

KFK-268

KERNFORSCHUNGSZENTRUM

KARLSRUHE

November 1964

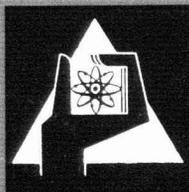
KFK 268

Institut für Strahlenbiologie

In vivo-Inaktivierung der alkalischen Phosphatase

durch DTPA und ÄDTA

Vladimir Nigrovic



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.
KARLSRUHE

Aus dem Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

**In vivo-Inaktivierung der alkalischen Phosphatase
durch DTPA und ÄDTA**

Von
VLADIMIR NIGROVIĆ

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. Juli 1964)

Tierexperimentelle Untersuchungen und klinische Erfahrungen haben gezeigt, daß bei wiederholter Verabreichung höherer Dosen der Äthylendiamintetraessigsäure (ÄDTA) und Diäthylentriaminpentaessigsäure (DTPA) — Chelatbildner, die bei der Behandlung von Vergiftungen mit radioaktiven und nichtradioaktiven Metallen in zunehmendem Maße Verwendung finden — mit toxischen Nebenwirkungen zu rechnen ist. Es handelt sich hierbei in erster Linie um eine nephrotische Schädigung der proximalen Tubuli (vgl. hierzu CATSCH 1964a). Es liegt nahe, die Toxizität der Chelatbildner auf eine Bindung essentieller Spurenmetalle mit anschließender Inaktivierung von Metalloenzymen bzw. metallaktivierter Enzyme zurückzuführen (CATSCH 1964b; FOREMAN et al. 1956; SEVEN 1960).

Tatsächlich konnte unter dem Einfluß von Ca-ÄDTA eine deutlich erhöhte Ausscheidung von Zn, nicht aber oder in nur geringem Maße von anderen Spurenmetallen nachgewiesen werden (CANDURA et al. 1960; MILLAR et al. 1954; PERRY u. PERRY 1959; TARCI 1960; TEISINGER u. FIŠEROVÁ-BERGEROVÁ 1958). Zugunsten der obigen Hypothese kann weiterhin angeführt werden, daß die Toxizität der Zn(II)-DTPA gegenüber Ca-DTPA stark herabgesetzt ist (CATSCH 1963, 1964b).

Daß zahlreiche Enzyme *in vitro* durch Chelatbildner inaktiviert werden, ist bekannt (DIXON u. WEBB 1964; FURST 1963; WESTERFIELD 1961); der direkte Nachweis einer primären Hemmung renaler Enzyme durch ÄDTA und DTPA *in vivo* steht noch aus. REUBER u. SCHMELER (1962) fanden zwar nach wiederholter Verabreichung hoher ÄDTA-Dosen histochemisch eine Abnahme der alkalischen Phosphatase in der Nierenrinde: da jedoch gleichzeitig schwere degenerative Veränderungen der Nieren vorlagen, ist die *pathogenetische* Bedeutung dieses Befundes äußerst fraglich.

Auf eine andere Erklärungsmöglichkeit für die nephrotischen Veränderungen wurde von BUTT (1960) sowie FOREMAN (1963) hingewiesen. Ausgehend von der tatsächlich nicht zu übersehenden Ähnlichkeit der durch die Chelatbildner einerseits und hypertonische Lösungen von Saccharose, Äthylenglykol u. a. (siehe auch CUTLER 1939; HELMHOLZ

1933, JANIGAN u. SANTAMARIA 1961) andererseits gesetzten Schäden, wird auch ein identischer Wirkungsmechanismus, und zwar im Sinne einer „osmotischen Nephrose“ (ALLEN 1951), diskutiert.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit dem Einfluß der eingangs erwähnten synthetischen Chelatbildner auf die alkalische Phosphatase (AP) und soll durch Untersuchungen an anderen Enzymen bzw. Chelatbildnern fortgesetzt werden. Für erste orientierende Untersuchungen schien die AP insofern geeignet zu sein, als sie in den proximalen Convoluten, und zwar im Bürstensaum, eine besonders hohe Konzentration aufweist (vgl. hierzu DE DUVE et al. 1962), zur Gruppe der Zn-Enzyme gehört (MATHIES 1958) und *in vitro* durch verschiedene Komplexbildner, darunter auch ÄDTA, inaktiviert wird (vgl. hierzu VALLEE 1959).

