

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM
KARLSRUHE**

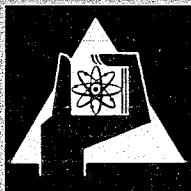
November 1968

KFK 926

Institut für Strahlenbiologie

Metabolismus und Toxizität therapeutischer Chelatbildner

4. Mitteilung: Exkretion und metabolischer Abbau von ÄDTA und DTPA
F. Havlíček, F. Bohne, H. Zorn
5. Mitteilung: Der physiologische Verdünnungsraum des ÄDTA und DTPA
F. Bohne, A.-E. Harmuth-Hoene, K. Kürzinger, F. Havlíček



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

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

Sonderdruck

136/5

1968

Strahlentherapie

**Archiv für klinische
und experimentelle Radiologie**

Metabolismus und Toxizität therapeutischer Chelatbildner

4. Mitteilung: Exkretion und metabolischer Abbau von ÄDTA und DTPA

Frantisek Havlicek, Felicitas Bohne, Herbert Zorn

Aus dem Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe



URBAN & SCHWARZENBERG

MÜNCHEN - BERLIN - WIEN

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

© Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien 1968

Metabolismus und Toxizität therapeutischer Chelatbildner

4. Mitteilung: Exkretion und metabolischer Abbau von ÄDTA und DTPA

Frantisek Havlíček, Felicitas Bohne, Herbert Zorn

Aus dem Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

Es wird allgemein angenommen, daß die Chelate der Äthylendiamintetraessigsäure (ÄDTA) und Diäthylentriaminpentaessigsäure (DTPA) sich im Säugetierorganismus metabolisch inert verhalten, d. h. nicht abgebaut und unverändert ausgeschieden werden. Dieser Annahme liegen Untersuchungen von Foreman und Mitarb. (1953, 1960) mit den ^{14}C -markierten Chelaten an Ratten zugrunde: Neben einer schnellen Ausscheidung mit dem Urin (95% in 4 Stunden) ergab sich eine sehr viel geringere mit den Faeces (3% in 24 Stunden). Die im Urin ausgeschiedene ^{14}C -Aktivität zeigte bei der Papierchromatographie den gleichen R_f -Wert wie ^{14}C -ÄDTA. Im ausgeatmeten CO_2 fand sich nur $< 0,1\%$ der injizierten Aktivität.

Die Wiederholung und Erweiterung der Untersuchungen schien uns insofern angezeigt, als von Foreman und Mitarb. nur eine Chelatedosis untersucht wurde; auch waren die Chelate nur in der C-2-Acetat-Stellung markiert. Daher bestimmten wir erneut das Verhalten der ^{14}C -markierten Chelate mit einer im Vergleich zu der von Foreman und Mitarb. verwendeten Methodik empfindlicheren Meßtechnik, und zwar 1. die „Veratmung“ von in verschiedenen Positionen markierter Ca-ÄDTA, um nachzuweisen, ob und an welcher Stelle des Moleküls ein Abbau stattfindet. 2. Außerdem bestimmten wir die Exkretion und „Veratmung“ der in der C-1-Acetat-Stellung markierten Ca- und Y(III)-ÄDTA sowie der Ca- und Zn-DTPA in unterschiedlicher Dosierung; dadurch sollte festgestellt werden, ob die Dosis oder das chelierte Metall das metabolische Verhalten der Komplexe beeinflussen.

Methodik

Die Versuche wurden an Ratten des Heiligenberg-Inzuchtstammes durchgeführt, deren mittleres Körpergewicht 210 g betrug. Die Chelate wurden in 0,5 ml Wasser (pH 7,4) gelöst und in verschiedener Dosierung intraperitoneal injiziert. Die ^{14}C -Aktivi-

tät der Injektionslösungen lag zwischen 10 und $20 \mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$. Für die Exkretionsversuche hielten wir die Tiere in speziellen Stoffwechselfäßen, in denen die Tiere immobilisiert sind und die die Sammlung von Urin und Faeces ohne gegenseitige Kontamination ermöglichen. In einem speziellen Versuch wurden die Nierengefäße abgebunden; die Ligatur erfolgte in Äthernarkose von der dorsalen Seite her.

Urinproben von 0,25 ml wurden mit 1 ml Hyaminhydroxid bei 50°C 1 bis 3 Stunden verdaut. Die klare Lösung versetzten wir nach Abkühlen mit 18 ml Szintillator folgender Zusammensetzung: 6% Naphtalin, 2% Äthylenglykol, 1% Methanol, 0,4% 2,5-Diphenyloxazol (PPO), 0,002% 2,2'-p-Phenylen-bis-(5-Phenyloxazol) (POPOP) in Dioxan (p. A.). Die Faeces wurden homogenisiert und aliquote Teile bei 650°C im Sauerstoffstrom verbrannt. Das $^{14}\text{CO}_2$ wurde nach Bagglioni (1965) in 12 ml eines Gemisches aus Äthanolamin und Methanol absorbiert und mit 10 ml Szintillator (0,4% PPO, 0,01% POPOP in Toluol [p. A.]) versetzt.

Bei den „Veratmungs“-Versuchen befanden sich die Tiere in einem Exsikkator auf einem Drahtnetz, unter dem sich Kieselgel befand. Durch den Exsikkator wurde Luft gesaugt; die Abluft passierte eine Waschflasche mit Kieselgel zum Trocknen der ausgeatmeten Luft, eine Waschflasche mit Methanol und zwei Waschflaschen mit je 12 ml CO_2 -Absorptionsgemisch (Zusammensetzung s. oben). 24 ml dieser Mischung absorbieren etwa 2,7 g CO_2 . Die von einer Ratte in 24 Stunden ausgeatmete Menge CO_2 beträgt etwa 3,4 g. Durch Wechseln der Absorptionsflüssigkeit nach 4 und 8 Stunden war die Gewähr gegeben, daß das ausgeatmete CO_2 vollständig absorbiert wird. Zur Messung versetzten wir das Absorptionsgemisch mit dem oben beschriebenen Szintillator.

Alle ^{14}C -Proben maßen wir bei 0°C in einem Flüssigszintillationszähler zusammen mit einem Standard (d. h. einem aliquoten Teil der Injektionslösung), der auf die gleiche Weise vorbehandelt war wie die Proben der entsprechenden Versuchsreihe. Der verschiedenen starken Löschung von Proben wurde durch entsprechende Korrekturen Rechnung getragen.

Wir verwendeten folgende Chelate: ÄDTA-1-¹⁴C-Acetat (spezifische Aktivität 10 mCi · mmol⁻¹), ÄDTA-2-¹⁴C-Acetat (21,6 mCi · mmol⁻¹) vom Radiochemical Centre, Amersham, ÄDTA-¹⁴C-Äthylen (1,58 mCi · mmol⁻¹) von Mallinckrodt Nuclear, Orlando, Florida/USA, und DTPA-1-¹⁴C-Acetat (4,95 mCi · mmol⁻¹) von den Geigy Research Laboratories, Ardsley, N.Y. Zu Kontrollzwecken führten wir außerdem Veratmungsversuche mit Na-Acetat-1-¹⁴C (10 mCi · mmol⁻¹) und Na-Acetat-2-¹⁴C (38 mCi · mmol⁻¹) (Radiochemical Centre, Amersham) durch.

Um sicher zu sein, daß die verwendeten Chelate nicht mit Autoradiolyseprodukten verunreinigt waren, testeten wir die Reinheit von Na₂Ca-ÄDTA-1-¹⁴C und Na₃H₂-DTPA-1-¹⁴C mittels Hochspannungselektrophorese auf Whatman-Papier Nr. 3MM in Veronalpuffer (pH 8,5). Die Laufzeit betrug 1 Stunde bei einer Feldstärke von 47 V · cm⁻¹. Die aufgetragene Chelatlösung war 2 bis 4 µl, was einer Aktivität von etwa 60 nCi entspricht. Eine weitere Reinheitsprüfung erfolgte durch aufsteigende Papierchromatographie (Papier von Schleicher & Schüll Nr. 2043a). Die ¹⁴C-Chelatlösungen waren mit 400 µmol Träger versetzt, die ¹⁴C-Aktivität betrug 12 µCi · ml⁻¹, die aufgetragene Menge 2 µl. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Methanol/Pyridin/Wasser (50:30:20 V/V), die Laufzeit betrug 120 Minuten, und die Lokalisation erfolgte durch ein Sprühreagens nach *Sykora* und *Eybl* (1966). Die ¹⁴C-Aktivität der Phero- und Chromatogramme wurde mit Hilfe eines aus einem doppelten fensterlosen Methandurchflußzähler bestehenden Scanners registriert.

