÄ-Chelats (vgl. Tab. 5) als auch die der Proteinkomplexe (vgl. Abb. 1 u. Tab. 2). Die Geschwindigkeit der Komplexbildung ist offensichtlich jedoch erheblich größer als die der *Austauschreaktion*, wie ebenfalls in Übereinstimmung mit den Erfahrungen der Koordinations-Chemie steht [2, 24]. Die im Vergleich zum Chlorid schnellere Plasmaclearance des  $^{106}\text{Ru}$ -Nitrosylnitrats und seine geringere Beeinflussbarkeit durch Chelatbildner lassen sich befriedigend damit erklären, daß die Austauschreaktion des Nitrosylnitratkomplexes mit endogenen oder exogenen Liganden langsamer als beim Chlorid verläuft.

Die aus unseren Untersuchungen sich ergebenden praktischen Konsequenzen liegen auf der Hand: Die selbst unter optimalen Bedingungen (d. h. bei einer unmittelbar auf die Inkorporation folgenden Verabreichung) verschwindend geringe Effektivität von Chelatbildnern läßt das Problem der Behandlung einer Radioruthenium-Inkorporation nach wie vor ungelöst.

#### Zusammenfassung

Das Verhalten von trägerfreiem  $^{106}\text{Ru}$  im Organismus der Ratte ist durch eine relativ gleichförmige Verteilung über die Organe und Gewebe, durch eine Bindung an alle Proteinfractionen des Blutplasmas sowie eine langsame Blutclearance gekennzeichnet. Die Prüfung einer größeren Zahl von Chelatbildnern ergab, daß einige Substanzen, wie Diäthylentriaminpentaessigsäure und insbesondere 1:2-Bis-[di(carboxymethyl)aminoäthylthio]äthan, das  $^{106}\text{Ru}$  fester als Proteine binden und seine Ausscheidung mit dem Urin in starkem Maße intensivieren. Bei nachträglicher Verabreichung sind alle Chelatbildner wirkungslos. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die Tendenz des Ru(III)-Ions zur Bildung robuster Komplexe mit den Proteinen den hierfür verantwortlichen Faktor darstellt. Als unwirksam erwies sich das diuretische Diamox.

#### Summary

The behaviour of carrier-free  $^{106}\text{Ru}$  in the organism of the rat is characterized by a relatively uniform distribution over the organs and tissues, by a marked affinity toward the plasma proteins, and by a slow blood clearance. Among several chelating agents tested, the most pronounced reduction of  $^{106}\text{Ru}$ -retention was exhibited by diethylene-triaminepentaacetic acid and, particularly, by 1:2-bis-[di(carboxymethyl)aminoethylthio]ethane. The binding of  $^{106}\text{Ru}$  by these compounds is more stable than that by the

proteins. Nevertheless, the efficacy of the chelators administered with a delay is completely abolished. It is very likely, that the tendency of the Ru(III)-ion to form sluggishly exchanging chelates with the proteins is the responsible factor. The diuretic Diamox proved to be ineffective.

#### Résumé

Le comportement du ruthénium 106 sans entraineur dans l'organisme du rat est caractérisé par une répartition relativement uniforme dans tous les organes et tissus, une fixation à toutes les fractions du plasma sanguin et une "clearance" lente. L'étude d'un grand nombre d'agents chélateurs a montré que certaines substances comme l'acide diéthylènetriaminepentaacétique et en particulier le 1:2-bis-[di(carboxyméthyl)aminoéthylthio]-éthane ont pour le ruthénium 106 une plus grande affinité que les protéines et intensifient vivement son élimination par les voies rénales. Néanmoins tous les agents chélateurs étudiés sont inefficaces si l'administration est retardée. Il est fort probable que ceci est dû à la tendance des ions Ru(III) à former avec les protéines des complexes dits "robustes". Le diurétique Diamox est sans aucun effet sur l'élimination du ruthénium.

