

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM
KARLSRUHE**

Mai 1970

KFK 1244

Institut für Strahlenbiologie

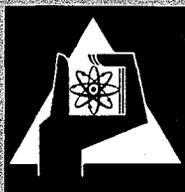
Metabolismus und Toxizität therapeutischer Chelatbildner

7. Mitteilung: Blutchemische und hämatologische Screening-Tests

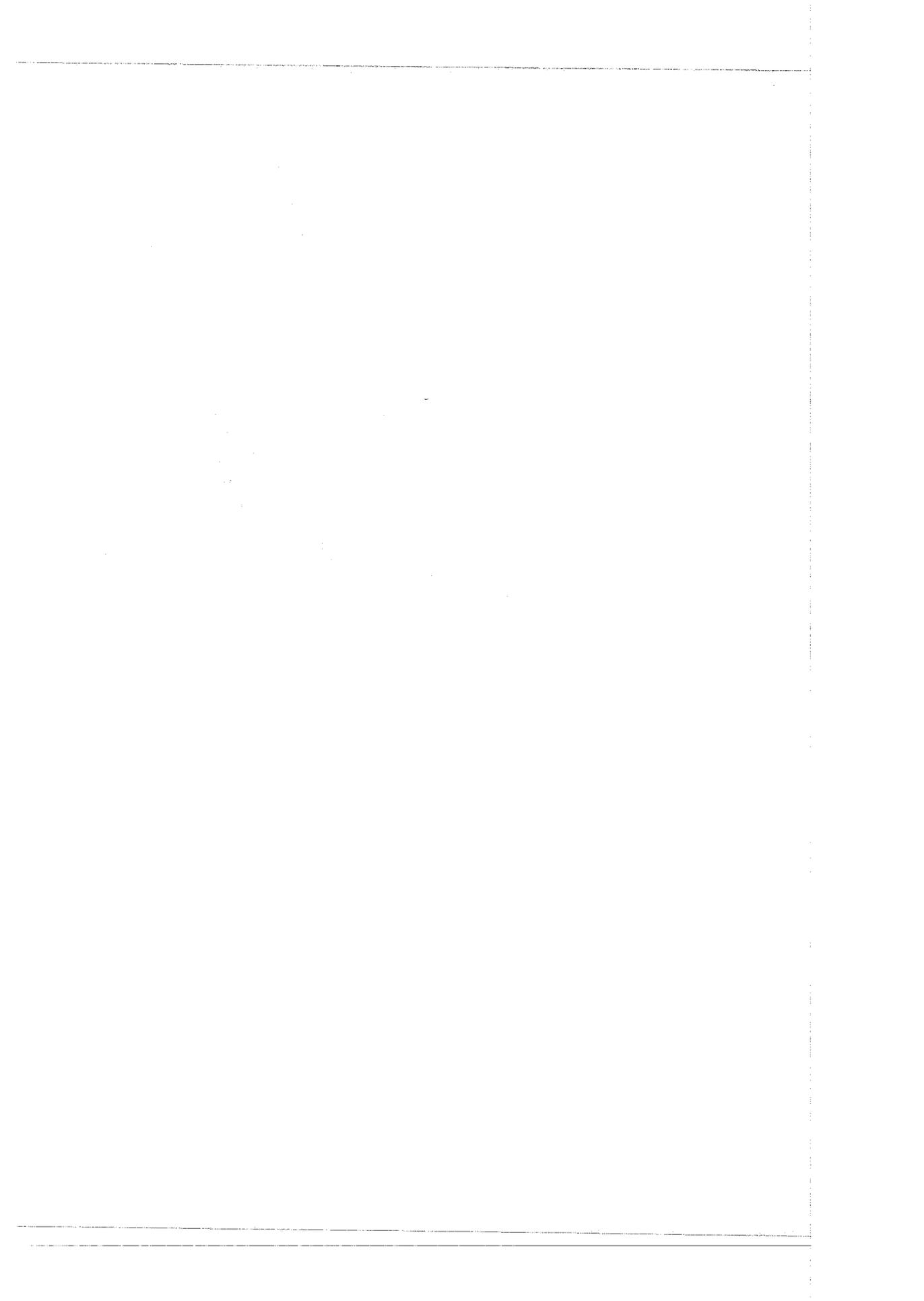
A. Seidel

8. Mitteilung: Ausscheidung von Natrium, Kalium, Magnesium und Zink

P. Dvořák



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



Sonderdruck

139/5

1970

Strahlentherapie

**Archiv für klinische
und experimentelle Radiologie**

Metabolismus und Toxizität therapeutischer Chelatbildner

7. Mitteilung: Blutchemische und hämatologische Screening-Tests

Arnulf Seidel

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 1970

Die Pathogenese der Toxizität der Ca-Chelate des Äthylendiamintetraacetats (ÄDTA) und Diäthylentriaminpentaacetats (DTPA) ist nicht geklärt. Klinische Erfahrungen und histopathologische Tierversuche (Schrifttum bei [10, 11, 33]) schienen bisher auf die alleinige Bedeutung nephrotischer Nierenschäden hinzuweisen, denen ein funktionelles Korrelat allerdings noch nicht zugeordnet werden konnte. Die akute und chronische Letalität zeigt keinen klaren Zusammenhang mit dem Ausmaß der Nierenschäden [31, 33]; darüber hinaus lassen auch andere Überlegungen Zweifel an der pathogenetischen Relevanz der Nierenschädigung aufkommen [11]. Dies um so mehr, als neuerdings degenerative Darmveränderungen beschrieben wurden, die den Unterschieden der Letalitätsraten besser zu entsprechen scheinen [1, 2, 30]. Schließlich wurde auch eine (nicht näher definierte) „systemic reaction“ für einen Teil der Todesfälle verantwortlich gemacht [12]. Ziel vorliegender Arbeit war es, durch blutchemische und hämatologische Untersuchungen zusätzliche Information zu diesem Fragenkomplex zu gewinnen. Durch Hämoglobin- und Hämatokritbestimmungen erwarteten wir, die von Weber [33] beschriebene Dehydratation quantitativ zu erfassen. Im Hinblick auf den allgemeinen Charakter der Untersuchung schien die Beobachtung des Differentialblutbildes geboten. Nierenfunktionsstörungen könnten sich in einer Retention harnpflichtiger Verbindungen wie Harnstoff, Kreatinin, ^{51}Cr -ÄDTA und ^{125}I -Hippuran im Blutplasma äußern. Das Verhalten des Plasmacholesterins wurde deswegen untersucht, weil Na_2 -ÄDTA bei arteriosklerotischen Patienten den erhöhten Cholesterinspiegel senkt [22]. Die Bestimmung der Blutglukose wurde durch die Untersuchungen von Weber [30, 32] nahegelegt, der nach Chelatverabfolgung eine erhöhte Glykogenablagerung in der Niere, Abnahme des Leberglykogens und eine (zahlenmäßig allerdings nicht belegte) kurzfristige Hyperglykämie beobachtete. Demgegenüber wurde bei insulinbehandelten Diabetikern gelegentlich eine Abnahme der Blut-

glukose gefunden [20]. Ausgesprochen pathologische Leberveränderungen wurden bisher nur bei sehr jungen Ratten beobachtet [24]. Um eventuelle Leberschäden zu erfassen, bestimmten wir die Aktivität der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) im Serum, die sich als zuverlässiges Kriterium einer Leberschädigung erwiesen hat [3, 17].

Die von uns untersuchten Dosen, 2 bis $8 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$, sind bei *einmaliger* Verabreichung noch nicht letal, beeinträchtigen jedoch in starkem Maße das Allgemeinbefinden der Tiere und führen auch zu eindeutigen histopathologischen Veränderungen der Nieren und des Darms [31, 33].

Methodik

Versuchstiere waren Ratten des Heiligenberg-Stamms beiderlei Geschlechts und unterschiedlichen Alters. Wenn nicht anders angegeben, betrug das Gewicht der zwei bis drei Monate alten Tiere 140 bis 180 g, das der fünf bis sieben Monate alten 200 bis 240 g. Sie erhielten Altromin-Standardfutter und Wasser ad libitum.

Die jeweils frisch hergestellten Lösungen von Na_2 [Ca-ÄDTA], Na_3 [Ca-DTPA] und Na_3 [Zn-DTPA] injizierten wir intraperitoneal in Äthernarkose. Na_2 [Ca-ÄDTA] bezogen wir von der Firma Merck; Na_3 [Ca-DTPA] und Na_3 [Zn-DTPA] wurden aus $\text{Ca}(\text{OH})_2$ bzw. ZnO , NaOH und freier DTPA-Säure (Fluka) hergestellt. Die i.p. injizierte Dosis betrug 2,4 oder $8 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$, in 4 ml Aqua tridest. gelöst (pro 200 g Körpergewicht). Die Kontrolltiere erhielten das gleiche Volumen einer 0,9% NaCl -Lösung, in einer speziellen Gruppe $8 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$. Der pH-Wert aller Lösungen war auf 7,4 eingestellt.

Das Serum gewannen wir aus dem Mischblut der Bauch- oder Halsgefäße. Blut zur Hämoglobin-(Hb)- und Hämatokrit (Htkr)-Bestimmung sowie für das Differentialblutbild (May-Grünwald-Giemsa) entnahmen wir aus der Schwanzspitze. Zur Htkr-Bestimmung zentrifugierten wir das Blut in heparinisierten Mikrohämatokritröhrchen; Hb bestimmten wir als Hb-Cyanid (Merckotest), die Blutglukose durch den UV-Test mit NADP. Im Serum wurden Harnstoff-N (Urease-Methode), Kreatinin (mit Pikrinsäure in alkalischer Lösung),

Tabelle 1. Mittelwerte \pm Standardfehler von unbehandelten und mit 0,9% NaCl injizierten Kontrolltieren. Die Zahl der untersuchten Tiere ist in der mittleren Säule angeführt.

