

KERNFORSCHUNGSZENTRUM

KARLSRUHE

Juni 1969

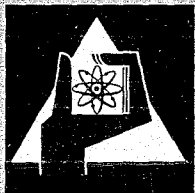
KFK 1047

Institut für Strahlenbiologie

Metabolismus und Toxizität therapeutischer Chelatbildner

6. Mitteilung: Die histoautoradiographische Lokalisation von ÄDTA
in Organen der Ratte

K. M. Weber



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.
KARLSRUHE

Sonderdruck

137/6

1969

Strahlentherapie

**Archiv für klinische
und experimentelle Radiologie**

Metabolismus und Toxizität therapeutischer Chelatbildner

6. Mitteilung: Die histoautoradiographische Lokalisation von ÄDTA in Organen der Ratte

Klaus M. Weber

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 1969

Bei der Bestimmung der Plasmaclearance von Ca-ÄDTA-¹⁴C (Äthylendiamintetraacetat) fanden Foreman et al. (1953) und Bohne et al. (1968), daß 24 Stunden nach i.v.-Injektion die ¹⁴C-Konzentration einiger Organe rund 10mal höher als die des Blutplasmas ist. Hieraus war zu schließen, daß ÄDTA zu einem gewissen Teil auch in das Zellinnere gelangt. Schwartz et al. (1968) konnten mittels differentieller Zentrifugation von Nierenhomogenat intrazelluläres Chelat nachweisen. Ein weiterer Hinweis für eine gewisse intrazelluläre Permeation des Chelatbildners ist, daß DTPA (Diäthylentriaminpentaacetat), das dem ÄDTA chemisch verwandt ist, auch mit der Galle ausgeschieden wird (Ballou und Palotay, 1966), was eine Leberzellpassage voraussetzt. Diese Untersuchungen erlauben jedoch nicht die Klärung der Frage, ob sich das Chelat gleichförmig über die betreffenden Organe verteilt oder ob hierbei bestimmte Gewebe eine ausgesprochenere Affinität aufweisen. Dies ist insofern von Interesse, als sich weiterhin die Frage erhebt, ob eine Korrelation zwischen dem histopathologischen Wirkungsmuster und der Lokalisation des Chelatbildners im Organ vorliegt.

Die einzige Methode, um diese Frage zu beantworten, bietet die Histoautoradiographie mit markiertem Chelat, doch sind hierbei gewisse technische Schwierigkeiten zu beachten: 1. Die Chelatkonzentration der Gewebe ist gering. 2. ÄDTA ist sehr leicht wasserlöslich, was die Verwendung wäßriger Medien bei der Aufarbeitung des Gewebes grundsätzlich verbietet. Die Kryostattechnik mit nativem Gewebe bringt neben Artefaktmöglichkeiten (z. B. durch Tausalz) eine meist unbefriedigende Zytologie mit sich. Darum verwendeten wir eine Plastik-

einbettung nach Gefriersubstitution. Durch die Plastikeinbettung dürfte, auch während des Film-Aufziehens, ein Auswaschen bzw. Verlagern der ¹⁴C-Aktivität weitgehend vermieden werden. Das Einbettmedium stört bei der mikroskopischen Betrachtung nicht. Mit Phasenkontrast ist eine befriedigende Auswertung der ungefärbten Schnitte möglich; die Abbildungen können jedoch nur in negativem Phasenkontrast gegeben werden.

