

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM
KARLSRUHE**

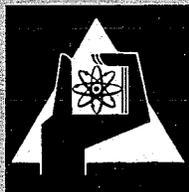
August 1966

KFK 491

Institut für Strahlenbiologie

Das Verhalten von Radiozink-Chelaten im Säugetierorganismus

A. Catsch, D.Kh. Lê



**GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.
KARLSRUHE**

Sonderdruck aus

STRAHLENTHERAPIE Band 130, Heft 4, S. 557 (1966)

Herausgegeben von Josef Becker, Rudolf Birkner, Hanns Langendorff

VERLAG URBAN & SCHWARZENBERG · MÜNCHEN — BERLIN — WIEN

Alle Rechte, auch die des Nachdrucks, der photomechanischen Wiedergabe und der Übersetzung, vorbehalten

Aus dem Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

Das Verhalten von Radiozink-Chelaten im Säugetierorganismus

Von

Alexander Catsch und Du Khuong Lê

Mit 8 Abbildungen

Die Stabilitätskonstanten der Zn-Chelate der Diäthylentriaminpentaessigsäure (DTPA) und Äthylendiamintetraessigsäure (ÄDTA) betragen $10^{18,40}$ (Anderegg u. a., 1959) bzw. $10^{16,26}$ (Schwarzenbach u. a., 1954), während die Stabilitäten der entsprechenden Ca-Chelate mit $10^{10,89}$ bzw. $10^{10,85}$ praktisch identisch sind. Es sollte demnach erwartet werden (Catsch, 1964 a; Heller, 1963; Heller u. Catsch, 1959), daß nach Verabfolgung von Zn-DTPA weniger Zn im Körper retiniert wird als im Falle von Zn-ÄDTA.

Bisher liegen nur unsystematische und nicht widerspruchsfreie Untersuchungen über das biologische Verhalten dieser Zn-Chelate vor. Foreman (1960) findet nach intravenöser Injektion radioaktiv markierter Chelate, daß im Falle der DTPA vom gesamten Körper der Ratte 17% Zn retiniert wird im Vergleich zu 19% bei ÄDTA; die Dosierung ist nicht angegeben. Nach Catsch u. a. (1964) werden von Ratten nach intraperitonealer Injektion von 250 μ M Zn-DTPA etwa 5% ^{65}Zn zurückgehalten. Bei Mäusen betrug die ^{65}Zn -Ausscheidung mit dem Urin 80% (DTPA) und 60% (ÄDTA) nach intravenöser Verabfolgung von rund 1 μ M Zn und der doppelten Menge der Chelatbildner (Stand u. a., 1962). Beim Menschen hingegen fanden Rosoff u. a. (1965) nach intravenöser Injektion von Zn-DTPA im Urin nur 5% ^{65}Zn und 50% im Falle von Zn-ÄDTA; die Dosierung ist nicht spezifiziert.

Eingehendere Untersuchungen zu dieser Frage sind nicht nur im Hinblick auf die obigen Diskrepanzen von Interesse, sondern auch aus folgendem Grund: Das Ca-Chelat der DTPA ist bekanntlich eines der wirksamsten Antidote bei Inkorporation verschiedener potentiell gefährlicher Radionuklide (vgl. hierzu Catsch, 1964 a). Die gelegentlich bei länger dauernder Medikation beobachteten toxischen Nebenerscheinungen des Chelats sind aller Wahrscheinlichkeit nach durch Mobilisierung essentieller Spurenmetalle, insbesondere von Zn, bedingt. Die Toxizität der Zn-DTPA ist dementsprechend erheblich geringer als die von Ca-DTPA (Catsch, 1963, 1964 b; Catsch u. von Wedelstaedt, 1965; Nigrović, 1964; von Wedelstaedt u. Catsch, 1965). Die Dekorporationseffektivität der Zn-DTPA dagegen unterscheidet sich nur unwesentlich von der des Ca-Chelats

Herrn Prof. Dr. med. F. Curtius zum 70. Geburtstag gewidmet.

(Catsch u. a., 1964), so daß ein etwa 15mal höherer therapeutischer Index resultiert (Catsch, 1966). Sollte es sich nun bei den eingangs zitierten Befunden um eine echte Abspaltung und Retention von ^{65}Zn und stabilem Zn handeln und nicht ausschließlich um einen isotopischen Austausch des ^{65}Zn mit endogenem Zn, wie er durch orientierende Untersuchungen von Catsch und Lè (1965) nahegelegt wird, so ist die Frage nach dem Ausmaß der Zn-Retention im Hinblick auf etwaige toxische Spätwirkungen des Zn natürlich von entscheidender praktischer Bedeutung.

Methodik

Folgende Chelate¹ wurden verwendet: 1. $\text{Na}_3[\text{Ca-DTPA}]$, 2. $\text{Na}_3[\text{Zn-DTPA}]$, 3. $\text{Na}_2[\text{Ca-ÄDTA}]$ und 4. $\text{Na}_2[\text{Zn-ÄDTA}]$. Bei 2. und 4. betrug der Überschuß an freiem Liganden $\leq 0,2\%$. Für die Markierung diente trägerfreies $^{65}\text{ZnCl}_2$ (The Radiochemical Centre, Amersham) in Dosen von 2 bis 5 μCi pro Tier.