Hb $\frac{\text{alt}}{\text{jung}}$ [g %]	25	14,3 \pm 0,1
Hämatokrit [%]	10	11,6 \pm 0,2
Hämatokrit [%]	32	44,6 \pm 0,4
Neutr. [%]	51	15 \pm 1
Lymph. [%]	51	78 \pm 1
Eos. [%]	47	1,7 \pm 0,2
GPT [IU/l]	52	22 \pm 1
Harnstoff-N [mg %]	45	14,3 \pm 0,4
Kreatinin [mg %]	51	1,34 \pm 0,03
Cholesterin [mg %]	30	69 \pm 3
Glukose [mg %]	57	94 \pm 2

Gesamtcholesterin (mit Essigsäureanhydrid und konz. Schwefelsäure), GPT (UV-Test mit NADH) mit Hilfe der Reagentiensätze der Fa. Boehringer, Mannheim, bestimmt; bezüglich der Einzelheiten der Methodik sei auf die Vorschriften der Fa. Boehringer [29] verwiesen. An dem von einer Ratte gewonnenen Serum konnten mittels des sogenannten Eppendorf-Mikrolitersystems und -Photometers alle Untersuchungen durchgeführt werden. Durch verschiedene Standard-Seren überprüften wir bei jeder Meßreihe die Zuverlässigkeit der Methodik. Bei den verwendeten radioaktiven Präparaten handelte es sich um ÄDTA-2- ^{14}C -azetat (The Radiochemical Centre, Amersham) mit einer spezifischen Aktivität von 21,6 mCi \cdot mmol $^{-1}$, Na [^{51}Cr -ÄDTA] (Fa. Hoechst) mit einer spezifischen Aktivität von 20 mCi \cdot mg $^{-1}$ Cr sowie ^{125}J -Hippuran (Fa. Hoechst) mit einer spezifischen Aktivität von 70 bis 90 μCi $^{125}\text{J} \cdot \text{mg}^{-1}$ J-Hippuran. Die Tiere erhielten $\sim 1 \mu\text{Ci}$ ^{14}C -ÄDTA, das wir intraperitoneal injizierten. ^{51}Cr -ÄDTA und ^{125}J -Hippuran wurden gleichzeitig in die frei präparierte Schwanzvene injiziert, und zwar $\sim 0,5 \mu\text{Ci}$ ^{51}Cr und $\sim 6 \mu\text{Ci}$ ^{125}J . Die ^{14}C -Aktivität des Serums wurde in einem Flüssigkeits-

szintillations-Spektrometer, die ^{51}Cr - und ^{125}J -Aktivität in einem Zweikanal- γ -Spektrometer mit NaJ(Tl)-Bohrlochkristall gemessen.

Ergebnisse

Die Kontrollwerte, die mit den Literaturangaben [6, 18, 19, 27] befriedigend übereinstimmen, sind in Tabelle 1 zusammengestellt; hierbei konnten die Werte von jungen und alten Tieren beiderlei Geschlechts, die vier oder 24 Stunden nach der Injektion von 0,9% NaCl getötet wurden, wie auch von unbehandelten Kontrolltieren vereinigt werden, da keine signifikanten Unterschiede vorlagen. Die einzige Ausnahme stellt das Differentialblutbild vier Stunden nach 0,9% NaCl dar, das in einem späteren Zusammenhang angeführt wird.

Bei den Versuchen machten wir regelmäßig die Beobachtung, daß vier Stunden nach Chelatverabfolgung in der Bauchhöhle reichlich Flüssigkeit vorhanden ist, deren pH-Wert ~ 8 ist und die Leukozyten, Erythrozyten und Eiweiß enthält. Es stellt sich hier natürlich die Frage nach der Resorption der Chelate. Ein in Tabelle 2 wiedergegebener orientierender Versuch zeigt, daß 90 Minuten nach Injektion die Flüssigkeitsmenge in der Bauchhöhle größer als die injizierte Menge sein kann und mit steigender Chelatdosis zunimmt, wobei die Art des Chelats offenbar ohne Einfluß ist. Die Flüssigkeitsmenge ist nach 24 Stunden (in der Tab. 2 nicht angeführt) nicht mehr nachweisbar. Nach Verabfolgung der beiden NaCl-Dosen war dagegen nach vier Stunden keine Flüssigkeit (oder nur Spuren) vorhanden. Die Bestimmung der ^{14}C -Aktivität in der Flüssigkeit ergab, daß trotz der großen Flüssigkeitsmenge bereits nach 90 Minuten ein beachtlich hoher Bruchteil resorbiert

Tabelle 2. Flüssigkeitsmenge und ^{14}C -Aktivität in der Bauchhöhle nach 90 Minuten und vier Stunden. Mittelwerte von zwei bis sechs Tieren pro Gruppe.

Chelat	Dosis [mmol \cdot kg $^{-1}$]	Mittl. Gewicht [g]	[ml]		% der ^{14}C -Dosis	
			90 Min.	4 Std.	90 Min.	4 Std.
$\text{Na}_2[\text{Ca}-\text{ÄDTA}]$	4	93	—	2	—	—
	2	228	6	4	19	3
	4	236	11	8	30	10
	8	231	15	8	20	4
	4	275	—	12	—	—
$\text{Na}_3[\text{Ca}-\text{DTPA}]$	2	219	6	6	—	—
	4	218	12	13	—	—
	8	222	11	11	—	—
$\text{Na}_3[\text{Zn}-\text{DTPA}]$	8	214	14	16	—	—

Tabelle 3. Kationengehalt der intraperitonealen Flüssigkeit nach i.p. Injektion von Na₃[Zn-DTPA] (8 mmol·kg⁻¹). N = Zahl der Tiere (♀).

	90 Min.	4 Std.
N	5	4
Körpergewicht [g]	209	222
Na (mmol·ml ⁻¹)	2,26 ± 0,53	2,50 ± 0,30
K (μmol·ml ⁻¹)	68,7 ± 5,2	64,1 ± 8,7
Mg (μmol·ml ⁻¹)	26,7 ± 1,1	28,8 ± 3,8
Ca (μmol·ml ⁻¹)	9,17 ± 0,68	11,98 ± 1,81
Zn (mmol·ml ⁻¹)	0,55 ± 0,051	0,24 ± 0,043
Zn % d. Zn-Dosis	33,0	13,3

ist. Die relativ schnelle Resorption bestätigte sich auch in einem weiteren Versuch, in dem Zn-DTPA (8 mmol·kg⁻¹) injiziert und der Zn-Gehalt der Flüssigkeit in der Bauchhöhle bestimmt wurden (Tab. 3). Gleichzeitig wurden die Konzentrationen von Na, K, Mg und Ca gemessen, die (natürlich mit Ausnahme der Na-Werte) weitgehend identisch mit den Konzentrationen des Bluteserums sind [13].

Tabelle 4 zeigt den Einfluß einmaliger Chelatdosen auf Hb, Htkr und Differentialblutbild bei alten Tieren. Nach vier Stunden ist ein dosisproportionaler, jedoch von der Art des Chelats unabhängiger Anstieg von Hb und Htkr festzustellen, während nach 24 Stunden beide Werte wieder normalisiert sind. Das Differentialblutbild nach vier Stunden ist durch eine ausgeprägte relative Lymphopenie gekennzeichnet. Hervorzuheben ist, daß eine Lymphopenie

Tabelle 5. Differentialblutbild nach 24 Stunden bei jungen Tieren (♂) mit einem mittl. Körpergewicht von 102 g. Je fünf Tiere pro Gruppe.

Chelat	mmol·kg ⁻¹	Neutr. (%)	Lymph. (%)	Eos. (%)
Na ₂ [Ca-ÄDTA]	2	18 ± 1	68 ± 3	1,0 ± 0,6
	4	18 ± 2	73 ± 3	1,0 ± 0,6
	8	23 ± 6	69 ± 7	0,8 ± 0,4
Na ₃ [Ca-DTPA]	2	14 ± 3	79 ± 2	0,4 ± 0,2
	4	21 ± 3	71 ± 4	0,2 ± 0,2
	8	28 ± 5	64 ± 5	0
0,9% NaCl		24 ± 2	68 ± 3	0,8 ± 0,4

auch bei den mit NaCl injizierten Tieren nachzuweisen ist. Nach 24 Stunden sind die Veränderungen gleichsinnig, jedoch schwächer ausgeprägt, und – im Gegensatz zu den Verhältnissen nach vier Stunden – die größere Wirkung von DTPA unverkennbar. Zn-DTPA verhält sich insofern exzeptionell, als nach 24 Stunden die für die Ca-Chelate charakteristische relative Lymphopenie vermißt wird. Der Tabelle 5 ist zu entnehmen, daß das Differentialblutbild nach 24 Stunden bei jungen Tieren praktisch normal ist.

Harnstoff-N und Kreatinin sind bei alten Tieren nach vier Stunden dosisproportional erhöht, zeigen nach 24 Stunden jedoch – mit Ausnahme der Dosis von 8 mmol·kg⁻¹ DTPA – wieder normale Werte (Tab. 6). Die Cholesterinkonzentration ist nach vier Stunden geringfügig und ohne eindeutige Dosisabhängigkeit

Tabelle 4. Hb, Htkr und Differentialblutbild bei alten Tieren. Je fünf Tiere pro Gruppe. Vier Stunden nach 0,9% NaCl: 38 ± 2% Neutr., 54 ± 3% Lymph., 1,6 ± 0,4% Eos.

Chelat	mmol·kg ⁻¹	Std.	Ge-schlecht	Hb (g%)	Htkr (%)	Neutr. (%)	Lymph. (%)	Eos. (%)
Na ₂ [Ca-ÄDTA]	2	4	♀	16,4 ± 0,2	49 ± 0,4	57 ± 3	35 ± 3	1,8 ± 0,4
	4	4	♀	17,3 ± 0,3	50 ± 0,5	64 ± 2	29 ± 3	1,4 ± 0,5
	8	4	♀	17,6 ± 0,8	55 ± 2	72 ± 3	18 ± 3	0,4 ± 0,4
	2	24	♂	14,8 ± 0,3	48 ± 1	15 ± 4	75 ± 4	1,4 ± 0,5
	4	24	♂	14,5 ± 0,3	44 ± 1	22 ± 5	69 ± 5	1,6 ± 0,5
	8	24	♂	14,4 ± 0,2	47 ± 1	50 ± 8	45 ± 7	0,4 ± 0,2
Na ₃ [Ca-DTPA]	2	4	♀	15,9 ± 0,2	50 ± 0,4	50 ± 4	43 ± 3	2,8 ± 0,4
	4	4	♀	16,2 ± 0,3	52 ± 1	72 ± 2	22 ± 2	0,8 ± 0,4
	8	4	♀	18,9 ± 0,5	60 ± 2	62 ± 2	30 ± 3	0,4 ± 0,4
	2	24	♂	14,7 ± 0,3	44 ± 1	23 ± 3	71 ± 2	1,6 ± 1,1
	4	24	♂	15,0 ± 0,1	45 ± 1	49 ± 6	47 ± 6	0,8 ± 0,6
	8	24	♂	14,7 ± 0,1	44 ± 1	77 ± 5	20 ± 4	0
Na ₃ [Zn-DTPA]	8	24	♀	14,3 ± 0,4	45 ± 2	19 ± 1	73 ± 2	1,2 ± 0,4
NaCl	8	4	♀	14,2 ± 0,3	48 ± 1	44 ± 3	49 ± 4	1,0 ± 0,3

Tabelle 6. Blutchemische Werte bei alten Tieren. Je fünf Tiere pro Gruppe.