Material und Methodik

Als Versuchstiere dienten 12–20 Wochen alte Rattenmännchen des Heiligenberg-Inzuchtstammes, deren Gewicht von 250–330 g variierte. Die Chelate¹ (Na₂Ca-ÄDTA, Na₃Ca-DTPA, Na₃Zn-DTPA) sowie Saccharose wurden intraperitoneal injiziert, wobei das Volumen der injizierten Lösungen, wenn nicht anders angegeben, 2 ml betrug. Nach Töten der Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten entnahmen wir Blut, die Prostata und die Nieren. Die Organe, und zwar im Falle der Nieren nur die Rinde, wurden nach POTTER-ELVEHJEM in 0,9% NaCl homogenisiert, wobei die Konzentration des Nierenrindenhomogenats 0,6%, die des Prostatahomogenats 1,0% betrug. Die Bestimmung der AP-Aktivität im (hämolysefreien) Serum und in den Homogenaten erfolgte nach BESSEY et al. (1946) mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat. Da die Bestimmung nach dieser Methode bei 37°C erfolgt, drückten wir die gefundenen Aktivitäten nicht in Internationalen Einheiten aus — da diesen eine Bestimmung bei 25°C zugrunde liegt —, sondern in μM p-Nitrophenol, das innerhalb von 1 min freigesetzt wird.

Ergebnisse

Tab.1 orientiert über eine Versuchsreihe, in der 4.2 mM Ca-DTPA pro kg einmalig verabfolgt und die AP-Aktivität zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt wurde. DTPA führt in allen Fällen zu einer deutlichen Hemmung mit einem Maximum innerhalb von 6 Std. Die Inaktivierung der renalen AP (um rund 80%) ist stärker als in Serum und Prostata (rund 50%). Ein weiterer Unterschied betrifft die Dauer der Aktivitätshemmung: Während in Serum und Prostata nach 48 Std bereits eine vollständige Normalisierung vorliegt, ist dies bei der renalen AP erst nach 96 Std der Fall. Die Wirkung der niedrigen Ca-DTPA-Dosis (0,42 mM · kg⁻¹) ist mit einer Hemmung der Nieren-AP um rund 47%₀ immer noch stark ausgeprägt (Tab.2), die Erholung verläuft allerdings wesentlich schneller. Hervorzuheben ist die Unwirksamkeit von Zn(II)-DTPA; 6 Std nach Injektion von 4.2 mM · kg⁻¹ betrug die AP-Aktivität der Niere bei 14 Tieren 33.4 ± 1,44.

In einem weiteren Versuch wurde die Wirkung verschiedener Dosen der Ca-Chelate der ÄDTA und DTPA auf die AP der Nieren untersucht.

¹ Für ihre Überlassung danken wir der J. R. Geigy AG, Basel.

Tabelle 1. *Aktivität der alkalischen Phosphatase zu verschiedenen Zeitpunkten nach intraperitonealer Injektion von $\text{Na}_2\text{Ca-DTPA}$ ($4,2 \text{ mM} \cdot \text{kg}^{-1}$)*

Mittelwerte und einfache Standardfehler. Die Zahl der Tiere ist in Klammern angegeben. Die Aktivitäten beziehen sich auf 1 g Nierenrinde bzw. Prostata und 1000 ml Serum

| Stunden | Nierenrinde | Prostata | Serum |
|-----------|------------------|------------------|-----------------|
| Kontrolle | 30,9 ± 2,30 (10) | 14,6 ± 0,99 (6) | 45,5 ± 4,08 (6) |
| 1 | 13,5 ± 1,38 (8) | 8,34 ± 0,08 (5) | 38,8 ± 3,07 (6) |
| 2 | 4,45 ± 1,11 (7) | | 22,8 ± 1,56 (6) |
| 3 | 6,20 ± 0,76 (7) | 7,86 ± 0,80 (5) | 23,9 ± 0,54 (3) |
| 6 | 6,20 ± 1,05 (7) | 7,39 ± 1,12 (6) | 19,5 ± 1,97 (6) |
| 12 | 6,52 ± 1,00 (8) | | |
| 18 | 7,13 ± 0,93 (7) | | |
| 24 | 7,32 ± 0,66 (8) | 10,12 ± 0,60 (6) | 30,8 ± 0,96 (3) |
| 36 | 20,6 ± 1,05 (7) | | |
| 48 | 20,9 ± 1,71 (7) | 12,7 ± 0,78 (4) | 45,5 ± 12,3 (4) |
| 72 | 21,0 ± 2,38 (8) | | |
| 96 | 30,8 ± 2,72 (8) | | |
| 120 | 39,3 ± 3,27 (8) | | |

