

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM  
KARLSRUHE**

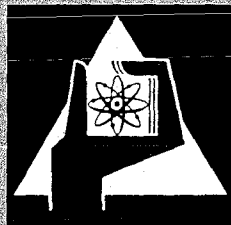
Oktober 1970

KFK 1362

Institut für Strahlenbiologie

**Metabolismus und Toxizität therapeutischer Chelatbildner  
9. Mitteilung: Zur Frage der Metabolisierung von ÄDTA und DTPA**

H. Zorn



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.  
KARLSRUHE



Sonderdruck

**140/4**

1970

# **Strahlentherapie**

**Archiv für klinische  
und experimentelle Radiologie**

## **Metabolismus und Toxizität therapeutischer Chelatbildner**

**9. Mitteilung: Zur Frage der Metabolisierung von ÄDTA und DTPA**

**Herbert Zorn**

Aus dem Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe



MÜNCHEN - BERLIN - WIEN

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

**URBAN & SCHWARZENBERG**

© Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien 1970



Nachdem *Havlicek* et al. (1968) im Gegensatz zu *Foreman* et al. (1953, 1960) einen geringen Abbau von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Äthylendiamintetraazetat (ÄDTA) und Diäthylentriamin-pentaazetat (DTPA) bei Ratten nachweisen konnten, lag es nahe, den zugrunde liegenden Mechanismus näher zu untersuchen, d. h. das für den Abbau verantwortliche Enzym oder Enzymsystem *in vitro* zu finden, anzureichern und zu charakterisieren. Besonderes Interesse galt dabei den Metaboliten des ÄDTA und DTPA, die, wie von *Havlicek* et al. (1968) und *Catsch* (1968) bereits kurz diskutiert, möglicherweise für die Toxizität dieser Substanzen verantwortlich sein könnten.

## Material und Methodik

### Tiermaterial, Organgewinnung und Homogenatherstellung

Als Versuchstiere dienten Albinoratten des Heiligenberg-Inzuchtstammes, die Standardfutter (Altromin R) und Leitungswasser ad libitum erhielten. Für die *in vitro*-Versuche wurden Organe von männlichen Tieren mit einem Körpergewicht von 180 bis 220 g verwendet, während die Versuche *in vivo* mit weiblichen Ratten, deren Körpergewicht 170 bis 190 g betrug, durchgeführt wurden. Die Organe wurden unter Äthernarkose nach Ausbluten aus der Aorta und V. cava inferior entnommen und sofort gewogen. Alle weiteren Prozeduren wurden im Eisbad durchgeführt. Nach grobem Zerkleinern mit einer Schere wurden pro g Frischgewebe 5 ml Saccharoselösung (0,25 M) bzw. der entsprechende Puffer zugegeben und mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Urin wurde von männlichen, in einem speziellen Stoffwechsellkäfig (*Volf* u. *Mohr*, im Druck) immobilisierten Ratten über 24 Stunden gesammelt. Zur Serumgewinnung wurde Blut kurz zentrifugiert.

### Chelatbildner

Inaktive Chelate:  $\text{Na}_2\text{Ca} \cdot \text{ÄDTA} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (Calcium-Titriplex®, E. Merck AG, Darmstadt) und  $\text{Na}_3\text{Ca} \cdot \text{DTPA} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (J. R. Geigy, Basel).

$^{14}\text{C}$ -markierte Chelate:  $\text{Na}_4\text{ÄDTA-1-}^{14}\text{C}$  (1 mCi/mmol) zu 99% radiochemisch rein (International Chemical and Nuclear Corporation, City of Indus-

try, Calif./USA),  $\text{Na}_4\text{ÄDTA-2-}^{14}\text{C}$  (21,6 mCi/mmol) zu 95 bis 96% radiochemisch rein (The Radiochemical Centre, Amersham, England),  $\text{H}_4\text{ÄDTA-äthylen-}^{14}\text{C}$  (1,58 mCi/mmol) (Mallinckrodt Nuclear, Orlando, Florida/USA),  $\text{H}_5\text{DTPA-1-}^{14}\text{C}$  (2,81 mCi/mmol) (Geigy Research Laboratories, Ardsley N.Y./USA),  $\text{H}_5\text{DTPA-1-}^{14}\text{C}$  (0,59 mCi/mmol) synthetisiert von Dr. *Schweer* (Institut für Strahlenchemie, Kernforschungszentrum Karlsruhe).