Chelat	mmol·kg ⁻¹	Std.	Ge- schlecht	Harnstoff-N (mg %)	Kreatinin (mg %)	Cholesterin (mg %)	GPT (IU/l)	Glukose (mg %)
Na ₂ [Ca-ÄDTA]	2	4	♀	16,9 ± 0,7	1,7 ± 0,05	92 ± 10	20 ± 1	65 ± 8
	4	4	♀	18,0 ± 1,0	1,8 ± 0,09	81 ± 8	25 ± 2	78 ± 8
	8	4	♀	24,0 ± 1,1	2,2 ± 0,06	71 ± 6	38 ± 8	115 ± 13
	2	24	♀	13,8 ± 0,6	2,1 ± 0,1	80 ± 2	30 ± 2	92 ± 15
	4	24	♀	10,7 ± 0,4	1,8 ± 0,2	72 ± 3	18 ± 1	71 ± 10
	8	24	♀	13,7 ± 1,2	1,5 ± 0,07	76 ± 2	33 ± 4*	92 ± 9
	8	24	♀	20,1 ± 1,3	1,9 ± 0,2	—	121 ± 18*	—
	8	24	♀	14,8 ± 0,6	1,4 ± 0,06	104 ± 3	23 ± 2	91 ± 2
Na ₃ [Ca-DTPA]	4	4	♀	18,4 ± 1,5	1,6 ± 0,06	97 ± 2	31 ± 2	136 ± 16
	8	4	♀	27,0 ± 1,7	2,5 ± 0,15	111 ± 6	41 ± 1	107 ± 3
	2	24	♀	11,0 ± 0,9	1,3 ± 0,02	55 ± 5	18 ± 2	65 ± 10
	4	24	♀	12,3 ± 0,9	1,4 ± 0,08	64 ± 2	21 ± 2	74 ± 6
	8	24	♀	28,2 ± 6,6	1,8 ± 0,2	88 ± 5	45 ± 7**	49 ± 3
	8	24	♀	32,4 ± 13,3	2,9 ± 0,5	—	83 ± 8***	—
	8	24	♀	13,5 ± 0,6	2,2 ± 0,07	—	29 ± 3	—
	8	24	♀	12,3 ± 1,1	1,3 ± 0,09	64 ± 5	19 ± 2	—

* 18 Tiere ** 14 Tiere *** 12 Tiere

erhöht. Die GPT-Aktivität bleibt bei den niedrigeren Dosen praktisch unbeeinflusst. Im Falle der höchsten Dosis fällt nach 24 Stunden die gesichert stärkere Reaktion der Weibchen auf. Die Erhöhung der GPT-Aktivität findet sich nicht bei Zn-DTPA. Die Glukosewerte liegen praktisch im Normbereich.

Da wir ausgeprägtere Effekte in dieser Versuchsreihe nur bei der Dosis von 8 mmol·kg⁻¹ fanden, beschränkten wir uns in der Versuchsreihe an jungen Tieren auf diese Dosis. Tabelle 7 zeigt überraschenderweise, daß die GPT-Aktivität im Gegensatz zu den älteren Tieren kaum beeinflusst wird.

In einer weiteren Versuchsreihe erhielten die Tiere an drei bzw. vier aufeinanderfolgenden Tagen Chelate in unterschiedlicher Dosis, und 24 Stunden nach der letzten Injektion wurde das Differentialblutbild bestimmt (Tab. 8). Eine relative Lymphopenie konnte nur nach den höchsten Gesamtdosen von 24 mmol·kg⁻¹ ÄDTA und 12 mmol·kg⁻¹ DTPA nachgewiesen werden.

Abbildung 1 gibt die Plasmaclearance von ⁵¹Cr-ÄDTA und ¹²⁵J-Hippuran bei Kontrolltieren wieder. Um den Einfluß der Chelate auf die Clearance zu prüfen, wurden die markierten Substanzen 24 Stunden nach der Chelatverabfolgung i.v. injiziert und die Aktivität im Plasma nach 30 Minuten bestimmt; jede Gruppe war mit fünf Tieren besetzt. Die einmalige Verabfolgung von Ca-ÄDTA und -DTPA (4 mmol·kg⁻¹) ergab Werte, die mit denen der Kontrolle sehr gut übereinstimmen; dies gilt auch für die Verabreichung von Ca-ÄDTA an vier aufeinanderfolgenden Tagen (4 mmol·kg⁻¹·d⁻¹). Von den fünf Tieren, die dreimal 4 mmol·kg⁻¹·d⁻¹ Ca-DTPA erhielten, überlebten nur zwei, und diese wiesen mit 2,1 bzw. 2,5% ⁵¹Cr-ÄDTA pro 1 ml Plasma und 1,8 bzw. 1,3% ¹²⁵J-Hippuran eine gegenüber der Kontrolle stark erhöhte Retention auf. Der Plasmaspiegel von ⁵¹Cr-ÄDTA ist nach dreimaliger Verabfolgung von Ca-DTPA in einer Dosis von 2 mmol·kg⁻¹·d⁻¹ mit 1,05% signifikant (P = 0,04) erhöht, wobei die Htcr-Werte

Tabelle 7. Blutchemische Werte bei jungen Tieren. Je fünf Tiere pro Gruppe.

Chelat	mmol·kg ⁻¹	Std.	Geschlecht	Harnstoff-N (mg %)	Kreatinin (mg %)	GPT (IU/l)
Na ₂ [Ca-ÄDTA]	8	24	♀	12,5 ± 1,0	1,8 ± 0,1	21 ± 3
	8	24	♂	12,2 ± 0,6	1,4 ± 0,04	22 ± 2
Na ₃ [Ca-DTPA]	8	24	♀	17,1 ± 1,4	2,8 ± 0,4	42 ± 11
	8	24	♂	21,2 ± 4,4	2,5 ± 0,1	25 ± 1

Tabelle 8. Differentialblutbild bei alten Tieren. Je fünf Tiere pro Gruppe.

Chelat	Dosis (mmol · kg ⁻¹)	Geschlecht	Neutr. (%)	Lymph. (%)	Eos. (%)
Na ₂ [Ca-ÄDTA]	4 × 4	♀	23 ± 7	66 ± 7	2,8 ± 0,9
	4 × 4	♂	15 ± 1	81 ± 2	1,2 ± 0,4
	3 × 8	♀ + ♂	55 ± 5	36 ± 5	1,0 ± 0,7
Na ₃ [Ca-DTPA]	3 × 2	♂	26 ± 3	68 ± 4	1,0 ± 0,6
	3 × 4	♂	57 ± 6	40 ± 5	0
	4 × 4	♂ + ♀	17 ± 2	79 ± 1	1,7 ± 0,2

* 25 Tiere

normal sind. Die mit $0,16 \pm 0,054\%$ erhöhte Konzentration von ¹²⁵J-Hippuran erreicht mit $P = 0,26$ keine statistische Signifikanz. Allerdings ist die Streuung in dieser Gruppe ungewöhnlich hoch (bei einem Tier betrug die Konzentration z. B. $0,36\%$), was offenbar Ausdruck einer ausgeprägten biologischen Variabilität im Falle hoher Dosen ist (vgl. hierzu auch [33]).

Diskussion

Die akute LD 50% des Ca-DTPA bei Mäusen beträgt nach einmaliger i.p. Injektion $12,5 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ [9]; Ca-DTPA hat damit eine 1,4mal höhere Toxizität als Ca-ÄDTA, dessen LD 50% $17,4 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ ist [14]. Auch bezüg-

lich der chronischen Toxizität, d. h. bei wiederholter Verabfolgung, ist Ca-DTPA etwa zweimal toxischer als Ca-ÄDTA [7]. Demgegenüber besitzen die Zn-Chelate eine im Vergleich zu den Ca-Chelaten erheblich geringere Toxizität [7, 8]. Es erhebt sich nun die Frage, welche der von uns gefundenen Effekte als „chelatspezifisch“ und welche als „chelatuspezifisch“ anzusehen sind. Als chelatuspezifisch sind jene Reaktionen zu bezeichnen, die bei allen drei Chelaten gleich stark ausgeprägt sind, während für chelatspezifische Reaktionen zu fordern ist, daß sie die eingangs angeführten Unterschiede in der Toxizität annähernd widerspiegeln.

Für die Bildung der Flüssigkeit im Peritonealraum muß ein unspezifischer Mechanismus angenommen werden, da die Flüssigkeitsmenge bei allen Chelaten praktisch gleich ist und nur von der injizierten Konzentration abhängt. Dies legt die Annahme nahe, die Flüssigkeitsabsonderung als osmotisch bedingt aufzufassen, da die isotonische Konzentration von Na₃[Ca-DTPA] $0,095 \text{ M}$ beträgt und die injizierten Chelatlösungen hypertonisch sind; im Falle der niedrigsten Dosis von $2 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ entspricht die Konzentration $0,125 \text{ M}$. Gegen diese Deutung sprechen jedoch der exsudatähnliche Charakter der Flüssigkeit (Protein, zahlreiche Erythrozyten, erhöhter pH-Wert), das Fehlen der Flüssigkeit im Fall einer hypertonischen NaCl-Lösung und schließlich der Umstand, daß die nach 90 Minuten und vier Stunden gefundene Flüssigkeit in bezug auf das Chelatanion hypotonisch ist (vgl. hierzu die prozentuale Resorption in Tab. 2 und 3). Eine toxische Schädigung des Peritoneums ist somit wahrscheinlich, über deren Natur allerdings nichts ausgesagt werden kann. Die gleichstarke Wirksamkeit der Zn- und Ca-Chelate scheint dafür zu sprechen, daß die Chelierung eines Spuren-

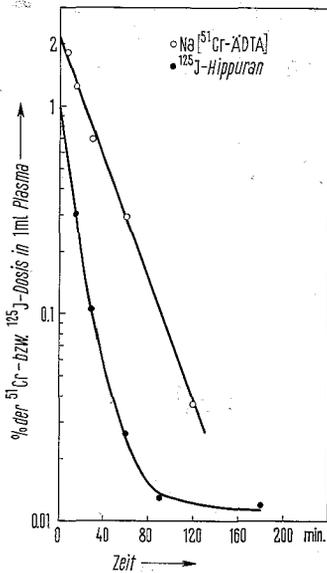


Abb. 1. Plasmaclearance von Na[⁵¹Cr-ÄDTA] und ¹²⁵J-Hippuran bei Kontrolltieren.