Ergebnisse

Die Ausscheidungsdaten sind in Tabelle 1 wiedergegeben. In Übereinstimmung mit *Foreman* und Mitarb. (1953, 1960) erscheinen 90 bis 95% der injizierten Dosis innerhalb von 24 Stunden im Urin, während die faecale Ausscheidung sehr gering ist. Eine Dosisabhängigkeit der Ausscheidung im Urin läßt sich statistisch nicht sichern. Die niedrigen Mittelwerte bei beiden 1-µmol-Dosen sind da-

durch bedingt, daß bei einem bzw. zwei Tieren die 4-Stunden-Werte (offenbar infolge unvollständiger Entleerung der Harnblase) extrem niedrig sind. Bei den 1-µmol-DTPA-Dosen tritt jedoch in den Faeces eine signifikant niedrigere Aktivität auf als nach höheren Dosen. Die Ergebnisse der Veratmungsversuche sind in den Tabellen 2 bis 4 zusammengefaßt. In der Tabelle 2 ist die in 24 Stunden ausge-

Tabelle 2. ¹⁴CO₂ in der Atemluft (24 Stunden) nach Injektion von 100 µmol Ca-ÄDTA, in verschiedenen Positionen markiert. Mittelwerte mit Mutungsbereichen (P = 0,05). n = Zahl der Tiere.

Position des ¹⁴ C	n	% der ¹⁴ C-Dosis
-COOH	6	1,191 ± 0,212
-*CH ₂ -COOH	10	1,234 ± 0,062
Äthylen	5	0,0513 ± 0,024

atmete ¹⁴C-Aktivität nach Injektion verschiedenen markierter Ca-ÄDTA wiedergegeben. Sie beträgt bei C-1- und C-2-markierter ÄDTA ~ 1%, während sie im Falle der am Äthylen markierten Verbindung vernachlässigbar ist. Tabelle 3 zeigt, daß ÄDTA einem stärkeren

Tabelle 3. ¹⁴CO₂ in der Atemluft (24 Stunden) nach Injektion markierter Chelatbildner (¹⁴C-1-Acetat). Mittelwerte mit Mutungsbereichen (P = 0,05). n = Zahl der Tiere.

Chelat	Dosis (µmol)	n	% der ¹⁴ C-Dosis
Ca-ÄDTA	1	4	1,353 ± 0,148
	100	6	1,191 ± 0,212
	100	6	1,175 ± 0,168
Ca-DTPA	1	8	0,724 ± 0,108
	100	5	0,852 ± 0,100
	1000	3	0,848 ± 0,129
Zn-DTPA	1	6	0,860 ± 0,152
	100	6	0,546 ± 0,177

Abbau als DTPA unterliegt. Beide Verbindungen zeigen in ihrem Verhalten keine Abhängigkeit von der Dosis und von der Art des chelierten Metallions. Die ausgeatmete ¹⁴CO₂-Menge ist, wie Tabelle 4 zeigt, während der

Tabelle 1. ¹⁴C-Ausscheidung (% der ¹⁴C-Dosis) nach Injektion markierter Chelate (¹⁴C-1-Acetat). Mittelwerte mit Mutungsbereichen (P = 0,05). n = Zahl der Tiere.

Chelat	Dosis (µmol)	n	Urin		Faeces	
			0 bis 4 Stunden	4 bis 24 Stunden	0 bis 24 Stunden	0 bis 24 Stunden
Ca-ÄDTA	100	6	---	---	94,90 ± 6,11	0,267 ± 0,172
Ca-DTPA	1	6	66,41 ± 21,40	29,00 ± 24,15	95,41 ± 4,42	0,223 ± 0,123
	100	6	82,59 ± 4,65	8,68 ± 5,71	91,11 ± 2,47	0,581 ± 0,103
Zn-DTPA	1	5	66,91 ± 28,45	24,21 ± 23,99	91,13 ± 5,80	0,359 ± 0,164
	100	5	83,71 ± 4,03	6,03 ± 3,55	89,75 ± 4,08	0,551 ± 0,139

Tabelle 4. ^{14}C in der Atemluft nach Injektion von 100 μmol Ca-ÄDTA (^{14}C -2-Acetat). Mittelwerte mit Mutungsbereichen ($P = 0,05$). n = Zahl der Tiere.

Gruppe	n	Zeit nach der Injektion		
		0 bis 4 Std.	4 bis 8 Std.	0 bis 8 Std.
Kontr. Tiere mit Nierenlig.	10	$0,786 \pm 0,158$	$0,306 \pm 0,073$	$1,090 \pm 0,553$
	6	$0,446 \pm 0,088$	$0,464 \pm 0,180$	$0,910 \pm 0,185$

ersten 4 Stunden am größten (etwa 70% der gesamten in 24 Stunden ausgeatmeten $^{14}\text{CO}_2$ -Menge) und sinkt in den folgenden 4 Stunden auf die Hälfte des Anfangswertes ab.

Der Versuch an Tieren mit abgebandenen Nierengefäßen ergab in den ersten 4 Stunden eine geringere $^{14}\text{CO}_2$ -Ausscheidung, die jedoch in den nächsten 4 Stunden konstant blieb.

Diskussion

Das wesentlichste Ergebnis unserer Untersuchung, der Nachweis einer im Vergleich zu den Daten von Foreman und Mitarb. wesentlich höheren $^{14}\text{CO}_2$ -Ausscheidung, führt sofort zu der Frage, ob von dem metabolischen Abbau die Chelate selbst oder die bei einer evtl. Autoradiolyse entstehenden Produkte betroffen werden.

Im Hinblick auf die Tatsache, daß die ^{14}C -markierten Verbindungen in nicht sehr hohen spezifischen Aktivitäten und in trockener Form vorlagen, dürfte eine stärkere Autoradiolyse von vornherein wenig wahrscheinlich sein. Dies bestätigten wir in entsprechenden Versuchen: Frisch zubereitete Chelatlösungen zeigen bei der Hochspannungselektrophorese nur einen und sehr scharfen Peak (Abb. 1 a, b). Auch bei der chromatographischen Prüfung wiesen der ^{14}C -Peak und die anfärbbare Zone einen identischen R_f -Wert von 0,24 auf, und andere ^{14}C -haltige Zonen waren nicht nachweisbar. Erst bei einer 3 Wochen alten und bei Zimmertemperatur gelagerten ^{14}C -ÄDTA- bzw. DTPA-Lösung tritt im Elektropherogramm ein zweiter Peak auf (Abb. 1 c). Die gleichen Lösungen ergaben jedoch im Tierversuch bei einer Dosis von 1 μmol eine Ausatmung von $1,264 \pm 0,189\%$ (ÄDTA) und $0,820 \pm 0,130\%$ (DTPA) $^{14}\text{CO}_2$ Werte, die mit der Veratmung frisch hergestellter Lösungen (vgl. Tab. 3) praktisch identisch sind. Wird eine ^{14}C -DTPA-Lösung mit der sehr hohen γ -Dosis (^{60}Co) von

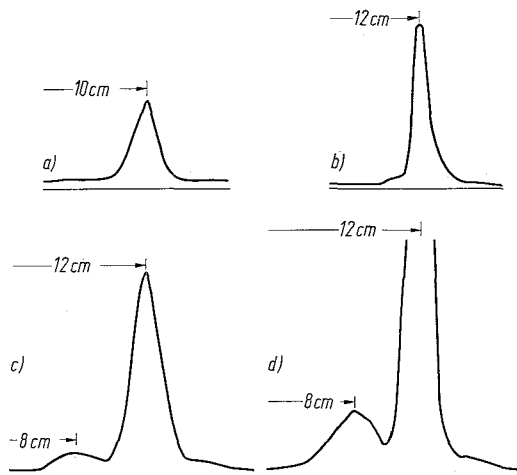


Abb. 1. ^{14}C -Verteilung in den Elektropherogrammen. Die Pfeile geben die Laufstrecke der Peaks an. a) $\text{Na}_2\text{Ca-ÄDTA-1-}^{14}\text{C}$ -Acetat, frische Lösung; b) $\text{Na}_3\text{H}_2\text{-DTPA-1-}^{14}\text{C}$ -Acetat, frische Lösung; c) $\text{Na}_3\text{H}_2\text{-DTPA-1-}^{14}\text{C}$ -Acetat, 3 Wochen alte Lösung; d) $\text{Na}_3\text{H}_2\text{-DTPA-1-}^{14}\text{C}$ -Acetat, mit 20 MR bestrahlte Lösung.