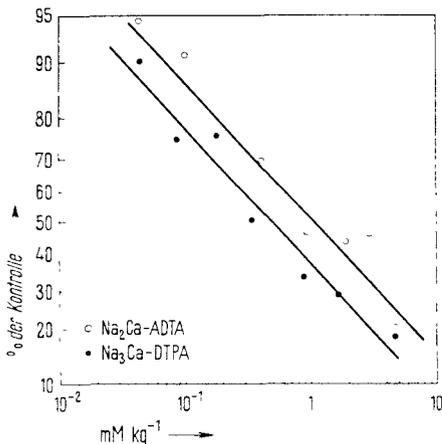


Abb. 1. Aktivität der alkalischen Phosphatase der Nierenrinde 6 Std nach intraperitonealer Injektion verschiedener Dosen von Ca-ÄDTA und Ca-DTPA. Je 5–6 Tiere pro Gruppe

Tabelle 2. *Aktivität der alkalischen Phosphatase in der Nierenrinde zu verschiedenen Zeitpunkten nach intraperitonealer Injektion von $\text{Na}_2\text{Ca-DTPA}$ ($0,42 \text{ mM} \cdot \text{kg}^{-1}$)*

Erklärungen und Kontrolle siehe Tab. 1

| Stunden | Nierenrinde |
|---------|-----------------|
| 3 | 16,1 ± 1,05 (6) |
| 6 | 16,2 ± 0,99 (6) |
| 12 | 29,5 ± 3,15 (6) |
| 24 | 33,4 ± 2,32 (6) |

und zwar 6 Std nach Injektion, d. h. zu einem Zeitpunkt, zu dem nach den in Tab. 1 wiedergegebenen Resultaten die maximale Hemmung erreicht ist, die Erholung

aber noch nicht eingesetzt hat. Drückt man die AP-Aktivitäten in Prozenten des Kontrollwerts aus und trägt das Wahrscheinlichkeitsintegral des Effekts gegen den Logarithmus der Dosis auf (Abb. 1), so erhält man für beide Chelate zwei parallele Gerade ($P > 0,2$). Die Probitanalyse nach FINNEY (1952) ergab für DTPA eine relative Potenz $\rho = 2,19 \pm 0,16$, wobei ρ als das Verhältnis gleichwirksamer Dosen (ÄDTA/DTPA) definiert ist.

Werden die Ca-Chelate in Konzentrationen von 10^{-5} – 10^{-1} M zu den Organhomogenaten bzw. zum Serum *in vitro* zugesetzt und die AP-Aktivität nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C bestimmt (Abb. 2),

so ergeben sich im Vergleich zu den *in vivo*-Versuchen folgende Unterschiede: DTPA ist zwar wiederum wirksamer als ÄDTA, die relative Potenz ist jedoch um rund zwei Größenordnungen höher als *in vivo*. Wie Abb. 2 zu entnehmen ist, lassen sich die Versuchspunkte befriedigend durch eine gemeinsame Dosis-Effektkurve wiedergeben, wenn man die

ÄDTA-Konzentration durch $\rho \approx 100$ dividiert. Die für Nierenrinde und

Prostata erhaltenen Dosis-Effektkurven sind praktisch identisch, während die Abhängigkeit der Inaktivierung der Serum-AP von der Chelatkonzentration eindeutig schwächer ausgeprägt ist.