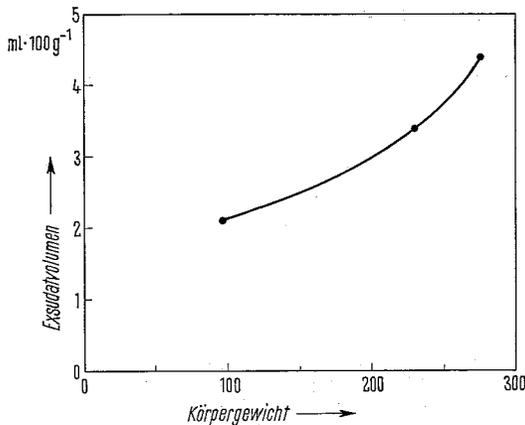


Abb. 2. Abhängigkeit der Exsudatbildung vom Körpergewicht (g).

metalls hierbei keine entscheidende Rolle spielt. Auffallend ist die ausgesprochene Altersabhängigkeit der Exsudatbildung. Bezieht man das Volumen des Exsudats auf 100 g Körpergewicht, wie dies in Abbildung 2 geschehen ist, so nimmt die Flüssigkeitsabsonderung mit steigendem Körpergewicht stark zu. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, daß die Chelattoxizität bei älteren Tieren ebenfalls erheblich größer als bei jungen Tieren ist [7, 23, 25]. Ob hier ein ursächlicher Zusammenhang vorliegt, kann natürlich nicht ohne weiteres entschieden werden. Die Bildung des Exsudats in der Bauchhöhle erklärt auch befriedigend die ausgeprägte und dosisproportionale Erhöhung des Hb und Htcr, die somit ebenfalls als chelatunspezifisch aufzufassen ist. Die Dehydratation während der ersten Stunden nach Chelatverabfolgung erlaubt weiterhin zwangslos, die nach vier Stunden zu beobachtende Erhöhung von Harnstoff-N und Kreatinin im Serum zu erklären. Die Verminderung der renalen Durchblutung infolge der Dehydratation führt zu einer Beeinträchtigung der glomerulären Filtrationsleistung im Sinne einer „extrarenalen“ Azotämie [16]. Eine renal bedingte Erhöhung der Retention der harnpflichtigen Substanzen kann wohl ausgeschlossen werden, da die Glomeruli zu diesen frühen Zeitpunkten histologisch keine Schäden zeigen [33] und da die glomeruläre Filtration von ^{51}Cr -ÄDTA auch bei wiederholter Verabreichung relativ hoher Chelatdosen normal verläuft. Eine eindeutig verlangsamte Clearance von ^{51}Cr -ÄDTA und von ^{125}I -Hippuran (als Anzeichen einer Schädigung der

tubulären Funktion) findet sich erst bei wiederholter Injektion hoher Dosen, wobei die im Vergleich zu ÄDTA höhere Toxizität des DTPA unverkennbar ist. Hier scheint somit ein chelat-spezifischer Effekt vorzuliegen. Bohne et al. [5] fanden bei einem analogen Versuch ebenfalls eine verminderte Clearance von ÄDTA- ^{14}C .

Die von uns gefundene Reaktion des Differentialblutbilds, die prozentuale Abnahme der Lymphozyten und der Eosinophilen, ist charakteristisch für das sogenannte Streß-Syndrom bei Ratten [28]. In die gleiche Richtung weist auch die von Weber [31] beschriebene Vergrößerung der Nebennierenrinde und die Milzinvolution. Die Streß-Reaktion in unserem Fall muß als chelat-spezifisch angesehen werden, da Zn-DTPA sich diesbezüglich inert verhält und die Reaktion (genauer gesagt die Dauer der Reaktion) auf Ca-DTPA ausgeprägter als nach Ca-ÄDTA ist. Multipliziert man die DTPA-Dosen mit dem Faktor 1,4, der dem eingangs erwähnten Verhältnis der LD $_{50\%}$ -Werte entspricht, kann die Dosisabhängigkeit der relativen Lymphopenie nach 24 Stunden befriedigend durch eine gemeinsame Dosis-Effekt-Kurve approximiert werden (Abb. 3). Die Spezifität der Streß-Reaktion macht es unwahrscheinlich, daß die Exsudatbildung den allein verantwortlichen Faktor darstellt, da diese chelatunspezifisch ist. Hervorzuheben ist, daß die Streß-Reaktion ebenfalls eine ausgesprochene Altersabhängigkeit zeigt, und zwar in der gleichen Richtung wie bei der Letalität.

Die Erhöhung der GPT-Aktivität im Serum, die allerdings nur bei der höchsten Chelatdosis

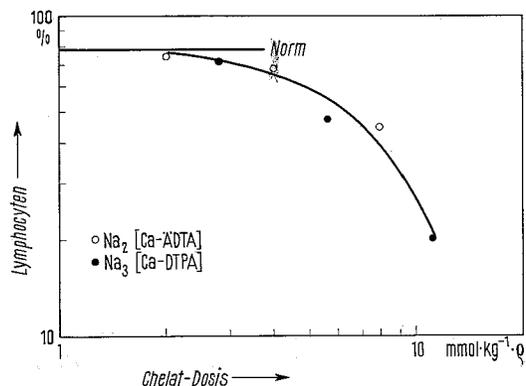


Abb. 3. Dosisabhängigkeit der relativen Lymphopenie. Die Dosis ist mit dem Faktor q multipliziert, der bei ÄDTA und DTPA 1 bzw. 1,4 beträgt (vgl. Text).

auftritt, scheint ebenfalls altersabhängig zu sein, indem sie bei alten Tieren ein höheres Ausmaß erreicht; die Reaktion zeigt außerdem eine deutliche Geschlechtsabhängigkeit, über deren Ursache noch keine Aussagen gemacht werden können. Es ist zwar denkbar, daß die Ischämie der Leber, wie sie im Gefolge einer Dehydratation auftritt [26], zu einer Enzymfreisetzung aus anoxisch geschädigten Leberzellen führen könnte [15]. Diese Erklärung für die erhöhte GPT-Aktivität scheidet jedoch insofern aus, als die Dehydratation chelatunspezifisch und geschlechtsunabhängig ist, während die GPT-Aktivität nach Verabfolgung von Zn-DTPA unbeeinflusst bleibt. Andererseits kann es beim Streß-Syndrom zu einer Hyperfermentämie kommen [21]; ohne weitere Versuche muß aber die Frage offen bleiben, ob die erhöhte GPT-Aktivität als Streß-Reaktion oder als Ausdruck einer hepatotoxischen Chelatwirkung zu erklären ist. Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde, zeigt die Leber — mit Ausnahme von sehr jungen Tieren, bei denen wir aber keine erhöhte GPT-Aktivität finden — keine eindeutigen histopathologischen Veränderungen.

Eine Beeinflussung der Blutglukose konnten wir nicht feststellen. Da unsere Versuche an Tieren durchgeführt wurden, die vor und während des Versuchs freien Zugang zu Futter hatten, kann ein gewisser, allerdings kaum sehr ausgeprägter Einfluß nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Unsere Untersuchung lieferte trotz ihres orientierenden Charakters einige wichtige Beiträge zum Problem der Chelat-Toxizität:

1. Es ergaben sich bei einmaliger Chelatverabfolgung keine eindeutigen Hinweise für eine Beeinträchtigung der Nierenfunktionen. Dies stellt erneut und in Übereinstimmung mit anderen Befunden [31] und Überlegungen [11] die pathogenetische Relevanz der histopathologi-

schen Nierenveränderungen für die *akute* Toxizität in Frage. Bei der chronischen Toxizität allerdings wird sowohl die Funktion der Glomeruli als auch der Tubuli eindeutig beeinträchtigt.

2. Demgegenüber fanden wir Allgemeinreaktionen, wie die starke Dehydratation sowie das Streß-Syndrom, die sowohl für sich allein betrachtet als auch im Zusammenwirken mit anderen (von uns evtl. nicht erfaßten) Schäden sich letal auswirken könnten.

3. Es muß zwischen chelatspezifischen und -unspezifischen Toxizitätsmechanismen unterschieden werden. Für die ersteren ist die Wechselwirkung mit essentiellen Spurenmetallen nach wie vor die plausibelste Erklärung, während für die chelatunspezifischen Reaktionen das Chelatanion als solches verantwortlich wäre. Gewisse experimentelle Hinweise in dieser Richtung liegen vor [4]. Die Existenz unspezifischer Reaktionen würde auch befriedigend den Widerspruch beseitigen, der zwischen den großen Unterschieden in den Affinitäten von ÄDTA und DTPA zu Spurenmetallen einerseits und den im Vergleich hierzu nur geringfügigen Toxizitätsunterschieden auf der anderen Seite besteht.

4. Um Mißverständnissen vorzubeugen, ist zu unterstreichen, daß die in der Humanmedizin üblichen Chelatdosen $< 0,1 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ betragen und überdies in der Regel langsam und verdünnt i.v. infundiert werden, so daß mit Reaktionen, wie wir sie nach i.p. Injektionen von mindestens 20mal höheren Dosen beobachteten, nicht zu rechnen ist.

Für die Bestimmung der Kationen mittels Atomabsorptionsspektrometrie danken wir Herrn Ing. P. Dvořák; für die technische Hilfe danken wir Fräulein R. Huber und Frau L. Braun.

Zusammenfassung

Akut toxische Dosen von Ca-ÄDTA und Ca-DTPA bewirken bei der Ratte nach intraperitonealer Injektion eine Exsudatbildung in der Bauchhöhle, Dehydratation, Veränderungen des Differentialblutbilds im Sinne einer Streß-Reaktion und eine geschlechts- und altersabhängige Erhöhung der Aktivität der Glutamat-Pyruvat-Transaminase. Eine Beeinträchtigung der glomerulären und tubulären Funktionen findet sich erst nach wiederholter Verabfolgung der Chelate. Zn-DTPA hat keinen Einfluß auf das Differentialblutbild und die Glutamat-Pyruvat-Transaminase. Die theoretischen Folgerungen werden diskutiert.

Summary

Intraperitoneal injection of acute toxic doses of Ca-EDTA and Ca-DTPA leads in the rat to an exsudation into the abdominal cavity, dehydration, a stress-response of the differential leucocyte count, and a raise of the glutamate-pyruvate-transaminase activity of the serum (dependent on sex and age). Impaired glomerular and tubular functions are found with repeated dosages only. Zn-DTPA does not influence the differential count and the glutamate-pyruvate-transaminase. The theoretical implications of the findings are discussed.

Résumé

L'injection intrapéritonéale de doses toxiques aiguës de Ca-EDTA et Ca-DTPA provoque chez le rat une exsudation vers la cavité abdominale, une déshydratation, une perturbation de la formule leucocytaire et, selon le sexe et l'âge de l'animal, une élévation de l'activité de la transaminase glutamique-pyruvique. Une modification des fonctions glomérulaires et tubulaires n'a lieu qu'après répétition de l'injection. Le Zn-DTPA n'influe pas la formule leucocytaire ni l'activité de la transaminase. On discute les conséquences théoriques de ces observations.

