

KERNFORSCHUNGSZENTRUM

KARLSRUHE

September/Oktober 1967

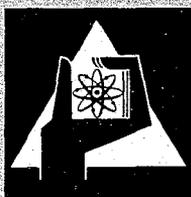
KFK 703

Institut für Strahlenbiologie

Metabolismus und Toxizität therapeutischer Chelatbildner

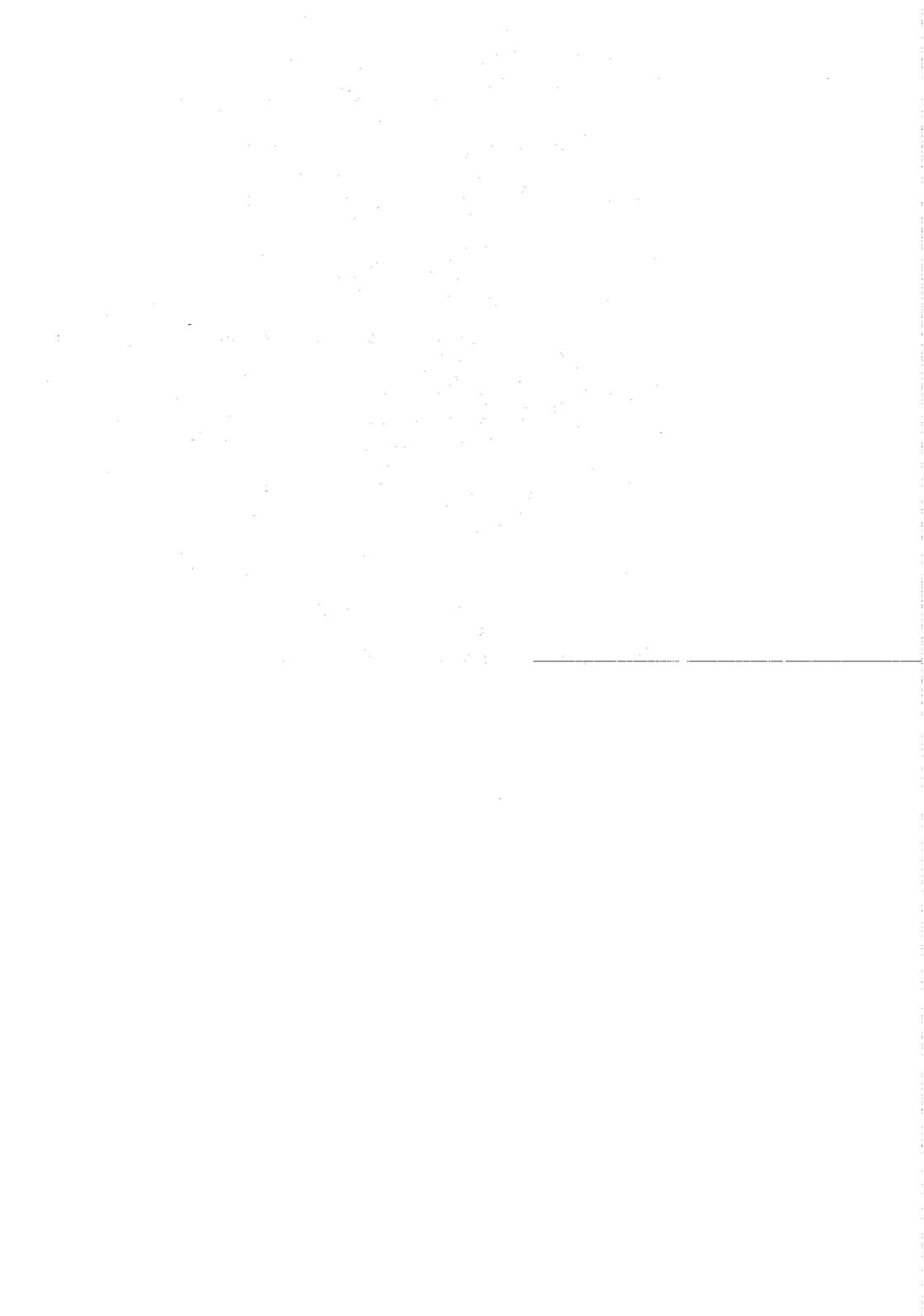
1. - 3. Mitteilung

- A. E. Harmuth-Hoene: Vergleichende Untersuchungen über die Ausscheidung von ÄDTA und DTPA im Urin der Ratte
- F. Bohne, V. Nigrović, A. E. Harmuth-Hoene: Einfluß von DTPA auf die enterale Resorption von Zink
- F. Havlíček: Einfluß von ÄDTA und DTPA auf die Ausscheidung von endogenem Zink



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG

KARLSRUHE



Sonderdruck aus

STRAHLENTHERAPIE Band 134, Heft 1, 110 (1967)

Herausgegeben von Josef Becker, Rudolf Birkner, Hanns Langendorff

VERLAG URBAN & SCHWARZENBERG · MÜNCHEN — BERLIN — WIEN

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

Aus dem Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

Metabolismus und Toxizität therapeutischer Chelatbildner

1. Mitteilung: Vergleichende Untersuchungen über die Ausscheidung von ÄDTA und DTPA im Urin der Ratte

Von

Anna-Elisabeth Harmuth-Hoene

Mit 2 Abbildungen

Einleitung

Im Laufe der letzten 15 Jahre wurden in zunehmendem Maße Untersuchungen über die Verwendung von Chelatbildnern zur Mobilisierung von Radionukliden oder stabilen toxischen Metallen aus dem Säugetierorganismus durchgeführt. Als besonders wirksam erwiesen sich verschiedene synthetische Polyaminopolykarboxylsäuren, und ihre Dekorporationseffektivität für eine Reihe von Metallionen ist heute hinreichend bekannt (Übersicht bei *Catsch*, 1964 b). Um jedoch auf breiter Basis therapeutische Anwendung finden zu können, ist eine gründliche Kenntnis des metabolischen Verhaltens und der Toxizität dieser Chelatbildner eine unerläßliche Voraussetzung.

Es liegen bisher wenige und nur orientierende Untersuchungen über das metabolische Verhalten der synthetischen Polyaminopolykarboxylsäuren vor (*Foreman*, 1960; *Foreman* u. a., 1953; *Stevens* u. a., 1962). Diese Autoren fanden, daß das ^{14}C -markierte Ca-Chelat der Äthylendiamintetraessigsäure (ÄDTA) nach parenteraler Verabfolgung bei Ratten und Menschen schon nach 6 Stunden zu annähernd 95% und in unveränderter Form mit dem Urin ausgeschieden wird, wobei neben der glomerulären Filtration auch eine aktive Sekretion in den Tubuli wahrscheinlich ist. Weniger als 0,1% der Aktivität konnte im ausgeatmeten CO_2 nachgewiesen werden, und die nach 24 Stunden noch im Körper verbleibende Aktivitätsmenge war gleichmäßig über die verschiedenen Organe verteilt. Die Bestimmung des sog. Verdünnungsvolumens ergab eine auf den extrazellulären Raum beschränkte Verteilung des Chelats. Die Resorption von Ca-ÄDTA aus dem Gastrointestinaltrakt betrug im Mittel etwa 5%. Zu abweichenden Resultaten kamen *Darwish* und *Kratzer* (1965) nach oraler Applikation von Zn-ÄDTA · ^{14}C an Hühnern: 4 bis 5% der Aktivität wurden in dem ausgeatmeten CO_2 und 10% im Urin nachgewiesen, wobei jedoch 30% der im Urin ausgeschiedenen Aktivität in Form von Harnsäure vorlagen.

Die Untersuchungen von *Foreman* (1960) zeigten, daß Ca-DTPA · ^{14}C (Diäthylentriaminpentaessigsäure) sich im wesentlichen ähnlich der ÄDTA ver-

hält; eine genauere Analyse der Daten zeigt jedoch, daß die Plasmaclearance der DTPA etwas langsamer als im Falle der ÄDTA verläuft und daß nach 24 Stunden ein etwas größerer Anteil der ^{14}C -Aktivität in den Organen, hauptsächlich in der Niere und in der Leber, zurückbleibt. Ob es sich hierbei um ein Eindringen des Chelatanions in den intrazellulären Raum oder um eine Adsorption an der Zellmembran handelt, mußte zunächst offenbleiben. In diesem Zusammenhang sind einige, das Wirkungsmuster der DTPA betreffende Befunde anzuführen, die für die zuletzt angeschnittene Frage unter Umständen von Bedeutung sein könnten. Es ist zunächst auffällig, daß DTPA die Ausscheidung von „leberaffinen“ Radionukliden (wie z. B. ^{144}Ce und ^{239}Pu) nicht nur mit dem Urin, sondern auch mit den Faeces intensiviert, wobei die Ausscheidungsraten über einige Tage erhöht bleiben (Catsch, 1961; Catsch u. Lê, 1957; Fried u. a., 1959; Smith u. a., 1961; Tregubenko u. a., 1961). Weiterhin ist die Ultrafiltrierbarkeit beider Radionuklide im Leberhomogenat nach DTPA-Behandlung eindeutig erhöht (Catsch u. a., 1961; Lindenbaum u. Schubert, 1960). Diese Befunde und schließlich der direkte Nachweis von ^{239}Pu in der Galle von DTPA-behandelten Ratten (Ballou u. Palotay, 1966) machen es wahrscheinlich, daß ein gewisser Bruchteil der DTPA — entgegen den von Foreman (1960) entwickelten Vorstellungen — in der Lage ist, sich in den Leberzellen anzureichern. Zu ähnlichen Ergebnissen, d. h. zu der Feststellung einer gewissen fäkalen Ausscheidung, kamen auch Rubin und Princiotto (1960), die nach parenteraler Applikation von $^{59}\text{Fe}(\text{III})$ -Chelaten der (2-Hydroxycyclohexyl)äthylendiamintriessigsäure, der bis(2-Hydroxycyclohexyl)äthylendiamindiessigsäure sowie der Äthylendiamin-di(o-Hydroxyphenyl)essigsäure eine erhöhte Fe-Ausscheidung mit der Galle finden. Allerdings handelt es sich hier um Liganden mit einer zyklischen bzw. aromatischen Konfiguration, bei denen ein von den aliphatischen Liganden unterschiedlicher Ausscheidungsmechanismus vorliegen könnte.

Was die Toxizität der Chelatbildner betrifft, wollen wir uns im folgenden nur auf die Ca-Chelate beschränken, denen jetzt allgemein bei Dekorporationsversuchen der Vorzug vor den relativ toxischen, kalzipriven Na-Salzen gegeben wird. Letzteren bleibt nur die Anwendung mit bestimmten Indikationsstellungen (z. B. Hyperkalzämie, Arteriosklerose u. a. m.) vorbehalten.

Die Toxizität der Ca-Chelate der Polyaminopolykarboxylsäuren ist bei einmaliger parenteraler Verabreichung mit LD 50%-Werten von ca. $12 \text{ mM} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Catsch, 1967; Catsch u. a., 1958) relativ niedrig. Bei wiederholter Applikation konnten jedoch auch im niederen Dosisbereich sowohl im Tierexperiment (Foreman u. a., 1956; Catsch, 1963, 1964 a; Reuber u. Schmieler, 1962) als auch klinisch (siehe Übersicht bei Brugsch, 1959; Catsch, 1964 b; Seven, 1960) charakteristische Nierenveränderungen vom nephrotischen Typ nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei im wesentlichen um eine hydropische Degeneration der Zellen in den proximalen Konvoluten. Bezüglich dieser chronischen Toxizität ist DTPA zweimal wirksamer als ÄDTA (Catsch, 1964 a). Die Pathogenese dieser Nierenschäden ist noch nicht geklärt, und es wurden im einzelnen folgende Hypothesen zur Diskussion gestellt:

1. Allen (1951) beobachtete nach parenteraler Verabreichung hypertotonischer Lösungen von Saccharose und Äthylenglykol eine Schädigung der Tubuli, für die er den Begriff der „osmotischen Nephrose“ prägte. Im Hinblick auf die Ähn-

lichkeit, die diese Veränderungen mit den durch Chelatbildner gesetzten Schäden zeigen, wurde von *Butt* (1960), *Foreman* (1963) und *Schwartz* u. a. (1966) auch für die letzteren eine Pathogenese im Sinne der osmotischen Nephrose postuliert. Unseres Erachtens kann jedoch die weitgehende Ähnlichkeit der histologischen Veränderungen allein nicht als zwingendes Argument zugunsten dieser Auffassung angeführt werden. Andererseits ist darauf hinzuweisen, daß die wirksamen Saccharose-Dosen um mindestens eine Größenordnung höher liegen als im Falle der Chelate, und schließlich spricht auch die unterschiedliche Toxizität von Ca-ÄDTA, Ca-DTPA und Zn-DTPA (*Catsch*, 1964 a), d. h. von Chelaten, die sich bezüglich ihres Molekulargewichts nur unwesentlich voneinander unterscheiden, gegen die zur Diskussion gestellte Vorstellung.