### Versuchsanordnungen *in vitro*

Da offensichtlich ein oxydativer Abbau der Chelatbildner anzunehmen ist, wurde folgende Versuchsanordnung zum Nachweis des vermuteten enzymatischen Abbaus gewählt. Als Reaktionsgefäß diente eine etwa 12 ml fassende Waschflasche mit Fritte, in der sich ein sogenannter Standardansatz befand. Darauf folgte eine gleich große Sicherheitsflasche, der ein mit Kieselgel gefülltes U-Rohr zur Trocknung nachgeschaltet war. Das entstehende  $^{14}\text{CO}_2$  wurde in einem Absorptionsgefäß mit 12 ml einer Mischung aus Methanol und Äthanolamin (3:1 V/V) aufgefangen. Das Reaktionsgefäß und die Sicherheitsflasche wurden in einem Wasserbad thermostatiert (30°C). Zur „Beatmung“ des Ansatzes wurde langsam ein Luftstrom durch die Apparatur gesaugt. Die Inkubationsdauer betrug eine Stunde; dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml halbkonzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gestoppt und anschließend noch 20 min mit Luft gespült, um alles  $^{14}\text{CO}_2$  zu absorbieren. Unter identischen Bedingungen gewonnene Leerwerte ohne Homogenat wurden jeweils subtrahiert.

### Standardansatz I

9 ml Puffer (Sörensen pH 5,9), 0,5 ml auf enzymatische Aktivität zu untersuchende Lösung bzw. Suspension, 0,1 ml Substratlösung ( $\text{Na}_2\text{Ca} \cdot \text{ÄDTA-2-}^{14}\text{C}$  12  $\mu\text{Ci/ml}$ , 400  $\mu\text{mol/ml}$ ).

### Standardansatz II

Wie I, aber 0,2 ml Substratlösung und zur Sättigung zusätzlich 154 mg  $\text{Na}_2\text{Ca} \cdot \text{ÄDTA} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ .

### Bestimmung der $^{14}\text{C}$ -Aktivität

Die  $^{14}\text{C}$ -Aktivität der Proben wurde in einem Flüssigszintillationszähler (Mark I, Nuclear Chicago Corporation) zusammen mit einem Standard (d. h. einem aliquoten Teil der Substrat- bzw. Injek-

tionslösungen) gemessen. Als Flüssigszintillatoren dienten:

1. *Petroff*-Szintillator: 8 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 110 g 2,2'-p-Phenyl-bis-(5-Phenylloxazol) (POPOP) wurden in 100 ml Toluol gelöst und nach Zugabe von 150 ml 2-Butoxy-Äthanol mit Toluol auf 1000 ml aufgefüllt.

2. *Bray*-Szintillator: 4 g PPO, 200 mg POPOP und 60 g Naphthalin wurden mit 100 ml Methanol sowie 60 ml Äthylenglykol versetzt und mit Dioxan auf 1000 ml aufgefüllt. Zur Messung des  $^{14}\text{CO}_2$  wurden nach Beendigung der Veratmungsversuche je 10 ml *Petroff*-Szintillator in die Absorptionsgläschen pipettiert und, wenn nötig, mit Methanol aufgefüllt (Gesamtvolumen etwa 22 ml). Die Bestimmung der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität in den durch die Gelchromatographie erhaltenen Fraktionen erfolgte mit je 10  $\mu\text{l}$  Lösung in 10 ml *Bray*-Szintillator. Die gemessene Impulsrate wurde mit Hilfe einer Quenchkurve in Zerfälle pro Minute umgerechnet.

#### Versuchsanordnung in vivo

Alle Chelatbildner wurden als Ca-Chelate intraperitoneal, in 0,5 ml Wasser gelöst, injiziert. Die Konzentration betrug 200  $\mu\text{mol/ml}$  und die  $^{14}\text{C}$ -Dosis, wenn nicht anders angegeben, etwa 4  $\mu\text{Ci/ml}$ . Der pH-Wert der Injektionslösungen lag bei den Chelaten des ÄDTA um 5, bei denen des DTPA zwischen 7,5 und 8,0.

Die Proteinbestimmung zur Berechnung der spezifischen Enzymaktivität von Homogenaten wurde mit der (geringfügig modifizierten) Methode von *Beisenherz et al.* (1953) durchgeführt.

Für die *Hochspannungselektrophorese* wurden je 6  $\mu\text{l}$  der Injektionslösungen aufgetragen. Als Puffer diente ein Veronalpuffer (pH 8,6), die Laufzeit betrug 20 min bei einer Feldstärke von 90 V/cm.

Die Aktivität wurde durch Autoradiographie lokalisiert und das ÄDTA mit dem Sprühreagenz nach *Sykora u. Eysel* (1966) nachgewiesen, das ÄDTA- und DTPA-Komplexe durch Bildung der jeweiligen Co(III)-Verbindungen violett anfärbt. Zusammensetzung: 1%  $\text{CoCl}_2$ , 2%  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  und 10% Eisessig in Wasser.

#### Gelchromatographie

Sephadex G 10 wurde einige Stunden in Wasser gequollen und anschließend blasenfrei in Säulen eingefüllt. Für die einzelnen Reinigungsversuche wurden folgende Säulendimensionen gewählt:

	Bethöhe	Säulendurchmesser
Vorversuch	44 cm	1 cm
Reinigung	143 cm	1,4 cm

Die Elutionsgeschwindigkeit betrug im sogenannten Vorversuch 31 ml/Stunde und bei der Reinigung

26 bis 28 ml/Stunde. Die Fraktionsgröße betrug 1,8 ml (40 Tropfen).