Schrifttum

- [1] Ahrens, F. A., A. L. Aronson: Fed. Proc. 27 (1968), 1401.
 [2] Aronson, A. L., P. B. Hammond, A. C. Strafuss: Toxicol. appl. Pharmacol. 12 (1968), 337.
 [3] Balazs, T., T. K. Murray, J. M. McLaughlan, H. C. Grice: Toxicol. appl. Pharmacol. 3 (1961), 71.
 [4] Bersin, T., A. Müller, H. Schwarz: Arch. Biochem. Biophys. 69 (1957), 507.
 [5] Bohne, F., A.-E. Harmuth-Hoene, K. Kürzinger, F. Havlíček: Strahlentherapie 136 (1968), 609.
 [6] Burns, K. F., C. W. de Lannoy: Toxicol. appl. Pharmacol. 8 (1966), 429.
 [7] Catsch, A.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 246 (1964), 316.
 [8] Catsch, A., E. von Wedelstaedt: Experientia 21 (1965), 210.
 [9] Catsch, A.: Arzneimittel-Forsch. 17 (1967), 493.
 [10] Catsch, A.: Dekorporierung radioaktiver und stabiler Metallionen. K. Thieme, München 1968.
 [11] Catsch, A.: Naturwissenschaften 55 (1968), 473.
 [12] Doolan, P. D., S. L. Schwartz, J. R. Hayes, J. C. Mullen, N. B. Cummings: Toxicol. appl. Pharmacol. 10 (1967), 481.
 [13] Dvořák, P.: Strahlentherapie 139 (1970), 611.
 [14] Günther, R.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 262 (1969), 405.
 [15] Hauss, W. H., U. Gerlach, E. Schürmeyer: Dtsch. med. Wschr. 83 (1958), 1310.
 [16] Heintz, R.: Erg. inn. Med. Kinderheilk. 6 (1955), 334.
 [17] Hess, B.: Enzyme im Blutplasma. G. Thieme, Stuttgart 1966.
 [18] Hoffmann, H., L. Kersten: Z. Versuchstierk. 8 (1966), 227.
 [19] Macapinlac, M. P., W. N. Learson, W. J. Darby: In: „Zinc Metabolism“, A. S. Prasad (ed.). Ch. Thomas, Springfield/Ill. 1966.
 [20] Meltzer, L. E., J. R. Kitchell: Amer. Med. Sci. 242 (1961), 51.
 [21] Pearl, W., T. Balazs, D. A. Buyske: Life Science 5 (1966), 67.
 [22] Perry, H. M., H. A. Schroeder: J. Chron. Diseases. 2 (1955), 520.
 [23] Reuber, M. D.: Arch. Environ. Health 15 (1967), 141.
 [24] Reuber, M. D.: Toxicol. appl. Pharmacol. 11 (1967), 321.
 [25] Reuber, M. D.: J. Pathol. 97 (1969), 335.
 [26] Roger, M. M.: Acta Medica Hung. 21 (1965), 35.
 [27] Schmidt, F. H.: Excerpta Medica Intern. Congr. Ser. No. 90 (1965), 84.
 [28] Selye, H.: Stress. Acta Inc., Montreal 1950.
 [29] Test-Fibel der Firma Boehringer, Mannheim. Mannheim 1968.
 [30] Weber, K. M.: Experientia 24 (1968), 703.
 [31] Weber, K. M.: Z. ges. exp. Med. 150 (1969), 354.
 [32] Weber, K. M.: Experientia 25 (1969), 509.
 [33] Weber, K. M.: Virchows Arch. Abt. B 5 (1970), 39.

Anschrift d. Verf.: Dr. med. A. Seidel, Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe, 75 Karlsruhe 1, Postfach 3640.

Sonderdruck

139/5

1970

Strahlentherapie

**Archiv für klinische
und experimentelle Radiologie**

Metabolismus und Toxizität therapeutischer Chelatbildner

8. Mitteilung: Ausscheidung von Natrium, Kalium, Magnesium und Zink

Pavel Dvořák

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 1970

Tabelle 1. Methodik der Bestimmung mittels Atomabsorptions-Spektrometrie. Zur Eichung verwendete Standards: NaCl, KCl, MgSO₄, ZnCl₂, CaCl₂. Die Methodik wurde mittels des sogenannten Recovery-Tests überprüft.

Spektrallinie d. Elem. (Å)	Luft (l·min ⁻¹)	Acetylen	Probe	Stammlösung	Gemessene Lösung Verdünnung der Proben	Milieu
Na	4,5+3,0	0,9	Urin	0,1 ml + 0,1 ml 30% HCl + 4,8 ml H ₂ O	1:250, 1:500, 1:1000	0,1 — 0,15% HCl
5890			Serum	0,1 ml + 0,1 ml 30% HCl + 0,8 ml H ₂ O	1:500, 1:1000	0,1 — 0,15% HCl
K	8,0+3,0	0,8	Urin	0,1 ml + 0,1 ml 30% HCl + 4,8 ml H ₂ O	1:250, 1:500, 1:1000	0,1 — 0,15% HCl
7450			Serum	0,1 ml + 0,1 ml 30% HCl + 0,8 ml H ₂ O	1:50, 1:100	0,3 — 0,6 % HCl
Mg	7,7+3,0	0,9	Urin	0,1 ml + 0,1 ml 30% HCl + 4,8 ml H ₂ O	1:250, 1:500, 1:1000	0,1 — 0,15% HCl
2852			Serum	0,1 ml + 0,1 ml 30% HCl + 0,8 ml H ₂ O	1:50, 1:100	0,3 — 0,6 % HCl
Zn	9,0+3,0	1,1	Urin	2,0 ml + 0,5 ml 5% Na ₂ — ÄDTA	1:1,25, 1:2,5, 1:10000, 1:25000	1% Na ₂ -ÄDTA
2139			Serum	0,2 ml + 0,2 ml 5% Na ₂ — ÄDTA + 0,6 ml H ₂ O	1:5	1% Na ₂ -ÄDTA
Ca	6,0+3,0	0,95	Urin	0,5 ml + 0,3 ml 30% HCl	1:20, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000	1% HCl + 1% LaCl ₃
4227						

Ergebnisse

Da eine 24stündige Immobilisierung der Tiere im Stoffwechsellkäfig zweifelsohne einen Streß darstellt, war in einem Vorversuch zu klären, ob die Prozedur als solche das Ausscheidungsmuster der Metallionen beeinflusst. Die Tiere wurden jeden zweiten oder dritten Tag und insgesamt viermal in Stoffwechsellkäfige gesetzt und — wie auch bei den folgenden Versuchen — Futter und Wasser ihnen an den Versuchstagen entzogen. Tabelle 2 zeigt, daß am ersten Tag die Na-Ausscheidung deutlich herabgesetzt ist, die Tiere sich aber schnell adaptierten und die Ausscheidungsrate während des zweiten bis

vierten Versuchstages eine befriedigende Konstanz erreichte.

Unter Berücksichtigung dieses Ergebnisses wählten wir folgende Versuchsanordnung: Der am ersten Tag gewonnene Urin wurde verworfen, der des dritten Tages diente als Kontrolle, während am fünften Tag die Chelatbildner injiziert wurden. Am zweiten und vierten Tag befanden sich die Tiere in normalen Käfigen und hatten Zugang zu Futter und Wasser. Zwei Versuchsgruppen erhielten i. p. 12 bzw. 24 mmol NaCl·kg⁻¹, d. h. die 4 und 8 mmol DTPA·kg⁻¹ äquivalenten Na-Mengen. Die Urinvolumina und die während der ersten vier Stunden und

Tabelle 2. Kationenausscheidung im 24-Stunden-Urin und Urinmenge in Abhängigkeit von der Adaptation (vgl. Text). Mittelwerte ± Standardfehler. Je sechs Tiere pro Gruppe.

	Nr. des Versuchs			
	1.	2.	3.	4.
Na μmol	80 ± 12	393 ± 24	324 ± 20	379 ± 41
K μmol	1054 ± 110	849 ± 107	1061 ± 87	859 ± 51
Mg μmol	76 ± 10	159 ± 21	209 ± 19	127 ± 10
Zn μmol	0,029 ± 0,003	0,038 ± 0,004	0,040 ± 0,003	0,032 ± 0,004
Urinmenge ml	5,7 ± 1,0	7,7 ± 0,8	6,2 ± 0,6	7,2 ± 1,7

der darauf folgenden 20 Stunden ausgeschiedenen Metallmengen sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Die Ausscheidung von Na, K und Mg ist in allen Versuchsgruppen, die beiden NaCl-Dosen eingeschlossen, in mehr oder weniger starkem Maße erhöht. Die in den Abbildungen 1 bis 3 wiedergegebenen Kurven (normiert auf 200 g Körpergewicht) wurden mittels der Regressionsanalyse berechnet, und zwar für die Gruppen, die Ca-Chelate erhielten. Sie zeigen, daß der bestimmende Faktor die Na-Dosis und nicht die Dosis des Chelatanions ist. Weiterhin fallen die Mittelwerte der Zn-Chelat- und der NaCl-Gruppen ausnahmslos in den Mutungsbereich ($P = 0,05$) der berechneten Kurven, was die obige Feststellung noch einmal bestätigt. In Abbildung 1 entspricht Gerade 1 der Annahme, daß die verabfolgte Na-Menge innerhalb von 24 Stunden vollständig ausgeschieden wird; addiert man dazu die normalerweise, d. h. am zweiten Versuchstag ausgeschiedene Na-Menge, erhält man Gerade 2. Die experimentell

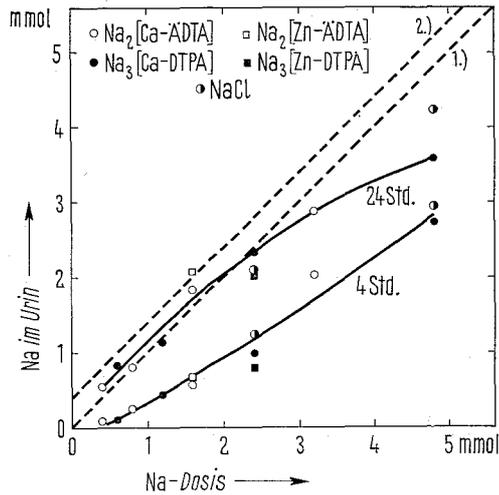


Abb. 1. Natriumausscheidung (y) mit dem Urin nach Chelat-injektion in Abhängigkeit von der Na-Dosis (x), normiert auf ein Körpergewicht von 200 g. Berechnete Kurven: Vier Stunden: $y = 0,90 + 0,524(x - 1,88) + 0,023(x^2 - 5,53)$; 24 Stunden: $y = 1,75 + 1,198(x - 1,88) - 0,094(x^2 - 5,53)$. Bezüglich der Geraden 1 und 2 s. Text.