20 MR bestrahlt, vergrößert sich der zweite Peak eindeutig (Abb. 1 d); desgleichen auch die *in vivo*-Veratmung ($1,310 \pm 0,092\%$ $^{14}\text{CO}_2$). Auf Grund der vorstehend angeführten Befunde dürfen wir mit großer Wahrscheinlichkeit folgern, daß der Ausatmung von $^{14}\text{CO}_2$ ein metabolischer Abbau der Chelate selbst ursächlich zugrunde liegt, wobei der Abbau nach den Ergebnissen der Tabelle 2 im wesentlichen die Acetatgruppen betrifft. Tolbert und Mitarb. (1955) zeigten, daß nach Verabfolgung von ^{14}C -markiertem Acetat, Glukose u. a. m. innerhalb von 24 Stunden nur maximal 60 bis 70% der ^{14}C -Aktivität im ausgeatmeten CO_2 auftreten. Unsere Kontrollversuche mit ^{14}C -markiertem Na-Acetat bestätigen diesen Befund sowohl für die in der C-1- als auch in der C-2-Stellung markierte Verbindung. Man kann daher annehmen, daß der tatsächliche Abbau der Chelate um 30 bis 40% höher liegt, d. h. 1,3 bis 1,7% beträgt.

Der Vergleich der ^{14}C -Veratmung von Ca- und Y(III)-ÄDTA bzw. von Ca- und Zn-DTPA (Tab. 3) läßt erkennen, daß das Ausmaß der Metabolisierung weder von der Dosis noch vom chelierten Metallion, sondern allein von der Art des Liganden abhängt. Der Unterschied zwischen der 1- und 100- μmol -Zn-DTPA-Dosis ist statistisch nicht signifikant.

Da die Chelate vorwiegend mit dem Urin ausgeschieden werden, wird nach Ligatur der Nierengefäße im Blutplasma eine konstant hohe Chelatkonzentration beobachtet (*Bohne* u. Mitarb., 1968; *Foreman* u. Mitarb., 1953, 1960). Da bei intakter Nierenfunktion die Plasmaclearance der Chelate mit einer HWZ von ~ 20 Min. sehr schnell verläuft (*Bohne* u. Mitarb., 1968), konnte erwartet werden, daß der metabolische Chelatabbau bei ausgeschalteten Nieren ein wesentlich stärkeres Ausmaß erreicht. Interessanterweise ist dies jedoch nicht der Fall (Tab. 4); darüber hinaus bleibt die $^{14}\text{CO}_2$ -Ausscheidung während der gesamten Versuchsdauer — im Gegensatz zu der Kontrolle — konstant. Dieser Befund legt die Annahme nahe, daß der Abbau hauptsächlich in den Nieren stattfindet und andere Organe und das Blut in geringerem Ausmaß zur Metabolisierung der Chelate befähigt sind. Was die faecale Ausscheidung der Chelate betrifft, so dürfte die Diskrepanz zwischen unseren Befunden und den etwa 10mal höheren Werten bei *Foreman* und Mitarb. methodisch, d. h. durch die Art der Stoffwechsellkäfige bedingt sein. Zur Frage, warum im Falle höherer DTPA-Dosen eine prozentual höhere und statistisch gesicherte ^{14}C -Menge in den Faeces auftritt (Tab. 1), kann nicht Stellung genommen werden, solange die Dosisabhängigkeit der Chelatverteilung im Organismus nicht bestimmt und noch nicht geklärt ist, ob es sich bei dem in den Faeces ausgeschiedenen ^{14}C um intakte Chelate und/oder deren Abbauprodukte handelt.

Abschließend stellt sich die Frage nach der biologischen Relevanz der von uns festgestell-

ten Metabolisierung der Chelate. Da der Abbau maximal 2% betragen dürfte, ist dieser Befund für die Dekorporationseffektivität der Chelatbildner sicherlich bedeutungslos. Anders könnten jedoch die Verhältnisse im Fall der Toxizität der Chelatbildner liegen. Wie von *Catsch* (1968) ausführlich diskutiert wird, haben die zahlreichen Untersuchungen zu dieser Frage bisher noch kein in sich geschlossenes und widerspruchsfreies Bild vermittelt. Insbesondere ergeben sich für die Hypothese, die allgemeine und Nephrotoxizität der Chelatbildner auf eine Wechselwirkung mit endogenen Spurenmetallen zurückzuführen, gewisse Schwierigkeiten. Es bietet sich nun durch die vorliegende Untersuchung die reizvolle Annahme an, nicht in den intakten Chelaten, sondern in den Metaboliten die für die toxischen Wirkungen verantwortlichen Agentien zu suchen. Man muß sich dabei vergegenwärtigen, daß die akute LD 50% der Ca-Chelate relativ sehr hoch ist (12,5 mmol DTPA \cdot kg $^{-1}$, *Catsch*, 1967, und 17,4 mmol ÄDTA \cdot kg $^{-1}$, *Günther*, 1968) und der prozentual geringe Abbau — absolut betrachtet — nicht zu vernachlässigen ist. Unter diesem Gesichtspunkt könnte die Koinzidenz der offenbar stärkeren Metabolisierung der Chelate in den Nieren mit der Tatsache, daß die Toxizität sich vornehmlich in einer Nierenschädigung manifestiert, mehr als nur zufällig sein. Definitive Aussagen werden natürlich erst dann möglich sein, wenn die Metabolite chemisch identifiziert sind; mit entsprechenden Untersuchungen wurde begonnen.

Zusammenfassung

Es wurde die Ausscheidung von ^{14}C -markierten Chelaten der ÄDTA und DTPA bei Ratten untersucht. Innerhalb von 24 Stunden wurden 95% der Aktivität im Urin, 0,5% mit den Faeces und 0,7 bis 1,3% mit dem ausgeatmeten CO_2 ausgeschieden. Der daraus gefolgerte metabolische Abbau der Chelate betrifft die Acetatgruppen und hängt nicht von der Art des chelierten Metallions und der Chelatdosis, wohl aber vom Liganden ab. Der Abbau scheint bevorzugt in den Nieren stattzufinden.

Summary

The excretion of ^{14}C -labelled EDTA and DTPA was studied in rats. Within 24 hours 95% of the radioactivity was excreted with the urine, 0.5% with the feces, and 0.7 to 1.3% with the expired CO_2 . From the experiments a metabolic degradation of the chelates can be deduced which concerns mainly the acetate groupings. This decay does not depend on the chelated metal or on the dose of the chelate but only on the ligand. It seems likely that the metabolic decay takes place in the kidneys.

Résumé

L'excrétion des chélates EDTA et DTPA a été examinée chez le rat. Dans les 24 heures, 95% de la radioactivité est éliminée dans les urines, 0,5% dans les faeces et 0,7 à 1,3% dans le CO₂ expiré. La dégradation métabolique des chélates que l'on peut déduire concerne essentiellement les groupements acétates. Elle ne dépend ni du métal chélaté ni de la dose de chélaté, mais seulement du ligand. Il semble que la dégradation métabolique se fasse dans les reins.