#### Ergebnisse

##### In-vitro-Versuche

Zum Nachweis einer enzymatischen Reaktion wurden verschiedene Organe und Körperflüssigkeiten untersucht. Die Versuche wurden mit ÄDTA- $^{14}\text{C}$  durchgeführt. Nach Beatmung von Homogenaten aus Nieren, Leber und Dünndarm sowie Dünndarmstücken im Standardansatz I zeigte sich, daß die spezifische Aktivität der Niere 2,1mal größer als die der Leber und 3,6mal größer als die des Dünndarms ist. Daraus ist zu entnehmen, daß die Niere das Organ mit der größten spezifischen metabolisierenden Wirkung auf das ÄDTA ist. Serum ist nicht in der Lage, ÄDTA in vitro zu veratmen. Auch Vollblut und Urin, die im Standardansatz I getestet wurden (je 0,5 ml), erwiesen sich als völlig inaktiv. Daher wurden für die weiteren Untersuchungen ausschließlich Nierenhomogenate verwendet.

Anreicherungsversuche mittels Differentialzentrifugation nach *Hogeboom* schlugen fehl. Nur in den Kern- und Mitochondrienfraktionen wurden je 8 bis 10% der gesamten Enzymaktivität wiedergefunden. Versuche, die enzymatische Aktivität mittels Detergentien von den Zellstrukturen abzulösen, mißlangen ebenfalls. Anionische Detergentien (Teepol 710, Desoxycholat) wirkten als Inhibitoren, das kationische N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid sowie das neutrale Triton X 100 waren ohne Einfluß. Bei der Ultraschallzerkleinerung verschwand die Enzymaktivität völlig. Nach Ultrazentrifugation zeigte sich im Niederschlag eine um den Faktor 4 erhöhte spezifische Aktivität. Im Überstand war keinerlei enzymatische Aktivität nachweisbar. Die Behandlung von zentrifugierten Homogenaten mit Phospholipase A und D (Boehringer, Mannheim) erhöhte die spezifische Aktivität im Niederschlag um den Faktor 2, wogegen eine Behandlung mit Pankreatin und Trypsin ohne Einfluß blieb (vgl. hierzu *Zorn*, 1970).

Nachdem alle Anreicherungsversuche fehlgeschlagen waren, wurde versucht, die enzymatische Reaktion in Homogenaten direkt zu charakterisieren. Zunächst wurde das pH-Optimum der Reaktion mit Nierenhomogenaten von zwei Ratten gleichen Gewichts bestimmt. Dazu wurde der Standardansatz I mit verschiedenen Puffern benutzt:

pH 3 bis 4,5 Citratpuffer,  
pH 5,5 bis 7,5 Sörensen-Puffer,  
pH 8,5 Pyrophosphat/HCl-Puffer.

Die Blindwerte der Reaktion blieben über den gesamten pH-Bereich konstant. Es ergab sich für beide Homogenate ein übereinstimmendes pH-Optimum für die Veratmungsreaktion zwischen pH 5,5 und pH 6,0 (Abb. 1). Die Maxima der beiden Kurven unterscheiden sich infolge der bio-

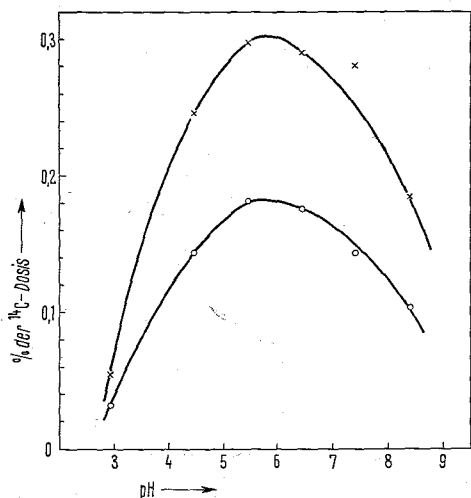


Abb. 1. pH-Abhängigkeit der ADTA-Veratmung in vitro (Erläuterungen im Text).

logischen Variabilität um einen Faktor von rund 1,6. Die Abbaureaktion verläuft im Standardansatz II über vier Stunden linear mit der Zeit, und zwar werden pro Stunde 0,02% der  $^{14}\text{C}$ -Dosis als  $^{14}\text{CO}_2$  aufgefangen. Bei 30minütiger Inkubation des Standardansatzes II bei verschiedenen Temperaturen und anschließender Substratzugabe verschwindet die enzymatische Aktivität oberhalb  $60^\circ\text{C}$  völlig. In Gegenwart von reinem  $\text{O}_2$  wird im Vergleich zu Luft die Veratmungsaktivität nicht gesteigert, dagegen werden unter  $\text{N}_2$  höchstens noch 30% der enzymatischen Aktivität gefunden.

Die Wirkung verschiedener Inhibitoren auf den ADTA-Abbau ist in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1. Einwirkung verschiedener Enzyminhibitoren auf die Veratmung von ADTA im Nierenhomogenat. Standardansatz I. Die Inhibitorkonzentration war  $10^{-3}\text{M}$ . Bei den Versuchen mit RBS 25,  $\text{CHCl}_3$  und Na-Cholat wurden je 0,1 ml Lösung und vom Rattenserum 0,5 ml dem Standardansatz I zugegeben.