Tabelle 3. Kationenausscheidung mit dem Urin und Urinmenge nach einmaliger Injektion der Chelate. Mittelwerte \pm Standardfehler. Je sechs Tiere pro Gruppe.

Körper-gew. (g)	Gruppe	Na (mmol)		K (mmol)		Mg (μ mol)		Zn (μ mol)		Urinmenge (ml)	
		0-4	4-24	0-4	4-24	0-4	4-24	0-4	4-24	0-4	4-24
223 \pm 3	Kontrolle	0,07	0,37	0,18	0,90	21,1	105,3	0,01	0,03	1,3	6,5
		$\pm 0,003$	$\pm 0,013$	$\pm 0,009$	$\pm 0,045$	$\pm 1,9$	$\pm 3,2$	$\pm 0,001$	$\pm 0,002$	$\pm 0,07$	$\pm 0,35$
218 \pm 6	Na ₂ [Ca-ADTA] 1	0,10	0,50	0,15	0,70	23,4	123,4	0,64	1,03	1,8	7,7
		$\pm 0,013$	$\pm 0,062$	$\pm 0,026$	$\pm 0,068$	$\pm 3,1$	$\pm 9,3$	$\pm 0,114$	$\pm 0,087$	$\pm 0,54$	$\pm 0,60$
243 \pm 5	2	0,30	0,68	0,39	0,58	44,8	97,9	1,12	0,95	1,7	7,7
		$\pm 0,040$	$\pm 0,099$	$\pm 0,052$	$\pm 0,067$	$\pm 6,8$	$\pm 16,7$	$\pm 0,151$	$\pm 0,138$	$\pm 0,32$	$\pm 0,81$
220 \pm 7	4	0,62	1,40	0,49	0,85	42,4	99,5	1,16	1,12	2,5	10,3
		$\pm 0,058$	$\pm 0,111$	$\pm 0,048$	$\pm 0,103$	$\pm 5,6$	$\pm 14,0$	$\pm 0,093$	$\pm 0,121$	$\pm 0,20$	$\pm 0,50$
213 \pm 4	8	2,08	0,96	0,62	0,73	69,9	116,0	1,28	1,37	6,1	5,4
		$\pm 0,106$	$\pm 0,123$	$\pm 0,036$	$\pm 0,061$	$\pm 7,2$	$\pm 14,8$	$\pm 0,067$	$\pm 0,087$	$\pm 0,25$	$\pm 0,57$
235 \pm 3	Na ₃ [Ca-DTPA] 1	0,12	0,86	0,30	0,91	29,6	98,3	1,62	1,21	1,0	11,6
		$\pm 0,015$	$\pm 0,125$	$\pm 0,033$	$\pm 0,065$	$\pm 4,7$	$\pm 8,6$	$\pm 0,252$	$\pm 0,148$	$\pm 0,09$	$\pm 0,62$
225 \pm 3	2	0,48	0,78	0,46	0,59	41,5	76,1	1,61	0,81	1,4	6,8
		$\pm 0,048$	$\pm 0,270$	$\pm 0,040$	$\pm 0,133$	$\pm 2,3$	$\pm 15,4$	$\pm 0,164$	$\pm 0,129$	$\pm 0,19$	$\pm 1,6$
202 \pm 5	4	0,99	1,36	0,57	0,77	56,8	89,7	2,06	1,61	2,6	9,9
		$\pm 0,072$	$\pm 0,130$	$\pm 0,064$	$\pm 0,054$	$\pm 3,5$	$\pm 11,4$	$\pm 0,160$	$\pm 0,091$	$\pm 0,25$	$\pm 0,96$
208 \pm 3	8	2,86	0,87	0,69	1,00	95,4	126,3	1,85	1,63	6,8	5,3
		$\pm 0,084$	$\pm 0,102$	$\pm 0,039$	$\pm 0,068$	$\pm 2,8$	$\pm 5,4$	$\pm 0,032$	$\pm 0,114$	$\pm 0,20$	$\pm 0,69$
243 \pm 6	Na ₂ [Zn-ADTA] 4	0,81	1,68	0,46	1,21	45,2	122,6	475	475	2,6	9,2
		$\pm 0,113$	$\pm 0,137$	$\pm 0,089$	$\pm 0,062$	$\pm 9,3$	$\pm 7,6$	$\pm 63,6$	$\pm 67,3$	$\pm 0,40$	$\pm 0,85$
236 \pm 9	Na ₃ [Zn-DTPA] 4	0,92	1,61	0,43	1,16	44,8	211,0	507	382	2,1	8,5
		$\pm 0,077$	$\pm 0,267$	$\pm 0,062$	$\pm 0,151$	$\pm 7,6$	$\pm 31,0$	$\pm 65,0$	$\pm 44,2$	$\pm 0,19$	$\pm 1,22$
243 \pm 10	NaCl 12	1,51	1,06	0,53	0,60	62,1	87,6	0,04	0,03	3,4	3,4
		$\pm 0,153$	$\pm 0,085$	$\pm 0,034$	$\pm 0,039$	$\pm 7,4$	$\pm 9,9$	$\pm 0,006$	$\pm 0,002$	$\pm 0,32$	$\pm 0,41$
217 \pm 3	24	3,19	1,39	0,64	0,49	57,6	82,7	0,04	0,02	9,2	3,8
		$\pm 0,264$	$\pm 0,263$	$\pm 0,077$	$\pm 0,092$	$\pm 5,7$	$\pm 16,7$	$\pm 0,005$	$\pm 0,002$	$\pm 0,71$	$\pm 0,73$

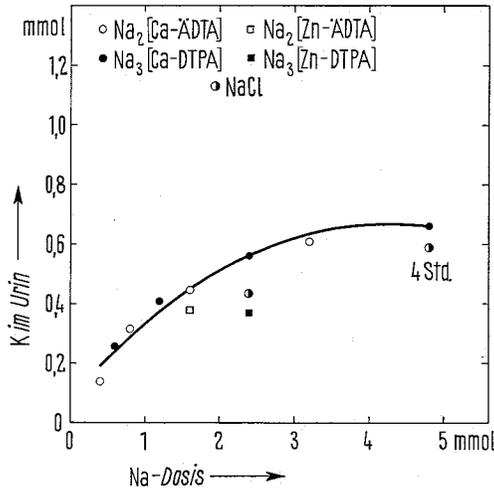


Abb. 2. Kaliumausscheidung (y) mit dem Urin nach Chelatinjektion in Abhängigkeit von der Na-Dosis (x), normiert auf ein Körpergewicht von 200 g. Berechnete Kurve: Vier Stunden: $y = 0,43 + 0,281(x - 1,88) - 0,034(x^2 - 5,53)$.

erhaltene 24-Stunden-Kurve weist — wenn man von den höchsten Dosen absieht — einen Steigungskoeffizienten von 1 auf, die überwiegende Zahl der Punkte liegt jedoch unterhalb der Geraden 2. Der quadratische Term, d. h. die eben erwähnte Abnahme der relativen Na-Ausscheidung bei den höchsten Dosen, ist statistisch signifikant. Nicht signifikant ist der Unterschied zwischen der höchsten DTPA- und NaCl-Dosis.

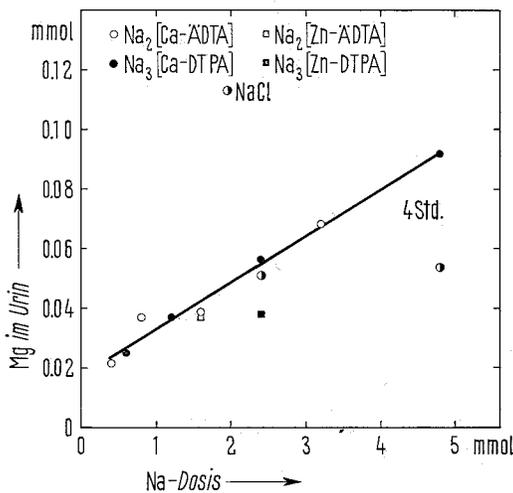


Abb. 3. Magnesiumausscheidung (y) mit dem Urin nach Chelatinjektion in Abhängigkeit von der Na-Dosis (x), normiert auf ein Körpergewicht von 200 g. Berechnete Kurve: Vier Stunden: $y = 0,047 + 0,016(x - 1,88)$.

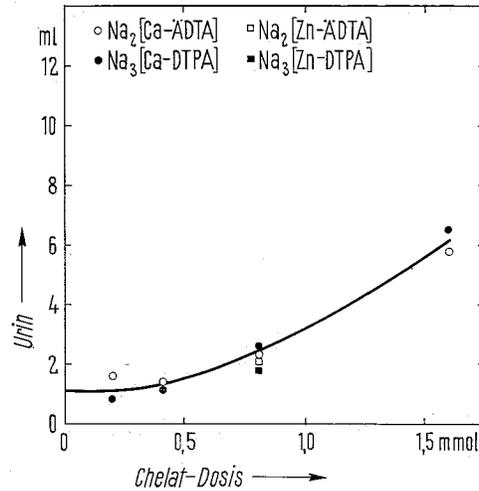


Abb. 4. Vier-Stunden-Urinmenge nach Chelatinjektion in Abhängigkeit von der Chelatdosis, normiert auf ein Körpergewicht von 200 g.

Aus Abbildung 1 und Tabelle 3 ist ersichtlich, daß das Maximum der Ausscheidung niedrigerer Na-Dosen später als bei hohen Dosen auftritt. Die K-Ausscheidung nimmt mit steigender Na-Dosis offensichtlich nicht stetig zu, und es scheint sich ein Plateau einzustellen. Die geringere Ausscheidung im Falle von Zn-DTPA und 12 mmol NaCl · kg⁻¹ ist statistisch nicht gesichert. Andere Verhältnisse liegen bei der stark erhöhten Zn-Ausscheidung vor, die nicht nur eine Funktion der Chelatdosis, sondern auch der Chelatart ist; eine genauere Analyse ist der Diskussion vorbehalten. Abbildung 4 zeigt, daß das Urinvolumen mit wachsender Dosis, jedoch nicht als Funktion der Na-Dosis zunimmt.