Schrifttum

- Baggioni, M.: *Experientia* 21 (1965), 731.
Bohne, F., A.-E. Harmuth-Hoene, K. Kürzinger, F. Hawlíček: *Strahlentherapie* 136 (1968), 609.
Catsch, A.: *Arzneimittel-Forsch.* 17 (1967), 493; *Naturwissenschaften* 55 (1968), 473.
Foreman, H., M. Vier, M. Magee: *J. biol. Chem.* 203 (1953), 1045.
Foreman, H., C. C. Lushbaugh, M. Magee, G. Humason: *LAMS* 2445 (1960), 67.
Günther, R.: *KFK-Report* 821 (1968).
Sykora, J., V. Eybl: *Die Pharmazie* 21 (1966), 563.
Tolbert, B. M., J. H. Lawrence, M. Calvin: *Proc. Int. Conference for Peaceful Uses of Atomic Energy* 12 (1955), 281.

Für technische Assistenz danken wir Frau R. Poessnecker.

Anschrift d. Verff.: Ing. F. Hawlíček, Dr. rer. nat. F. Bohne, Dipl.-Chem. H. Zorn, Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe, 75 Karlsruhe 1, Postfach 3640.

Sonderdruck

136/5

1968

Strahlentherapie

**Archiv für klinische
und experimentelle Radiologie**

Metabolismus und Toxizität therapeutischer Chelatbildner

5. Mitteilung: Der physiologische Verdünnungsraum des ÄDTA und DTPA

Felicitas Bohne, Anna-Elisabeth Harmuth-Hoene, Klaus Kürzinger, Frantisek Havlicek

Aus dem Institut für Strahlenbiologie am Kernforschungszentrum Karlsruhe



URBAN & SCHWARZENBERG

MÜNCHEN - BERLIN - WIEN

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

© Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien 1968

Metabolismus und Toxizität therapeutischer Chelatbildner

5. Mitteilung: Der physiologische Verdünnungsraum des ÄDTA und DTPA

Felicitas Bohne, Anna-Elisabeth Harmuth-Hoene, Klaus Kürzinger, Frantisek Havlíček

Aus dem Institut für Strahlenbiologie am Kernforschungszentrum Karlsruhe

Nach Verabfolgung niedriger Dosen von ^{65}Zn -DTPA (Diäthylentriaminpentaacetat) wird bei der Ratte und beim Menschen ein außergewöhnliches Verhalten beobachtet: Die ^{65}Zn -Retention ist größer als im Falle äquimolarer Dosen von ^{65}Zn -ÄDTA (Äthylendiamintetraacetat), obwohl Zn-DTPA das stabilere Chelat ist (Catsch u. Lé, 1966; Harmuth-Hoene, 1967; Jammers, 1967; Rosoff u. Mitarb., 1965). Niedrige Dosen von Ca-DTPA verhalten sich ebenfalls exzeptionell, indem im Urin weniger Zink ausgeschieden wird, als auf Grund der effektiven Stabilitätskonstante zu erwarten ist (Havlíček, 1967). Nachdem Catsch und Lé (1965, 1966) sowie Harmuth-Hoene und Mitarb. (1966, 1967) zeigten, daß der ^{65}Zn -Retention ein Isotopenaustausch mit dem endogenen stabilen Zn zugrunde liegt, liegt die Annahme nahe, daß für kleine Dosen von Zn-DTPA eine größere austauschbare Zn-Menge, d. h. ein größerer physiologischer Verdünnungsraum, als für höhere Dosen bzw. ÄDTA zur Verfügung steht. Dies könnte dann der Fall sein, wenn im Blut das bimetallische Zn_2 -DTPA gebildet wird, das nur eine negative Ladung besitzt und leichter in den intrazellulären Raum als das dreifach geladene Zn-DTPA eindringen könnte. Die Bildung des bimetallischen Chelats wäre bei höheren DTPA-Dosen vernachlässigbar, weil der Zn-Gehalt des Blutplasmas mit $\sim 2 \mu\text{mol}$ bei einer 200 g schweren Ratte (Gilbert u. Taylor, 1956) relativ klein ist. Zur Prüfung dieser Hypothese bietet sich die Bestimmung des physiologischen Verdünnungsraumes auf Grund der Plasmaclearance der Chelate an. Von Foreman und Mitarb. (1953, 1960) wurde das metabolische Verhalten ^{14}C -markierter ÄDTA und DTPA nur für hohe Dosen und nur für ihre Ca-Chelate bestimmt; die Ergebnisse sind für unsere Fragestellung somit nicht informativ.

Material und Methodik

Versuchstiere waren weibliche Ratten des Heiligenberg-Inzuchtstammes mit einem mittleren Körper-

gewicht von rund 200 g. Die Tiere erhielten intravenös die ^{14}C -markierten Ca- bzw. Zn-Chelate des ÄDTA und DTPA in Dosen von 1 bzw. 100 μmol pro Tier, gelöst in 0,25 ml H_2O (pH 7,4). Die pro Tier injizierte Aktivität betrug 2,8 bis 4,0 μCi . ÄDTA-2- ^{14}C -Acetat lag in einer spezifischen Aktivität von 63 $\mu\text{Ci} \cdot \text{mg}^{-1}$ vor (Radiochemical Centre, Amersham); die spezifische Aktivität des DTPA-1- ^{14}C -Acetats betrug 7,1 $\mu\text{Ci} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Geigy Research Laboratories, Ardsley, N. Y.). Die Chelate wurden mittels Hochspannungselektrophorese auf ihre Reinheit geprüft, wobei sich keine Hinweise für eine Autoradiolyse ergaben (vgl. hierzu Havlíček u. Mitarb., 1968).

In der ersten Versuchsreihe wurden je 4 Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Injektion der Chelate getötet und Blut entnommen, und zwar nach 10, 20, 30, 40, 60 und 80 Minuten sowie 2, 4, 8 und 24 Stunden. In einer zweiten Versuchsreihe wurden den Tieren vor der Injektion der Chelate die Nierengefäße abgebunden, um die Ausscheidung der Chelate mit dem Urin zu verhindern; 6 Tiere pro Gruppe wurden 6 Stunden später getötet und Blut entnommen. Da orientierende Vorversuche in Übereinstimmung mit Foreman und Mitarb. (1953) feststellten, daß die Chelate nicht in nennenswerterem Maße in die Erythrozyten eindringen, bestimmten wir die ^{14}C -Aktivität nur im Blutserum. Pro Tier wurden 3 bis 4 Proben zur Aktivitätsmessung folgendermaßen vorbereitet: Auf je 0,3 ml Serum ließen wir 4 Stunden bei 50°C 1 ml Hyaminhydroxid einwirken. Die klare Lösung wurde nach Abkühlen mit 18 ml Szintillator mit folgender Zusammensetzung versetzt: 2 ml Äthylenglycol, 6 g Naphthalin, 1 ml Methanol, 0,4 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO), 0,002 g 2,2-p-Phenylbenzyl-(5-phenyloxazol) (POPOP) ad 100 ml Dioxan (p.a.). Die Proben wurden im Flüssig-Szintillationszähler bei 0°C gemessen, wobei verschieden starke Löschung der Proben korrigiert wurde.

In der ersten Versuchsreihe bestimmten wir bei den Tieren, die nach 24 Stunden getötet wurden, außerdem den ^{14}C -Gehalt einiger Organe. Nach Entbluten der Tiere und Perfusion mit physiologischer NaCl-Lösung wurden Leber, Nieren, Diaphyse des Femur, Duodenum und Jejunum entnommen; aus der Diaphyse wurde das Knochenmark, aus den Darmabschnitten der Inhalt entfernt. Die Organe trock-

neten wir bei 50° C und verbrannten sie anschließend bei 650° C im O₂-Strom. Das hierbei entstehende ¹⁴CO₂ wurde in Äthanolamin absorbiert und nach Mischen mit 10 ml Szintillator (0,4 g PPO, 0,01 g POPOP ad 100 ml Toluol) im Flüssigszintillationszähler gemessen (Baggiolini, 1965). Bei der Papierelektrophorese der Plasmaproteine verwendeten wir Papier Nr. 2043 a (Schleicher & Schüll) und Veronalpuffer (p_H = 8,6, J = 0,075). Die Laufzeit betrug 16 Stunden bei 2,9 V·cm⁻¹. Die Hochspannungselektrophorese wurde auf MN-Filtrierkarton 827 durchgeführt. Die Laufzeit war 20 Minuten bei 100 V·cm⁻¹; Veronalpuffer: p_H = 8,6, J = 0,05. Die radiometrische Auswertung der Pherogramme erfolgte mittels zweier fensterloser Methandurchflußzähler.