2. Da die Stabilität der Ca-Chelate wesentlich niedriger ist als die von endogenen Spurenmetallen, ist die Annahme nicht unplausibel, daß das chelierte Ca^{2+} gegen endogene essentielle Metallionen ausgetauscht wird. Dies könnte seinerseits zu einer Beeinträchtigung der Funktion von metallkontrollierten Enzymen und zu einer dadurch bedingten Ansammlung von Metaboliten in den betroffenen Zellen führen. Von *Foreman* (1960) wurde in diesem Zusammenhang an eine Inaktivierung der Zn-haltigen Karboanhydratase oder der durch Fe kontrollierten Bernsteinsäuredehydrogenase gedacht.

Zugunsten der unter 2. umrissenen Hypothese lassen sich einige experimentelle Befunde anführen. *Candura* u. a. (1960), *Millar* u. a. (1954), *Perry* und *Perry* (1959), *Taruï* (1960), *Teisinger* u. a. (1958) zeigten, daß es unter dem Einfluß von Ca-ÄDTA zu einer deutlich erhöhten Ausscheidung von Zn, nicht aber oder nur in geringem Maße von anderen Spurenmetallen mit dem Urin kommt. *Nigrovié* (1964) zeigte, daß die Ca-Chelate der ÄDTA und DTPA in vivo zu einer ausgeprägten Inaktivierung der Zn-haltigen alkalischen Phosphatase der Nierenrinde führen, wobei die größere Wirksamkeit der DTPA in guter Übereinstimmung mit der unterschiedlichen Toxizität beider Liganden steht. Es sollte schließlich erwartet werden, daß Metallchelate, die eine höhere Stabilität als die Ca-Chelate besitzen, auch eine entsprechend reduzierte Toxizität aufweisen. Dies konnte für die Co(II)- und Zn-Chelate sowohl der ÄDTA (*Sullivan*, 1960; *Steffensen*, 1957) als auch der DTPA (*Catsch*, 1963, 1964 a; *Catsch* u. *von Wedelstaedt*, 1965; *von Wedelstaedt* u. *Catsch*, 1965) auch tatsächlich nachgewiesen werden. Wenn somit schon gewisse Anhaltspunkte für die Deutung der Chelat-Toxizität vorliegen, so sind wir doch von einer vollständigen Aufklärung ihrer Pathogenese noch weit entfernt. Es erschien uns deshalb sowie im Hinblick auf die Widersprüche bzw. Unklarheiten bezüglich des metabolischen Verhaltens der Chelate lohnend, diese Probleme zum Mittelpunkt eines umfassenderen Versuchsprogrammes zu machen.

Die vorliegende erste Mitteilung befaßt sich mit der Ausscheidung der Ca- und Zn-Chelate der ÄDTA und DTPA mit dem Urin in Abhängigkeit von der Chelatdosis. Der Vergleich der Zn- und Ca-Chelate ist insofern von Interesse und praktischer Bedeutung, als die Dekorporationswirksamkeit der Zn-DTPA im Vergleich zum Ca-Chelat nicht wesentlich vermindert ist (*Catsch* u. a., 1964). Da aber andererseits, wie weiter oben bereits erwähnt wurde, die Zn-Chelate auch bei längerer Applikationsdauer eine erheblich geringere Toxizität als die entsprechenden Ca-Chelate zeigen, ist ihr therapeutischer Index (definiert als das Verhältnis der toxischen zur therapeutischen Dosis) nicht unerheblich er-

höht. Eine endgültige Empfehlung der Zn-DTPA würde allerdings erst die Klärung der Frage erfordern, ob und in welchem Umfang das in chelierter Form zugeführte Zn im Körper zurückgehalten wird und ob die evtl. freigesetzte Zn-Menge vom toxikologischen Standpunkt als zulässig angesehen werden darf.

Alle Autoren, welche die Retention von ^{65}Zn nach Verabreichung der markierten Zn-Chelate untersuchten, finden tatsächlich eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Retention von Aktivität im Organismus (*Catsch* u. a., 1964; *Catsch* u. *Lê*, 1966; *Foreman*, 1960; *Rosoff* u. a., 1965; *Stand* u. a., 1962). Was das Ausmaß der ^{65}Zn -Retention in Abhängigkeit von der Art und der Dosis des Liganden betrifft, sind die Ergebnisse jedoch nicht frei von Widersprüchen. *Catsch* und *Lê* (1966) kommen nach einer kritischen Analyse aller zur Verfügung stehenden Daten zu der Schlußfolgerung, daß die ^{65}Zn -Retention mit steigender Chelatdosis abnimmt und daß im höheren Dosisbereich keine nennenswerte Abhängigkeit der Retention von der Art des Liganden vorliegt. Im niederen Dosisbereich jedoch ist die Retention von ^{65}Zn im Falle von Zn-DTPA deutlich höher als nach Verabfolgung von Zn-ÄDTA. Dies ist insofern überraschend, als die sog. effektive Stabilitätskonstante (vgl. hierzu *Heller* u. *Catsch*, 1959) der Zn-DTPA um rund 2 Größenordnungen höher als die der Zn-ÄDTA (*Anderegg* u. a., 1959; *Schwarzenbach* u. a., 1954) ist und somit eine geringere Zn-Retention für die DTPA erwartet werden müßte. Wie von *Catsch* und *Lê* (1965, 1966) angenommen und auch experimentell verifiziert wird, ist es jedoch nicht zulässig, die Retention von ^{65}Zn nach Verabfolgung der markierten Zn-Chelate ausschließlich auf eine echte Abspaltung und Ablagerung des chelierten Zn zurückzuführen; die Autoren konnten vielmehr zeigen, daß der isotopische Austausch des chelierten mit endogenem Zn eine wesentliche Rolle spielt.

In einer früheren Arbeit (*Harmuth-Hoene* u. a., 1966) hatten wir nun eine Methode vorgeschlagen, die mit Hilfe doppelt markierter (^{65}Zn , ^{14}C) Chelate Aussagen gestattet, in welchem Umfang isotopischer Austausch und echte Zn-Ablagerung beteiligt sind. Der Berechnung der austauschbaren endogenen Zinkmenge (Zn_{ex}) liegt folgende Überlegung zugrunde: Die parenteral verabreichte Chelatdosis wird durch die Quotienten $S_1 = ^{65}\text{Zn}/\text{Zn}$ und $S_2 = \text{Zn}/^{14}\text{C}$ charakterisiert, während man die entsprechenden Quotienten im Urin mit U_1 und U_2 bezeichnet. Findet lediglich ein Austausch des applizierten ^{65}Zn mit körpereigenem stabilem Zn und keine Zn-Retention statt, dann werden $U_1 < S_1$ und $U_2 = S_2$. Die austauschbare Zinkmenge entspricht:

$$\text{Zn}_{\text{ex}} = \text{Zn}_{\text{tot}} (S_1/U_1 - 1), \quad (1)$$

wobei Zn_{tot} die als Chelat verabreichte Zn-Dosis ist und Zn_{ex} die gleiche Maßeinheit hat wie Zn_{tot} .

Findet dagegen kein isotopischer Austausch, sondern lediglich eine Abspaltung und Ablagerung des verabreichten Zn statt, dann werden $U_1 = S_1$ und $U_2 < S_2$. Bei einer Mobilisation von endogenem Zn dagegen ist $U_2 > S_2$. Die Menge des abgelagerten Zn berechnet sich durch

$$\text{Zn}_{\text{ret}} = \text{Zn}_{\text{tot}} (1 - U_2/S_2). \quad (2)$$

Ist Zn_{ret} negativ, entspricht es der Menge des mobilisierten endogenen Zn.

Treten isotopischer Austausch und Zn-Retention gleichzeitig auf, entspricht der Bruchteil des abgelagerten ^{65}Zn :

$$^{65}\text{Zn}_{\text{ret}} = 1 - U_1 U_2 / S_1 S_2. \quad (3)$$

Diese Methode ermöglicht es, auf die sehr aufwendige quantitative Erfassung von ^{65}Zn und stabilem Zn im Körper der Ratte und in den Ausscheidungen zu verzichten.

Methodik

Als Versuchstiere dienten weibliche Ratten des Heiligenberg-Stamms mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 223 g (Versuche mit Zn-Chelaten) bzw. 190 g (Versuche mit Ca-Chelaten). Vor der Injektion der Chelate in die Schwanzvene wurde die Urethra abgebunden. 4 Stunden nach der Injektion wurde die freigelegte Blase mittels einer Platinkanüle punktiert, der Urin entnommen und dessen Volumen sofort gemessen. Bis zu Beginn des Versuchs hatten die Tiere freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter ($20 \mu\text{g Zn} \cdot \text{g}^{-1}$); beides wurde während des Versuchs entzogen. Vorversuche an 20 Tieren ergaben, daß die Blase 4 Stunden nach Injektion von 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung im Mittel $1,12 \pm 0,003$ ml Urin enthält und kein wesentlicher Rückstau eintritt.

Es wurden folgende Chelate¹ und Chemikalien verwendet: 1. Na_2 (Zn-ÄDTA), 2. Na_3 (Zn-DTPA), 3. Na_2 (Ca-ÄDTA), 4. Na_3 (Ca-DTPA), 5. metallisches Zink (p. a.), gelöst in konz. HCl (Zn-Gehalt $< 5 \cdot 10^{-7} \%$). Zur Markierung der Chelate dienten $\text{DTPA} \cdot ^{14}\text{C}$ (spez. Aktivität = $7,14 \mu\text{Ci} \cdot \text{mg}^{-1}$)² und $\text{ÄDTA} \cdot ^{14}\text{C}$ (spez. Aktivität = $63,3 \mu\text{Ci} \cdot \text{mg}^{-1}$)³. Beide Substanzen lagen als Säuren vor. ÄDTA $\cdot ^{14}\text{C}$ war in der α -Stellung der Azetatgruppen und DTPA $\cdot ^{14}\text{C}$ am C-Atom der Carboxylgruppen markiert. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen ergaben keine Hinweise für eine Radiolyse der ^{14}C -markierten Liganden. $^{65}\text{ZnCl}_2$ lag in trägerfreier Form in 1 N HCl gelöst vor.³

Die Chelate wurden in Dosen von 1, 10 und 100 μM pro Tier in einem Volumen von 0,5 ml appliziert ($\text{pH} \sim 7$). Die Aktivität betrug für ^{65}Zn 2 bis 10 μCi , für ^{14}C 3 bis 14 μCi . Um sicher zu gehen, daß kein Überschuß an unchelatiertem Zn vorhanden war, hatten die Zn-Chelate einen Überschuß an freiem Liganden, und zwar von 10% (1- und 10- μM -Dosen) bzw. 1% (100- μM -Dosis).

Zur Aktivitätsmessung wurden 0,02 ml des Urins und der Injektionslösungen auf 4 cm breite Filterpapierstreifen aufgebracht (Schleicher & Schüll, Nr. 2043 b) und getrocknet. Die β -Aktivität der Flecken wurde in einem doppelten fensterlosen Methandurchflußzähler mit 4- π -Geometrie gemessen, durch den die Streifen bei einer konstanten Geschwindigkeit von 120 mm/Stunde transportiert wurden. Die Schlitzweite der Blenden betrug 1×36 mm. Die Gesamtaktivität wurde mit Hilfe eines Peakintegrators bestimmt. Die γ -Aktivität bestimmten wir auf den ausgestanzten Flecken in einem NaJ(Tl)-Bohrlochkristall. Um die β -Aktivität des ^{14}C allein zu ermitteln, wurde von der insgesamt gemessenen β -Aktivität die vom ^{65}Zn stammende Aktivität abgezogen; diesen Korrekturwert erhielten wir aus dem Quotienten β -Aktivität/ γ -Aktivität eines ^{65}Zn -Standards, der unter den gleichen Bedingungen wie die Urinproben gemessen wurde. Für jedes Tier wurde die Aktivität in 3 Urinproben bestimmt; die Varianzanalyse ergab einen Standardfehler von 7,5% für die ^{14}C - und von 1,1% für die ^{65}Zn -Messungen.

Urin und Injektionslösungen wurden in Duplikaten nach der Methode von *Vallee* und *Gibson* (1948) auf Zink analysiert. Die Proben wurden in Platintiegeln trocken verascht. Nur zinkfreie bzw. ultrareine Reagenzien kamen zur Verwendung. Zur Entfernung von exogenen Zinkspuren wurden alle Glasgeräte und Pipetten einer Behandlung mit Na_2 -ÄDTA und Dithizon unterzogen, Kanülen und Platintiegel wurden mit verdünnter HNO_3 zinkfrei gemacht. Der Standardfehler für die Zinkbestimmung betrug 3,5%.

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

² Für die Überlassung danken wir den Geigy Research Laboratories, Ardsley, N. Y.

³ The Radiochemical Centre, Amersham.