#### Schrifttum

1. *Anderegg, G., P. Nügeli, F. Müller u. G. Schwarzenbach*: *Helv. chim. Acta* 42 (1959): 827. — 2. *Basolo, F., u. R. G. Pearson*: *Advanc. Inorg. Chem. Radiochem.* 3 (1961): 1. — 3. *Bjerrum, J., G. Schwarzenbach u. L. G. Sillén*: *Stability Constants, Part I*. London 1957. — 4. *Brown, P. G. M., J. M. Fletcher u. A. G. Wain*: *A. E. R. E. C/R* 2260 (1957). — 5. *Bruce, R. S., u. T. E. F. Carr*: *React. Sci. Technol.* 14 (1961): 9. — 6. *Buldakov, L. A.*: *Raspredeleniye, Biologicheskoye Deystviye i Migratsiya Radioaktivnykh Isotopov*, S. 164. Moskau 1961. — 7. *Burykina, L. N.*: *Mater. Toksikol. Radioakt. Veshch.* 1 (1957): 41. — 8. *Catsch, A.*: *Fed. Proc.* 20, Suppl. 10 (1961): 206. — 9. *Ders.*: *Health Phys.* 8 (1962): 725. — 10. *Ders.*: *Arzneimittel-Forsch.* 12 (1962): 924. — 11. *Catsch, A., u. D. Seidel*: *Diagnosis and Treatment of Radioactive Poisoning*. Wien 1963, S. 191. — 12. *Chaberek, S., u. A. E. Martell*: *Organic Sequestering Agents*. New York 1959. — 13. *Daily, M., J. Wender u. R. Abrams*: *MDDC-420* (1945). — 14. *Dwyer, F. P., u. J. Backhouse*: *Proc. roy. Soc., N. S. Wales* 38 (1949): 138. — 15. *Eldjarn, L.*: *Acta chem. scand.* 7 (1953): 343. — 16. *Fletcher, J. M., I. L. Jenkins, F. M. Lever, F. S. Martin, A. R. Powell u. R. Todd*: *J. inorg. nucl. Chem.* 1 (1955): 378. — 17. *Foreman, H.*: *Metal-Binding in Medicine*, S. 82. Philadelphia-Montreal 1960. — 18. *Hamilton, J. G.*: *Rev. mod. Phys.* 20 (1948): 718. — 19. *Heller, H.-J.*: *Diagnosis and Treatment of Radioactive Poisoning*. Wien 1963, S. 347. — 20. *Heller, H.-J., u. A. Catsch*: *Strahlentherapie* 109 (1959): 464. — 21. *Hunter, H. T., u. N. E. Ballou*: *Nucleonics* 9 (1951): 2. — 22. *Kalberer, S., u. J. Rutschmann*: *Helv. chim. Acta* 44 (1961): 1956. — 23. *Lé, D. Kh.*: *Nature (im Druck)*. — 24. *Margerum, D. W.*: *J. Phys. Chem.* 63 (1959): 336. — 25. *Markova, Y. V., A. M. Pozharskaya, V. J. Maiwind, T. F. Zhukova, N. A. Kosolapova u. M. N. Shchukina*: *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 91 (1953): 1129. — 26. *Richmond, C. R., u. J. E. Furchner*: *Health Phys.* 6 (1961): 36. — 27. *Schlöpfer, H.* (J. R. Geigy AG, Basel): *Pers. Mitt.* — 28. *Schwarzenbach, G.*: *Angew. Chem.* 70 (1958): 451. — 29. *Schwarzenbach, G., H. Senn u. A. Anderegg*: *Helv. chim. Acta* 40 (1957): 1886. — 30. *Schubert, J.*: *Ann. Rev. nuclear. Sci.* 5 (1955): 369. — 31. *Seidel, D.*: *Diss. Heidelberg* 1964. — 32. *Speziale, A. J.*: *Organic Synthesis*, Vol. 30 (1950). — 33. *Spode, E., u. F. Gensicke*: *Strahlentherapie* 111 (1960): 476. — 34. *Dies.*: *ebenda* 111 (1960): 266. — 35. *Thompson, R. C., H. Maurice, O. Hollis, J. E. Ballou u. W. Oakley*: *Amer. J. Roentgenol.* 79 (1958): 1026.

Für die Überlassung von Substanzen danken wir folgenden Firmen: J. R. Geigy AG, Basel (Polyamino-polycarboxylsäuren u. Polyamine), Chemische Werke Albert, Wiesbaden-Biebrich (kondensierte Phosphate), Farbenfabriken Bayer AG, Leverkusen (Periston N), Chemiewerk Homburg, Frankfurt a. M. (DMP), und Lederle Arzneimittel, München (Diamox).