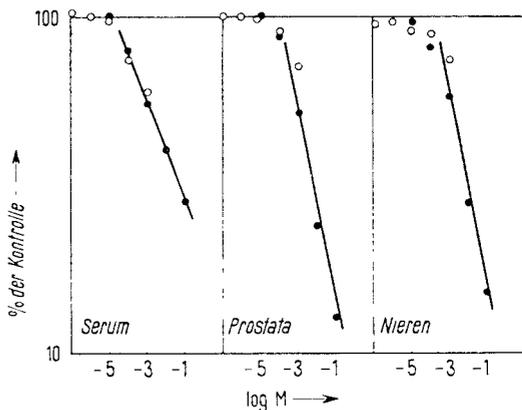


Abb. 2. Aktivität der alkalischen Phosphatase nach *in vitro*-Inkubation (30 min, 37°C) mit verschiedenen Konzentrationen (M) von Ca-DTPA (\bullet) und Ca-ÄDTA (\circ). Bei der Darstellung sind die ÄDTA-Konzentrationen mit 10^{-2} multipliziert (siehe hierzu Text)

Tabelle 3. Aktivität der alkalischen Phosphatase der Nierenrinde nach Inkubation des Homogenats mit Zn^{2+} (30 min, 37°C)

Die mit Ca-DTPA ($4,2 \text{ mM} \cdot \text{kg}^{-1}$) behandelten Tiere wurden 3 Std nach der intraperitonealen Injektion getötet. Je 6 Tiere pro Gruppe

| Ca-DTPA | Inkubation des Homogenats in | Nierenrinde |
|---------|---|-----------------|
| — | 0,9% NaCl | $30,4 \pm 2,60$ |
| — | 0,9% NaCl + 10^{-4} M ZnCl_2 | $31,7 \pm 1,40$ |
| + | 0,9% NaCl | $4,28 \pm 0,49$ |
| + | 0,9% NaCl + 10^{-4} M ZnCl_2 | $22,5 \pm 1,11$ |

Tabelle 4. Aktivität der alkalischen Phosphatase der Nierenrinde zu verschiedenen Zeitpunkten nach intraperitonealer Injektion von Saccharose
Kontrolle und Erklärungen siehe Tab. 1

| $\text{mM} \cdot \text{kg}^{-1}$ | Stunden | Nierenrinde |
|----------------------------------|---------|---------------------|
| 4,2 ¹ | 6 | $25,4 \pm 1,85$ (6) |
| 4,2 | 24 | $31,2 \pm 2,48$ (6) |
| 12,6 ² | 6 | $19,0 \pm 1,82$ (6) |
| 35,4 ³ | 6 | $12,6 \pm 0,32$ (6) |
| 35,4 | 24 | $6,94 \pm 0,30$ (6) |
| 35,4 | 48 | $2,56 \pm 0,09$ (3) |

¹ 2 ml. ² 2 ml. ³ 6 ml.

Tab.3 zeigt, daß die AP-Aktivität des Nierenhomogenats, das von unbehandelten oder DTPA-behandelten und nach 6 Std getöteten Tieren gewonnen wurde, durch Inkubation mit 10^{-4} M $ZnCl_2$ (30 min, $37^\circ C$) in letzterem Fall stark erhöht wird.

Tab.4 orientiert über den Einfluß von Saccharose auf die renale AP. Während bei einer Dosierung von $4,2 \text{ mM} \cdot \text{kg}^{-1}$ ein Effekt vermißt wird, bewirken höhere Dosen eine deutliche und mit der Zeit zunehmende Abnahme der Aktivität. Hervorzuheben ist jedoch, daß bei der höchsten Saccharose-Dosis die Letalität bereits mehr als 50% betrug.

Diskussion

Es ist zunächst auf den möglichen Einwand einzugehen, daß es sich bei der *in vivo* festgestellten Inaktivierung der AP der Niere und Prostata um einen durch die von uns verwendete Methodik bedingten Artefakt handelt. Da die mehrfach geladenen Anionen der Chelate sich nach FOREMAN et al. (1953) fast ausschließlich im extracellulären Raum verteilen, wäre es denkbar, daß die beobachtete AP-Inaktivierung erst dann eintritt, wenn die Zellen durch die Homogenisierung zerstört werden und die intracelluläre AP die Möglichkeit erhält, mit dem extracellulären Chelat zu reagieren. Gegen diese Annahme ist jedoch vorzubringen, daß mehr als 90% des Chelats bereits innerhalb der ersten 6 Std mit dem Urin ausgeschieden sind (FOREMAN 1960; FOREMAN et al. 1953), während die Inaktivierung der renalen AP, zumindest bei der höheren Dosis, über 24 Std praktisch *konstant* bleibt.

