

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM
KARLSRUHE**

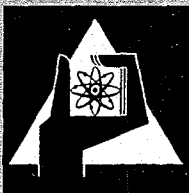
Januar 1967

KFK 572

Institut für Strahlenbiologie

Vergleichende Untersuchungen über die Dekorporationseffektivität von
D-Penicillamin, Penicillosäure und Penillosäure

P. Böhme, A. Catsch



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



Sonderdruck aus:

»**ARZNEIMITTEL-FORSCHUNG**«

»**DRUG RESEARCH**«

Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 17, 19—22 (1967)

Editio Cantor KG / Aulendorf i. Württ.

*Aus dem Institut
für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe*

**Vergleichende Untersuchungen über
die Dekorporationseffektivität von
D-Penicillamin, Penicillosäure und
Penillosäure**

Herrn Dr. med. Werner Heyl zum 75. Geburtstag gewidmet

Von

P. Böhme und A. Catsch

*Aus dem Institut für Strahlenbiologie,
Kernforschungszentrum Karlsruhe*

Vergleichende Untersuchungen über die Dekorporationseffektivität von D-Penicillamin, Penicillosäure und Penillosäure

*Herrn Dr. med. Werner Heyl zum
75. Geburtstag gewidmet*

Von P. Böhme und A. Catsch

Von Büechl und Wiemann [4] wurde auf die Möglichkeit hingewiesen, daß die Penicillosäure (PCS) und Penillosäure (PS) in vivo zu D-Penicillamin (PA) abgebaut werden können. PA selbst hat in den letzten Jahren als Antidot bei Vergiftungen mit bestimmten Schwermetallen wie Hg [1, 12], Pb [3, 5, 8] und Au [6, 7] in zunehmendem Maße an Bedeutung gewonnen. Dies ist durch die beachtlich hohe Stabilität der entsprechenden PA-Chelate [11] sowie durch seine relativ niedrige Toxizität [1] bedingt. Die Frage nach dem Ausmaß der postulierten Umsetzung von PS und PCS zu PA ist dementsprechend von gewissem Interesse, da die beiden Säuren, falls sie tatsächlich biologische Vorstufen des PA darstellten, unter Umständen für eine Prophylaxe von Schwermetallintoxikationen in Frage kämen. Für die experimentelle Prüfung ist in besonderem Maße Co geeignet; L ê [10] konnte nämlich zeigen, daß die Retention von Radiocobalt (^{60}Co) in den Organen der Ratte durch PA stark gehemmt wird.

Methodik

Als Versuchstiere dienten männliche Albinoratten mit einem mittleren Körpergewicht von 238 g, denen $\sim 3 \mu\text{Ci } ^{60}\text{CoCl}_2$ in die Schwanzvene injiziert wurden; der pH der Lösung betrug 2–4, die spezifische Aktivität $\leq 100 \text{ Ci} \cdot \text{g}^{-1}$. Die Tiere wurden nach 72 h getötet, der ^{60}Co -Gehalt der Leber, Nieren, beider Femores sowie in einem aliquoten Teil der Muskulatur (M. quadriceps) mit Hilfe eines NaJ(Tl)-Bohrlochkristalls bestimmt und in % der injizierten ^{60}Co -Menge ausgedrückt. Die Aktivität des Skeletts wurde dabei dem 10fachen beider Femores gleichgesetzt, die Masse der Muskulatur mit 45% des Körpergewichts angenommen.

Die wäßrigen Lösungen von PA, PCS und PS waren auf ein pH von 6–7 eingestellt; sie wurden entweder iv. gleichzeitig mit ^{60}Co (0,5 ml) oder oral mittels einer Schlundsonde (1 ml) verabfolgt. Im letzten Fall wurde den Tieren 18 h vorher das Futter (Standardpellets der Fa. Altromin) entzogen.

Die Effektivität der getesteten Substanzen wird im folgenden definiert als der ^{60}Co -Gehalt der Organe, ausgedrückt in % der entsprechenden Kontrollwerte von unbehandelten Tieren. Führt man die Berechnungen für logarithmisch transformierte Einzelwerte durch, so ist der Standardfehler dieses Quotienten gleich dem Standardfehler der Differenz der logarithmischen Mittelwerte.