Ergebnisse

Die Zn-Ausscheidung im 4-Std.-Urin betrug bei 20 Tieren nach i.v. Injektion von 0,5 ml physiologischer NaCl-Lösung $1,27 \pm 0,16 \mu\text{g}$ und zeigt gute Übereinstimmung mit *Millar* u. a. (1954), die eine Ausscheidung von $3,8 \mu\text{g}$ Zink in 18 Stunden fanden. Bei der Berechnung des nach Chelat-Applikation ausgeschiedenen Zn wurde diese Menge in Abzug gebracht. In Tabelle 1 sind der Gehalt des Urins und der injizierten Chelatlösungen an ^{65}Zn , ^{14}C und stabilem Zn sowie die für die Gleichungen (1), (2) und (3) benötigten Quotienten zusammengestellt. Auf die Angabe der Standardfehler für die Mittelwerte von je 4 Analysen der Injektionslösungen wurde verzichtet, weil sie keiner biologischen Variabilität unterliegen.

Nach Verabfolgung von Zn-ÄDTA weichen die Quotienten S_1/U_1 , U_2/S_2 und $U_1 \cdot U_2/S_1 \cdot S_2$ bei allen drei Dosen nur unwesentlich und statistisch nicht signifikant von 1 ab. Im Dosisbereich von 1 bis $10 \mu\text{M}$ Zn-DTPA dagegen sind $U_1 < S_1$, $U_2 > S_2$ und $U_1 \cdot U_2 < S_1 \cdot S_2$. Die Varianzanalyse ergibt eine statistisch gesicherte Dosisabhängigkeit der Quotienten S_1/U_1 (linearer und quadratischer Term $P < 0,001$), U_2/S_2 (linearer Term $P < 0,001$, quadratischer Term $P < 0,02$) und $U_1 \cdot U_2/S_1 \cdot S_2$ (linearer Term $P < 0,005$).

Das unterschiedliche Verhalten beider Komplexbildner zeigt sich deutlich bei der graphischen Darstellung der Größen $S_1/U_1 - 1$, $1 - U_2/S_2$ und $1 - U_1 \cdot U_2/S_1 \cdot S_2$ in Abhängigkeit von der Dosis (Abb. 1).

Durch Multiplikation der Werte in Abbildung 1 mit den entsprechenden Zn-Dosen erhält man die in Tabelle 2 wiedergegebenen Schätzwerte für Zn_{ex} und Zn_{ret} . Sie zeigen, daß bei allen drei ÄDTA-Dosen ein statistisch gesicherter isotopischer Austausch sich zwar nicht nachweisen, aber im Hinblick auf den

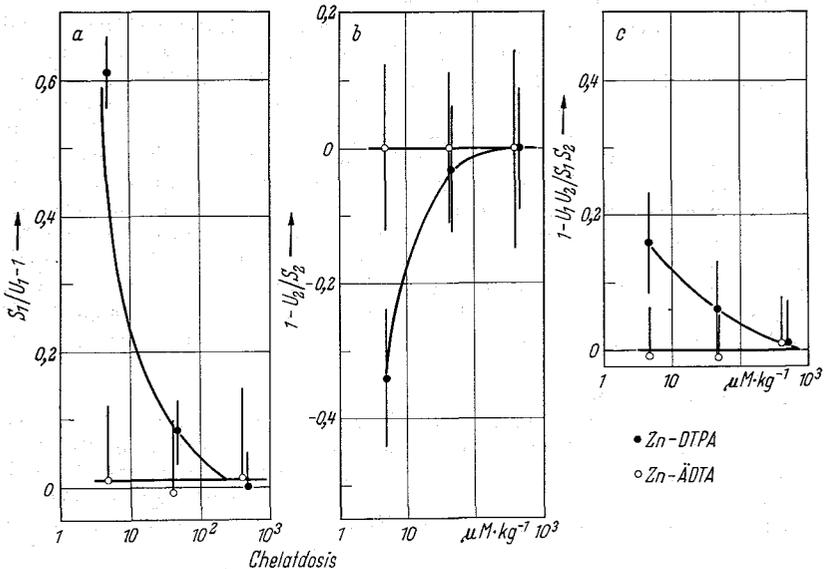
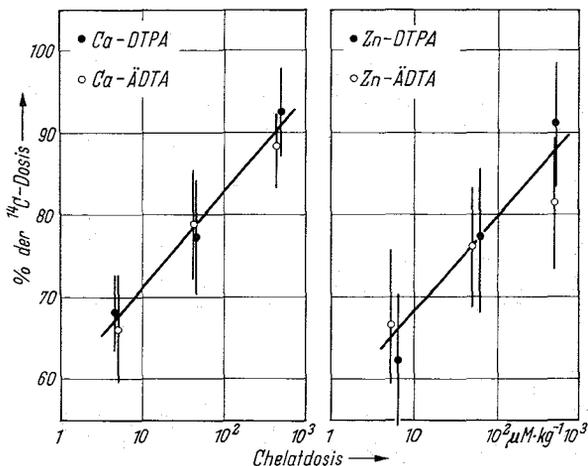


Abb. 1. Isotopischer Austausch (a), Retention bzw. Mobilisation von Zn (b) und Retention von ^{65}Zn (c) in Abhängigkeit von der Chelatdosis. Mutungsbereiche für $P = 0,05$. Weitere Erklärungen s. Text.

Abb. 2. Dosisabhängigkeit der innerhalb von 4 Std. mit dem Urin ausgeschiedenen Chelatmenge. Mutungsbereiche für $P = 0,05$.



relativ großen Mutungsbereich für Zn_{ex} auch nicht ausschließen läßt. Nicht gesichert ist desgleichen die Ablagerung von Zn (Zn_{ret} und $^{65}\text{Zn}_{\text{ret}}$); hierbei sind wiederum weder Zn-Retention noch Mobilisierung von endogenem Zn auszuschließen.

Nach Verabfolgung von 1 und 10 μM Zn-DTPA dagegen ist der isotopische Austausch signifikant, und die entsprechenden Zn_{ex} -Werte zeigen eine relativ gute Übereinstimmung. Besonders hervorzuheben ist, daß die für 1 μM Zn-ÄDTA und Zn-DTPA berechneten Zn_{ex} -Werte sich signifikant ($P < 0,001$) voneinander unterscheiden. Da Zn_{ret} für 1 und 10 μM negativ ist (statistisch gesichert allerdings nur bei der kleineren Dosis), muß eine Mobilisierung von endogenem Zn angenommen werden. Die mobilisierte Zn-Menge beträgt im Mittel 0,30 μM und ist niedriger als die austauschbare Zn-Menge. Die Abnahme der ^{65}Zn -Retention mit steigender Dosis ist, wie bereits erwähnt, signifikant.

Abbildung 2 gibt die innerhalb von 4 Std. ausgeschiedene ^{14}C -Aktivität in Abhängigkeit von Dosis, Art des Liganden und des chelierten Metallions (Ca^{2+} oder Zn^{2+}) wieder. Während die Zunahme der Ausscheidung bei steigender Dosis mit $P < 0,001$ statistisch gesichert ist, bleiben die beiden anderen Faktoren offensichtlich ohne Einfluß.

Diskussion

Vor der Diskussion der Versuchsergebnisse ist es notwendig, auf einen methodisch wichtigen Punkt hinzuweisen. Die Berechnung von Zn_{ex} und Zn_{ret} kann nur dann statistisch signifikante Aussagen zeitigen, solange diese Zn-Mengen nicht wesentlich kleiner sind als die zugeführte Zn-Chelat-Dosis. Anderenfalls werden die für die Gleichungen (1) und (2) relevanten Quotienten praktisch gleich 1, und minimale Unterschiede lassen sich — gleiche experimentelle Genauigkeit vorausgesetzt — naturgemäß in diesem Fall nur schwer sichern. Es liegt somit eine Limitierung der Methode vor, wie sie bei der im Prinzip ähnlichen isotopischen Verdünnungsanalyse bereits bekannt ist. Aus diesem Grunde beschränken wir uns zunächst auf die Diskussion der bei der niedrigsten Dosis (1 μM) erzielten Ergebnisse, da nur in diesem Fall statistisch signifikante Unterschiede im Verhalten beider Chelatbildner beobachtet werden konnten.

Tabelle 1. ^{65}Zn - und ^{14}C -Aktivität sowie Zinkgehalt der injizierten Chelatlösungen und im 4-Std.-Urin von Ratten. Mittelwerte, einfache Standardfehler. Bezüglich der Definition der Quotienten s. Text (S. 113).

	ÄDTA			DTPA		
	1 μM	10 μM	100 μM	1 μM	10 μM	100 μM
<i>Injizierte Lösung:</i>						
^{65}Zn (Imp. $\cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 10^3$)	22,50	22,10	20,85	16,25	36,55	48,80
Zn (mg $\cdot \text{ml}^{-1}$)	0,119	1,157	13,196	0,122	1,194	12,870
^{14}C (Imp. $\cdot \text{ml}^{-1} \cdot 10^5$)	19,52	17,92	12,37	9,13	56,20	30,75
<i>Urin:</i>						
Volumen (ml)	1,18 \pm 0,15	1,26 \pm 0,08	1,81 \pm 0,13	0,91 \pm 0,08	1,10 \pm 0,12	1,18 \pm 0,08
^{65}Zn (Imp. $\cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 10^3$)	6,48 \pm 0,67	7,22 \pm 0,65	4,66 \pm 0,34	5,38 \pm 0,56	14,47 \pm 2,34	17,11 \pm 1,30
Zn (mg $\cdot \text{ml}^{-1}$)	0,035 \pm 0,004	0,374 \pm 0,033	2,961 \pm 0,198	0,065 \pm 0,006	0,517 \pm 0,046	4,485 \pm 0,314
^{14}C (Imp. $\cdot \text{ml}^{-1} \cdot 10^5$)	5,52 \pm 0,53	5,82 \pm 0,56	2,79 \pm 0,20	3,60 \pm 0,33	22,18 \pm 2,91	10,85 \pm 0,52
S_1 / U_1	1,01 \pm 0,05	0,99 \pm 0,05	1,01 \pm 0,06	1,61 \pm 0,02	1,08 \pm 0,02	1,00 \pm 0,02
U_2 / S_2	1,00 \pm 0,06	1,00 \pm 0,05	1,00 \pm 0,07	1,34 \pm 0,05	1,03 \pm 0,04	1,00 \pm 0,04
$U_1 \cdot U_2 / S_1 \cdot S_2$	1,01 \pm 0,03	1,01 \pm 0,03	0,99 \pm 0,04	0,84 \pm 0,03	0,94 \pm 0,03	0,99 \pm 0,03
Anzahl der Tiere	13	14	11	11	13	14

Tabelle 2. Berechnung der austauschbaren endogenen Zn-Menge (Zn_{ex}), der retinierten Zn- und ^{65}Zn -Menge (Zn_{ret} , $^{65}\text{Zn}_{\text{ret}}$). Mittelwerte und Mutungsbereich für $P = 0,05$. Im Falle von (definitionsgemäß sinnlosen) negativen Mutungsgrenzen von Zn_{ex} und $^{65}\text{Zn}_{\text{ret}}$ ist nur die obere Mutungsgrenze angegeben.

	ÄDTA			DTPA		
	1 μM	10 μM	100 μM	1 μM	10 μM	100 μM
Zn_{ex} (μM)	0,01 (0,11)	-0,09 (0,86)	0,99 (14,77)	0,57 (0,53; 0,62)	0,74 (0,31; 1,16)	0 (4,36)
Zn_{ret} (μM)	0 (-0,11; 0,11)	0 (-1,00; 1,00)	0 (-14,45; 14,45)	-0,32 (-0,22; -0,42)	-0,28 (-1,13; 0,58)	0 (-8,81; 8,81)
$^{65}\text{Zn}_{\text{ret}}$ (0/o der ^{65}Zn -Dosis)	-1,0 (6,1)	-1,0 (5,6)	1,0 (9,6)	16,0 (8,5; 23,5)	6,0 (12,8)	1,0 (7,5)

Der erste Unterschied betrifft die Mobilisation von endogenem Zn, die im Falle der DTPA, nicht jedoch bei ÄDTA vorliegt. Der geringfügige Überschuß an freiem Liganden in den Chelatlösungen (s. Methodik) kann für die Mobilisation von endogenem Zn allein nicht verantwortlich gemacht werden. Zwar könnte DTPA, dessen Zn-Chelat eine rund 100mal höhere Stabilität als Zn-ÄDTA aufweist, an sich auch eine dementsprechend höhere Mobilisationswirksamkeit zeigen. Entscheidend jedoch ist der Umstand, daß die rund $0,3 \mu\text{M}$ ausmachende Mobilisation gesichert höher ist als der Überschuß an Zn-freiem Liganden, der nur $0,1 \mu\text{M}$ beträgt. Es muß folglich angenommen werden, daß Zn-DTPA in der Lage ist, ein weiteres Zn^{2+} zu chelieren. Diese Annahme ist insofern begründet, als DTPA 8 Elektron-Donoratome, Zn^{2+} aber eine Koordinationszahl von maximal 4 aufweist, so daß die Zn_2 -DTPA mit einer Konstanten von $10^{4.4}$ eine beachtlich hohe Stabilität besitzt (Anderegg u. a., 1959). Bei der nur 6zähligen ÄDTA dagegen dürften stabile 2:1-Chelate nicht gebildet werden, und der oben erwähnte Unterschied in den durch DTPA und ÄDTA mobilisierten Zn-Mengen findet damit eine zwanglose und befriedigende Erklärung.