Material und Methoden

Untersucht wurden Niere, Nebenniere, Leber, Duodenum und Pankreas von zwei 190 g schweren männlichen Ratten. Das Versuchstier hatte 24 Std. vor der Sektion 200 µCi Na₂[Ca-ÄDTA]-2-¹⁴C-Acetat (Radiochemical Center, Amersham; spezifische Aktivität 63 µCi·mg⁻¹) i.v. erhalten; das Kontrolltier war unbehandelt. Die Organe wurden nach Ausbluten der Tiere entnommen und folgendermaßen bearbeitet:

1. Einfrieren der etwa 4 mm³ großen Stücke von Leber, Darm und Pankreas und einer 2 mm dicken Querscheibe einer Niere in flüssiger Luft.
2. Gefriersubstitution mit Aceton-CO₂-gekühltem Äthylenglycolmonomethyläther als Fixans (30 Tage), der mit Wasser und Methacrylat mischbar ist (Conkie, 1965).
3. Nach Erwärmen auf Zimmertemperatur Einbringen in Methylmethacrylat mit 2% Benzoylperoxid (wasserfrei) für 24 Std.
4. 24 Std. bei 27°C in einem Gemisch von 50 ml Methacrylat, 1 g Benzoylperoxid (wasserfrei) und 25 g Polyäthylenglycol 1500.
5. In gewechseltem Gemisch Polymerisation bei 37°C ca. 48 Std.
6. Schneiden (4 µ) mit Leitz-Grundschlittenmikrotom unter Befeuchten mit 96%igem Alkohol.
7. Stripping-Film-Methode nach Boyd (1955) mit Kodak Strippingfilm AR 10; Expositionszeit 35 Tage.

Abb. 1. Innere Nierenrinde (Untergrundschrägung) der Kontrolle. — Abb. 2 a. Äußere Nierenrinde des Versuchstieres mit geringer ¹⁴C-Aktivität. — Abb. 2 b. Innere Rinde mit mehr Aktivität. In der Bildmitte ein distaler Tubulus. — Abb. 3. Leber des Versuchstieres mit mäßiger Aktivität. — Abb. 4 a. Duodenalzotten. — Abb. 4 b. Krypten des Versuchstieres mit viel Aktivität.

Alle Abbildungen negativer Phasenkontrast, Schnittdicke 4 µ, Vergr. orig. 380×.