Ergebnisse

Da die ^{60}Co -Verteilung über die Organe in Abhängigkeit vom pH der injizierten Lösung, vom Körpergewicht und anderen Faktoren einer gewissen Variabilität unterworfen sein kann, war es geboten, jede der Versuchsreihen mit einer eigenen Kontrollgruppe

Tab. 1: Verteilung von ^{60}Co 72 h nach iv. Injektion. Mittelwerte von 52 Ratten.

Organ	% der ^{60}Co -Dosis
Leber	5,35
Nieren	0,92
Skelett	0,60
Muskulatur	1,90

durchzuführen. Die Mittelwerte aller, insgesamt 52 Tiere umfassenden Kontrollgruppen, sind in Tab. 1 zusammengestellt. Sie bestätigen die bereits früher [10] festgestellte Tat-

sache, daß ^{60}Co relativ sehr schnell aus dem Körper ausgeschieden wird, indem die Aktivität der von uns untersuchten Organe $<10\%$ der injizierten ^{60}Co -Menge ausmacht.

In der ersten Versuchsreihe wurde die Dosis-Abhängigkeit der PA-Effektivität unter optimalen Bedingungen, d. h. bei gleichzeitiger iv. Injektion mit ^{60}Co , bestimmt. Die PA-Dosis variierte von 0,01 bis $316 \mu\text{M}$ pro Tier. Die in Abb. 1 wiedergegebenen Er-

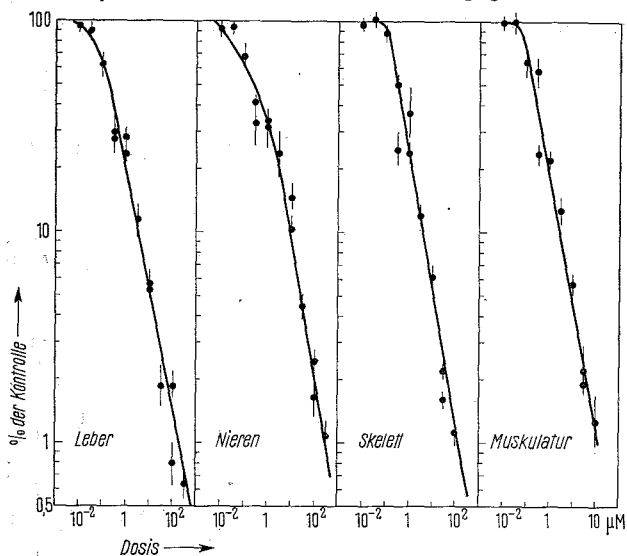


Abb. 1: Einfluß verschiedener PA-Dosen bei gleichzeitiger iv. Injektion auf die ^{60}Co -Verteilung. Mittelwerte (und Standardfehler) von 6–8 Ratten.

gebnisse zeigen, daß eine statistisch signifikante Hemmung der ^{60}Co -Retention in allen Organen bei einer Dosierung von $\geq 0,1 \mu\text{M}$ auftritt und daß Dosen $\geq 100 \mu\text{M}$ die Ablagerung auf $1/100$ und weniger der Kontrollwerte senken. Die Aktivität der Skelett- und Muskulaturproben in der $316 \mu\text{M}$ -Gruppe lag nur wenig über dem Nulleffekt, so daß wir auf ihre Auswertung verzichten mußten.

Werden PCS und PS in einer Dosierung von $100 \mu\text{M}$ pro Tier iv. und gleichzeitig mit ^{60}Co injiziert, so resultiert zwar, wie Tab. 2 zeigt, eine signifikante, jedoch im Vergleich zu PA erheblich schwächere Hemmung der ^{60}Co -Retention. Die im Vergleich zu PCS größere Effektivität der PS ist statistisch gesichert.

Tab. 2: ^{60}Co -Verteilung bei gleichzeitiger iv. Injektion von $100 \mu\text{M}$ PS und PCS. Mittelwerte von 6 Ratten. In Klammern sind die dem Standardfehler entsprechenden Werte angegeben.