Ergebnisse

Die Abbildungen 1 und 2 zeigen, daß die Serumclearance bis zu einem Zeitpunkt von 80 Minuten einer einfachen Exponentialfunktion folgt und zu späteren Zeitpunkten eine sehr ausgeprägte Verlangsamung erfährt. Für die „schnelle“ Komponente ergibt die Regressionsanalyse keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen, und die Abnahme der ¹⁴C-Konzentration kann durch eine gemeinsame Gerade wiedergegeben werden, deren HWZ 17 Minuten beträgt. Die Extrapolation der Geraden nach t = 0 Stunden ergibt eine ¹⁴C-Konzentration

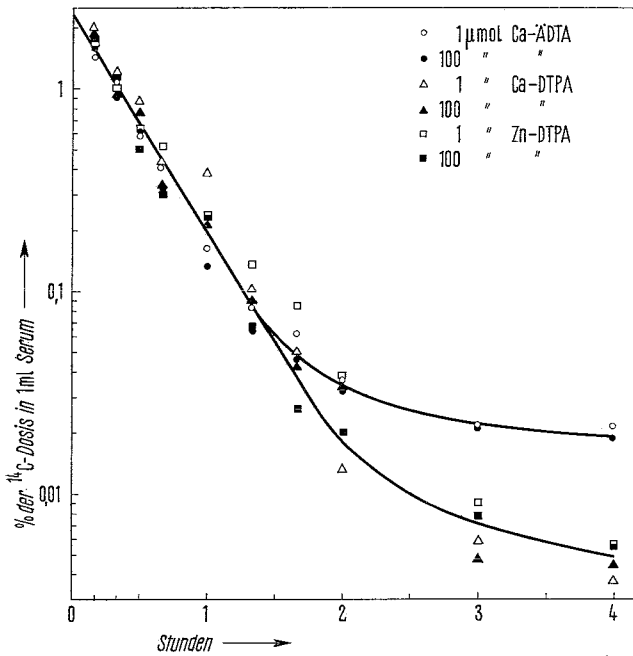


Abb. 1. Serumclearance der ¹⁴C-Chelate bis zur 4. Stunde.

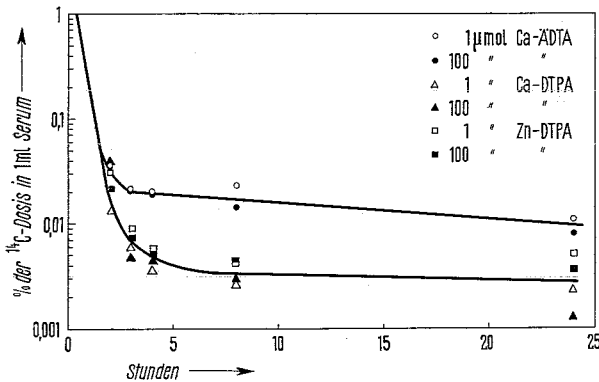


Abb. 2. Serumclearance der ¹⁴C-Chelate bis zur 24. Stunde.

Physiologischer Verdünnungsraum der Chelate

im Serum (C_0), aus der sich der sog. physiologische Verdünnungsraum nach $V = 100/C_0$ berechnet. Eine Zusammenfassung dieser Werte in den einzelnen Gruppen gibt Tabelle 1; V beträgt im Mittel 41,5 ml, was 21,2% des Körpergewichts entspricht.

Die „langsame“ Fraktion der Clearance ist im Falle des ÄDTA gesichert höher als bei DTPA, wobei aber wiederum kein statistisch gesicherter Unterschied in dem Verhalten verschiedener Dosen bzw. der Ca- und Zn-Chelate des DTPA vorliegt. Die HWZ läßt sich, da die Punkte bei 24 Stunden eine relativ starke Streuung aufweisen, nur ungenau abschätzen; sie beträgt im Falle des ÄDTA ~ 40 Stunden, bei DTPA ~ 20 Stunden, wobei der Unterschied jedoch statistisch nicht gesichert ist.

Der ^{14}C -Gehalt von Duodenum, Jejunum und Diaphyse 24 Stunden nach Injektion der Chelate beträgt im Mittel 0,019, 0,013 bzw. 0,018% der ^{14}C -Dosis. Höher dagegen ist er in Leber und Nieren (Tab. 2), wobei der prozentuale ^{14}C -Gehalt mit steigender Dosis abnimmt. Die Varianzanalyse (Tab. 3) zeigt, daß die Dosisabhängigkeit statistische Signifikanz erreicht, während die Art des Liganden bzw. des chelierten Metalls offenbar ohne Einfluß ist. Bei den Tieren mit abgebundenen Nierengefäßen (Tab. 1) beträgt das über alle Gruppen gemittelte Verdünnungsvolumen 23,3% des Körpergewichts. Ein statistisch gesicherter Unterschied zwischen den verschiedenen Chelaten bzw. Dosen liegt auch in dieser Versuchsreihe nicht vor. Vergleicht man die einzelnen

Tabelle 1. Physiologischer Verdünnungsraum der Chelate, berechnet auf Grund der nach $t = 0$ extrapolierten ^{14}C -Konzentration des Bluteserums (A) und der ^{14}C -Konzentration (6 Stunden) bei Ratten mit abgebundenen Nierengefäßen (B). Mutungsbereiche für $P = 0,05$.

Chelat	Dosis (μmol)	% des Körpergewichts	
		A	B
Ca-ÄDTA	1	21,2 (18,8–27,0)	25,1 (22,9–27,6)
	100	19,8 (15,1–26,1)	25,8 (21,9–30,2)
Ca-DTPA	1	18,9 (14,3–24,9)	23,4 (20,5–26,8)
	100	21,5 (17,0–26,9)	23,7 (20,7–27,1)
Zn-DTPA	1	23,1 (18,8–28,5)	21,9 (19,2–25,3)
	100	22,5 (15,9–31,8)	20,0 (17,8–22,4)

Tabelle 2. ^{14}C -Gehalt der Leber und Nieren 24 Stunden nach Injektion der Chelate. Einfacher Standardfehler.

Chelat	Dosis (μmol)	% der ^{14}C -Dosis	
		Leber	Niere
Ca-ÄDTA	1	0,308 ($\pm 0,035$)	0,133 ($\pm 0,010$)
	100	0,161 ($\pm 0,002$)	0,074 ($\pm 0,017$)
Ca-DTPA	1	0,560 ($\pm 0,145$)	0,176 ($\pm 0,011$)
	100	0,178 ($\pm 0,024$)	0,096 ($\pm 0,019$)
Zn-DTPA	1	0,303 ($\pm 0,028$)	0,171 ($\pm 0,076$)
	100	0,215 ($\pm 0,031$)	0,116 ($\pm 0,018$)

Mittelwerte mit denen der ersten Versuchsreihe, so sind sie im Falle der Ca-Chelate ausnahmslos höher, so daß es im Hinblick auf die Gleichsinnigkeit der (im einzelnen statistisch nicht gesicherten) Differenzen gerechtfertigt ist, *gemeinsam* für alle Gruppen zu prüfen, ob der Unterschied signifikant ist, was mittels der sog. z-Transformation der einzelnen t-Werte (Quenouille, 1952) erfolgt. Hierbei zeigt sich, daß der Verdünnungsraum der Ca-Chelate in der zweiten Versuchsreihe mit $P = 0,02$ gesichert größer als in der ersten Versuchsreihe ist. Für die Zn-Chelate dagegen kann ein solcher Unterschied weder gesichert noch ausgeschlossen werden.