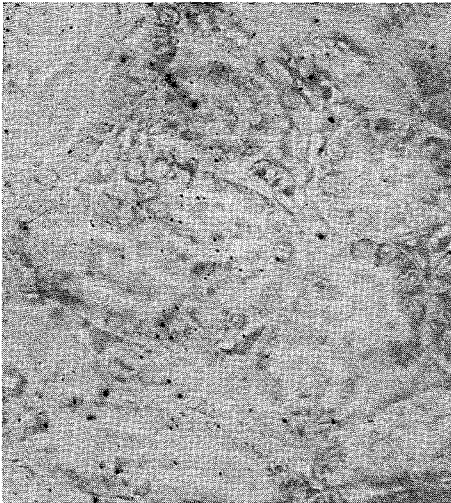


Abb. 1

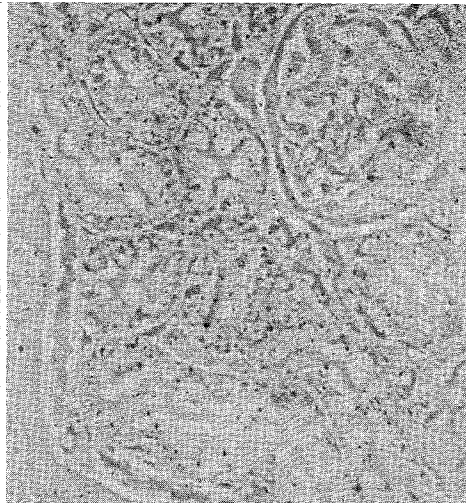


Abb. 2 a

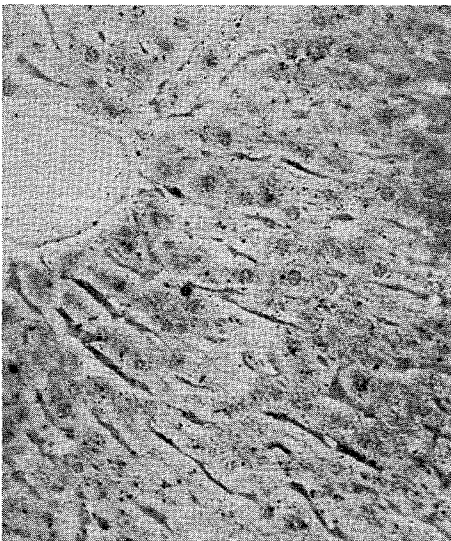


Abb. 3

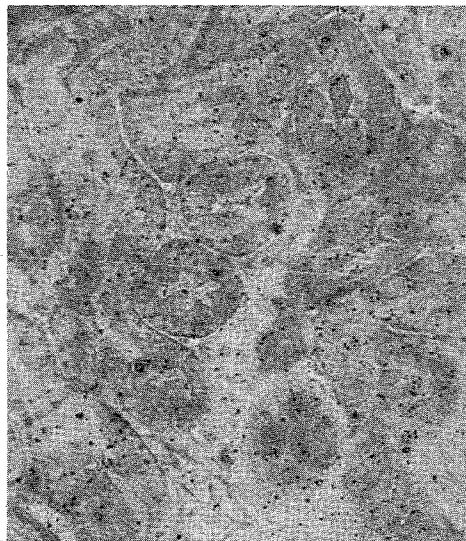


Abb. 2 b

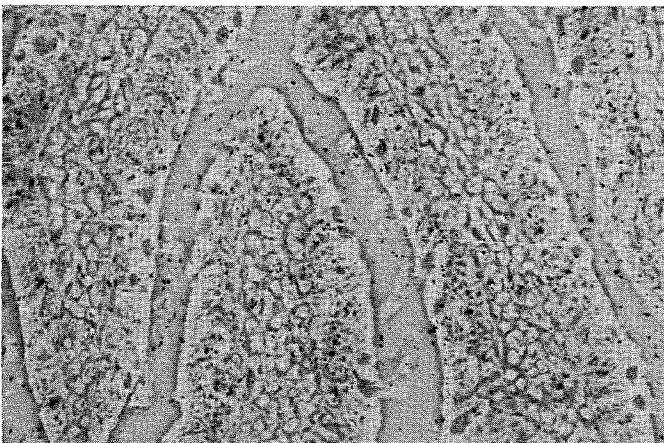


Abb. 4 a



Abb. 4 b

Die Abbildungen wurden nach *Brück* (1967) hergestellt. Diese Aufnahmetechnik, die in einer Doppelbelichtung des „Kornbildes“ im Dunkelfeld und des Phasenkontrastbildes des Schnittes besteht, ermöglicht es, mit schwacher Optik bei geringer Korndichte ein Übersichtsbild zu geben; durch den Lichthof der Körner im Dunkelfeld werden sie im Gegensatz zum Hellfeld überhaupt erst sichtbar. Außerdem erhält man eine größere „Kornausbeute“, da sich wegen des großen Kontrastes im Dunkelfeld auch nicht in der Schärfenebene liegende Körner darstellen.

Ergebnisse

Wie ein Kontrollschnitt (Abb. 1) erkennen läßt, ist die Untergrundschwärzung wegen der langen Expositionszeit hoch. Eine deutlich größere Zahl von Silberkörnern, die auf ^{14}C -Aktivität zurückzuführen ist, findet sich aber bei Niere, Leber und Darm, nicht jedoch über Nebenniere und Pankreas des Versuchstieres. Die Kornverteilung über der Niere ist nicht gleichförmig. Während die Glomeruli keine Aktivität zu enthalten scheinen, liegen über den Zellen der gewundenen Teile der proximalen Tubuli, häufig in Nähe des Lumens, vermehrt Silberkörner (Abb. 2 a). Noch mehr Aktivität zeigt sich über den geraden Teilen der proximalen Tubuli (Abb. 2 b), während sie über Mark und Papille nicht eindeutig erhöht ist.

Die Körner über der Leber sind relativ gleichförmig verteilt und finden sich vorwiegend über den Leberbälkchen (Abb. 3). Die Aktivität in Gallengängen und Blutgefäßen scheint gleich hoch und geringer als im Parenchym zu sein.