Organ	% der Kontrolle	
	PS	PCS
Leber	28,7 (26,3—31,3)	58,0 (34,7—41,5)
Nieren	39,1 (36,6—41,6)	58,7 (56,2—61,3)
Skelett	57,5 (54,4—60,6)	81,4 (79,4—85,4)
Muskulatur	37,2 (35,2—41,7)	54,5 (49,2—60,4)

In einer weiteren Versuchsreihe wurden $600 \mu\text{M}$ PA, PCS bzw. PS oral zu verschiedenen Zeitpunkten vor der iv. Injektion von ^{60}Co verabfolgt. Die Ergebnisse in Abb. 2 u. 3 zeigen außer einem sehr ausgeprägten Effektivitätsunterschied ($\text{PA} \gg \text{PS} > \text{PCS}$) auch eine unterschiedliche Zeit-Abhängigkeit: Während PA einen maximalen Effekt bei der kürzesten Zeitspanne von 30 min, zu späteren Zeitpunkten aber eine progressive Abnahme der Wirksamkeit aufweist, ist dies bei PS und PCS nicht der Fall, da hier die größte Wirkung dann auftritt, wenn die Applikation 1–2 h vorher erfolgt.

Da auch 6–8 h vorher verabreichte PS einen signifikanten Effekt auf die ^{60}Co -Ablagerung ausübt, prüften wir in einem weiteren Versuch die Wirksamkeit von 24 h vorher verabfolgter PS. Tab. 3 zeigt, daß auch in diesem Fall der ^{60}Co -Gehalt der Leber und Nieren gesichert unter dem der Kontrolle liegt.

Die Unterschiede in der Effektivität von PS und PCS einerseits und in der Beeinflussbarkeit der verschiedenen Organe andererseits bleiben auch bei einer Senkung der Dosis auf $190 \mu\text{M}$ (verabfolgt 1 h vor ^{60}Co) in vollem Umfang erhalten (Tab. 4).

Da in allen bisher besprochenen Versuchen PS und PCS an fastende Tiere verabreicht wurden, war in

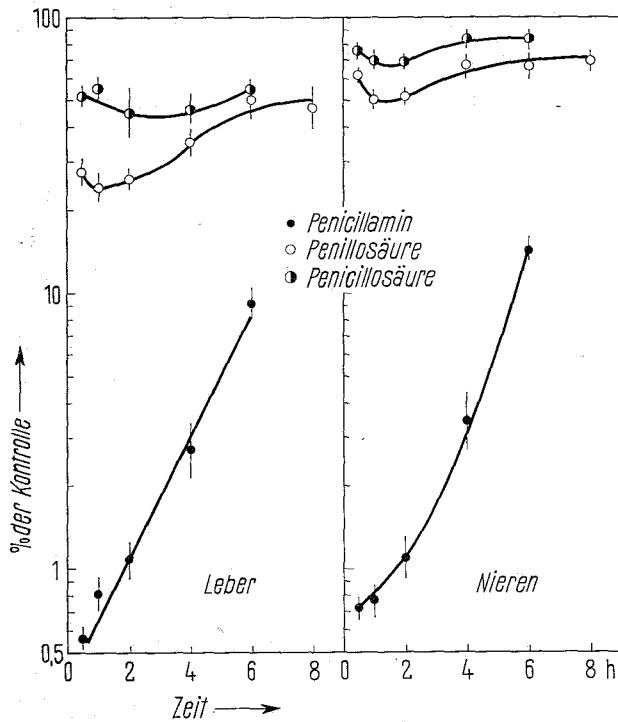


Abb. 2: Einfluß von 600 μ M PA, PS und PCS, oral zu verschiedenen Zeitpunkten vor ^{60}Co verabfolgt, auf die ^{60}Co -Verteilung in Leber und Nieren. Mittelwerte (und Standardfehler) von Ratten.

Tab. 5: ^{60}Co -Verteilung bei einer 24 h vorhergehenden oralen Verabfolgung von 600 μ M PS. Mittelwerte von Ratten. In Klammern sind die dem Standardfehler entsprechenden Werte angegeben.

Organ	% der Kontrolle
Leber	68,5 (62,0—75,2)
Nieren	75,2 (73,1—77,3)
Skelett	109 (100—119)
Muskulatur	81,1 (70,5—92,7)

einem letzten Versuch zu prüfen, ob dieser Faktor die Effektivität der Substanzen beeinflusst. Die in Tab. 5 zusammengestellten Ergebnisse des Versuchs, in dem 600 μ M PS bzw. PCS 1 h vorher an fastende und nicht