Ein weiterer Unterschied liegt darin, daß die ^{65}Zn -Retention in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Catsch und Lê (1966), Rosoff u. a. (1965) nach Verabfolgung von DTPA deutlich größer ist. Falls diesem Befund eine auf Instabilität oder metabolischem Abbau von Zn-DTPA zurückzuführende echte Abspaltung und Retention von Zn ursächlich zugrunde läge, müßte sich dies in einem gesichert positiven Wert für Zn_{ret} äußern. Dies ist jedoch, wie bereits erwähnt, nicht der Fall.

Ein letzter Unterschied ist, daß im Falle von DTPA ein eindeutig höherer Wert für den isotopischen Austausch und damit auch für den formalen Ausdruck des austauschbaren endogenen Zn, d. h. Zn_{ex} , vorliegt. Es erhebt sich hier sofort die Frage, warum der isotopische Austausch im Falle der Zn-ÄDTA gar nicht, zumindest aber in wesentlich geringerem Maße als bei Zn-DTPA wirksam wird. Bei der Diskussion dieser Diskrepanz muß zuerst darauf hingewiesen werden, daß die nach den Gleichungen (1) und (2) berechneten Zn-Mengen nur unter der Voraussetzung gültig sind, daß isotopischer Austausch tatsächlich stattfindet, und in diesem Fall erlaubt unsere Methode tatsächlich eine voneinander unabhängige Erfassung der Austauschvorgänge auf der einen Seite und der echten Retention bzw. Mobilisation von Zn auf der anderen Seite. Geht man jedoch von der Annahme aus, daß isotopischer Austausch grundsätzlich nicht möglich ist, d. h. nur Mobilisation vorliegt, so ist diese Voraussetzung nicht mehr erfüllt, und die nach Gleichung (1) berechneten Werte für Zn_{ex} werden identisch mit den sich aus Gleichung (2) ergebenden Werten von Zn_{ret} . Diese Erklärungsmöglichkeit, d. h. die Annahme, daß DTPA endogenes Zn mobilisiert, ÄDTA dagegen nicht, und daß bei beiden Liganden kein isotopischer Austausch stattfindet, kann sofort aus folgenden Gründen ausgeschlossen werden: 1. Im Falle von $1 \mu\text{M}$ DTPA ist die berechnete Zn_{ex} -Menge statistisch gesichert größer als die mobilisierte Menge von endogenem Zn. 2. Wenn kein isotopischer Austausch, sondern nur Mobilisation von endogenem Zn stattfände, dürfte keine Retention von ^{65}Zn auftreten; es werden jedoch 16% der applizierten ^{65}Zn -Menge retiniert. 3. Die bereits erwähnten Untersuchungen von Catsch und Lê (1965, 1966) haben mit Hilfe einer grundsätzlich anderen Methodik eindeutig den Nachweis erbracht, daß nicht nur bei Zn-DTPA, sondern auch bei Zn-ÄDTA isotopischer Austausch stattfindet.

Eine weitere Denkmöglichkeit wäre die Annahme, daß die Austauschprozesse bei beiden Liganden mit unterschiedlicher Geschwindigkeit verlaufen. Die Komplexchemie kennt zwar sog. robuste Koordinationsverbindungen (e.g. *Schwarzenbach*, 1957), bei denen der Austausch des chelierten Metallions überaus träge verläuft. Da jedoch in unserem Fall das gleiche Metallion, d. h. Zn^{2+} , involviert ist und da außerdem beide Liganden bezüglich Art und sterischer Anordnung der Elektron-Donoratome eng miteinander verwandt sind, kann die Annahme unterschiedlicher Austauschraten ausgeschlossen werden; dies um so mehr, als die geringere Effektivität der ÄDTA auf langsamere Austauschreaktionen dieses Liganden schließen lassen würde, während es sich nach *Margerum* (1959) bei der Zn-ÄDTA um ein ausgesprochen labiles Assoziat handelt, bei dem die Austauschvorgänge nicht meßbar schnell ablaufen.

Es bleibt somit als Erklärung nur die einzige mögliche Annahme, daß die austauschbare endogene Zn-Menge (Zn_{ex}) bei beiden Liganden unterschiedliche Werte aufweist. Diese Aussage kann natürlich nur bedeuten, daß DTPA ein von ÄDTA abweichendes bzw. größeres physiologisches Verteilungsvolumen aufweist. Beide Zn-Chelate unterscheiden sich — wie auch die Ca-Chelate — nur durch die Zahl ihrer negativen Ladungen, und für die letzteren konnte von *Foreman* (1960) ein weitgehend identisches Verhalten, d. h. eine Verteilung im extrazellulären Raum allein, wahrscheinlich gemacht werden. Weiter oben hatten wir nun gezeigt, daß mit der Bildung bimetallischer Zn_2 -DTPA gerechnet werden muß, die nur noch eine negative Ladung aufweist. Es erscheint nun die Annahme nicht unplausibel, daß die nur eine negative Ladung besitzenden Chelationen — im Gegensatz zu den höher geladenen 1:1-Chelaten — eine erhöhte Zellpermeabilität besitzen und dadurch mit mehr endogenem Zn auszutauschen Gelegenheit erhalten. Grundsätzlich könnte auch mit der Bildung gemischter CaZn-DTPA-Chelate gerechnet werden, jedoch ist es äußerst unwahrscheinlich, daß diese Spezies eine nennenswerte Stabilität besitzt, da dann mit einer hohen, kalzipriv bedingten Toxizität der Zn-DTPA gerechnet werden müßte, was jedoch, wie die Untersuchungen von *Catsch* und von *Wedelstaedt* (1965), von *Wedelstaedt* und *Catsch* (1965) zeigen, nicht der Fall ist.

Es bieten sich verschiedene Möglichkeiten für die experimentelle Prüfung obiger Arbeitshypothese an: Falls die Zn-DTPA ein von der Zn-ÄDTA unterschiedliches physiologisches Verteilungsvolumen aufweist, müßte sich dies auch bei einer Analyse der Plasmaclearance manifestieren. Beweisend wäre natürlich der direkte, eventuell histoautoradiographische Nachweis von Zn-DTPA im intrazellulären Raum. Erwähnt sei, daß unsere Arbeitshypothese auch eine befriedigende Erklärung für die in der Einleitung erwähnten Unterschiede im Wirkungsmuster der Ca-Chelate der ÄDTA und DTPA bietet. Als letztes Argument kann darauf hingewiesen werden, daß nach *Gilbert* und *Taylor* (1956) das Blutplasma, das nach den obigen Vorstellungen ein wesentlicher Bestandteil des Zn-haltigen extrazellulären Verteilungsvolumens darstellt, bei einer 223 g schweren Ratte etwa $0,23 \mu M$ Zn enthält. Der von uns berechnete Zn_{ex} -Wert für die $1\text{-}\mu M$ -Dosis liegt jedoch — auch bei Berücksichtigung der Mutungsgrenzen — wesentlich höher, was darauf hinweist, daß sich die Verteilung von Zn-DTPA nicht ausschließlich auf den extrazellulären Raum beschränkt.

Nachdem wir zeigen konnten, daß nach Verabfolgung von $1 \mu M$ Zn-DTPA sowohl isotopischer Austausch als auch eine gesicherte Mobilisation von endogenem Zn wirksam werden, müssen beide Prozesse selbstverständlich und

zwangsläufig auch für höhere Zn-DTPA-Dosen Gültigkeit haben. An sich wäre eine Zunahme der mobilisierten endogenen Zn-Menge mit wachsender Chelatdosis naheliegend. Tatsächlich nehmen die Mittelwerte, wie Tabelle 2 zeigt, jedoch ab; allerdings läßt sich wegen der relativ breiten Mutungsbereiche der Schätzwerte eine Zunahme der mobilisierten Zn-Menge bis maximal $9 \mu\text{M}$ auch nicht ausschließen. Auch eine fehlende bzw. nur geringfügige Zunahme der mobilisierten Zn-Menge wäre keineswegs unerwartet, da die Annahme durchaus plausibel ist, daß die grundsätzlich mobilisierbare endogene Zn-Menge nicht unbegrenzt ist. In diesem Zusammenhang sei auf ähnliche Überlegungen bei *Gilbert* und *Taylor* (1956) hingewiesen. Auf jeden Fall können eine echte Abspaltung und Retention des chelierten Zn, wenn sie bei der niedrigsten Chelatdosis nicht auftreten, erst recht nicht bei höheren Chelatdosen erwartet werden. Die prozentuale isotopisch ausgetauschte Zn-Menge muß selbstverständlich mit wachsender Zn-DTPA-Dosis und erst recht bei einer Zunahme des mobilisierten endogenen Zn abnehmen. Dies ist der Fall, und auch der Schätzwert für Zn_{ex} bleibt innerhalb der experimentellen Genauigkeit bei allen DTPA-Dosen konstant. Es ist sogar der entgegengesetzte Fall denkbar, daß Zn_{ex} mit wachsender Zn-DTPA-Dosis abnimmt; wenn die mobilisierbare Menge des endogenen Zn klein ist, so wird bei hoher Dosierung der Bruchteil von bimetallischem $\text{Zn}_2\text{-DTPA}$, damit aber auch die Erhöhung des physiologischen Verteilungsvolumens vernachlässigbar werden.

Gehen wir jetzt auf die mit ÄDTA erzielten Ergebnisse ein, so ist es nach den vorausgehenden Überlegungen selbstverständlich, daß auch bei diesem Liganden isotopischer Austausch und Retention von ^{65}Zn auftreten müssen. Die von uns erhaltenen Mittelwerte sind allerdings für beide Größen von 0 nicht signifikant verschieden; ein ernsthafter Widerspruch zu unserer Arbeitshypothese liegt jedoch wegen der relativ großen Mutungsbereiche der Schätzwerte sicherlich nicht vor. Es ist in diesem Zusammenhang auch noch einmal auf die Ergebnisse von *Catsch* und *Lê* (1966) hinzuweisen, denen zufolge bei ÄDTA eine Retention von ^{65}Zn auftritt.

Eine befriedigende Erklärung für die von uns beobachtete und bisher von anderen Autoren nicht explizit beschriebene Dosisabhängigkeit der Ausscheidung der Chelate im Urin kann im Moment noch nicht gegeben werden; dies um so mehr, als die Frage des Ausscheidungsmechanismus der Chelate noch nicht eindeutig geklärt ist (*Foreman*, 1960; *Heller* u. *Vostal*, 1964). Eine Denkmöglichkeit, allerdings zunächst rein spekulativer Art, könnte davon ausgehen, daß die Polyaminosäuren die tubuläre Rückresorption von Wasser eindeutig hemmen (*Tregubenko*, 1956). Es wäre nun denkbar, daß die Hemmung der tubulären Wasserrückresorption bei höheren Dosen stärker ausgeprägt ist. Das Fehlen einer Rückresorption und damit auch eines Konzentrationsgradienten könnte unter Umständen das Eindringen der Chelat-Ionen in die Nierenzellen verhindern, was seinerseits zu einer erhöhten Ausscheidung mit dem Urin führen müßte.

In praktischer Beziehung ergibt sich aus der vorliegenden Untersuchung die äußerst bedeutungsvolle Konsequenz, daß eine echte Zn-Retention mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann und damit eventuelle Bedenken bezüglich der therapeutischen Anwendung von Zn-DTPA hinfällig sind.

Zusammenfassung

Es wurde die Ausscheidung der mit ^{65}Zn und ^{14}C markierten Zn-Chelate der Äthylendiamintetraessigsäure (ÄDTA) und Diäthylentriaminpentaessigsäure (DTPA) mit dem Urin bei Ratten untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß der beobachteten Retention von ^{65}Zn isotopischer Austausch mit endogenem Zn, aber keine echte Abspaltung ursächlich zugrunde liegt. Darüber hinaus ist Zn-DTPA in der Lage, endogenes Zn zu mobilisieren. Die Ausscheidungsraten der Ca- und Zn-Chelate nehmen mit steigender Dosis zu.

Summary

The urinary excretion of ^{65}Zn and ^{14}C -labelled chelates of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) was studied in rats. It could be shown that the observed retention of ^{65}Zn is due to isotopic exchange with endogenous Zn; no genuine splitting-off takes place. In addition, Zn-DTPA is capable of mobilizing endogenous Zn. The excretion rates of Ca- and Zn-chelates rise with increasing dosage.

Résumé

On a étudié chez le rat l'excrétion urinaire des chélates de Zn des acides éthylène-diaminetétracétique (EDTA) et diéthylènetriaminepentacétique doublement marqués au ^{65}Zn et au ^{14}C . On a pu ainsi montrer que la rétention observée de ^{65}Zn est due à un échange isotopique avec le Zn endogène et non à un vrai détachement. Le Zn-DTPA est de plus capable de mobiliser du Zn endogène. La vitesse d'excrétion des chélates de Ca et de Zn augmente avec la dose.