Die hohe Aktivität des Darmes ist besonders im Schleimhautepithel und in den Krypten lokalisiert (Abb. 4 a, b). Über der Muskularis sind demgegenüber nicht mehr Silberkörner anzutreffen als über Blutgefäßen, Pankreas und Nebenniere.

Diskussion

Die hier verwendete Methodik ist zwar noch verbesserungsbedürftig, es läßt sich aber trotzdem feststellen, daß die ^{14}C -Aktivität in Blutgefäßen geringer ist als über Nieren-, Darm- und Lebergewebe, was in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von *Foreman et al.* (1953) und *Bohne et al.* (1968) steht. Die

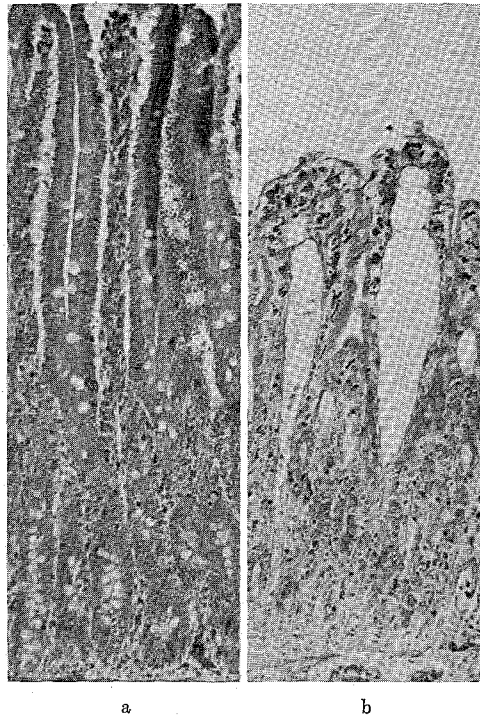


Abb. 5. Duodenum eines a) Kontrolltieres, b) eines Versuchstieres nach $2 \times 8 \text{ mmol Na}_2[\text{Ca-}\ddot{\text{A}}\text{DTA}] \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Paraffinschnitt 5μ , Masson-Trichrom nach *Goldner*, Vergr. 150fach.

Lage der Silberkörner macht die intrazelluläre Lokalisation der Aktivität sehr wahrscheinlich, wenn auch eine Zuordnung zu bestimmten Zellstrukturen nicht möglich ist.

Bei der Leber findet sich keine unterschiedliche Aktivität über Blutgefäßen einerseits und Gallengängen andererseits, was jedoch kein Beweis dafür ist, daß $\ddot{\text{A}}\text{DTA}$ nicht mit der Galle ausgeschieden werden kann. Ein Teil der ^{14}C -Aktivität in den Faeces (*Havlíček et al.*, 1968) dürfte aber wahrscheinlich auch daher rühren, daß durch die physiologische Mauserung der Darmschleimhaut markierte Zellen in den Kot gelangen.

Der hohe ^{14}C -Gehalt des Darmes ist überraschend, ebenso die Anreicherung in einem bestimmten Nierenrindenbereich. Es erhebt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob eine Korrelation zur Histopathologie besteht. Eine Beziehung scheint beim Darm vorzuliegen, wie neuere Untersuchungen zeigen (*Weber*, unveröff.): Hohe $\ddot{\text{A}}\text{DTA}$ -Dosen führen nämlich

zu Verkürzung und Ödemen der Villi sowie zu einer Zellentleerung der Krypten, so daß die Ergänzung der Schleimhautzellen gehemmt sein dürfte (Abb. 5 a, b). In Übereinstimmung mit diesem Befund steht auch eine neuere Untersuchung von *Ahrens* und *Aronson* (1968), derzufolge ÄDTA zu einer eindeutigen Schädigung der Funktion und Struktur des Darms führt.