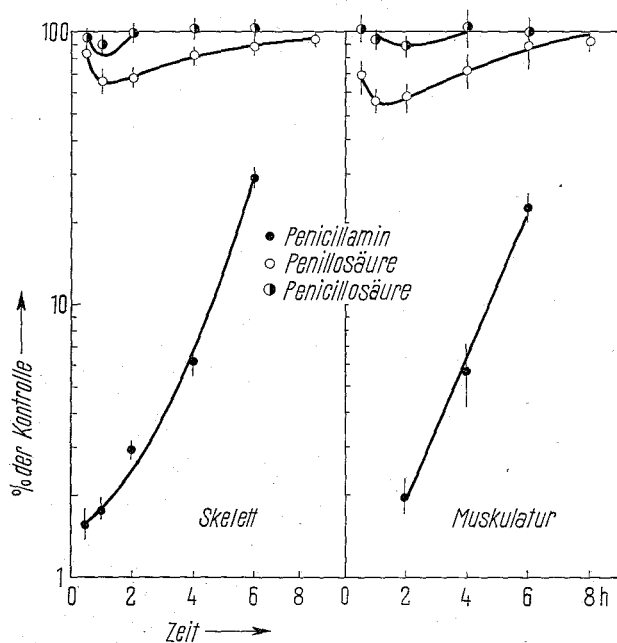


Abb. 5: Einfluß von 600 μM PA, PS und PCS, oral zu verschiedenen Zeitpunkten von ^{60}Co verabfolgt, auf die ^{60}Co -Verteilung in Skelett und Muskulatur. Mittelwerte (und Standardfehler) von Ratten. Die Aktivität der Muskelproben bei Verabfolgung von PA ($1/2$ und 1 h) war zu niedrig, um ausgewertet werden zu können.

Tab. 4: ^{60}Co -Verteilung bei einer 1 h vorhergehenden oralen Verabfolgung von 190 μM PS und PCS. Mittelwerte von Ratten. In Klammern sind die dem Standardfehler entsprechenden Werte angegeben.

Organ	% der Kontrolle	
	PS	PCS
Leber	32,4 (28,6—36,9)	68,9 (60,5—78,8)
Nieren	72,7 (66,6—79,7)	85,5 (81,6—89,5)
Skelett	78,9 (73,6—82,2)	98,6 (93,3—104,2)
Muskulatur	82,2 (70,4—96,2)	80,0 (70,5—90,9)

fastende Tiere verabfolgt wurden, lassen einen stärkeren und gleichsinnigen Einfluß jedoch vermissen. Die Varianzanalyse zeigt, daß nur im Falle der Nieren ein mit $P = 0,01-0,001$ signifikant stärkerer Effekt der PS und PCS bei nicht fastenden Tieren vorliegt.

Tab. 5: ^{60}Co -Verteilung bei einer 1 h vorhergehenden oralen Verabfolgung von $600\ \mu\text{M}$ PS und PCS an fastende und nicht fastende Tiere. Mittelwerte von Ratten. Bezüglich der Signifikanz s. Text.

Gruppe	% der Kontrolle			
	Leber	Nieren	Skelett	Muskulatur
PS fastend	19,6	54,9	68,9	53,3
PS —	18,5	48,9	75,0	72,5
PCS fastend	64,5	86,1	99,4	99,0
PCS —	61,4	69,2	90,1	87,7

Diskussion

In Übereinstimmung mit der bereits früher [1] beschriebenen hohen Wirksamkeit von oral verabreichtem PA, die auf seine annähernd vollständige Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt schließen läßt, finden auch wir nach oraler Applikation von PA eine sehr ausgeprägte Hemmung der ^{60}Co -Retention. Im Wirkungsmuster von gleichzeitig iv. und prophylaktisch oral verabfolgtem PA liegt jedoch ein gewisser Unterschied vor: In Abb. 4 sind die aus der Abb. 1 entnommenen iv. Dosen von PA aufgetragen, welche die gleiche Wirksamkeit wie die zu verschiedenen Zeitpunkten vorher verabreichten $600\ \mu\text{M}$ PA (vgl. Abb. 2, 3) zeigen. Diese Schätzwerte der „äquivalenten Dosis“ sind zwar wegen der steilen Dosis-Effekt-Kurven in Abb. 1 nicht sehr genau, doch dürften folgende Tatsachen unverkennbar sein:

1. Die Zeitabhängigkeit der PA-Effektivität (und damit auch die Blutclearance des PA) weisen eine Halbwertszeit von etwa 1 h auf.
2. Die Gerade, welche die Abhängigkeit von der Zeit für Leber und Nieren wiedergibt, liegt um fast eine Größenordnung höher als die für Skelett und Muskulatur. Anders ausgedrückt, bedeutet dies, daß prophylaktisch verabfolgtes PA die Ablagerung von ^{60}Co in Leber und Nieren relativ stärker als bei gleichzeitiger Injektion beeinflusst. Es wird damit die Annahme nahegelegt, daß PA in diesen Organen, zumindest während der ersten Stunden, angereichert wird bzw. eine längere Verweilzeit aufweist.