Die Frage, ob es sich bei der Abnahme der renalen AP-Aktivität um eine *primäre* Wirkung des Chelatbildners handelt — die Alternative wäre eine triviale Aktivitätsabnahme als Folge degenerativer Gewebsveränderungen — ist positiv zu beantworten. Die höchste, von uns verwendete Dosis ($4,2 \text{ mM} \cdot \text{kg}^{-1}$) führt zwar bei wiederholter Verabreichung zu ausgeprägten morphologischen Veränderungen der Nierentubuli, jedoch konnten bei *einmaliger* Applikation und insbesondere zu so frühen Zeitpunkten keine histopathologischen Veränderungen nachgewiesen werden. (CATSCH 1964b; FOREMAN et al. 1960). Zu erwähnen ist auch, daß der Bürstensaum, der die höchste AP-Konzentration aufweist, auch bei fortgeschrittener Schädigung der Tubuli erhalten bleibt (CATSCH 1964b). Ein letztes Argument zugunsten der Annahme einer primären Wirkung ist der Nachweis, daß die Nieren-AP durch relativ sehr niedrige Chelatedosen gehemmt wird, die mit Sicherheit zu keinen morphologischen Veränderungen führen.

Da die sogenannte Saccharose-Nephrose sich bereits zu sehr frühen Zeitpunkten manifestiert (JANIGAN u. SANTAMARIA 1961), da wir weiterhin eine Inaktivierung der AP durch Saccharose *in vitro* nicht nachweisen konnten, dürfte es sich bei dem *in vivo*-Effekt der Saccharose aller Wahrscheinlichkeit nach um eine sekundäre Erscheinung handeln. In

die gleiche Richtung weist auch die mit der Zeit, d. h. parallel zu der Entwicklung der morphologischen Veränderungen, zunehmende Inaktivierung der AP.

Die im Vergleich zu Ca-ÄDTA größere Wirksamkeit von Ca-DTPA, die aufgrund der höheren Stabilität der Zn(II)-DTPA von vornherein zu erwarten war, das Fehlen einer AP-Inaktivierung durch Zn(II)-DTPA und schließlich die Reaktivierbarkeit der in vivo inaktivierten AP durch Zn^{2+} stehen in guter Übereinstimmung mit der Annahme, daß der Chelierung essentieller Spurenmetalle bei der Toxizität der Chelatbildner eine entscheidende Rolle zukommt. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß für ein anderes Zn-Enzym, und zwar die DN-ase der Leber, ebenfalls eine in vivo-Inaktivierung durch ÄDTA nachgewiesen wurde (FUJIOKA u. LIEBERMAN 1964), während die Aktivität der nicht-metallaktivierten RN-ase der Nieren durch DTPA nicht beeinflußt wird (NIGROVIĆ, unveröffentlichte Ergebnisse). Auf der anderen Seite scheint aber durchaus nicht jedes Zn-Enzym durch DTPA inaktiviert zu werden; die Lactodehydrogenase der Nieren beispielsweise reagierte nicht auf DTPA (NIGROVIĆ, unveröffentlichte Ergebnisse). Selbstverständlich darf auch nicht übersehen werden, daß durch andere Kationen als Zn^{2+} aktiviert werden, durch Chelatbildner beeinflußt werden können. Die Klärung dieser Fragen soll weiteren Untersuchungen vorbehalten sein.