Inhibitor	% der Kontrolle Mittelwert
KCN	11
$\text{Na}_2\text{S}$	20
$\text{NaN}_3$	10
RBS 25	15
$\text{CHCl}_3$	18
Na-Cholat (20%/oig)	2
p-Chinon	18
Dinitrophenol	9
Naphthochinon	4
$\text{HgCl}_2$	12
Rattenserum	24

Folgende Substanzen hatten keinerlei Einfluß auf den ADTA-Abbau: Hydrazin, Hydroxylamin, Aminoguanidin, Semicarbazid, Methylenblau, 8-Oxychinolin und Alloxan. Spezifische Hemmer für einzelne Schritte der Atmungskette, wie Antimycin A und 5-Äthyl-5-isoamylbarbitursäure sowie das als Monoaminoxidasehemmer bekannte  $\beta$ -Phenyläthylhydrazinhydrogensulfat, blieben ebenfalls wirkungslos.

Einige der obigen Befunde lassen sich mit der Annahme einer Beteiligung der Cytochromoxidase am ADTA-Abbau in vitro vereinbaren. Nach Yonetani (1963) besitzt die Cytochromoxidase ein pH-Optimum von 5,8, was gut mit dem pH-Bereich (5,5 bis 6,0) übereinstimmt, in dem das ADTA in vitro maximal veratmet wird. Als Inhibitoren werden Cyanid und Azid angegeben, wogegen ADTA und 8-Oxychinolin ohne Hemmwirkung sind. Allerdings müßten auch Aldehydagentien, wie Hydroxylamin und Hydrazinderivate, als Hemmer fungieren, was jedoch bei Untersuchungen mit Nierenhomogenat für den ADTA-Abbau nicht der Fall ist. Ferner kann die Cytochromoxidase in Gewebeschnitten durch 30minütiges Erwärmen auf  $60^\circ\text{C}$  inaktiviert werden. Interessant ist außerdem, daß anionische Detergentien die Cytochromoxidase inhibieren, neutrale und kationische dagegen aktivieren. Daher wurde nach der Methode von Greci u. Ziegler (1963) ein Cytochromoxidasepräparat aus Rinderherzmitochondrien hergestellt. Die Cytochromoxidaseaktivität wurde nach Wharton (1967) geprüft, und die ADTA-Veratmungsfähigkeit wurde im Standardansatz I getestet. Die angereicherte Cytochromoxidase war völlig inaktiv, wogegen der weitgehend von Cytochromoxidase befreite und abzentrifugierte Niederschlag einen deutlichen ADTA-Abbau bewirkte.

Von Havlíček et al. (1968) war gezeigt worden, daß ADTA und DTPA unabhängig von dem chelierten Metall gleich stark in vivo veratmet werden. In vitro konnte dieser Befund durch Vergleich des Abbaus des  $\text{Na}_2\text{CaADTA}$  und des äußerst stabilen  $\text{NaFeADTA}$  bestätigt werden:  $\text{NaFeADTA}$  wurde zu  $1,0 \cdot 10^{-2}\%$  der  $^{14}\text{C}$ -Dosis und  $\text{Na}_2\text{CaADTA}$  zu  $1,2 \cdot 10^{-2}\%$  veratmet.

Die bisherigen Versuche zeigten zwar, daß es sich bei dem in vitro gefundenen Effekt um eine enzymatische Einwirkung auf das radioaktive Substrat handelt, eine Identifizierung

des Enzyms war jedoch nicht möglich. Zur Erklärung der zum Teil nicht eindeutigen Ergebnisse bietet sich die Erklärung an, daß zum enzymatischen Abbau des ÄDTA mehrere und an Zellbruchstücken lokalisierte Enzyme nötig sind. Beim Ablösen oder Hemmen eines Teils dieser Enzyme wird der ganze Enzymkomplex unwirksam. Damit ist aber noch nicht erklärt, warum das Ca- und das Fe(III)-Chelat zu innerhalb der Fehlergrenze gleichen Prozentsätzen abgebaut werden. Wie Peters et al. (1966) zeigten, ist das dreiwertige Eisen in der Lage, Desferrioxamin durch Komplexbildung einem enzymatischen Angriff zu entziehen. Ein ähnlicher Effekt kann auch in unserem Fall erwartet werden. Als Alternative zu obigem Erklärungsversuch kann angenommen werden, daß es sich bei dem tatsächlich abgebauten Substrat nicht um ÄDTA, sondern um eine Vielzahl von Verunreinigungen handelt, die von verschiedenen Enzymen metabolisiert werden.