Die Wirkung von gleichzeitig mit ^{60}Co injizierten $100\ \mu\text{M}$ PCS und PS kommt der von $0,1$ – $0,3$ bzw. $0,3$ bis $0,5\ \mu\text{M}$ PA gleich (vgl. Tab. 2 u. Abb. 1). Geht man von der in der Einleitung erwähnten Hypothese aus, so müßte auf Grund dieses Ergebnisses angenommen werden, daß die Umsetzung der Säuren zu PA bereits

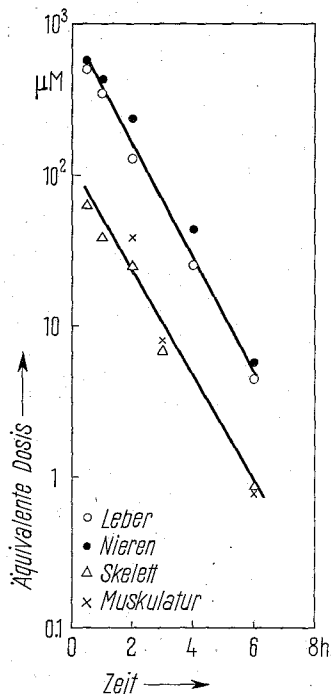


Abb. 4: Äquivalente iv. Dosen von PA nach oraler Verabfolgung von 600 μM PA zu verschiedenen Zeitpunkten. Einzelheiten s. Text

im Blut möglich ist, der umgesetzte Bruchteil mit $\leq 0,5\%$ jedoch verschwindend klein und nur infolge der hohen Effektivität von PA experimentell überhaupt nachweisbar ist. Es kann allerdings auch eine grundsätzlich andere Deutung nicht ohne weiteres ausgeschlossen werden, nämlich daß PS und in geringem Maße PCS selbst chelierende Eigenschaften aufweisen. Die sog. effektive Stabilitätskonstante (vgl. hierzu [9]) der Co(II)-Chelate läge auf Grund des von uns ermittelten Effektivitätsunterschiedes um etwa 3 Größenordnungen niedriger als die des Co(II)-PA. Beide Säuren besitzen tatsächlich mehrere potentielle Ligandenatome (Carboxylsauerstoff, Stickstoff sowie Schwefel in Ätherbindung); es ist jedoch offen, ob ihre ungünstige sterische Anordnung tatsächlich zur Bildung relativ stabiler Chelate führt.

Auch die bei oraler Verabfolgung von PCS und PS erzielten Ergebnisse (Abb. 2, 3, Tab. 3—5) lassen keine eindeutige Entscheidung zwischen beiden Erklärungsmöglichkeiten zu. Geht man von der Annahme aus, daß die Säuren selbst als Chelatbildner fungieren, müßte auf Grund der unterschiedlichen Abhängigkeit von der Zeit (vgl. Abb. 2) postuliert werden, daß PS und PCS langsamer als PA bzw. in tieferen Darmabschnitten resorbiert werden, so daß ein maximaler Effekt erst nach einigen Stunden beobachtet wird. Zugunsten dieser Vorstellung lassen sich im Moment keine direkten Befunde anführen, und die Annahme erscheint uns plausibler, daß PS und PCS im Darm zu PA abgebaut werden und daß dieser Abbau relativ langsam erfolgt. Aus rein chemischen Gründen halten es Büechl u. Wiemann [4] für wahrscheinlich, daß PCS nicht direkt zu PA, vielmehr zuerst oder auch endgültig zu PS umgewandelt wird. Die höhere Wirksamkeit der PS steht mit dieser Vorstellung in guter Übereinstimmung. Die Tatsache schließlich, daß die Zeitabhängigkeit der PCS- und PS-Effektivität im Falle der Leber deutliche Unterschiede aufweist (vgl. Abb. 2) und daß der Unterschied in der Wirksamkeit beider Säuren sich zu späteren Zeitpunkten zu verwischen scheint, könnte als Hinweis dafür angesehen werden, daß die Reaktion: $PCS \rightarrow PS \rightarrow PA$ sich nicht ausschließlich auf den Intestinaltrakt beschränkt, sondern auch in der Leber erfolgen kann.