Zur Klärung der Frage, ob die Nephroxizität hoher Chelatdosen einen Einfluß auf den physiologischen Verdünnungsraum und die Clearancegeschwindigkeit ausübt, erhielten 27 Tiere an fünf aufeinanderfolgenden Tagen Ca-ÄDTA; die Dosis betrug $4 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. 24 Stunden nach der letzten Chelatdosis wurde $1 \mu\text{mol } ^{14}\text{C}$ -ÄDTA injiziert. Abbildung 3 zeigt, daß die Clearance mit einer HWZ von 30 Minuten eindeutig verlangsamt ist; der physiologische Verdünnungsraum ist mit 28,0 (21,5 bis 36,9) % des Körpergewichts etwas größer als in der Kontrollserie (Tab. 1), wobei jedoch der Unterschied keine statistische Signifikanz erreicht.

Tabelle 3. Ergebnisse der Varianzanalyse der in Tabelle 2 wiedergegebenen Daten. a) Ca-ÄDTA vs. Ca-DTPA und b) Ca-DTPA vs. Zn-DTPA.

Art der Varianz	P	
	Leber	Niere
a) Chelatbildner	0,13	0,05
Dosis	0,001	0,005
Wechselwirkung	0,16	~ 1
b) Metallion	0,20	~ 1
Dosis	0,012	0,0015
Wechselwirkung	0,12	~ 1

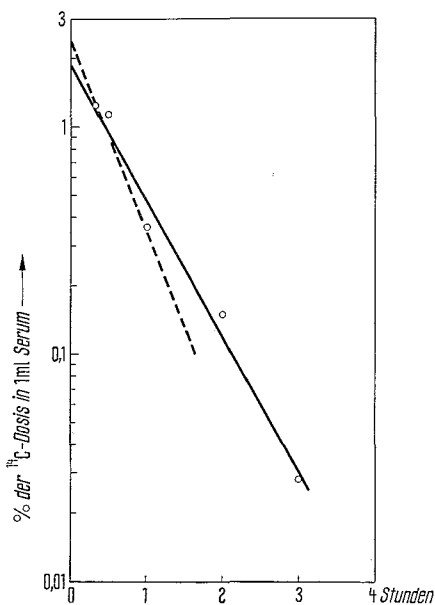


Abb. 3. Serumclearance von 1 μmol ^{14}C -ÄDTA bei mit ÄDTA vergifteten Tieren (○—). Clearance der Kontrollserie (---) (Abb. 1).

Diskussion

Wir stellten für ÄDTA und DTPA eine multi-exponentielle Serumclearance fest; dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Aronson und Hammond (1964), jedoch im Widerspruch zu Foreman (1960), der die Existenz einer „langsamen“ Fraktion nur für DTPA charakteristisch hält. Da die ^{14}C -Konzentration der Leber und insbesondere der Niere nach 24 Stunden höher als im Serum ist (vgl. Tab. 2), können wir annehmen, daß ein bestimmter Bruchteil des Chelats in den intrazellulären Raum gelangt. Der zweite Term der Clearancekurven könnte somit durch die Redifusion des Chelats aus dem intrazellulären in den extrazellulären Raum bedingt sein. Das dieser Vorstellung entsprechende Kompartimentmodell ist in Abbildung 4 wiedergegeben. Mit V_1 und V_2 wird das Volumen (ml) des extrazellulären bzw. intrazellulären Raums bezeichnet. M_0 sei die injizierte Chelatdosis, M_i die Menge des Chelats im i -ten Kompartiment ($\%$ von M_0) und c_{ij} die Transferraten ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$). Die Unterteilung von V_1 in das intra- und extrakapilläre Wasser bleibt im Modell unberücksichtigt. Dies ist zulässig, da die Clearance während der 1. Stunde linear ist,

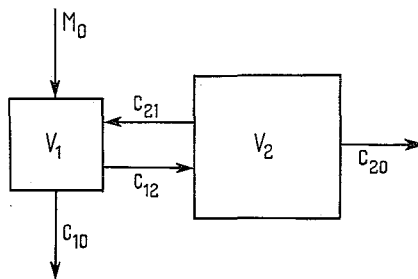


Abb. 4. Schematische Darstellung des Kompartimentmodells. Einzelheiten s. Text.

d. h., die Verteilung des Chelats über beide Räume offenbar sehr schnell erfolgt. V_2 wird als einheitliches Kompartiment aufgefaßt; das ist es sicherlich nicht, für die Analyse jedoch irrelevant, da uns die Zeitabhängigkeit von M_1 interessiert. c_{20} soll der Tatsache Rechnung tragen, daß das Chelat aus einem Subkompartiment von V_2 mit den Faeces ausgeschieden wird (Havlíček u. Mitarb., 1968) und evtl. im Zellinnern irreversibel gebunden oder abgebaut werden kann.

Für den Chelatgehalt der Kompartimente in Abhängigkeit von der Zeit t gelten die Gleichungen:

$$\begin{aligned} \frac{dM_1}{dt} &= -c_{10}M_1/V_1 - c_{12}M_1/V_1 + c_{21}M_2/V_2 \\ \frac{dM_2}{dt} &= c_{12}M_1/V_1 - c_{21}M_2/V_2 - c_{20}M_2/V_2 \end{aligned}$$

Für $t = 0$ ist $M_1 = M_0$ und $M_2 = 0$. Die Auflösung des Systems von gekoppelten Differentialgleichungen gibt für $M_1(t)$ folgenden Ausdruck:

$$M_1(t) = \frac{M_0}{a} \left[\left(\frac{a-b}{2} + c \right) \exp\left(\frac{a-b}{2} t \right) + \left(\frac{a+b}{2} - c \right) \exp\left(-\frac{a+b}{2} t \right) \right],$$

wobei

$$a = \left[\left(\frac{c_{21} + c_{20}}{V_2} + \frac{c_{10} + c_{12}}{V_1} \right)^2 - \frac{4(c_{10}c_{21} + c_{10}c_{20} + c_{12}c_{20})}{V_1V_2} \right]^{1/2}$$

$$b = \frac{c_{21} + c_{20}}{V_2} + \frac{c_{10} + c_{12}}{V_1}$$

$$c = \frac{c_{21} + c_{20}}{V_2}$$

Setzt man in obiger Gleichung das Verhältnis $V_2/V_1 = 2,5$ und macht bezüglich der c_{ij} -Werte verschiedene Annahmen, so können die experi-

Tabelle 4. Zusammenstellung der c_{ij} -Werte. Einzelheiten s. Text.

	ÄDTA		DTPA	
	a	b	a	b
c_{10}	0,42	0,97	1,25	1,38
c_{12}	1,26	0,68	0,42	0,32
c_{21}	0,050	0,088	0,028	0,038
c_{20}	0,048	0,0085	0,0083	0

mentellen Kurven der Abbildungen 1 und 2 recht genau durch Kurven mit den in Tabelle 4 zusammengestellten c_{ij} -Werten wiedergegeben werden. Es liegt insofern eine Vieldeutigkeit vor, als die Kurven gleich gut durch c_{ij} -Werte beschrieben werden können, die zwischen den in Tabelle 4 mit a) und b) bezeichneten Extremwerten variieren. Zu beachten ist hierbei, daß die Raten voneinander abhängen; die Zunahme von c_{10} ist beispielsweise mit einer Abnahme von c_{12} verbunden. Die Tatsache, daß $c_{12} \gg c_{21}$ ist, spräche dafür, daß es sich bei dem Transfer durch die Zellmembran nicht um einen passiven Prozeß handelt, da der Transfer dann richtungsunabhängig sein sollte. Daß $c_{21} \gg c_{20}$ ist, erklärt sich zwanglos mit der Annahme, daß die durch c_{20} charakterisierte Ausscheidung nur in einem Subkompartiment von V_2 (z. B. in der Leber) wirksam wird. Sowohl c_{12} als auch c_{21} sind im Falle des DTPA kleiner als bei ÄDTA; anders ausgedrückt, könnten die nur 2fach negativ geladenen Chelationen des ÄDTA die Zellmembran leichter als die 3 negative Ladungen aufweisenden DTPA-Chelate permeieren.