Die Versuchstiere waren junge, ausgewachsene Albinorattenweibchen des Heiligenbergstammes. Die Injektionen erfolgten teils intraperitoneal, teils in die Schwanzvene. Für die Bestimmung des ^{65}Zn -Gehaltes im Körper (täglich bzw. jeden 2. Tag bis mindestens zum 15. Tag nach Injektion) diente ein abgeschirmter Plastiksintillator mit einem Durchmesser von 17,8 cm und einer Tiefe von 12,7 cm. Die Ratten befanden sich während der Messung in einer Plexiglasröhre, wobei der Abstand ihrer Achse vom Szintillator 19 cm betrug. Die unmittelbar nach Injektion gemessene Aktivität wurde gleich 100% gesetzt. Parallelmessungen von ^{65}Zn -Standardpräparaten ermöglichten Korrekturen auf radioaktiven Zerfall und Zählereffektivität.

Ergebnisse

Um die Versuchsergebnisse auswerten zu können, war es zunächst notwendig, eine eindeutig definierte Größe zu finden, welche die Retention von ^{65}Zn quantitativ wiedergibt. Hierzu wurden je 12 Tiere i.v. bzw. i.p. mit trägerfreiem ^{65}Zn injiziert und die Aktivität des Körpers bis zum 35. Tag verfolgt. Da statistisch gesicherte Unterschiede zwischen beiden Applikationsarten nicht vorlagen, wurden beide Gruppen vereinigt. Wie Abbildung 1 zeigt, ist die Retention befriedigend durch $R_t = A_1 \exp(-\lambda_1 t) + A_2 \exp(-\lambda_2 t)$ zu approximieren. Da A_2 mit 79% der applizierten ^{65}Zn -Menge und einer biologischen HWZ von 33 Tagen den dominierenden Term der Verweilfunktion darstellt, ist es zweckmäßig, im folgenden den A_2 -Wert als Maß der ^{65}Zn -Retention zu verwenden.

Bei der Berechnung von A_2 in den weiteren Versuchsreihen wurde mit Hilfe der Regressionsanalyse für eine gegebene Versuchsgruppe ein gemeinsamer λ_2 -Wert berechnet, wobei wir selbstverständlich nur Meßwerte ab 6. Tag, d. h. wenn A_1 zu vernachlässigen ist, berücksichtigten. Die Extrapolation der Meßpunkte für jede einzelne Ratte mit Hilfe von λ_2 nach $t = 0$ ergibt A_2 -Werte, für die nach üblichem Vorgang Mittelwert, Standardfehler bzw. Mutungsgrenzen berechnet werden. In keinem Fall lagen statistisch gesicherte Unterschiede zwischen den λ_2 -Werten verschiedener Versuchsgruppen vor.

Bei isotopischer Verdünnung des ^{65}Zn mit $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ resultiert eine nur geringfügige Herabsetzung der Retention von ^{65}Zn (Abb. 2). Der Einfluß höherer Trägerdosen konnte nicht geprüft werden, da die Letalität (in Übereinstimmung mit Caujolle u. a., 1964, und Franz, 1962) bereits bei 16 μM pro Tier 50% und bei 32 μM 100% betrug.

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

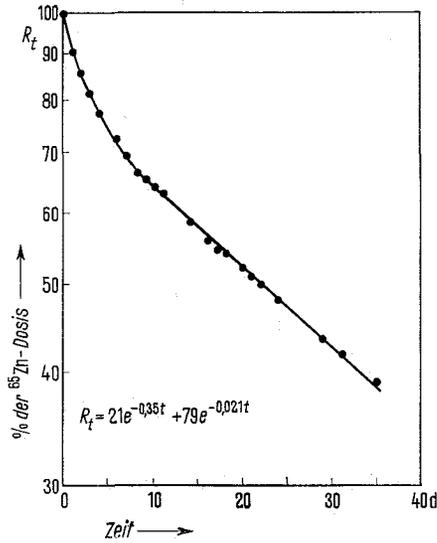


Abb. 1

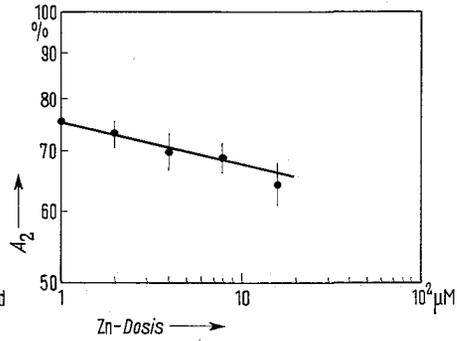


Abb. 2

Abb. 1. Retention von i.v. oder i.p. injiziertem trägerfreiem ^{65}Zn . Mittelwerte von 24 Ratten. —
 Abb. 2. Retention von isotopisch verdünntem ^{65}Zn nach i.v. Injektion. Mittelwerte von je 6 Ratten
 und Standardfehler.