Schrifttum

Allen, A. C.: The Kidney. New York 1951. — Andereg, G., P. Nügeli, F. Müller, G. Schwarzenbach: Helv. chim. Acta 42 (1959), 827. — Ballou, J. E., J. L. Palotay: Health Phys. 12 (1966), 895. — Brugsch, H. G.: A.M.A. Arch. industr. Hlth 20 (1959), 285. — Butt, E. M.: Diskussionsbemerkung in: Metal-Binding in Medicine, S. 157. Philadelphia-Montreal 1960. — Candura, F., M. Candura, T. Villa, S. Eszechieli: Lav. umano 12 (1960), 402. — Catsch, A.: Strahlentherapie 114 (1961), 565; Strahlenschutz 3 (1963), 181; Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 246 (1964 a), 316; Radioactive Metal Mobilization in Medicine. Springfield, Ill. 1964 b; Arzneimittel-Forsch. 17 (1967), 493. — Catsch, A., H. Immel-Teller, D. Schindewolf-Jordan: Ztschr. f. Naturforsch. 16 b (1961), 181. — Catsch, A., D. Kh. Lê: Strahlentherapie 104 (1957), 494; Experientia 21 (1965), 724; Strahlentherapie 130 (1966), 557. — Catsch, A., D. Kh. Lê, H. Melchinger: Strahlentherapie 106 (1958), 606. — Catsch, A., E. von Wedelstaedt: Experientia 21 (1965), 210. — Catsch, A., D. Kh. Lê, D. Chambault: Int. J. Radiat. Biol. 8 (1964), 35. — Darwish, N. M., F. H. Kratzer: J. Nutr. 86 (1965), 187. — Foreman, H.: Metal-Binding in Medicine, S. 82. Philadelphia—Montreal 1960; Diskussionsbemerkung in: Diagnosis and Treatment of Radioactive Poisoning, S. 379. Wien 1963. — Foreman, H., C. Finnegan, C. C. Lushbaugh: J. Amer. med. Ass. 160 (1956), 1042. — Foreman, H., T. T. Trujillo: J. Lab. clin. Med. 43 (1954), 566. — Foreman, H., M. Vier, M. Magee: J. biol. Chem. 203 (1953), 1045. — Fried, J. F., E. H. Graul, J. Schubert, W. M. Westfall: Atompraxis 5 (1959), 1. — Gilbert, J. G. F., D. M. Taylor: Biochim. biophys. Acta 21 (1956), 545. — Harmuth-Hoene, A. E., A. Catsch, V. Nigrović, F. Bohne: Int. J. Rad. Biol. 10 (1965), 479. — Heller, H. J., A. Catsch: Strahlentherapie 109 (1959), 464. — Heller, J., J. Vostal: Experientia 20 (1964), 99. — Lindenbaum, A., J. Schubert: Nature 187 (1960), 575. — Margerum, D. W.: J. Phys. Chem. 63 (1959), 336. — Millar, J. M., M. I. Fischer, C. A. Mawson, P. V. Elcoate: Nature 174 (1959), 881. — Nigrović, V.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 249 (1946), 206. — Perry, H. H., E. F. Perry: J. clin. Invest. 38 (1959), 1452. — Reuber, M. D., G. C. Schmieler: Arch. environm. Hlth. 5 (1962), 430. — Rosoff,

B., A. Methfessel, H. Spencer: Fed. Proc. 24 (1965), 170. — Rubin, M., J. V. Princiotta: Ann. N.Y. Acad. Sci. 88 (1960), 450. — Schwartz, S. L., J. R. Hayes, R. S. Ide, C. B. Johnson, P. D. Doolan: Biochem. Pharm. 15 (1966), 377. — Schwarzenbach, G.: Angew. Chem. 70 (1957), 451. — Seven, M. J.: Metal-Binding in Medicine, S. 95. Philadelphia—Montreal 1960. — Smith, V. H., J. E. Ballou, W. J. Clarke, R. C. Thompson: Proc. Soc. exp. biol. Med. 107 (1961), 120. — Stand, F., B. Rosoff, G. L. Williams, H. Spencer: J. Pharmacol. exp. Ther. 138 (1962), 399. — Steffensen, D.: Nature 180 (1957), 827. — Stevens, E., B. Rosoff, M. Weiner, H. Spencer: Proc. Soc. exp. biol. Med. 111 (1962), 235. — Sullivan, T. J.: Arch. int. Pharmacodyn. 124 (1960), 827. — Tarui, S.: Med. J. Osaka Univ. 10 (1960), 499. — Teisinger, J., V. Fiserová-Bergerová: Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg. 16 (1958), 178. — Tregubenko, I. P.: Dokl. Akad. Nauk SSSR 110 (1956), 874. — Tregubenko, I. P., V. G. Yashunsky, D. I. Semenov: Biokhimiya 26 (1961), 177. — Vallee, B. L., J. G. Gibson: J. biol. Chem. 176 (1948), 435. — von Wedelstaedt, E., A. Catsch: Strahlentherapie 128 (1965), 285.

Für technische Assistenz danken wir Frau R. Poefnecker.

Anschrift d. Verf.: Dr. Dr. A. E. Harmuth-Hoene, PhD., Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe, 75 Karlsruhe, Postfach 947.

Aus dem Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

Metabolismus und Toxizität therapeutischer Chelatbildner

2. Mitteilung: Einfluß von DTPA auf die enterale Resorption von Zink

Von

Felicitas Bohne, Vladimir Nigrović und Anna-Elisabeth Harmuth-Hoene

Parenteral verabfolgtes Diäthylentriaminpentaacetat (DTPA) erhöht die Resorption von Eisen aus dem Intestinaltrakt (Nigrović u. a., 1967). In der vorliegenden Untersuchung wird geprüft, ob DTPA einen ähnlichen Einfluß im Falle von Zink ausübt. Diese Frage ist insofern von Interesse, als Zink bei der Pathogenese der DTPA-Toxizität möglicherweise eine zentrale Rolle spielt (Catsch, 1966; Harmuth-Hoene, 1967).

Mit ^{65}Zn markiertes ZnCl_2 (5 bzw. 50 μMol , $\text{pH} \sim 2$) wurde 150 bis 200 g schweren Rattenweibchen des Heiligenberg-Stammes mit einer Schlundsonde verabfolgt; in einer anderen Versuchsreihe injizierten wir intravenös 2,5 μMol ^{65}Zn -markiertes $\text{Zn}[\text{CH}_3\text{COO}]_2$. In beiden Fällen wurde den Tieren 16 Stunden vor ^{65}Zn -Verabreichung das Futter (Altromin-R, 20 mg $\text{Zn} \cdot \text{kg}^{-1}$) entzogen. $\text{Na}_3[\text{Ca-DTPA}]$ (100 μMol) wurde intraperitoneal unmittelbar im Anschluß an ^{65}Zn oder 16 Stunden vorher injiziert. Die Tiere befanden sich 24 Stunden nach ^{65}Zn -Applikation in Stoffwechselkäfigen (Nigrović u. Mohr, 1966). Sie wurden dann getötet und mittels eines Plastikszintillators (\varnothing 18 cm, Tiefe 13 cm) der ^{65}Zn -Gehalt im eviszerierten Körper (K), im Intestinaltrakt mit Inhalt (I), Faeces (F) und Urin (U) bestimmt. Die Aktivitäten drückten wir in Prozent der Bilanz aus, die im Mittel 96% betrug.

Die Ergebnisse sind in tabellarischer Form zusammengestellt (Tab. 1). Bei i.v. Injektion (Nr. 1) wird ^{65}Zn vorwiegend mit den Faeces ausgeschieden; die Quotienten F/U und $(F+I)/U$ betragen 10 bzw. 21. Um die enterale Resorption von ^{65}Zn abzuschätzen (Nr. 3 u. 6), müssen die hierbei beobachteten U -Werte mit den obigen Quotienten multipliziert und das dabei resultierende Produkt zu U und K summiert werden. Es würden demnach 18 bis 21% der 5 μMol -Dosis und 8 bis 11% der 50 μMol -Dosis resorbiert. Die Abnahme der prozentualen Resorption mit wachsender Zn -Dosis wurde bereits von Ballou und Thompson (1961) festgestellt.

DTPA vermindert die Retention und erhöht die Ausscheidung von i.v. injiziertem ^{65}Zn (Nr. 2). Da $U \gg F$ ist, sind bei den Gruppen, in denen DTPA nach oraler Verabfolgung von ^{65}Zn injiziert wurde (Nr. 4 u. 7), keine Korrekturen erforderlich, und $K + U$ kann der resorbierten Menge gleichgesetzt werden. Man erhält 17% der 5 μMol -Dosis und 9% der 50 μMol -Dosis. Offenbar übt also DTPA keinen Einfluß auf die enterale Resorption aus, sondern erhöht nur die Ausscheidung der resorbierten Fraktion mit dem Urin.

Tabelle 1. ^{65}Zn -Gehalt der Bilanz \pm Standardfehler des eviszerierten Körpers (K), Intestinaltrakt (I), Faeces (F) und Urin (U). DTPA wurde sofort nach ^{65}Zn (nach) oder 16 Std. vorher (vor) injiziert. n = Zahl der Tiere.

Nr.	$\mu\text{Mol Zn}$	DTPA	n	K	I	F	U
1	2,5 i.v.	—	12	$64,0 \pm 0,5$	$18,0 \pm 0,4$	$16,4 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,2$
2	2,5 i.v.	nach	12	$10,9 \pm 1,0$	$3,1 \pm 0,3$	$3,8 \pm 0,6$	$82,2 \pm 2,0$
3	5 p.o.	—	5	$16,1 \pm 1,5$	$4,3 \pm 0,4$	$79,4 \pm 1,7$	$0,2 \pm 0,05$
4	5 p.o.	nach	5	$4,4 \pm 0,6$	$1,9 \pm 0,5$	$81,3 \pm 0,5$	$12,4 \pm 0,7$
5	5 p.o.	vor	6	$21,5 \pm 2,0$	$7,3 \pm 0,7$	$70,2 \pm 2,8$	$1,0 \pm 0,1$
6	50 p.o.	—	7	$4,6 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,2$	$93,2 \pm 0,5$	$0,3 \pm 0,1$
7	50 p.o.	nach	7	$1,6 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,2$	$90,2 \pm 1,1$	$7,4 \pm 0,6$
8	50 p.o.	vor	5	$11,1 \pm 0,9$	$8,9 \pm 1,0$	$79,1 \pm 4,3$	$0,9 \pm 0,2$

Dieser Befund wurde mit Hilfe einer anderen Versuchsanordnung bestätigt. 24 Ratten, denen 16 Stunden vorher das Futter entzogen wurde, erhielten intraperitoneal 100 μMol DTPA; 12 Ratten wurden gleichzeitig mit DTPA oral 5,45 $\mu\text{Mol ZnCl}_2$ verabfolgt, die restlichen 12 Tiere dienten als Kontrolle. Im 4-Stunden-Urin (bezüglich Methodik s. *Harmuth-Hoene*, 1967) bestimmten wir den Zn-Gehalt nach *Vallee* und *Gibson* (1948). Er betrug $1,96 \pm 0,07 \mu\text{Mol}$ in der ersten Gruppe und $1,53 \pm 0,08 \mu\text{Mol}$ in der Kontrolle. Die Differenz ($0,43 \pm 0,11 \mu\text{Mol}$) ist 8% der applizierten Zn-Dosis und stimmt mit dem in Nr. 4 ermittelten Resorptionswert von 8 bis 11% gut überein.

Der Umstand, daß Vorbehandlung mit DTPA (Nr. 5 u. 8) zu einer erhöhten Zn-Retention (K) führt, könnte zwanglos mit der Annahme erklärt werden, daß dies eine Folge einer durch DTPA induzierten Verarmung des Organismus an Zn ist; die nach Verabfolgung von DTPA in dem 4-Stunden-Urin ausgeschiedene Menge von 1,53 μMol ist rund das 10fache der Zn-Ausscheidung von 0,2 μMol bei Kontrolltieren (*Harmuth-Hoene*, 1967). Die Frage, ob und in welchem Maße DTPA zu einer Mobilisierung von endogenem Zn führt, wird in der Arbeit von *Havlíček* (1967) geprüft.

Zusammenfassung

Die prozentuale Resorption von Zn aus dem Intestinaltrakt der Ratte nimmt mit steigender Zn-Dosis ab. Gleichzeitig mit Zn, jedoch parenteral verabfolgtes DTPA beeinflusst die Resorption nicht, erhöht jedoch die Ausscheidung der resorbierten Zn-Fraktion und von endogenem Zn mit dem Urin. Vorbehandlung mit DTPA dagegen bedingt eine erhöhte Retention des aus dem Intestinaltrakt resorbierten Zn.

Summary

The relative absorption of Zn from the intestine of the rat decreases with increasing Zn-dosage. Simultaneous parenteral administration of DTPA does not enhance the absorption of Zn but leads solely to an elevated urinary excretion of the absorbed fraction. Pretreatment with DTPA is followed by an enhanced retention of Zn.