Der für die Inaktivierung der AP durch Chelatbildner verantwortliche Mechanismus ist in der Erhöhung des pZn und in der (durch die Störung des Gleichgewichts bedingten) Freisetzung von Zn^{2+} aus dem AP-Komplex zu sehen, wobei das Ausmaß der pZn-Erhöhung der Konzentration des Chelatbildners proportional ist (HELLER u. CATSCH 1959). Die in vivo unterschiedlich starke Wirkung der Chelatbildner auf die AP in Nieren, Prostata und Serum kann zwanglos damit erklärt werden, daß die Chelatbildner in den Nieren infolge der fast ausschließlich renalen Ausscheidung besonders hohe Konzentrationen erreichen. Weiterhin werden sie nach FOREMAN et al. (1953) zum Teil aktiv von den Tubuli sezerniert, und die tubuläre Rückresorption von Wasser führt zu einem großen Konzentrationsgradienten, so daß in den Nieren, im Gegensatz zu anderen Organen, auch eine gewisse intracelluläre Anreicherung der Chelate resultiert. Daß die Effektivitätsunterschiede in vitro aufgehoben werden, war dementsprechend zu erwarten und konnte auch insofern experimentell bestätigt werden, als in diesem Fall die AP-Hemmung in Prostata und Nieren durchaus vergleichbar ist. Unerwartet niedrig dagegen war der Einfluß auf die Serum-AP. Es ist nun bekannt, daß die aus verschiedenen Organen gewonnene AP in ihrer Funktion, Molekulargewicht, ihren Turnover-Raten und auch bezüglich der für die Aktivität benötigten Metallionen eine heterogene Gruppe darstellt (STADTMAN

1961), was bei der obenangeführten Diskrepanz ursächlich eine Rolle spielen könnte.

Die Effektivität der Chelatbildner sollte in erster Näherung dem Verhältnis der Stabilitätskonstanten $K_{ZnL}^{Zn}/K_{CaL}^{Ca}$ proportional sein (HELLER u. CATSCH 1959). Dieser Quotient beträgt im Falle der DTPA $10^{7,66}$ (ANDEREGG et al. 1959), bei ÄDTA dagegen nur $10^{5,56}$ (SCHWARZENBACH et al. 1954). DTPA sollte somit rund hundertmal wirksamer als ÄDTA sein, und die Annahme eines entsprechenden ρ ergab tatsächlich eine befriedigende Wiedergabe der in vitro-Ergebnisse. Unerwartet klein ist der in vivo ermittelte ρ -Wert von 2,19. Diese Diskrepanz könnte durch ein unterschiedliches Verhalten beider Chelate im Organismus (Unterschiede in der Ausscheidungsgeschwindigkeit und/oder in den intracellulären Konzentrationen) bedingt sein. Untersuchungen mit ^{14}C -markierten Chelaten (FOREMAN 1960) ergaben jedoch keinerlei Hinweise für eine solche Annahme. Eine andere Erklärung wäre, daß DTPA (infolge ihrer im Vergleich zu ÄDTA erheblich höheren Affinität nicht nur zu Zn^{2+} , sondern auch zu anderen Spurenmetallen) bereits vor der Passage durch die Nieren das chelierte Ca in stärkerem Maße gegen andere, stabiler gebundene Metallionen ausgetauscht, was seinerseits zu einer Verminderung der für die Inaktivierung der AP entscheidenden Ca-DTPA-Konzentration führen würde. Auch hierfür, ebenso wie für die Annahme, daß der Austausch des durch DTPA chelierten Ca gegen das Zn der AP langsamer als bei der ÄDTA verläuft, lassen sich zur Zeit noch keine experimentellen Befunde anführen.

Zu der Frage der ausgeprägten Dosisabhängigkeit der Geschwindigkeit, mit der die Normalisierung der AP erfolgt, soll erst nach Durchführung von Untersuchungen an gereinigten AP-Präparaten Stellung genommen werden.

Die Bedeutung der AP und der von ihr kontrollierten metabolischen Prozesse für die Funktion der Nierenzelle ist zur Zeit noch nicht geklärt (HOLMGÅRD 1962), so daß auch nicht entschieden werden kann, welche Rolle der Inaktivierung der AP bei der Pathogenese der durch die Chelatbildner gesetzten nephrotischen Schädigung zukommt. Auf jeden Fall kann aber die enge Korrelation nicht übersehen werden, die zwischen der AP-Inaktivierung und den letalen sowie nephrotoxischen Wirkungen der Polyaminosäuren besteht: Es wurde von CATSCH (1964b) eine im Vergleich zu ÄDTA um 1,8 bis 2,2 größere Toxicität der DTPA festgestellt; die relative Potenz der DTPA im Falle der AP-Inaktivierung beträgt 2,2. Die auffallend geringe Toxicität der $Zn(II)$ -DTPA wurde bereits erwähnt. Übereinstimmung besteht schließlich bezüglich der Reversibilität der Nephrotoxicität und der Inaktivierung der AP sowie bezüglich der Dosisabhängigkeit der Reversibilität.