Sollten die gefundenen Veratmungseffekte durch radioaktive Verunreinigungen hervorgerufen werden, wäre zu erwarten, daß die unterschiedlich sauberen Präparate (ÄDTA-1- $^{14}\text{C}$  zu 99%, ÄDTA-2- $^{14}\text{C}$  zu 98 bis 96% radiochemisch rein, siehe Methodik) auch verschieden große Effekte ergeben, und zwar sollte die Veratmung des ÄDTA-2- $^{14}\text{C}$  etwa um den Faktor 2 bis 4 die des ÄDTA-1- $^{14}\text{C}$  übersteigen. Diese Vermutung wurde bei pH 5,9 im Standardansatz geprüft. Das ÄDTA-2- $^{14}\text{C}$  wurde zu  $3,3 \cdot 10^{-1}\%$  der  $^{14}\text{C}$ -Dosis und das

ÄDTA-1- $^{14}\text{C}$  zu  $7,6 \cdot 10^{-2}\%$  veratmet, was einem Faktor von 4,4 entspricht. Damit kann als sehr wahrscheinlich angenommen werden, daß die bisherigen Ergebnisse nicht auf einem Abbau des ÄDTA, sondern auf der Oxydation unbekannter Verunreinigungen beruhen.

Zur weiteren Sicherung dieser Befunde unterzogen wir in einem Vorversuch eine Probe  $\text{Na}_2\text{CaÄDTA-2-}^{14}\text{C}$  einer Gelfiltration über Sephadex G10. Die  $^{14}\text{C}$ -Aktivität erschien in einem einzigen Peak, der allerdings eine kleine Schleppe besaß. Die dem Peakmaximum entsprechende Fraktion wurde, ebenso wie die ungereinigte Verbindung, im Standardansatz I geprüft. Die Veratmung betrug bei dem gereinigten ÄDTA- $^{14}\text{C}$   $2,75 \cdot 10^{-2}\%$  der Dosis, bei dem „gereinigten“ dagegen nur  $2,25 \cdot 10^{-3}\%$  der Dosis. Damit war ein weiterer Beweis erbracht, daß in vitro zumindest der größte Teil des Veratmungseffekts nicht auf dem Abbau des ÄDTA beruht.

#### In-vivo-Versuche

Nach diesen Ergebnissen war es geboten, die Experimente von Havlíček et al. zu überprüfen. Dazu wurden die in verschiedenen Positionen markierten Chelatbildner über Sephadex G10 gereinigt. Es ergaben sich zwei grundsätzlich verschiedene Arten von Elutionsdiagrammen: Entweder erscheint die Aktivität in einem Peak (I), dem mindestens ein weiterer, deutlich kleinerer (II) folgt, oder die gesamte Aktivität wird

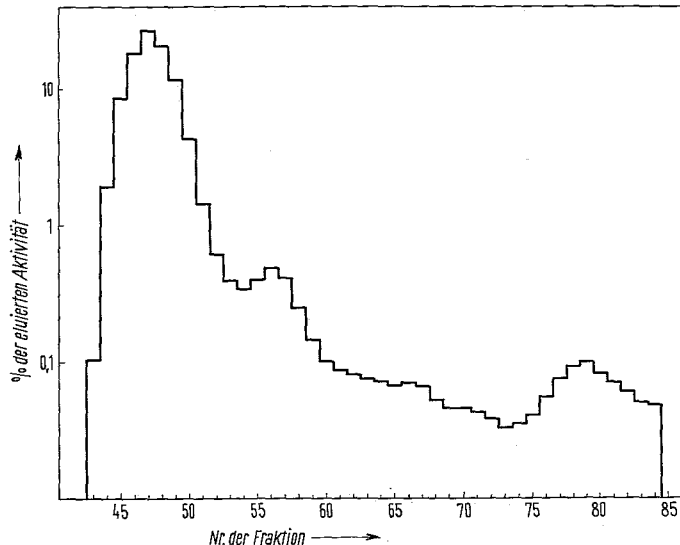


Abb. 2. Verteilung der eluierten Aktivität auf die einzelnen Fraktionen nach einer Gelfiltration von  $\text{Na}_4\text{ÄDTA-2-}^{14}\text{C}$  über Sephadex G10. Fraktionsgröße 1,8 ml.



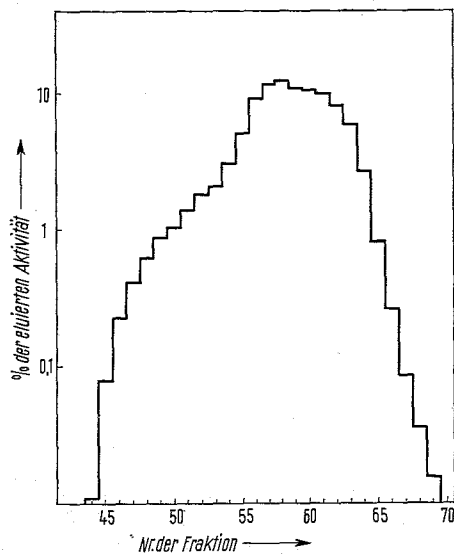


Abb. 3. Verteilung der eluierten Aktivität auf die einzelnen Fraktionen nach einer Gelfiltration von  $\text{Na}_4\text{ÄDTA}$ -äthylen- $^{14}\text{C}$  über Sephadex G10. Fraktionsgröße 1,8 ml.

in einem einzigen stark verbreiterten Peak gefunden (Abb. 2 u. 3). Das letztere betrifft das äthylenmarkierte ÄDTA und das von *Schweer* synthetisierte DTPA-1- $^{14}\text{C}$ . Diese beiden Verbindungen werden übrigens auch in vivo ohne vorherige Reinigung zu einem deutlich niedrigeren Prozentsatz veratmet.