ÄDTA-Chelate werden glomerulär filtriert, und eine tubuläre Sekretion kann mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden (Forland u. Mitarb., 1966; Stacy u. Thorburn, 1966). Der c_{10} -Wert, der die Ausscheidung durch die Nieren beschreibt, ist im Falle des DTPA größer als bei ÄDTA; dies würde bedeuten, daß DTPA auch tubulär sezerniert wird. Diese an sich schon unwahrscheinliche Annahme wird durch den Nachweis widerlegt, daß das Clearanceverhältnis $^{113m}\text{In-DTPA}/\text{Inulin} = 0,99$ ist (Reba u. Mitarb., 1968). Da die Streuung der Versuchspunkte beträchtlich ist (Abb. 1), können jedoch ein steilerer Verlauf der ÄDTA-Kurve und mit DTPA identische c_{10} -Werte nicht ausgeschlossen werden. Die integrale Ausscheidung der Chelate mit dem Urin berechnet sich nach der Gleichung:

$$U(t) = \frac{c_{10}}{V_1} \int_0^t M_1(t) dt + K.$$

Aus der Randwertbetrachtung folgt, daß die Integrationskonstante $K = 0$ ist. Für die kumulative 4-Stunden-Ausscheidung erhält man nach Maßgabe der c_{ij} -Werte in Tabelle 4 im Falle des ÄDTA eine Ausscheidung von 27 bis 63%, bei DTPA von 82 bis 96%. Die experimentell durch Havlíček und Mitarb. (1968) ermittelte Ausscheidung beträgt für beide Chelate $\sim 83\%$. Die Diskrepanz im Falle des ÄDTA stellt somit erneut die Gültigkeit des c_{10} -Werts in Tabelle 4 in Frage.

Schaltet man die Ausscheidung durch Unterbindung der Nierengefäße aus, wird $c_{10} = 0$. Die HWZ des schnellen Terms der Clearance würde somit durch c_{12} bestimmt sein und $\sim 0,693 V_1/c_{12}$ betragen, d. h., in der Größenordnung von 1 Stunde liegen. Da nun $c_{21} \ll c_{12}$ und $V_1 < V_2$ sind, sollte die Chelatkonzentration im Serum nach 6 Stunden erheblich kleiner sein als der Wert, den man bei Extrapolation der Clearancekurve in Abbildung 1 nach $t = 0$ erhält. Dies ist jedoch nicht der Fall und der physiologische Verdünnungsraum nach Ausschaltung der Nieren nur geringfügig erhöht (Tab. 1).

Fassen wir zusammen: Es ist im Hinblick auf die Daten der Tabelle 2 ein intrazellulärer Transfer der Chelate anzunehmen, der jedoch einen relativ nur sehr kleinen Bruchteil der Chelatdosis betrifft; das physiologische Verdünnungsvolumen des weitaus größeren Anteils entspricht dem extrazellulären Wasser. Wegen der weiter oben angeführten Widersprüche ist es jedoch nicht möglich, die langsame Komponente der Serumclearance dem Wiedereintritt des Chelats aus dem intrazellulären Raum in das extrazelluläre Kompartiment zuzuordnen, und es muß somit nach einer anderen Erklärung gesucht werden. Es bietet sich die Annahme an, daß ein bestimmter und mit einer großen HWZ ausgeschiedener Bruchteil der ^{14}C -Aktivität nicht als freie und/oder intakte Chelatmolekel vorliegt. Zur Prüfung dieser Hypothese wurde einer Ratte mit einem Körpergewicht von 190 g das mit ^{14}C markierte Ca-ÄDTA in einer Aktivität von 200 μCi i.v. injiziert, das Tier nach 24 Stunden getötet, Blut entnommen und das Plasma einer Hochspannungselektrophorese unterworfen. Die nach 24 Stunden sehr niedrige ^{14}C -Konzentra-

tion des Bluts und die Nachweisempfindlichkeit des Scanners machten es notwendig, eine Plasamenge (100 μ l) aufzutragen, die wesentlich größer als das bezüglich der Trennung der Proteinfraktionen optimale Volumen ist. Als Kontrolle diente Plasma, dem 14 C-ÄDTA in vitro unmittelbar vor der elektrophoretischen Trennung zugesetzt wurde. Das Ergebnis ist in Abbildung 5 wiedergegeben: Während das Kontrollplasma praktisch nur einen Peak zeigt, finden wir im Plasma des Versuchstiers zwei distinkte Peaks, von denen der erste mit dem Peak der Kontrolle identisch ist; die etwas geringere Laufstrecke sowie die angedeutete Asymmetrie des Peaks dürften methodisch bedingt sein. Was den zweiten und erheblich breiteren Peak, der 55% der 14 C-Aktivität ausmacht, betrifft, liegt die Annahme einer 14 C-Bindung durch die Proteine nahe. Zu ihrer Verifizierung untersuchten wir das Plasma mittels Niederspannungselektrophorese. Da jedoch auch in diesem Fall 30 μ l Plasma aufgetragen werden mußten, gelang trotz der langen Laufzeit von 16 Stunden eine nur unbefriedigende Trennung der Proteinfraktionen (Abb. 6). Auch hier ist der erste Peak des „freien“ Chelats nachweisbar; die langsamer wandernde Aktivität der Abbildung 5 läßt nun aber zwei Peaks erkennen, deren Lage mit der des Albumins bzw. der Globuline zusammenfällt.

Eine Bindung von ÄDTA durch Plasmaproteine wurde auf Grund von mehr oder weniger über-

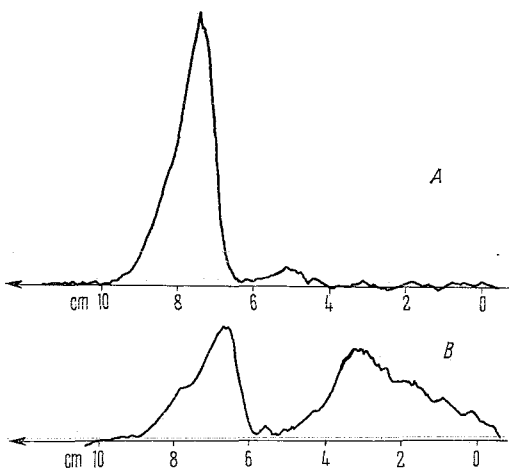


Abb. 5. 14 C-Verteilung in den Plasmapherogrammen (Hochspannungselektrophorese), A: in vitro-Plasma, B: in vivo-Plasma.

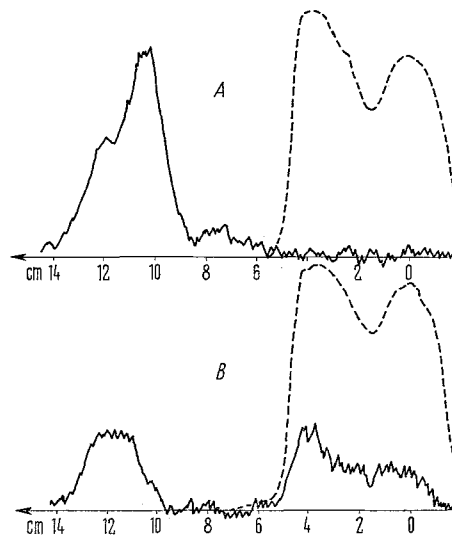


Abb. 6. 14 C-Verteilung (—) und Proteinverteilung (---) in den Plasmapherogrammen (Niederspannungselektrophorese). A: in vitro-Plasma, B: in vivo-Plasma.

zeugenden Befunden bereits von *Anghileri* (1968), *Aronson* und *Hammond* (1964) sowie *Stacy* und *Thornburn* (1966) vermutet, ohne daß jedoch Aussagen über die Art der Bindung gemacht wurden; man könnte hier beispielsweise an die Bildung robuster ternärer Komplexe denken. In diesem Zusammenhang sollte jedoch nicht übersehen werden, daß ein kleiner Bruchteil der Chelate einem metabolischen Abbau unterliegt (*Havlíček* u. Mitarb., 1968). Damit ist aber auch die Möglichkeit gegeben, daß für die 14 C-Markierung der Proteine nicht die intakten Chelatanionen, sondern deren Metabolite verantwortlich sind. Als ein Hinweis in diese Richtung wäre anzuführen, daß ÄDTA in stärkerem Maße als DTPA metabolisch abgebaut wird (*Havlíček* u. Mitarb., 1968) und daß die langsam ausgeschiedene Fraktion im Falle von ÄDTA größer als bei DTPA ist (Abb. 2). Die gleichen Überlegungen gelten natürlich auch für die in den Organen nachgewiesene Aktivität (Tab. 2), d. h., es erhebt sich die Frage, ob es sich bei der intrazellulären 14 C-Anreicherung um intakte Chelate und/oder um Metabolite handelt. Eine endgültige Klärung dieser Fragen ist späteren Untersuchungen vorbehalten.