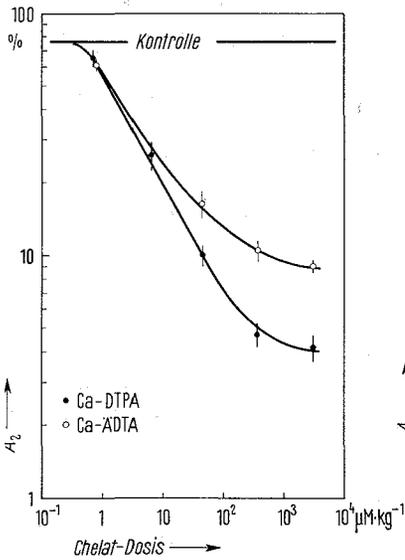


Abb. 3

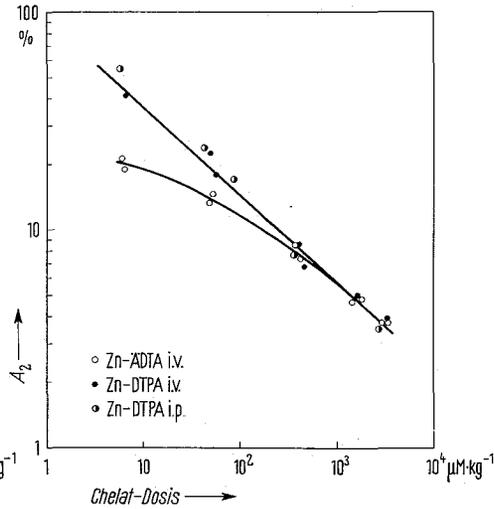


Abb. 4

Abb. 3. Retention von trägerfreiem ^{65}Zn bei gleichzeitiger i.v. Injektion von Ca-Chelaten. Mittel-
 werte von je 6 Ratten und Standardfehler. Kontrolle = ^{65}Zn ohne Ca-Chelate. — Abb. 4. Reten-
 tion von ^{65}Zn nach Injektion ^{65}Zn -markierter Zn-Chelate. Mittelwerte von je 6 Ratten. Der Über-
 sichtlichkeit wegen sind die Standardfehler, welche die gleiche Größe wie in Abb. 2 und 3 haben,
 nicht wiedergegeben.

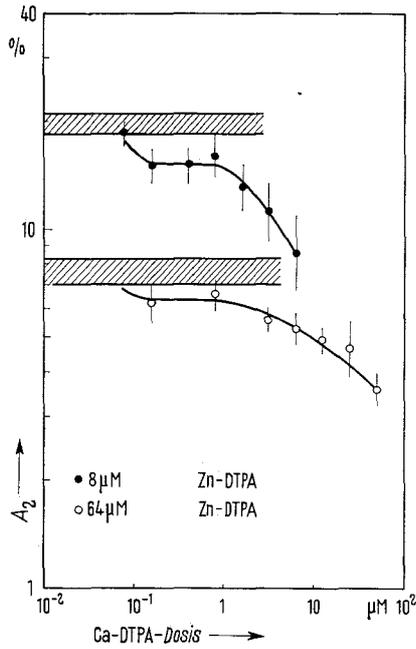


Abb. 5

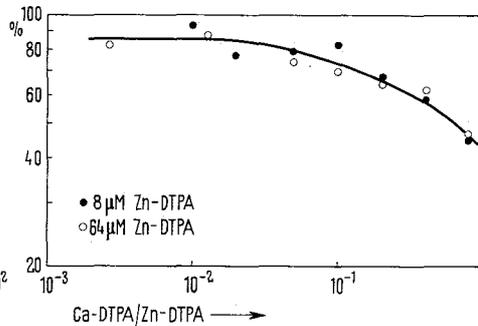


Abb. 6

Abb. 5. Retention von ^{65}Zn nach i.v. Injektion von ^{65}Zn -markierter Zn-DTPA mit und ohne (schraffierter Bereich) von Ca-DTPA. Mittelwerte von je 6 Ratten und Mutungsbereiche für $P = 0,05$. — Abb. 6. Ergebnisse der Abb. 5; die ^{65}Zn -Retention ist in Abhängigkeit von dem Verhältnis Ca-DTPA/Zn-DTPA aufgetragen.

Wird trägerfreies ^{65}Zn gleichzeitig mit verschiedenen Dosen von Ca-DTPA bzw. -ÄDTA i.v. injiziert, ist die ^{65}Zn -Retention stark herabgesetzt (Abb. 3).

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die ^{65}Zn -markierten Chelate der DTPA und ÄDTA in Dosen von 1, 8, 64, 256 bzw. 512 μM pro Tier verabfolgt. Abbildung 4 zeigt, daß die von der Applikationsart unabhängige Retention von ^{65}Zn mit wachsender Chelatdosis abnimmt. Auffallend ist der unterschiedliche Einfluß beider Liganden: Während im Dosisbereich von $\geq 10^2 \mu\text{M} \cdot \text{kg}^{-1}$ die A_2 -Werte identisch sind, ist die Retention von ^{65}Zn bei niederen ÄDTA-Dosen gesichert niedriger.

Abbildung 5 gibt die Ergebnisse eines Versuchs wieder, in dem 8 bzw. 64 μM von ^{65}Zn -markierter Zn-DTPA mit Zusatz verschiedener Dosen von Ca-DTPA injiziert wurden. Bei beiden Zn-DTPA-Dosen bewirkt der Überschuß an Ca-DTPA eine deutliche Herabsetzung der ^{65}Zn -Retention. Trägt man die A_2 -Werte (in Prozent der entsprechenden Kontrollwerte, d. h. bei Abwesenheit von Ca-DTPA) gegen das Verhältnis Ca-DTPA/Zn-DTPA auf, so können beide Versuchsgruppen durch eine gemeinsame Ausgleichskurve wiedergegeben werden (Abb. 6).