Für die Niere dagegen ist eine solche Beziehung schwerer zu finden, denn die augenfälligsten Schädigungen treten im gewundenen proximalen Tubulus auf und nicht im geraden Teil. Naheliegender wäre die Annahme, daß die beiden Tubulusabschnitte gegenüber ÄDTA unterschiedlich empfindlich sind; erst sehr hohe ÄDTA-Dosen führen auch im geraden Teil des

proximalen Tubulus zu sichtbaren pathologischen Veränderungen, die jedoch ganz anders als die im proximalen Konvolut sind (*Weber*, unveröffentlicht).

Die Frage, ob es sich bei der ^{14}C -Aktivität in den Organen um ÄDTA handelt, muß offen bleiben. *Havlicek* et al. (1968) haben nämlich nachgewiesen, daß ein größerer Anteil des Chelats metabolisiert wird, als man früher annahm (*Foreman* et al., 1953). Bei diesem Abbau, der nicht die Äthylengruppe, sondern die Acetatgruppen betrifft, ist die Bildung toxischer Metabolite möglich, so daß u. U. auch andere Wirkungsmechanismen bei der Chelattoxizität diskutiert werden müssen als nur die Wechselwirkung mit endogenen Spurenmetallen (*Catsch*, 1968).

Zusammenfassung

Bei einer mit ^{14}C -markiertem ÄDTA injizierten Ratte findet sich histoautoradiographisch nach 24 Std. ^{14}C -Aktivität in den geraden Teilen der proximalen Tubuli der Niere, im Schleimhautepithel und in den Krypten des Duodenums sowie in geringerem Maße im Leberparenchym, jedoch keine Aktivität in Pankreas und den Nebennieren. Eine intrazelluläre Anreicherung des Chelats und/oder dessen Metaboliten wird wahrscheinlich gemacht. Die Bedeutung der Befunde für die histopathologischen Wirkungen des ÄDTA werden diskutiert.

Summary

In a rat injected with ^{14}C -labeled EDTA ^{14}C -activity could be demonstrated by histoautoradiography in the straight portions of the proximal tubules of the kidney, in the mucosa and the cryptes of the duodenum. Less ^{14}C -activity was associated with liver parenchyme while no activity could be found in pancreas or adrenals. An intracellular permeation of EDTA and/or its metabolites appears to be likely. The significance of the findings for the histopathological effects of EDTA is discussed.

Résumé

Chez un rat auquel on a injecté de l'EDTA marqué au ^{14}C , l'analyse histo-autoradiographique a montré que la radioactivité était surtout concentrée dans la partie linéaire des tubes proximaux du rein, dans l'épithélium muqueux et dans les cryptes du duodénum, et, mais en moindre intensité, dans le parenchyme hépatique. On n'a observé aucune radioactivité dans le pancréas ni dans les surrénales. Une pénétration intracellulaire de l'EDTA et/ou de ses métabolites paraît vraisemblable; on en discute signification pour les effets histopathologiques.

Schrifttum

- Ahrens, F. A., A. L. Aronson:* Fed. Proc. 27 (1968), 465.
Ballou, J. E., J. L. Palotay: Health Phys. 12 (1966), 895.
Bohne, F., A.-E. Harmuth-Hoene, K. Kürzinger, F. Havlicek: Strahlentherapie 136 (1968), 609.
Boyd, G. A.: Autoradiography. New York 1955.
Brück, H.-J.: Leitz-Mitteilungen 4 (1967), 83.
Catsch, A.: Naturwissenschaften 55 (1968), 473.
Conkie, D.: Acta anat. 60 (1965), 531.
Foreman, H., M. Vier, M. Magee: J. biol. Chem. 203 (1953), 1045.
Havlicek, F., F. Bohne, H. Zorn: Strahlentherapie 136 (1968), 604.
Schwartz, S. L., C. B. Johnson, J. R. Hayes, P. D. Doolan: Biochem. Pharmacol. 16 (1967), 2413.
Weber, K. M.: unveröffentl. Ergebnisse.

Anschrift d. Verf.: Dr. phil. nat. K. M. Weber, Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe, 75 Karlsruhe 1, Postfach 3640.