Der Nachweis einer in vivo- 14 C-Markierung der Proteine scheint uns — unabhängig davon, welche Reaktionen hierfür verantwortlich

sind — eine befriedigende Erklärung zu geben, warum ein gewisser Bruchteil der Chelate sehr langsam ausgeschieden wird.

Doolan und Mitarb. (1967) stellten fest, daß die 24-Stunden-Ausscheidung von ^{14}C -ÄDTA mit dem Urin bei Tieren, die mit toxischen ÄDTA-Dosen vorbehandelt wurden, das gleiche Ausmaß wie bei Kontrolltieren erreicht; die Autoren folgern, daß die durch ÄDTA induzierten nephrotischen Veränderungen keinen Einfluß auf die Ausscheidungsfunktion der Nieren ausüben. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch, daß die Clearance bei ÄDTA-vergifteten Tieren eindeutig verlangsamt ist (Abb. 3), d. h., daß offenbar eine Hemmung der glomerulären Filtration vorliegt; eine Annahme, die

im Hinblick auf die ödematöse Verklumpung der Glomerula (Catsch, 1964; Weber, in Vorbereitung) plausibel erscheint.

Die in der Einleitung erwähnte Hypothese, daß es im Blut nach Verabfolgung niedriger Zn-DTPA-Dosen zu der Bildung von $\text{Zn}_2\text{-DTPA}$ kommt, das ein größeres physiologisches Verdünnungsvolumen besitzt, wird durch die vorliegende Untersuchung nicht bestätigt, indem sowohl die Clearance als auch der Verdünnungsraum von $1\ \mu\text{mol Zn-DTPA}$ sich nicht abweichend verhalten. Es sei hier auf neuere Untersuchungen von Jammers und Catsch (1967) verwiesen, die eine grundsätzlich andere Erklärung für die exzeptionelle Wirkung niedriger Zn-DTPA-Dosen vorschlagen.

Zusammenfassung

Es wurde bei der Ratte die Serumclearance der ^{14}C -markierten Ca-ÄDTA, Ca- und Zn-DTPA in Abhängigkeit von der Dosis bestimmt. Die Clearance ist multiexponentiell, indem $\geq 99\%$ der Chelate mit einer Halbwertszeit von 17 Minuten, der restliche Bruchteil, der im Falle von ÄDTA größer als bei DTPA ist, mit einer Halbwertszeit von ≥ 20 Stunden ausgeschieden wird. Chelatdosis und Art des chelierten Metallions sind ohne Einfluß. Der physiologische Verdünnungsraum der Chelate entspricht dem extrazellulären Wasser, die intrazelluläre Anreicherung ist nur geringfügig. Es konnte auf Grund von Versuchen mit abgebundenen Nierengefäßen sowie durch eine Kompartimentanalyse und elektrophoretische Untersuchung des Blutplasmas gezeigt werden, daß der langsame Term der Clearancefunktion nicht auf einer Rediffusion des Chelats aus dem intrazellulären Raum beruht, sondern auf einer Bindung der Chelate bzw. ihrer Metabolite durch die Plasmaproteine.

Summary

The serum clearance of ^{14}C -labelled Ca-EDTA as well as Ca- and Zn-DTPA as a function of dose was determined in rats. The clearance is multiexponential: $\geq 99\%$ of the chelates are cleared with a half-time of 17 minutes while the remaining fraction, which is larger in the case of EDTA than with DTPA, has a half time of ≥ 20 hours. Chelate dosis and the kind of chelated metal ion are without influence. The physiological dilution space of the chelates corresponds to the extracellular water. There is only a very slight intracellular accumulation of ^{14}C . It could be shown by experiments with ligated kidney vessels, as well as by a compartmental analysis and by electrophoretic separation of blood plasma that the slow term of the clearance function is not due to a rediffusion of the chelates from the intracellular space but to binding of the chelates or their metabolites, respectively, by the plasma proteins.

Résumé

On a étudié chez les rats la clearance du CaEDTA marqué au C^{14} , ainsi que celle du CaDTPA et du ZnDTPA en fonction de la dose. La clearance est multiexponentielle: $\geq 99\%$ des chélatés sont éliminés avec un demi-temps de 17 minutes tandis que la fraction restante, plus importante dans le cas de l'EDTA que dans celui du DTPA, a un demi-temps égal ou supérieur à 20 heures. Le taux du chélate et l'espèce du métalion chélaté n'ont pas d'influence. Le compartiment de dilution physiologique des chélatés correspond à l'eau extracellulaire. L'accumulation intracellulaire est très faible. On a pu montrer par la ligature des vaisseaux du rein, ainsi que par analyse compartimentale et électrophorèse du plasma sanguin que la fraction lente de la clearance n'est pas due à une rediffusion des chélatés venant de l'espace intracellulaire mais à la liaison des chélatés ou de leurs métabolites avec les protéines du plasma.

Schrifttum

- Anghileri, L. J.*: Naturwissenschaften 55 (1968), 182.
Aronson, A. L., P. B. Hammond: J. Pharmacol. exp. Ther. 146 (1964), 241.
Baggiolini, M.: Experientia 21 (1965), 731.
Catsch, A.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 246 (1964), 316.
Catsch, A., D. Kh. Lê: Experientia 21 (1965), 724; Strahlentherapie 130 (1966), 557.
Doolan, P. D., S. L. Schwartz, J. R. Hayes, J. C. Mullen, N. B. Cummings: Toxicol. appl. Pharmacol. 10 (1967), 481.
Foreman, H.: Metal-Binding in Medicine, S. 82. Philadelphia-Montreal 1960.
Foreman, H., C. C. Lushbaugh, M. Magee, L. Humason: LAMS-2445 (1960), 67.
Foreman, H., M. Vier, M. Magee: J. Biol. Chem. 203 (1953), 1045.
Forland, M., T. N. Pullman, A. R. Lavender, I. Aho: J. Pharmacol. exp. Ther. 153 (1966), 142.
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. 10 (1966), 479.
Harmuth-Hoene, A.-E.: Strahlentherapie 134 (1967), 110.
Havlicek, F.: Strahlentherapie 134 (1967), 296.
Havlicek, F., F. Bohne, H. Zorn: Strahlentherapie 136 (1968), 604.
Jammers, W.: KFK-Report 614 (1967).
Jammers, W., A. Catsch: Naturwissenschaften 54 (1967), 588.
Quenouille, M. H.: Introductory Statistics. London 1950.
Reba, R. C., F. Hosain, H. C. Wagner: Radiology 90 (1968), 147.
Rosoff, B., A. Methfessel, H. Spencer: Fed. Proc. 24 (1965), 170.
Stacy, B. D., G. D. Thorburn: Science 132 (1966), 1076.
Weber, K. M.: In Vorber.

Anschrift d. Verff.: Dr. rer. nat. F. Bohne, Dr. agr. A.-E. Harmuth-Hoene, PhD, Dipl.-Phys. K. Kürzinger, Ing. F. Havlicek, Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe, 75 Karlsruhe, Postfach 3640.