Résumé

On a étudié chez le rat l'influence du DTPA sur la résorption intestinale du Zn. L'absorption du Zn par le tube intestinal décroît en pourcentage avec l'accroissement des doses en Zn. L'injection intrapéritonéale simultanée de DTPA ne montre aucune

influence sur cette résorption, mais provoque cependant une augmentation de l'excrétion urinaire de la fraction de Zn résorbée. Un traitement préliminaire au DTPA entraîne une élévation de la rétention du Zn résorbé par le tube intestinal.

Schrifttum

Ballou, J. E., R. C. Thompson: Health Phys. 6 (1961), 6. — Catsch, A.: Nukleonik 8 (1966), 56. — Harmuth-Hoene, A.-E.: Strahlentherapie 134 (1967), 110. — Havlicek, F.: Strahlentherapie 134 (1967), 296. — Nigrović, V., Th. Mohr: Strahlentherapie 130 (1966), 314. — Nigrović, V., P. Spreng, F. Bohne: Radioisotope in der Gastroenterologie, S. 147. Stuttgart 1967. — Vallee, B. L., J. G. Gibson: J. Biol. Chem. 176 (1948), 435.

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

Anschrift d. Verff.: Dr. rer. nat. F. Bohne, Dr. med. V. Nigrović, Dr. agr. A.-E. Harmuth-Hoene, PhD, Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe, 75 Karlsruhe, Postfach 947.

Sonderdruck aus

STRAHLENTHERAPIE Band 134, Heft 2, S. 296 (1967)

Herausgegeben von Josef Becker, Rudolf Birkner, Hanns Langendorff

VERLAG URBAN & SCHWARZENBERG · MÜNCHEN — BERLIN — WIEN

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

Aus dem Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

Metabolismus und Toxizität therapeutischer Chelatbildner

**3. Mitteilung: Einfluß von ÄDTA und DTPA auf die Ausscheidung
von endogenem Zink**

Von

František Havlíček

Mit 5 Abbildungen

Die Tatsache, daß Äthylendiamintetraacetat (ÄDTA) die Ausscheidung von Zn mit dem Urin in starkem Maße erhöht, die von anderen Spurenmetallen dagegen kaum beeinflußt (*Candura* u. Mitarb., 1960; *Millar* u. Mitarb., 1954; *Perry* u. *Perry*, 1959; *Tarui*, 1960; *Teisinger* u. *Fiserová-Bergerová*, 1958), kann als ein Argument zugunsten der Hypothese angesehen werden, daß der Wechselwirkung zwischen ÄDTA (bzw. ihm verwandter Chelatbildner) und endogenem Zn eine für die Toxizität der Chelatbildner pathogenetische Bedeutung zukommt. Entsprechende Untersuchungen mit dem Diäthylentriaminpentaacetat (DTPA), das bezüglich der therapeutischen Effektivität dem ÄDTA eindeutig überlegen ist (vgl. hierzu *Catsch*, 1964 a), wurden bisher nur von *Spencer* und *Rosoff* (1966) durchgeführt; die Autoren fanden beim Menschen eine stärkere Ausscheidung von ^{65}Zn durch DTPA als nach Verabfolgung von ÄDTA. Allerdings ist dieser Befund insofern wenig informativ, als die (auf molarer Basis) unterschiedliche Dosierung der beiden Chelatbildner und der unterschiedliche Zeitpunkt ihrer Verabfolgung einen quantitativen Vergleich erschweren.

Widerspruchsvolle Resultate ergaben sich bezüglich des Einflusses der Chelatbildner auf die fäkale Zn-Ausscheidung. *Millar* und Mitarb. (1955) fanden an Ratten, daß ÄDTA die Ausscheidung von ^{65}Zn mit dem Urin zwar erhöht, die mit den Faeces jedoch herabsetzt, so daß die unter dem Einfluß von ÄDTA insgesamt ausgeschiedene Zn-Menge nur 1,3mal größer als in der Kontrolle ist. *Spencer* und *Rosoff* (1966) stellten — ohne es durch konkrete Daten zu belegen — fest, daß weder ÄDTA noch DTPA beim Menschen eine erhöhte ^{65}Zn -Ausscheidung bewirken, während *Candura* und Mitarb. (1960) unter dem Einfluß von ÄDTA eine rund 1,7mal größere Ausscheidung von stabilem Zn in den Faeces nachwiesen. Die Daten von *Candura* und Mitarb. streuen erheblich, und außerdem ist eine Trennung von endogenem, in den Darm ausgeschiedenen Zn und nicht resorbiertem, d. h. aus der Nahrung stammenden Zn nicht möglich.

Die vorliegende Untersuchung stellt sich die Aufgabe, den Einfluß verschiedener Dosen von ÄDTA und DTPA auf die Ausscheidung von Zn bei der Ratte zu untersuchen.

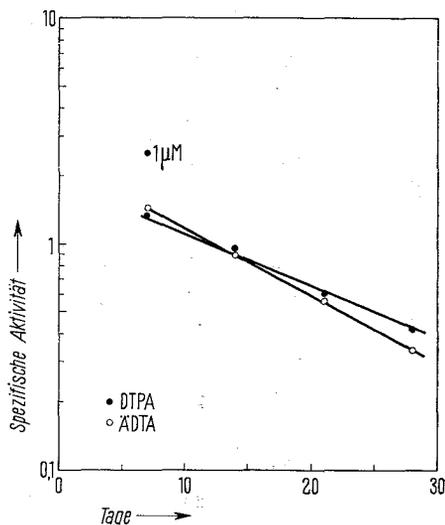
Methodik

Als Versuchstiere dienten Weibchen des Heiligenberg-Rattenstammes, deren Ernährung aus „Altromin-R“-Pellets ($20 \text{ mg Zn} \cdot \text{kg}^{-1}$) und Wasser ad libitum bestand. Trägerfreies $^{65}\text{ZnCl}_2$ ($0,5 \text{ ml}$, $\text{pH} \sim 2$) wurde in die Schwanzvene injiziert, wobei die Aktivität nach Maßgabe der Versuchsdauer 5 bis $15 \mu\text{Ci}$ pro Tier betrug. In den Versuchsserien, in denen der ^{65}Zn - und Zn-Gehalt im 4-Stunden-Urin bestimmt wurde, verwendeten wir die von *Harmuth-Hoene* und Mitarb. (1966) beschriebene Methode, die in der Unterbindung der Urethra und in der Gewinnung des Urins mittels Blasenpunktur besteht; sie hat für unsere Fragestellung den entscheidenden Vorteil, daß eine Kontamination des Urins mit dem aus Faeces und Nahrung stammenden Zn ausgeschlossen ist. Bei dem Versuch, in dem die ^{65}Zn -Ausscheidung mit Urin und Faeces bestimmt wurde, befanden sich die Tiere in speziellen Stoffwechsellkäfigen (*Nigrović* u. *Mohr*, 1966). Die Chelatbildner¹ ($\text{Na}_2[\text{Ca-ÄDTA}]$, $\text{Na}_3[\text{Ca-DTPA}]$ und $\text{Na}_3[\text{Zn-DTPA}]$) wurden, wenn nicht anders angegeben, intravenös injiziert. Die Bestimmung von ^{65}Zn erfolgte mittels eines NaJ(Tl) -Bohrlochkristallszintillators, die von stabilem Zn nach der Methode von *Vallee* und *Gibson* (1948).

Ergebnisse

In der ersten Versuchsreihe wurden Ca-ÄDTA und Ca-DTPA in unterschiedlicher Dosierung und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Verabfolgung von ^{65}Zn injiziert. Tabelle 1 zeigt, daß die Ausscheidung sowohl von Zn als auch von ^{65}Zn in dem Urin mit wachsender Chelatdosis zunimmt, wobei DTPA wirksamer als ÄDTA ist. Während die Ausscheidung von ^{65}Zn mit fortschreitender Zeit kleiner wird, bleibt die durch eine gegebene Dosis eines gegebenen Chelatbildners zur Ausscheidung gebrachte Zn-Menge für alle Zeitpunkte erwartungsgemäß konstant, und die spezifische Aktivität ($^{65}\text{Zn}/\text{Zn}$) nimmt dementsprechend

Abb. 1. Spezifische Aktivität ($^{65}\text{Zn} \cdot 10^2/\text{Zn}$) im Urin nach Verabfolgung von Ca-Chelaten zu verschiedenen Zeitpunkten.



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

ab (Abb. 1). Sieht man von dem exzeptionell hohen Wert in der 1 μ M-DTPA-Gruppe am 7. Tag ab, kann die Abnahme der spezifischen Aktivität befriedigend durch eine einfache Exponentialfunktion approximiert werden. Der Unterschied in der Neigung der ÄDTA- und DTPA-Gruppe ist geringfügig und mit $P = 0,03$ an der Grenze der statistischen Signifikanz.

In einem weiteren Versuch wurde geprüft, ob eine Vorbehandlung mit Ca-DTPA einen Einfluß auf die Mobilisierung von ^{65}Zn und Zn durch eine darauffolgende Ca-DTPA-Dosis ausübt. Die in Tabelle 2 zusammengestellten Ergebnisse zeigen, daß dies nicht der Fall ist.

Wird Zn-DTPA verabreicht, so wird eindeutig mehr ^{65}Zn mit dem Urin ausgeschieden als nach Verabfolgung der gleichen Dosis von Ca-DTPA (Tab. 3). Die ausgeschiedene Zn-Menge ist natürlich erhöht und die spezifische Aktivität erniedrigt.

Tabelle 1. Ausscheidung von Zn und ^{65}Zn mit dem 4-Stunden-Urin in Abhängigkeit von der Dosis des Chelatbildners und vom Zeitpunkt seiner Verabfolgung. Mittelwerte und Mutungsgrenzen für $P = 0,05$. N = Zahl der Ratten.

Chelatbildner	μM	Tag	N	Körpergewicht [g]	Zn [μg]	^{65}Zn [% der Dosis]	$^{65}\text{Zn} \cdot 10^2$
							Zn
ÄDTA	1	7	7	200	4,0 \pm 0,45	0,098 \pm 0,007	2,66
	10	7	6	189	25,4 \pm 2,25	0,55 \pm 0,095	2,18
	100	7	5	212	48,3 \pm 3,33	0,92 \pm 0,070	1,91
	1	14	6	170	4,0 \pm 0,19	0,053 \pm 0,004	1,32
	10	14	6	196	22,8 \pm 1,27	0,32 \pm 0,006	1,41
	100	14	6	180	44,5 \pm 1,02	0,58 \pm 0,019	1,31
	1	21	6	184	5,1 \pm 0,59	0,052 \pm 0,006	1,09
	10	21	5	164	27,2 \pm 2,53	0,20 \pm 0,011	0,73
	100	21	5	187	54,2 \pm 2,54	0,36 \pm 0,022	0,66
	1	28	6	166	8,0 \pm 1,16	0,036 \pm 0,003	0,47
	10	28	5	158	26,3 \pm 3,54	0,13 \pm 0,010	0,53
	100	28	5	162	46,6 \pm 2,65	0,28 \pm 0,011	0,60
DTPA	1	7	6	191	19,1 \pm 0,75	0,73 \pm 0,021	3,81
	10	7	6	185	64,8 \pm 1,94	1,41 \pm 0,022	2,32
	100	7	5	206	91,2 \pm 3,00	1,73 \pm 0,031	1,90
	1	14	7	196	27,3 \pm 2,26	0,36 \pm 0,010	1,32
	10	14	6	189	60,8 \pm 1,54	0,83 \pm 0,029	1,36
	100	14	5	194	71,0 \pm 3,00	1,12 \pm 0,025	1,59
	1	21	5	162	24,2 \pm 2,60	0,22 \pm 0,037	0,91
	10	21	5	169	58,3 \pm 3,14	0,49 \pm 0,027	0,85
	100	21	4	174	80,2 \pm 5,18	0,77 \pm 0,024	0,97
	1	28	7	179	32,1 \pm 1,70	0,20 \pm 0,006	0,64
	10	28	7	176	60,0 \pm 2,56	0,40 \pm 0,017	0,68
	100	28	5	161	90,4 \pm 3,12	0,57 \pm 0,024	0,66

In einer letzten Versuchsreihe wurden 24 Tiere am 8. und 9. Tag und 4 Tiere am 10. Tag nach Injektion von ^{65}Zn in Stoffwechselfäßen gehalten und die tägliche Ausscheidung von ^{65}Zn mit Urin und Faeces bestimmt (Tab. 4). Die Unterschiede der Ausscheidungsraten an den einzelnen Tagen sind nicht signifikant ($P > 0,2$), so daß die Mittelung über alle Tage berechtigt ist. 20 Tiere der gleichen Serie erhielten am 10. Tag Ca-ÄDTA bzw. Ca-DTPA; die dabei beobachteten Ausscheidungsraten sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 2. Ausscheidung von Zn und ^{65}Zn mit dem 4-Stunden-Urin nach i.v. Injektion von $100 \mu\text{M}$ DTPA am 14. Tag in Abhängigkeit von einer Vorbehandlung mit $100 \mu\text{M}$ DTPA pro Tag (intraperitoneal). Mittelwerte und Mutungsgrenzen für $P = 0,05$. N = Zahl der Tiere.