Tabelle 4 gibt die Metallionenkonzentration des Serums 24 Stunden nach Verabfolgung der Chelate wieder. Während die Na-Konzentration mit dem Kontrollwert praktisch identisch ist, sind die Konzentrationen von K und Mg gesichert niedriger, ohne jedoch, daß eine Dosisabhängigkeit erkennbar ist. Stark gesenkt, um rund 60%, ist die Zn-Konzentration, wobei der extrem niedrige Wert nach 8 mmol Ca-DTPA · kg⁻¹ im Vergleich zu den anderen Gruppen statistisch gesichert ist. Die leicht erhöhte Na-Konzentration nach Verabfolgung der Zn-Chelate ist zwar statistisch gesichert, eine begründete Erklärung hierfür kann jedoch nicht gegeben werden. Werden die Chelate mehrfach

Tabelle 4. Kationenkonzentration im Serum 24 Stunden nach Chelatinjektion. Mittelwerte \pm Standardfehler. Je sechs Tiere pro Gruppe.

Gruppe mmol·kg ⁻¹	Konzentration im Serum			
	Na μ mol·ml ⁻¹	K μ mol·ml ⁻¹	Mg μ mol·ml ⁻¹	Zn nmol·ml ⁻¹
Kontrolle*	141 \pm 3,5	5,70 \pm 0,13	1,16 \pm 0,042	23,7 \pm 2,33
Na ₂ [Ca-ÄDTA]	1	140 \pm 4,0	5,09 \pm 0,18	0,77 \pm 0,025
	2	144 \pm 3,5	4,81 \pm 0,12	0,73 \pm 0,033
	4	141 \pm 3,6	4,99 \pm 0,25	0,64 \pm 0,026
	8	139 \pm 1,1	4,45 \pm 0,40	0,99 \pm 0,089
Na ₃ [Ca-DTPA]	1	147 \pm 1,8	4,71 \pm 0,08	0,77 \pm 0,055
	2	148 \pm 2,6	4,78 \pm 0,12	0,86 \pm 0,021
	4	142 \pm 2,6	4,27 \pm 0,35	0,82 \pm 0,068
	8	140 \pm 3,3	4,37 \pm 0,16	0,98 \pm 0,061
Na ₂ [Zn-ÄDTA]	4	155 \pm 3,9	5,12 \pm 0,19	0,94 \pm 0,040
Na ₃ [Zn-DTPA]	4	157 \pm 1,7	5,06 \pm 0,24	1,09 \pm 0,057
NaCl	12	141 \pm 3,7	5,17 \pm 0,13	0,85 \pm 0,030
	24	146 \pm 1,1	4,81 \pm 0,19	0,73 \pm 0,030
Na ₂ [Ca-ÄDTA] 3 \times 4		127 \pm 1,9	5,57 \pm 0,14	1,06 \pm 0,067
Na ₃ [Ca-DTPA] 3 \times 4		126 \pm 1,5	5,31 \pm 0,18	1,28 \pm 0,077

* Mit Ausnahme von Na je zwölf Tiere.

an drei aufeinanderfolgenden Tagen i.p. injiziert und die Konzentrationen 24 Stunden nach der letzten Dosis bestimmt, erhält man praktisch die gleichen Verhältnisse wie nach einer einmaligen Dosis; eine Ausnahme ist nur die etwas niedrigere Na-Konzentration.

In einem letzten Versuch bestimmten wir die Ausscheidung des ¹⁴C-markierten Chelatanions und von Ca nach Verabfolgung der Chelate in einer Dosis von 4 mmol·kg⁻¹ und einer Aktivität von 8 μ Ci·kg⁻¹. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengestellt und werden weiter unten diskutiert. Hier sei nur erwähnt, daß 60 bis 70% der ¹⁴C-Dosis innerhalb von vier Stunden ausgeschieden werden. Im Falle der Zn-Chelate erfolgt die Zn-Ausscheidung annähernd mit der gleichen Geschwindigkeit (Tab. 3). Die gleiche Ausscheidungsrate fan-

den Harmuth-Hoene [14] und Havlicek et al. [16] für wesentlich niedrigere Chelatdosen (5 bis 500 μ mol·kg⁻¹), so daß eine dosisunabhängige Ausscheidung als wahrscheinlich gelten kann.

Diskussion

Eine Bilanz der untersuchten Kationen und ÄDTA bzw. DTPA im Fall der 4 mmol·kg⁻¹-Dosis gibt Tabelle 6, wobei die Werte, die aus verschiedenen Versuchsgruppen stammen, auf ein Körpergewicht von 200 g normiert sind. Es fällt bei der zweiten Urinportion (vier bis 24 Stunden) sofort auf, daß das Verhältnis Ca/Chelatbildner nur 0,6 beträgt. Dies bestätigt analoge Ergebnisse früherer Untersuchungen [9, 20–22]. Als Erklärung hierfür wurde angenommen, daß die Ca-Chelate im sauren

Tabelle 5. Calcium- und ¹⁴C-Chelatausscheidung mit dem Urin nach einmaliger Injektion der Chelate (4 mmol·kg⁻¹). Mittelwerte \pm Standardfehler. Je sechs (bzw. drei*) Tiere pro Gruppe.

Körpergewicht (g)	Gruppe	Ca (mmol)		¹⁴ C-Chelate (mmol)	
		0–4	4–24	0–4	4–24
223 \pm 4	Kontrolle	0,001 \pm 0,0001	0,003 \pm 0,0005	0	0
210 \pm 4	Na ₂ [Ca-ÄDTA]	0,495 \pm 0,050	0,173 \pm 0,0049	—	—
177 \pm 4	Na ₂ [Ca-ÄDTA]*	—	—	0,423 \pm 0,052	0,228 \pm 0,043
221 \pm 4	Na ₃ [Ca-DTPA]	—	0,132 \pm 0,026	—	—
185 \pm 6	Na ₃ [Ca-DTPA]*	0,511 \pm 0,024	—	0,528 \pm 0,070	0,179 \pm 0,025

Tabelle 6. Bilanz der Kationen- und ¹⁴C-Chelat-ausscheidung mit dem Urin (in μmol) nach einmaliger Injektion der Chelate (4 mmol·kg⁻¹). Die Werte sind auf 200 g Körpergewicht berechnet (vgl. hierzu die Daten in den Tabellen 3 und 5).

	ÄDTA		DTPA	
	0-4 Std.	4-24 Std.	0-4 Std.	4-24 Std.
Na	565	1269	983	1350
K	446	769	563	766
Mg	39	91	56	89
Ca	471	165	463	119
Zn	1	1	2	2
¹⁴ C-Chelate	478	257	569	194

Urin infolge der pH-Abhängigkeit der Chelatstabilität dissoziieren und es zu einer Reabsorption des freigesetzten Ca²⁺ kommt [20]. Diese Annahme wird durch den Nachweis gestützt, daß das Verhältnis Ca/Chelatbildner bei Alkalisierung des Urins (z. B. durch Diamox®) gleich 1 wird. Tabelle 6 zeigt zwar, daß das Verhältnis (Ca+Mg)/Chelatbildner ~ 1 ist, so daß an einen Austausch von Ca gegen Mg gedacht werden könnte. Dies kann jedoch nicht der Fall sein, da die Ca-Chelate etwa 100mal höhere Stabilitätskonstanten als die Mg-Chelate besitzen und die pH-Abhängigkeit der Stabilität natürlich auch für Mg-Chelate gilt. Die mobilisierte Zn-Menge kann als additives Glied vernachlässigt werden (vgl. Tab. 3), ebenfalls andere Spurenmetalle (vgl. hierzu [6, 7]), so daß anzunehmen ist, daß mindestens 40% des Chelatbildners nicht als Metallchelate im Urin vorliegen. Auffallend ist nun, daß in der ersten Urinportion das Verhältnis Ca/Chelatbildner mit Werten von 1 bzw. 0,8 größer ist. Die oben postulierte Dissoziation der Ca-Chelate bei niedrigen pH-Werten muß zwar mit steigender Chelatkonzentration abnehmen, doch ist es wenig wahrscheinlich, daß der Unterschied der Chelatkonzentration in den zu verschiedenen Zeitpunkten abgesonderten Urinportionen ausreichend groß ist, um den Effekt zu erklären. Eine andere Denkmöglichkeit wäre, daß der pH-Wert im Urin fortschreitend abnimmt. Dies ist jedoch nicht der Fall [10]. Die relativ große Ungenauigkeit der Quotienten 1 und 0,8 (wie sie sich aus den Standardfehlern in Tabelle 5 ergibt) läßt andererseits niedrigere Werte zu, und wir sind somit geneigt, eine Zeitabhängig-

keit des Dissoziationsgrades nicht anzunehmen und den fraglichen Unterschied als nur zufällig bedingt anzusehen.

Die während der ersten vier Stunden ausgeschiedenen Na-Mengen sind ebenfalls erheblich kleiner, als dem Chelat entspricht; das Verhältnis Na/2 ÄDTA und Na/3 DTPA beträgt nur 0,6. Die gleichzeitig erhöhte Ausscheidung von K und Mg gewährleistet jedoch die zu fordernde Anionen-Kationen-Äquivalenz. Daß die Zufuhr von Na⁺ neben einer erhöhten Natriurese zu einer gesteigerten Ausscheidung von K führt, ist bekannt und wird auf den Na-K-Austausch in den distalen Konvoluten zurückgeführt (Schrifttum bei [17]). Daß diese Erklärung auch für unsere Befunde gültig ist, geht aus der Abbildung 5 hervor, der zufolge die ausgeschiedene Menge beider Alkalimetallionen im Vier-Stunden-Urin eine lineare Funktion der zugeführten Na-Dosis ist. In unseren Versuchen nimmt das Verhältnis K/Na im Urin mit steigender Chelatdosis zwar ab, doch trifft dies auch für die Verabfolgung von NaCl zu, so daß eine spezifische Chelatwirkung auszuschließen ist, da der Quotient K/Na offensichtlich nur von der Na-Dosis abhängt. Eine erhöhte Mg-Ausscheidung wie in unserer Unter-

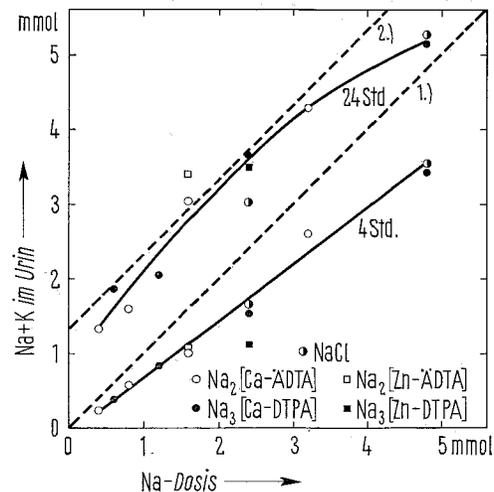


Abb. 5. Summe der Natrium- und Kaliumausscheidung (y) mit dem Urin nach Chelatinjektion in Abhängigkeit von der Na-Dosis (x), normiert auf ein Körpergewicht von 200 g. Berechnete Kurven: Vier Stunden: $y = 1,32 + 0,805(x - 1,88)$; 24 Stunden: $y = 2,88 + 1,472(x - 1,88) - 0,113(x^2 - 5,53)$. Bezüglich der Geraden 1 und 2 s. Text.