In einer letzten Versuchsreihe wurden die Ca- bzw. Zn-Chelate der ÄDTA und DTPA in verschiedener Dosierung am 7., 14., 21. und 29. Tag nach i.v. Injektion von trägerfreiem ^{65}Zn i.p. appliziert. Um die Effektivität jeder einzelnen Chelatdosis bei der Mobilisierung von ^{65}Zn getrennt zu erfassen, gingen

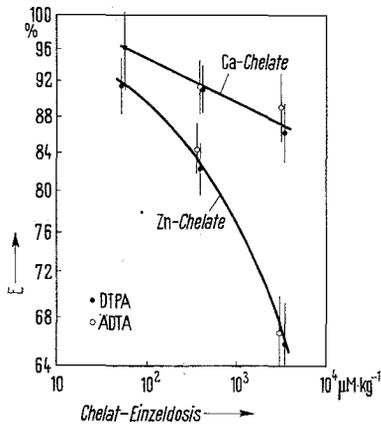


Abb. 7

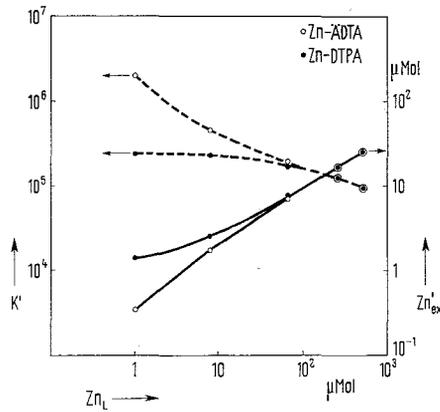


Abb. 8

Abb. 7. Retention von i.v. injiziertem trägerfreiem ^{65}Zn bei nachträglicher 4maliger (am 7., 14., 21. u. 29. Tag) i.p. Injektion von Chelaten. $E = \text{Effektivität } (100A_2^i / A_2^0; \text{ s. Text})$. Mittelwerte von je 6 Ratten und Mutungsbereiche für $P = 0,05$. — Abb. 8. Theoretisch berechnete Werte für den austauschbaren endogenen Zn-Pool Zn'_{ex} (—) und für die „scheinbare“ Stabilitätskonstante K' (---) in Abhängigkeit von der applizierten Zn-Chelatdosis Zn_L .

wir folgendermaßen vor: Bezeichnet man mit A_2^0 die ^{65}Zn -Retention bei unbehandelten Kontrolltieren und mit A_2^i die nach i Chelatdosen, so ist die Effektivität jeder Chelatdosis als $100 A_2^i / A_2^0$ definiert. Der Zusammenstellung in der Tabelle 1 ist zu entnehmen, daß 1. die Zn-Chelate in dem untersuchten Dosisbereich mehr ^{65}Zn zur Ausscheidung bringen als die Ca-Chelate. 2. Die mobilisierte ^{65}Zn -Menge nimmt mit wachsender Chelatdosis zu und 3. im Laufe der

Tabelle 1. Effektivität ($100 A_2^i / A_2^0$; s. Text) verschiedener Chelatdosen, die i.p. zu verschiedenen Zeitpunkten nach i.v. Injektion von trägerfreiem ^{65}Zn verabfolgt wurden. Mittelwerte von je 6 Ratten und Mutungsbereiche für $P = 0,05$.

μM pro Tier	Tag	$100 \frac{A_2^i}{A_2^0}$			
		Ca-DTPA	Zn-DTPA	Ca-ÄDTA	Zn-ÄDTA
8	7	97 (92–102)	92 (90–95)	—	—
8	14	99 (93–105)	99 (97–101)	—	—
8	21	101 (95–106)	100 (98–103)	—	—
8	29	—	103 (99–106)	—	—
64	7	93 (91–96)	88 (85–91)	95 (92–98)	90 (87–93)
64	14	98 (97–100)	95 (94–97)	96 (94–98)	95 (93–97)
64	21	100 (99–101)	98 (96–100)	100 (98–103)	99 (97–101)
64	29	—	103 (101–105)	—	—
512	7	91 (88–94)	80 (77–83)	93 (90–96)	81 (78–84)
512	14	96 (93–99)	88 (85–92)	87 (83–91)	99 (96–101)
512	21	98 (95–102)	93 (88–98)	97 (95–100)	95 (90–101)
512	29	—	101 (92–111)	—	—

Zeit ab, so daß die am 29. Tag verabfolgten Chelate praktisch wirkungslos sind. 4. Gesicherte Unterschiede in der Wirksamkeit von DTPA und ÄDTA bestehen nicht. Der unter 1., 2. und 4. umrissene Sachverhalt kommt besonders klar in Abbildung 7 zum Ausdruck, in welcher der Gesamteffekt der ersten drei Dosen, d. h. $100 A / A_2$, wiedergegeben ist.

Diskussion

Es ist zweckmäßig, bei der Analyse der Ergebnisse von den in der Tabelle 1 und in Abbildung 7 wiedergegebenen Daten auszugehen. Sie zeigen, daß Zn-Chelate in der Lage sind, im Körper befindliches ^{65}Zn zur Ausscheidung zu bringen. Da Zn^{2+} eine Koordinationszahl 4 hat, die DTPA-Molekel aber 8 Ligandenatome aufweist, ist im 1:1-Zn-Chelat die Bindungskapazität des Liganden noch nicht abgesättigt, und ein weiteres Zn-Ion kann gebunden werden; die Stabilitätskonstante der bimetallischen Zn_2 -DTPA ist mit $10^{4,4}$ beachtlich hoch (Anderegg u. a., 1959). Es könnte somit und im Hinblick auf den geringfügigen Überschuß an freiem Liganden grundsätzlich auch endogenes stabiles Zn entfernt werden. Die Stabilität der bimetallischen Zn-Chelate der nur sechszähligen ÄDTA dagegen dürfte vernachlässigbar sein. Da nun aber keine Unterschiede in der Effektivität von Zn-ÄDTA und Zn-DTPA vorliegen und da vor allem die Zn-Chelate eine erheblich größere Mobilisierung von ^{65}Zn bewirken als die Ca-Chelate, kann der isotopische Austausch als gesichert angesehen werden. Die ausgeprägte Abhängigkeit der Effektivität vom Zeitpunkt der Verabfolgung der Zn- und Ca-Chelate weist darauf hin, daß ^{65}Zn in Kompartimente überführt wird, in denen es dem Verteilungsraum der Chelate entzogen ist und/oder in einer grundsätzlich nicht mehr austauschbaren bzw. mobilisierbaren Bindung vorliegt.