Vorbehandlung am Tag	N	Körpergewicht [g]	Zn [μg]	^{65}Zn [% der Dosis]	$\frac{^{65}\text{Zn} \cdot 10^2}{\text{Zn}}$
—	5	216	$86,7 \pm 4,9$	$0,97 \pm 0,05$	1,13
13.	7	209	$88,6 \pm 3,7$	$1,12 \pm 0,03$	1,28
12., 13.	5	203	$83,4 \pm 4,8$	$1,03 \pm 0,02$	1,25
11., 12., 13.	8	202	$82,3 \pm 4,0$	$1,04 \pm 0,02$	1,26

Tabelle 3. Ausscheidung von Zn und ^{65}Zn mit dem 4-Stunden-Urin nach i.v. Injektion von $10 \mu\text{M}$ DTPA am 7. Tag. Mittelwerte und Mutungsgrenzen für $P = 0,05$. N = Zahl der Tiere.

Art des Chelats	N	Körpergewicht [g]	Zn [μg]	^{65}Zn [% der Dosis]	$\frac{^{65}\text{Zn} \cdot 10^2}{\text{Zn}}$
Zn-DTPA	7	203	$652 \pm 18,8$	$2,29 \pm 0,06$	0,35
Ca-DTPA	5	222	$79,2 \pm 3,27$	$1,51 \pm 0,05$	1,91

Tabelle 4. ^{65}Zn -Ausscheidung bei nicht behandelten Tieren am 8. bis 10. Tag. Mutungsgrenzen für $P = 0,05$. N = Zahl der Tiere.

Tag	N	Körpergewicht [g]	% der ^{65}Zn -Dosis		
			Urin	Faeces	Gesamt
8.	24	176	0,030	2,28	2,35
9.	24	176	0,041	2,08	2,12
10.	4	175	0,036	2,13	2,21
Mittelwert			$0,036 \pm 0,0022$	$2,175 \pm 0,024$	$2,211 \pm 0,074$

Tabelle 5. ^{65}Zn -Ausscheidung am 10. Tag nach Behandlung mit Chelatbildnern. Mittelwerte und Mutungsgrenzen für $P = 0,05$. Je 5 Tiere pro Gruppe.

Chelatbildner	Körpergewicht [g]	% der ^{65}Zn -Dosis		
		Urin	Faeces	Gesamt
ÄDTA $1 \mu\text{M}$	180	$0,132 \pm 0,0095$	$2,134 \pm 0,189$	$2,266 \pm 0,197$
$100 \mu\text{M}$	174	$1,338 \pm 0,041$	$1,556 \pm 0,134$	$2,894 \pm 0,126$
DTPA $1 \mu\text{M}$	178	$0,756 \pm 0,026$	$1,786 \pm 0,129$	$2,542 \pm 0,131$
$100 \mu\text{M}$	173	$2,440 \pm 0,080$	$1,382 \pm 0,047$	$3,822 \pm 0,097$

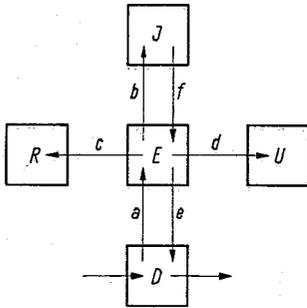


Abb. 2. Schematische Darstellung des endogenen Zn-Pools. D = Darm, E = extrazellulärer Raum, I = intrazellulärer Raum, R = Knochen, Haare u. a., U = Urin. Die einzelnen Transfer-Raten sind durch kleine Buchstaben wiedergegeben.

Diskussion

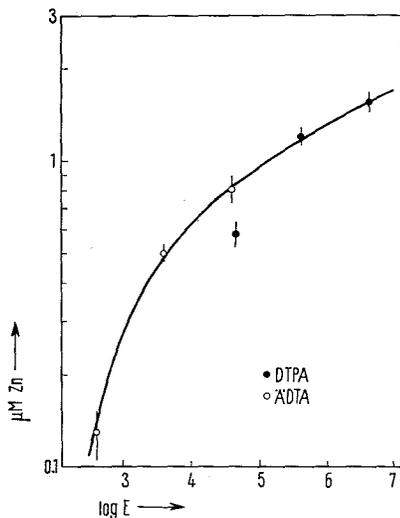
Der Zn-Pool des Säugetierorganismus kann in erster Näherung als ein offenes System aus mehreren Kompartimenten aufgefaßt werden (Abb. 2): Aus dem Darm (D) wird ein bestimmter Bruchteil des in der Nahrung enthaltenen Zn resorbiert und gelangt zunächst in das zentrale Kompartiment des extrazellulären Raums (E), in dem es praktisch vollständig durch die Plasmaproteine gebunden ist. Ein Teil des in E enthaltenen Zn wird mit dem Urin (U) und in den Darm ausgeschieden. Da für den Zn-Pool im nicht wachsenden Organismus ein Steady State anzunehmen ist, muß $a > e$ und $a = d + e$ sein. Aus dem gleichen Grunde sollte der Zn-Transfer zwischen E und dem intrazellulären Raum (I) in beiden Richtungen mit gleicher Schnelligkeit erfolgen, d. h. $b = f$ sein. Ursächlich liegen diesem Transfer isotopischer Austausch sowie Synthese und Abbau Zn-haltiger zellulärer Bestandteile (vornehmlich von Enzymen) zugrunde. I ist ein heterogenes Kompartiment und sollte an sich in weitere (parallel oder in Serie geschaltete) Kompartimente unterteilt werden. Die Untersuchungen von Ballou und Thompson (1961), Gilbert und Taylor (1965) und Taylor (1961) zeigen schließlich, daß ^{65}Zn in bestimmte, in unserem Modell mit R bezeichnete Gewebe (Knochen, Haare u. a. m.) abgelagert und aus diesen nur extrem langsam eliminiert wird. Der rückläufige Transfer von R nach E ist deshalb in Abbildung 2 auch unberücksichtigt geblieben.

Die Analyse der Ergebnisse hat zweckmäßigerweise von den sog. Effektivitätskonstanten E auszugehen; die Größe von E hängt von der Chelatdosis, den Stabilitätskonstanten der Zn- und Ca-Chelate (Ca^{2+} als wichtigstes konkurrierendes endogenes Kation) und vom pH ab (vgl. hierzu Catsch, 1964 a; Heller u. Catsch, 1959).

Bei der Berechnung von E verwendeten wir die von Anderegg und Mitarb. (1959) für DTPA und von Schwarzenbach und Mitarb. (1954) für ÄDTA bestimmten Stabilitäts- und Basizitätskonstanten; es wurden $\text{pH} = 7,4$ und die Ca^{2+} -Konzentration im Plasma mit 10^{-3} molar angenommen. Für identische Dosen sind die E-Werte des DTPA rund 100mal größer als die von ÄDTA.

Es ist weiterhin zu berücksichtigen, daß bei der von uns gewählten Methodik die Ausscheidung der Ca- und Zn-Chelate des DTPA und ÄDTA von ihrer Dosis abhängt, indem die Ausscheidung der ^{14}C -markierten Chelate mit dem 4-Std.-Urin von 65% der $1 \mu\text{M}$ -Dosis über 77% ($10 \mu\text{M}$) auf 90% der $100 \mu\text{M}$ -Dosis zunimmt (Harmuth-Hoene, 1967). Um die Wirksamkeit der verschiedenen Chelatdosen in unserer Untersuchung miteinander vergleichen zu können, müssen die in Tabelle 1 angeführten Werte entsprechend auf den 24-Stunden-Urin

Abb. 3. Abhängigkeit des im 24-Std.-Urin ausgeschiedenen Zn von der Effektivitätskonstante E. Mutungsbereiche für P = 0,05.



korrigiert werden; die Ausscheidung der Chelate nach 24 Stunden ist praktisch vollständig (Foreman, 1960; Stevens u. a., 1962).

Den Abbildungen 3 und 4 ist zu entnehmen, daß die Abhängigkeit der Zn- und ^{65}Zn -Ausscheidung mit dem Urin von E erwartungsgemäß befriedigend durch eine Kurve wiedergegeben werden kann. Abweichend allein ist die $1\ \mu\text{M}$ -DTPA-Dosis, die in zwei voneinander unabhängigen Versuchsreihen (Abb. 3 u. Tab. 5) eine geringere Effektivität als die ihr bezüglich des E-Werts äquivalente Dosis von $100\ \mu\text{M}$ ADTA zeigt. Bei den in Abbildung 4 wiedergegebenen Daten läßt sich die geringere Wirksamkeit von $1\ \mu\text{M}$ DTPA statistisch zwar nicht sichern, jedoch auch — bei Verabfolgung am 14. und 21. Tag — nicht ausschließen. Da eine unerwartet hohe Retention von ^{65}Zn nach Verabfolgung

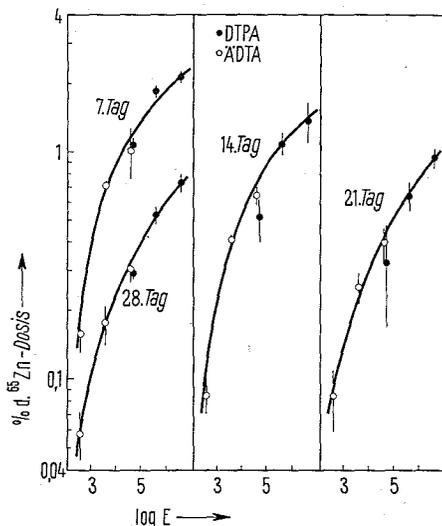


Abb. 4. Abhängigkeit des im 24-Std.-Urin ausgeschiedenen ^{65}Zn von der Effektivitätskonstante E und vom Zeitpunkt der Chelatverabfolgung. Mutungsbereiche für P = 0,05.

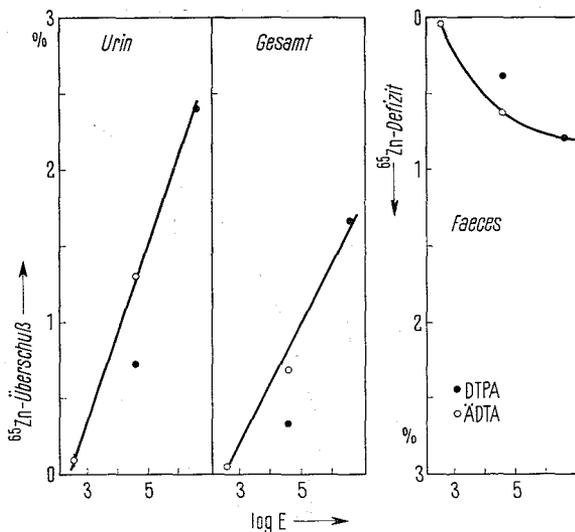


Abb. 5. Abhängigkeit der ⁶⁵Zn-Ausscheidung mit Urin und Faeces von der Effektivitätskonstante E. Vgl. hierzu Tab. 4 und 5 sowie Text.

niedriger ⁶⁵Zn-DTPA-Dosen auch von *Catsch* und *Lê* (1966), *Harmuth-Hoene* (1967) und *Rosoff* und Mitarb. (1965) beobachtet wurde, halten wir den obigen Befund für real.

Das Verhalten der 1 μ M-DTPA-Dosis soll später diskutiert werden, und die folgenden Überlegungen beschränken sich zunächst auf die übrigen Befunde. Subtrahiert man von den in Tabelle 5 angeführten ⁶⁵Zn-Ausscheidungsraten die entsprechenden Mittelwerte von Kontrolltieren (Tab. 4), so zeigt sich, daß unter dem Einfluß der Chelatbildner im Urin mehr ⁶⁵Zn ausgeschieden, die fäkale Ausscheidung dagegen in Übereinstimmung mit *Millar* und Mitarb. (1955) gehemmt wird. Die Gesamtausscheidung jedoch bleibt, wie Abbildung 5 zeigt, eindeutig erhöht. Die 1 μ M-DTPA-Dosis verhält sich übrigens wiederum abweichend, indem die Hemmung der fäkalen Ausscheidung weniger stark als bei 100 μ M ÄDTA ausgeprägt ist; der Unterschied erreicht mit $0,01 > P > 0,001$ volle statistische Signifikanz. Da die spezifische Aktivität des durch die Nieren und in den Darm ausgeschiedenen ⁶⁵Zn annähernd identisch sein sollte, kann gefolgert werden, daß es sich bei der erhöhten Ausscheidung von stabilem Zn mit dem Urin (Abb. 3) um eine echte Mobilisierung von endogenem Zn handelt und nicht nur um eine durch den Chelatbildner bewirkte „Umschaltung“ der Ausscheidung.

Die in Abbildung 3 angeführten Daten zeigen, daß nach Verabfolgung von 1 μ M DTPA rund 0,6 μ M Zn ausgeschieden wird. Dieser Bruchteil von 60% nimmt jedoch mit wachsender Chelatdosis stark ab und beträgt bei 100 μ M DTPA nur noch 1,5%. Dies zeigt, daß die grundsätzlich mobilisierbare Zn-Menge limitiert und relativ klein ist. Bei weiterer Erhöhung der Effektivitätskonstante E würde dementsprechend die mobilisierte Zn-Menge ein Plateau erreichen.