Zusammenfassend ist somit festzustellen, daß die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zu der von Büechl u. Wiemann [4] postulierten Hypothese, daß PS und PCS biologische Vorstufen des PA darstellen könnten, nicht in Widerspruch stehen, wenn auch diese Vorstellung im Hinblick auf die Möglichkeit, daß PS und PCS selbst als Chelatbildner fungieren können, nicht als streng bewiesen angesehen werden darf. Eine endgültige Entscheidung würde erst der direkte Nachweis von PA (beispielsweise im Blut oder im Urin) nach Verabfolgung der Säuren ermöglichen.

Was die in der Einleitung kurz erwähnten praktischen Aspekte betrifft, so wird in weiteren Untersuchungen zu prüfen sein, welchen Einfluß die möglichen Vorstufen des PA auf das biologische Verhalten von Metallionen ausübt, denen — wie z. B. Pb, Zn, Hg, Cd — eine größere gewerbe-medizinische Bedeutung zukommt.

Zusammenfassung

Es wurde der Einfluß von D-Penicillamin (PA), Penicillosäure (PCS) und Penillosäure (PS) auf die Re-

tention von Radiocobalt in den Organen der Ratte untersucht. Die Ergebnisse sind mit der Annahme vereinbar, daß PS und PCS in vivo zu PA abgebaut werden können.

Für gewissenhafte technische Assistenz danken wir Fr. L. Braun und Fr. M. Peterleit. Die Substanzen wurden uns freundlicherweise von der Fa. Heyl & Co., Berlin 37, zur Verfügung gestellt.

Summary

Comparative Evaluation of the Decorporation Efficacy of D-Penicillamine, Penicilloic and Penilloic Acid

The influence of D-penicillamine (PA), penicilloic (PCS) and penilloic (PS) acid on the retention of radiocobalt was studied in the rat. The results are consistent with the hypothesis that PS and PCS may be degraded *in vivo* to PA.

Literatur

- [1] Aposhian, H. V., Science 128, 93 (1958)
- [2] Aposhian, H. V., and Aposhian, M. M., J. Pharm. exp. Ther. 126, 131 (1959)
- [3] Boulding, J. E., and Baker, R. A., Lancet II 1957, 985
- [4] Büschl, H. u. Wiemann, H., Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 17, 16 (1967)
- [5] Catsch, A., Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 12, 924 (1962)
- [6] Coul, A. A. W. u. Rubens, A., Nederl. T. Geneeskunde 108, 465, (1964)
- [7] Eyring, E. J., and Engleman, E. P., Arthr. Rheumat. 6, 216 (1963)
- [8] Harris, C. E. C., Can. Med. Ass. J. 79, 664 (1958)
- [9] Heller, H.-J. u. Catsch, A., Strahlentherapie 109, 464 (1959)
- [10] Lé, D. Kh., Nature 204, 696 (1964)
- [11] Lenz, G. R., and Martell, A. E., Biochemistry 3, 745 (1964)
- [12] Nigrović, V., Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 13, 787 (1965)

Für die Verf.: Prof. Dr. A. Catsch, Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum, 75 Karlsruhe, Postfach 947

Verantwortlich für die Redaktion: Dr. W. Saenger. Verlag: Editio Cantor, 796 Aulendorf i. W. Ruf: Aulendorf (07525) 431. — Druck: Vereinigte Buchdruckereien, A. Sandmaier & Sohn, 7952 Bad Buchau. Bezugsbedingungen: Die Zeitschrift erscheint monatlich einmal. Sie kann vom Verlag oder durch eine Buchhandlung bezogen werden. Der Bezugspreis beträgt im Abonnement pro Halbjahr (6 Hefte) 35,— DM zuzügl. Versandkosten. Das Einzelheft kostet 6,— DM zuzügl. Versandkosten. Kostenlose Probehefte liefert der Verlag auf Anforderung. A u s l a n d s a b o n n e m e n t s errechnen sich zuzüglich Versand auf der Basis von 78,— DM pro Jahr.