Wir erwähnten bereits, daß die Nephrotoxicität der Chelatbildner von einigen Autoren im Sinne der „osmotischen Nephrose“ gedeutet

wird. Obgleich die vorliegende Untersuchung sich nur mittelbar mit dieser Frage befaßt, möchten wir betonen, daß die weitgehende Ähnlichkeit der histologischen Veränderungen allein kein zwingendes Argument zugunsten dieser Auffassung sein kann. Der Umstand, daß die wirksamen Saccharose-Dosen um eine Größenordnung höher als im Falle der Chelate liegen, und vor allem die unterschiedliche Toxizität von Ca-ÄDTA, Ca-DTPA und Zn(II)-DTPA sprechen unseres Erachtens gegen die zur Diskussion gestellte Vorstellung.

Zusammenfassung

Die parenterale Verabfolgung von $\text{Na}_2\text{Ca-ÄDTA}$ und $\text{Na}_3\text{Ca-DTPA}$ bewirkt innerhalb weniger Stunden eine Hemmung der alkalischen Phosphatase in Prostata, Serum und in besonders starkem Maße in der Nierenrinde. Die Dauer der Hemmung kann in Abhängigkeit von der Dosis bis zu 4 Tagen betragen. Das gehemmte Enzym wird *in vitro* durch Zn^{2+} reaktiviert. $\text{Na}_3\text{Ca-DTPA}$ ist *in vivo* zweimal, *in vitro* 100mal wirksamer als $\text{Na}_2\text{Ca-ÄDTA}$, während $\text{Na}_3\text{Zn-DTPA}$ die alkalische Phosphatase überhaupt nicht inaktiviert. Die Befunde sprechen dafür, daß es sich bei der Inaktivierung des Enzyms um einen primären Effekt, d. h. um eine Bindung des Zn der alkalischen Phosphatase durch die Chelatbildner, handelt. Obgleich in quantitativer Hinsicht eine enge Korrelation zwischen der Inaktivierung der alkalischen Phosphatase und der allgemeinen und Nephrotoxizität der Chelatbildner besteht, kann die pathogenetische Bedeutung der Befunde noch nicht übersehen werden.

Für technische Assistenz danken wir Fräulein H. RECKERT.

Literatur

- ALLEN, A. C.: The Kidney. New York: Grune & Stratton 1951.
- ANDREGG, G., P. NÄGELI, F. MÜLLER u. G. SCHWARZENBACH: Komplexe XXX. *Helv. chim. Acta* **42**, 827 (1959).
- BESSEY, O. A., H. O. LOWRY, and M. J. BROCK: A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. biol. Chem.* **164**, 321 (1946).
- BUTT, E. M.: Diskussionsbemerkung. In: *Metal-Binding in Medicine*, p. 157. Philadelphia and Montreal: J. B. Lippincott 1960.
- CANDURA, F., M. CANDURA, T. VILLA e S. ESZECHIELI: L'eliminazione urinaria e fecale dello zinco durante trattamento con etilendiaminetetracetato calcio-disodico [EDTACaNa₂]. *Lav. umano* **12**, 402 (1960).
- CATSCH, A.: Dekorporierung radioaktiver Stoffe. In: *Strahlenschutz in Forschung und Praxis*, Bd. 3, S. 181. Freiburg i. Br.: Rombach & Co. 1963.
- Radioactive Metal Mobilization in Medicine. Springfield: Ch. C. Thomas 1964a.
- Zur Toxikologie der Diäthylentriaminpentaessigsäure. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak.* **246**, 316 (1964b).
- CUTLER, H. H.: Effects of sucrose on the kidneys. *Proc. Mayo Clin.* **14**, 318 (1939).
- DIXON, M., and E. C. WEBB: *Enzymes*. London: Longmans, Green and Co. 1964.
- DUVE, C. de, R. WATTIAUX, and P. BAUDHIN: Distribution of enzymes between subcellular fractions in animal tissues. *Advanc. Enzymol.* **24**, 291 (1962).
- FINNEY, D. J.: *Probit Analysis*. Cambridge: University Press 1952.