Es erhebt sich nun die Frage, woher das in erhöhtem Maße ausgeschiedene Zn stammt. Das sog. physiologische Verdünnungsvolumen der Chelat-Ionen kann nach *Foreman* (1960) in erster Näherung dem Kompartiment E in unserem Modell des Zn-Pools gleichgesetzt werden. Der Zn-Gehalt des Blutplasmas

beträgt bei einer 200 g schweren Ratte rund $0,16 \mu\text{M}$ (Gilbert u. Taylor, 1956); davon sind jedoch etwa 34% im Sinne eines Metalloproteins sehr fest gebunden (Vallee, 1959) und lassen sich in vitro durch Chelatbildner nicht mobilisieren (Jammers, 1967). Auf jeden Fall ist die Zn-Menge in E erheblich kleiner, als durch die Chelatbildner zur Ausscheidung gebracht wird. Im Hinblick auf den relativ hohen Zn-Gehalt der von uns verwendeten Futterpellets könnte zunächst daran gedacht werden, daß es sich bei der im Überschuß ausgeschiedenen Menge um das aus dem Intestinaltrakt resorbierte Zn handelt. Diese Annahme kann jedoch insofern ausgeschlossen werden, als einerseits $a = d + e$ ist und andererseits Ca-DTPA die enterale Resorption von Zn nicht erhöht (Bohne u. Mitarb., 1967). Da eine Mobilisierung aus R definitionsgemäß ausgeschlossen ist, muß gefolgert werden, daß das mobilisierte Zn nicht nur aus E, sondern auch aus dem Kompartiment I stammt, und zwar infolge der Störung des Gleichgewichts $E \rightleftharpoons I$. Diese Deutung ist durchaus plausibel, da der Einbau von ^{65}Zn in I relativ schnell verläuft und $b = f$ ist.

Die durch Chelatapplikation bewirkte Verarmung von E und I an Zn kann nur kurzdauernd sein, da anderenfalls die durch DTPA mobilisierte Zn- und ^{65}Zn -Menge nach DTPA-Vorbehandlung erniedrigt sein müßte, was aber nicht der Fall ist (Tab. 2). Das Zn-Defizit in E und I wird offenbar sehr schnell durch enteral resorbiertes Zn aufgefüllt. Diese Vorstellung wird durch die Untersuchungen von Bohne u. Mitarb. (1967) bestätigt, denen zufolge oral verabfolgtes ^{65}Zn nach DTPA-Vorbehandlung in erhöhtem Maße im Körper zurückgehalten, d. h. $d + e < a$ wird.

Die Beobachtung, daß Zn-DTPA mehr ^{65}Zn mobilisiert als Ca-DTPA (Tab. 3), mag auf den ersten Blick paradox erscheinen, bestätigt jedoch analoge Befunde von Catsch und Lê (1965, 1966) und läßt nur die eine Deutung zu, daß es sich dabei um isotopischen Austausch zwischen endogenem und dem durch den Chelatbildner gebundenen Zn handelt und daß die austauschbare Zn-Fraktion größer als die mobilisierbare ist. Wiederum von der Annahme ausgehend, daß die Chelat-Ionen sich vornehmlich im extrazellulären Raum verteilen, würde dies bedeuten, daß das durch DTPA gebundene Zn auch mit dem durch die Plasma-proteine fest gebundenen und nicht mobilisierbaren ^{65}Zn austauscht. Die nach Verabfolgung von $10 \mu\text{M}$ Zn-DTPA ausgeschiedene Zn-Menge beträgt $10 \mu\text{M}$. Dieser Befund könnte als trivial angesehen werden, ist es jedoch insofern nicht, als während der 4 Stunden nur 77% des DTPA ausgeschieden werden (Harmuth-Hoene, 1967). Es ist somit zu folgern, daß Zn-DTPA noch in der Lage ist, unter Bildung von $\text{Zn}_2\text{-DTPA}$ ein zusätzliches Zn^{2+} zu binden. Der Anteil dieser bimetalischen Chelatspezies würde im vorliegenden Fall etwa 30% ausmachen. Bezüglich der komplexchemischen und weiterer tierexperimenteller Befunde, die für die Bildung von $\text{Zn}_2\text{-DTPA}$ sprechen, verweisen wir auf die ausführliche Diskussion bei Harmuth-Hoene (1967).

Die Annahme ist nicht unplausibel, daß das nur eine negative Ladung tragende $\text{Zn}_2\text{-DTPA}$ Zellmembranen leichter als das dreifach negativ geladene Zn- bzw. Ca-DTPA permeiert und damit aber auch ein größeres physiologisches Verteilungsvolumen als die 1:1-Chelate besitzt. $\text{Zn}_2\text{-DTPA}$ könnte sich somit in den Leberzellen anreichern und mit der Galle in den Darm ausgeschieden werden. Dies würde natürlich, was die Zn- und ^{65}Zn -Ausscheidung mit dem Urin betrifft, eine geringere Wirksamkeit ergeben, die jedoch durch eine erhöhte Ausscheidung

in den Darm kompensiert wäre. Genau dieses Verhalten konnten wir für die $1 \mu\text{M}$ -DTPA-Dosis experimentell nachweisen. Daß höhere DTPA-Dosen diesen Effekt nicht zeigen, ist insofern nicht überraschend, als die durch Chelatbildner mobilisierbare Zn-Fraktion limitiert ist und bei ausgesprochenem Chelatüberschuß der prozentuale Anteil der bimetalischen Spezies vernachlässigbar wird.

Die ^{65}Zn -Retention im Gesamtkörper der Ratte folgt bis zum 40. Tag einer multiexponentiellen Funktion: 20% werden mit einer biologischen HWZ von 2 Tagen, die restlichen 80% mit einer HWZ von 33 Tagen ausgeschieden (*Catsch* u. *Lé*, 1966). Zu späteren Zeitpunkten (bis 300 Tage) wird eine weitere Fraktion mit einer erheblich größeren HWZ von > 200 Tagen manifest, bei der es sich im wesentlichen um das im Skelett abgelagerte ^{65}Zn , d. h. das Kompartiment R, handelt (*Ballou* u. *Thompson*, 1961; *Taylor*, 1961). Die spezifische Aktivität des durch Chelatbildner mobilisierten ^{65}Zn nimmt während des Zeitraums, in dem die Komponente mit einer HWZ von 33 Tagen dominiert, interessanterweise erheblich schneller, und zwar mit einer HWZ von nur 11 Tagen ab (s. Abb. 1). Da die spezifische Aktivität des ausgeschiedenen ^{65}Zn mit der spezifischen Aktivität der mobilisierbaren Fraktion des Zn-Pools identisch sein sollte, ist es möglich, die letztere zu konkretisieren. Der Zusammenstellung der ^{65}Zn -Retentionsgleichungen für die einzelnen Organe bei *Ballou* und *Thompson* (1961) ist zu entnehmen, daß in dem uns interessierenden Zeitraum vom 7. bis 28. Tag bei allen Organen und im Blut die Terme mit einer HWZ von > 22 Tagen dominieren. Die einzige Ausnahme stellt die Leber dar, die eine Fraktion mit einer HWZ von 9 Tagen aufweist. Dieser Wert steht mit der von uns für das mobilisierte ^{65}Zn ermittelten HWZ von 11 Tagen in recht guter Übereinstimmung, und es kann somit gefolgert werden, daß bei der von uns postulierten Zn-Mobilisierung aus dem intrazellulären Raum (vgl. S. 297) im wesentlichen die Leber beteiligt ist.

Im Hinblick auf die durch Chelatbildner erhöhte Zn-Ausscheidung mit dem Urin sowie die herabgesetzte Toxizität der Zn-Chelate (*Catsch*, 1964 b; *Catsch* u. v. *Wedelstaedt*, 1965) lag die in der Einleitung erwähnte Annahme eines kausalen Zusammenhangs nahe (*Catsch*, 1966). Obwohl die vorliegende Untersuchung eine echte Mobilisierung von endogenem Zn durch die Chelatbildner nachweisen konnte, erscheint ihre pathogenetische Relevanz fraglich, zumindest was die einfache Gleichsetzung von Toxizität und allgemeiner Verarmung des Organismus an Zn betrifft. Für diese Formulierung ergeben sich aus unserer Untersuchung insofern gewisse Komplikationen, als die durch Chelatbildner induzierte Zn-Defizienz des Organismus nur kurzfristig ist und überaus schnell durch erhöhte Retention des enteral resorbierten Zn kompensiert wird. Weiterhin zeigt DTPA bei der Mobilisierung von endogenem Zn eine 100mal höhere Effektivität als ÄDTA. Was die chronische Toxizität betrifft, weist jedoch DTPA eine nur zweimal höhere Toxizität auf (*Catsch*, 1964 b). Weitere Untersuchungen sind für die Klärung dieser Fragen erforderlichlich.

Zusammenfassung

In Versuchen an Ratten wurde gezeigt, daß die Ca-Chelate des DTPA und ÄDTA zu einer kurzdauernden Verarmung des Organismus an Zn führen. Das Zn wird aus dem extrazellulären und einem Teil des intrazellulären Raums (Leber) mobilisiert und mit dem Urin ausgeschieden, während die fäkale Ausscheidung herabgesetzt wird. DTPA ist 100mal wirksamer als ÄDTA.

Summary

Experiments with rats show that the Ca-chelates of DTPA and EDTA give rise to a transient Zn-depletion of the organism. Zn is mobilized from the extracellular space and partially from the intracellular space, mainly from the liver. The mobilized fraction is excreted with the urine whereas the faecal elimination is lowered. DTPA proved to be 100 times more effective than EDTA.

Résumé

Par expérimentation chez le rat on a pu montrer que les Ca-chélates du DTPA et de l'EDTA conduisaient à un appauvrissement transitoire de la teneur en Zn de l'organisme. La totalité du Zn de l'espace extracellulaire ainsi qu'une partie du Zn de l'espace intracellulaire, surtout du foie, est mobilisé et excrété avec les urines, alors que l'excrétion faecale diminue. Le DTPA est 100 fois plus actif que l'EDTA.

Schrifttum

Anderegg, G., P. Nügeli, F. Müller, G. Schwarzenbach: *Helv. chim. Acta* 42 (1959), 827. — Ballou, J. E., R. C. Thompson: *Health Phys.* 6 (1961), 6. — Bohne, F., V. Nigrović, A.-E. Harmuth-Hoene: *Strahlentherapie* 134 (1967), 293. — Candura, F., M. Candura, T. Villa, S. Eszechieli: *Lav. Umato* 12 (1960), 402. — Catsch, A.: *Radioactive Metal Mobilization in Medicine*. Springfield 1964 a; *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharm.* 246 (1964 b), 316; *Nukleonik* 8 (1966), 56. — Catsch, A., D. Kh. Lê: *Experientia* (Basel) 21 (1965), 724; *Strahlentherapie* 130 (1966), 557. — Catsch, A., E. v. Wedelstaedt: *Experientia* (Basel) 21 (1965), 210. — Foreman, H.: *Metal-Binding in Medicine*, S. 82. Philadelphia — Montreal 1960. — Gilbert, J. G. F., D. M. Taylor: *Biochim. biophys. Acta* (Amst.) 21 (1956), 545. — Harmuth-Hoene, A.-E., A. Catsch, V. Nigrović, F. Bohne: *Int. J. Rad. Biol.* 10 (1966), 479. — Harmuth-Hoene, A.-E.: *Strahlentherapie* 134 (1967), 110. — Heller, H. J., A. Catsch: *Strahlentherapie* 109 (1959), 464. — Jammers, W.: *KFK-Report* 614 (1967). — Millar, M. J., M. G. Fischer, C. A. Mawson, P. V. Elcoate: *Nature* 174 (1954), 881; *Biochem. J.* 60 (1955), 38. — Nigrović, V., T. Mohr: *Strahlentherapie* 130 (1966), 314. — Perry, H. M., E. F. Perry: *J. clin. Invest.* 38 (1959), 1452. — Rosoff, B., A. Methfessel, H. Spencer: *Fed. Proc.* 24 (1965), 170. — Schwarzenbach, G., R. Gut, G. Anderegg: *Helv. chim. Acta* 37 (1954), 937. — Spencer, H., B. Rosoff: *Health Phys.* 12 (1966), 475. — Stevens, E., B. Rosoff, M. Weiner, H. Spencer: *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 111 (1962), 235. — Tarui, S.: *Med. J. Osaka Univ.* 10 (1960), 499. — Taylor, D. M.: *Nature* 189 (1961), 932. — Teisinger, J., V. Fiserová-Bergerová: *Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg.* 16 (1958), 478. — Vallee, B. L.: *Physiol. Rev.* 39 (1959), 443. — Vallee, B. L., J. G. Gibson: *J. biol. Chem.* 176 (1948), 435.

Herrn Prof. Dr. A. Catsch möchte ich für fördernde Diskussionen und sein Interesse an der gesamten Arbeit besonders herzlich danken. Für sorgfältige technische Assistenz danke ich Frau L. Braun und Fräulein D. Domprobst.

Anschrift d. Verf.: Ing. F. Havlíček, Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe, 75 Karlsruhe, Postfach 947.