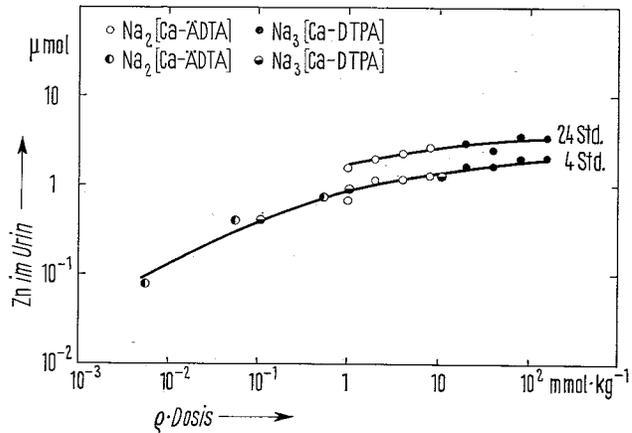


Abb. 6. Zinkausscheidung mit dem Urin nach Chelatinjektion in Abhängigkeit von der Chelatdosis $\cdot \rho$. ρ = Effektivitätskoeffizient; für ADTA $\rho = 1$, für DTPA $\rho = 20$. (●) und (○) : Versuche von Havlicek [15].

suchung wurde auch nach Infusion von Na-Salzen anderer mehrwertiger Anionen beobachtet [25].

Der Verlust an K und Mg wird offenbar schnell kompensiert, da die entsprechenden Serumkonzentrationen nach 24 Stunden nur noch geringfügig gesenkt sind (Tab. 4). Dies gilt auch für die wiederholte Verabfolgung der Chelate. Die in der Einleitung zitierte Hypothese, die chelatinduzierten nephrotischen Veränderungen ursächlich auf eine Hypokaliämie zurückzuführen, dürfte damit an Wahrscheinlichkeit verlieren; dies gilt um so mehr, als die hypokaliämische Nephrose sich erst bei ausgesprochener K-Defizienz und außerdem wesentlich langsamer als im Falle der Chelate entwickelt (vgl. hierzu [18]) und schließlich Unterschiede in der Art und Lokalisation der histologischen Läsionen zu bestehen scheinen.

Die sogenannte effektive Stabilitätskonstante (vgl. hierzu [6, 7]) des Zn-DTPA ist 90mal größer als die von Zn-ADTA. Damit in Übereinstimmung steht die Untersuchung von Havlicek [15], der bezüglich der Mobilisierung von endogenem Zn eine rund 100mal höhere Effektivität des DTPA findet. Im Widerspruch dazu findet Weber [26] in Versuchen mit ⁶⁵Zn nur eine etwa zehnmal höhere Wirksamkeit von DTPA. Unsere Untersuchung ermöglicht eine Überprüfung dieser Frage, wobei wir die Daten von Havlicek [15], denen eine nur unwesentlich verschiedene Methodik zugrunde liegt, mitberücksichtigten. Die beste Approximation der Abhängigkeit des Zn-Gehalts im Vier-Stunden-Urin von der Chelatdosis durch

eine gemeinsame Kurve erhält man, wenn die DTPA-Dosen mit einem Faktor 20 multipliziert werden (Abb. 6). Die Verwendung eines Faktors 90 dagegen ergibt eine schlechtere Korrelation. Die mobilisierten Zn-Mengen sind ein Vielfaches des Plasma-Zn, das nur $\sim 0,1 \mu\text{mol}$ ausmacht. Es muß somit eine Mobilisierung von Zn aus den Organen angenommen werden. Die normale Zn-Konzentration des Serums ist nach 24 Stunden noch nicht erreicht. Es ist bemerkenswert, daß – mit Ausnahme der 8 mmol DTPA $\cdot \text{kg}^{-1}$ -Dosis – die Werte bei allen Gruppen, die wiederholte Chelatverabfolgung eingeschlossen, nicht wesentlich verschieden sind und rund 40% des Normwertes ausmachen. Dieser Prozentsatz stimmt recht gut mit dem Bruchteil des Zn überein, das als relativ stabiles Metallprotein vorliegt [23]. Ohne genauere Kenntnis der Kinetik halten wir eine Diskussion der Abhängigkeit der Zn-Konzentration von Dosis und Art des Chelats für verfrüht.

Fassen wir die wesentlicheren Ergebnisse zusammen: Die nach Verabfolgung toxischer Dosen von Ca-Chelaten zu beobachtende Erhöhung der K- und Mg-Ausscheidung ist allein die Folge der erhöhten Na-Zufuhr und für die Pathogenese der Chelat-Toxizität irrelevant. Anderenfalls wäre nicht zu verstehen, warum die Zn-Chelate sowie hohe NaCl-Dosen sich bezüglich der renalen Ausscheidung und Serumkonzentration von K und Mg vollkommen identisch mit den Ca-Chelaten verhalten. Auf die mögliche Bedeutung der Zn-Mobilisierung, die eingehend an anderer Stelle [7] diskutiert wurde, soll hier nicht eingegangen werden. Die

Feststellung, daß DTPA — entgegen früheren Befunden — eine nur 20mal höhere Effektivität als ÄDTA aufweist, könnte sich bei einer späteren Analyse des Toxizitätsmechanismus der

Chelate, die noch weitere Untersuchungen benötigt, als bedeutungsvoll erweisen.

Für technische Assistenz danke ich Frau R. Simon und Fräulein U. Ehrig.

Zusammenfassung

Die intraperitoneale Verabfolgung hoher Dosen der Ca- und Zn-Chelate des ÄDTA und DTPA sowie von NaCl führt bei der Ratte zu einer erhöhten Ausscheidung von K und Mg mit dem Urin, deren Ausmaß allein von der Na-Dosis abhängt. Die K- und Mg-Konzentration des Serums ist nur geringfügig herabgesetzt. Was die Zn-Ausscheidung betrifft, ist DTPA etwa 20mal wirksamer als ÄDTA. Die Bedeutung dieser Befunde für die Toxizität der Chelatbildner wird diskutiert.

Summary

The intraperitoneal administration of high doses of the Ca- and Zn-chelates of EDTA and DTPA as well as of NaCl leads to an enhanced urinary excretion of K and Mg in the rat. Its degree depends only on the dose of Na. The concentration of K and Mg in the serum is slightly diminished. As to the excretion of Zn, DTPA is 20 times more effective than EDTA. The implications of these findings for the toxicity of the chelating agents are discussed.

Résumé

L'injection intrapéritonéale de fortes doses des chélates calcique et zincique de l'EDTA et du DTPA ainsi que de NaCl provoque chez le rat une élévation de l'excrétion urinaire de K et Mg, dont l'importance dépend seulement de la dose en sodium. La concentration en K et Mg du sérum n'est que faiblement réduite. Le DTPA est environ 20 fois plus actif que l'EDTA pour l'élimination du zinc. Ces résultats sont discutés dans le cadre de la toxicité des agents chélateurs.

Schrifttum

- [1] Ahrens, F. A., A. L. Aronson: Fed. Proc. 27 (1968), 1401.
[2] Aronson, A. L., P. B. Hammond, A. C. Strafuss: Toxicol. appl. Pharmacol. 12 (1968), 337.
[3] Batchelor, T. M., M. McCall, R. M. Mosher: J. Amer. med. Ass. 187 (1964), 305.
[4] Catsch, A.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 246 (1964), 316.
[5] Catsch, A.: Arzneim.-Forsch. 17 (1967), 493.
[6] Catsch, A.: Dekorporierung radioaktiver und stabiler Metallionen. K. Thieme, München 1968.
[7] Catsch, A.: Naturwissenschaften 55 (1968), 473.
[8] Catsch, A., E. von Wedelstaedt: Experientia (Basel) 21 (1965), 210.
[9] Cournoisier, B., E. C. Bonard, E. Martin: Schweiz. med. Wschr. 84 (1954), 1289.
[10] Dvořák, P.: In Vorbereitung.
[11] Foreman, H., V. Nigrovic: Diagnosis and Treatment of Deposited Radionuclides, p. 419. Excerpta Medica Foundation 1968.
[12] Forland, M., T. N. Pullman, A. R. Lavender, I. Aho: J. Pharmacol. exp. Ther. 153 (1966), 142.
[13] Günther, R.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol. 262 (1969), 405.
[14] Harmuth-Hoene, A. E.: Strahlentherapie 134 (1967), 110.
[15] Havlíček, F.: Strahlentherapie 134 (1967), 296.
[16] Havlíček, F., F. Bohne, H. Zorn: Strahlentherapie 136 (1968), 604.
[17] Kruhoffer, P.: In: The Alkali Metal Ions in Biology, p. 233. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1960.
[18] Relman, A. S., W. B. Schwartz: Amer. J. Med. 24 (1938), 764.
[19] Reuber, D. M.: Arch. Path. 76 (1963), 382.
[20] Rubin, M., G. E. Lindenblad: Ann. N. Y. Acad. Sci. 64 (1956), 337.
[21] Truhaut, R., C. Boudène, M. Lutz: Ann. Biol. clin. 24 (1966), 419.
[22] Verbanck, M., C. Toussaint, N. Toppet, H. Bastanier, P. Deslypère, Degraef-Millet: Arch. Malad. Profess. 20 (1959), 21.
[23] Vikbladh, I.: Scand. J. clin. Lab. Invest. 2 (1950), 143.
[24] Volf, V., Th. Mohr: In Vorbereitung.
[25] Walser, M., A. Browder: J. clin. Invest. 37 (1958), 940.
[26] Weber, I.: Diss. Heidelberg 1968.
[27] Weber, K. M.: Experientia (Basel) 24 (1968), 703.
[28] Weber, K. M.: Z. ges. exp. Med. 150 (1969), 354.
[29] Weber, K. M.: Experientia (Basel) 25 (1969), 509.
[30] Weber, K. M.: Strahlentherapie 137 (1969), 703.
[31] Zollinger, H. U.: Spezielle pathologische Anatomie, Bd. 3. Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1966.
[32] Zorn, H.: Diss. Karlsruhe 1970.

Anschrift d. Verf.: Dipl.-Chem. P. Dvořák, Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe, 7500 Karlsruhe 1, Postfach 3640.