Lösungen von den ungereinigten und den gereinigten Chelatbildnern sowie den abgetrennten Verunreinigungen (7,4 bis 57 nCi/ml) wurden in vivo in der von *Havlicek* et al. beschriebenen Anordnung getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 wiedergegeben und lassen sich dahingehend zusammenfassen:

1. Der Veratmungseffekt ist für ÄDTA-2- $^{14}\text{C}$ , entsprechend dem vom Hersteller angegebenen Verunreinigungsgrad, um einen Faktor von 2 bis 3 größer als bei dem ÄDTA-1- $^{14}\text{C}$ .
2. Nach Reinigung der Chelatbildner sinkt die  $^{14}\text{C}$ -Aktivität in der Exspirationsluft deutlich ab, und zwar bei ÄDTA-1- $^{14}\text{C}$ , ÄDTA-2- $^{14}\text{C}$

Tabelle 2. Veratmung  $^{14}\text{C}$ -markierter Chelatbildner in vivo. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Je sechs Tiere pro Gruppe.

Substanz		% der $^{14}\text{C}$ -Dosis		
		0 bis 4 Std.	0 bis 8 Std.	0 bis 24 Std.
$\text{Na}_2\text{CaÄDTA-1-}^{14}\text{C}$	ungereinigt	0,281 $\pm$ 0,027	0,429 $\pm$ 0,074	0,594 $\pm$ 0,183
	Peak I	0,0234 $\pm$ 0,0014	0,0628 $\pm$ 0,0040	0,144 $\pm$ 0,0175
	Peak II	3,05 $\pm$ 0,311	5,17 $\pm$ 0,43	6,12 $\pm$ 0,482
$\text{Na}_2\text{CaÄDTA-2-}^{14}\text{C}$	ungereinigt	1,235 $\pm$ 0,062	1,577 $\pm$ 0,028	1,683 $\pm$ 0,036
	Peak I	0,0649 $\pm$ 0,0032	0,1124 $\pm$ 0,0044	0,1691 $\pm$ 0,036
	Peak II	31,75 $\pm$ 2,52	40,19 $\pm$ 1,16	41,64 $\pm$ 1,12
$\text{Na}_2\text{CaÄDTA-äthylen-}^{14}\text{C}$	ungereinigt	0,0449 $\pm$ 0,0048	0,0861 $\pm$ 0,0173	0,138 $\pm$ 0,048
	Peakmaximum	0,0193 $\pm$ 0,0009	0,0376 $\pm$ 0,0017	0,0579 $\pm$ 0,0029
$\text{Na}_3\text{CaDTPA-}^{14}\text{C-(Geigy)}$	ungereinigt	1,613 $\pm$ 0,103	1,854 $\pm$ 0,083	1,933 $\pm$ 0,082
	Peak I	0,0338 $\pm$ 0,0035	0,0727 $\pm$ 0,0062	0,1223 $\pm$ 0,0192
	Peak II	14,25 $\pm$ 1,31	19,28 $\pm$ 1,88	21,64 $\pm$ 2,18
$\text{Na}_3\text{CaDTPA-}^{14}\text{C-(Schweer)}$	ungereinigt	0,0985 $\pm$ 0,0163	0,1703 $\pm$ 0,0127	0,1954 $\pm$ 0,0144
	Peakmaximum	0,0337 $\pm$ 0,0048	0,0839 $\pm$ 0,0026	0,1135 $\pm$ 0,0055

sowie DTPA-1-<sup>14</sup>C (Geigy) auf etwa den gleichen Wert.

3. Die abgetrennten Verunreinigungen werden zu einem wesentlich höheren Prozentsatz als die nicht gereinigten Ausgangspräparate metabolisiert.

4. Die bereits im Elutionsdiagramm homogener erscheinenden Chelatbildner (äthylenmarkierte ÄDTA und DTPA nach *Schweer*) ergeben einen geringeren Veratmungseffekt.