Es erhebt sich somit die Frage, ob und in welchem Maße die nach Injektion von ^{65}Zn -markierten Zn-Chelaten zu beobachtende ^{65}Zn -Retention (Abb. 4) ebenfalls auf isotopischem Austausch beruht. Die Berechnungen des endogenen austauschbaren Zn-Pools (Zn_{ex}) gehen davon aus, daß die Verteilung einer gegebenen ^{65}Zn -Dosis ($^{65}\text{Zn}_{\text{L}}$) auf die beiden Zn-Kompartimente, Zn_{ex} einerseits und die durch den Chelatbildner gebundene Menge (Zn_{L}) andererseits, entsprechend dem Verhältnis des Zn-Gehalts beider Kompartimente, erfolgt:

$$\text{Zn}_{\text{ex}} = \frac{^{65}\text{Zn}_{\text{r}} \cdot \text{Zn}_{\text{L}}}{^{65}\text{Zn}_{\text{L}} - ^{65}\text{Zn}_{\text{r}}}, \quad (1)$$

wobei mit $^{65}\text{Zn}_{\text{r}}$ das im Körper retenierte ^{65}Zn bezeichnet ist. Da $^{65}\text{Zn}_{\text{L}} = 100\%$ gesetzt wird und da A_2 79% von $^{65}\text{Zn}_{\text{L}}$ ausmacht (vgl. Abb. 1), vereinfacht sich (1) nach Umformung zu

$$\text{Zn}_{\text{ex}} = \frac{\text{Zn}_{\text{L}}}{79/A_2 - 1}. \quad (2)$$

Nach Einsetzen der experimentell erhaltenen A_2 (Abb. 4) in Gleichung (2) erhält man für Zn_{ex} Werte, die mit wachsender Chelatdosis erheblich zunehmen und überdies im niederen Dosisbereich von der Art des Liganden abhängig sind (Abb. 8).

Dieser Befund scheint mit der Definition eines endogenen austauschbaren Zn-Pools, der naturgemäß eine konstante Größe aufweisen sollte, nicht vereinbar zu sein. Der tatsächliche Zn_{ex} braucht jedoch mit den berechneten Werten, die wir im folgenden deshalb mit Zn'_{ex} bezeichnen wollen, insofern nicht identisch

zu sein, als das Ausmaß des isotopischen Austausches nicht allein von Zn_{ex} , sondern auch von der Verteilung der Zn-Chelate im Körper und — im Hinblick auf die Möglichkeit, daß die Austauschreaktionen relativ langsam verlaufen — von ihrer Ausscheidungsgeschwindigkeit abhängt. Beispielsweise würde Zn'_{ex} im Falle eines Chelats, dessen Verteilung sich ausschließlich auf den extrazellulären Raum beschränkt und das schnell ausgeschieden wird, kleiner sein als bei einem Chelat, das langsam ausgeschieden wird und dem auch der intrazelluläre Raum zugänglich ist.

Es lassen sich tatsächlich einige Befunde anführen, die zugunsten eines unterschiedlichen Verhaltens von ÄDTA und DTPA bzw. verschieden hoher Chelatdosen sprechen: Während bei Ratten nach i.v. Injektion von Ca-ÄDTA · ^{14}C 95% mit dem Urin ausgeschieden werden, beträgt die Ausscheidung von Ca-DTPA · ^{14}C nur 87% (Foreman, 1960; Foreman u. a., 1953); die ^{14}C -Aktivität der Organe ist dementsprechend im Falle der DTPA höher und die Plasmaclearance verlangsamt. Stevens u. a. (1962) finden beim Menschen keinen Unterschied in der Ausscheidungsrate von i.v. injizierten 25 μM Ca-ÄDTA · ^{14}C bzw. Ca-DTPA · ^{14}C , indem nach 4 Stunden etwa 60% und nach 24 Stunden etwa 90% beider Chelate mit dem Urin ausgeschieden werden. Es ist bemerkenswert, daß Foreman und Trujillo (1954) beim Menschen nach i.v. Injektion einer etwa 200mal höheren Dosis von Ca-ÄDTA · ^{14}C bereits nach 4 Stunden eine Ausscheidung von 90% feststellten.

Die oben zur Diskussion gestellte Erklärungsmöglichkeit kann somit nicht ohne weiteres von der Hand gewiesen werden, es ist jedoch fraglich, ob die sehr ausgeprägten Unterschiede der Zn'_{ex} -Werte ausschließlich dadurch bedingt sind. Dies gilt um so mehr, als der höchste Zn'_{ex} -Wert nur wenig kleiner ist als der gesamte Zn-Gehalt des Körpers, der bei einer 175 g schweren Ratte rund 80 μM beträgt, wovon die im Knochen und in den Haaren enthaltenen 30 μM von vornherein für einen isotopischen Austausch nicht in Frage kommen dürfen (Gilbert u. Taylor, 1956).