- FOREMAN, H.: The pharmacology of some useful chelating agents. In: *Metal-Binding in Medicine*, p. 82. Philadelphia and Montreal: J. B. Lippincott 1960.
- Diskussionsbemerkung. In: *Diagnosis and Treatment of Radioactive Poisoning*, p. 379. Vienna: IAEA 1963.
- C. FINNEGAN, and C. C. LUSHBAUGH: Nephrotoxic hazard from uncontrolled edathamil calcium-disodium therapy. *J. Amer. med. Ass.* **160**, 1042 (1956).
- C. C. LUSHBAUGH, M. MAGEE, and G. HUMASON: Nephrotoxicity of diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA). *LAMS-2445*, 67 (1960).
- M. VIER, and M. MAGEE: The metabolism of C^{14} -labeled ethylenediaminetetraacetic acid in the rat. *J. biol. Chem.* **203**, 1045 (1953).
- FUJIOKA, M., and I. LIEBERMAN: A Zn^{2+} requirement for synthesis of deoxyribonucleic acid by rat liver. *J. biol. Chem.* **239**, 1164 (1964).
- FURST, A.: *Chemistry of Chelation in Cancer*. Springfield: Ch. C. Thomas 1963.
- HELLER, H. J., u. A. CATSCH: Einige physikalisch-chemische Überlegungen zur Dekorporation radioaktiver Metalle durch Komplexbildner. *Strahlentherapie* **109**, 464 (1959).
- HELMHOLZ, H. F.: Renal changes in the rabbit resulting from intravenous injection of hypertonic solution of sucrose. *J. Pediat.* **3**, 144 (1933).
- HOLMGÅRD, Å.: Quantitative analysis of enzymes in normal and diseased kidney tissue. *Scand. J. clin. Lab. Invest., Suppl.* to **14** (1962).
- JANIGAN, D. T., and A. SANTAMARIA: A histochemical study of swelling and vacuolation of proximal tubular cells in sucrose nephrosis in the rat. *Amer. J. Path.* **39**, 175 (1961).
- MATHIES, J. C.: Preparation and properties of highly purified alkaline phosphatase from swine kidneys. *J. biol. Chem.* **223**, 1121 (1958).
- MILLAR, J. M., M. I. FISCHER, C. A. MAWSON, and P. V. ELCOATE: Influence of ethylenediamine-tetra-acetic acid on the excretion of zinc by the rat. *Nature (Lond.)* **174**, 881 (1954).
- PERRY, H. M., and E. F. PERRY: Normal concentrations of some trace metals in human urine: changes produced by ethylenediamine-tetraacetate. *J. clin. Invest.* **38**, 1452 (1959).
- REUBER, M. D., and G. C. SCHMIELER: Edetate kidney lesions in rats. *Arch. environm. Hlth* **5**, 430 (1962).
- SCHWARZENBACH, G., R. GUT u. G. ANDEREGG: Komplexone XXIV. *Helv. chim. Acta* **37**, 937 (1954).
- SEVEN, M. J.: Observations on the toxicity of intravenous chelating agents. In: *Metal-Binding in Medicine*, p. 95. Philadelphia and Montreal: J. B. Lippincott 1960.
- STADTMAN, T. C.: Alkaline Phosphatases. In: *The Enzymes*, Vol. 5, p. 55. New York and London: Academic Press 1961.
- TARUI, S.: Studies on zinc metabolism. I. The influence of chelating agents on urinary excretion of metals. *Med. J. Osaka Univ.* **10**, 499 (1960).
- TEISINGER, J., u. V. FJŠEROVÁ-BERGEROVÁ: Über den Einfluß des zur Therapie der Bleivergiftung angewendeten Calciumdinatriumsalzes der Äthylendiamintetraessigsäure auf den Eisen- und Kupferspiegel im Blut und Urin. *Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg.* **16**, 478 (1958).
- VALLEE, B. L.: Biochemistry, physiology and pathology of zinc. *Physiol. Rev.* **39**, 443 (1959).
- WESTERFIELD, W. W.: Effect of metal-binding agents on metalloproteins. *Fed. Proc.* **20**, Suppl. 10, 158 (1961).

Dr. med. VLADIMIR NIGROVIĆ, Institut für Strahlenbiologie,
Kernforschungszentrum Karlsruhe, 75 Karlsruhe, Postfach 947