### Elektrophoretische Untersuchungen

*Havlicek* et al. hatten bei ihrer Untersuchung des ÄDTA-1-<sup>14</sup>C und des DTPA-1-<sup>14</sup>C (Geigy) weder bei der Papierchromatographie noch mittels Hochspannungselektrophorese nennenswerte Verunreinigungen, die den Veratmungseffekt erklären könnten, gefunden. Zum Nachweis der in vorliegender Arbeit gefundenen geringfügigen Verunreinigungen muß ihre Methode jedoch als nicht genügend genau angesehen werden. Daher wurden die beiden Injektionslösungen mit ungereinigtem und gereinigtem ÄDTA-2-<sup>14</sup>C sowie die deren Verunreinigung enthaltende dritte Lösung auf einer Zellulosedünnschicht, die meist bessere Auftrennungen gewährleistet, hochspannungselektrophoretisch untersucht (Abb. 4). Bei dem ungereinigten und dem gereinigten ÄDTA ist der Hauptteil der Radioaktivität identisch mit dem anfärbbaren Chelat. Beide Flecke besitzen eine radioaktive Schleppe, die keine Farbreaktion gibt und bei der gereinigten Verbindung deutlich kürzer ist. Die Lösung mit der aktiven Verunreinigung ist in zwei Flecke, einen großen inaktiven und färbbaren sowie

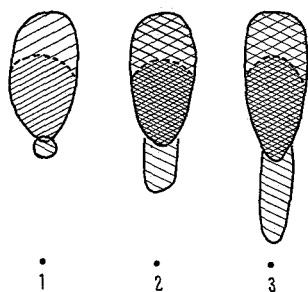


Abb. 4. Hochspannungselektropherogramm von Injektionslösungen. 1. Von ÄDTA-2-<sup>14</sup>C abgetrennte Verunreinigung. 2. Gereinigtes ÄDTA-2-<sup>14</sup>C. 3. Ungereinigtes ÄDTA-2-<sup>14</sup>C, je 6 µl aufgetragen (von links oben schraffiert = radioaktiv, von rechts oben schraffiert = mit Sprühreagenz anfärbbar).

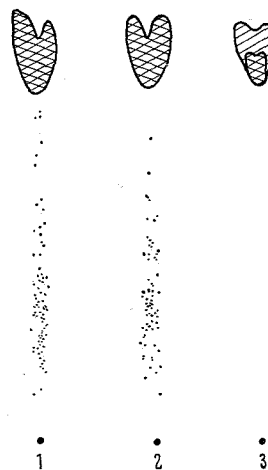


Abb. 5. Autoradiogramm eines Papierchromatogramms. Papier: Whatman No. 1. Laufmittel: Isopropanal, HCl 0,2 N (1:1 V/V). Temperatur: 22° C. Zeit: 10 Std., absteigend. Substanzen: je 6 µl aufgetragen. 1. Lösung mit ungereinigtem ÄDTA-2-<sup>14</sup>C. 2. Lösung mit gereinigtem ÄDTA-2-<sup>14</sup>C. 3. Lösung mit ÄDTA und abgetrennter Verunreinigung (von links oben schraffiert = radioaktiv, von rechts oben schraffiert = mit Sprühreagenz anfärbbar).

einen kleinen kreisförmigen und aktiven, der keine Farbreaktion gibt, auftrennbar. Aus der runden Form des von der Verunreinigung hervorgerufenen Flecks läßt sich auf eine weitgehende Homogenität der Substanz schließen, wogegen die lange Schleppe — analog dem Elutionsdiagramm — für eine Vielzahl von Substanzen spricht. Die Größe der färbbaren Flecke ist auf die hohe Trägerkonzentration (200 µmol/ml), dergegenüber die Menge der radioaktiven Verunreinigung vernachlässigbar ist, zurückzuführen. Die Trennung ist nicht sehr deutlich, wegen der voneinander unabhängigen Nachweismethoden für Radioaktivität und ÄDTA jedoch ausreichend. Dieselben Lösungen ergeben bei der Papierchromatographie nach *Foreman* et al. (1953) keine Auftrennung (Abb. 5), was wegen des zu hohen R<sub>F</sub>-Werts von 0,8 auch kaum zu erwarten war. Die Ablagerung radioaktiver Kristalle entlang des Laufweges dürfte auf ein Ausfallen des freien H<sub>4</sub>ÄDTA in dem sauren Laufmittel (pH 1,5) zurückzuführen sein. Der Vergleich zwischen Hochspannungselektrophorese und Papierchromatographie zeigt, daß der von *Foreman* et al. (1953) allein aus papierchromatographischen Untersuchungen gezogene Schluß auf Einheitlichkeit des ÄDTA-2-<sup>14</sup>C nicht zulässig ist.

### Diskussion

Unsere Befunde widerlegen eindeutig die von Havlíček et al. aufgestellte Hypothese über die Metabolisierung der Chelatbildner vom Typ der Polyaminopolycarboxylsäuren. Ob diese Substanzen möglicherweise doch zu einem minimalen Prozentsatz abgebaut werden, kann natürlich nicht eindeutig entschieden werden. Daß die hier als gereinigt bezeichneten Präparate nicht als völlig radiochemisch sauber betrachtet werden können, ist aus dem Elektropherogramm ersichtlich und nach den Elutionsdiagrammen auch nicht zu erwarten. Es dürfte einleuchten, daß ein einziger Reinigungsschritt nicht ausreichen kann, um die Chelatbildner von allen ihnen beliebig ähnlichen Verunreinigungen abzutrennen. Als radioaktive Verunreinigungen kommen Autoradiolyseprodukte und/oder Vorstufen der ÄDTA-Synthese in Frage. Die Feststellung von Foreman et al. (1953, 1960), daß ÄDTA und DTPA höchstens zu einem Anteil, der kleiner als 0,1% der verabfolgten Dosis ist, veratmet werden, konnte somit bestätigt werden. Ein so geringfügiger Abbau kann nicht zur Erklärung der toxischen Wirkung der Chelatbildner herangezogen werden.