Näherliegend ist somit die Annahme, daß neben dem isotopischen Austausch auch eine echte Abspaltung des chelierten Zn und seine Bindung durch endogene Liganden stattfindet, so daß Zn'_{ex} sich dementsprechend aus endogenem und abgespaltenem Zn (Zn_r) zusammensetzen würde. Das ^{65}Zn würde sich in diesem Fall auf Zn'_{ex} einerseits und $Zn_L - Zn_r$ andererseits entsprechend dem Verhältnis der beiden Kompartimente verteilen. Da weder Zn'_{ex} noch Zn_r sich aus den experimentellen Daten berechnen lassen, versuchten wir, die Stabilität der Zn-Chelate im biologischen Milieu unter der vereinfachenden Annahme $Zn'_{ex} = 0$ zu berechnen. Das Ausmaß des Zerfalls der Zn-Chelate ist dann in erster Näherung durch die „scheinbare“ Stabilitätskonstante

$$K' = \frac{[Zn_L - Zn_r]}{[Zn_r] \cdot [L_f]} \quad (3)$$

bestimmt. Im Falle von 1:1-Chelaten ist $[Zn_r] = [L_f]$ (Zn-freier Chelatbildner). Die Klammern in Gleichung (3) bedeuten Konzentrationen; da jedoch das biologische Verdünnungsvolumen für die Chelate nach dem oben Gesagten nicht bekannt ist, wurden bei den Berechnungen die Konzentrationen in $Mol \cdot kg^{-1}$ Körpergewicht ausgedrückt. Dieser Punkt ist übrigens irrelevant, da es sich bei K' um keine Stabilitätskonstante in der strengen Definition des Begriffs handelt. Zn_r läßt sich in Analogie zu $^{65}Zn_r$ berechnen; es ist jedoch zu berücksichtigen,

daß $A_2 = 79\%$ nur für trägerfreies ^{65}Zn gilt, während bei isotopischer Verdünnung A_2 mit steigender Trägerdosis abnimmt (Abb. 2). Es ist somit $[\text{Zn}_r] = [\text{Zn}_L] A_2/A'_2$. Die A'_2 -Werte für ein gegebenes $A_2 \text{Zn}_L/100$ entsprechen den A_2 -Werten in Abbildung 2. Nach Einsetzen in (3) und Umformung erhält man:

$$K' = \frac{A'_2/A_2 - 1}{[\text{Zn}_L] A_2/A'_2} \quad (4)$$

Abbildung 8 zeigt, daß die nach Gleichung (4) berechneten K' -Werte nicht konstant sind, vielmehr von der Art und der Dosis des Zn-Chelats abhängen. Dies steht jedoch nicht in Widerspruch zu der Definition von K' , die ja keine Stabilitätskonstante im eigentlichen Sinne ist, sondern von der Konkurrenz endogener Liganden und damit aber auch von dem physiologischen Verdünnungsvolumen der Zn-Chelate abhängt. Falls weiterhin die zugrunde gelegte Annahme $\text{Zn}'_{\text{ex}} \ll 1 \mu\text{M}$ nicht zutrifft, d. h. $\text{Zn}'_{\text{ex}} \geq \text{Zn}_r$ ist, wird die Berechnung von K' nach (4) zu niedrige Werte ergeben. Es ist in diesem Zusammenhang auf das Ergebnis einer von uns durchgeführten Untersuchung zu verweisen, die auf der Doppelmarkierung von Zn-Chelaten mit ^{65}Zn und ^{14}C basiert und die getrennte Erfassung von Zn'_{ex} und Zn_r gestattet (*Harmuth-Hoene u. a.*, 1966): Zn'_{ex} wurde nach Verabfolgung von $9 \mu\text{M}$ Zn-DTPA zu $1,23 \mu\text{M}$ berechnet, während die vorliegende Untersuchung für die gleiche Dosis einen eindeutig höheren Wert von $2,7 \mu\text{M}$ ergibt (vgl. Abb. 8). Die Differenz zwischen beiden Werten sollte somit Zn_r entsprechen.

Bei gleichzeitiger Verabreichung von Zn-freien Liganden ist die Retention von ^{65}Zn infolge des hierbei zu erwartenden geringeren Chelaterfalls und der Mobilisierung von endogenem Zn herabgesetzt (Abb. 3, 5 u. 6). Die Kurve der Abbildung 6 zeigt, daß etwa 80% von $^{65}\text{Zn}_r$ erst bei einem Ca-DTPA/Zn-DTPA-Verhältnis von $\geq 0,1$ abnehmen, während die restlichen 20% bereits auch bei wesentlich kleinerem Überschuß an Ca-DTPA den Kontrollwert nicht erreichen. Es liegt die Annahme nahe, die Abnahme der 80% ausmachenden Fraktion auf Mobilisierung von endogenem Zn zurückzuführen. Daß die Ca-Chelate sich bezüglich der Zn-Mobilisierung bei später Verabfolgung als relativ unwirksam erwiesen (Abb. 7 u. Tab. 1), steht hierzu nicht in Widerspruch, da das ^{65}Zn offenbar sehr schnell in Bindungen überführt wird, die es der Mobilisierung durch Chelate weitgehend entziehen. Es ist hier auf die Versuche von *Millar u. a.* (1954) hinzuweisen; die Zn-Ausscheidung im 24-Stunden-Urin von Ratten wurde von etwa $0,04 \mu\text{M}$ durch Verabreichung von $300 \mu\text{M}$ Ca-ÄDTA auf 1 bis $2 \mu\text{M}$ erhöht.