Auf Grund unserer Ergebnisse werden kritische Anmerkungen zu Arbeiten notwendig, die mit

ungereinigten Chelatbildnern durchgeführt wurden. Bohne et al. (1968) fanden für die Plasmaclearance des ÄDTA und DTPA bei der Ratte einen multiexponentiellen Verlauf. Ein Teil der Aktivität wurde mit einer Halbwertszeit von 20 Minuten, der andere mit einer Halbwertszeit von 20 bis 40 Stunden ausgeschieden. Der „langsame“ Term beträgt weniger als 0,1% der verabfolgten Dosis und wurde von den Autoren durch die Bindung der Chelate bzw. ihrer Metabolite durch Plasmaproteine erklärt. Diese Möglichkeit ist zwar nicht auszuschließen, es muß aber beachtet werden, daß dieser zweite Anteil auch aus Verunreinigungen und/oder deren Metaboliten bestehen könnte. Zur Klärung dieser Frage müßten die Versuche mit gereinigten Präparaten wiederholt werden. Analoge Überlegungen gelten für die Arbeit von Weber (1969), der nach i.v. Injektion die Verteilung von ÄDTA-2-<sup>14</sup>C bei Ratten autoradiographisch untersuchte. Da die abgelagerte Aktivität nur einen minimalen Bruchteil der applizierten Dosis ausmacht und Weber die Verbindung mit der stärksten Verunreinigung benutzt hatte, kann auch hier nicht ausgeschlossen werden, daß es sich möglicherweise bei der aufgefundenen <sup>14</sup>C-Aktivität um radioaktive Verunreinigungen und/oder deren Metaboliten handelt.

### Zusammenfassung

Es wurde *in vitro* gezeigt, daß bestimmte Organe der Ratte, besonders die Nieren, in der Lage sind, bei Inkubation von <sup>14</sup>C-markiertem ÄDTA <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> durch eine enzymatische Reaktion freizusetzen. Eine Vertiefung der Untersuchungen durch Heranziehung anderer Chelate, der Gelfiltration und Hochspannungselektrophorese zeigte jedoch, daß die Veratmung zum wesentlichsten Teil auf radioaktive Verunreinigungen zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse wurden durch *in-vivo*-Versuche bestätigt und ihre Bedeutung im weiteren Rahmen diskutiert.

### Summary

It was demonstrated *in vitro* that certain organs of the rat, especially the kidneys, are able to set free <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> by an enzymatic reaction if incubated with <sup>14</sup>C-labelled EDTA. An extension of the investigation to other chelates, gelfiltration and high voltage electrophoresis showed that the respirative oxidation must be related to the greatest part to radioactive impurities. These results were confirmed by experiments *in vivo*. Their general significance was discussed.

### Résumé

On a montré *in vitro* que certains organes du rat, en particulier les reins, incubés avec le <sup>14</sup>C-EDTA sont capables de libérer <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> par un mécanisme enzymatique. Un appro-

fondissement des recherches à l'aide d'autres chélates par filtration sur gel et par électrophorèse haute tension a permis toutefois de montrer que l'expiration de CO<sub>2</sub> était due pour la plus grande partie à des impuretés radioactives du chélate. Ces résultats ont été confirmés in vivo. On discute leur intérêt dans un cadre élargi.

**Schrifttum**

- Beisenherz, G., H. J. Boltze, R. Czok, K. H. Garabade, E. Meyer-Arendt, G. Pfeleiderer: Z. Naturforsch. 8 b (1953), 555.  
Bohne, F., A.-E. Harmuth-Hoene, K. Kürzinger, F. Havlíček: Strahlentherapie 136 (1968), 609.  
Catsch, A.: 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.  
Green, D. E., D. M. Ziegler: Methods in Enzymology VI S. 416. Acad. Press, New York-London 1963.  
Havlíček, F., F. Bohne, H. Zorn: Strahlentherapie 136 (1968), 604.  
Peters, G., H. Keberle, K. Schmid, H. Brunner: Biochem. Pharmacol. 15 (1966), 93.  
Weber, K. M.: Strahlentherapie 137 (1969), 708.  
Wharton, C. D.: Methods in Enzymology X, S. 245. Acad. Press, New York-London 1967.  
Yonetani, T.: The Enzymes, Vol. 8, S. 41. Acad. Press, New York-London 1963.  
Zorn, H.: Diss. Karlsruhe 1970.

Anschrift d. Verf.: Dr. rer. nat. H. Zorn, Kernforschungszentrum, Institut für Strahlenbiologie, 75 Karlsruhe I, Postfach 3640.