Wie in der Einleitung begründet wurde, war eine höhere Effektivität der DTPA zu erwarten; DTPA sollte mehr endogenes Zn als ÄDTA mobilisieren, desgleichen sollte der Zerfall der Zn-DTPA und damit auch $^{65}\text{Zn}_r$ kleiner sein als im Falle der ÄDTA. Tatsächlich finden wir jedoch — in Übereinstimmung mit den eingangs zitierten Ergebnissen von *Rosoff u. a.* (1965) — bei *kleinen* Dosen eine eindeutige und statistisch gesichert höhere Effektivität der ÄDTA (vgl. Abb. 4 u. 8).

Eine befriedigende Erklärung für diesen unerwarteten Befund kann vorerst noch nicht gegeben werden. Es ist äußerst unwahrscheinlich, daß Unterschiede in der Austauschgeschwindigkeit hierbei eine ursächliche Rolle spielen. Zn-ÄDTA ist nach *Margerum* (1959) ein ausgesprochener Gleichgewichtskomplex, d. h.,

Bildung und Zerfall des Chelats erfolgen mit einer nicht meßbar hohen Geschwindigkeit. Es besteht kein zwingender Grund, ein in dieser Beziehung exzeptionelles Verhalten der DTPA anzunehmen. Unwahrscheinlich und experimentell auch durch *Foreman* (1960) widerlegt ist ebenfalls die Annahme, daß DTPA im Gegensatz zu ÄDTA metabolisch abgebaut wird. Auf der anderen Seite könnte jedoch die unterschiedliche Zahl der Ligandenatome der DTPA und ÄDTA einen entscheidenden Faktor darstellen. Die 1:1-Zn-Chelate der DTPA und ÄDTA weisen drei bzw. zwei negative Ladungen auf. Infolge der höheren Zahl der Ligandenatome der DTPA können neben den 1:1-Chelaten auch andere Chelatspezies — Zn₂-DTPA (*Anderegg* u. a., 1959) und Zn-[DTPA]₂ (*Chaberek* u. a., 1959) — gebildet werden, wobei die Wahrscheinlichkeit für die Bildung dieser Chelate von dem Konzentrationsverhältnis Ligand/Zn abhängt. Es wären somit bei der quantitativen Analyse auch die Stabilitäten dieser Chelatspezies sowie die Möglichkeit zu berücksichtigen, daß die verschiedenen Chelate ein unterschiedliches physiologisches Verdünnungsvolumen und damit auch unterschiedliche K' und Zn'ex aufweisen. Diese Betrachtungen weiterzuführen, erscheint im Moment wenig sinnvoll, und es sollten die Ergebnisse von Untersuchungen abgewartet werden, die wir mit anderer Methodik und gezielter Fragestellung in Angriff genommen haben.

Abschließend sei noch kurz zu der in der Einleitung erwähnten Frage der therapeutischen Verwendung von Zn-DTPA Stellung genommen. Beim Menschen käme eine Dosierung von etwa $60 \mu\text{M} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ in Frage (*Catsch*, 1964 a). Die vorliegende Untersuchung machte für diesen Dosisbereich unter Berücksichtigung der Ergebnisse von *Harmuth-Hoene* u. a. (1966) eine Zn-Retention von $\sim 9 \mu\text{M} \cdot \text{kg}^{-1}$ wahrscheinlich. Bei einem Erwachsenen würden somit etwa 37 mg Zn reteniert werden. Die LD_{50%} beträgt bei parenteraler Verabreichung und bei kleinen Nagetieren $\sim 500 \mu\text{M} \cdot \text{kg}^{-1}$ (*Caujolle* u. a., 1964; *Franz*, 1962) und ist damit etwa 50mal größer als der oben angeführte Zn_T-Wert. Nach *Vallee* u. a. (1949) treten beim Menschen nach i.v. Injektion von $8 \mu\text{M}$ Zn (als Glukonat) keine Nebenerscheinungen auf. Wenn auch somit keine Bedenken gegen die praktische Verwendung von Zn-DTPA zu bestehen scheinen, wäre doch sicherheitshalber ein geringfügiger Überschuß von maximal 10% Ca-DTPA zu empfehlen, da hierbei nach den vorliegenden Ergebnissen und denen von *Harmuth-Hoene* u. a. (1966) die Abspaltung von Zn weitgehend unterdrückt wird.

Zusammenfassung

Es wurde der Einfluß der isotopischen Verdünnung sowie verschiedener Dosen der Ca- und Zn-Chelate der DTPA und ÄDTA auf die Retention von ⁶⁵Zn im Körper der Ratte untersucht. Die isotopische Verdünnung führt zu einer geringfügigen Abnahme der Retention. Die nachträgliche Verabfolgung von Zn-Chelaten bewirkt eine größere Mobilisation von ⁶⁵Zn als die Ca-Chelate, so daß ein isotopischer Austausch anzunehmen ist. Die Analyse der Versuche, in denen mit ⁶⁵Zn markierte Zn-Chelate injiziert wurden, zeigte, daß die ⁶⁵Zn-Retention sowohl durch isotopischen Austausch als auch Abspaltung von Zn bedingt ist. Die dabei auftretende Retention von ⁶⁵Zn kann durch relativ kleinen Überschuß an Zn-freiem Liganden unterdrückt werden. Ausgeprägte Unterschiede in der Wirksamkeit von DTPA und ÄDTA machen die Annahme eines unterschiedlichen metabolischen Verhaltens beider Chelatbildner wahrscheinlich. Die aus den Ergebnissen folgenden Konsequenzen für die therapeutische Verwendung von Zn-DTPA werden diskutiert.

Summary

The retention of ^{65}Zn by the rat as influenced by isotopic dilution and different doses of the Ca- and Zn-chelates of EDTA and DTPA was studied. Stable carrier leads to a slightly diminished retention. Delayed administration of Zn-chelates is more effective in mobilizing ^{65}Zn from the body than Ca-chelates. Consequently isotopic exchange has to be assumed. The analysis of experiments with Zn-chelates labelled by ^{65}Zn indicates that the retention of ^{65}Zn is due to isotopic exchange as well as to a genuine retention of Zn. The ^{65}Zn -retention in this case is markedly suppressed by a relatively small excess of free ligand. Pronounced differences in the efficacy of EDTA and DTPA suggest a different metabolic behaviour of the chelating agents. The implication of these findings for the therapeutic usage of Zn-DTPA is discussed.

Résumé

L'influence de la dilution isotopique et de différentes doses des chélates de Ca et de Zn du DTPA et de l'EDTA sur la rétention de ^{65}Zn par l'organisme du rat a fait l'objet de notre étude. La dilution isotopique entraîne une diminution peu importante de cette rétention, tandis qu'une administration retardée des chélates de Zn provoque une plus grande mobilisation du ^{65}Zn que les chélates de Ca. Cette constatation laisse supposer l'existence d'un échange isotopique du Zn dans l'organisme. L'analyse des expériences effectuées avec des chélates de Zn marqués au ^{65}Zn indique que la rétention du ^{65}Zn est due autant à un échange isotopique qu'à une véritable rétention du Zn après acission du chélate. Dans ce cas la rétention du ^{65}Zn peut être facilement abaissée par un excès relativement faible des ligands dépourvus de l'atome de Zn. Des différences prononcées dans l'efficacité de l'EDTA et du DTPA suggèrent un comportement métabolique différent de ces deux agents chélateurs. Les conséquences découlant des résultats pour un emploi thérapeutique du chélate de Zn du DTPA sont discutées.

Schrifttum

Anderegg, G., P. Nügeli, F. Müller, G. Schwarzenbach: *Helv. chim. Acta* 42 (1959), 827. — Catsch, A.: *Strahlenschutz in Forschung und Praxis*, Bd. 3, S. 183. Freiburg/Brsg. 1963; *Radioactive Metal Mobilization in Medicine*. Springfield/Ill. 1964 a; *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak.* 246 (1964 b), 316; *Nukleonik* 8 (1966), 56. — Catsch, A., D. Kh. Lè: *Experientia* (Basel) 21 (1965), 724. — Catsch, A., D. Kh. Lè, D. Chambault: *Int. J. Radiat. Biol.* 8 (1964), 35. — Catsch, A., E. von Wedelstaedt: *Experientia* (Basel) 21 (1965), 210. — Cavjolle, F., P. H. Chang, G. Mamy, M. Moulas, L. T. N. Suong: *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 258 (1964), 375. — Chaberek, S., A. E. Frost, M. A. Doran, N. J. Bicknell: *J. Inorg. Nucl. Chem.* 11 (1959), 184. — Foreman, H.: *Metal-Binding in Medicine*, S. 82. Philadelphia-Montreal 1960. — Foreman, H., T. T. Trujillo: *J. Lab. clin. Med.* 43 (1954), 566. — Foreman, H., M. Vier, M. Magee: *J. biol. Chem.* 203 (1953), 1045. — Franz, R. D.: *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak.* 244 (1962), 17. — Gilbert, J. G. F., D. M. Taylor: *Biochim. biophys. Acta* (Amst.) 21 (1956), 545. — Harmuth-Hoene, A.-E., A. Catsch, V. Nigrovic, F. Bohne: *Int. J. Radiat. Biol.* 1966 (im Druck). — Heller, H.-J.: *Diagnosis and Treatment of Radioactive Poisoning*, S. 347. Wien 1963. — Heller, H.-J., A. Catsch: *Strahlentherapie* 109 (1959), 464. — Margerum, D. W.: *J. Phys. Chem.* 63 (1959), 336. — Millar, M. J., M. J. Fischer, C. A. Mawson, P. V. Elcoate: *Nature* 174 (1954), 881. — Nigrovic, V.: *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak.* 249 (1964), 206. — Rosoff, B., A. Methfessel, H. Spencer: *Fed. Proc.* 24 (1965), 170. — Schwarzenbach, G., R. Gut, G. Anderegg: *Helv. chim. Acta* 37 (1954), 937. — Stand, F., B. Rosoff, G. L. Williams, H. Spencer: *J. Pharmacol. exp. Ther.* 138 (1962), 399. — Stevens, E., B. Rosoff, M. Weiner, H. Spencer: *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* 111 (1962), 235. — Vallee, B. L., R. G. Fluharty, J. G. Gibson: *Acta Un. int. Cancr.* 6 (1949), 869.

Anschrift d. Verf.: Prof. Dr. med. A. Catsch und Dr. med. D. Kh. Lè, Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe, 75 Karlsruhe, Postfach 947.